

Aus dem Physiologischen Institut

Lehrstuhl: Physiologie - Zelluläre Physiologie (im BioMedizinischen Centrum München)

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Frau Prof. Dr. med. Claudia Veigel

**Vorkommen und Regulation von Calbindin-D28k in Astrozyten
des Gehirns unter unterschiedlichen Bedingungen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jie XU

aus Xinxiang, P. R. China

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Michael Meyer

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

19.04.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Zentrales Nervensystem	1
1.1.1 Neurone und Gliazellen	1
1.1.2 Astrozyten und GFAP	1
1.1.3 Gliazellen und Ca ²⁺ -Signale	2
1.2 Ca ²⁺ und Calbindin-D28k	3
1.3 Calbindin-D28k in Astrozyten	4
1.3.1 Überblick über Calbindin-D28k in Astrozyten	4
1.3.2 Offene Fragen	6
1.4 Fragestellung	7
2 Material	9
2.1 Chemikalien	9
2.2 Zellkulturen	10
2.3 Zellkultur Medien	10
2.4 Verbrauchsmaterialien	11
2.5 Lösungen für die Immunfärbung	12
2.6 Lösungen allgemein	13
2.7 Antikörper	16
2.7.1 Primäre Antikörper	16
2.7.2 Sekundäre Antikörper	16
2.8 Geräte, Mikroskope	17
3 Methoden	19
3.1 Primärkultur Zellen	19
3.1.1 Vorbereitung	19
3.1.2 Präparation der Zell	19
3.2 Aufrechterhaltung der Zellkultur	20
3.3 Passage nach 4 Tagen	20
3.4 Fixation der Zellen	21
3.5 Immunfluoreszenz	22
3.6 Erfassung und Auswertung der Daten	22

4	Ergebnisse	25
4.1	Zellkultur.....	25
4.1.1	Darstellung der Astrozyten-spezifischen GFAP-Filamente	25
4.1.2	Darstellung des Neuronen-spezifischen β -Tubulin-III	28
4.1.3	Darstellung der Oligodendrozyten.....	29
4.1.4	Darstellung der Nuklei mit DAPI.....	29
4.2	Der Nachweis von Calbindin-D28k in Gliazellen	30
4.2.1	Färbung mit dem polyklonalen Calbindin-D28k Antikörper von SWANT	30
4.2.2	Vergleich der vier verschiedenen Calbindin-D28k Antikörper	33
4.2.3	Die Spezifität des polyklonalen Antikörper von SWANT	36
4.3	Das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen in serumfreiem Kulturmedium	37
4.4	Der Nachweis von GFAP in Calbindin-D28k-positiven Gliazellen.....	41
4.5	Das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen nach mechanischer Läsion.....	44
4.6	Das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen nach Zugabe von TNF- α ...	46
4.7	Das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen mit 10% Zelldichte	48
4.8	Das Verhältnis zwischen Calbindin-D28k-positiven Gliazellen und Neuronen...	50
5	Diskussion	51
5.1	Primärkultur des Telencephalon (Cerebrum) und Optimierung der Zellkultur....	51
5.2	Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen Calbindin-D28k.....	52
5.3	Expression und Regulation von Calbindin-D28K in der etablierten astrozytären Primärkultur	52
5.3.1	Calbindin-D28k-exprimierende Gliazellen sind Astrozyten	52
5.3.2	Eine Untergruppe der protoplasmatischen Astrozyten: Calbindin-D28k-exprimierende Astrozyten	54
5.3.3	Eigenschaften der Calbindin-D28K-exprimierenden Astrozyten	55
5.4	Funktionen von Calbindin-D28K in der astrozytären Primärkultur	56
5.4.1	Schutzfunktion und Ca^{2+} Homöostase	56
5.4.2	Einfluss auf Neurogenese	57
5.4.3	Ausblick: Die Rolle von Calbindin-D28k-positiven Astrozyten in Cerebrum.....	58
6	Zusammenfassung	60
	Literaturverzeichnis	63
	Danksagung	69

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 4.1 Kulturen in serumhaltigem Medium einen Tag nach der Passage:
Immunfluoreszenz mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594), und mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. (a) Zoom=1, zahlreiche GFAP-positive Astrozyten (lange Pfeile), dazwischen zwei Calbindin-D28k-positive und GFAP-negative Zellen (kurze Pfeile) (b) Zoom=4, höhere Vergrößerung der beiden Calbindin-D28k-positiven Zellen ... 26
- Abb. 4.2 Kulturen in serumhaltigem Medium einen Tag nach der Passage:
Immunfluoreszenz mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. Zoom=4, zwei GFAP-positive Astrozyten (lange Pfeile)..... 27
- Abb. 4.3 Kulturen in serumhaltigem Medium fünf Tage nach der Passage:
Immunfluoreszenz mit Anti- β -Tubulin-III (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555), und mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. (a) Zomm=1, zahlreiche β -Tubulin-III-positive Neuronen (lange Pfeile), links ein Calbindin-positives und β -Tubulin-III-positives Neuron (kurzer Pfeil). (b) Zomm=4, höher Vergrößerung des Calbindin-D28k-positiven Neuron (kurzer Pfeil), oben einige Calbindin-D28k-positiven Nichtneuronalen Zellen bzw. Gliazellen (Dreiecke)..... 28
- Abb. 4.4 Kulturen in serumhaltigem Medium neun Tage nach der Passage:
Immunfluoreszenz: mit Maus monoklonaler Anti-Oligodendrozyte Antikörper (grün, sekundärer AK: rabbit anti-mouse IgG Alexa Fluor 488). Konfokale Mikroskopie. Zoom=1, zahlreiche Oligodendrozyten (lange Pfeile) 29
- Abb. 4.5 Kulturen in serumhaltigem Medium einen Tag nach der Passage:
Immunfluoreszenz ohne Anti-GFAP (rot) sowie ohne Anti-Calbindin D-28k (grün), nur mit sekundären AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594 sowie donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488; Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. Zoom=1, zahlreiche große, dunkle Kerne der Gliazellen (lange Pfeile) und ein paar kleine, helle Kerne der Nervenzellen (kurze Pfeile) 30
- Abb. 4.6 Kulturen in serumhaltigem Medium fünf Tage nach der Passage:
Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. Zoom=4, zahlreiche GFAP-positive und Calbindin-D28k-negative Astrozyten (lange Pfeile), dazwischen zwei GFAP-positive und Calbindin-D28k-positive Astrozyten (kurze Pfeile) 31
- Abb. 4.7 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage:
Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. oben eine Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyte (kurze Pfeile) unten eine GFAP-positive und Calbindin-D28k-negative Astrozyte (lange Pfeile) 32

- Abb. 4.8 Kulturen in serumhaltigem Medium einen Tag nach der Passage:
 Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. Zoom=4, unten ein Calbindin-D28k-positives Neuron (kurzer Pfeil) mit Fortsatz (langer Pfeil).....32
- Abb. 4.9 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage:
 Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SWANT) (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Eine Calbindin-D28k-positiv nichtneuronale Zelle bzw. Gliazelle (lange Pfeile) ist mit zwei Anti-Calbindin-D28k gleichermaßen sichtbar.33
- Abb. 4.10 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage:
 Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SWANT) (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Zwei Calbindin-D28k-positiven Neuronen mit Fortsätzen (lange Pfeile) sind mit zwei Anti-Calbindin-D28k gleichermaßen sichtbar.34
- Abb. 4.11 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage:
 Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SIGMA) (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Eine Calbindin-D28k-positiv Nichtneuronale Zelle bzw. Gliazelle (lange Pfeile) ist mit zwei Anti-Calbindin-D28k gleichermaßen sichtbar.34
- Abb. 4.12 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage:
 Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SIGMA) (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Ein Calbindin-D28k-positives Neuron mit Fortsätzen (lange Pfeile) ist mit zwei Anti-Calbindin-D28k gleichermaßen sichtbar.35
- Abb. 4.13 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage:
 Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Eine Calbindin-D28k-positiv Nichtneuronale Zelle bzw. Gliazelle (Pfeile) ist mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) gleichermaßen sichtbar.35
- Abb. 4.14 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage:
 Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti- β -Tubulin-III (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Ein Calbindin-D28k-positives Neuron mit Fortsätzen (lange Pfeile) ist mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) gleichermaßen sichtbar.36

- Abb. 4.15 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), Konfokale Mikroskopie. Zoom=4, keine Calbindin-D28k-positiven Zellen sind sichtbar. 37
- Abb. 4.16 Kulturen fünf Tage in serumfreiem Medium sechs Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488) sowie mit Anti-GFAP, (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. Zoom=4, zwei Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (kurze Pfeile) mit Fortsätzen (lange Pfeile). 38
- Abb. 4.17 Kulturen fünf Tage in serumfreiem Medium sechs Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz: mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594). Epifluoreszenz Mikroskopie. Eine riesige Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyte (lange Pfeile) mit Fortsätzen..... 39
- Abb. 4.18: Anteil der Calbindin-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl mit / ohne Serum, $p=0,0187$, signifikant..... 40
- Abb. 4.19: GFAP-positive Zellen an Calbindin-positiven Zellen mit / ohne Serum in %, $p=0,0142$, signifikant 42
- Abb. 4.20 Kulturen in serumhaltigem Medium: Anteil der GFAP-positiven Zellen an Calbindin-D28k-positiven Zellen bis zum neunten Tag nach der Passage. 43
- Abb. 4.21 Kulturen einen Tag nach mechanischer Läsion in serumhaltigem Medium, zwei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Eine Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyte (lange Pfeile). 44
- Abb. 4.22 Kulturen zwei Tage nach mechanischer Läsion in serumhaltigem Medium, drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594). Epifluoreszenz Mikroskopie. zahlreiche Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (langer Pfeil, kurzer Pfeil und Dreiecke). 45
- Abb. 4.23 Kulturen vier Tage nach mechanischer Läsion in serumhaltigem Medium, fünf Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. zahlreiche Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (langer Pfeil, kurzer Pfeil und Dreieck). 45
- Abb. 4.24 Kulturen nach der mechanischen Läsion in serumhaltigem Medium, einen, drei und fünf Tage nach der Läsion: Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Die Bereiche, in denen die Zellen durch die mechanische Läsion zerstört wurden, sind durch die weißen Balken markiert..... 46
- Abb. 4.25 Kulturen drei Tage nach Zugabe von TNF- α (100ug/ml) in serumhaltigem Medium, vier Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün,

- sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. zwei Calbindin-positive und GFAP-positive Astrozyten (langer Pfeil und Dreiecke).47
- Abb. 4.26 Kulturen in serumhaltigem Medium sieben Tag nach der Passage mit 10% Zelldichte: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488) und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Zwei benachbarte Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (lange Pfeile).....48
- Abb. 4.27 Kulturen in serumhaltigem Medium neun Tag nach der Passage mit 10% Zelldichte: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Zwei Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (lange Pfeile).....49
- Abb. 4.28 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tag nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488); und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. Zoom=4. Links eine Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyte (kurzer Pfeil). Daneben eine Calbindin-D28k-positive bzw. Calbindin-D28k-exprimierende Nervenzelle (Dreieck) mit Fortsätzen (lange Pfeile).50

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1: Anteil der Calbindin-D28k-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl mit / ohne Serum; \pm SD	40
Tab. 4.2: Anteil der GFAP-positiven Zellen an den Calbindin-D28k-positiven Zellen mit / ohne Serum in %; \pm SD	41

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
ca.	circa
CaBPs	Ca ²⁺ -binding proteins (engl.) – Ca ²⁺ -bindende Proteine
Calbindin	calcium-binding-protein-D28k, Calbindin-D28k
cm	Zentimeter
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidine-2-phenylindole dihydrochloride
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNase	Desoxyribonuklease
engl.	englisch
et al.	et alii
FCS	Fetal calf serum (engl.) – Fötales Kälberserum
g	Gramm
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (engl.) – Gliales fibrilläres, saures Protein
HBSS	Hank's Buffered Saline Solution (engl.)
H ₂ O	Wasser
L	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NPC	the nuclear pore complex (engl.) – Kernporenkomplex

o. g.	oben genannt
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysine
P/S	Penicillin G/Streptomycin
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SIV	Simian Immundeficiency Virus
Tab.	Tabelle
TNF- α	tumor necrosis factor α (engl.), Tumornekrosefaktor α
TNF- β	tumor necrosis factor β (engl.), Tumornekrosefaktor β
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Zentrales Nervensystem

Das Nervensystem wird in Zentralnervensystem und peripheres Nervensystem gegliedert. Zum Zentralnervensystem (ZNS) zählen Gehirn und Rückenmark. Das ZNS nimmt über die Sinnesorgane alle Informationen auf, die aus der Umwelt oder dem Körperinnern kommen. Es bearbeitet und beantwortet diese Informationen zielgerichtet durch unterschiedliche Signale, die es einem ausführenden Zielorgan zusendet (Welsch, 2006).

1.1.1 Neurone und Gliazellen

Nervengewebe ist außerordentlich komplex strukturiert, besteht aber im Prinzip nur aus zwei Zelltypen, **Nervenzellen** und **Gliazellen**. An die Nervenzellen sind die typischen Leistungen des Nervengewebes gebunden. Die Gliazellen schaffen das Milieu, das für die Funktionen der Nervenzellen erforderlich ist. Alle Gliazellen entstammen, wie die Neurone, der ektodermalen Anlage des Nervensystems, nur die Mikroglia ist mesodermal. Die Gliazellen sind unabdingbare Hilfszellen der Nervenzellen, deren spezifische Funktionen von ihnen abhängig sind. Ihre Zahl ist noch größer als die der Nervenzellen und übertrifft sie um das 10fache (Hallermayer and Hamprecht, 1984; Mathewson and Berry, 1985; Mearow et al., 1989; Gasser and Hatten, 1990; Welsch, 2006; Seth and Koul, 2008; Batiz et al., 2011).

1.1.2 Astrozyten und GFAP

Zu den zentralen Gliazellen werden Astrozyten, Oligodendrozyten sowie Mikrogliazellen gezählt. Oft werden auch die Ependymzellen den Gliazellen zugerechnet. Alle diese Zelltypen sind nur im ZNS zu finden (Welsch, 2006). Astrozyten stellen die häufigsten und größten Gliazellen des ZNS dar. Die Astrozyten werden morphologisch unterteilt in überwiegend in der grauen Substanz gelegene **protoplasmatische Astrozyten** mit kurzen dicken, stärker verzweigten Fortsätzen und in hauptsächlich in der weißen Substanz vorliegende **fibrilläre Astrozyten** mit zahlreichen langen dünnen, wenig verzweigten Fortsätzen. Die morphologischen Unterschiede sind bedingt durch den Zellgehalt an saurem Gliafaserprotein (GFAP = „glial fibrillary acidic protein“), aus dem die

Intermediärfilamente der Astrozyten bestehen. GFAP ist im ZNS weitgehend spezifisch für astrozytäre Zellen. Die GFAP-Immunhistochemie ist äußerst wichtig für die Identifikation astrozytärer Zellen (Schachner et al., 1977; Schwartz and Wilson, 1992; De Groot et al. 1997; Lüllmann-Rauch, 2006; Trepel, 2008; Ulfing, 2008; Vinters and Kleinschmidt-DeMasters, 2008; Sofroniew and Vinters, 2010; Kuchelmeister, 2012).

Die protoplasmatischen Astrozyten spielen eine wichtige Rolle in der Homoöostase des ZNS. Recht gut ist ihre Funktion speziell für die Kalium- und Protonenhomöostase im Nervengewebe bekannt. Den Astrozyten kommt auch eine Funktion beim Kalziumgleichgewicht im Nervengewebe zu (Welsch, 2006).

1.1.3 Gliazellen und Ca^{2+} -Signale

Gliazellen reagieren auf verschiedene externe Reize wie z.B Neurotransmitter, Hormone oder sogar mechanische Belastungen, indem sie komplexe Veränderungen in der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration erzeugen. Dieses Ca^{2+} -Signal wird durch ein Zusammenspiel von verschiedenen Mechanismen einschließlich plasmalemmalen und intrazellulären Ca^{2+} -Kanälen, Ca^{2+} -Transporten und zytoplasmatischen Ca^{2+} -Puffern gesteuert. Während die Gliazellen nicht mit den richtigen Kanälen ausgestattet sind, um Aktionspotentiale zu erzeugen, können Ca^{2+} -Signale das Instrument sein, durch das diese Zellen Signale in das ZNS integrieren und propagieren. Das neuronale Aktionspotential folgt den „Alles oder Nichts“ Regel und spielt wie auf eine Zeitskala von Millisekunden ab. Demgegenüber kann die Ca^{2+} -Antwort der Gliazellen gradiert sein und auf einer längeren Zeitskala verwendet werden, entweder Sekunden oder sogar Minuten (Nedergaard, 1994; Verkhratsky and Kettenmann, 1996; Kang et al., 1998; Verkhratsky et al., 1998; Metea and Newman, 2006; Kettenmann and Verkhratsky, 2008).

In Astrozyten kann sich das Ca^{2+} -Signal als Wellen im Synzytium über Gap junction (Nexus) ausbreiten, das als mögliches Mittel für intergliale Kommunikation angesehen werden könnte. Dieses Synzytium verhält sich sehr dynamisch in Bezug auf Raum und Zeit. Das Ca^{2+} -Signal ist ebenfalls ein wichtiges Medium für die Neuronen-Glia-Interaktion: die neuronale Aktivität kann das Ca^{2+} -Signal in Gliazellen auslösen und im Gegenzug können Glia- Ca^{2+} -Signale Reaktionen in Neuronen hervorrufen (Cornell-Bell et al., 1990; Nedergaard, 1994; Verkhratsky and Kettenmann, 1996; Zanotti and Charles, 1997; Kang et al., 1998; Pasti et al., 2001; Kettenmann and Verkhratsky, 2008).

1.2 Ca^{2+} und Calbindin-D28k

Die Ca^{2+} -Signalweitergabe in Neuronen zeichnet sich durch stark begrenzte und dynamische Gradienten aus. Dazu gehören, je nach räumlichen und zeitlichen Merkmalen, Ca^{2+} -Wellen, Spitzen, Transienten und Puffer. Deshalb stellt das Ca^{2+} -Ion die Grundlage für die komplexe Signalweitergabe in neuronalen Bestandteilen dar, deren räumliche Auflösung im Mikro- und Nanobereich liegen. Die meisten der Ca^{2+} -regulierten Prozesse erfordern spezielle nachgelagerte Weiterverarbeitungsmechanismen, die das Ca^{2+} -Signal umwandeln, damit weitere zelluläre Prozesse stattfinden können. Die vielen unterschiedlichen Phänomene in Neuronen, die durch Ca^{2+} ausgelöst werden (von der Neurotransmission bis zur Genexpression), bedingen die vielen unterschiedlichen Ca^{2+} -bindende Proteine (CaBPs), von denen zahlreiche zur EF-Hand-Superfamilie gehören. Die EF-Hand-Proteine können in Ca^{2+} -Puffer und Ca^{2+} -Sensorproteine unterteilt werden. Die Ca^{2+} -Puffer besitzen eine sehr hohe Affinität für Ca^{2+} , zeigen wenig Konformationsänderung im Ca^{2+} -gebundenen Zustand und werden als Chelat Ca^{2+} angesehen. Die Ca^{2+} Sensorproteine haben eine geringere Affinität für Ca^{2+} und zeigen erhebliche Konformationsänderungen, wenn sie an Ca^{2+} -gebunden sind. Diese führen häufig zu einer Interaktion mit dem Zielprotein (Burgoyne and Haynes, 2012; Diaz-Romero and Nestic, 2016; Kreutz et al., 2016; Muk-herjee et al., 2017).

Calbindin-D28k gehört zur Familie der Kalzium-bindenden Proteine. Wie der Name bereits sagt, ist es ein Vitamin D-abhängiges Protein in peripherem Gewebe und seine molekulare Masse beträgt 28 kDalton (Schwaller et al., 2002). Ein strukturelles Merkmal dieses Proteins ist das Vorhandensein einer oktaedrischen Kalzium-bindenden Struktur, welche auf einer Helix-Loop-Helix-Anordnung der Polypeptidkette, einer sog. EF-Hand, basiert (Christakos et al., 1989). Viele natürlich vorkommende EF-Hand Domänen haben ihre Metall-bindenden Eigenschaften aufgrund von Mutationen (an einigen dieser Stellen) verloren. Jedoch sind diese degenerativen EF-Hand-Motive immer noch hochkonserviert zwischen den verschiedenen Arten und sind somit wahrscheinlich zuständig für noch nicht vollständig verstandene strukturelle Funktionen. Calbindin-D28k besitzt sechs EF-Hände, von denen nur vier Kalzium binden können. Calbindin-D28k wird als ein schneller Puffer bezeichnet (Schwaller et al., 2002).

Seit der Entdeckung des Calbindin-D28k (Wasserman and Taylor, 1966, Taylor and Wasserman, 1967) gibt es solide experimentelle Evidenz für das Vorkommen von Calbindin-D28k in Neuronen. Es befindet sich im gesamten Zentralen Nervensystem. Es kommt in den meisten, aber nicht in allen wichtigen Gruppen von Nervenzellen vor. Die höchste Konzentration von Calbindin-D28k liegt im Cerebellum vor, wo es ausschließlich in Purkinjezellen vorhanden ist. Ultrastrukturelle Studien haben gezeigt, dass sich Calbindin-D28k in erster Linie im Zellkörper (Somata) befindet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Calbindin-D28k als ein Puffersystem fungiert. Es schützt

die Neuronen vor einer zu hohen Kalzium-Konzentration (Baimbridge and Miller, 1982; Baimbridge et al., 1982; Christakos et al., 1987; Christakos et al., 1989).

In zahlreichen Studien wurden Eigenschaften von Calbindin-D28k in Neuronen, besonders in der Purkinje-Zelle im Zerebellum, untersucht (Arai et al., 1991; Hof and Morrison, 1991; Lin and Graybiel, 1992; Ferrer et al., 1993; Li et al., 1995). Calbindin-D28k spielt eine überraschende Rolle bei der von zerebellären Purkinjezellen abhängigen Bewegungskoordination. Mit Hilfe von Calbindin-D28k werden synaptisch evozierte schnelle Kalziumtransienten ausgebildet, die für die sensomotorische Integration und das motorische Lernen wichtig sind (Vecellio et al., 2000; Schwaller et al., 2002).

1.3 Calbindin-D28k in Astrozyten

Allerdings wurden Gliazellen, die Calbindin-D28k exprimieren, bisher nicht detaillierter untersucht. Es wurde lang postuliert, dass Calbindin-D28k unter physiologischen Bedingungen in Gliazellen nicht vorhanden ist. (Celio, 1990, Christakos et al., 1989)

1.3.1 Überblick über Calbindin-D28k in Astrozyten

1995 weisen Mattson et al. darauf hin, dass eine Expression von Calbindin-D28k in Astrozyten im Cerebrum sowohl in Kainat behandelten Ratten als auch in Ratten nach einer mechanischen Läsion auftritt. Calbindin-D28k-positive Zellen wurden mit einem polyklonalen Antiserum, Antikörpern gegen GFAP (nach Zugabe von Kainate) sowie Antikörpern gegen S-100 β (nach einer mechanischen Läsion) immungefärbt. In derselben Studie stellen Mattson et al. fest, dass eine Expression von Calbindin-D28k in Astrozyten in kultivierten Hippocampus- und Corticalzellen (von Ratten) sowohl unter normalen Bedingungen als auch nach Zugabe von TNF- α oder TNF- β stattfindet. Allerdings sind Calbindin-D28k-positive Zellen in den kultivierten TNF-behandelten Großhirnzellen 6 bis 12mal häufiger und resistenter gegen Azidose. Alle kultivierten Calbindin-D28k-positiven Zellen sind GFAP positiv (Mattson et al., 1995; Figiel, 2008).

In zwei Studien aus dem Jahre 1996 weisen Toyoshima et al. und Ahmed et al. schon darauf hin, dass eine Expression von Calbindin-D28k in Astrozyten unter einer Ischämie (im Hippocampus der Mongolischen Rennmaus) sowie unter einer elektrischen Läsion (im Hippocampus und Corpus Callosum von Ratten) stattfindet. In dieser Untersuchung zeigen Toyoshima et al. und Ahmed et al., dass die Anzahl an Calbindin-D28k-positiver Zellen zunächst ca. bis zur dritten Woche ansteigt, danach bleibt das

Vorkommen bis zur siebenten Woche (unter einer Ischämie) oder bis zur sechsten Woche (unter einer elektrischen Läsion) ungefähr gleich. Alle Calbindin-D28k-positiven Astrozyten (mit monoklonalen Antikörper gegen Calbindin von Sigma) sind ebenfalls GFAP positiv. Bei der Untersuchung unter einer Ischämie wurde Calbindin-D28k vornehmlich in Perikaryon nachgewiesen (Toyoshima et al., 1996, Ahmed et al., 1996).

Die Ergebnisse von Toyoshima et al. zeigen, dass der Transport von Proteinen innerhalb der Zelle näher betrachtet werden muss. Es ist bekannt, dass die Synthese von Proteinen im Zytoplasma stattfindet. Befinden sich die Proteine stattdessen im Perikaryon oder im Zellkern, muss eine Bewegung stattgefunden haben. Christie et al (2016) beruft sich darauf, dass die Translation der Proteine nur im Zytoplasma stattfinden kann. Sie kommen jedoch zu dem Ergebnis, dass viele Proteine erst dann ihre Funktion erfüllen können, wenn sie sich im Zellkern befinden. Es ist der Kernporenkomplex (the nuclear pore complex, NPC), der den Transport von Makromolekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleoplasma ermöglicht. Moleküle mit einer Größe von bis zu 50 kDalton können den NPC durch Diffusion passieren. Aber selbst kleine Proteine wie Calbindin-D28k erfordern Kernlokalisierungssequenzen, um ihr Ziel nicht zu verfehlen. Die aktive Aufnahme von Proteinen in den Nukleus ist ein schneller, spezifischer und evolutionär konservierter Prozess (Hicks and Raikhel, 1995; Schlenstedt, 1996; Quimby et al., 2000; Freitas and Cunha, 2009). Die räumliche Trennung von Transkription und Translation stellt Eukaryoten leistungsstarke Mechanismen zur Verfügung, durch die sie die Genexpression kontrollieren können. Gleichzeitig ist der Austausch zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma selektiv, damit die Zusammensetzung im Nukleus und im Zytoplasma erhalten bleibt. Die Kernhülle ist also eine wichtige Barriere, durch die sowohl Proteine als auch RNA in geregelter Weise transportiert werden. Ebenso wie beim Bulk-Transfer konstitutiver Kernproteine, zum Beispiel Histone, im Anschluss an ihre Synthese im Zytoplasma, erfordern Veränderungen in der Genexpression, dass Schlüsselsignalmoleküle kontrolliert in den Nukleus transportiert werden. (Stewart, 2007). Die Genregulation ist ein Prozess mit vielen Interdependenzen. Die regulatorischen Proteine, wie zum Beispiel RNA-Bindungsproteine, spielen während der gesamten Genexpression, von der Transkription zur Translation, eine wichtige Rolle. (Kornhauser et al., 1990; Raingeaud et al., 1996; Jaenisch and Bird, 2003; Apikonda et al., 2016; Jeong, 2017)

Berman et al. weisen 1998 ausdrücklich darauf hin, dass sich Calbindin-D28k immunzytochemisch in Astrozyten im Cerebrum des Rhesusaffen nach Infektion mit dem Simian Immundeficiency Virus (SIV) nachweisen lässt (mit monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin-D28k von SIGMA). Das Vorkommen von Calbindin-D28k-positiven Zellen wird möglicherweise durch die Toxizität des Virus und die Schwere der Erkrankung beeinflusst. Bei den Rhesusaffen mit einer Überlebensdauer von weniger als 14 Wochen wurden deutlich mehr Calbindin-D28k-positive Astrozyten beobachtet. Allerdings wurden keine Calbindin-D28k-positiven Astrozyten bei den Rhesusaffen mit einer

Überlebensdauer von mehr als 30 Wochen vorgefunden. Alle Calbindin-D28k-positiven Astrozyten sind auch GFAP positiv (Berman et al., 1998).

In einer weiteren Studie aus dem Jahre 2004 weisen Lee et al. auch darauf hin, dass die Expression von Calbindin-D28k in Astrozyten von Kaninchen unter einer Ischämie im Rückenmark stattfindet. Mit Western-Blot (mit anti-Calbindin-D28k Antiserum von Mäusen) zeigen Lee et al., dass das Vorkommen an Calbindin-D28k-positiven Zellen unter Ischämie zunächst ansteigt, bis nach einer Stunde das Maximum erreicht ist. Danach nimmt die Menge an Calbindin-D28k-positiven Zellen wieder ab. Diese These wird jedoch nicht durch eine Phänotypisierung mit Antikörpern (z.B. GFAP positiv oder S-100 β positiv) experimentell belegt. Es gibt keine Angaben zur GFAP-Expression und S-100 β -Expression. In dieser Untersuchung weisen Lee et al. Calbindin-D28k in Astrozyten aufgrund der morphologischen Unterschiede nach (Lee et al., 2004).

1.3.2 Offene Fragen

Wie oben dargestellt, wurde die Expression von Calbindin-D28k in Astrozyten von verschiedenen Autoren in verschiedenen Spezies (Ratten, Mongolische Rennmäuse, Rhesusaffen sowie Kaninchen) bereits festgestellt. Aber sein Vorkommen und seine Regulation in der Maus sind dagegen weitergehend unbekannt. Inwiefern spielen die unterschiedlichen Bedingungen eine Rolle für sein Vorkommen und seine Regulation in der Maus? Des Weiteren wurde die spezifische subzelluläre Verteilung des Calbindin-D28k bis dato nicht intensiv untersucht. Nur Toyoshima et al. berichten, dass Calbindin-D28k vornehmlich in Perikaryon vorzufinden ist. Es ist bisher auch noch nicht geklärt, ob Calbindin-D28k im Nukleus vorhanden ist. Im Allgemeinen sind Calbindin-D28k-Zellen GFAP positiv. Gibt es Hinweise darauf, dass Calbindin-D28k-Zellen auch GFAP negativ sein können? Wird Calbindin-D28k unterschiedlich reguliert in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Bedingungen? Bis heute wurde die Regulation von Calbindin-D28k nur unter der Ischämie untersucht (Toyoshima et al. und Lee et al.). Allerdings kommen die beiden Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen. Ist Calbindin-D28k in Astrozyten unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich konzentriert? Verändert sich die Konzentration über die Zeit? Die Literatur gibt darauf keine Antwort.

Die oben genannten Autoren haben unterschiedliche Antikörper gegen Calbindin-D28k verwendet. Es könnte entscheidend sein, von welcher Firma die verwendeten Antikörper stammen. Haben alle Antikörper die gleiche Spezifität und Sensibilität? Die Experimente wurden mit verschiedenen Tiermodell durchgeführt (Ratten, Mongolische Rennmäuse, Rhesusaffen sowie Kaninchen). Ist die Expression von Calbindin-D28k in Astrozyten von der Tierart abhängig?

Nur Mattson et al. berichten über eine Expression von Calbindin-D28k in kultivierten Astrozyten nach Zugabe von TNF- α sowie TNF- β . Kommt Calbindin-D28k auch in kultivierten Astrozyten unter anderen Bedingungen vor, z. B. nach einer mechanischen Läsion, oder ohne Verwendung von Serum? Könnte Calbindin-D28k in allen Astrozyten exprimiert werden oder nur in manchen bzw. in einer Untergruppe von Astrozyten?

Dabei werten alle Autoren diese Expression als Hinweis darauf, dass Calbindin-D28k die Astrozyten vor Ischämie, mechanischer Läsion, Azidose, Infektion usw. schützen kann. Spielt Calbindin-D28k in Astrozyten eine Rolle, die bisher noch nicht in Erwägung gezogen wurde?

1.4 Fragestellung

Im Zentrum steht die Rolle des zytosolischen kalziumbindenden Proteins Calbindin-D28k in kultivierenden Gliazellen des Mäusegroßhirns. Im Folgenden werden drei Eigenschaften von Calbindin-D28k in Gliazellen dargestellt.

1. Kommt Calbindin-D28k in kultivierten Zellen des Großhirns der Maus vor? In welchen Arten von Zellen kommt Calbindin-D28k vor (Astrozyten, Oligodendrozyten, Endothelzellen, Ependymzellen, Mikroglia et al.)? Kommt Calbindin-D28k in kultivierten Gliazellen nur im Nukleus oder nur im Zytosol vor?
2. Wie wird das Vorkommen von Calbindin-D28k in kultivierten Gliazellen unter normalen Bedingungen reguliert?
3. Wie wird das Vorkommen von Calbindin-D28k unter veränderten Bedingungen reguliert?

Zur Beantwortung dieser Fragen werden Untersuchungen an primären Zellkulturen aus dem Gehirn neugeborener Mäuse durchgeführt. Mittels Immunfluoreszenz werden Calbindin-D28k-enthaltende nicht-neuronale Zellen charakterisiert. Ferner wird das Verhalten dieser Zellen unter verschiedenen kontrollierten Bedingungen untersucht (z. B. mit und ohne Serum, nach mechanischer Läsion, mit und ohne TNF- α).

2 Material

2.1 Chemikalien

- Albumin, Bovine Serum (BSA), A9647-100g, Sigma, München
- Natriumchlorid (NaCl), p.A., 3957.2, Roth, Karlsruhe
- Dinatriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), p.A., 4984.3, Roth, Karlsruhe
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), p.A. 3904.2, Roth, Karlsruhe
- Nonidet P-40, 59009 2L, BDH Laboratory Supplies, Dubai, UAE
- Sodium deoxycholate monohydrate, BioXtra, D5670-5G, Sigma, München
- SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$), ultra pure, 2326.2, Roth, Karlsruhe
- Tris, p.A., 4855.2, Roth, Karlsruhe
- Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), p.A., 8043.1, Roth, Karlsruhe
- Ponceau S, for electrophoresis, 78376, Fluka, über Sigma, München
- Orange G, 021700, Hopkin & Williams, Swansea, UK
- Glycerin (Glycerol), p.A., 3783.1, Roth, Karlsruhe
- Ethanol, p.A., 9065.3, Roth, Karlsruhe
- 2-Propanol, p.A., 6752.4, Roth, Karlsruhe
- Methanol, p.A., 4627.2, Roth, Karlsruhe
- Paraformaldehyd (PFA), reagent grade, 6148-1kg, Sigma, München
- Poly-l-lysin-hydrobromide, P2636, Sigma, München
- Aqua B.Braun, B.Braun, Melsungen
- Triton-X-100, SigmaUltra, T-9284, Sigma, München
- Dnase I, D-4527, Sigma, München
- Calciumchlorid-Dihydrat, p.A., 5239.2, Roth, Karlsruhe
- D+-Saccharose (Sucrose), 99,5 %, 9097.1, Roth, Karlsruhe
- Polyvinylalkohol 4-88 (Mowiol), 81381, Fluka, Steinheim
- Glycerin, wasserfrei, p.A., 3783.1, Roth, Karlsruhe

- 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), ca.99 %, HPLC, B5002, Sigma München
- DAPI (4',6-Diamidine-2-phenylindole dihydrochloride), A1001.0100, 100 mg, mit Apothekenwasser auf 10 mg/ml→ 1:10→ 1:500 = 2 µg/ml, Applichem Lifescience, Darmstadt, bestellt über VWR, Radnor, PA, USA
- rekombinanter Maus TNF- α , von R&D Systems, Minneapolis, USA

2.2 Zellkulturen

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, GlutaMAXTM supplement, 61965-026, Gibco for life technologies, Darmstadt
- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), 10 x, no calcium, no magnesium, 14200-059, Gibco for life technologies, Darmstadt
- Trypsin-EDTA (1x), 0,25 %, phenol red, 25200-072, Gibco for life technologies, Darmstadt
- Fetal Calf Serum (FCS), Boehringer, Ingelheim oder Fetal Bovine Serum (FCS), qualified, heat inactivated, E.U.-approved, South America Origin, 10500064, Gibco for life technologies, Darmstadt
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO), D8418, Sigma, München
- HBSS, no calcium, no magnesium, 14170-088, Gibco for life technologies, Darmstadt
- P/S, Penicillin G/Streptomycin, Penicillin 10000 Units/ml, Streptomycin 10000 µg/ml, 15140-122, Gibco for life technologies, Darmstadt

2.3 Zellkultur Medien

- FCS hitzeinaktivieren (hi)
FCS bei 37°C (Wasserbad) auftauen
30 Minuten bei 56°C (Wasserbad) hitzeinaktivieren
aliquotieren (steril) je 50 ml (Falconröhrchen)
lagern bei -20°C
- EMFI-Medium
450 ml DMEM
50 ml FCS (hi)

5 ml P/S

Steril filtrieren

lagern bei 4°C

- EMFI-Cryomedium

EMFI-Medium + 10 % DMSO

Steril filtrieren

lagern bei -20°C

2.4 Verbrauchsmaterialien

- Pipettenspitzen TipOne 10 µl, S1111-3700 und 200 µl, S1111-1706, Starlab, Hamburg
- Pipettenspitzen 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht
- Zentrifugenröhrchen 15 ml, 188271, Cellstar Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Zentrifugenröhrchen 50 ml, 227261, Cellstar Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Gewebekulturschale 35 mm, 627160, Cellstar Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Gewebekulturschale 60 mm, 628160, Cellstar Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Gewebekulturschale 100 mm, 664160, Cellstar Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Menzel-Deckgläser, rund, 12 mm Durchmesser, 5161064, über Schubert und Weiss Omnilab, München
- Zellkulturflaschen 25 cm² canted neck, 0,2 µm vent cap, 430639, Corning, Corning, NY, USA
- Glaspasteurpipetten mit Wattestopfen, E327, Roth, Karlsruhe
- Nalgene Rapid Flow Filter Unit, 0,2 µm aPES membrane, 90 mm, 500 ml, 569-0020, Thermo Fisher Scientific, life technologies, Darmstadt
- Nalgene Rapid Flow Filter Unit, 0,2 µm aPES membrane, 50 mm, 150 ml, 566-0020, Thermo Fisher Scientific, life technologies, Darmstadt

2.5 Lösungen für die Immunfärbung

- PBS-CMF(Phosphate-buffered-solution Calcium-Magnesium-free) pH 7,3
6,96 g NaCl (120 mM)
3,54 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (20 mM)
0,34 g KH₂PO₄ (2,5 mM)
800 ml H₂O bidest
mit wenig konzentrierter HCl pH 7, 3 einstellen
auffüllen auf 1 l
- Antikörperverdünnung für Immunfärbung
PBS-CMF auf 100 ml
1 % BSA 1g
0,1 % Triton X100 100 µl
bei -20°C aufbewahren
- Blockpuffer mit BSA
PBS-CMF 45 ml
10 % BSA 5 ml
durch Faltenfilter schicken, bei -20°C aufbewahren
- Blockpuffer mit Serum
z.B Goatserum, Sheepserum, o.a.
PBS-CMF 45 ml
10 % Serum 5 ml
Steril filtrieren, bei -20°C aufbewahren
- Permeabilisierungslösung für Immunfärbung
PBS-CMF auf 100 ml
10 % BSA 10 g

pH 7,4 mit konz. HCl (ca. 70 ml) einstellen
autoklavieren

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

- Rabbit anti-Calbindin D-28k, CB 38a, SWANT, Marly, Schweiz
- Anti-GFAP antibody (glial fibrillary acidic protein), goat polyclonal to GFAP, ab53554, Abcam, Cambridge, United Kingdom
- Monoclonal anti-Calbindin, clone 300, 300, SWANT, Marly, Schweiz
- Monoclonal Anti-Calbindin D-28k antibody produced in mouse, clone CB-955, C9848, Sigma, München
- Anti-Water Channel Aquaporin 4 antibody produced in rabbit, A5971, Sigma, München
- Anti-Calbindin-D28K (EG-20) antibody produced in rabbit, polyclonal, C2724, Sigma, München
- Anti-Nestin clone rat-401, monoclonal antibody, MAB353, Millipore, Temecula, CA, USA
- Anti-S-100 antibody (4C4.9), ab 4066, Abcam, Cambridge, United Kingdom
- Anti-Beta III Tubulin antibody (TU-20), ab7751, Abcam, Cambridge, United Kingdom
- Maus monoklonaler Anti-Oligodendrozyte Antikörper mit dem Namen O4 in Form von Ascites (Sommer and Schachner, 1981), aus dem Labor von Hans Thoenen.

2.7.2 Sekundäre Antikörper

- Donkey anti-rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate, A-21206, Invitrogen jetzt Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt
- Donkey anti-goat IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 conjugate, A-11058, Invitrogen jetzt Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt

- Goat anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 conjugate, A-11029, Invitrogen jetzt Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt
- Rabbit anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate, A-11059, Invitrogen jetzt Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.8 Geräte, Mikroskope

- Lichtmikroskop, Leica, MZ7.5 Stereomikroskop, Leica, Wetzlar
- Lichtmikroskop, Leica DMIL Type: 090.136.001, Leica, Wetzlar
- Zellkultur-Inkubator, Galaxy 170 S, New Brunswick, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
- Zellkultur-Inkubator, CB 210 02 37317, Binder, Tuttlingen
- Zellkultur-Sterilbank, Berner FlowSafe, B-[MaxPro]² 160, Berner International GmbH, Elmshorn
- Zellkultur-Sterilbank, Bio-Air Instruments Safeflow 1.2, Siziano, Italien, über Nunc GmbH, Wiesbaden
- Wasserbad, Memmert, Schwabach
- Tischzentrifuge 5804, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
- Zählkammer nach Neubauer, Neubauer Improved
- Konfokalmikroskop Zeiss LSM710
- Epifluoreszenzmikroskop Zeiss S100

3 Methoden

3.1 Primärkultur Zellen

3.1.1 Vorbereitung

Alle benötigten Glaswaren und Pipettenspitzen werden autoklaviert (20 min, 121°C, 1,1 bar). Sterile Reagenzröhrchen und Gewebekulturschalen sind von Cellstar Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen. Zellkulturflaschen sind von Corning NY, USA.

Das Präparierbesteck wird in Ethanol (70 %) mehr als 15 Minuten lang eingelegt.

Zellkulturflaschen werden mit jeweils 5 ml PLL-Lösung (10 µg/ml) überschichtet und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Die PLL-Lösung wird abgezogen und einmal mit Aqua bidest gespült sowie getrocknet.

Nach ca. 10 Minuten Spülen mit Aqua bidest werden die Deckgläser (cover slips) in Ethanol (70 %) mehr als 15 Minuten lang eingelegt. Wieder nach ca. 10 Minuten Spülen mit Aqua bidest werden jeweils 3 Deckgläser in eine Gewebekulturschale mit 35 mm gesetzt, mit jeweils 50 µl PLL-Lösung (10ug/ml) überschichtet und im Inkubator über 1 Stunde inkubiert. Die PLL-Lösung wird abgesaugt und einmal mit Aqua bidest gespült sowie getrocknet.

3.1.2 Präparation der Zell

Zuerst wird eine Mischkultur aus den Zellen hergestellt. Diese wird aus 1 bis 3 Tage alten Mäusen gewonnen.

Zur Organentnahme werden Wildtyp-Mäuse (C57Bl/6) sowie Calbindin-D28k defiziente Mäuse (auf einem C57Bl/6 Hintergrund mit mehr als 100 Rückkreuzungen) verwendet (Tierhaus des Physiologischen Instituts an der Ludwig-Maximilians-Universität München).

Diese ein bis drei Tage alten Mäuse werden mit einer Schere dekapitiert. Die Kopfhaut wird entfernt. Unter aseptischen Bedingungen wird die Kalotte mit einer feinen Schere geöffnet und das Großhirn (Telencephalon) mit einer gebogenen Schere in eine eiskühlte HBSS-Lösung überführt. Nach einmaligem Spülen mit HBSS wird das Bindegewebe (z.B. Meningen sowie Gefäße) stumpf mit zwei Pinzetten unter einem binokularen Mikroskop entfernt. Mit einem Skalpell wird das Großhirn der Maus unter Zuhilfenahme optischer Kontrolle in einer Gewebekulturschale (Durchmesser: 60 mm) in der Mitte geteilt, anschließend weiter zerkleinert und zur Kühlung auf Eis gelegt.

Dann wird jeweils ein halbes Großhirn in HBSS-Lösung (1800 μ l) gelegt, welches Trypsin-Verdauungslösung (200 μ l, 0,25 % Trypsin-EDTA) mit Dnase (20 μ l, 1 mg/ml Dnase) enthält. Darin wird das Gewebe im Wasserbad bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Etwa 8 ml Medium wird zupipettiert, um den Verdauungsprozess zu stoppen. Ohne Sedimentation des Gewebes werden etwa 9 ml dieser Lösung abgesaugt. Etwa 1 ml Medium wird wieder hinzugefügt. Das halbe Gehirn wird in dieser Lösung (ca. 2 ml) mit feuerpolierten Glaspipetten (abnehmender Öffnungsdurchmesser) mechanisch dissoziiert. Es werden ca. 2 ml der Zellsuspension in Kulturschälchen (Durchmesser 10 cm) mit 8 ml vorgelegtem Medium ausgesät und im Inkubator 30 Minuten lang inkubiert. Dann wird die Zellsuspension (ca. 10 ml) in einer mit PLL beschichteten Zellkulturflasche ausgesät.

3.2 Aufrechterhaltung der Zellkultur

Für die Anzüchtung werden die vereinzelt vorliegenden Zellen auf eine PLL-beschichteten Matrix gebracht. Die Kulturen werden in einem Brutschrank bei 37°C und 10 % CO₂ inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgt ein Mediumwechsel mit etwa 5 ml frischem Medium. Bei jedem Medientausch werden stichprobenartig Kulturflaschen mikroskopisch untersucht und die Entwicklung der Zellkultur beobachtet. Lichtmikroskopisch sind vereinzelt Gliazellen und Neuronen zu sehen.

3.3 Passage nach 4 Tagen

Um nach 4 Tagen die Zellen von den Kulturflaschen zu lösen, wird das Medium abgesaugt und mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung gespült und danach werden die Zellen mit 1

ml Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kulturflaschen werden dazwischen leicht geschwenkt. Danach wird das Kulturmedium (etwa 5 ml) aufgefüllt, die Zellen vom Kulturflaschenboden gelöst und bei 300 rcf (relative centrifugal force) bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Im nächsten Schritt wird das Sediment in ca. 500 µl Kulturmedium aufgenommen und der Überstand abgesaugt. Von dieser Zellsuspension werden ca. 10 µl in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Die Zellsuspension wird in dem Medium verdünnt, sodass eine Zelldichte von ca. 20.000 Zellen/50 µl Medium erreicht wird. Es werden jeweils 50 µl der Zellsuspension auf den PLL-beschichteten Deckgläsern in die Gewebekulturschalen ausplattiert und im Inkubator für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wird jede Gewebekulturschale mit etwa 2 ml Kulturmedium aufgefüllt.

3.4 Fixation der Zellen

Das Medium wird aus den Gewebekulturschalen abgesaugt. Nach kurzzeitigem Waschen mit PBS Puffer werden pro Gewebekulturschale etwa 1 ml PFA 4 %-Fixationslösung zupipettiert und ca. 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen der Fixationslösung werden die Gewebekulturschalen mit jeweils ca. 1 ml 0,5 % Fixationslösung im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Auswertung werden die Zellen auf den Deckgläsern (Coverslips) nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen fixiert.

Es wird untersucht, ob in serumfreiem Kulturmedium das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen beeinflusst wird. Etwa 24 Stunden nach der Passage werden die Zellen in serumfreiem Kulturmedium kultiviert. Danach werden die Zellen auf den Deckgläsern (Coverslips) nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen fixiert.

Es wird außerdem untersucht, ob das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen durch mechanische Läsion beeinflusst wird. Etwa 24 Stunden nach der Passage wird bei den Zellen auf den Deckgläsern (Coverslips) mithilfe einer ca. 6 mm breiten Metallplatte eine Kratzwunde zugeführt. Anschließend werden die Zellen weiter kultiviert. Die Läsion (Kratzwunde) ist ca. 6 mm breit. Im diesem Bereich werden die Zellen durch die Läsion zerstört. Danach werden die Zellen auf den Deckgläsern (Coverslips) nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen fixiert.

Es wird überprüft, ob im Kulturmedium mit TNF- α (100 ng/ml) sowie in serumfreiem Kulturmedium mit TNF- α (100 ng/ml) das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen beeinflusst wird. Etwa 24 Stunden nach der Passage werden die Zellen im Kulturmedium mit TNF- α (100 ng/ml) sowie in serumfreiem Kulturmedium mit TNF- α (100 ng/ml)

kultiviert. Danach werden die Zellen auf den Deckgläsern (Coverslips) nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen fixiert.

Effekte der Zelldichte werden wie folgt untersucht. Es werden jeweils ca. 2.000 Zellen (10 % Zelldichte) auf den mit PLL beschichteten Deckgläsern untersucht. Die Zellen auf den Deckgläsern (Coverslips) werden nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen fixiert.

3.5 Immunfluoreszenz

Die 0,5 % Fixationslösung wird aus den Gewebekulturschalen abgesaugt. Pro Gewebekulturschale wird etwa 1 ml Permeabilisierungslösung zupipettiert und ca. 15 bis 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen der Permeabilisierungslösung wird pro Gewebekulturschale etwa 1 ml Blockierungslösung zupipettiert und ca. 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Deckgläser mit den darauf fixierten Zellen werden auf Objektträger gelegt und jeweils 50 µl eines primären Antikörpers in der jeweiligen Verdünnung aufgetragen. Als Kontrolle der unspezifischen Bindung der sekundären Antikörper dienen ein bis zwei Deckgläser, auf die Antikörperverdünnungslösung ohne Antikörper aufgetragen wird. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer werden die primären Antikörper abgesaugt und es wird dreimal kurz sowie zweimal 30 Minuten lang mit PBS gewaschen. Danach werden jeweils 50 µl der zwei passenden sekundären Antikörper mit DAPI (1:5.000) zupipettiert und 1 bis 3 Stunden lang bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wird wiederum dreimal kurz sowie zweimal 30 Minuten lang mit PBS gewaschen und dann mit Mowiol eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur und in Dunkelheit getrocknet.

3.6 Erfassung und Auswertung der Daten

Mithilfe der Immuncytochemie werden die Zellen auf jeweils einem Deckglas mit zwei verschiedenen Antikörpern (Antikörper gegen Calbindin-D28k sowie Antikörper gegen GFAP) markiert und unter dem Epifluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss) ausgewertet. Bei 40facher Vergrößerung wird die Anzahl der immuncytochemisch markierten Zellen ermittelt. Jedes Experiment wird mit drei Deckgläsern durchgeführt. Die Anzahl der Calbindin-D28k-Zellen sowie die Anzahl der beiden immuncytochemisch markierten Zellen werden auf jedem Deckglas bestimmt.

Um die Gesamtzellzahl pro Deckglas mit einem Durchmesser von 10mm schätzen zu können, wird ein quantitatives Experiment durchgeführt.

Unter einem Epifluoreszenzmikroskop S100 (Fa. Zeiss) werden bei einer 40fachen Vergrößerung jeweils 6 Gesichtsfelder (Groß: 0,34mm x 0,24mm) pro Deckglas ausgewertet. Zwei Gesichtsfelder werden im Außengebiet zufällig ausgewählt. Es befindet sich entlang des Radius mehr als 4,3 mm vom Mittelpunkt entfernt. Vier Gesichtsfelder werden im Innengebiet zufällig ausgewählt. Es liegt entlang des Radius weniger als 4,3 mm vom Mittelpunkt entfernt. Es wird die Anzahl der Zellkerne mit DAPI erfasst und zur Gesamtzellzahl/Gesichtsfeld addiert. Es werden die Mittelwerte (jeweils n=6) berechnet. Ein Gesichtsfeld wird zur gesamten Fläche des Deckglases ins Verhältnis gesetzt und auf diese Weise die Gesamtzellzahl pro Deckglas geschätzt.

Der prozentuale Anteil der immunocytochemisch markierten Zellen (bzw. Calbindin-Zellen) an der Gesamtzellzahl wird errechnet, die Prozentwerte von 3 Versuchen gemittelt und als Mittelwert \pm Standardabweichung (\pm SD) angegeben. Ebenfalls wird der prozentuale Anteil der GFAP-positiven Zellen an den Calbindin-D28k-positiven Zellen aus 3 Versuchen gemittelt und als Mittelwert \pm Standardabweichung (\pm SD) angegeben.

Für die statistische Auswertung wird ein t-Test mit zweiseitiger Verteilung und ungepaarten Daten durchgeführt. Unterschiede werden ab einem P-Wert von $< 0,05$ als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

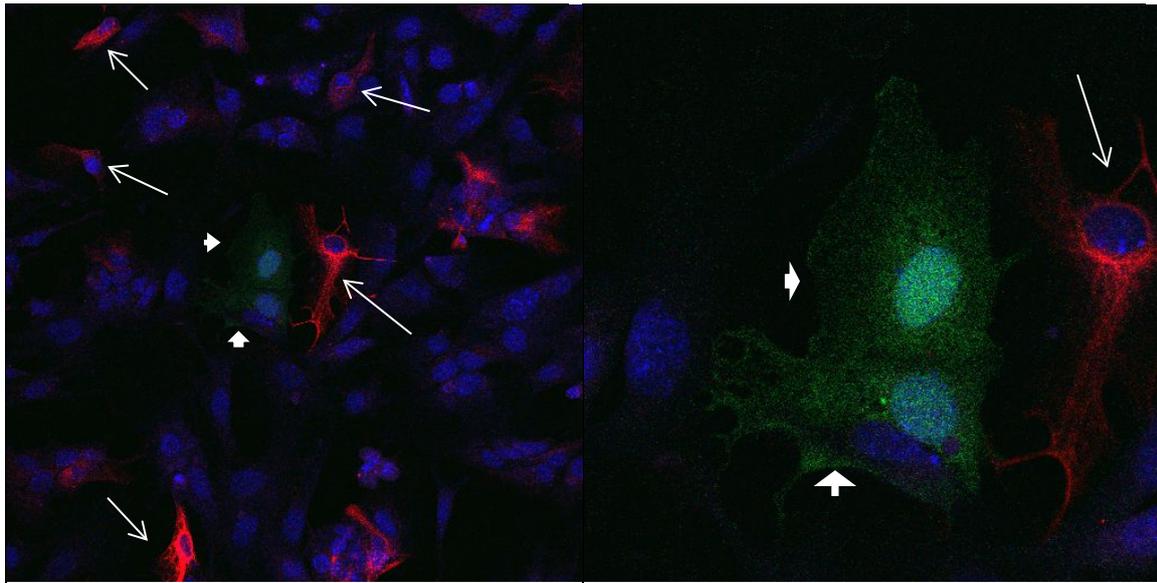
In der Studie werden die Großhirngewebe von 1-3 Tage alten Mäusen dissoziiert und die Zellen kultiviert. Verglichen werden das Vorkommen und die Regulation von Calbindin-D28k in kultivierten Gliazellen unter normalen Bedingungen und in serum-freiem Kulturmedium. Ergänzend wird das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen nach mechanischer Läsion, im Kulturmedium mit TNF- α beobachtet. Durch die immunhistochemische Markierung von Calbindin-D28k sowie GFAP können die Zellen als Calbindin-D28k-positive Astrozyten kenntlich gemacht werden. Durch Untersuchung solcher Kulturen von Calbindin-D28k defizienten (knock out) Mäusen wird die Spezifität des Calbindinnachweises geprüft.

4.1 Zellkultur

Ausgangspunkt sind Untersuchungen von Puschmann et al., welche für die vorliegende Arbeit angepasst wurden. Die Kulturen enthalten routinemäßig mehr als 98 % Astrozyten, weniger als 0,5 % Mikroglia, weniger als 0,1 % Oligodendrozyten sowie weniger als 0,1 % Neuronen (Puschmann et al. 2010).

4.1.1 Darstellung der Astrozyten-spezifischen GFAP-Filamente

Nach viertägiger Zellkultivierung in beschichteten Zellkulturflaschen werden die Zellen am fünften Tag auf einem Deckglas ausgesät. Die Astrozyten werden durch Anfärben der Astrozyten-spezifischen GFAP-Filamente des Zytoskeletts bestätigt. Bereits einen Tag nach der Passage sind unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop in der Wachstumsphase befindliche Fibroblasten-ähnliche Astrozyten mit ihren sternförmigen Zellausläufen zu erkennen (Abb. 4.1 und Abb. 4.2).



a)

b)

Abb. 4.1 Kulturen in serumhaltigem Medium einen Tag nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594), und mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie.

(a) Zoom=1, zahlreiche GFAP-positive Astrozyten (lange Pfeile), dazwischen zwei Calbindin-D28k-positive und GFAP-negative Zellen (kurze Pfeile)

(b) Zoom=4, höhere Vergrößerung der beiden Calbindin-D28k-positiven Zellen

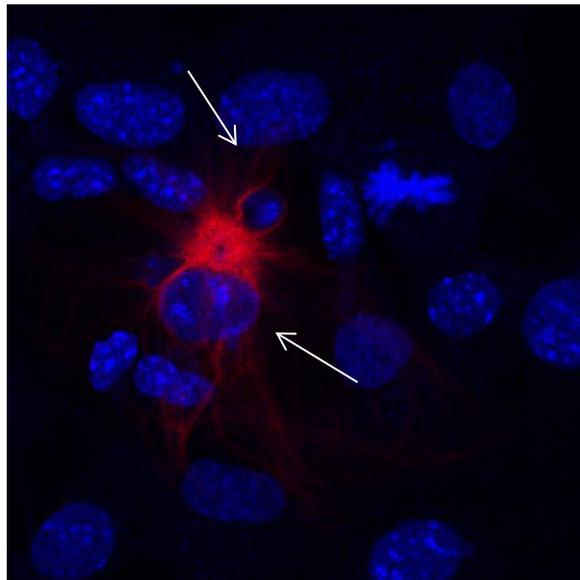
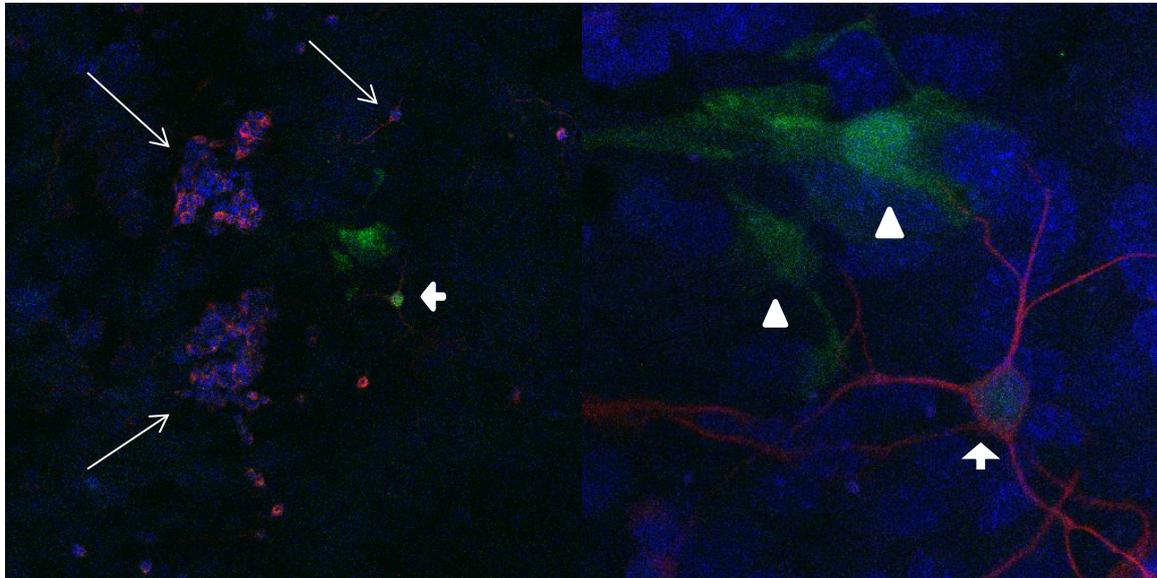


Abb. 4.2 Kulturen in serumhaltigem Medium einen Tag nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. Zoom=4, zwei GFAP-positive Astrozyten (lange Pfeile)

4.1.2 Darstellung des Neuronen-spezifischen β -Tubulin-III

Das Vorhandensein der Neuronen wird durch Anfärben des Neuronen-spezifischen β -Tubulin-III bestätigt.



a)

b)

Abb. 4.3 Kulturen in serumhaltigem Medium fünf Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti- β -Tubulin-III (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555), und mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie.

(a) Zomm=1, zahlreiche β -Tubulin-III-positive Neuronen (lange Pfeile), links ein Calbindin-positives und β -Tubulin-III-positives Neuron (kurzer Pfeil).

(b) Zomm=4, höher Vergrößerung des Calbindin-D28k-positiven Neuron (kurzer Pfeil), oben einige Calbindin-D28k-positiven Nichtneuronalen Zellen bzw. Gliazellen (Dreiecke).

4.1.3 Darstellung der Oligodendrozyten

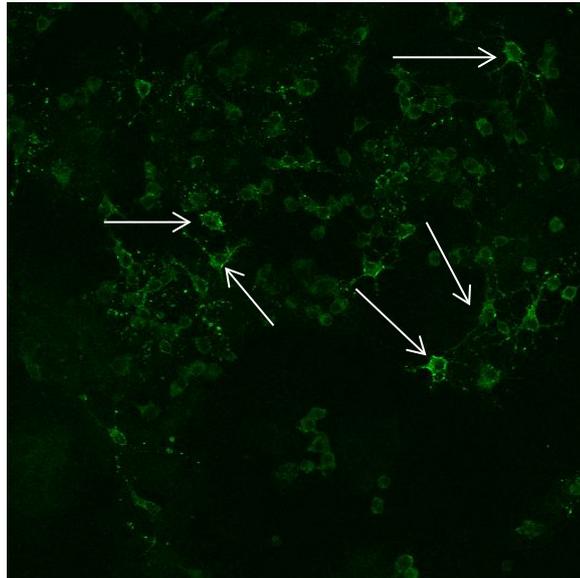


Abb. 4.4 Kulturen in serumhaltigem Medium neun Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz: mit Maus monoklonaler Anti-Oligodendrozyte Antikörper (grün, sekundärer AK: rabbit anti-mouse IgG Alexa Fluor 488). Konfokale Mikroskopie. Zoom=1, zahlreiche Oligodendrozyten (lange Pfeile)

4.1.4 Darstellung der Nuklei mit DAPI

Zur Auswertung werden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop können die Unterschiede zwischen

- kleinen, hellblauen und
- großen, dunkleren Zellkernen

identifiziert werden (siehe Abb. 4.5).

Mithilfe der immuncytochemischen Reaktion mit Anti-GFAP und Anti- β -Tubulin-III kann festgestellt werden, dass die kleinen, hellen Kerne den Nervenzellen und die großen, dunklen Kerne den Zellkernen der Gliazellen zuzuordnen sind (siehe hierzu die Abb. 4.1, Abb. 4.2, Abb. 4.3).

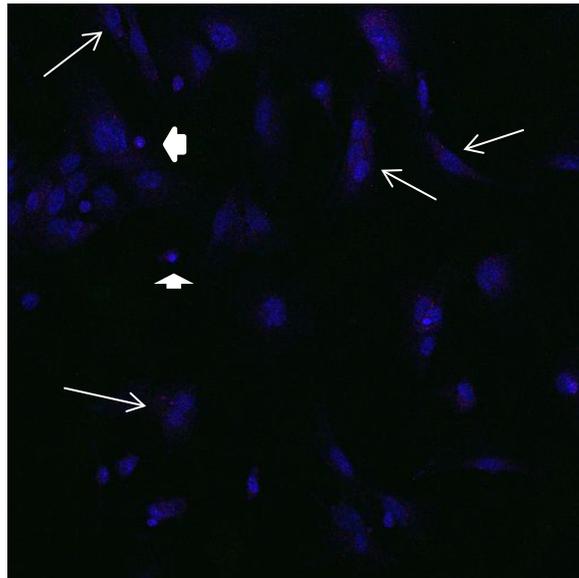


Abb. 4.5 Kulturen in serumhaltigem Medium einen Tag nach der Passage: Immunfluoreszenz ohne Anti-GFAP (rot) sowie ohne Anti-Calbindin D-28k (grün), nur mit sekundären AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594 sowie donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488; Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie. Zoom=1, zahlreiche große, dunkle Kerne der Gliazellen (lange Pfeile) und ein paar kleine, helle Kerne der Nervenzellen (kurze Pfeile)

Wie durch die Abb.4.5 deutlich wird, werden ohne Anti-GFAP sowie ohne Anti-Calbindin-D28k weder GFAP- noch Calbindin-D28k-positive Zellen sichtbar. Dieses Ergebnis beweist die Spezifität und Sensitivität der Antikörper gegenüber GFAP und Calbindin-D28k.

4.2 Der Nachweis von Calbindin-D28k in Gliazellen

4.2.1 Färbung mit dem polyklonalen Calbindin-D28k Antikörper von SWANT

Durch Zugabe von Kaninchen anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) und Esel anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488 werden unter der Konfokalen Mikroskopie und der Epifluoreszenz Mikroskopie Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (Abb. 4.6 und Abb.4.7) sowie Calbindin-D28k-positive Neuronen (Abb. 4.8) erkennbar.

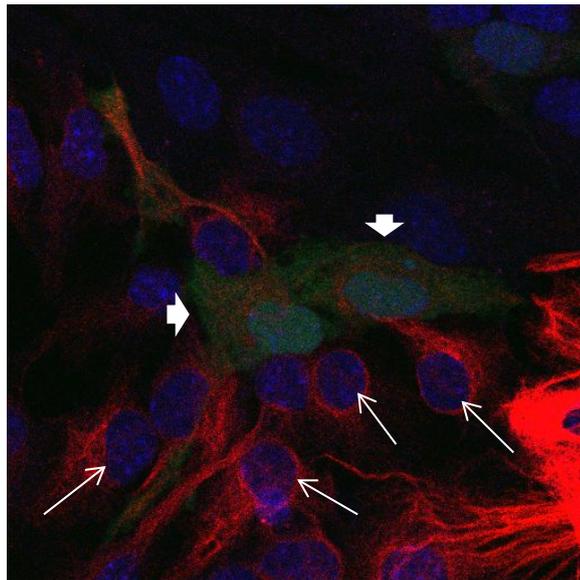
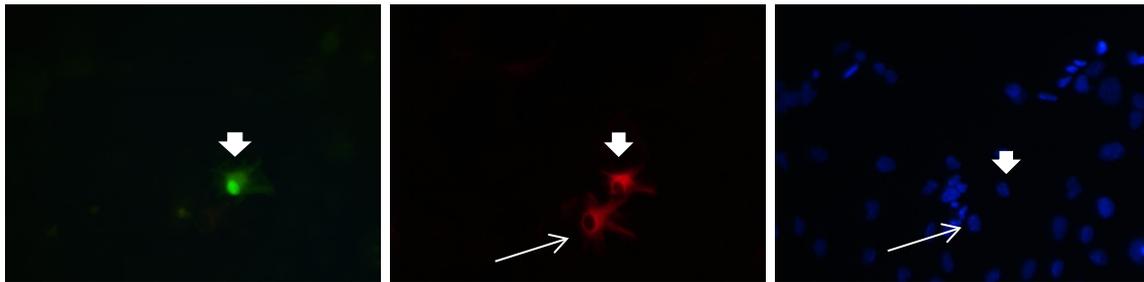


Abb. 4.6 Kulturen in serumhaltigem Medium fünf Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie.

Zoom=4, zahlreiche GFAP-positive und Calbindin-D28k-negative Astrozyten (lange Pfeile), dazwischen zwei GFAP-positive und Calbindin-D28k-positive Astrozyten (kurze Pfeile)



a) mit Anti-Calbindin-D28k
(polyklonaler Antikörper
von SWANT)

b) mit Anti-GFAP

c) Zellkernfärbung mit
DAPI

Abb. 4.7 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie.

oben eine Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyte (kurze Pfeile)
unten eine GFAP-positive und Calbindin-D28k-negative Astrozyte (lange Pfeile)

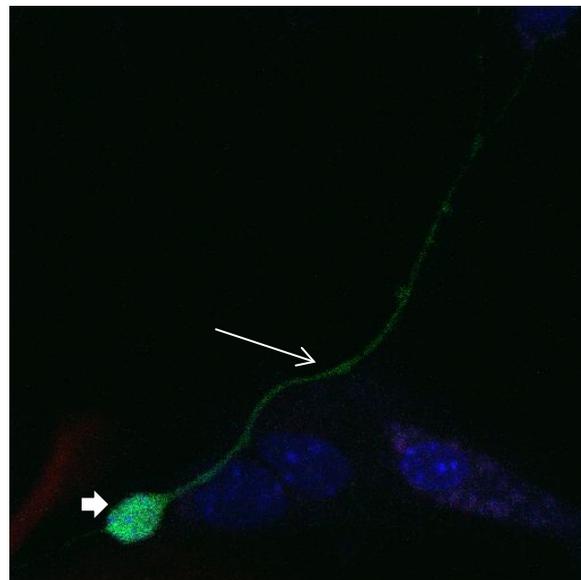


Abb. 4.8 Kulturen in serumhaltigem Medium einen Tag nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie.

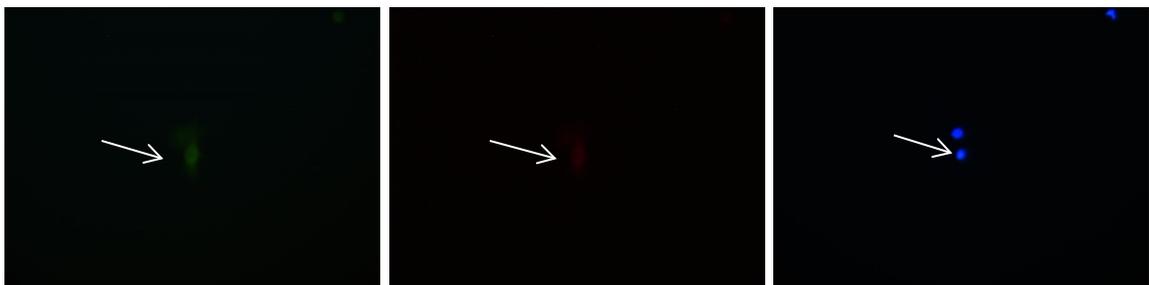
Zoom=4, unten ein Calbindin-D28k-positives Neuron (kurzer Pfeil) mit Fortsatz (langer Pfeil)

4.2.2 Vergleich der vier verschiedenen Calbindin-D28k Antikörper

Durch Zugabe von

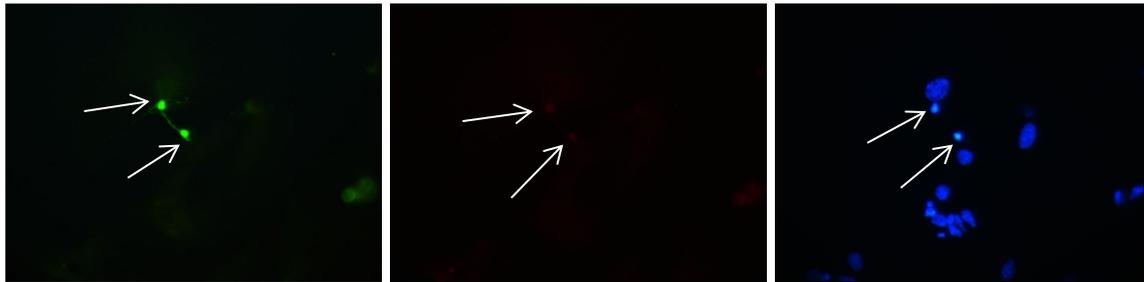
- AK1: rabbit anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) und AK2: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488,
- AK1: mouse anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SWANT) und AK2: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555,
- AK1: mouse anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SIGMA) und AK2: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555

werden unter der Konfokale Mikroskopie und der Epifluoreszenz Mikroskopie ebenfalls Calbindin-D28k-positive Nichtneuronale Zellen bzw. Gliazellen und Calbindin-D28k-positive Neuronen sichtbar (Abb. 4.9, Abb. 4.10, Abb. 4.11, Abb. 4.12, Abb. 4.13 und Abb. 4.14).



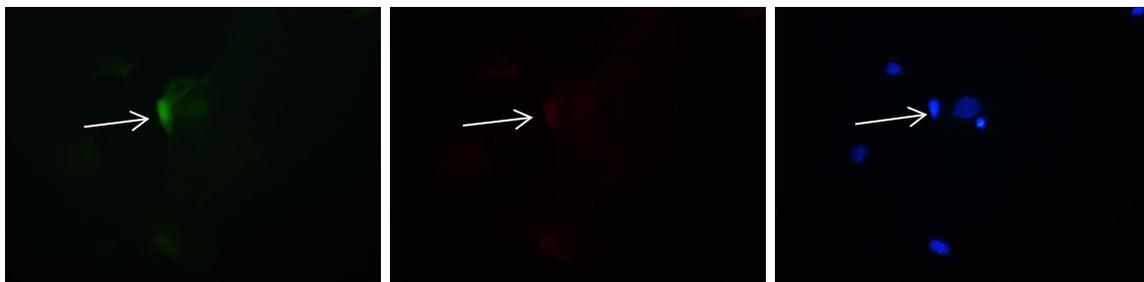
a) mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) b) mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SWANT) c) Zellkernfärbung mit DAPI

Abb. 4.9 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SWANT) (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Eine Calbindin-D28k-positive nichtneuronale Zelle bzw. Gliazelle (lange Pfeile) ist mit zwei Anti-Calbindin-D28k gleichermaßen sichtbar.



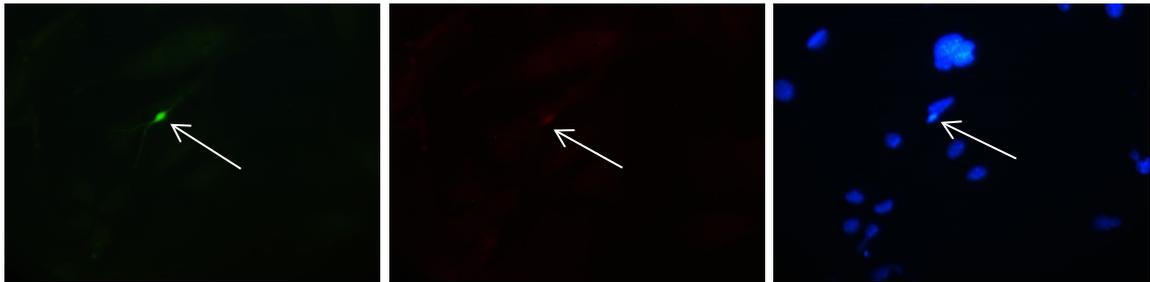
a) mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) b) mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SWANT) c) Zellkernfärbung mit DAPI

Abb. 4.10 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SWANT) (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Zwei Calbindin-D28k-positiven Neuronen mit Fortsätzen (lange Pfeile) sind mit zwei Anti-Calbindin-D28k gleichermaßen sichtbar.



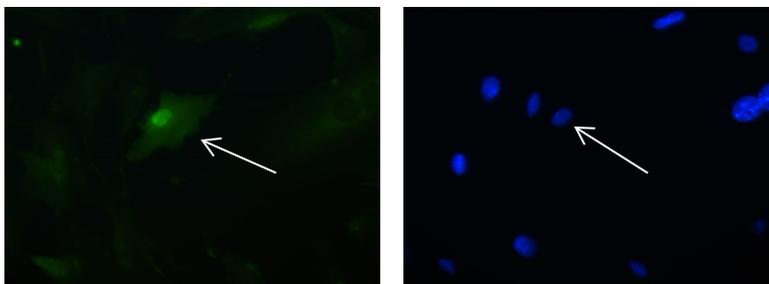
a) mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) b) mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SIGMA) c) Zellkernfärbung mit DAPI

Abb. 4.11 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SIGMA) (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Eine Calbindin-D28k-positiv Nichtneuronale Zelle bzw. Gliazelle (lange Pfeile) ist mit zwei Anti-Calbindin-D28k gleichermaßen sichtbar.



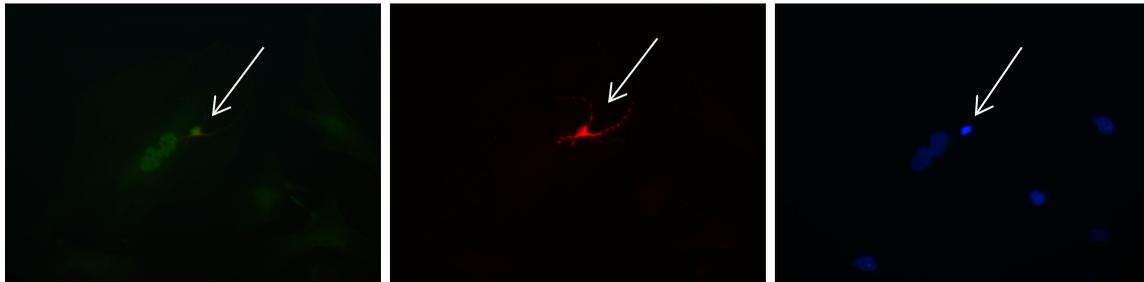
a) mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) b) mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SIGMA) c) Zellkernfärbung mit DAPI

Abb. 4.12 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-Calbindin-D28k (monoklonaler Antikörper von SIGMA) (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Ein Calbindin-D28k-positives Neuron mit Fortsätzen (lange Pfeile) ist mit zwei Anti-Calbindin-D28k gleichermaßen sichtbar.



a) mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) b) Zellkernfärbung mit DAPI

Abb. 4.13 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Eine Calbindin-D28k-positive Nichtneuronale Zelle bzw. Gliazelle (Pfeile) ist mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) gleichermaßen sichtbar.



a) mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) b) mit Anti- β -Tubulin-III c) Zellkernfärbung mit DAPI

Abb. 4.14 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti- β -Tubulin-III (rot, sekundärer AK: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie.

Ein Calbindin-D28k-positives Neuron mit Fortsätzen (lange Pfeile) ist mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SIGMA) gleichermaßen sichtbar.

4.2.3 Die Spezifität des polyklonalen Antikörper von SWANT

Färbungen werden anschließend mit gentechnisch modifizierten Calbindin-D28k defizienten (Knock-out-) Mäusen durchgeführt.

Bei diesen Mäusen, deren Zellen kein Calbindin-D28k aufweisen, können keine Calbindin-D28k-positiven Zellen durch die Immunfluoreszenz-Markierung mit rabbit anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) festgestellt werden (Abb. 4.15).

Dieses Ergebnis beweist die Spezifität und Sensitivität des Antikörpers rabbit anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT).

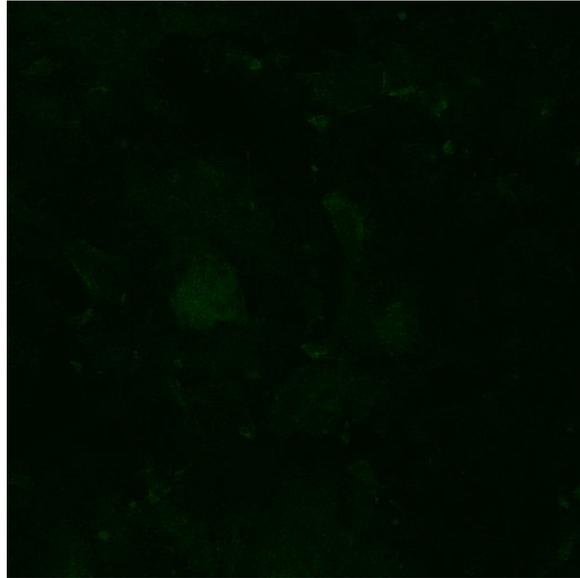


Abb. 4.15 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), Konfokale Mikroskopie. Zoom=4, keine Calbindin-D28k-positiven Zellen sind sichtbar.

4.3 Das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen in serumfreiem Kulturmedium

Nach einem, drei, fünf, sieben und neun Tagen nach der Passage werden die Anzahl der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen sowie die Gesamtzellzahl ermittelt.

Ebenfalls wird in serumfreiem Kulturmedium das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen untersucht. Etwa 24 Stunden nach der Passage werden die Zellen in serumfreiem Kulturmedium kultiviert. Zur Auswertung werden die Zellen auf Coverslips (Deckgläser) nach einem, drei, fünf, sieben und neun Tagen fixiert. Die Anzahl der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen sowie die Gesamtzellzahl werden ermittelt (Abb. 4.16, Abb. 4.17).

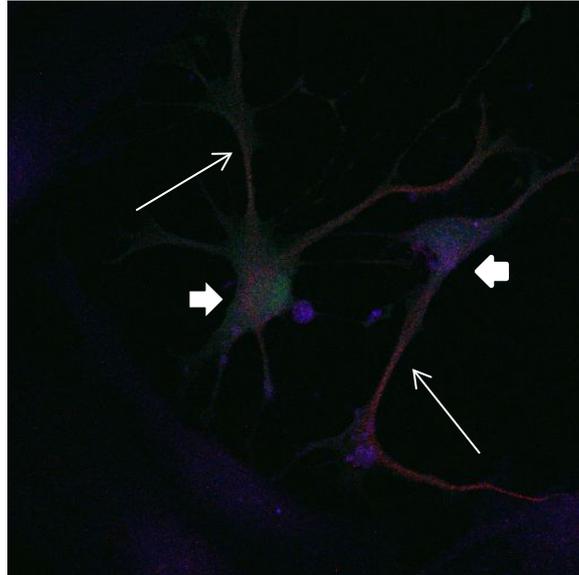
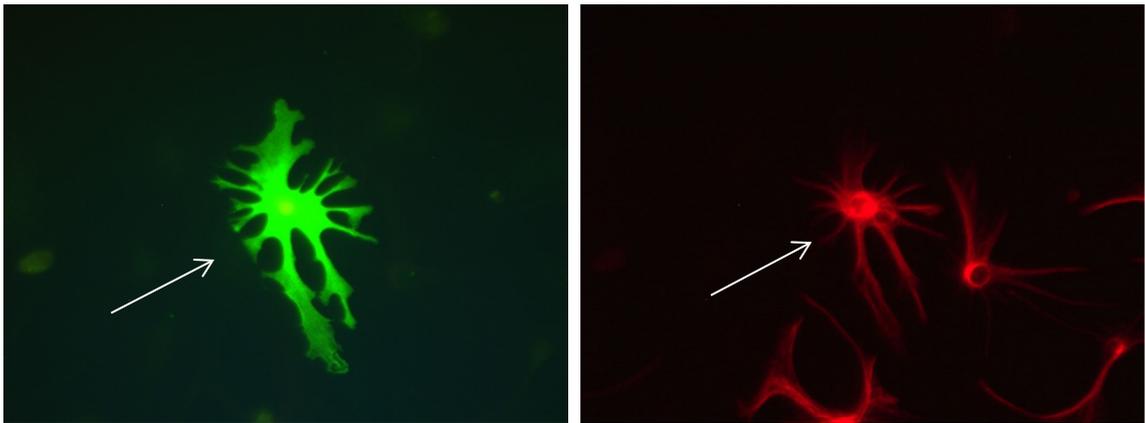


Abb. 4.16 Kulturen fünf Tage in serumfreiem Medium sechs Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488) sowie mit Anti-GFAP, (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie.

Zoom=4, zwei Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (kurze Pfeile) mit Fortsätzen (lange Pfeile).



a) mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) b) mit Anti-GFAP

Abb. 4.17 Kulturen fünf Tage in serumfreiem Medium sechs Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz: mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594). Epifluoreszenz Mikroskopie. Eine riesige Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyte (lange Pfeile) mit Fortsätzen.

In serumfreiem Kulturmedium differenzieren sich die Calbindin-D28k-positiven Gliazellen morphologisch durch die Ausbildung von Zellfortsätzen. Die Calbindin-D28k-positiven Gliazellen verändern sich von ihrer typischen polygonalen in eine sternförmige Form.

Der Anteil der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen an der Gesamtzellzahl (Tab. 4.1, Abb. 4.18) wird anschließend berechnet.

	Zellkultur mit Serum	Zellkultur ohne Serum
	Anteil der Calbindin-pos. Zellen an der Gesamtzellzahl; \pm SD	Anteil der Calbindin-pos. Zellen an der Gesamtzellzahl; \pm SD
1d (1 Tag nach Passage)	$1,85 \times 10^{-3} \pm 0,0006$	$3,89 \times 10^{-3} \pm 0,0019$
3d (3 Tage nach Passage)	$3,35 \times 10^{-3} \pm 0,0004$	$4,87 \times 10^{-3} \pm 0,0023$
5d (5 Tage nach Passage)	$3,78 \times 10^{-3} \pm 0,0007$	$6,47 \times 10^{-3} \pm 0,0028$
7d (7 Tage nach Passage)	$3,47 \times 10^{-3} \pm 0,0008$	$4,74 \times 10^{-3} \pm 0,0008$
9d (9 Tage nach Passage)	$4,28 \times 10^{-3} \pm 0,0010$	$4,25 \times 10^{-3} \pm 0,0011$

Tab. 4.1: Anteil der Calbindin-D28k-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl mit / ohne Serum; \pm SD

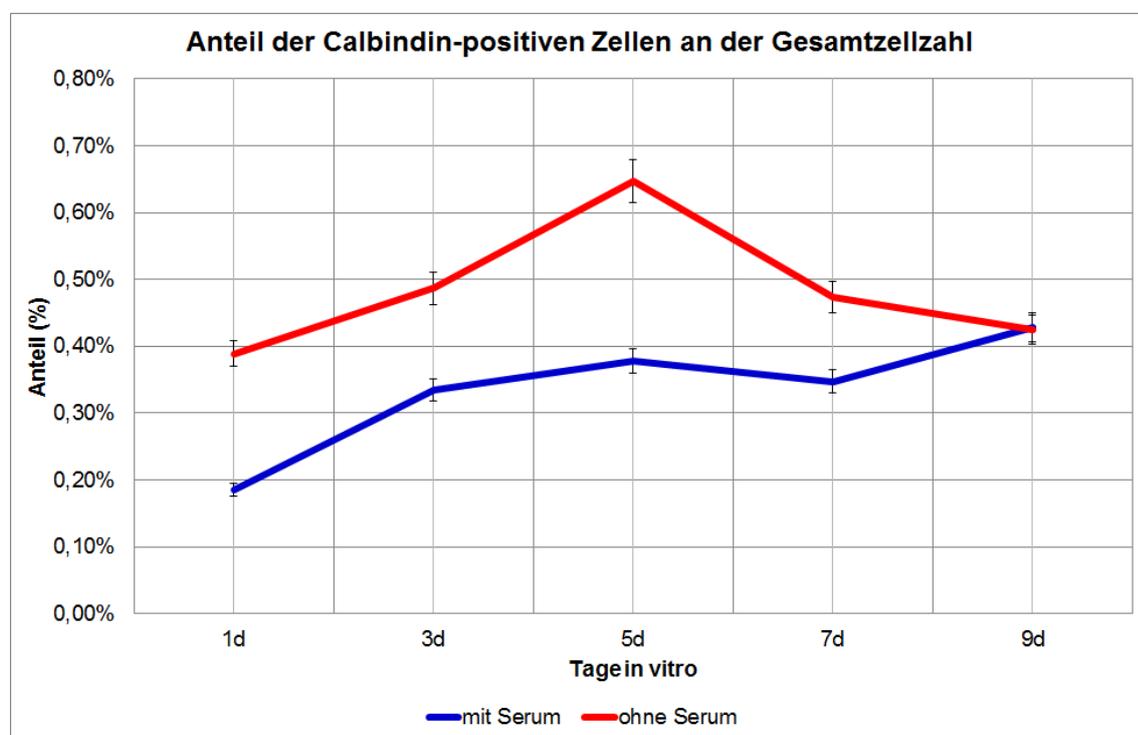


Abb. 4.18: Anteil der Calbindin-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl mit / ohne Serum, $p=0,0187$, signifikant

Abb. 4.18 zeigt, dass ohne Serum im Zeitraum zwischen dem ersten und dem fünften Tag die Zahl der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen ansteigt. Im weiteren Verlauf nimmt der Anteil an Calbindin-D28k-positiven Gliazellen sukzessive ab. Am neunten Tag geht der Anteil an Calbindin-D28k-positiven Gliazellen weiter zurück annähernd auf das Niveau, das auch mit Serum erreicht wird. Der Anteil an Calbindin-D28k-positiven Gliazellen ohne Serum bis zum neunten Tag ist höher als in den Kontrollgruppen mit Serum. Das stimmt mit den Ergebnissen von Lee et al. (2004) überein. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($P < 0,05$). Allerdings findet mit Serum ein sukzessiver Anstieg von Calbindin-D28k-positiven Gliazellen bis zum neunten Tag statt.

4.4 Der Nachweis von GFAP in Calbindin-D28k-positiven Gliazellen

Wie in Abb. 4.1 dargestellt, sind Calbindin-D28k-positive Zellen nicht unbedingt GFAP-positiv.

Es erfolgt die Bestimmung des prozentualen Anteils der GFAP-positiven Gliazellen (bzw. Astrozyten) an den Calbindin-D28k-positiven Zellen (Tab. 4.2, Abb. 4.19).

	Zellenkultur mit Serum	Zellenkultur ohne Serum
	Anteil der GFAP-pos. Zellen an Calbindin-pos. Zellen in %; \pm SD	Anteil der GFAP-pos. Zellen an Calbindin-pos. Zellen in %; \pm SD
1d (1 Tag nach Passage)	64,69% \pm 8,17	63,81% \pm 1,42
3d (3 Tage nach Passage)	36,54% \pm 1,49	52,67% \pm 8,19*
5d (5 Tage nach Passage)	32,07% \pm 4,83	53,40% \pm 5,26**
7d (7 Tage nach Passage)	23,38% \pm 8,44	62,33% \pm 3,51**
9d (9 Tage nach Passage)	17,47% \pm 2,44	55,20% \pm 6,25**

Tab. 4.2: Anteil der GFAP-positiven Zellen an den Calbindin-D28k-positiven Zellen mit / ohne Serum in %; \pm SD

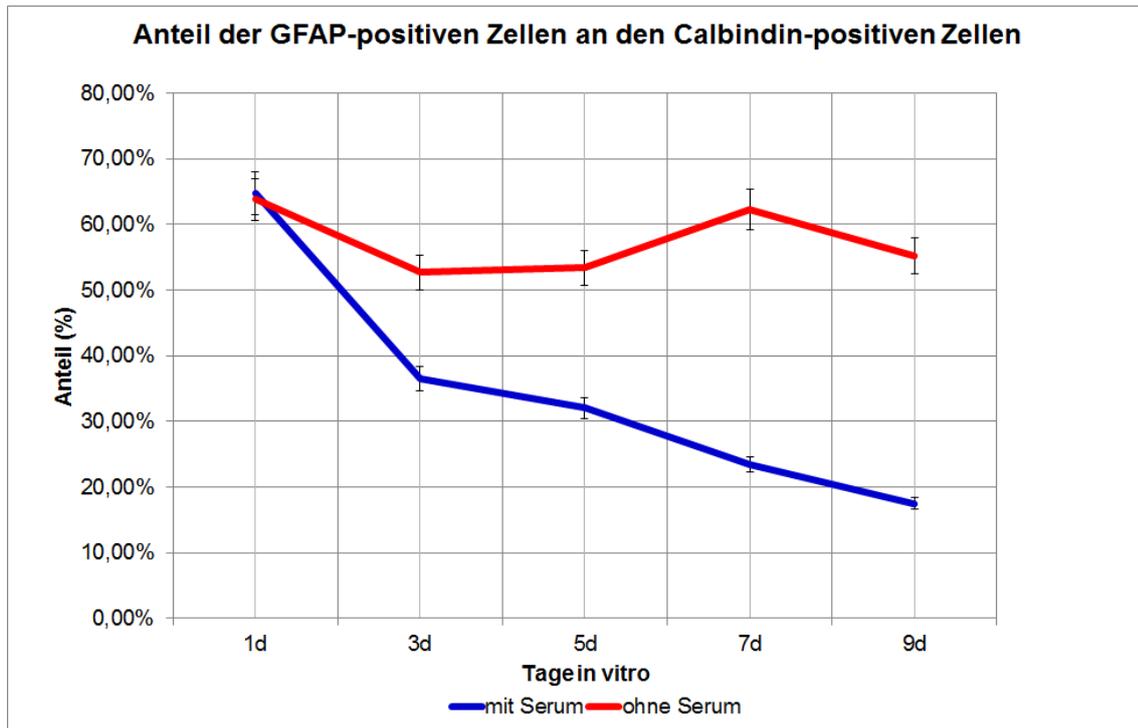


Abb. 4.19: GFAP-positive Zellen an Calbindin-positiven Zellen mit / ohne Serum in %, $p=0,0142$, signifikant

Wie in Abb. 4.19 dargestellt, kommt es im Zeitraum zwischen dem ersten und dem neunten Tag mit Serum zu einer rapiden Reduktion des Anteils der GFAP-positiven Zellen (bzw. Astrozyten) an allen Calbindin-D28k-positiven Gliazellen.

Anpassung der Daten mittels eines Polynoms erlaubt Extrapolation auf den Beginn der Kultur (CurveExpert Basic 1.4). Demnach sind zum Beginn der Untersuchung ca. 92 % der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen ebenfalls GFAP-positiv (Abb. 4.20).

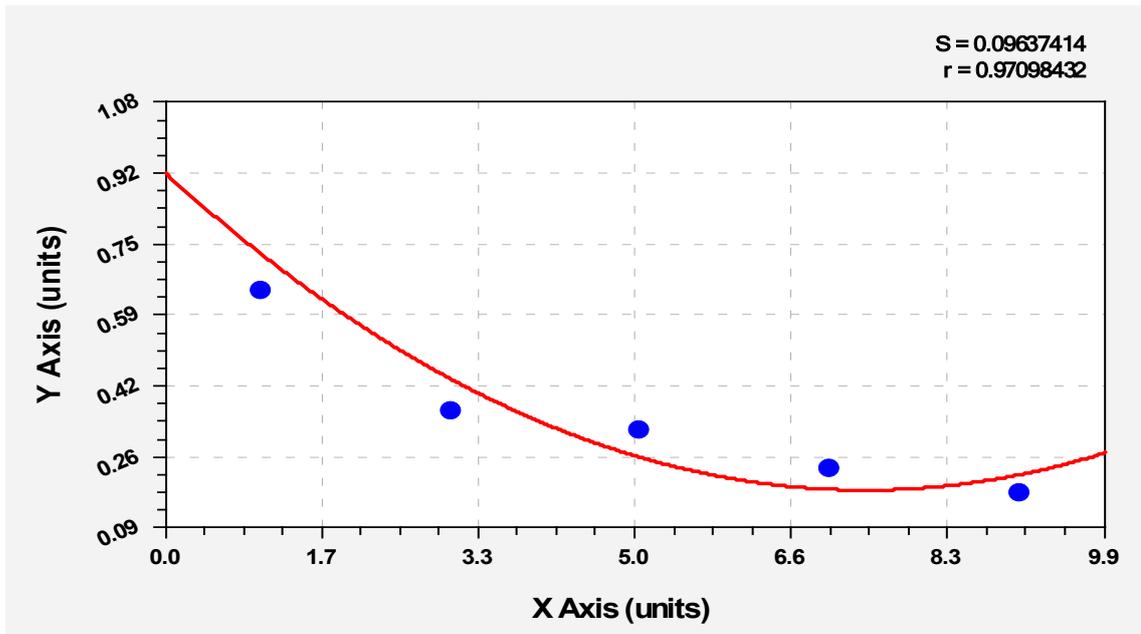


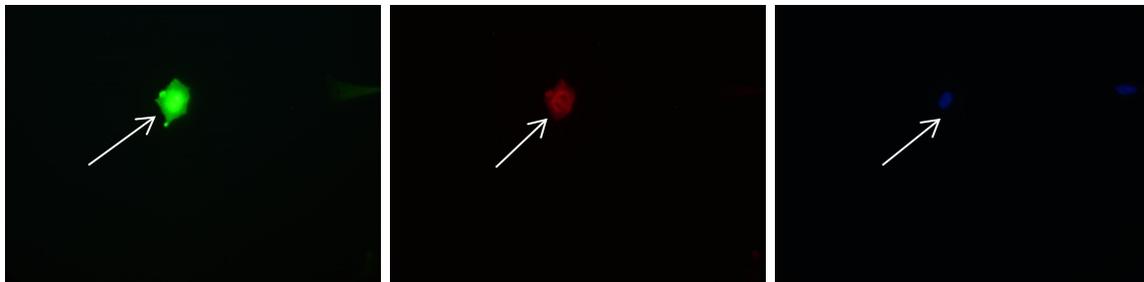
Abb. 4.20 Kulturen in serumhaltigem Medium: Anteil der GFAP-positiven Zellen an Calbindin-D28k-positiven Zellen bis zum neunten Tag nach der Passage.

Allerdings bleibt im Zeitraum zwischen dem ersten und dem neunten Tag ohne Serum das Verhältnis von GFAP-positiven Zellen (bzw. Astrozyten) zu Calbindin-D28k-positiven Gliazellen auf annähernd gleichem Niveau. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($P < 0,05$).

Etwa 24 Stunden nach der Passage werden die Zellen in serumfreiem Kulturmedium kultiviert. In diesen ersten 24 Stunden mit Serum sinkt der Anteil an GFAP-positiven Zellen um ca. 35 %. Ohne Serum nimmt der Anteil nach 9 Tagen um nur ca. 10 % ab. Das heißt, mit Serum gehen deutlich mehr GFAP-positive Zellen verloren. Vermutlich sind alle Calbindin-D28k-positiven Gliazellen ebenfalls GFAP-positive Zellen (bzw. Astrozyten). Angesichts eines Wachstum-Faktors im Serum kommt es zu einer rapiden Reduktion des Anteils der GFAP-positiven Zellen an den Calbindin-D28k-positiven Gliazellen.

4.5 Das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen nach mechanischer Läsion

Etwa 24 Stunden nach der Passage wird bei den Zellen eine Läsion durchgeführt und anschließend weiter kultiviert. Die Läsion (Kratzwunde) ist ca. 6 mm breit. Nach einem Tag sind auffallend mehr Calbindin-D28k-positive Gliazellen unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop und dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. Bis zum vierten Tag ist die Anzahl der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen noch weiter angestiegen (Abb. 4.21 a/b/c, Abb. 4.22 a/b und Abb. 4.23 a/b/c).

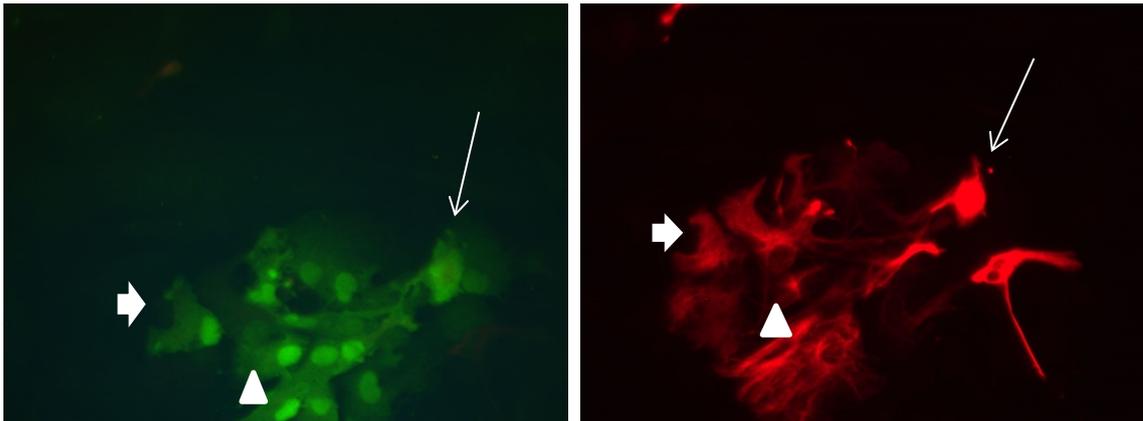


a) mit Anti-Calbindin-D28k
(polyklonaler Antikörper
von SWANT)

b) mit Anti-GFAP

c) Zellkernfärbung mit
DAPI

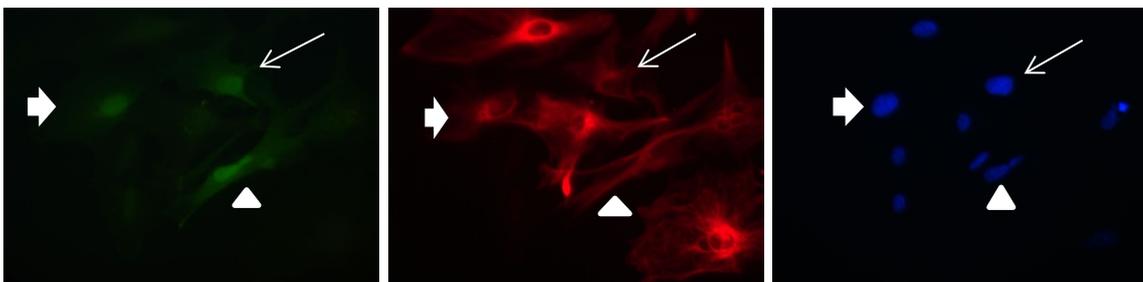
Abb. 4.21 Kulturen einen Tag nach mechanischer Läsion in serumhaltigem Medium, zwei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie.
Eine Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyte (lange Pfeile).



a) mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) b) mit Anti-GFAP

Abb. 4.22 Kulturen zwei Tage nach mechanischer Läsion in serumhaltigem Medium, drei Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594). Epifluoreszenz Mikroskopie.

zahlreiche Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (langer Pfeil, kurzer Pfeil und Dreiecke).



a) mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) b) mit Anti-GFAP c) Zellkernfärbung mit DAPI

Abb. 4.23 Kulturen vier Tage nach mechanischer Läsion in serumhaltigem Medium, fünf Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie.

zahlreiche Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (langer Pfeil, kurzer Pfeil und Dreieck).

Die Abbildungen 4.22 und 4.23 zeigen, dass die Calbindin-D28k-positiven und GFAP-positiven Gliazellen zwei oder vier Tage nach mechanischer Läsion einen Klumpen bilden. Die Morphologie der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen ist mehr polygonal.

Die Vermehrung von Calbindin-D28k-positiven Gliazellen wird bis vier Tage nach der mechanischen Läsion beobachtet. Ab dem fünften Tag nach der mechanischen Läsion nimmt die Zellzahl der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen sukzessive ab. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse aus der Literatur (Lee et al. 2004).



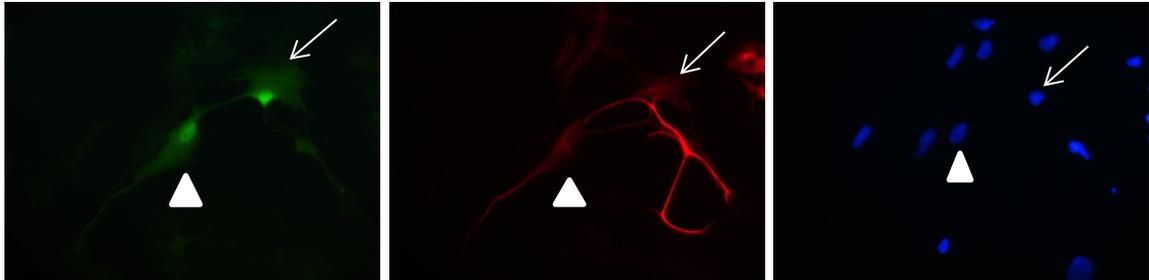
a). Zellkernfärbung mit DAPI, einen Tag nach der Läsion b). Zellkernfärbung mit DAPI, drei Tage nach der Läsion c). Zellkernfärbung mit DAPI, fünf Tage nach der Läsion

Abb. 4.24 Kulturen nach der mechanischen Läsion in serumhaltigem Medium, einen, drei und fünf Tage nach der Läsion: Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie. Die Bereiche, in denen die Zellen durch die mechanische Läsion zerstört wurden, sind durch die weißen Balken markiert.

4.6 Das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen nach Zugabe von TNF- α

Etwa 24 Stunden nach der Passage werden die Zellen im Kulturmedium mit TNF- α (100ng/ml) sowie serumfreiem Kulturmedium mit TNF- α (100ng/ml) kultiviert. Die Zugabe von TNF- α (100ng/ml) zum Zellkulturmedium bewirkt ab dem dritten Tag eine deutlich vermehrte Zahl Calbindin-D28k-positiver Gliazellen. Allerdings wird die gleiche Erscheinung in einem serumfreien Kulturmedium mit TNF- α (100ng/ml) nicht beobachtet (Abb. 4.25). Mattson et al. zeigen im Gegensatz eine erhöhte Expression von

Calbindin-D28k in kultivierten Astrozyten 24 Stunden nach Zugabe von TNF- α oder TNF- β (Mattson et al. 1995).



a) mit Anti-Calbindin-D28k
(polyklonaler Antikörper
von SWANT)

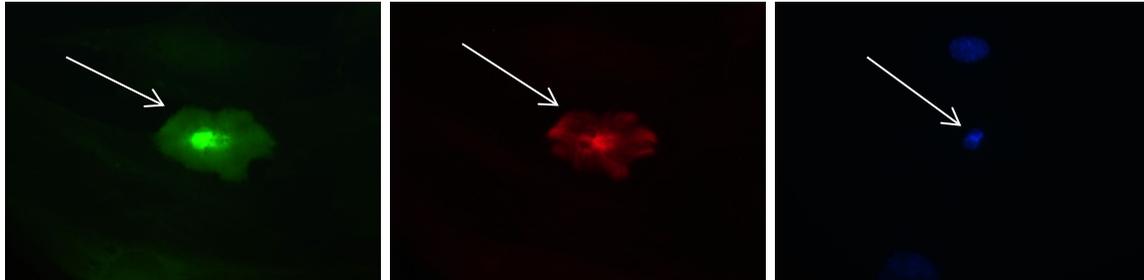
b) mit Anti-GFAP

c) Zellkernfärbung mit
DAPI

Abb. 4.25 Kulturen drei Tage nach Zugabe von TNF- α (100ug/ml) in serumhaltigem Medium, vier Tage nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie.
zwei Calbindin-positive und GFAP-positive Astrozyten (langer Pfeil und Dreiecke).

4.7 Das Vorkommen von Calbindin-D28k in Gliazellen mit 10% Zelldichte

Es werden jeweils circa 2.000 Zellen (10 % Zelldichte) auf den mit PLL beschichteten Deckgläsern untersucht (Abb. 4.26 und Abb. 4.27).



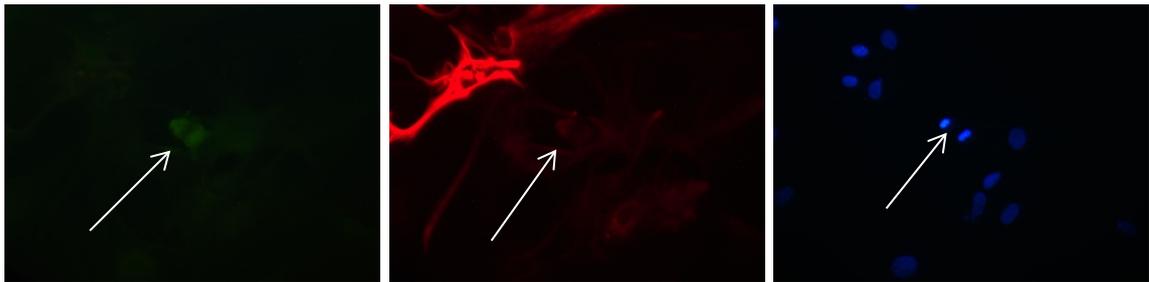
a) mit Anti-Calbindin-D28k
(polyklonaler Antikörper
von SWANT)

b) mit Anti-GFAP

c) Zellkernfärbung mit
DAPI

Abb. 4.26 Kulturen in serumhaltigem Medium sieben Tag nach der Passage mit 10% Zelldichte: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488) und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie.

Zwei benachbarte Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (lange Pfeile).



a) mit Anti-Calbindin-D28k
(polyklonaler Antikörper
von SWANT)

b) mit Anti-GFAP

c) Zellkernfärbung mit
DAPI

Abb. 4.27 Kulturen in serumhaltigem Medium neun Tag nach der Passage mit 10% Zelldichte: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488), und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Epifluoreszenz Mikroskopie.

Zwei Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyten (lange Pfeile).

Auf den Deckgläsern werden jeweils circa 2.000 Zellen kultiviert. Von diesen jeweils 2.000 Zellen können nur wenige bis gar keine Calbindin-D28k exprimieren bzw. auf manchen Deckgläsern werden keine Calbindin-D28k-positiven Gliazellen beobachtet. Wie bereits die Ergebnisse des Anteils der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen an der Gesamtzellzahl gezeigt haben, exprimieren nur ein paar Promille Gliazellen Calbindin-D28k.

4.8 Das Verhältnis zwischen Calbindin-D28k-positiven Gliazellen und Neuronen

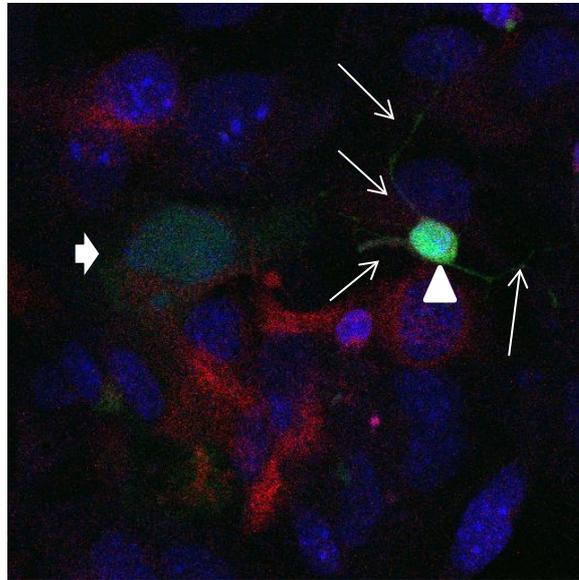


Abb. 4.28 Kulturen in serumhaltigem Medium drei Tag nach der Passage: Immunfluoreszenz mit Anti-Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von SWANT) (grün, sekundärer AK: donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488); und mit Anti-GFAP (rot, sekundärer AK: donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 594); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Konfokale Mikroskopie.

Zoom=4. Links eine Calbindin-D28k-positive und GFAP-positive Astrozyte (kurzer Pfeil). Daneben eine Calbindin-D28k-positive bzw. Calbindin-D28k-exprimierende Nervenzelle (Dreieck) mit Fortsätzen (lange Pfeile).

In Abb. 4.28 und Abb. 4.3 werden mehrere neuronale Fortsätze eines Calbindin-D28k-exprimierenden Neurons gezeigt, die in engem Kontakt mit einer Calbindin-D28k-positiven Gliazelle stehen. Es zeigt sich ein Verhältnis zwischen Calbindin-D28k-positiven Gliazellen und Neuronen zugunsten der Nervenzellen.

Das vorliegende Vorhaben trägt zum besseren Verständnis des Vorkommens von Calbindin-D28k in einer Untergruppe der Astrozyten sowie der Funktionen des nicht-neuronalen Calbindin-D28ks bei. Vermutlich spielen die Calbindin-D28k-positiven Gliazellen eine wichtige Rolle für die Entwicklung von Calbindin-D28k-positiven Neuronen.

5 Diskussion

In dieser Studie wurde die Expression von Calbindin-D28k in einem Cerebrum-Zellkulturmodell der Maus untersucht. Das Zellkulturmodell wurde etabliert, um einen neuen Einblick in das Vorkommen und die Regulation von Calbindin-D28k in Astrozyten gewinnen zu können, die möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung und anderen pathophysiologischen Vorgängen von Neuronen im Gehirn spielen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass primär kultivierte Astrozyten von neugeborenen Mäusen Calbindin-D28k exprimieren. Die Stimulation der Zellen unter verschiedenen pathologischen Bedingungen führt zu einem sichtbaren Anstieg der Expression von Calbindin-D28k. Es wird der Einfluss von unterschiedlichen Bedingungen auf die Regulation von Calbindin-D28k genauer betrachtet.

5.1 Primärkultur des Telencephalon (Cerebrum) und Optimierung der Zellkultur

Die Zellkultur spielt eine bedeutende Rolle für das Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie von Neuronen und Gliazellen *in vivo*. Viele biologische Prozesse sind schwierig *in vivo* zu untersuchen. Die große Anzahl von verschiedenen Zelltypen im ZNS stellt ein Problem dar. Es müssen sowohl die primären Effekte einzelner Zelltypen als auch die sekundären Effekte der beteiligten Zellsignalwege berücksichtigt werden. Astrozytenkulturen sind unverzichtbar für die Untersuchung der Prozesse bei der Aktivierung von Astrozyten (Puschmann et al., 2010; Codeluppi et al., 2011).

In dieser Arbeit wird ein Zellkulturmodell aus Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten etc.) und Neuronen von neugeborenen Mäusen etabliert. Dieses Modell wird einer Gruppe Calbindin-D28k exprimierender Astrozyten gegenüber gestellt. Es wird eine Charakterisierung des Calbindin-D28k vorgenommen, um seine Funktionen besser zu verstehen.

5.2 Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen Calbindin-D28k

In der vorliegenden Studie erfolgen die Untersuchungen an kultivierten Calbindin-D28k-positiven Gliazellen mit zwei polyklonalen Antikörpern gegen Calbindin-D28k und mit zwei monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin-D28k (von SWANT und von SIGMA). Die immunhistochemische Reaktion der kultivierten Calbindin-D28k-positiven Gliazellen kann mit den vier verschiedenen Antikörpern farblich kenntlich gemacht werden. Mit allen Antikörpern wird gezeigt, dass primär kultivierte Astrozyten von neugeborenen Mäusen tatsächlich Calbindin-D28k exprimieren.

Außerdem wurden die immunhistochemischen Untersuchungen mit gentechnisch modifizierten Calbindin-D28k defizienten Mäusen durchgeführt. Bei diesen Mäusen, deren Zellen kein Calbindin-D28k aufweisen, können keine Calbindin-D28k-positiven Zellen mithilfe der Antikörper gegen Calbindin-D28k (polyklonaler Antikörper von Firma SWANT) festgestellt werden. Dieses Ergebnis beweist die Spezialität und Sensitivität dieses Antikörpers gegen Calbindin-D28k.

5.3 Expression und Regulation von Calbindin-D28K in der etablierten astrozytären Primärkultur

5.3.1 Calbindin-D28k-exprimierende Gliazellen sind Astrozyten

Die vorliegenden Experimente haben gezeigt, dass die beobachteten Calbindin-D28k-positiven Nichtneuronalen-Zellen Gliazellen sind. Anstatt den Phänotyp der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen nach dem Ausschlussprinzip zu bestimmen, wird mit dem spezifischen Marker GFAP der Nachweis erbracht, dass es sich um Astrozyten handelt.

Gibt es Argumente, die dagegen sprechen könnten, dass es sich hierbei um Astrozyten handelt? Eine solche Vermutung könnte darauf basieren, dass es im Zeitraum zwischen 1 und 9 Tagen nach der Passage mit Serum zu einer rapiden Reduktion des Anteils von GFAP-positiven Zellen an den Calbindin-D28k-positiven Gliazellen kommt. Auf den ersten Blick erscheint dies durchaus plausibel, da die meisten Calbindin-D28k-positiven Zellen in den 9 Tagen nach Passage GFAP-negativ sind. Darüber hinaus kann argumentiert werden, dass es unter unterschiedlichen Bedingungen (z. B. nach

mechanischer Läsion, nach Zugabe von TNF- α , etc) ebenfalls GFAP-negative Calbindin-D28k-Zellen gibt.

Jedoch gibt es überzeugende Argumente, die dafür sprechen, dass es sich um Astrozyten handelt:

1) Wie gezeigt werden konnte, sinkt der Anteil an GFAP-positiven Zellen (bzw. Astrozyten) an den Calbindin-D28k-positiven Gliazellen im Zeitraum zwischen 1 und 9 Tagen nach Passage mit Serum schnell. Allerdings bleibt im Zeitraum zwischen 1 und 9 Tagen ohne Serum das Verhältnis der GFAP-positiven Zellen (bzw. Astrozyten) zu den Calbindin-D28k-positiven Gliazellen auf annähernd gleichem Niveau, d. h., dass der prozentuale Anteil an Calbindin-D28k-positiven Gliazellen nicht sinkt.

2) Ungefähr 24 Stunden nach der Passage wird das Medium mit Serum durch eines ohne Serum ausgetauscht. Interessanterweise bleibt der Anteil an GFAP-positiven Zellen nach dem ersten Tag mit oder ohne Serum nahezu stabil. Es zeigt sich keine weitere Reduktion des Anteils an GFAP-positiven Zellen an den Calbindin-D28k-positiven Gliazellen ohne Serum.

3) Einer computerbasierten Berechnung zufolge (CurveExpert Basic 1.4) sind zu Beginn der Untersuchung ca. 92 % der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen ebenfalls GFAP-positiv und damit Astrozyten.

Auf Grund der oben genannten Überlegungen kann es sich nur um Calbindin-D28k positive Astrozyten handeln.

Es ist bekannt, dass sich die Astrozyten in den verschiedenen Regionen des ZNS hinsichtlich ihrer GFAP Immunoreaktivität unterscheiden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es unterschiedliche Populationen von Astrozyten mit verschiedenen Funktionen und physiologischen Zuständen gibt (Kafitz et al., 1999; Holthoff and Witte, 2000). Das heißt, dass die Eigenschaften von Astrozyten dynamisch sein können und mit den Bedingungen in ihrer Umgebung korrelieren. Es gibt allerdings keine Beweise für die Heterogenität von Astrozyten in Bezug auf die Expression von GFAP (Brenner et al., 1994; Eng et al., 2000; Nolte et al., 2001; Bushong et al., 2002). Auch die vorliegende Studie kommt zu dem Ergebnis, dass Astrozyten nicht generell heterogen sind. Ca. 17 % sind am neunten Tag nach der Passage in einem Kulturmedium mit Serum GFAP-positiv, aber die GFAP-positiven Astrozyten bilden keine Untergruppe mit spezifischen Eigenschaften innerhalb der Astrozyten. In einem Kulturmedium ohne Serum sind nach neun Tagen noch ca. 55 % der GFAP-positiven Zellen vorhanden.

Morrison et al. weisen darauf hin, dass die Expression von GFAP in Astrozyten der Regulierung durch Hormone und Wachstumsfaktoren unterliegt. Die Syntheserate von GFAP ist bei Astrozyten ohne Serum 2,5mal höher. Die Halbwertszeit von GFAP in den Astrozytenkulturen beträgt ungefähr 7,5 Tage. (Morrison et al., 1985; Chiu and Goldman, 1985). Der Abbau von GFAP wird teilweise durch eine calciumabhängige Proteinase gesteuert, die bei einem fast neutralen pH-Wert aktiv ist. Er kann durch Calcium-Chelat mit EGTA verhindert werden (DeArmond et al., 1983; Aono et al., 1985). In der vorliegenden Studie wird auch gezeigt, dass Astrozyten in einem Kulturmedium ohne Serum mehr GFAP exprimieren, d. h. nach neun Tagen sind mit Serum nur noch ca. 17 % der GFAP-positiven Zellen übrig. Ohne Serum sind nach neun Tagen noch ca. 55 % der GFAP-positiven Zellen vorhanden.

5.3.2 Eine Untergruppe der protoplasmatischen Astrozyten: Calbindin-D28k-exprimierende Astrozyten

Ohne Serum bleibt der Anteil der GFAP-positiven an den Calbindin-D28k-positiven Astrozyten auf annähernd gleichem Niveau, obwohl GFAP abgebaut wird. Es kann die Vermutung aufgestellt werden, dass alle neu gebildeten Calbindin-D28k-positiven Astrozyten Tochterzellen der Ursprungszellen sind und auf diese Weise der Anteil von ca. 60 % an Calbindin-D28k-positiven Zellen aufrechterhalten werden kann. Käme es zu spontanen Neubildungen von Calbindin-D28K-positiven Astrozyten, müsste sich der Anteil von GFAP-positiven an den Calbindin-positiven Astrozyten verändern.

In dem Versuch mit 10 % Zelldichte bzw. jeweils circa 2.000 Zellen exprimieren nur wenige Astrozyten Calbindin-D28k, bei manchen wurden **keine** Calbindin-D28k-positiven Astrozyten beobachtet. Wie bereits die Ergebnisse des Anteils der Calbindin-D28k-positiven Astrozyten an den Gesamtzellen gezeigt haben, exprimieren nur ein paar Promille der Kulturzellen Calbindin-D28k. Nachweislich zeigt sich nur bei wenigen Astrozyten die Expression von Calbindin-D28k. Diese Resultate decken sich mit o. g. Vermutung: Alle Calbindin-D28K-positiven Astrozyten sind Tochterzellen der Ursprungszellen. Das heißt, dass nur eine Untergruppe von Astrozyten in der Lage ist, Calbindin-D28k zu exprimieren.

Aktuelle Studien schlagen vor, dass protoplasmatische Astrozyten heterogene Populationen aufweisen (Walz, 2000), weil sie sich im Hinblick auf ihre GFAP Immunoreaktivität und ihre elektrophysiologischen Eigenschaften unterschiedlich verhalten (Jabs et al., 1997; D'Ambrosio et al., 1998; Walz and Lang, 1998). Gibt es verschiedene Arten von protoplasmatischen Astrozyten mit funktioneller Heterogenität, dann hat dies physiologische Auswirkungen auf das ZNS (Bushong et al., 2002).

Bushong et al. weisen darauf hin, dass bei einer GFAP-Färbung insgesamt nur etwa 15 % der protoplasmatischen Astrozyten markiert werden, das heißt, GFAP exprimieren (Bushong et al., 2002). In der vorliegenden Studie zeigt sich am 9ten Tag nach der Passage, dass ca. 17,47 % ($\pm 2,44$ %) der Calbindin-D28k-positiven Zellen ebenfalls GFAP-positiv sind. Die Expression von Calbindin-D28k scheint dabei jedoch auf eine kleine Subpopulation von protoplasmatischen Astrozyten begrenzt zu sein.

5.3.3 Eigenschaften der Calbindin-D28K-exprimierenden Astrozyten

Mattson et al. weisen darauf hin, dass im unversehrten adulten Gehirn keine Calbindin-D28k immunoreaktiven Astrozyten vorhanden sind. Allerdings exprimiert nur ein kleiner Prozentsatz der kultivierten Astrozyten Calbindin-D28k. Dabei handelt es sich um Zellen, die während der Zelldissoziation verletzt wurden und/oder die Expression ist von den Bedingungen innerhalb der Zellkultur abhängig (Mattson et al., 1995). Auch in der vorliegenden Studie wird gezeigt, dass Astrozyten im Cerebrum-Zellkulturmodell unter normalen sowie veränderten Bedingungen im Mäusegroßhirn Calbindin-D28k exprimieren.

Hinsichtlich der subzellulären Verteilung des Calbindin-D28k berichten Toyoshima et al., dass Calbindin-D28k vornehmlich unter einer Ischämie im Perikaryon nachweisbar ist (Toyoshima et al., 1996). Im Gegensatz hierzu kann in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Calbindin-D28k immunzytochemisch in Astrozyten generell im Nukleus mit einer deutlich höheren Konzentration vorkommt als im Zytoplasma.

Außerdem ist die Morphologie der Calbindin-D28k-exprimierenden Astrozyten auffallend unterschiedlich. Besonders differenzieren sich die Calbindin-D28k-Zellen in serumfreiem Kulturmedium durch die Ausbildung von langen Zellfortsätzen. Die Calbindin-D28k-positiven Astrozyten verändern ihre Morphologie – aus ihrer typischen polygonalen wird eine sternförmige Form. Wie Puschmann et al. zeigen, ist die Morphologie der Astrozyten nach mechanischer Läsion polygonaler (Puschmann et al., 2010). Allerdings wird in der vorliegenden Studie beobachtet, dass nach mechanischer Läsion mehr Calbindin-D28k-positiv Astrozyten mit deutlich größerem Nukleus vorhanden sind. Das heißt, die Kern-Plasma-Relation ist deutlich verändert. Auch Verkhratsky und Kettenmann weisen darauf hin, dass Astrozyten ihr Volumen deutlich erhöhen können, besonders unter pathologischen Bedingungen. Die Regulierung des Zellvolumens könnte mit dem intrazellulären Ca^{2+} -Signal in Verbindung stehen. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in Astrozyten kann die Funktion der Zelle verändern und möglicherweise die Freisetzung von Wachstumsfaktoren induzieren (Verkhratsky and Kettenmann 1996).

5.4 Funktionen von Calbindin-D28K in der astrozytären Primärkultur

Wie in der vorliegenden Studie beobachtet, beginnt die Expression von Calbindin-D28k in einem frühen Entwicklungsstadium der Zelle. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass Calbindin-D28k bereits während des Proliferationsstadiums exprimiert wird. Der höchsten Calbindin-D28k-positiven Zellen-Spiegel wird etwa 9 Tage nach der Passage erreicht und bleibt dann auf einem konstant hohen Niveau. Es wird gezeigt, dass das Vorkommen von Calbindin-D28k unter veränderten größer als unter normalen Bedingungen ist. Die Regulation wird möglicherweise durch verschiedene Faktoren beeinflusst.

Die in dieser Arbeit gezeigten Vorkommen und Regulation von Calbindin-D28K in Astrozyten geben Hinweise auf ihre Funktionen.

5.4.1 Schutzfunktion und Ca^{2+} Homöostase

Mattson et al. weisen darauf hin, dass Calbindin-D28k-positive Astrozyten relativ resistent gegen Schädigungen durch Kalzium oder Azidose sind. Sie werten dies als Hinweis darauf, dass Calbindin-D28k in den Zellen eine Schutzfunktion hat (Mattson et al., 1995), da es die Homöostase von intrazellulärem Kalzium steuert (Ahmed et al., 1996; Wernyj et al. 1999; Lee et al., 2004).

Die vorliegende Studie zeigt ebenfalls, dass die Expression von Calbindin-D28k unter veränderten Bedingungen sogar erhöht sein kann. Sowohl nach einer Schädigung durch mechanische Läsion als auch nach der Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$ findet weiterhin eine Expression statt. Darüber hinaus wird die Expression von Calbindin-D28k auch ohne Serum aufrechterhalten. Dies deutet ebenfalls auf die Schutzfunktion von Calbindin-D28k hin. Calbindin-D28k könnte ein mobiler zytoplasmatischer Kalziumpuffer sein, der die Verteilung von Kalzium innerhalb der gesamten Zelle verbessert. Da das Calbindin-D28k sich nicht nur im Nukleus sondern auch im Zytoplasma befindet, gilt seine Schutzfunktion für die gesamte Zelle.

5.4.2 Einfluss auf Neurogenese

Der Zusammenhang zwischen Astrozyten und der Neurogenese wird schon lange in der Literatur diskutiert. Astrozyten sezernieren eine ganze Reihe neurotropher Proteine, z. B. NGF (Nervenwachstumsfaktor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-3 (Neurotrophin 3), bFGF (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor) und CNTF (ziliärer neurotropher Faktor) sowie die Neuropeptide Enkephalin, Somatostatin und die Substanz P, die das Überleben von Neuronen und das Nachwachsen weiter fördern kann (Mucke and Eddleston, 1993; Schwartz und Nishiyama, 1994; Mattson et al., 1995; Wyss-Coray et al., 2003).

Protoplasmatische Astrozyten gehören zu den Gehirnzellen mit den kompliziertesten Strukturen. In der Literatur wächst die Überzeugung, dass protoplasmatische Astrozyten stark mit neuronalen Elementen im Gehirn interagieren und ihre Aktivität beeinflussen. Es wird vorgeschlagen, dass Astrozyten große Gruppen von Synapsen umgeben. Und diese Cluster neuronaler Elemente werden differentiell beeinflusst durch die Glia-Prozesse, die wieder davon abhängig sind, vom welchem Astrozytentyp diese Elemente umhüllt werden (Bushong et al., 2002).

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie geben ebenfalls wichtige Hinweise auf die Funktionen der Calbindin-D28k-exprimierenden Astrozyten, da sie Beweise für die Entstehung und das Wachstum von Neuronen liefern. Wie im Kapitel 4 (Abb. 4.3a/b und Abb. 4.28) gezeigt, haben Calbindin-D28K positive Astrozyten vermutlich einen Einfluss auf das Wachstum der Neuronen. Sie sezernieren möglicherweise einen unbekannten Faktor, der eine wichtige Rolle für die Entwicklung neuronaler Zellen spielt. Bei diesem Faktor könnte es sich um ein Protein handeln, dessen Bildung vom Vorhandensein des Calbindin-D28ks abhängig ist.

Vermutlich spielen die Calbindin-D28k-positiven Gliazellen eine wichtige Rolle für die Entwicklung von Neuronen bei pathologischen Zuständen (z.B. im Kulturmedium ohne Serum, nach mechanischer Läsion sowie nach Zugabe von TNF- α ins Kulturmedium).

Wie bereits in Kapitel 1.3.1 erwähnt, findet die Synthese von Proteinen im Zytoplasma statt. Die Proteine können sich in den Zellkern bewegen, wo sie ihre Funktion erfüllen können. Im Falle von Calbindin-D28K ist die Konzentration im Nukleus am höchsten, d. h. dass Calbindin-D28K sich in den Nukleus gewandert ist. Es befindet sich damit sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. Das Calbindin-D28K im Nukleus ist vermutlich für eine Vielzahl von Zellantworten verantwortlich. Möglicherweise reguliert Calbin-

din-D28K die Genexpression im Zellkern und beeinflusst damit sämtliche Zellfunktionen.

Darüber hinaus zeigt die vorliegende Studie ein größeres Vorkommen von Calbindin-D28k in Zellen, die eine veränderte Umgebung aufweisen (z. B. nach mechanischer Läsion, Kulturmedium mit TNF α , Kulturmedium ohne Serum). Eine wichtige Beobachtung ist dabei, dass es in diesen Umgebungen zu einer signifikanten Steigerung der Zahl der Calbindin-D28K-positiven Astrozyten kommt. Es kann vermutet werden, dass in diesen Umgebungen die Zellteilung der Calbindin-D28k-positiven Astrozyten besonders stimuliert wird, sodass mehr neue Calbindin-D28k-positiven Astrozyten gebildet werden. Ein weiteres wichtiges Ergebnis der vorliegenden Studie ist die Abnahme an Calbindin-D28k-positiven Astrozyten im Anschluss an die beobachtete Steigerung. Die Vermutung ist, dass die Calbindin-D28k-positiven Zellen einen unbekanntem Faktor produzieren, durch den sich der Zustand der Zelle verbessert. Durch ihn kann das Überleben und Nachwachsen von Neuronen weiter gefördert werden. Dieser verbesserte Zustand führt zu der beobachteten Abnahme an Calbindin-D28k-positiven Astrozyten. Die Zelle scheint unter den verbesserten Bedingungen weniger Calbindin-D28k zu benötigen und deshalb auch weniger zu exprimieren.

Auch wenn vieles dafür spricht, dass unter verschiedenen Bedingungen das Vorkommen von Calbindin-D28k-positiven Astrozyten für Neuronen günstig ist, bedarf es einer weiteren experimentellen Abklärung. Beispielsweise ist wenig darüber bekannt, welche intrazellulären Signalwege von Calbindin-D28k aktiviert oder inhibiert werden. Welche Rolle spielt Calbindin-D28k für das zeitliche wie räumliche Profil dieser Signalwege? Die molekularen Mechanismen, die hinter Calbindin-D28k medierte Aktionen stehen, sind bisher noch weitestgehend unbekannt. Nichtsdestotrotz ist durch die vorliegende Studie wichtige Funktionen von Calbindin-D28k in Astrozyten aufgezeigt.

5.4.3 Ausblick: Die Rolle von Calbindin-D28k-positiven Astrozyten im Cerebrum

Im Rahmen der vorliegenden Studie wird gezeigt, dass Calbindin-D28k in den verwendeten primär kultivierten Astrozyten von neugeborenen Mäusen exprimiert wird. Die Stimulation der Zellen unter bestimmten veränderten Bedingungen führt zu einem sichtbaren Anstieg der Zahl Calbindin-D28k-positiver Gliazellen im Kulturmedium. Außerdem werden morphologische Veränderungen der Calbindin-D28k-exprimierenden Astrozyten unter dem Einfluss von unterschiedlichen Bedingungen genauer betrachtet.

Allerdings ist die genaue Funktionsweise von Calbindin-D28k-positiven Astrozyten bisher noch weitestgehend unbekannt. Die vorliegende Studie zeigt, dass Calbindin-D28k immer im Zellkern mit höherer Konzentration vorhanden ist. Es wird die Vermutung aufgestellt, dass in diesen Zellen ein Faktor produziert wird, der das Wachstum der umliegenden Neuronen beeinflusst. Bisher ungeklärt ist, was bei der Produktion dieses Faktors auf der molekularen Ebene passiert. Welcher DNA-Abschnitt ist für die Bildung dieses Faktors zuständig? Wodurch wird das Ablesen dieses DNA-Abschnitts ausgelöst und welche Rolle spielt Calbindin-D28k dabei?

Die vorliegende Studie kommt zu dem Ergebnis, dass der Anteil an Calbindin-D28k-positiven Astrozyten unter pathologischen Bedingungen höher ist. Darüber hinaus werden die Auswirkungen der Calbindin-D28k-positiven Astrozyten auf die Nervenzellen in der Umgebung beschrieben. Besonders auffällig ist dabei die entstehende Nähe und der Kontakt zwischen den Calbindin-D28k-positiven Astrozyten und den Nervenzellen. Jedoch ist noch unbekannt, welche Rolle der oben erwähnte Faktor für diese Entwicklung der Nervenzellen spielt? Des Weiteren, wie ist diese Entwicklung der Nervenzellen zu bewerten?

Eine vielversprechende Forschungsrichtung wäre ein Vergleich zwischen den hier beschriebenen Calbindin-D28k-positiven Astrozyten mit denjenigen ohne Calbindin-D28k. Dieser Vergleich wäre im Rahmen einer Forschungsstudie mit Calbindin-D28k-defizienten Mäusen möglich. Entfällt ohne Calbindin-D28k die Neuroprotektion, die von Calbindin-D28k-positiven Astrozyten bekannt ist? Oder ganz allgemein, welche Rückschlüsse erlauben die Zellen ohne Calbindin-D28k über Calbindin-D28k-positive Astrozyten?

6 Zusammenfassung

Seit seiner Entdeckung ist das in Gliazellen vorkommende Calbindin-D28k noch nicht ausreichend erforscht worden. Für die Calbindin-D28k-positiven Astrozyten gibt es jedoch vereinzelte ab und zu Belege. Weder die Morphologie der Calbindin-D28k-positiven Gliazellen, die spezifische subzelluläre Verteilung des Calbindin-D28k in den Gliazellen, noch ihre Quantität / Anzahl wurde bis dato hinreichend untersucht. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen das Vorkommen und die Regulation von Calbindin-D28k in kultivierten Gliazellen in der Maus.

Es wird gezeigt, dass es im Allgemeinen unter veränderten Bedingungen zu einer raschen Vermehrung der Anzahl Calbindin-D28k-positiver Gliazellen kommt (z. B. im Kulturmedium ohne Serum, nach mechanischer Läsion). Allerdings wird im Kulturmedium mit TNF- α ein deutlicher Anstieg Calbindin-D28k-positiver Gliazellen ab dritten Tag beobachtet.

Im Zentrum der Untersuchung stehen die Astrozyten, eine Untergruppe der Gliazellen. Es wird gezeigt, dass Calbindin-D28k-enthaltende nicht-neuronale Zellen Astrozyten sind. Das heißt, dass außer Neuronen nur die Astrozyten Calbindin-D28k exprimieren können. Die Calbindin-D28k-positiven Astrozyten können mithilfe des Proteins GFAP, das als Marker verwendet wird, kenntlich gemacht werden.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist die Abnahme an Calbindin-D28k-positiven Astrozyten im Anschluss an den beobachteten Anstieg (z.B. im Kulturmedium ohne Serum, nach mechanischer Läsion). Die Morphologie der Calbindin-D28k-exprimierenden Astrozyten ist auffallend unterschiedlich (z.B. die Ausbildung von langen Zellfortsätzen in serumfreiem Kulturmedium). Das Calbindin-D28k kommt in Astrozyten im Nukleus mit einer deutlich höheren Konzentration vor als im Zytoplasma.

Die Ergebnisse zu den Calbindin-D28k-positiven Astrozyten geben Grund zur Annahme, dass die Expression von Calbindin-D28k jedoch auf eine Subpopulation von Astrozyten begrenzt ist. Vermutlich lösen die Calbindin-D28k-positiven Astrozyten die Bildung eines unbekanntes Faktors aus, der direkten Einfluss auf das Wachstum von Neuronen hat.

Die vorliegende Studie leistet damit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Eigenschaften und Funktionen Calbindin-D28k-positiver Gliazellen.

Literaturverzeichnis

- Ahmed, B. Y., T. Toyoshima, S. Yamagami, L. Jin, T. Itano, O. Miyamoto, M. Tokuda, T. H. Murakami, and O. Hatase (1996). "A chronological study of the expression of glial fibrillary acidic protein and calbindin-D28k by reactive astrocytes in the electrically lesioned rat brain." *Neurosci Res* 26: 271-78.
- Aono, S., H. Sato, R. Semba, S. Kashiwamata, and L. F. Eng (1985). "Studies on a Cerebellar 50,000-Dalton Protein Associated with Cerebellar Hypoplasia in Jaundiced Gunn Rats: Its Identity with Glial Fibrillary Acidic Protein as Evidenced by the Improved Immunoblotting Method." *J Neurochem* 44(6): 1877-84.
- Appikonda, S., K. N. Thakkar, and M. C. Barton (2016). "Regulation of gene expression in human cancers by TRIM24." *Drug Discov Today Technol* 19: 57-63
- Arai, H., I. Noguchi, Y. Makino, K. Kosaka, C. W. Heizmann, and R. Iizuka (1991). "Parvalbumin-immunoreactive neurons in the cortex in Pick's disease." *J Neurol* 238(4): 200-2.
- Baimbridge, K. G. and J. J. Miller (1982). "Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat." *Brain Res* 245(2): 223-9.
- Baimbridge, K. G., J. J. Miller and C. O. Parkes (1982). "Calcium-binding protein distribution in the rat brain." *Brain Res* 239(2): 519-25.
- Batiz, L. F., A. J. Jimenez, M. Guerra, L. M. Rodriguez-Perez, C. D. Toledo, K. Vio, P. Paez, J. M. Perez-Figares, and E. M. Rodriguez (2011). "New ependymal cells are born postnatally in two discrete regions of the mouse brain and support ventricular enlargement in hydrocephalus." *Acta Neuropathol* 121(6): 721-35.
- Berman, N. E. J., C. Yong, R. Raghavan, L. A. Raymond, S. V. Joag, O. Narayan, and P. D. Cheney (1998). "Neurovirulent Simian Immunodeficiency Virus Induces Calbindin-D-28K in Astrocytes." *Mol Chem Neuropathol* 34: 25-38
- Brenner, M., W. C. Kisseberth, Y. Su, F. Besnard, and A. Messing (1994). "GFAP Promoter Directs Astrocyte-specific Expression in Transgenic Mice." *J Neurosci* 14(3): 1030-7.
- Burgoyne, R. D. and L. P. Haynes (2012). "Understanding the physiological roles of the neuronal calcium sensor proteins." *Mol Brain* 5:2.
- Bushong, E. A., M. E. Martone, Y. Z. Jones, and M. H. Ellisman (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains." *J. Neurosci* 22(1): 183-92.
- Celio, M. R. (1990). "Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system." *Neuroscience* 35(2): 375-475.

- Chiu, F.C. and J. E. Goldman (1985). "Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Expression in CNS Development and in Pathological States." *J Neuroimmunol* 8(4-6): 283-92.
- Christakos, S., W. B. Rhoten, and S. C. Feldman (1987). "Rat Calbindin D28k: Purification, Quantitation, Immunocytochemical Localization, and Comparative Aspects." *Methods Enzymol.* 139: 534-51.
- Christakos, S., C. Gabrielides, and W. B. Rhoten (1989). "Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology." *Endocr Rev.* 10(1): 3-26.
- Christie, M., C. W. Chang, G. Rona, K. M. Smith, A. G. Stewart, A. A. Takeda, M. R. Fontes, M. Stewart, B. G. Vertessy, J. K. Forwood, and B. Kobe (2016). "Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus." *J Mol Biol.* 428(10 Pt A): 2060-90.
- Codeluppi, S., E. N. Gregory, J. Kjell, G. C. Wigerblad, L. Olson, and C. I. Svensson (2011). "Influence of rat substrain and growth conditions on the characteristics of primary cultures of adult rat spinal cord astrocytes." *J Neurosci Methods* 197(1): 118-27.
- Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper, and S. J. Smith (1990). "Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling." *Science* 247: 470-3.
- D'Ambrosio, R., J. Wenzel, P. A. Schwartzkroin, G. M. McKhann II, and D. Janigro (1998). "Functional Specialization and Topographic Segregation of Hippocampal Astrocytes." *J Neurosci* 18: 4425-38.
- DeArmond, S. J., M. Fajardo, S. A. Naughton, and L. F. Eng (1983). "Degradation of Glial Fibrillary Acidic Protein by a Calcium Dependent Proteinase: an Electroblob Study." *Brain Res.* 262(2): 275-82.
- De Groot, C. J. A., C. H. Langeveld, C. A. M. Jongenelen, L. Montagne, P. V. Der Valk, and C. D. Dijkstra (1997). "Establishment of Human Adult Astrocyte Cultures Derived From Postmortem Multiple Sclerosis and Control Brain and Spinal Cord Regions: Immunophenotypical and Functional Characterization." *J Neurosci Res.* 49(3): 342-54.
- Diaz-Romero, J. and D. Nestic (2016). "S100A1 and S100B: Calcium Sensors at the Cross-Roads of Multiple Chondrogenic Pathways." *J Cell Physiol* Dec 7.
- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar, and Y. L. Lee (2000). "Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000)." *Neurochem Res.* 25(9-10): 1439-51.
- Ferrer, I., T. Tunon, M. T. Serrano, R. Casas, S. Alcantara, M.J. Zujar, and R. M. Rivera (1993). "Calbindin D-28k and parvalbumin immunoreactivity in the frontal cortex in patients with frontal lobe dementia of non-Alzheimer type associated with amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56: 257-61.
- Figiel, I. (2008). "Pro-inflammatory cytokine TNF- α as a neuroprotective agent in the brain." *Acta Neurobiol Exp (wars).* 68(4): 526-34.

- Freitas, N. and C. Cunha (2009). "Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins." *Curr Genomics*. 10(8): 550-7.
- Gasser, U. E. and M. E. Hatten (1990). "Central nervous system neurons migrate on astroglial fibers from heterotypic brain regions in vitro." *Proc Natl Acad Sci USA* 87(12): 4543-7.
- Hallermayer, K. and B. Hamprecht (1984). "Cellular Heterogeneity in Primary Cultures of Brain Cells Revealed by Immunocytochemical Localization of Glutamine Synthetase." *Brain Res*. 295(1): 1-11.
- Hicks, G. R. and N. V. Raikhel (1995). "Protein import into the nucleus: an integrated view." *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11: 155-88.
- Hof, P. R. and J. H. Morrison (1991). "Neocortical Neuronal Subpopulations Labeled by a Monoclonal Antibody to Calbindin Exhibit Differential Vulnerability in Alzheimer's Disease." *Exp Neurol*. 111(3): 293-301.
- Holthoff, K. and O. W. Witte (2000). "Directed Spatial Potassium Redistribution in Rat Neocortex." *Glia* 29: 288-92.
- Jabs, R., I. A. Paterson, and W. Walz (1997). "Qualitative analysis of membrane currents in glial cells from normal and gliotic tissue in situ: down-regulation of Na⁺ current and lack of P2 purinergic responses." *Neuroscience* 81: 847-60.
- Jaenisch, R and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nat Genet* 33: 245-54.
- Jeong, S. (2017). "SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA." *Mol Cells* 40(1): 1-9.
- Kafitz, K. W., H. R. Güttinger, and C. M. Müller (1999). "Seasonal Changes in Astrocytes Parallel Neuronal Plasticity in the Song Control Area HVC of the Canary." *Glia* 27: 88-100.
- Kang, J., L. Jiang, S. A. Goldman, and M. Nedergaard (1998). "Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission." *Nat. Neurosci.* 1: 683-92.
- Kettenmann, H. and A. Verkhratsky (2008). "Neuroglia: the 150 years after." *Trends Neurosci*. 31(12): 653-9.
- Kornhauser, J. M., D. E. Nelson, K. E. Mayo, and J. S. Takahashi (1990). "Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus." *Neuron* 5(2): 127-34.
- Kreutz, M. R., J. R. Naranjo, K-W. Koch, and B. Schwaller, eds. (2016). *The Neuronal Functions of EF-hand Ca²⁺-binding Proteins*, 2nd Edition. Lausanne: Frontiers Media.
- Kuchelmeister, K. (2012). *Zellen des Zentralnervensystems und ihre Reaktionsformen*. In W. Paulus und J. M. Schröder (Hrsg.). *Neuropathologie*. Springer Verlag.

- Lee, J. C., I. K. Hwang, J. H. Cho, S. M. Moon, T. C. Kang, W. K. Kim, and M. H. Won (2004). "Expression and changes of calbindin D-28k immunoreactivity in the ventral horn after transient spinal cord ischemia in rabbits." *Neurosci Lett.* 369: 145-9.
- Li, Z. H., C. Decavel, and G. I. Hatton (1995). "Calbindin-D28k: role in determining intrinsically generated firing patterns in rat supraoptic neurones." *J Physiol* 488(3): 601-8.
- Liu, F. C. and A. M. Graybiel (1992). "Transient Calbindin-D28k-Positive Systems in the Telencephalon: Ganglionic Eminence, Developing Striatum and Cerebral Cortex." *J Neurosci.* 12(2): 674-90.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). *Taschenlehrbuch Histologie. 2. Aufl.* Thieme, Stuttgart New York
- Mathewson, A. and M. Berry (1985). "Observations on the Astrocyte Response to a Cerebral Stab Wound in Adult Rats." *Brain Res.* 327: 61-9.
- Mattson, M. P., B. Cheng, S. A. Baldwin, V. L. Smith-Swintosky, J. Keller, J. W. Geddes, S. W. Scheff, and S. Christakos (1995). "Brain Injury and Tumor Necrosis Factors Induce Calbindin D-28k in Astrocytes: Evidence for a Cytoprotective Response." *J Neurosci Res.* 42: 357-70.
- Mearow, K. M., J. F. Mill, and L. Vitkovic (1989). "The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* 6(4): 223-32.
- Metaa, M. and E. A. Newman (2006). "Calcium Signaling in Specialized Glial Cells." *Glia* 54(7): 650-5.
- Morrison, R. S., J. De Vellis, Y. L. Lee, R. A. Bradshaw, and L. F. Eng (1985). "Hormones and Growth Factors Induce the Synthesis of Glial Fibrillary Acidic Protein in Rat Brain Astrocytes." *J Neurosci Res* 14(2):167-76.
- Mucke, L. and M. Eddleston (1993). "Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system." *FASEB J.* 7: 1226-32.
- Mukherjee, R., A. Das, S. Chakrabarti, and O. Chakrabarti (2017). "Calcium dependent regulation of protein ubiquitination – interplay between E3 ligases and calcium binding proteins." *Biochim Biophys Acta Mar* 7.
- Nedergaard, M. (1994). "Direct Signaling from Astrocytes to Neurons in Cultures of Mammalian Brain Cells." *Science* 263: 1768-71.
- Nolte, C., M. Matyash, T. Pivneva, C. G. Schipke, C. Ohlemeyer, U. K. Hanisch, F. Kirchhoff, and H. Kettenmann (2001). "GFAP Promoter-Controlled EGFP-Expressing Transgenic Mice: A Tool to Visualize Astrocytes and Astrogliosis in Living Brain Tissue." *Glia* 33(1): 72-86.
- Pasti, L., M. Zonta, T. Pozzan, S. Vicini, and G. Carmignoto (2001). "Cytosolic Calcium Oscillations in Astrocytes May Regulate Exocytotic Release of Glutamat." *J. Neurosci.* 21: 477-84.

- Puschmann, T. B., K. J. Dixon, and A. M. Turnley (2010). "Species Differences in Reactivity of Mouse and Rat Astrocytes in vitro." *Neurosignals* 18: 152-63.
- Quimby, B. B., T. Lamitina, S. W. L'Hernault, and A. H. Corbett (2000). "The Mechanism of Ran Import into the Nucleus by Nuclear Transport Factor 2." *J. Biol Chem.* 275(37): 28575-82.
- Raingaud, J., A. J. Whitmarsh, T. Barrett, B. Derijard, and R. J. Davis (1996). "MKK3- and MKK6-Regulated Gene Expression Is Mediated by the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway." *Mol Cell Biol* 16(3): 1247-55.
- Schachner, M., E. T. Hedley-Whyte, D. W. HSU, G. Schoonmaker, and A. Bignami (1977). "Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling." *J Cell Biol* 75(1): 76-73.
- Schlenstedt, G. (1996). "Protein import into the nucleus." *FEBS Letters* 389(1): 75-9.
- Schwaller, B., M. Meyer, and S. Schiffmann (2002). "'New' functions for 'old' proteins: The role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice." *Cerebellum* 1: 241-58.
- Schwartz, J. P. and D. J. Wilson (1992). "Preparation and Characterization of Type 1 Astrocytes Cultured From Adult Rat Cortex, Cerebellum, and Striatum." *Glia* 5: 75-80.
- Schwartz, J.P. and N. Nishiyama (1994). "Neurotrophic Factor Gene Expression in Astrocytes During Development and Following Injury." *Brain Res. Bull* 35: 403-07.
- Seth, P. and N. Koul (2008). "Astrocyte, the star avatar: redefined." *J. Biosci.* 33(3): 405-21.
- Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." *Acta Neuropathol* 119: 7-35.
- Sommer, I. and M. Schachner (1981). "Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system." *Dev Biol.* 83(2):311-27.
- Stewart, M. (2007). "Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(3): 195-208.
- Taylor, A. N. and R. H. Wasserman (1967). "Vitamin D3-induced calcium-binding protein: partial purification, electrophoretic visualization, and tissue distribution." *Arch Biochem Biophys* 119(1): 536-40.
- Trepel, M. (2008). *Neuroanatomie. Struktur und Funktion.* 4. Aufl. Urban & Fischer, München Jena
- Toyoshima, T., S. Yamagami, B. Y. Ahmed, L. Jin, O. Miyamoto, T. Itano, M. Tokuda, H. Matsui, and O. Hatase (1996). "Expression of calbindin-D28K by reactive astrocytes in gerbil hippocampus after ischaemia." *NeuroReport* 7: 2087-91.
- Ulfing, N. (2008). *Kurzlehrbuch Neuroanatomie.* Thieme, Stuttgart New York

- Vecellio, M., B. Schwaller, M. Meyer, W. Hunziker, and M. R. Celio (2000). "Alterations in Purkinje cells spines of calbindin D-28k and parvalbumin knock-out mice." *Eur J Neurosci.* 12(3): 945-54.
- Verkhatsky, A. and H. Kettenmann (1996). "Calcium signalling in glial cells." *Trends Neurosci.* 19: 346-352
- Verkhatsky, A., R. K. Orkand, and H. Kettenmann (1998). "Glial Calcium: Homostasis and Signaling Function." *Physiol. Rev.* 78: 99-141.
- Vinters, H. V. and B. K. Kleinschmidt-DeMasters (2008). General pathology of the central nervous system. In: Love, S., D. N. Louis, and D. W. Ellison (eds) *Greenfield's Neuropathology* 8th edn. Hodder Arnold, London, pp 1-62.
- Walz, W. (2000). "Controversy Surrounding the Existence of Discrete Functional Classes of Astrocytes in Adult Gray Matter." *Glia* 31: 95-103.
- Walz, W. and M. K. Lang (1998). "Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus." *Neurosci Lett* 257: 127-30.
- Wasserman, R. H. and A. N. Taylor (1966). "Vitamin D3-induced Calcium-Binding protein in chick intestinal mucosa." *Science* 152: 791-793.
- Welsch, U. (2006). *Lehrbuch Histologie.* 2. Aufl. Urban & Fischer, München Jena.
- Wernyj, R. P., M. P. Mattson, and S. Christakos (1999). "Expression of calbindin-D28k in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid β -peptide." *Brain Res Mol Brain Res* 64(1): 69-79.
- Wyss-Coray, T., J. D. Loike, T. C. Brionne, E. Lu, R. Anankov, F. Yan, S. C. Silverstein, and J. Husemann (2003). "Adult mouse astrocytes degrade amyloid- β in vitro and in situ." *Nat Med* 9(4): 453-7.
- Zanotti, S. and A. Charles (1997). "Extracellular Calcium Sensing by Glial Cells: Low Extracellular Calcium Induces Intracellular Calcium Release and Intercellular Signaling." *J Neurochem* 69: 594-602.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Meyer, der mir nicht nur die Anregung zu dieser experimentellen Arbeit gegeben hat, sondern mich auch stets mit ansteckender Begeisterung und geduldiger Unterstützung durch dieses Projekt geführt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, allen Mit-Doktorandinnen und Doktoranden der Arbeitsgruppe Meyer für ihre Hilfsbereitschaft, Aufmunterung und die nette Atmosphäre in „unserem“ Raum, insbesondere bei Frau Sabine Mach, die mit Rat, Tat und vielen fruchtbaren Diskussionen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte.

Besonderer Dank gilt der Linguistin Frau Dr. Anja Kleemann-Krämer für ihre uneingeschränkte Unterstützung während der Niederschrift, welche mir Kraft für das Erreichen meines Zieles gab.

Eidesstattliche Versicherung

Xu

Jie

Name,

Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Vorkommen und Regulation von Calbin- din-D28k in Astrozyten des Gehirns unter unterschiedlichen Bedingungen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 15.Juli 2017

Jie Xu

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand