



Hitzeschockproteine in neuronalen Zellen: Entwicklungsabhängige Expression und differentielle Regulation nach Stress

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
angenommene

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von Frau

Grit Vollmer

geboren am 24.11.1976
in Recklinghausen

Gutachterin: Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Koch

Tag der Disputation: 19.09.2005

Es ist besser, ein kleines Licht zu entzünden,
als über große Dunkelheit zu fluchen.

Konfuzius

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg für die Überlassung des Promotionsthemas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ich danke ihr für die Unterstützung während dieser Zeit, für die Anregungen, ihre stetige Gesprächsbereitschaft und die Unterstützung bei der Präsentation von Ergebnissen auf Fachtagungen.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie/Neurochemie für ihre Hilfe und Unterstützung bei kleineren oder größeren Problemen und für das freundliche Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt der Tönjes-Vagt-Stiftung, Bremen, die durch die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Kooperationsprojekts „Synaptische Pathologie und biochemische Veränderungen im Rattenhirn nach Störungen der Hirnentwicklung“ die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Prof. Dr. Michael Koch, Dr. Kerstin Schwabe und Stephan Röskam (Institut für Hirnforschung, Abt. Neuropharmakologie, Universität Bremen) danke ich für die kooperative Zusammenarbeit.

Vielen Dank Christine Bellmann, Stephan Ewert und Robert Meyer für das Korrekturlesen.

Und ein ganz spezieller Dank meinen Eltern und meiner Oma für ihre immerwährende Unterstützung.

Abkürzungsverzeichnis

AD	<i>Alzheimer's disease</i> /Alzheimer-Krankheit
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
AP	Aprotinin
Apaf-1	Apoptose-Protease aktivierender Faktor-1
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor-2
Arc	<i>Activity-regulated-cytoskeleton-associated protein</i>
AS	Aminosäure
AS-ODN	Antisense-Oligonucleotid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BME	Basal Medium Eagle
bp	Basenpaare
CAM	<i>Cell adhesion molecule</i> /Zelladhäsionsmolekül
CBD	Corticobasale Demenz
CDK5	<i>Cyclin dependent kinase</i> /Cyclin-abhängige Kinase 5
cDNA	<i>Copy desoxyribonucleic acid</i> /komplementäre DNA
CGN	<i>cerebellar granule neurons</i> /Körnerzellen
CJD	<i>Creutzfeldt-Jakob disease</i> /Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CP	Corticalplatte
CR-Zellen	Cajal-Retzius-Zellen
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
Cyt c	Cytochrom c
DAB1	Disabled1
DAPI	Diamidinphenylindoldihydrochlorid
DISC-1	<i>Disrupted in Schizophrenia</i>
DIV	<i>Days in vitro</i> /Tage in Kultur
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
DTT	Dithiothreitol
ECM	<i>Extracellular matrix</i> /extrazelluläre Matrix
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAP-43	<i>Growth associated protein-43</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HMW	<i>High molecular weight</i>
HO	Hämoxygenase
HS	Hitzestress
HSE	Hitzeschockelement
HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
IF	Intermediärfilamente
IZ	Intermediärzone
kDa	Kilodalton
LTP	<i>Long term potentiation</i> /Langzeitpotenzierung
MACF	<i>Microtubule actin cross-linking factor</i>
MAP	Mikrotubulus-assoziiertes Protein

MARCKS	Myristiliertes Alanin-reiches C-Kinase Substrat
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> /Boten-Ribonucleinsäure
MSA	Multisystematrophie
MT	Mikrotubuli
MTOC	<i>Microtubule organizing center</i> /Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MW	<i>Molecular weight</i> /Molekulargewicht
MZ	Marginalzone
NF	Neurofilament
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NRG1	Neuregulin-1
NSF	N-Ethylmaleimid sensitiver Faktor
NUDEL	<i>NudE (nuclear distribution element) – like protein</i>
OS	Oxidativer Stress
PA	Phenanthrolin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> /Polymerase-Kettenreaktion
PD	<i>Pick's disease</i> /Pick-Krankheit
PFC	Präfrontaler Cortex
PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSP	<i>Progressive supranuclear palsy</i> /Progressive supranucleäre Blickparese
PSYN	Präsynaptische sekretorische Maschinerie
RGS4	<i>Regulator of G-protein signalling-4</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> /reaktive Sauerstoffverbindungen
RT	Reverse Transkriptase
SCG-10	<i>Superior cervical ganglia-10</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sHSP	<i>Small heat shock protein</i> /kleines Hitzeschockprotein
SP	<i>Subplate zone</i>
SPP	<i>Superplate</i>
SYN2	Synapsin II
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> /nicht translatierte Region
VLDLR	<i>Very low density-lipoprotein receptor</i>
VZ	Ventrikulärzone
ZNS	Zentrales Nervensystem

1.	Einleitung	1
1.1	Neurone und Glia.....	2
1.2	Stressfaktoren im zentralen Nervensystem.....	8
1.2.1	Stress und Störungen der Hirnentwicklung	17
1.2.2	Schizophrenie.....	17
1.3	Fragestellung	26
2.	Material und Methoden.....	29
2.1	Zellkultur	29
2.2	Morphologische Untersuchung	30
2.3	SDS-PAGE und Immunoblot.....	31
2.3.1	Probenherstellung für die SDS-PAGE	31
2.3.2	Proteinbestimmung nach Neuhoff <i>et al.</i> , 1979.....	31
2.3.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.3.4	Western Blot (Tank-/Wet-Blotting)	33
2.3.5	Antikörperinkubation.....	33
2.3.6	Immunochemische Detektion von Proteinen mit der ECL-Methode	35
2.4	Mikrotubuli-Binding-Assay.....	35
2.5	Semi-quantitative RT-PCR	36
2.5.1	Extraktion der Gesamt-RNA	36
2.5.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	37
2.5.3	PCR (Polymerase chain reaction)	37
2.5.4	Agarose-DNA-Gelelektrophorese	38
2.6	DNA-Fragmentationsanalyse	39
2.7	Indirekte Immunfluoreszenz.....	40
2.8	Antisense	41
3.	Ergebnisse	44
3.1	<i>In vitro</i> -Differenzierung von Neuronen.....	44
3.1.1	Morphologische Entwicklung <i>in vitro</i>	44
3.1.2	Biochemische Charakterisierung der Neuronenkultur mittels Immunoblot.....	46
3.2	Hitzeschockproteine in Neuronen und Astrozyten <i>in vitro</i> ..	48
3.2.1	Untersuchung der konstitutiven Expression von Hitzeschockproteinen während der <i>in vitro</i> -Differenzierung von Neuronen.....	49
3.2.2	Immunoblot-Analyse der HSP-Expression in Neuronen und Astrozyten nach Hitzestress und oxidativem Stress	53
3.2.3	Untersuchung zur Genexpression von HSPs in Neuronen und Astrozyten mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR	55
3.2.4	Assoziation von HSPs mit dem Cytoskelett in Neuronen und Astrozyten	57
3.2.4.1	Mikrotubuli in Neuronen und Astrozyten nach HS und OS <i>in vitro</i> ...	57
3.2.4.2	Colokalisation von HSP25 mit Mikrotubuli	59
3.2.4.3	Assoziation von HSPs mit MT in Neuronen und Astrozyten <i>in vitro</i> ..	61
3.2.5	Reaktion von Neuronen und Astrozyten auf Proteasomen-Inhibition <i>in vitro</i>	63
3.2.5.1	HSP-Induktion nach Inhibierung des proteasomalen Apparats in Neuronen und Astrozyten	64

3.2.5.2	HSP-Genexpression in Neuronen und Astrozyten nach Inhibierung des proteasomalen Apparats	65
3.2.5.3	Mikrotubuli-Verteilung in Neuronen und Astrozyten nach Proteasomen-Inhibition	66
3.2.5.4	Bindungsverhalten von HSPs an Mikrotubuli nach Behandlung mit MG132	67
3.3	Einfluss von Stress auf Zelltod	68
3.4	Zellulärer Stress durch Eingriff in die Hirnentwicklung	70
3.4.1	Einfluss der Unterdrückung von Reelin	70
3.4.1.1	Vorkommen von Reelin in kultivierten Neuronen	70
3.4.1.2	Unterdrückung der Synthese von Reelin mit Antisense-Oligonucleotiden <i>in vitro</i>	72
3.4.1.3	Unterdrückung der Reelin-Synthese mit Antisense- Oligonucleotiden <i>in vivo</i>	77
3.4.2.2	Hemmung der Spaltung des Reelin-Proteins	81
3.4.2	Einfluss von Ethanol auf Nervenzellen in Kultur	86
4.	Diskussion	89
4.1	Stressproteine in Neuronen und Astrozyten	89
4.1.1	Stressproteine in der neuronalen Entwicklung	89
4.1.2	Stressreaktion von kultivierten Neuronen und Astrozyten	90
4.1.3	Assoziation von HSPs mit dem Cytoskelett in Neuronen und Astrozyten	95
4.2	Eingriff in die Hirnentwicklung	97
4.2.1	Einfluss von Reelin auf kultivierte Neurone	98
5.	Zusammenfassung	105
6.	Literatur	108
7.	Anhang	122

1. Einleitung

Die Entwicklung des Nervensystems beginnt am Ende der dritten Woche nach der Befruchtung mit der Neurulation und vollzieht sich in mehreren Phasen. Zunächst werden die Zellen des Nervensystems aus Zellteilungen erzeugt. Neurone und Gliazellen entstehen aus ektodermalen Vorläuferzellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten und an unterschiedlichen Orten gebildet werden (Alberts et al., 2004). Während ihrer Entwicklung wandern Neurone entlang von Radialgliazellen zu ihrer endgültigen Position. Durch die sequentielle Generierung, Migration und Positionierung der Neurone entstehen die Zellschichten des Cortex (Frotscher, 1998). Nach Ende der Teilungstätigkeit wachsen Axone und Dendriten aus Wachstumskegeln der Neuronen aus und folgen Signalen entlang des Weges zur Zielregion. Dort bilden sie zahlreiche synaptische Kontakte. Letztendlich kommt es zur Gestaltung und Verfeinerung des neuronalen Netzwerks. Dies geschieht zum einen durch den Tod entbehrlicher Nervenzellen, zum anderen durch das Eliminieren überschüssiger Synapsen oder Verstärken anderer Verbindungen (Alberts et al., 2004). Die abschließende Differenzierung reicht noch bis in die zweite Lebensdekade hinein (Weinberger, 1994). Aversive Einflüsse, die das Gehirn während dieser Zeit treffen, können langfristige Folgen haben. Erkrankungen wie Schizophrenie, Epilepsie, Autismus und das fötale Alkoholsyndrom haben ihre Grundlage in Störungen der Hirnentwicklung. In entwicklungsneurobiologischen Störungen findet der pathologische Prozess während der Gehirnentwicklung statt, lange bevor sich die Krankheit klinisch manifestiert (Weinberger, 1994). Eine ganze Reihe neuropsychiatrischer Störungen, von geistiger Beeinträchtigung bis zur Schizophrenie, sind vermutlich eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen. Letztere wirken dabei auf das unreife Gehirn während kritischer Phasen der Entwicklung (Olney, 2001). Stress und pathologische Ereignisse können die Zellen des Gehirns schädigen und ihre Interaktion stören.

1.1 Neurone und Glia

Neurone

Das menschliche Gehirn enthält mehr als 10^{11} Neurone, von denen im Durchschnitt jedes mit tausend weiteren eine Verbindung eingeht (Alberts et al., 2004). Das Perikaryon oder Zellsoma bildet mehr oder weniger lange und dünne Fortsätze aus. Das Axon, von dem es pro Neuron immer nur eins gibt, leitet die Erregung vom Perikaryon weg. Dendriten, die in unterschiedlicher Zahl ausgebildet sein können, leiten die Erregung in der Regel zum Perikaryon hin. Sie sind oft zu ausgedehnten Dendritenbäumen verzweigt und können zahlreiche *spines* (Dornen) tragen, welche eine Bedeutung als postsynaptische Strukturen haben (Zilles und Rehkämper, 1998). Es gibt eine Reihe verschiedener Nervenzelltypen, die sich morphologisch durch die unterschiedliche Ausprägung der Dendriten, der Form des Zellsomas oder dem Verhältnis von Soma zu Fortsätzen unterscheiden. Man spricht je nach Anzahl der Zellfortsätze von uni-, bi- oder multipolaren Neuronen.

Neurone sind die am meisten polymorphen Zellen des Körpers und ihre Klassifikation erfolgt anhand der Gestalt, Lokalisation, Funktion oder des Transmittergehalts (Raine in Siegel et al., 1994). Nervenzellen sind mit anderen Nervenzellen zu Verbänden assoziiert. Die endgültige Form eines Neurons ist durch die Wechselwirkung mit seiner Umgebung bedingt, als Folge der Anpassung an die anderen Neurone und der notwendigen Verbindungen (Campos-Ortega in Dudel et al., 1996). Intrazellulär unterscheiden sich einzelne Neuronengruppen in der Zusammensetzung ihrer Transmitter, was Auswirkungen auf die spezifische Funktion hat.

Zur Analyse von Nervenzellen können eine Reihe neuronenspezifische Marker dienen, von denen einige entwicklungsabhängig exprimiert werden. Neurone besitzen spezifische Intermediärfilamente (IF), die Neurofilamente (NF), die vor allem in den Axonen angereichert sind. Sie unterscheiden sich von anderen intermediären Filamenten dadurch, dass sie aus Filamentbausteinen unterschiedlicher molekularer Masse zusammengesetzt sind, den leichten (NF-L), mittleren (NF-M) und schweren Untereinheiten (NF-H). Neurofilament-Proteine werden in der neuronalen Entwicklung zu unterschiedlichen Zeitpunkten gebildet. NF-L und NF-M werden gleich zu Beginn der Neurogenese exprimiert. Im Gehirn der Ratte kommen sie bereits embryonal an

Tag 12 (E12) vor und erreichen etwa an E15 adulte Level. NF-H wird ab E15 gebildet, die Menge bleibt jedoch bis E19 sehr gering und weit unterhalb der Mengen der anderen beiden NF-Formen. Erst während der postnatalen Entwicklung nimmt NF-H weiter zu und kommt vor allem in der späten neuronalen Differenzierung vor (Lariviere und Julien, 2003; Carden et al., 1987). Neurofilament-Proteine können N- und C-terminal phosphoryliert werden, was wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung führt (Zimmermann in Dudel et al., 1996). Phosphorylierte Formen von NF-H sind normalerweise nur im Axon und die weniger oder gar nicht phosphorylierten Formen in den Dendriten zu finden (Lee and Cleveland, 1996).

Ein weiterer neuronaler Marker, der entwicklungsabhängig exprimiert wird, ist Synaptophysin, welches im Hippocampus der Ratte erstmals an E17 entdeckt werden kann (Grabs et al., 1994). Synaptophysin ist ein Glykoprotein in der Membran präsynaptischer Vesikel (Biranowska et al., 2002). Zunächst ist Synaptophysin nur im Perikaryon und den Axonen zu detektieren, an E21 ist es auch in Dendriten zu finden und spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Auswachsen der neuronalen Fortsätze (Grabs et al., 1994). Während der Entwicklung steigt die Expression von Synaptophysin parallel zur Bildung der Synapsen (Knaus et al., 1986). Das neuronenspezifische, in der Membran von Wachstumskegeln lokalisierte GAP-43 ist speziell wichtig für das axonale Wachstum, sowohl während der Entwicklung als auch nach Verletzung (Meiri et al., 1988; Meiri et al., 1986). GAP-43 kann erstmals an E13 im Hirnstamm detektiert werden und nach der Geburt auch in anderen Hirnregionen. Ab P8 nimmt die Menge von GAP-43 ab bis sie an P16 adulte Level erreicht (Dani et al., 1991). An der Ausbildung der Dendriten ist das mikrotubuli-assoziierte Protein MAP2 beteiligt. Neurone exprimieren das embryonale MAP2c und die adulten Isoformen MAP2a und MAP2b. Etwa um Tag 10 bis 20 postnatal erfolgt ein Wechsel der Isoformen: MAP2a erscheint, während MAP2c gleichzeitig abnimmt. Diese Veränderung vollzieht sich, wenn das Wachstum der Dendriten abgeschlossen ist und die Neurone ihre endgültige Morphologie angenommen haben (Binder et al., 1986). MAP2 ist jedoch nicht neuronenspezifisch, sondern wird auch von Gliazellen exprimiert. So kann in Oligodendrozyten und Astrozyten *in vitro* vor allem MAP2c und zu einem geringen Anteil auch MAP2b identifiziert werden (Richter-Landsberg und Gorath, 1999; Müller et al., 1997).

Integrale Membranproteine wie die Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1 sind ebenfalls am Neuritenwachstum beteiligt (Thele et al., 2002). In kultivierten Neuronen fungiert L1 am Wachstumskegel als Rezeptor für Signale, die das Auswachsen der Fortsätze induzieren (Lemmon et al., 1989). L1 wird auch von differenzierten Neuronen exprimiert und spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Faszikulieren von Axonen (Kenwrick et al., 2000). Im entwickelnden Nervensystem spielen CAMs eine Rolle bei der Migration der Neurone. Die neuronale Migration ist auch von Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM) wie Reelin abhängig.

Die ECM reguliert auch andere Aspekte der neuronalen Entwicklung, wie axonales Wachstum, Synapsenbildung und das Überleben der Zellen (Venstrom und Reichardt, 1993). In der ECM gibt es zwei Hauptklassen von Makromolekülen: Polysaccharide vom Glycosaminoglycan-Typ, welche kovalent an Proteine zu einem Proteoglykan gebunden sind, sowie fibröse Proteine wie Kollagen und Laminin. Kollagene sind die Hauptstrukturproteine der ECM. Sie lagern sich zu Kollagenfibrillen zusammen und geben so der Matrix ihre Gestalt (Alberts et al., 2004). Proteoglykane wie Heparansulfat-Proteoglykane oder Chondroitinsulfat-Proteoglykane kommen vor allem im Nervensystem in großer Zahl vor. Proteoglykane sind sowohl Komponenten der neuronalen ECM als auch Zelloberflächen-Rezeptoren für ECM-Moleküle und Wachstumsfaktoren. Auch über Integrine, transmembrane Rezeptoren, sind Zellen mit der ECM verbunden. Integrine spielen eine Rolle bei der Adhäsion, Migration und dem Auswachsen von Fortsätzen. Verschiedene Integrin-Untereinheiten bilden Heterodimere und fördern z.B. in Interaktion mit Laminin, Fibronectin oder Kollagenen das Neuritenwachstum (Venstrom und Reichardt, 1993). Die integralen Membranrezeptoren interagieren mit intrazellulären Signalmolekülen und dem Aktin-Cytoskelett, wodurch Zellgestalt, Wachstum, Proliferation und Zellüberleben beeinflusst wird. Die Signaltransduktionskaskade wird i.d.R. durch cytoplasmatische Tyrosinkinase wie FAK (Fokaladhäsions-Kinase) und Mitgliedern der Src-Familie weitergeleitet (Alberts et al., 2004).

Die Zellmigration wird durch Glykoproteine, wie Fibronectine, Tenascine und Thrombospondine und einem kontrollierten Abbau der ECM-Bestandteile durch Matrix-Metalloproteinasen und Serinproteasen unterstützt (Alberts et al., 2004).

Gliazellen

Gliazellen werden in Makro- und Mikroglia unterteilt. Die zur Phagozytose fähigen Mikroglia übernehmen im Gehirn bei entzündlichen Prozessen die Rolle von Makrophagen. Zu den Makroglia zählen die Astrozyten und die Oligodendrozyten. Oligodendrozyten sind die myelinbildenden Zellen des ZNS. Sie wickeln ihre membranösen Ausläufer in mehreren Schichten um die Axone benachbarter Neurone. Ein Oligodendrozyt kann bis zu 50 Axone gleichzeitig myelinisieren. Die an metabolischen Funktionen des ZNS beteiligten Astrozyten, tragen zusammen mit Endothelzellen auch zur Bildung der Blut-Hirn-Schranke bei. In erster Linie sind es jedoch die *tight junctions* der Endothelzellen, die diese Barriere ausbilden. Die genaue Rolle der Astrozyten dabei ist nicht endgültig geklärt (Nedergaard et al., 2003).

Während der Entwicklung des Nervensystems bilden sich Astrozyten etwa zum Zeitpunkt der Geburt aus den Radialgliazellen (Slezag und Pfrieder, 2003; Zilles und Rehkämper, 1998). Astrozyten haben ein ausgeprägtes Intermediärfilament-System, welches aus dem astrozyten-spezifischen IF-Protein GFAP besteht. Die Zellkörper und Hauptfortsätze, jedoch nicht die feineren Fortsätze, sind reich an GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Nedergaard et al., 2003). Die Vorläuferzellen der Astrozyten exprimieren auch das IF-Protein Vimentin, während GFAP als Marker für reife Astrozyten dient (Gomes et al., 1999). Unter den pathologischen Bedingungen der Alexander-Krankheit wird GFAP zusammen mit kleinen Hitzeschockproteinen in cytoplasmatischen Einschlüssen, den sog. Rosenthal-Fasern, gefunden (Brenner et al., 2001). Die Alexander-Krankheit ist eine autosomal-rezessive neurodegenerative Erkrankung bei der es zu Makrozephalie und progressivem psychomotorischen Abbau und Spastik kommt (Pschyrembel, 1993).

Morphologisch lassen sich Astrozyten in zwei Gruppen unterteilen: Protoplasmatische Typ I-Astrozyten erscheinen in Kultur als flächig ausgebreitete Zellen ohne Fortsätze. Stellate Typ II-Astrozyten haben kleinere Zellkörper und lange faserige Fortsätze. Im Gehirn findet man fibröse Astrozyten in der weißen Substanz und protoplasmatische Astrozyten in der grauen Substanz (Kimmelberg und Norenberg, 1989).

Astrozyten bilden zwischen den neuronalen Elementen eine dichte Anordnung von Fortsätzen. Typischerweise entwickeln Astrozyten zwischen fünf und acht

Fortsätze, welche sich weiter verzweigen. Die Verteilung der Astrozyten im ZNS ist höchst organisiert. Die Zellkörper und größeren Fortsätze benachbarter Astrozyten kommen nicht miteinander in Kontakt. Der Raum, den ein Astrozyt für sich einnimmt, ist frei von anderen Astrozyten, nur die periphersten Fortsätze können mit anderen Astrozyten überlappen. Diese strukturelle Anordnung bewirkt, dass alle in einem bestimmten Gebiet befindlichen Synapsen unter dem Einfluss von einem einzigen Astrozyt stehen könnten (Nedergaard et al., 2003).

Neuron-Glia-Interaktionen

Neurone und Gliazellen befinden sich in engem Kontakt und interagieren auf vielfältige Weise. Gliazellen sind aktiv an der Entwicklung und metabolischen Regulation im ZNS beteiligt und sind essentiell für dessen Komplexität und Funktion. Mit Komplexität und Größe eines Gehirns nimmt die Anzahl der Astrozyten in Relation zu Neuronen dramatisch zu (Abb. 1). In niederen Säugetieren wie Ratten oder Mäusen beträgt das Verhältnis von Astrozyten zu Neuronen 1:3. Im Cortex des Menschen kommen auf jede Nervenzelle 1,4 Astrozyten. Dichtere und höher entwickelte synaptische Netzwerke benötigen mehr lokale Regulation und Kontrolle (Nedergaard et al., 2003).

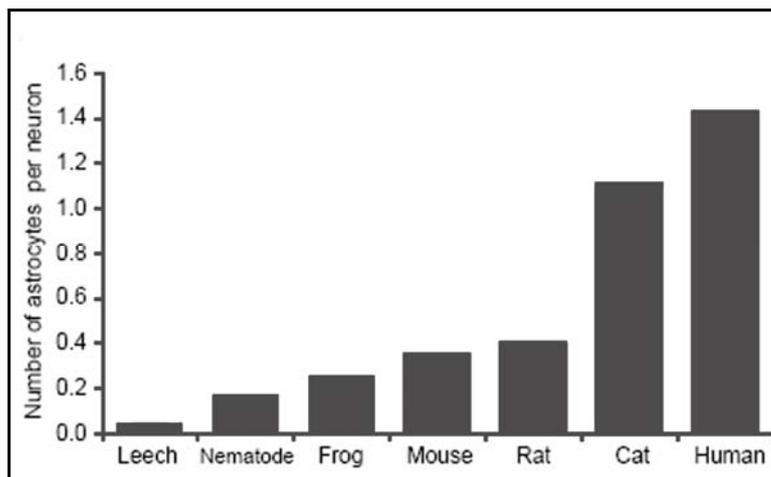


Abb. 1: Verhältnis der Astrozyten- zur Neuronenanzahl in unterschiedlichen Spezies. Die Anzahl der Astrozyten, die auf ein Neuron kommen, steigt mit der Größe und Komplexität des Gehirns. Bei den Säugern repräsentiert die Ratio nur den Cortex (modifiziert nach Nedergaard et al., 2003).

Astrozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Unterstützung von Neuronen durch metabolischen Stofftransport und der Sekretion von Wachstumsfaktoren. Astrozyten regulieren die chemische Umgebung von Neuronen, indem sie für die Kontrolle der lokalen Ionen und pH-Homöostase sorgen und Glucose und

metabolische Substrate bereitstellen. Sie beseitigen die von den Nervenzellen freigesetzten Ionen und Neurotransmitter (Nedergaard et al., 2003). So nehmen sie z.B. Glutamat und GABA aus dem synaptischen Spalt auf, wie auch das bei der Transmitterfreisetzung freigesetzte Kalium (Zilles und Rehkämper, 1996). Astrozyten sekretieren neuroaktive Substanzen, wie Wachstumsfaktoren, Transmitter, Steroide, Eicosanoide und Neuropeptide (Nedergaard et al., 2003). Über eine bidirektionale Kommunikation zwischen perisynaptischen Astrozyten und präsynaptischen Neuronen kann die synaptische Transmission reguliert werden: Von Astrozyten freigesetztes Glutamat beeinflusst die Freisetzung von Neurotransmittern, welche wiederum einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration benachbarter Glia bewirken. Diese aktivierten Astrozyten sekretieren daraufhin Transmitter wie Glutamat und ATP, und können durch ein Feedback die neuronale Transmitterfreisetzung entweder weiter verstärken oder aber unterdrücken. Auch durch die Aufnahme von Glutamat und durch Freisetzung von D-Serin können Astrozyten die synaptische Transmission beeinflussen (Newman, 2003).

Die Vorläufer der Astrozyten sind unerlässlich bei der Entwicklung des ZNS für die Wegfindung der Neurone: Radialglia sind bipolare Zellen, die zwischen der inneren und äußeren Oberfläche des Neuralrohrs ausgespannt sind (Campos-Ortega in Dudel et al., 1996). Postmitotische Neurone wandern etwa ab E12 aus der Ventrikulärzone, dem Ort ihrer Entstehung, entlang der Radialgliafasern zu ihrem Bestimmungsort. An diesem Prozess sind verschiedene Rezeptoren und Liganden, wie Neuregulin und ErbB4, Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), ECM-Moleküle wie Reelin, und deren Rezeptoren wie Integrine, beteiligt (Uher und Golden, 2000). Womöglich spielen Astrozyten auch eine Rolle bei der Regulation der Neurogenese im adulten Gehirn (Ransom et al., 2003).

Neue Untersuchungen zeigen, dass Astrozyten vermutlich die Synaptogenese im ZNS regulieren. Dabei sind sie an der Bildung, Reifung und Erhaltung sowie Eliminierung von Synapsen beteiligt (Slezag und Pfrieder, 2003). Mit Astrozyten kokultivierte Neurone bilden etwa siebenmal mehr Synapsen aus als reine Neuronen-Kulturen (Ullian et al., 2001). Nicht nur während der Hirnentwicklung kontrollieren sie die Bildung von Synapsen, auch darüber hinaus sorgen sie wahrscheinlich dafür, neue Verbindungen im adulten Gehirn zu stabilisieren (Slezag und Pfrieder, 2003).

Die in dieser Arbeit verwendeten neuronalen Kulturen werden an Tag 17 aus dem Gesamtgehirn embryonaler Ratten gewonnen (E17). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Neurone noch in der Entwicklung. Astrozyten und Oligodendrozyten bilden sich erst einige Tage später (Abb. 2). Die Kultur ist deshalb in früheren Kultivierungsstadien gut dazu geeignet, Studien an noch nicht vollständig ausdifferenzierten Neuronen ohne die Einflüsse von Gliazellen durchzuführen.

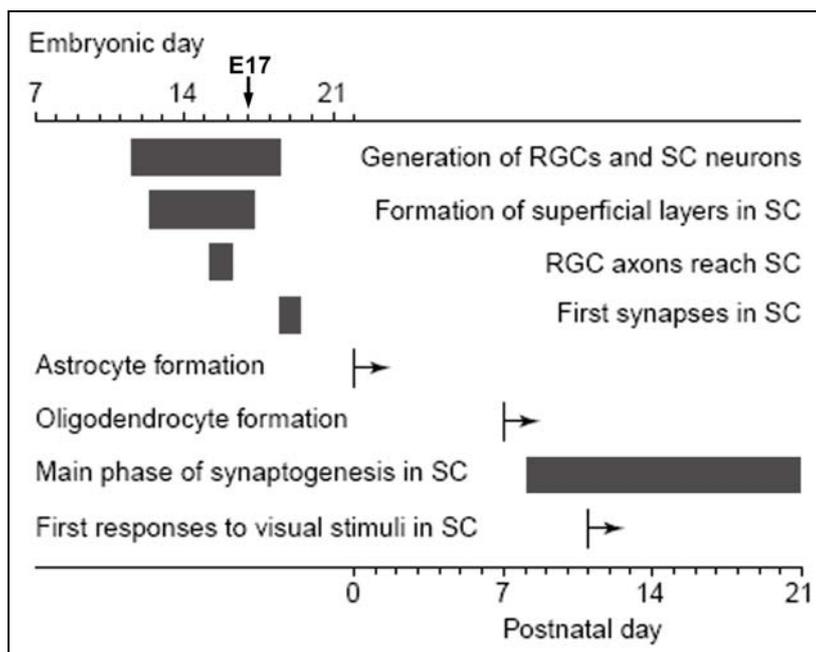


Abb. 2: Stadien der Hirnentwicklung in Nagern. Während die Entwicklung von Neuronen und die Synaptogenese bereits pränatal beginnen, bilden sich Gliazellen erst postnatal mit der Entstehung von Astrozyten aus Radialglia. Die Neuronen-Kulturen werden an E17 angelegt (Pfeil), bevor Gliazellen präsent sind. RGC: Retinale Ganglienzelle, SC: Superior Colliculus (modifiziert nach Slezag und Pfrieger, 2003).

1.2 Stressfaktoren im zentralen Nervensystem

Stress oder Stressfaktoren sind Bedingungen oder Agenzien, welche die Homöostase von Zellen stören. Stress kann auch zu Störungen der Hirnentwicklung führen. Zellulärer Stress kann durch verschiedene Stressoren ausgelöst werden, wie z.B. Hitzestress, oxidativer Stress, ionisierende Strahlung, Virusinfektionen oder chemische Agenzien, wie Schwermetalle und Ethanol. Unter diesen Stress-Bedingungen kann es nicht nur zur Veränderung des Zellmilieus kommen, sondern auch zur Schädigung von Makromolekülen,

wie DNA, Proteinen und Lipiden bis hin zum nekrotischen oder apoptotischen Zelltod.

Zellen reagieren auf Stress mit einer Stressantwort, zu der die Induktion von Hitzeschockproteinen (HSPs) gehört. HSPs oder Stressproteine helfen, unter Stresseinwirkung denaturierte Proteine wieder korrekt zu falten. Die unterschiedlichen HSPs werden nach ihrem Molekulargewicht in die fünf Hauptfamilien HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 und sHSPs (*small heat shock proteins* = kleine HSPs) eingeteilt (Craig et al., 1994). In eukaryotischen Zellen können HSPs in verschiedenen Kompartimenten wie Nucleus, Mitochondrien oder Endoplasmatisches Retikulum lokalisiert sein oder dorthin transloziert werden.

HSP90

HSP90 wird im Gehirn von Säugern konstitutiv exprimiert (Brown, 1994; D'Souza und Brown, 1998; Loones et al., 2000). Es gibt zwei Isoformen von HSP90. HSP90 α wird konstitutiv in geringeren Mengen exprimiert als HSP90 β , ist aber im Gegensatz zu HSP90 β stark induzierbar (Loones et al., 1997). Unter physiologischen Bedingungen spielt HSP90 eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. HSP90 ist daran beteiligt, dass verschiedene Signalmoleküle die Konformation ihres aktiven Status erreichen und erhalten, indem es mit diesen Molekülen Heterokomplexe bildet. HSP90 und HSP70 kooperieren mit Cochaperonen und Cofaktoren in einem Multichaperon-Komplex, dem Foldosom (Pratt und Toft, 2003). Zu den Substraten von HSP90 gehören z.B. Steroidhormonrezeptoren, Zellzyklusproteine oder Signaltransduktionsmoleküle (Pratt und Toft, 2003; Young et al., 2001). Zudem scheint HSP90 durch die Interaktion mit Actin und Mikrotubuli an der Zellmigration und -bewegung beteiligt zu sein (Rousseau et al., 2000; Craig et al., 1994). Auch durch seine Funktion beim Zellzyklus und der Interaktion mit neurotrophen Faktoren spielt HSP90 vermutlich eine bedeutende Rolle bei der frühen Hirnentwicklung (Calabrese et al., 2002).

Unter Stressbedingungen hält HSP90 seine Substrate unter ATP-Verbrauch in einer faltungsfähigen Konformation und verhindert so die irreversible Denaturierung. Wird ADP gebunden, unterstützt HSP90 die Degradierung der Substrate, indem es sie zum Proteasom überführt (Neckers, 2002). HSP90

bindet an cytoskelettale Elemente und ist möglicherweise an der Stabilisierung und nach Stress am Schutz des Cytoskeletts beteiligt.

HSP70

Das 72kDa induzierbare Hitzeschockprotein HSP70 gehört zur Familie der HSP70-Chaperone. Mitglieder der HSP70-Familie erkennen frisch translatierte Polypeptidketten und teilweise gefaltete Intermediate von Proteinen und binden an diese. Durch Kooperation mit HSP40 wird verhindert, dass Proteine falsch gefaltet werden oder aggregieren (Ohtsuka und Suzuki, 2000). Unter physiologischen Bedingungen findet man es kaum im Gehirn, aber unter Bedingungen wie z.B. Ischämie wird es induziert und wirkt neuroprotektiv (Sharp et al., 1999). Je nach Stärke des Stresses wird es sowohl in Neuronen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia induziert. In Nervenzellen ist HSP70 nur schwach induzierbar, in Gliazellen wird es nach Stress dagegen stark hochreguliert (Richter-Landsberg und Goldbaum, 2003; Vogel et al., 1997; Voisin et al., 1996; Foster und Brown, 1996; Satoh und Kim, 1994). In Zellkultur konnte beobachtet werden, dass von Gliazellen abgegebenes HSP70 von benachbarten Neuronen wieder aufgenommen wird und diese resistenter gegenüber Stress werden. Möglicherweise können Gliazellen eine unzureichende HSP70-Induktion in Neuronen durch den interzellulären Transfer von Stressproteinen unterstützen (Guzhova et al., 2001). Nach Hitzestress wurde HSP70 in Synapsen gefunden, was bedeuten könnte, dass es bei der Reparatur stress-geschädigter synaptischer Proteine hilft und somit zur Neuroprotektion an der Synapse beiträgt (Bechtold et al., 2000). Auch wenn davon ausgegangen wird, dass HSP70 neuroprotektiv ist (Yenari et al., 1999; Sharp et al., 1999), scheint es neurale Zellen nicht ausnahmslos vor dem Tod zu schützen (Fauconneau et al., 2002). So ergaben Untersuchungen von Lee et al. (2001) an Astrozyten und Neuronen transgener Mäuse, welche HSP70 konstitutiv exprimieren, dass die Zellen gegenüber einigen, aber nicht allen Arten von Stress geschützt sind. So sind Astrozyten zwar gegenüber Wasserstoffperoxid resistent, nicht aber gegenüber Hypoglykämie und dem Entzug von Glukose und Sauerstoff. Neuronen dieser Mäuse sind dagegen geschützt vor Sauerstoff-Glukose-Entzug und Glutamat. Die neuroprotektive

Funktion von HSP70 scheint von Art und Stärke des Stresses und der Zellpopulation abhängig zu sein (Lee et al., 2001).

Entdeckt wurde HSP70 als mikrotubuli-assoziiertes Protein, bevor es als molekulares Chaperon identifiziert wurde (Weller, 1988; Liang und MacRae, 1997). HSP70 reguliert die Tubulin-Polymerisierung durch die Interaktion mit mikrotubuli-assoziierten Proteinen wie Tau, oder indem es direkt an Tubulin bindet. Dies ist besonders wichtig während der Zellteilung u. -differenzierung, da dann ein dynamisches Cytoskelett erforderlich ist (Liang und MacRae, 1997).

HSP32

HSP32 oder Hämoxygenase-1 (HO-1) ist ein Stressprotein mit enzymatischer Aktivität, welches zur Familie der Hämoxygenasen (HO) gehört. Es wirkt antioxidativ, indem es prooxidatives Häm degradiert (Fauconneau et al., 2002). HO katalysieren die oxidative Degradation von Häm zu Biliverdin, welches anschließend in Bilirubin umgewandelt wird. Bilirubin und Biliverdin besitzen die Fähigkeit freie Radikale zu fangen und fungieren somit als Antioxidantien. Das beim Hämabbau entstehende Eisen dagegen könnte die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten begünstigen und damit oxidativen Stress auslösen (Schipper, 2000). HO-1 ist ein induzierbares Enzym, welches in Reaktion auf Hitzeschock, Häm oder oxidativen Stress synthetisiert wird (Sharp et al., 1999). HSP32 erfüllt keine Chaperon-Funktion, wird aber als Sensor für oxidativen Stress betrachtet.

Unter physiologischen Bedingungen werden nur geringe Mengen HSP32 im Gehirn gefunden (Ewing et al., 1992). Nach Stress findet man jedoch eine Induktion in Gliazellen, vor allem in Mikroglia (Sharp et al., 1999), in Neuronen ist es kaum nachzuweisen (Dwyer et al., 1995). Vermutlich nehmen Mikroglia das nach Verletzungen aus anderen Gehirnzellen frei werdende Häm auf. Dies induziert in den Mikroglia die Transkription von HO-1. Die Hämkonzentration in der Zelle wird durch die katalytische Aktivität von HO-1 erniedrigt (Calabrese et al., 2002).

sHSPs

Zu der Gruppe der sHSPs zählen kleine Hitzeschockproteine mit einer Größe von 12 bis 43kDa. Die kleinen HSPs sind die einzigen HSPs, die kein ATP benötigen um ihre Funktion zu erfüllen. Sie haben zwar eine Funktion als Chaperone und bewahren die Zelle vor Protein-Aggregationen, tragen aber nicht direkt zur korrekten Faltung bei. Vielmehr halten sie missgefaltete Proteine in einem löslichen und inaktiven Status. Durch Kooperation mit anderen HSPs erfolgt dann die Renaturierung unter ATP-Verbrauch (Wang und Spector, 2001). Im Vergleich zu anderen HSPs haben sie eine hohe Substratbindungskapazität.

In neuronalen Zellen findet man die beiden sHSPs HSP25 und α B-Crystallin. HSP25 und α B-Crystallin bilden oligomere Strukturen, die durch Phosphorylierung aufgelöst werden. HSP25 wird als Reaktion auf verschiedene Stimuli phosphoryliert (Calabrese et al., 2002). Die Phosphorylierung der sHSPs beeinflusst dabei ihre Interaktion mit Elementen des Cytoskeletts (Liang und MacRae, 1997). HSP25 interagiert mit verschiedenen Komponenten des Cytoskeletts und spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des cytoskelettalen Netzwerks (Geum et al., 2002). Durch die Bindung an Actin kann HSP25 dessen Oligomerisierung verhindern. Dabei spielt der Phosphorylierungsstatus eine entscheidende Rolle: Die Bindung von monomerem, unphosphoryliertem HSP25 inhibiert die Actin-Polymerisierung und stabilisiert Actin-Filamente. Phosphoryliertes HSP25 fördert dagegen die Polymerisierung von Actin, da HSP25 nach Phosphorylierung die Bindungsfähigkeit an die Mikrofilamente verliert und so die Polymerisierung nicht mehr inhibiert ist (Williams et al., 2005). Auf diese Weise kann HSP25 die Stabilität von Mikrofilamenten regulieren. Es assoziiert aber auch mit α - und β -Tubulin und den Mikrotubuli (Hino et al., 2000) und kann an IF binden (Perng et al., 1999). HSP25 wird eine Rolle bei Zellwachstum, Differenzierung, Signaltransduktion und Schutz vor Apoptose zugesprochen. α B-Crystallin ist an der Stabilisierung und Regulation des Cytoskeletts beteiligt und erfüllt vermutlich eine Funktion als Chaperon für das Intermediärfilament- und Mikrotubuli-System (Djabali et al., 1997). Durch die Bindung an Mikrofilamente schützt α B-Crystallin diese vor Depolymerisation (Verschuure et al., 2002). α B-Crystallin interagiert unter normalen Bedingungen mit IF-Proteinen wie GFAP und Vimentin. Die Interaktion bleibt auch nach

stressbedingtem Zusammenbruch des Cytoskeletts bestehen (Perng et al., 1999).

Unter physiologischen Bedingungen werden HSP25 und α B-Crystallin hauptsächlich von Astrozyten exprimiert. In Neuronen und Oligodendrozyten sind die sHSPs nach Stress induzierbar, wobei sie unter diesen Bedingungen vermutlich das Cytoskelett schützen (Goldbaum und Richter-Landsberg, 2004; Goldbaum und Richter-Landsberg, 2001; Head und Goldman, 2000; Satoh und Kim, 1995). Durch die Interaktion mit GFAP könnten sHSPs eine wichtige Rolle bei der Umorganisation des Cytoskeletts in Astrozyten während der reaktiven Gliose spielen (Calabrese et al., 2002). Beide sHSPs wurden unter pathologischen Bedingungen mit Rosenthal-Fasern assoziiert gefunden, welche aus aggregiertem GFAP bestehen (Iwaki et al., 1993).

Eine Reihe von HSPs wird unter physiologischen Bedingungen konstitutiv exprimiert. Als molekulare Chaperone sind sie beteiligt an der Proteinsynthese und -faltung, an Transport und Translokationsprozessen. Mittels dieser Fähigkeiten spielen HSPs auch eine Rolle bei der Zellproliferation und -entwicklung, der Regulation des Zellzyklus, der Kontrolle der cytoskelettalen Struktur und beim Zelltod und -überleben (Söti et al., 2003; Nollen und Morimoto, 2002; Loones et al., 2000; Liang und MacRae, 1997). Einige HSPs werden im ZNS entwicklungsabhängig in kritischen Differenzierungs- und Proliferationsphasen exprimiert und spielen vermutlich eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung und Differenzierung. (Calabrese et al., 2002). Sie sind an der Regulation unterschiedlicher Prozesse beteiligt, welche für die zelluläre Entwicklung wichtig sind. Zum einen interagieren sie mit dem Cytoskelett, welches während der morphologischen Veränderungen differenzierender und migrierender Zellen ständig reorganisiert werden muss. Durch die direkte Bindung an Cytoskelett- oder cytoskelett-assoziierte Proteine, können HSPs den Auswuchs von Neuriten beeinflussen. So haben HSP25, HSC70, HSP70 und HSP90 einen Einfluss auf die Polymerisation der Mikrotubuli und können somit die Ausbildung der Neuriten steuern. Außerdem schützen HSPs, wie HSP70 und HSP25, Zellen vor der Induktion des apoptotischen Zelltods, für die unreife Neurone besonders anfällig sind. Zudem interagieren HSPs wie HSP90 und HSP25 mit intrazellulären Signalmolekülen, die bei der Differenzierung eine

Rolle spielen. Daneben ist HSC70 am langsamen und HSP70 am schnellen axonalen Proteintransport beteiligt, welcher gerade während der Entwicklung gesteigert ist (Reed Herbert et al. in Richter-Landsberg, 2005).

Im Gehirn werden HSPs in Neuronen und Gliazellen unterschiedlich exprimiert. Auch die stressbedingte HSP-Synthese ist zelltyp-spezifisch. Normalerweise wird der verstärkten Synthese von HSPs eine neuroprotektive Rolle zugesprochen (Sharp et al., 1999; Dwyer und Nishimura, 1994). Sie üben eine Schutzfunktion durch die Rückfaltung denaturierter Proteine, durch Steigerung der antioxidativen Abwehr, durch die Erhaltung der cytoskelettalen Struktur oder über direkte Beeinflussung des apoptotischen Programms aus (Reed Herbert et al. in Richter-Landsberg, 2005).

Die Apoptose oder auch programmierter Zelltod ist Teil der normalen Hirnentwicklung. Über 40% der Neurone im ZNS sterben während der Entwicklung apoptotisch. Auch die Apoptose von Astrozyten scheint für die normale Hirnentwicklung bedeutend zu sein (Mangoura und Dawson, 1998; Keane et al., 1997). Da die adulte Anzahl der Nervenzellen nicht von Beginn an determiniert ist, kommt es während der normalen Entwicklung, angepasst an die „Bedürfnisse“ des Organismus, zum Untergang von Zellen. Eine Rolle spielt dabei das Verhältnis zwischen der Anzahl der Neurone und der Größe ihres Zielgebietes (Zilles und Rehämper, 1998). Die Apoptose ist ein genetisch geregelter Prozess, der durch typische Abläufe zellulärer Vorgänge gekennzeichnet ist: Zellen, die den programmierten Zelltod eingeleitet haben, schrumpfen, verlieren ihre interzellulären Kontakte, das Chromatin kondensiert, es kommt zur Fragmentation des Nucleus und schließlich zur zellulären Fragmentation in *apoptotic bodies* (Hetts, 1998). Einige HSPs können bei der Apoptose regulatorisch eingreifen (Abb. 3). HSP27, HSP70 und HSP90 können die Bildung des Apoptosoms und somit die Aktivierung von Procaspasen zu Effektor-Caspasen verhindern. Die Aktivierung der Caspase-Kaskade führt normalerweise zur internucleosomalen Fragmentation der genomischen DNA (Bruey et al., 2000; Saleh et al., 2000; Pandey et al., 2000). Allerdings kann HSP60 zusammen mit HSP10 die proteolytische Bildung von Caspase-3 fördern und somit pro-apoptotisch wirken (Samali et al., 1999).

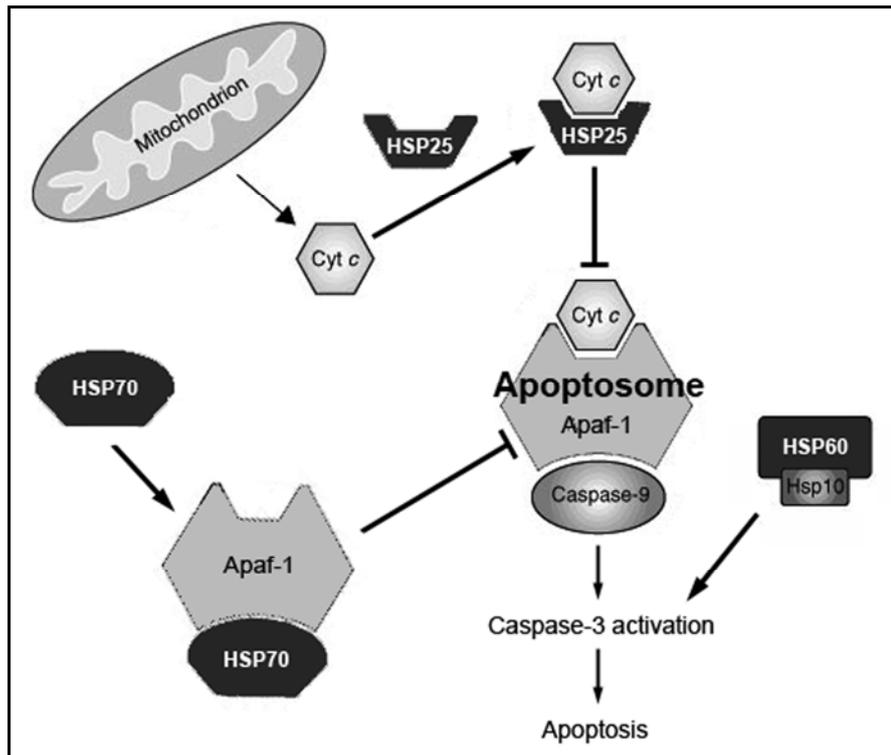


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Rolle von HSPs bei Zelltod und -überleben. Während des apoptotischen Zelltods oligomerisiert Apaf-1 nach Interaktion mit Cyt c und bindet an Procaspase-9. Innerhalb dieses Komplex, dem Apoptosom, kommt es zur Auto-Aktivierung der Procaspase-9, die zur proteolytischen Aktivierung von Procaspase-3 führt. Die aktive Caspase-3 aktiviert eine DNase, was letztendlich zu der für Apoptose typischen DNA-Fragmentierung führt. HSPs können in die Apoptose eingreifen: HSP25 kann aus Mitochondrien entlassenes Cytochrom c (Cyt c) binden und so die Bildung des Apoptosoms verhindern. Auch durch Bindung von HSP70 an den Apoptose-Protease aktivierenden Faktor-1 (Apaf-1) kann kein Apoptosom entstehen und die Procaspase-9 bleibt inaktiv. HSP60 dagegen kann zusammen mit HSP10 die Aktivierung der Caspase-3 fördern (modifiziert nach Xanthoudakis und Nicholson, 2000).

Zellen gehen auch während des normalen Alterungsprozesses apoptotisch zugrunde, wie außerdem beim Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen. Unter diesen Bedingungen können, mit Hilfe der Apoptose, geschädigte Neurone eliminiert werden, da durch apoptotischen Zelltod keine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird (Keane et al., 1997).

Hitzeschockproteine spielen nicht nur eine wichtige Rolle beim Schutz von Nervenzellen vor schädigenden Umwelteinflüssen, sie sind vermutlich auch beteiligt an pathologischen Prozessen neurodegenerativer und demyelinisierender Erkrankungen und könnten zum Zelltod beitragen. Viele HSPs sind in erkrankten Geweben hochreguliert. In Läsionen der Multiplen Sklerose wurden HSP60, HSP70, HSP32 und sHSPs in erhöhten Mengen

gefunden (Stahnke, 2004). HSP32, HSP27 und α B-Crystallin können erhöht bei der Parkinson-Erkrankung detektiert werden. α B-Crystallin kann auch in anderen neurologischen Erkrankungen, wie CJD (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit), CBD (Corticobasale Demenz), PSP (Progressive Supranucleäre Blickparese), PD (Pick-Krankheit), MSA (Multisystematrophie) und AD (Alzheimer-Krankheit) gefunden werden (Goldbaum, 2003).

Die schnelle Produktion von HSPs wird durch Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren (HSFs) reguliert. HSFs binden Hitzeschockelemente (HSE) in der Promotorregion von *hsp*-Genen und induzieren so die HSP-Synthese (Sarge et al, 1993; Übersicht bei Morimoto, 1998). In Vertebraten gibt es vier verschiedene HSFs (HSF1-4). HSF1 vermittelt die HSP-Induktion als Antwort auf Temperaturerhöhung oder anderen Stress. HSF2 dagegen wird durch die meisten Formen von Stress nicht aktiviert, sondern reguliert die *hsp* Genexpression unter normalen Bedingungen, während der frühen Entwicklung und bei der Differenzierung von Zellen (Calabrese et al., 2002). Allerdings wird HSF2 aktiviert, wenn das Ubiquitin-Proteasomen-System inhibiert ist, also bei Störungen der Proteindegradation (Mathew et al., 1998).

Wenn es nicht gelingt, ein Protein mit Unterstützung eines Chaperons wieder in die richtige Konformation zu bringen, helfen HSPs, die Proteine dem Proteasom zuzuführen. Das Proteasom ist eine komplexe, aus mehreren Untereinheiten bestehende Protease, die Proteine ATP-abhängig zu kurzen Peptiden degradiert. Proteasomen stellen etwa 1% des zellulären Proteins und sind über das gesamte Cytosol und den Kern verteilt. Etwa 80% der Proteine werden vom proteasomalen Komplex abgebaut. Die abzubauenen Proteine werden i.d.R. durch Ubiquitinierung markiert, damit sie durch die Proteasomen erkannt werden (Alberts et al, 2004; Mathew und Morimoto, 1998; ausführliche Beschreibung des Ubiquitin-Proteasomen-Systems in Schwartz und Ciechanover, 1999). Molekulare Chaperone und das Ubiquitin-Proteasomen-System arbeiten eng zusammen, vermutlich indem sie für eine Balance zwischen Proteinfaltung und Proteindegradation sorgen. Die genauen Mechanismen dieser Kooperation, mit Beteiligung von Chaperonen, Cochaperonen und Cofaktoren, sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.2.1 Stress und Störungen der Hirnentwicklung

Aufgrund ihrer wichtigen Funktion bei der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems ist es denkbar, dass HSPs auch an Störungen der Hirnentwicklung beteiligt sind. Während der Entwicklung können HSPs in unterschiedliche Prozesse regulatorisch eingreifen: Sie kontrollieren die Balance zwischen Zelltod und Überleben, interagieren mit dem Cytoskelett differenzierender Zellen und regulieren intrazelluläre Signalmoleküle, welche für Überleben und Differenzierung verantwortlich sind (Reed Herbert et al. in Richter-Landsberg, 2005). Kommt es bei diesen Prozessen zu Störungen, könnte dies Konsequenzen für die Entwicklung haben, was eventuell zu entwicklungsbiologischen Erkrankungen wie Schizophrenie beitragen kann.

1.2.2 Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine psychiatrische Erkrankung, die etwa 1% der Bevölkerung betrifft. Die Ätiologie dieser Psychose und die Faktoren, die den Verlauf der Erkrankung bestimmen, sind weitgehend ungeklärt (Koch, 2002). Neuropathologische Befunde in Gehirnen von Schizophrenen zeigen eine Reduktion des Hirnvolumens und damit einhergehend eine Vergrößerung der Ventrikel. Dem zugrunde liegt jedoch nicht ein Verlust von Gewebe, sondern eine Volumenreduktion von Nervenzellen, verbunden mit einer Hypoplastizität des Neuropils (Costa et al., 2001; Harrison, 1999). Diese Veränderungen werden insbesondere im präfrontalen Cortex, temporalen Cortex, Hippocampus, sowie im Thalamus beobachtet (Koch, 2002; Harrison, 1999). Diese Hirnregionen sind wichtig für die Regulation von Emotionen und Kognition, Funktionen, die bei der Schizophrenie beeinträchtigt sind (Sawa und Snyder, 2002). Es wird angenommen, dass die Vergrößerung der Ventrikel bereits einsetzt bevor sich irgendein Symptom zeigt (Costa et al., 2001). Die charakteristischen Störungen im Denken und Wahrnehmen, Motivations- und Aufmerksamkeitsdefizite setzen erst im Erwachsenenalter ein. Zugrunde liegt wahrscheinlich eine gestörte Konnektivität in bestimmten Bereichen des Gehirns. Klinische Symptome manifestieren sich erst, wenn gegen Ende der Pubertät überflüssige Synapsen eliminiert und Afferenzen in den präfrontalen Cortex einwachsen (Koch, 2002; Feinberg, 1982). Schizophrenie als entwicklungsneurobiologische Erkrankung ist das favorisierte Modell zur

Pathogenese (Lewis und Levitt, 2002; Harrison, 1999; Weinberger, 1987). Eine neurodegenerative Grundlage der Schizophrenie wird ausgeschlossen, da es weder zu einem verstärkten Zugrundegehen von Neuronen, noch zu Gliose kommt (Lewis und Levitt, 2002; Harrison, 1999).

Zu den Auslösern von Hirnentwicklungsstörungen können unterschiedliche Faktoren gehören, z.B.: eine genetische Prädisposition, verschiedene Stressoren, welche die Regulation von Proteinen beeinflussen, virale Infektionen oder chemische Agenzien wie Drogen und Alkohol, welche zellulären Stress verursachen und so eine Stressantwort auslösen. In der *Two-Hit*-Hypothese wird davon ausgegangen, dass mehrere dieser Faktoren zusammenspielen.

In der AG Neuropharmakologie der Universität Bremen unter der Leitung von Herrn Prof. M. Koch wurde an Ratten das *Two-Hit*-Modell (s.u.) etabliert. In einem Kooperationsprojekt wurden die tierexperimentellen Untersuchungen an der Universität Bremen und die biochemischen Untersuchungen an der Universität Oldenburg durchgeführt. Es wurden *in vivo* Experimente mit postnatal verabreichtem Alkohol und einer zweiten Behandlung im adulten Stadium durchgeführt, um die Wirkung von Alkohol auf die Entwicklung des Gehirns aufzuklären. Die damit einhergehenden Veränderungen der kognitiven, perzeptuellen und emotionalen Leistungen wurden in der AG Koch in Verhaltensversuchen ermittelt. In der AG Richter-Landsberg wurde zur Etablierung der Methoden und Untersuchungen der Auswirkungen von Alkohol auf molekularer Ebene zusätzlich ein Zellkulturmodell verwendet.

Zudem wurden in der AG Koch *in vivo* Antisense-Experimente durchgeführt, um die Translation von Reelin im präfrontalen Cortex (PFC) von Ratten zu inhibieren. Eine Minderexpression von Reelin spielt wahrscheinlich eine Rolle bei Störungen der Hirnentwicklung (s.u.). Die biochemische Analyse der Gewebeproben und unterstützende Untersuchungen in Zellkultur erfolgten in der AG Richter-Landsberg.

Die *Two-Hit*-Hypothese

Das *Two-Hit*-Modell oder die Vulnerabilitäts-Stress-Hypothese ist ein Modell zur Entstehung der Schizophrenie. Die Annahme ist, dass strukturelle Veränderungen im Gehirn bereits pränatal oder perinatal (*First Hit*) ausgelöst werden und so eine Prädisposition für die Erkrankung entsteht. Diese Störung der Hirnentwicklung kann dann zu einer erhöhten Anfälligkeit des jung-adulten Gehirns gegen Stress führen (*Second Hit*) (Keshavan, 1999). Pränatale Schädigungen, wie z.B. eine Virusinfektion der Mutter, Drogenmissbrauch oder Mangelernährung während der Schwangerschaft, können zu Wachstums- und Entwicklungsstörungen führen und das Gehirn vulnerabler gegenüber weiteren schädigenden Einflüssen machen (Koch, 2002; Lewis und Levitt, 2002). Im 2. Trimester der Schwangerschaft vermögen Noxen in Hirnstrukturen, die zu diesem Zeitpunkt reifen (Frontalhirnareale, Cortex), Wachstums- und Differenzierungsstörungen zu bewirken. In einem so „vorbelasteten“ Gehirn können in der Pubertät bereits geringfügige aversive Einflüsse wie Stress, hormonelle Veränderungen und Drogen zur Entgleisung wichtiger Hirnfunktionen und damit zu schizophrenen Symptomen führen. Denn während abschließender Reifungsprozesse kann es zu fehlerhaften Verbindungen in bestimmten Hirngebieten kommen, so dass diese Regionen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Lewis und Lieberman, 2000).

Als möglicher *First Hit* wird auch eine genetische Prädisposition diskutiert. Die Vererblichkeit der Schizophrenie liegt bei etwa 80% (Owen et al., 2003). Grundlage ist jedoch nicht ein einzelner Gendefekt, sondern die Beteiligung mehrerer Gene. Die involvierten Gene spielen vermutlich essentielle Rollen bei verschiedenen Schlüsselereignissen während der Gehirnentwicklung oder bei der abschließenden Reifung des Gehirns (Bayer et al., 1999). Zu den Kandidatengenen, in denen entweder Mutationen vorliegen oder deren Expression verändert ist, gehören z.B. DISC-1 (*Disrupted in Schizophrenia*), COMT (Catechol-O-Methyltransferase), der Serotonin-Rezeptor 5HT2A (Sawa und Snyder, 2002), MARCKS (myristyliertes Alanin-reiches C-Kinase Substrat), GAP-43 (*Growth associated protein-43*), SCG-10 (*superior cervical ganglia-10*), Neuroserpin (Hakak et al., 2001), NRG1 (Neuregulin-1), RGS4 (*regulator of G-protein signalling-4*) (Harrison und Owen, 2003), Gene der PSYN (Präsynaptische sekretorische Maschinerie)-Gruppe wie NSF (N-Ethylmaleimid

sensitiver Faktor) und SYN2 (Synapsin II) (Mirnics et al., 2000), sowie Reelin (Impagnatiello et al., 1998). Auch bei einer genetischen Komponente wird aber nur die Vulnerabilität, das Risiko für die Erkrankung, vererbt (Birbaumer und Schmidt, 1996). Die Funktion dieser Gene kann dann durch einen *Second Hit* verändert werden.

Faktoren, die das Gehirn beeinflussen können, sind vielfältig. Umwelteinflüsse, seien es psychosoziale Faktoren, Geburtskomplikationen oder Drogenkonsum, haben jedoch unterschiedliche Effekte auf Individuen mit verschiedenen Genotypen. Die Interaktion von Genotyp und Umwelt beruht auf genetisch bedingten Unterschieden in der Sensitivität gegenüber Umweltfaktoren (Lewis und Levitt, 2002; Tsuang et al., 2001).

Reelin

Ein Faktor, der die Vulnerabilität für psychotische Störungen erhöht, könnte eine Dysfunktion von Reelin, einem Protein der ECM, sein (Bayer et al., 1999). Eine verminderte Expression um etwa 50% von Reelin-mRNA und -Protein wurde in verschiedenen Gehirnregionen schizophrener Patienten gefunden (Costa et al., 2001; Impagnatiello et al., 1998). Tatsächlich ist dieses Defizit der am häufigsten nachgewiesene Befund in neurochemischen *post-mortem* Untersuchungen bei Schizophrenie (Knable et al., 2001). Es liegen jedoch bei schizophrenen Patienten keine Veränderungen im Reelin-Gen vor (Bayer et al., 1999). Vermutlich sind epigenetische Mechanismen wie Hypermethylierung im Promotor des *reelin*-Gens an der Minderexpression beteiligt (Tremolizzo et al., 2002; Chen et al., 2002; Costa et al., 2002). Denkbar ist auch, dass CGG-Repeat Polymorphismen in der 5'-UTR die Expression vermindern können (Lugli et al., 2003).

Das *reelin*-Gen ist etwa 450kb lang und umfasst 65 Exons (Impagnatiello et al., 1998). Über die Regulation der mRNA Expression ist fast nichts bekannt. Das 3461 Aminosäuren (AS) lange Protein (D'Arcangelo et al., 1995) besitzt am N-terminalen Ende ein Signalpeptid, gefolgt von einer Region mit Ähnlichkeit zu F-Spondin, einem einzigartigen Bereich und daran anschließenden acht 350 AS langen Repeats (Abb. 4). Jeder dieser Repeats besitzt in der Mitte ein *epidermal growth factor* (EGF) Motiv. Die C-terminale Region endet mit einem Bereich aus 33 AS mit vielen basischen Seitenketten (Tissir und Goffinet,

2003). Das Molekulargewicht des Proteins ist mit etwa 420kDa höher als durch die Anzahl der AS erwartet, da das Protein vor allem N-terminal glykosyliert wird (D'Arcangelo et al., 1997).

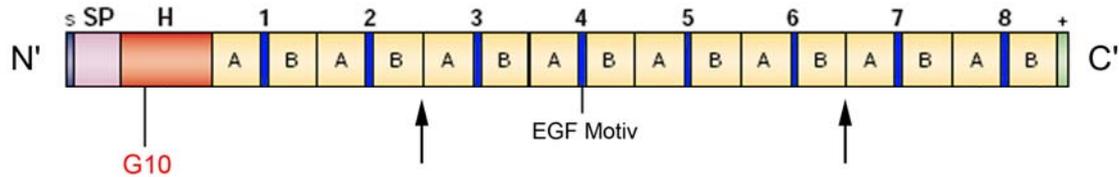


Abb. 4: Schematische Darstellung des Reelin-Proteins. S: Signalpeptid (27 AS), SP: Bereich ähnlich zu F-Spondin (AS 28-190), H: einzigartige Region (AS 191-500), G10: AK-Bindung, 1-8: 350 AS-lange Repeats mit EGF-Motiv im Zentrum, flankiert von Subrepeats A u. B, +: Region mit vielen basischen Seitenketten (AS 3429-3461). Die Pfeile markieren den Ort der Spaltung (modifiziert nach Tissir und Goffinet, 2003).

Reelin wird posttranslational (Lambert de Rouvroit et al., 1999) an zwei Stellen gespalten, zwischen Repeat 2 und 3 und zwischen Repeat 6 und 7 (Tissir und Goffinet, 2003). Die Fragmente, die den N-Terminus noch besitzen, haben eine Größe von etwa 180 bzw. 320kDa (Lambert de Rouvroit et al., 1999). Die Spaltung erfolgt vermutlich durch eine Metalloproteinase (Lambert de Rouvroit et al., 1999) oder autokatalytisch (Quattrocchi et al., 2002). Zumindest *in vitro* ist Reelin ein Substrat für Plasminogenaktivator und Plasmin (Lugli et al., 2003). Unklar bleibt, zu welchem Zeitpunkt das Protein gespalten wird, ob intrazellulär oder erst nach Sekretion. Auch über den Sinn der Spaltung und die Funktion der Fragmente wird noch spekuliert. Mit der N-terminalen Region kann Reelin homopolymerisieren (Utsunomiya-Tate et al., 2000). Im nativen Zustand bildet Reelin Dimere, die vermutlich durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Kubo et al., 2002). Obwohl das N-terminale Ende des Proteins nicht an die Rezeptoren VLDLR oder ApoER2 bindet, scheint es dennoch zur Signalübertragung beizutragen (Jossin et al., 2003). Wahrscheinlich ist die durch den N-Terminus vermittelte Dimerisierung erforderlich, um eine effiziente Signaltransduktionskaskade (s.u.) auszulösen (Kubo et al., 2002). Der C-Terminus ist für die Sekretion vonnöten (de Bergeyck et al., 1997; D'Arcangelo et al., 1997). Die Rezeptorbindung erfolgt mit dem zentralen Teil des Proteins. Diese Fähigkeit besitzen sowohl das *full-length* Protein als auch künstlich erzeugte Konstrukte. Da dadurch die Signaltransduktionskaskade ausgelöst wird, scheint dieser Teil für die Funktion von Reelin entscheidend zu sein

(Jossin et al., 2004). Obwohl eine Spaltung das Protein also nicht inaktiviert, ist unbekannt ob Reelin, um funktionell zu sein, gespalten werden muss.

Reelin wird während der Hirnentwicklung im Telencephalon von Pionierneuronen, so genannten Cajal-Retzius-Zellen (CR-Zellen) produziert. Im embryonalen Cerebellum synthetisieren Körnerzellen Reelin. Beide Zelltypen sekretieren das Protein in die ECM (Costa et al., 2001). Während der Entwicklung spielt das Protein eine Rolle bei der Wanderung der Zellen, wobei über die genaue Funktion noch spekuliert wird (Übersicht bei Rice und Curran, 2001 oder Frotscher, 1998). Beobachtungen, dass Neurone der Corticalplatte und Purkinjezellen im Cerebellum durch den Einfluss von Reelin ihre Migration beenden, lassen darauf schließen, dass Reelin möglicherweise ein „Stopp-Signal“ für wandernde Neurone ist (Dulabon et al., 2000; Miyata et al., 1997). Eine Funktion als „Lockstoff“ ist eine andere diskutierte Möglichkeit (Gilmore und Herrup, 2000). Reelin könnte aber auch ein Signal zur Trennung wandernder Neurone von ihrem Substrat, den Radialglia, sein (Dulabon et al., 2000). Neuere Untersuchungen unterstützen die letzte Möglichkeit (Hack et al., 2002). Der Reelin-Signaltransduktionsweg sorgt für die Trennung von Kontakten zwischen Neuronen und Radialglia. Vermutlich durch Änderung der Oberflächeneigenschaft der wandernden Neurone lösen sich diese zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort von den Radialglia. Somit wird eine korrekte Schichtung aller Hirnstrukturen ermöglicht (Tissir und Goffinet, 2003; Hack et al., 2002). Der Reelin-Signaltransduktionsweg beeinflusst während der Entwicklung die Zellmigration, die Zellform und die Verzweigung neuronaler Fasern (Rice und Curran, 1999). Das komplexe Muster der neuronalen Migration bildet die Grundlage für die Corticogenese. Ist kein Reelin vorhanden, wie bei der homozygoten *reeler* Maus, kommt es zu einer Umkehrung der normalen Schichtung der Corticalplatte (Abb. 5) und zu anderen strukturellen Anomalien der neuronalen Reifung (Costa et al., 2001).

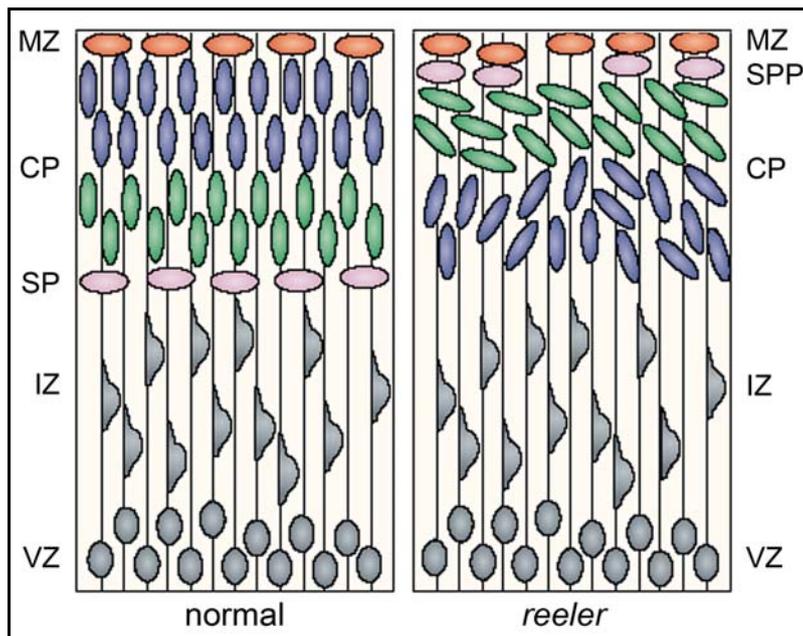


Abb. 5: Corticale Entwicklung der Maus (E15.5). Normalerweise wandern Neurone entlang von Radialgliafasern (grau) in Richtung CR-Zellen-reicher MZ (rot) und bilden die Schichten der CP (blau u. grün). In *reeler*-Mäusen passieren die Neurone die SP (rosa) nicht. Es entsteht eine SPP und eine ungeordnete CP. MZ: Marginalzone, CP: Corticalplatte, SP: *subplate zone*, SPP: *superplate*, IZ: Intermediärzone, VZ: Ventrikulärzone, CR: Cajal-Retzius (modifiziert nach Tissir und Goffinet, 2003).

Der genaue Mechanismus der Signaltransduktionskaskade sowie alle daran beteiligten Komponenten sind noch nicht bis ins letzte Detail geklärt. Der hier beschriebene Weg bleibt spekulativ. Homopolymerisiertes Reelin bindet an Rezeptoren der Lipoproteinrezeptor-Familie, genauer an den *very-low-density lipoprotein receptor* (VLDLR) und den *apolipoprotein E receptor-2* (ApoER2). Die Annahme, dass auch Integrine Rezeptoren für Reelin darstellen (Costa et al., 2002; Dulabon et al., 2000), kann nicht immer bestätigt werden (Strasser et al., 2004). Die Bindung von Reelin an VLDLR und ApoER2 induziert die Homo- oder Heterodimerisierung oder ein *clustering* dieser Rezeptoren, was vermutlich wiederum eine Dimerisierung oder Oligomerisierung des Adapter-Proteins Disabled-1 (DAB1) bewirkt (Strasser et al., 2004). Dies löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, im Zuge derer DAB1 durch eine Tyrosinkinase (vermutlich Kinasen der Src-Familie) phosphoryliert wird (Jossin et al., 2003; Bock und Herz, 2003). DAB1 bindet und schützt Proteine während es sie zum Nucleus oder anderen Zellkompartimenten befördert. Die von DAB1 transportierten Proteine fördern die Genexpression oder mRNA Translation (Costa et al., 2001).

Reelin wird nicht nur während der Entwicklung exprimiert. Die Reelin-exprimierenden Cajal-Retzius-Zellen verschwinden im Laufe der Zeit (Rice und Curran, 1999). Im adulten Gehirn wird Reelin im Cortex und im Hippocampus von GABAergen Interneuronen gebildet und im Cerebellum von glutamatergen Körnerzellen (Pesold et al., 1998; Alcantara et al., 1998; D'Arcangelo et al., 1997). In einer aktuellen Studie wurde Reelin auch in Gliazellen nachgewiesen (Roberts et al., 2005). Die Funktion von Reelin im adulten Gehirn bleibt auch spekulativ. Diskutiert werden eine Beteiligung an der GABAergen Transmission, der Ausbildung von dendritischen Spines und der synaptischen Plastizität, wodurch Reelin auch eine Rolle bei Lernen und Gedächtnis spielen könnte (Dong et al., 2003; Weeber et al., 2002; Costa et al., 2001). Reelin beeinflusst vermutlich nicht nur die Vulnerabilität zur Schizophrenie, indem es während der Embryogenese die Migration und endgültige Positionierung der Neurone verändert, die Beteiligung von Reelin bei der Plastizität dendritischer Spines im Erwachsenenalter könnte auch einen Einfluss auf die Symptome bei der Schizophrenie haben (Costa et al., 2001).

Alkohol als Stressfaktor in der Entwicklung

In Bezug auf das Vulnerabilitäts-Stress-Modell kann Alkohol sowohl in der frühen Hirnentwicklung als auch während späterer Reifungsprozesse ein schädigender Parameter sein. Pränataler Einfluss von Alkohol kann zu Entwicklungsstörungen im Gehirn des Ungeborenen führen. Außerdem können Alkohol- und Drogenkonsum bei Heranwachsenden, unter den entsprechenden neuropathologischen Vorbedingungen, die Entwicklung einer Psychose begünstigen (Cooper, 2001; Kelly und Murray, 2000). Die Folgen des Alkoholkonsums sind abhängig von Zeitpunkt und Dauer der Einwirkungen.

Alkohol (Ethanol) hat neurotoxische Eigenschaften, die die Hirnentwicklung in vielfältiger Weise beeinträchtigen können. In Ratten wurde gezeigt, dass Alkohol die neuronale Migration beeinflusst (Hirai et al., 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass Ethanol die gliale Entwicklung beeinflusst, indem es die Transformation von Radialglia zu Astrozyten fördert. Dies könnte wandernden Neuronen ihre Grundlage nehmen (Miller und Robertson, 1993). Ethanol hat anhaltende Auswirkungen auf Neurotransmittersysteme (Sari und Zhou, 2004) und kann die Expression von Genen des Ubiquitin-Proteasomen-

Systems, der Signaltransduktion und mitochondrialer Proteine verändern, was Folgen für den Energiemetabolismus und verschiedene Signalwege haben kann (Sokolov et al., 2003). An Ratten konnte gezeigt werden, dass während der Hirnentwicklung verabreichter Alkohol Membranlipide beeinflusst. Ethanol bewirkt, dass sich das Verhältnis der verschiedenen Phospholipide zueinander verändert. Dies könnte Auswirkungen auf die Funktion von Rezeptoren und die Aktivierung von Signalmolekülen haben (Wen und Kim, 2004). Durch die Beeinflussung der synaptischen Plastizität kann es zur Beeinträchtigung des in diesem Rahmen wichtigen Phänomens der Langzeit-Potenzierung (LTP) kommen und zur Schwächung von Lernen und Gedächtnis (Perrone-Bizzozero et al., 1998; Sutherland et al., 1997; Savage et al., 1996).

Die zellulären Schäden, die Ethanol hervorruft, können u.a. Folge von oxidativem Stress sein. Ethanol induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) und reduziert antioxidative Abwehrmechanismen, wie z.B. die Aktivität der Glutathion-Peroxidase (Cohem-Keren und Koren, 2003). Dadurch kann es zu Lipidperoxidation, Schädigung von Nucleinsäuren und Inaktivierung von Enzymen kommen. Der durch Ethanol verursachte zelluläre Stress kann zudem eine Induktion von HSPs zur Folge haben. So wurde gezeigt, dass Ethanol in neuronalen Zellen HSC70, GRP94 und GRP78 (Miles et al., 1994) und in verschiedenen Hirnregionen HSP70 induziert (Calabrese et al., 1996). Die Folgen von Ethanol sind jedoch stark abhängig von Dosis und Dauer der Behandlung, und trotz Alkohol-induziertem oxidativem Stress kann nicht immer eine Induktion von HSPs detektiert werden (Rakonczay et al., 2003).

Da die Induktion von HSPs häufig stressor- und zelltyp-spezifisch ist, können Stressproteine als Biomarker für unterschiedliche Stress-Situationen und Zelltypen dienen. Mit der Analyse von HSPs könnte der Einfluss von Stress bei Hirnentwicklungsstörungen ermittelt werden.

1.3 Fragestellung

Hitzeschockproteine (HSPs) spielen eine Rolle bei der Entwicklung und normalen Funktion des ZNS und werden unter verschiedenen pathologischen Situationen vermehrt gefunden. Viele HSPs werden konstitutiv exprimiert und einige HSPs werden als Reaktion auf Stress-Situationen induziert. Dabei scheinen bestimmte HSPs durch spezifische Stressoren induziert zu werden. Vermutlich spielen HSPs auch bei der Entwicklung des Nervensystems wichtige individuelle Rollen.

Störungen der Hirnentwicklung können genetische und umweltbedingte Grundlagen haben. Es wird davon ausgegangen, dass die resultierenden Erkrankungen, wie z.B. die Schizophrenie, multifaktoriell bedingt sind, d.h. dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Sawa und Snyder, 2002; Tsuang et al., 2001). Umwelteinflüsse resultieren letztendlich meist in Stressreaktionen im Gehirn. Die Reaktionen auf Stress variieren jedoch je nach Zelltyp, wobei der Grund dafür nicht bekannt ist. Vermutlich unterscheiden sich die molekularen Mechanismen bei der Stressreaktion verschiedener Zelltypen. Es ist denkbar, dass individuelle Zelltypen bei der Stressantwort unterschiedliche HSP-Systeme und -Strategien nutzen. Dafür könnten die spezifischen Funktionen des Zelltyps verantwortlich sein. Auch die Vulnerabilität gegenüber Stress ist abhängig vom Zelltyp. Während einige Zellen unbeeinträchtigt bleiben, werden andere unter dem gleichen Stresseinfluss stark geschädigt. Die Stressantwort einer Zellpopulation kann z.B. anhand der Induktion von HSPs, Änderungen der Morphologie oder Analyse des Zelltods untersucht werden. Bei vielen neurologischen Erkrankungen werden erhöhte Mengen verschiedener HSPs vorgefunden. Ungeklärt bleibt zumeist, in welchen Zellpopulationen die Induktion der HSPs vorliegt.

In dieser Arbeit sollte die Stressreaktion von Neuronen analysiert werden. Um zu gewährleisten, dass die verwendeten Kulturen ein geeignetes Modell für die Untersuchungen darstellen, wurde in den neuronalen Primärkulturen aus embryonalem Rattenhirn zunächst das Vorkommen von neuronalen Markern sichergestellt und das Vorkommen von glialen Markern ausgeschlossen. Dann wurde untersucht, welche HSPs in den Neuronen-Kulturen konstitutiv während

der Entwicklung exprimiert werden. Zur Analyse der stress-induzierten HSPs wurden die Neurone drei unterschiedlichen Stress-Situationen ausgesetzt

- 1) HS (Hitzestress)
- 2) OS (oxidativem Stress)
- 3) proteasomalem Stress

und das Vorkommen von HSPs auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht.

Zusätzlich wurde die Stressreaktion in kultivierten Astrozyten untersucht und mit der von Neuronen verglichen, um eine Aussage über zelltyp-spezifisches Vorkommen von HSPs zu treffen.

Entwicklungsprozesse gehen einher mit Veränderungen und der Ausbildung des Cytoskeletts, speziell der Mikrotubuli, die vor allem in Neuronen reichlich vorhanden sind. HSPs spielen eine wichtige Rolle für die Funktion und Ausbildung des Cytoskeletts. Um zu ermitteln, ob und welche HSPs mit dem Cytoskelett interagieren, erfolgten in beiden Zelltypen Untersuchungen zur Colokalisation von HSPs mit Komponenten des Cytoskeletts. Dabei sollte ermittelt werden, ob die Assoziation von HSPs mit dem Cytoskelett womöglich zur Unempfindlichkeit von Zellen gegenüber Stress beitragen kann.

Des Weiteren wurde das an Entwicklungsprozessen beteiligte Glykoprotein Reelin und der Effekt dessen Suppression in kultivierten Neuronen studiert. Eine verminderte Expression von Reelin könnte an Störungen der Hirnentwicklung und den damit verbundenen pathologischen Prozessen beteiligt sein. Zunächst wurde bestimmt, ob Reelin in den Kulturen exprimiert wird, wo das Protein lokalisiert ist und wie sich der Anteil des Gesamtprodukts und seiner Fragmente intra- und extrazellulär zueinander verhält. Mit Hilfe von Antisense-Oligonucleotiden (AS-ODNs) sollte die Translation von Reelin verhindert werden. Nach der Auswahl einer geeigneten AS-Sequenz und der optimalen Versuchsbedingungen erfolgte die Untersuchung zu den Auswirkungen einer solchen Unterdrückung auf die neuronale Entwicklung *in vitro*. Dabei wurde die Differenzierung der kultivierten Neurone durch morphologische Beobachtungen und Immunoblot-Analyse von entwicklungs-spezifischen Markern erfasst. Mit Inhibitoren wurde zudem die Spaltung des Gesamtproteins unterbunden, um Aussagen zur Funktionalität der Spaltung treffen zu können. Reelin wird posttranslational an zwei Stellen gespalten, wobei die Funktion der Spaltprodukte noch nicht geklärt ist.

In Kooperation mit der AG Neuropharmakologie der Universität Bremen sollte die Unterdrückung der Synthese von Reelin mit AS-ODNs auch *in vivo* am Tiermodell durchgeführt werden. Neonatale und adulte Ratten erhielten Mikroinjektionen der AS-ODN-Lösung und die entnommenen Gehirnproben wurden in der AG Richter-Landsberg biochemisch analysiert.

Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die Prozesse, die Hirnentwicklungsstörungen und ihren pathologischen Folgen zugrunde liegen, besser zu verstehen.

Ziel der Arbeit war, die möglicherweise differentielle Antwort von Neuronen und Astrozyten in Kultur auf Stress-Situationen zu ermitteln und in beiden Zelltypen festzustellen und zu vergleichen, ob

- 1) HSPs als Biomarker für zelltyp-spezifische Stressantworten geeignet sind
- 2) HSPs die Zellen vor cytotoxischen Folgen schützen können und
- 3) HSPs speziell mit dem Cytoskelett interagieren und so die neuronale Architektur beeinflussen.

Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob Reelin, als Bestandteil der extrazellulären Matrix, und eine Unterdrückung seiner Expression zu Stressantworten und morphologischen Schäden führt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle 3- 4 Tage.

Tiere: *rattus norvegicus*, Wistar-Auszucht (Charles-River)

Zellkultur-Plastik	(Nunc)
BME	Basal Medium Eagle (Invitrogen)
N-2 Supplement	100x (Invitrogen)
	Zusammensetzung in µg/µl:
	Insulin 500
	Human Transferrin 10000
	Progesteron 0,63
	Putrescin 1611
	Selenit 0,52
L-Glutamin	(Invitrogen)
Penicillin/Streptomycin	50 U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin (Invitrogen)
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagles Medium (Invitrogen) 70g DMEM Pulver, 18,5g NaHCO ₃ (Merck) ad 5l Aqua Bidest, pH 7,2-7,4, sterilfiltriert
FCS	Fötales Kälberserum (Invitrogen) Hitzeinaktiviert: 56°C, 30 min
Poly-L-Lysin (PLL):	PLL Hydrobromid (Sigma) Stammlösung: 1mg/ml Gebrauchslösung: 50µg/ml
DMEM/10% FCS:	500ml DMEM, 50ml FCS
DMEM/0,5% FCS:	50 U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin 500ml DMEM, 2,5ml FCS,
BME/N-2 Supplement:	50 U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin 500ml BME, 5ml N-2 Supplement, 5ml L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin
PBS:	Phosphatgepufferte Salzlösung 8g NaCl, 0,2g KH ₂ PO ₄ , 2,68g Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O, 0,24g KH ₂ PO ₄ ad 1l Aqua Bidest, pH 7,4

Anlegen neuronaler Primärkulturen aus embryonalem Rattenhirn (RCBs)

Trächtigen Ratten wurden an E17 (Tag 17 embryonal) die Embryonen entnommen und die Gehirne herauspräpariert (Richter-Landsberg, 1988). Die mechanische Dissoziation erfolgte mit Pasteurpipetten in BME mit 10% FCS.

Je Gehirn wurde in 6ml Medium eine Zellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden wie folgt ausgesät:

Tab. 1: Anteil von Zellsuspension und Medium beim Ausplattieren

	Zellsuspension	Medium
10 cm-Schale	5ml	5ml
6 cm-Schale	2,5ml	2,5ml
3,5 cm-Schale	0,5ml	2ml

Die weitere Kultivierung der Neurone erfolgt in serum-freiem Medium. Deshalb wurde nach etwa 2-3 h das Medium auf BME mit Supplement (N-2; 1:100) und L-Glutamin (1:100) gewechselt.

Die Kulturen wurden typischerweise zwischen 5 und 8 Tagen in Kultur (*days in vitro*: DIV) für die Versuche verwendet. Dies entspricht, bei einer normalen Tragezeit von 21 Tagen, einem theoretischen Alter von 1-4 Tagen postnatal.

Anlegen von Astrozyten-Primärkulturen

Aus cerebralen Hemisphären von 1-2 Tage alten Wistar-Ratten wurde nach Entfernen der Hirnhäute und Blutgefäße mit der Pasteurpipette eine Einzelzellsuspension hergestellt. In Vorkulturflaschen wurden zunächst Gliamischkulturen hergestellt (Richter-Landsberg und Vollgraf, 1998). Auf dem Boden der Zellkulturflasche entwickeln sich Astrozyten zu einem konfluenten einschichtigen Zellrasen. Auf diesem Monolayer wachsen die Oligodendrozyten. Die Oligodendrozyten wurden durch Abschüttelung entfernt und konnten für Oligodendrozytenkulturen verwendet werden. Die verbleibenden Astrozyten wurden für die Versuche auf Zellkulturschalen weiter kultiviert. Sobald der Schalenboden subkonfluent bewachsen war, wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

2.2 Morphologische Untersuchung

Mikroskop mit Kamera (Olympus IX70) mit Hoffman Modulation Contrast®

Bevor die Zellen für den Immunoblot oder die RT-PCR aufbereitet wurden, wurde die Morphologie mit dem Modulationskontrast-Mikroskop dokumentiert.

2.3 SDS-PAGE und Immunoblot

2.3.1 Probenherstellung für die SDS-PAGE

Probenpuffer (1x SB):	1ml Glycerin [10%] 0,1ml β -Mercaptoethanol [0,1%] 2ml 10%-SDS-Lösung [2%] 1,25ml Tris (0,5M, pH 6,8) [125mM] 20 μ l EDTA (0,5M, pH 8,0) [1mM] 0,5ml 0,2%-Bromphenolblau [0,01%] ad. 10ml mit Aqua bidest
Probenpuffer (5x SB):	24% Glycerin 0,5% Mercaptoethanol 10% SDS 400mM Tris (2M, pH 6,8) 5mM EDTA (0,5M, pH 8,0) 0,05% Bromphenolblau

Die Zellen wurden entsprechend der jeweiligen Fragestellung behandelt und zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten zweimal mit PBS gewaschen und geerntet:

Die Zellen wurden in 1xSB lysiert, mit Hilfe eines Gummischabers in Eppendorfcups überführt und 10 min gekocht. Je nach Dichte des Zellrasens und Schalenfläche wurden unterschiedliche Volumina des Probenpuffers genommen.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Neuhoff *et al.*, 1979

Photometer	SmartSpec™ 3000 (Biorad)
Einmal-Plastikküvetten	
Celluloseacetatfolie	(Sartorius)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Roth)
Färbelösung:	0,5% Amidoschwarz 10B (Serva) in Methanol/ Essigsäure (9+1)
Entfärber:	Methanol/ Essigsäure (9+1)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden dreimal je 5 μ l Probe auf die Celluloseacetatfolie pipettiert. Nach kurzem Trocknen wurde die Folie 5 min in die Färbelösung und anschließend 2 x 10 min in den Entfärber gelegt. Die gefärbten Proteinflecken wurden ausgeschnitten, in Eppendorf-Cups gegeben und über Nacht unter Schütteln in 1ml DMSO gelöst. Die photometrische Auswertung erfolgte bei 630nm gegen einen Blindwert aus identisch

behandelter Celluloseacetatfolie ohne Protein. Als Eichreihe diene eine Konzentrationsreihe von Rinderserumalbumin.

Die Proben werden für kurze Zeiträume bei -20°C gelagert, über längere Zeiträume bei -80°C .

2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gelelektrophoresesystem	MiniProtean; Spacer 1 mm (Biorad)
Spannungsquelle	PowerPac 300 (Biorad)
Spritzen	(Hamilton)
Acrylamid-Lösung (AA/BA):	30% Acrylamid (Serva), 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid (Gerbu), in A. bidest, filtriert
APS:	10% Ammoniumpersulfat (Sigma) in A. bidest
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Sigma)
Bromphenolblau:	0,1% (Merck) in A. bidest
Trenngelpuffer:	Tris, 1,5 M, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	Tris, 0,5 M, pH 6,8
Laufpuffer:	10 x Stocklösung: 15g Tris [25 mM], 72g Glycin [125mM] ad. 500ml A. bidest 1x Gebrauchslösung: 50ml Stocklösung, 5ml 10%-SDS-Lösung ad. 500ml A. bidest
Molekulargewichtsmarker:	High Molecular Weight Standard Mixture SDS-6H, 29-205 kDa (Sigma) 3mg in 900ml A. bidest lösen, 45 μl 1M Na_2HPO_4 und 55 μl Remazol Brilliant Blue (Sigma) dazugeben, 5 min kochen, 4:1 mit 5x SB versetzen (siehe 2.2.1), Lagerung bei -20°C

Tab. 2: Sammelgel (4,5 % AA/BA, Angaben für zwei Gele)

Aqua Bidest	2,0ml
Tris 0,5 M	0,8ml
AA/BA-Lösung	0,5ml
APS	30 μl
TEMED	15 μl

Tab. 3: Trenngel (in % AA/BA, Angaben für ein Gel)

	5%	7,5%	8,75%	10%	12,5%
A. Bidest	3,0ml	2,5ml	2,25ml	2,0ml	1,5ml
Tris 1,5M	1,5ml	1,5ml	1,5ml	1,5ml	1,5ml
AA/BA-Lsg.	1,0ml	1,5ml	1,75ml	2,0ml	2,5ml
APS	30µl	30µl	30µl	30µl	30µl
TEMED	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl

Die Proteine wurden mit der eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli, 1970) bei 160V für 60-80 min anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt.

2.3.4 Western Blot (Tank-/Wet-Blotting)

Transferkammer	Mini Trans-Blot (Biorad)
Netzgerät	PowerPac 300 (Biorad)
Nitrocellulosemembran	Trans-Blot [®] 0,45µM (Biorad)
Filterpapier	3mm (Whatman)
Schwämme	
Kühlaggregat	
Transferpuffer:	30g Tris [25 mM], 144g Glycin [192mM], 2l Methanol, ad 10l Aqua Bidest
Ponceau-Rot-Lösung:	0,2g Ponceau S (Sigma) in 100ml 3% Trichloressigsäure

Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte für 70 min bei konstanten 350 mA. Zur Kontrolle des Transfers und der gleichmäßigen Probenbeladung wurden die Membranen kurz in Ponceau-Rot-Lösung gelegt. Die Färbelösung wurde anschließend mit TBST (siehe 2.3.5) wieder ausgewaschen.

2.3.5 Antikörperinkubation

TBS:	1,2g Tris [10nM], 8,76g NaCl [150mM] ad. 1l A. bidest, pH 7,3
TBST:	1l TBS, 1ml Tween [®] 20 (Serva) [0,1%]
Blockpuffer:	5% Milchpulver (Carnation Nonfat Dry Milk, Nestle) in TBS

Primäre Antikörper:

(Verdünnung in Blockpuffer 1:1000)

Anti-Actin	monoclonal	anti-mouse	CP01 (Oncogene)
Anti-CNP	polyclonal	anti-rabbit	Waehneltd (Geschenk)
Anti-GAP-43	monoclonal	anti-mouse	CP09 (Oncogene)
Anti-GFAP	monoclonal	anti-mouse	Clone G-A-5 (Boehringer)
Anti-GFAP	polyclonal	anti-rabbit	G9269 (Sigma)
Anti-GRP94	monoclonal	anti-rat	SPA-850 (StressGen)
Anti-GRP78	polyclonal	anti-rabbit	SPA-826 (StressGen)
Anti-HSP25	polyclonal	anti-rabbit	SPA-801 (StressGen)
Anti-HSP32	polyclonal	anti-rabbit	SPA-895 (StressGen)
Anti-HSP60	monoclonal	anti-mouse	SPA-806 (StressGen)
Anti-HSP70	monoclonal	anti-mouse	SPA-810 (StressGen)
Anti-HSP/HSC70	monoclonal	anti-mouse	SPA-820 StressGen)
Anti-HSP90	monoclonal	anti-mouse	SPA-830 StressGen)
Anti-MAP1b (MAP5)	monoclonal	anti-mouse	Clone AA6 Sigma)
Anti-MAP2	monoclonal	anti-mouse	Clone HM-2 Sigma)
Anti-MBP	polyclonal	anti-rabbit	J.M.M. Geschenk)
Anti-NF-H non-phosphorylated	monoclonal	anti-mouse	RMO 09.5 (Philadelphia, Geschenk)
Anti-NF-H Phosphorylated	monoclonal	anti-mouse	RMO 24.9 (Philadelphia, Geschenk)
Anti-NF-L phosph. independent	polyclonal	anti-rabbit	(Philadelphia, Geschenk)
Anti-NF-M phosph. independent	monoclonal	anti-mouse	RMO 189.7 (Philadelphia, Geschenk)
Anti-Reelin	monoclonal	anti-mouse	Clone G10 (Calbiochem)
Anti-Synaptophysin	monoclonal	anti-mouse	Klon SY 38 (Boehringer)
Anti-Ubiquitin	monoclonal	anti-mouse	Clone FK2 (Affiniti)
Anti- α -Tubulin	monoclonal	anti-mouse	Clone DM1A (Sigma)
Anti- α B-Crystallin	monoclonal	anti-mouse	SPA-222 (StressGen)

Sekundäre Antikörper:

(Verdünnung in Blockpuffer 1:3333)

Anti-mouse-IgG-HRP	(Amersham)
Anti-rabbit-IgG-HRP	(BioRad)

HRP = konjugiert mit Meerrettichperoxidase

Vor der Inkubation des Blots mit dem ersten Antikörper wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran ca. 30 min mit Blockpuffer abgesättigt. Über Nacht wurde der Blot bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde am nächsten Tag dreimal 15 min mit TBST ausgewaschen. Danach erfolgte eine 60minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper und erneutes dreimaliges Waschen mit TBST.

2.3.6 Immunochemische Detektion von Proteinen mit der ECL-Methode

Filmpapier	
Röntgenkassetten	
ECL-Detektionskit	(Amersham)
Entwickler	D-19 (Kodak)
Stoppbad	Leitungswasser
Fixierer	(Tetanal)

Die Detektion der Immunreaktion erfolgte mit Hilfe der ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) - Methode. Die Blots wurden etwa 1 min mit Detektionslösung gespült. Anschließend erfolgte mit Filmpapier die Detektion der Chemilumineszenz in der Dunkelkammer. Nach unterschiedlichen Belichtungszeiten zwischen 20 sec und 30 min wurden die Filmpapiere in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

2.4 Mikrotubuli-Binding-Assay

Alle Materialien und Lösungen wurden auf 37°C erwärmt.

Zentrifuge	Biofuge Stratos (Heraeus)
Ultraschallgerät	(Branson Sonifier)
Beckmann-Cups	Centrifuge-Tubes (Beckman)
Hand-Homogenisator	Pellet Pestle [®] Motor (Kontes)
Complete [™] Mini:	Protease-Inhibitoren-Cocktail (Boehringer)
	7x Stock: 1 Tablette in 1,5ml Aqua bidest lösen, Zusammensetzung in mg/ml:
	Pancreasextrakt 0,02
	Pronase 0,005
	Thermolysin 0,0005
	Chymotrypsin 0,0015
	Papain 0,33
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Fluka) 0,1M in Ethanol
DTT	Dithiothreitol (Biomol) 800mM in A. bidest
Taxol	Paclitaxel (Sigma) 5mM in Ethanol
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat (Sigma) 100mM in A. bidest
RAB-Stock (10x):	1M Tris
	10mM EGTA
	5mM MgSO ₄
	20mM NaF

Lysis Puffer:	100µl RAB-Stock
	10µl 10% Triton [0,1%]
	20µl GTP [4mM]
	4µl Taxol [40µM]
	10µl PMSF [200µM]
	140µl Complete™ Mini
	ad 1ml A. bidest

Die Zellen werden zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten zweimal mit PBS gewaschen und in 200µl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach dem Homogenisieren werden die Zell-Lysate in Beckmann-Cups zentrifugiert (21000 rpm, 30 min, 37°C). Vom Überstand wird eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dann wird die Proteinkonzentrationen der einzelnen Überstände mit Lysis-Puffer (ohne GTP, Taxol und Triton) auf die geringste Konzentration angeglichen und 5xSB dazu gegeben. Die Pellets werden in der Hälfte des Überstand-Volumens in 1xSB aufgenommen. Beide Fraktionen werden 10 min gekocht. Das Pellet enthält die Mikrotubuli und der Überstand die cytosolische Fraktion.

2.5 Semi-quantitative RT-PCR

2.5.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Für das Arbeiten mit RNA wurden nur RNase-freie Materialien verwendet.

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen nach der im Manual angegebenen Methode für *Animal Cells*.

RNeasy® Mini Kit	(Qiagen)
Spektralphotometer	GeneQuant II (Pharmacia Biotech)
Mikroquarzküvette	10 µl (Hellma)

Die extrahierte RNA wurde spektrophotometrisch quantifiziert und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Thermocycler	Mastercycler gradient (Eppendorf)
A. bidest	RNase-frei (Eppendorf)
Reverse Transkriptase M-MLV (RT)	<i>Moloney murine leukemia virus</i> RT mit 5x RT-Puffer (Promega)
dNTPs:	100mM (Promega)
	Gebrauchslösung: 10mM je dNTP in A. bidest
Oligo dT-Primer:	(Promega)
	Gebrauchslösung 12,5µM in Aqua bidest
Random-Primer:	(Promega)
	Gebrauchslösung 12,5µM in Aqua bidest
DMSO	Dimethylsulfoxid (Roth)

Für die Synthese der cDNA wurde 1µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20µl eingesetzt. Ein Reaktionsansatz bestehend aus 4µl 5x Puffer, 4µl dNTPs, 1µl DMSO und 1µg RNA wurde 10 min bei 60 °C erhitzt. Zudem wurden Pro Ansatz 1µl Oligo dT-Primer und 1µl Random-Primer 5 min bei 60°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurde der Probenansatz mit Primermix und RT vermengt. Nach einstündiger Synthese-Reaktion bei 37°C im Thermocycler und Inaktivierung der RT bei 95°C wurde die Reaktion auf Eis gestoppt. Die cDNA wurde mit 80µl A. bidest verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.5.3 PCR (Polymerase chain reaction)

Thermocycler	T3 Thermocycler (Biometra)
MgCl ₂	25mM (Promega)
<i>Taq</i> -Polymerase	Biotherm 5U/µl mit 10x Probenpuffer (GeneCraft)
Mineralöl	(Sigma)
dNTPs:	(Promega)
	Gebrauchslösung: 2,5mM je dNTP in A. bidest
Primer:	entsalzt (Invitrogen); in Aqua bidest lösen:
	Stocklösung 50µM, Gebrauchslösung 10µM

Die Primer wurden designed mit dem Programm PRIMER3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Die Spezifität wurde mit FASTA3 (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html>) überprüft. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Primer nur an der Zielsequenz binden. Mit der *Primerselect*-Software (DNASTAR, Madison, WI) wurden die Primer auf interne Komplementarität überprüft. Synthetisiert wurden die Primer von Invitrogen (Tab. 4).

Aus 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,2mM je dNTP, 0,8mM je Primer und 1µl Template (ca. 10ng cDNA) wurde ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 23µl erstellt und mit Mineralöl überschichtet. Für den *hot start* wurde das Reaktionsgemisch 2 min bei 95°C erhitzt. Erst danach wurden 2µl Vorverdünnung der *Taq*-Polymerase (0,5U/µl) in den Reaktionsansatz gegeben. Für jedes Primerpaar erfolgte ein spezielles Programm im Thermocycler. Dieses bestand aus 24-33 Zyklen (je nach Primer) von je 30 sec Denaturierung bei 95°C, 30 sec *Annealing* bei primer-spezifischer Temperatur und 1 min Elongation bei 72°C. Abschließend erfolgte für 4 min eine terminale Elongation bei 72°C.

Tab. 4: Angaben zu den verwendeten Primern: Sequenzen, Quelle, Genbank (Acc. Nr.), *Annealing*-Temperatur (AT) und Amplifikatgröße (bp)

Primer	Sequenz (5' → 3')
HSP90 upper HSP90 lower	GAT TGA CAT CAT CCC CAA CC (nt 293-312) CCT CAT CAG ATC CCA CAT CC (nt 829-848) (Acc.Nr. S45392); AT: 61°C; bp: 555
HSP70 upper HSP70 lower	AGC TGC TGC AGG ACT TCT TC (nt 1220-1239) GCT GAT CTT GCC CTT GAG AC (nt 1847-1866) (Goldbaum und Richter-Landsberg, 2004) AT: 57°C; bp: 646
HSP32 upper HSP32 lower	AAG GAG GTG CAC ATC CGT GCA ATG TTG AGC AGG AAG GCG GTC (Kutty et al., 1995) AT: 64°C; bp: 565
HSP25 upper HSP25 lower	GTT AAG ACC AAG GAA GGC GTG G (nt 386-407) CTA CTT GGC TCC AGA CTG TTC C (nt 643-664) (Suzuki et al., 2001; Acc.Nr. M86389); AT: 68°C; bp: 278
αB-Crystallin upper αB-Crystallin lower	TGC AGT GAC AGC AGG CTT CT GAG AGC ACC TGT TGG AGT CT (Van Stipdonk et al., 2000) AT: 65°C
GAPDH upper GAPDH lower	CCC ACG GCA AGT TCA ACG GCA (nt 220-240) TGG CAG GTT TCT CCA GGC GGC (nt 805-825) (Fort et al., 1985; Acc.Nr. X02231) AT: 60°C; bp: 605

2.5.4 Agarose-DNA-Gelelektrophorese

Gelelektrophoresesystem	Agagel Midi-Wide (Biometra)
Geldokumentationsgerät	Herolab, E.A.S.Y. Image
Dokumentationssoftware	Intas GDS Image Quant
Spannungsquelle	Standard Power Pack P25 (Biometra)

Agarose	SeaKem® LE (BMA)
Marker	100bp DNA Ladder (GeneCraft)
6x Auftragspuffer:	100mM Tris (pH 8.0), 100mM EDTA (pH 8.0), 120mM NaCl, 15% Ficoll, 0,1% Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Färbelösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid (Serva), 25µl in 500ml TBE
TBE-Puffer:	10x Stocklösung: 107,5g Tris (890mM), 55g Borsäure (890mM), 7,4g EDTA (20mM), ad 1l Aqua Bidest, pH 8,2 1x Gebrauchslösung: 50ml Stocklösung und 450ml Aqua Bidest

Für ein 1,5%iges Agarosegel wurden 2,25mg Agarose in 150ml 1xTBE mittels Erhitzen gelöst. Es wurden 6µl PCR-Produkt zusammen mit 2µl 6x Auftragspuffer elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid-Lösung markiert. Mit dem Geldokumentationsgerät wurden die Banden sichtbar gemacht, fotografiert und anschließend mit der Software Image Quant quantifiziert.

2.6 DNA-Fragmentationsanalyse

Spektralphotometer	GeneQuant II (Pharmacia Biotech)
Ribonuclease A	2mg/ml (Sigma)
TE-Puffer	10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA
Lysis-Puffer:	100µl 1M Tris-HCl, pH 8 [10mM], 600µl 20% SDS [1,2%], 400µl 0,5M EDTA [20mM], ad 10ml A. bidest
Gelelektrophoresesystem	siehe 2.5.4
Geldokumentationsgerät u. -software	s.o.
Marker	1kb DNA-Ladder (Promega)

Die Zellen wurden mit PBS vom Schalenboden geerntet und pelletiert. Das Pellet wurde in 250µl TE-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 250µl Lysis-Puffer geschwenkt und kurz auf Eis gestellt. Die Fällung der Proteine erfolgte mit 300µl LiCl auf Eis. Nach 60minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, mit 800µl Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierte DNA in 20-30µl TE-Puffer resuspendiert. Mit Zugabe von 2µl RNase erfolgte die Degradation der RNA. Die DNA-Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Je 4µg der DNA-Proben wurden mit einem 1,5%igen Agarose-Gel

getrennt. Nach Färben in Ethidiumbromid-Lösung wurde die DNA mit dem Geldokumentationsgerät sichtbar gemacht und fotografiert.

2.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Fluoreszenzmikroskop mit Kamera	Axiophot (Zeiss)
Coverslips	autoklaviert (Fischer)
Paraformaldehydlösung 3%:	0,75g Paraformaldehyd (Serva) in 3,5ml A. bidest unter Zugabe von 3-4 Tropfen NaOH im Wasserbad lösen, ad. 25ml PBS
Triton X-100:	0,1% in PBS (Sigma)
Methanol	
PBS	siehe 2.1
Objektträger	
Einbettungsmittel	Vectashield® Mounting Medium with DAPI, H-1200 (Vector Laboratories)

Primäre Antikörper:

Anti-GFAP	monoclonal	anti-mouse	Clone G-A-5 (Boehringer)	1:20
Anti-GFAP	Polyclonal	anti-rabbit	G 9269 (Sigma)	1:50
Anti-HSP25	Polyclonal	anti-rabbit	SPA-801 (StressGen)	1:100
Anti-HSP32	Polyclonal	anti-rabbit	SPA-895 (StressGen)	1:50
Anti-HSP70	monoclonal	anti-mouse	SPA-810 (StressGen)	1:100
Anti-HSP/HSC70	monoclonal	anti-mouse	SPA-820 (StressGen)	1:25
Anti-HSP90		anti-rat	SPA-835 (StressGen)	1:25
Anti-MAP2	monoclonal	anti-mouse	Clone HM-2 (Sigma)	1:100
Anti-NF-L	polyclonal	anti-rabbit	Philadelphia (Geschenk)	1:50
phosph. indep.				
Anti-NF-M	monoclonal	anti-mouse	RMO 189.7 (Philadelphia, Geschenk)	1:50
phosph. indep.				
Anti-NF-M	polyclonal	anti-rabbit	H-60 (Santa Cruz)	1:50
Anti- α -Tubulin	polyclonal	anti-rabbit	T 3526 (Sigma)	1:50
Anti-Ubiquitin	monoclonal	anti-mouse	Clone FK2 (Affiniti)	1:100
Anti- α -Tubulin	monoclonal	anti-mouse	Clone DM1A (Sigma)	1:100
Anti- α B-Crystallin	monoclonal	anti-mouse	SPA-222 (StressGen)	1:50

Sekundäre Antikörper:

Verdünnung 1:50 in PBS

Anti-mouse FITC, Anti-rabbit FITC	Fluorescein-Isothiocyanat - conjugated AffiniPure Donkey IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)
Anti-mouse TR, Anti-rabbit TR	Texas Red dye - conjugated AffiniPure Donkey IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)

Die Zellen wurden auf PLL-beschichteten Glass-Coverslips kultiviert. Nach jeweiliger Behandlung und Erholungszeit wurden die Zellen fixiert. Für die Analyse intrazellulärer Proteine wurden die Zellen zunächst 15 min mit Paraformaldehyd fixiert und dann 30 min mit Triton X-100 permeabilisiert. Um unlösliche intrazelluläre Proteine zu untersuchen, wurde 5 min mit Methanol fixiert. Dann erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur (RT). Im Dunkeln wurde 45 min mit dem sekundären Antikörper bei RT inkubiert. Nach der Immunreaktion wurden die Coverslips auf Objektträgern in Einbettungsmedium mit Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. FITC-markierte Proteine emittieren grünes, Texas Red-markierte Proteine rotes Licht, DAPI leuchtet unter UV-Licht blau. (Zwischen den einzelnen Schritten wird jeweils dreimal mit PBS gewaschen.)

2.8 Antisense

Antisense-Oligonucleotide	(Biagnostik [®])
Zentrifugenfiltereinheiten	Microcon [®] Centrifugal Filter Devices YM-10 (Millipore)

Mit Antisense-Oligonucleotiden (AS-ODNs) lässt sich die Synthese eines bestimmten Proteins spezifisch unterdrücken. Antisense-Moleküle bestehen aus einzelsträngiger RNA, die komplementär zu der mRNA des Zielgens ist. Sie gehen mit der entsprechenden mRNA Basenpaarungen ein und blockieren so die Synthese des betreffenden Proteins (Zimmermann in Dudel et al., 1996).

Die AS-ODNs wurden von der Firma *BIOGNOSTIK*, Göttingen, entworfen und hergestellt. Um eine spezifische und effiziente Blockade der Translation zu gewährleisten, wurde auf verschiedene Kriterien geachtet. Idealerweise soll die Sequenz keine Komplementarität zu anderen RNAs als der *target*-mRNA aufweisen, keine Palindromstrukturen beinhalten und keine toxischen Motive haben.

Zu einem Antisense-Versuch sind Kontrollen erforderlich, die sequenz- und substanzbasierte Nebeneffekte ausschließen. Neben unbehandelten Kontrollen dienen randomisierte Kontrollen, so genannte *scrambled* Sequenzen als Negativkontrollen. *BIOGNOSTIK* stellt für diesen Zweck zwei standardisierte *scrambled* Kontrollen zur Verfügung, von denen versichert wird, dass sie an keine andere Sequenz aus der gesamten GenBank Datenbank binden und

auch keine problematischen Motive besitzen. *Scrambled* Kontrollsequenzen sind in etwa so lang wie die Antisense-Sequenzen und haben einen ähnlichen G/C-Gehalt.

Die geeignetste Methode um die Effekte von AS-ODNs zu untersuchen ist die Immunoblot-Analyse, da die Wirkungen der Antisense-Technik nur auf Proteinlevel ausgewertet werden können. Der Mechanismus von Antisense beruht auf einer Blockade der Translation an den Ribosomen. Durch die Behandlung mit Antisense kann der mRNA-Level sinken, steigen oder unbeeinträchtigt bleiben, während das Zielprotein deutlich reduziert wird. Unklar ist noch, ob der Antisense-Effekt durch die sterische Blockade der Translation aufgrund von Watson-Crick-Basenpaarungen verursacht wird oder durch den enzymatischen Abbau der *target*-mRNA mittels RNase H (Abb. 6).

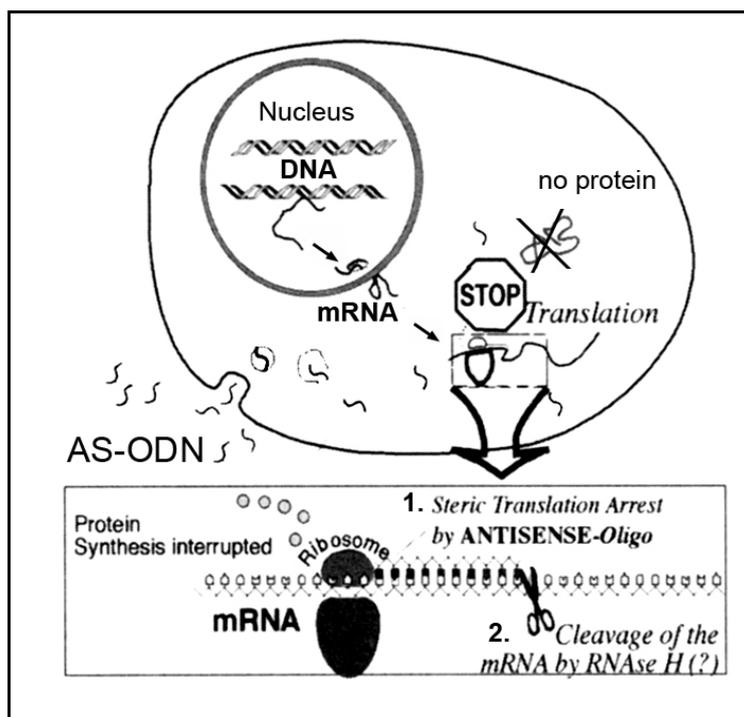


Abb. 6: Wirkung von AS-ODNs auf die Translation. Die negativ geladenen Oligonucleotide (ODNs) werden durch aktive Transportmechanismen aufgenommen. In der Zelle gelangen sie zunächst in Endosomen, von wo die ODNs ins Cytoplasma abgegeben werden. Dort binden sie die ihnen komplementäre mRNA. Die Hemmung der Translation beruht auf der sterischen Blockade des Ribosoms (1.) oder auf Degradation der mRNA durch RNase H (2.) (modifiziert aus Biognostik Antisense® Manual, 2001)

Ein Rückgang des Proteinprodukts durch Antisense kann nicht vor der natürlichen Degradation des vorher vorhandenen Proteins gesehen werden. Deshalb muss eine auf die Umsatzgeschwindigkeit des Proteins abgestimmte Inkubationsdauer gewählt werden. Die Halbwertszeit des hier untersuchten Proteins Reelin ist und bleibt unbekannt (Ignatova et al., 2004). In den Zellkulturexperimenten wurden die Zellen für 96 h mit AS-ODNs inkubiert.

Für die Antisense-Versuche wurden die Neuronen-Kulturen weniger dicht ausgesät als für andere Experimente (statt 2,5 ml Zellsuspension pro 6 cm Schale wurden nur 2 ml ausplattiert). Außerdem wurde vor AS-Gabe das Medium in den Schalen so weit reduziert, dass die Zellen gerade noch mit Flüssigkeit bedeckt sind:

- in 60 mm-Schalen von 5 auf 2,5ml
- in 35 mm-Schalen von 2,5 auf 1,5ml

Die Gabe der AS-ODNs erfolgte wie im Ergebnisteil beschrieben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium der einzelnen Versuchsansätze getrennt gesammelt und vorhandenes Protein mit Zentrifugationsfiltereinheiten aufkonzentriert. Zellrasen und konzentriertes Medium wurden in 1xProbenpuffer aufgenommen und für die Immunoblot-Analyse vorbereitet.

3. Ergebnisse

3.1 *In vitro*-Differenzierung von Neuronen

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden neuronale Primärkulturen aus embryonalem Rattenhirn verwendet. Zur Charakterisierung der Kultur wurden die Zellen über einen Zeitraum von vier Wochen kultiviert und in unterschiedlichen Abständen fotografiert und Zell-Lysate für die biochemische Charakterisierung hergestellt.

3.1.1 Morphologische Entwicklung *in vitro*

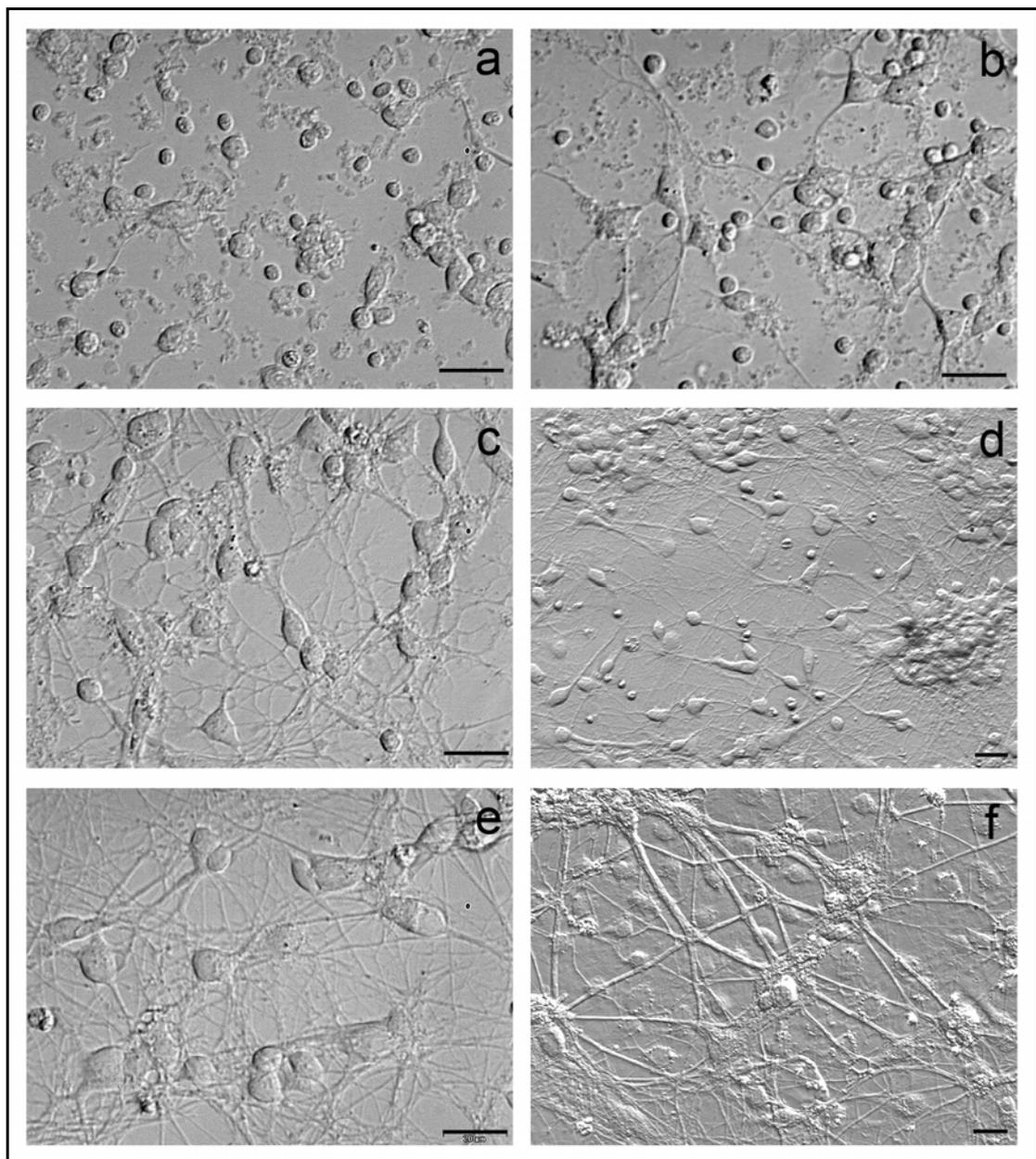


Abb. 7: Hoffman-Modulationskontrast-Aufnahmen von Neuronen-Kulturen. a: 5h *in vitro*; b: 1 DIV (*days in vitro*); c: 4 DIV; d: 7 DIV; e: 8 DIV; f: 21 DIV. Balken = 20µm.

Die morphologische Entwicklung der kultivierten Neuronen wurde durch Aufnahmen mit dem Hoffman-Modulationskontrast-Mikroskop dokumentiert (Abb. 7). Wenige Stunden nach der Aussaat sind die Zellen noch abgerundet und ohne Fortsätze (Abb. 7a). Bereits einen Tag später bildet ein Teil der Zellen kleine Ausläufer, die sich später zu mehr oder weniger verzweigten Fortsätzen entwickeln. Nach 7 DIV (*days in vitro*) bilden die Neurone zum Teil Aggregate (Abb. 7d). Die Fortsätze entwickeln sich innerhalb von einer Woche zu einem ausgeprägten Netzwerk, nach etwa drei Wochen bilden sie Faszikel (Abb. 7f).

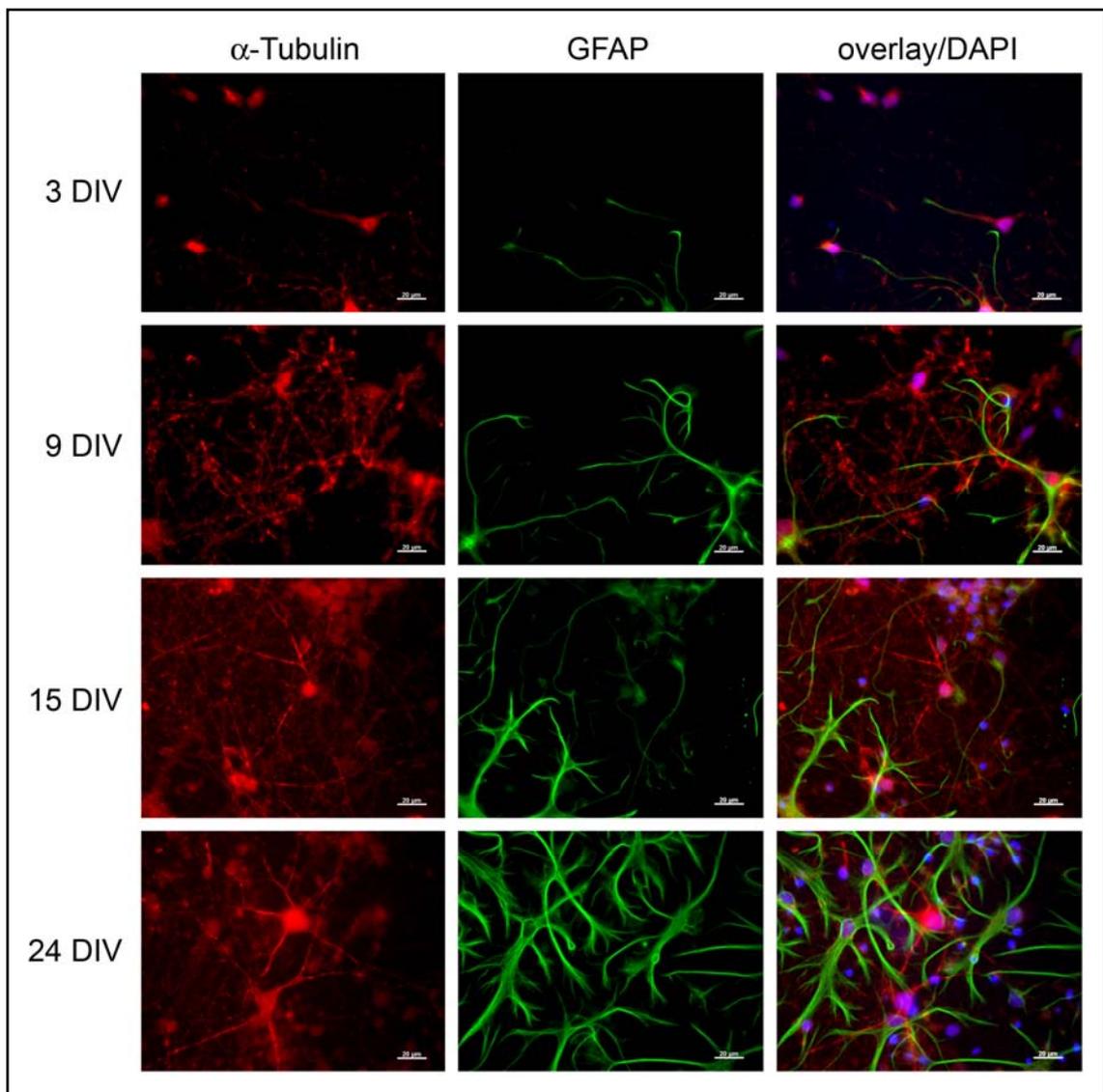


Abb. 8: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Neuronen-Kulturen. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mittels der Methode der indirekten Immunfluoreszenz mit polyclonalem anti- α -Tubulin (rot) und monoclonalem anti-GFAP (grün) analysiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Balken = 20 μ m

Die weitere Charakterisierung mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie ergab, dass mit zunehmender Kultivierungsdauer Astrozyten in den Kulturen auftauchen. Während in einer drei Tage alten Kultur hauptsächlich Neurone, welche besonders reich an Mikrotubuli sind, vorkommen, waren GFAP-positive Astrozyten erst nach 9 DIV zu detektieren (Abb. 8). Innerhalb von drei Wochen beträgt der Anteil der Astrozyten in der Kultur über 50% der Zellen.

3.1.2 Biochemische Charakterisierung der Neuronenkultur mittels Immunoblot

Zur Charakterisierung der biochemischen Differenzierung der Neurone in Kultur wurde das Vorkommen von neuronalen Markern untersucht und mit gliaspezifischen Markern verglichen. Diese Untersuchungen sollten dabei helfen, für die weiteren Versuche ein Kultivierungsstadium auszuwählen, in dem die Neuronen-Kulturen bereits differenziert, aber noch weitgehend frei von Gliazellen sind. Proteinextrakte der Zellkulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellt und einer SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot unterzogen.

Zur Identifizierung von Neuronen wurden Neurofilament (NF)-Proteine und das nur in synaptischen Vesikeln vorkommende Glykoprotein Synaptophysin analysiert. Abbildung 9 zeigt, dass Synaptophysin bereits an 3 DIV vorhanden ist und im Verlauf von neun Tagen in etwa konstant bleibt. Danach ist ab 14 DIV eine Abnahme der Immunreaktivität von Synaptophysin zu beobachten, welcher mit der Zunahme von GFAP und dem Wachstum von Astrozyten in der Kultur korreliert. In der *in vivo*-Entwicklung nimmt Synaptophysin progressiv zu und kann als Marker für eine normale Synaptogenese verwendet werden (Sarnat und Born, 1999; Leclerc et al., 1989).

In Abb. 9 ist zu sehen, dass alle drei NF-Proteine in den Neuronen-Kulturen vorkommen. So sind NF-M und NF-L bereits vom ersten Tag an vorhanden, wohingegen sich NF-H erst ab etwa zwei Wochen in der Kultur findet. Während NF-M bereits innerhalb von 3 DIV den maximalen Level erreicht hat, ist NF-L in der Kultur die ersten 14 Tage nur in geringen Mengen zu detektieren. Untersuchungen des Hippocampus der Ratte von Lopez-Picon et al. (2003) zeigen ebenso, dass NF-M in der ersten postnatalen Woche das NF-Protein mit

dem größten Vorkommen ist. Die erste postnatale Woche entspricht *in vitro* Tag 4-11 (s.u.). Die Mengen von NF-L sind *in vitro* wie *in vivo* zu diesem Zeitpunkt etwas geringer. NF-H nimmt erst postnatal zwischen Tag 7 und 14 (P7-P14) stark zu (Lopez-Picon et al., 2003). Auch *in vitro* ist ab 14 DIV, was *in vivo* P10 entspricht, eine Zunahme von NF-H zu beobachten.

NF werden *in vivo* phosphoryliert, was während des axonalen Wachstums und der Synaptogenese eine Rolle bei der Umorganisation der cytoskelettalen Architektur spielt (Zheng et al., 2003). Durch die Phosphorylierung mehrerer Lysin-Serin-Prolin-Repeats in der Carboxy-terminalen Region des Proteins erhöht sich die negative Ladung des NF. Dadurch vergrößern sich vermutlich die Zwischenräume der einzelnen Filamente und somit der axonale Umfang (Lariviere und Julien, 2003). *In vivo* können phosphorylierte NF erstmals an P8 detektiert werden (Sawant et al., 1994). In Abb. 9 ist zu sehen, dass NF-H auch *in vitro* in phosphorylierter Form ab 14 DIV vorkommt, was *in vivo* P10 entspricht (s.u.). Die Phosphorylierung von NF-M wurde hier nicht untersucht.

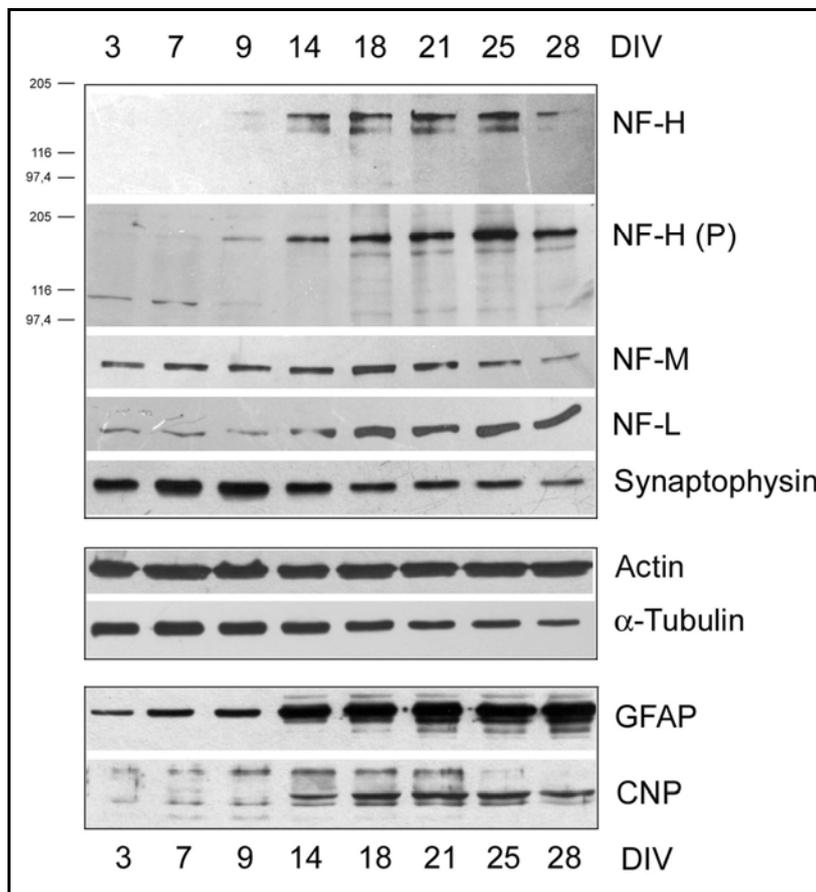


Abb. 9: Charakterisierung der Neuronenkultur (RCB) während der Entwicklung.

Zellextrakte der neuronalen Primärkultur wurden in einem Zeitraum von vier Wochen in Kultur zu den angegebenen Zeitpunkten (3-28 DIV) mittels Immunoblot auf neuronale und gliaspezifische Marker untersucht. Links im Bild: MW-Marker, rechts angegeben die identifizierten Proteine.

Die Zunahme von GFAP im Immunoblot bestätigt die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzanalyse und deutet auf ein verstärktes Wachstum der

Astrozyten hin, was sich auch in der α -Tubulin-Menge widerspiegelt. Da Astrozyten weniger α -Tubulin enthalten als Neurone, nimmt der Gesamtanteil von α -Tubulin im Zell-Lysat ab.

CNP, ein Marker unreifer Oligodendrozyten, wird ebenfalls nach etwa 14 DIV gebildet, was auf Oligodendrozyten-Wachstum in der Kultur hindeutet.

Die neuronalen Kulturen werden an Tag 17 aus embryonalem Rattenhirn gewonnen. Bei einer Tragezeit von 21 Tagen entsprechen 4 DIV dem Zeitpunkt der Geburt (P0). *In vivo* entstehen zu diesem Zeitpunkt Astrozyten, Oligodendrozyten bilden sich an P7 (Abb. 2). Astrozyten sind in Kultur bereits nach 3 DIV, dem frühesten analysierten Zeitpunkt, zu detektieren. Die Bildung der Oligodendrozyten zwischen 9-14 DIV entspricht der Entwicklung *in vivo*. Die Synaptogenese beginnt *in vivo* wenige Tage vor der Geburt. Auch *in vitro* kommt bereits ab 3 DIV Synaptophysin vor. Das differentielle Vorkommen der drei NF-Proteine ist *in vitro* wie *in vivo*. Während NF-L und NF-M *in vitro* und *in vivo* zuerst gebildet werden, nimmt NF-H in der Entwicklung nur langsam zu.

Die Ergebnisse zeigen, dass das hier verwendete System der kultivierten primären Neuronen embryonaler Ratten bis etwa 9 DIV vorwiegend neuronenspezifische und kaum gliale Charakteristika zeigt. Die Kulturen sind somit als neuronales Kulturmodell geeignet.

3.2 Hitzeschockproteine in Neuronen und Astrozyten *in vitro*

Neben einer verstärkten Synthese nach Stress, kommen viele Hitzeschockproteine (HSPs) auch unter physiologischen Bedingungen vor.

Die folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu evaluieren, welche HSPs in Neuronen konstitutiv vorkommen und welche nach unterschiedlichen Stress-Situationen induzierbar sind. Außerdem wurde die HSP-Expression in Astrozyten untersucht und mit der von Neuronen verglichen.

3.2.1 Untersuchung der konstitutiven Expression von Hitzeschockproteinen während der *in vitro*-Differenzierung von Neuronen

Die konstitutive Expression verschiedener HSPs in Neuronen wurde in Proteinextrakten der Entwicklungsreihe analysiert. Dabei zeigt sich, dass eine Reihe HSPs unter physiologischen Bedingungen in der Kultur vorkommen (Abb. 10): HSP90, die konstitutive Form von HSP70 HSC70, das mitochondriale HSP60 und HSP40 werden sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten konstitutiv exprimiert. Auch die beiden im ER lokalisierten HSPs GRP94, Mitglied der HSP90 Familie, und GRP78, Mitglied der HSP70-Familie, kommen konstitutiv in beiden Zelltypen vor. Die kleinen HSPs (sHSPs) HSP25 und α B-Crystallin kommen konstitutiv in großen Mengen in Astrozyten vor. In Neuronen wird α B-Crystallin unter normalen Bedingungen gar nicht, HSP25 nur zu einem geringen Teil exprimiert. Die Zunahme dieser beiden sHSPs ab 14 bzw. 21 DIV ist vermutlich mit einer Vermehrung der Astrozyten in der Neuronenkultur zu erklären. HSP32 kann in älteren Kulturen identifiziert werden. Da HSP32 als Marker für oxidativen Stress gilt, könnte dies darauf hindeuten, dass mit längerer Kultivierungsdauer der oxidative Stress zunimmt. HSP70 kommt in den kultivierten Neuronen konstitutiv nicht vor. Die Induktion von HSP70 nach 25 DIV zeigt ebenfalls, dass nach drei bis vier Wochen Stress in der Kultur entsteht.

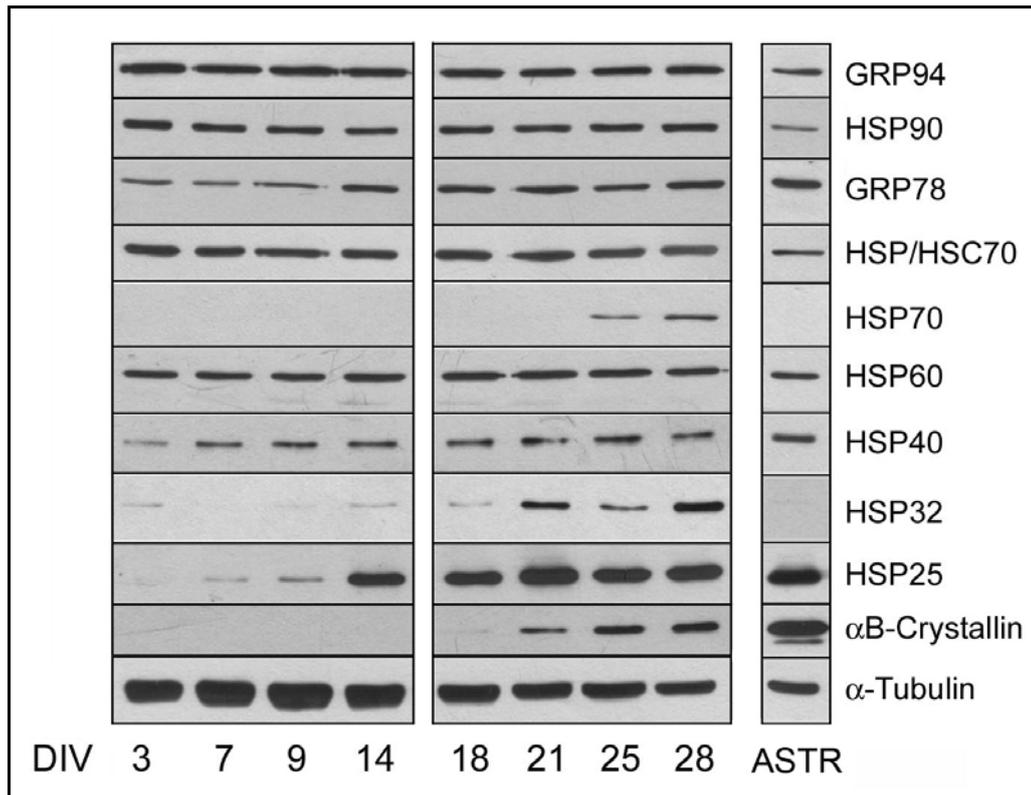


Abb. 10: Entwicklungsabhängiges Vorkommen von Hitzeschockproteinen in kultivierten Neuronen. Neuronen-Zellextrakte (3-28 DIV) wurden einer SDS-PAGE und anschließend Immunoblot unterzogen und mit einer Reihe von Antikörpern gegen verschiedene HSPs markiert. Die gleichen HSPs wurden in einem Extrakt einer Astrozyten-Kultur (ASTR) untersucht.

Neben der Zunahme von Gliamarkern deutet auch die Induktion von HSPs darauf hin, dass ältere Kulturen für Untersuchungen nicht geeignet sind. Aufgrund dieser Ergebnisse ist diese Kultur bis etwa 18 DIV geeignet, um eine stress-bedingte Induktion von HSPs zu studieren.

Astrozyten exprimieren, wie in der Immunoblot-Analyse zu sehen, im Gegensatz zu Neuronen auch konstitutiv die sHSPs HSP25 und α B-Crystallin (Abb. 10). In den Astrozyten-Kulturen kommen sowohl Astrozyten vom Typ I wie auch Astrozyten vom Typ II vor. Beide haben eine Immunreaktivität für HSP25. Jedoch weisen protoplasmatische Typ I-Astrozyten mehr HSP25 auf (Abb. 11, Pfeilkopf). Einige Zellen, meist stellate Astrozyten, exprimieren nur geringe Mengen an HSP25 (Abb. 11, Pfeil).

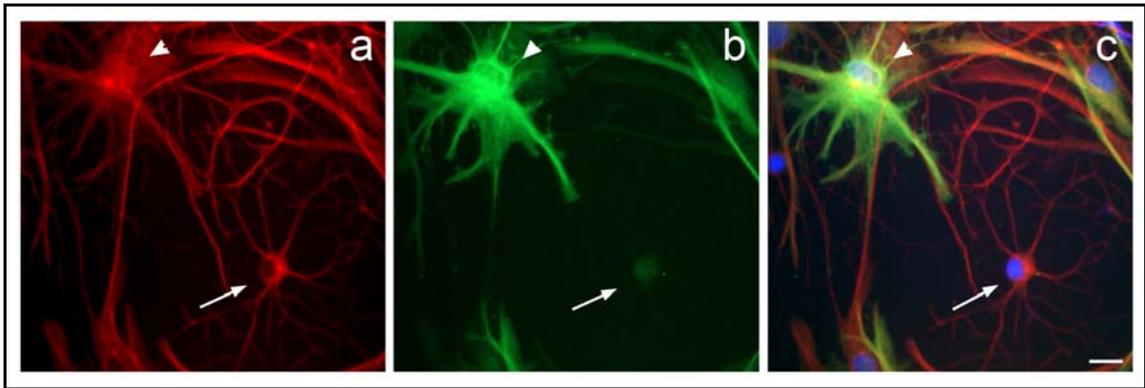


Abb. 11: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Astrozyten-Kulturen. Die Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse mit monoclonalem anti- α -Tubulin (rot: a) und polyclonalem anti-HSP25 (grün: b) analysiert. c: overlay und Kerndarstellung mit DAPI (blau). Die meisten Astrozyten vom Typ I (Pfeilkopf) zeigen eine stärkere Immunreaktivität für HSP25, als Typ II-Astrozyten (Pfeilkopf). Balken = 20 μ m

α B-Crystallin kann zwar in großen Mengen im Immunoblot nachgewiesen werden, in der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse dagegen nur minimal. Etwa die Hälfte der Astrozyten, vorwiegend vom Typ I, zeigt eine nur schwache Immunreaktivität, der Rest gar keine (Abb. 13).

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse lässt sich die konstitutive Expression von HSP90 und HSC70 in Neuronen (7 DIV) belegen (Abb. 12). In einigen Neuronen lassen sich geringe Mengen HSP32 und HSP25 nachweisen. HSP70 und α B-Crystallin sind nicht nachzuweisen. Es erfolgte eine Doppelmarkierung mit anti-NF und dem jeweiligen HSP-Antikörper, um die neuronenspezifische Expression zu zeigen.

Auf Grundlage der Untersuchungen aus 3.1.2 und 3.2.1 wurden die Kulturen in einem frühen Entwicklungsstadium von 6 bis 8 DIV verwendet. In dieser Zeit sind hauptsächlich neuronenspezifische Charakteristika zu detektieren. Außerdem sind keine HSPs induziert, sondern nur konstitutiv vorkommende HSPs vorhanden.

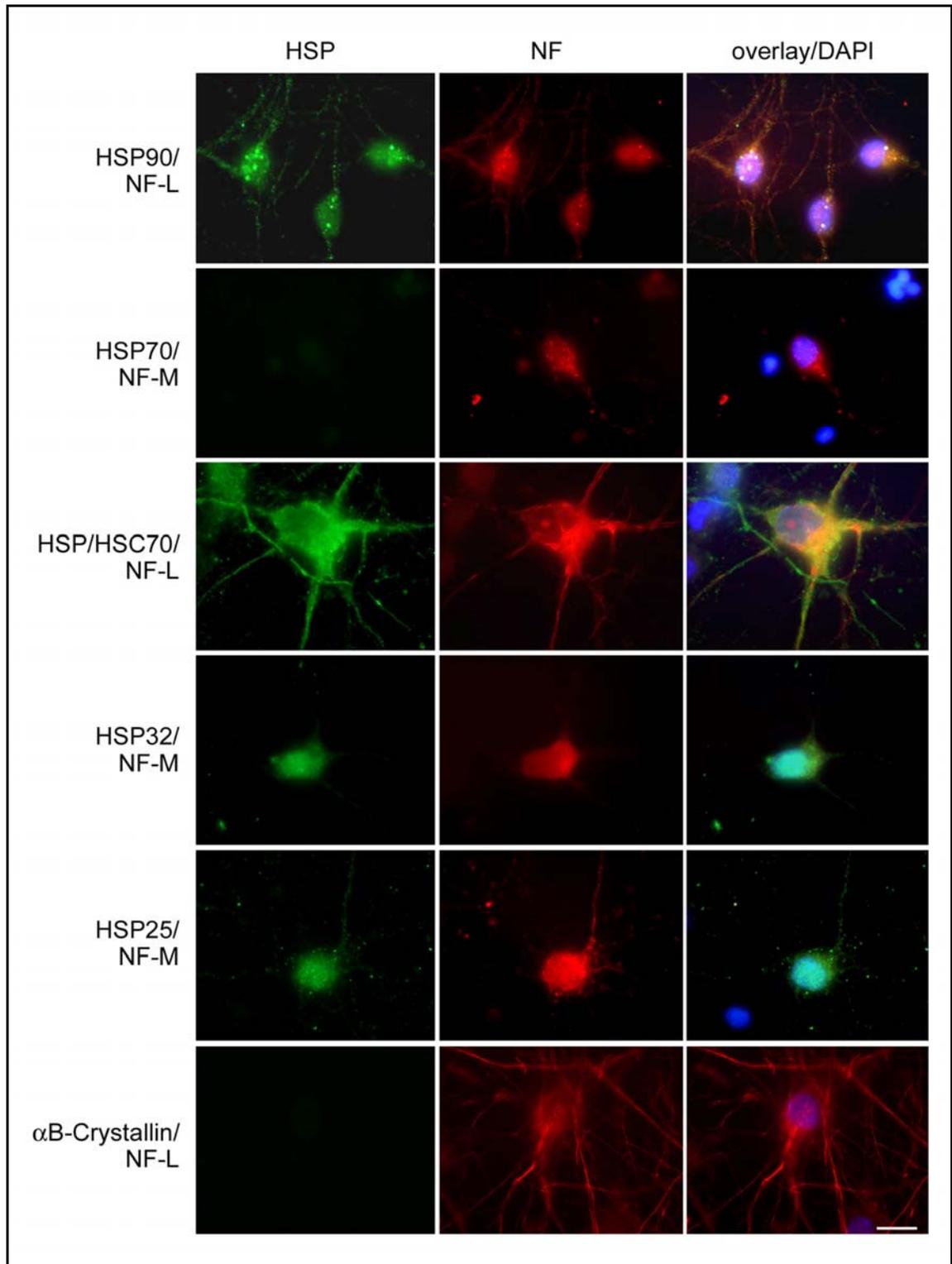


Abb. 12: Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse der HSPs. Neurone (7 DIV) wurden mit Methanol bzw. mit Paraformaldehyd fixiert und mit 0,1% Triton permeabilisiert. Es wurde eine Doppelfärbung mit jeweils einem HSP-Antikörper (grün) und anti-Neurofilament (rot) durchgeführt. Nervenzellen enthalten konstitutiv HSP90 und HSC70. Kernfärbung mit DAPI (blau). Balken = 20µm

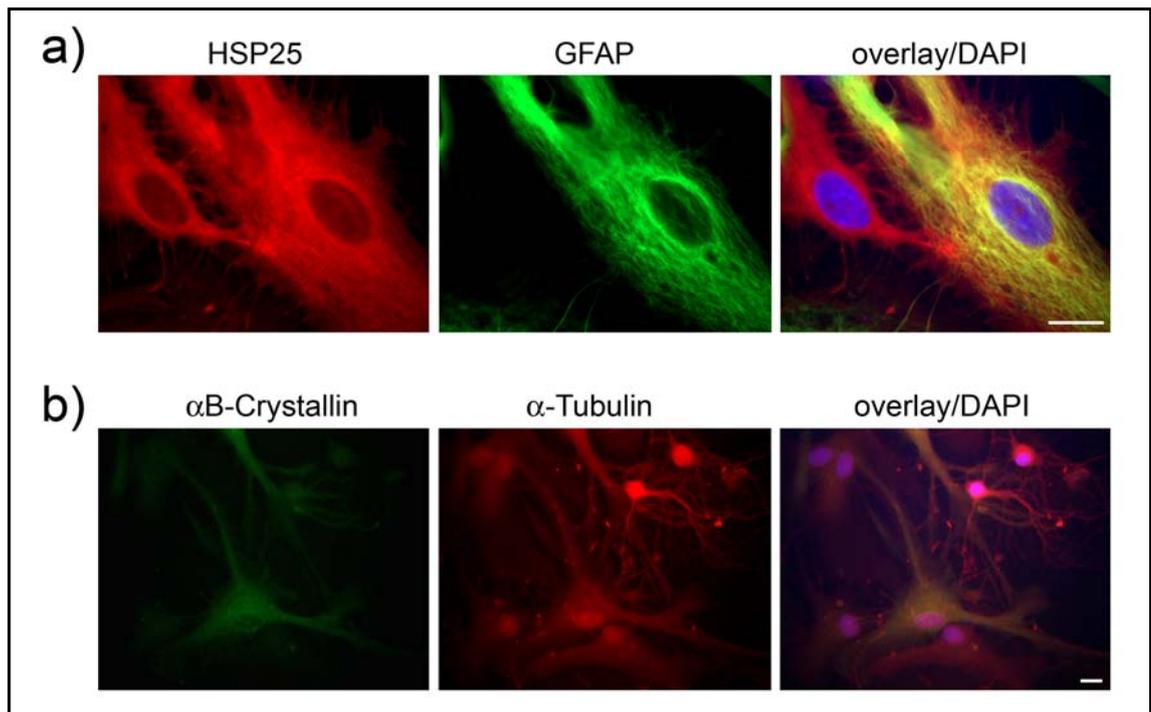


Abb. 13: Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von HSPs in Astrozyten. Astrozyten wurden mit Paraformaldehyd fixiert und mit HSP25 und GFAP (a) bzw. α B-Crystallin und α -Tubulin (b) markiert. Astrozyten enthalten konstitutiv hohe Mengen an HSP25 und geringe Mengen an α B-Crystallin. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). Balken = 20 μ m

3.2.2 Immunoblot-Analyse der HSP-Expression in Neuronen und Astrozyten nach Hitzestress und oxidativem Stress

Um zu analysieren, wie Neurone und Astrozyten auf verschiedene Stress-Situationen reagieren, wurden die Zellen *in vitro* unterschiedlichen Stressoren ausgesetzt.

Zunächst wurde die HSP-Expression nach Hitzestress (HS) und oxidativem Stress (OS) analysiert. Für den Hitzeschock wurden die Kulturschalen mit Parafilm verschlossen und für 30 min in ein Wasserbad mit 44°C gegeben. Auch die Kontrollen wurden mit Parafilm verschlossen, verblieben jedoch im Inkubator. Für den OS wurden die Zellen 30 min mit 50 μ M Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt. Sowohl nach HS als auch nach OS wurden die Zellkulturen nach der Behandlung für eine Erholungszeit von 24h im Inkubator bei 37°C gelassen. Anschließend wurden die Zellen extrahiert und mittels Immunoblot analysiert.

Die mikroskopische Beobachtung zeigt, dass Neurone sowohl nach HS als auch nach OS deutliche morphologische Veränderungen aufweisen, während

Astrozyten morphologisch intakt sind (Abb. 14). Nach HS und OS weisen Neurone Anzeichen von apoptotischem Zelltod auf, sie bilden membranöse Abschnürungen und apoptotische Körper. Nach Behandlung mit OS sind die Anzeichen deutlicher und ein größerer Teil der Zellpopulation ist geschädigt. Außerdem sind nach OS die Zellfortsätze der Neurone zerstört.

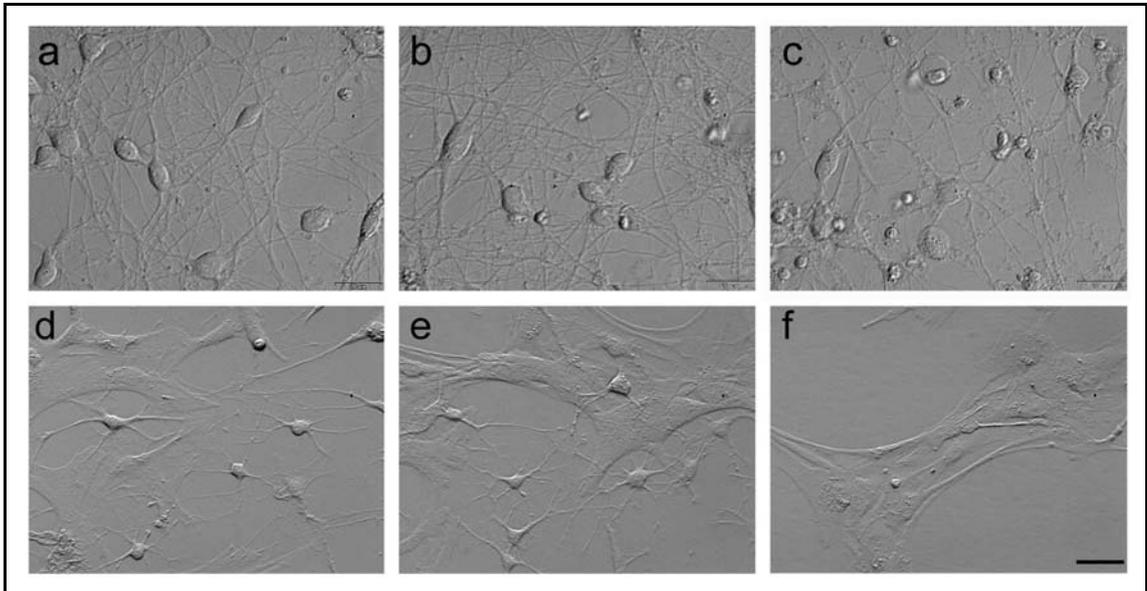


Abb. 14: Phasenkontrastaufnahmen von kultivierten Neuronen und Astrozyten nach Stress. Die Kulturen wurden einem Hitzestress (30 min, 44°C) (b+e) oder einem oxidativen Stress (H_2O_2 , 50 μM) (c+f) ausgesetzt. Mit dem Hoffman-Modulationskontrast-Mikroskop wurde die Morphologie nach 24h mit unbehandelten Kontrollen verglichen (a+d). a-c: Neuronen, d-f: Astrozyten. Balken = 20 μm

Der Vergleich der Menge von Hitzeschockproteinen in Neuronen und Astrozyten zeigt, dass Astrozyten zum einen im Gegensatz zu Neuronen konstitutiv hohe Mengen HSP25 und αB -Crystallin aufweisen (Abb. 15). Zum anderen ist die Menge der induzierbaren HSPs HSP70 und HSP32 nach Stress deutlich größer. In beiden Zelltypen zeigt sich eine spezifische Induktion von HSP70 nach HS und von HSP32 nach OS. HSP25 wird von Neuronen durch beide Stress-Situationen induziert, jedoch nach HS deutlicher als nach OS. Auch in Astrozyten, die schon konstitutiv große Mengen an HSP25 aufweisen, ist eine leichte Zunahme von HSP25 nach Stress zu beobachten. In Neuronen wird nach HS schwach αB -Crystallin induziert. Trotz hoher konstitutiver Mengen von αB -Crystallin in Astrozyten, ist eine Induktion von αB -Crystallin nach HS und OS zu erkennen. Während die Menge von HSP90 und HSP40 in beiden Zelltypen nach OS abnimmt, bleibt HSP60 nach Stress unverändert.

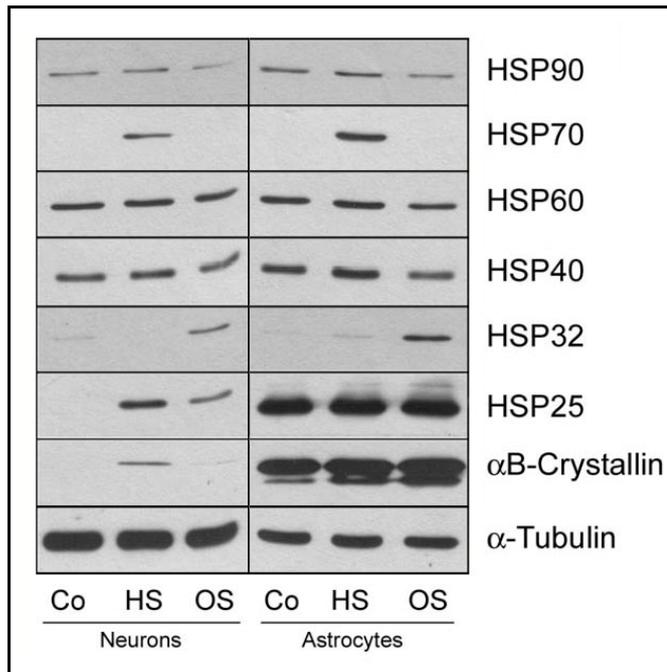


Abb. 15: Vergleich der HSP-Induktion nach HS oder OS in Neuronen und Astrozyten. Die Zellen wurden einem Hitzestress (HS: 30 min, 44°C) oder einem oxidativen Stress (OS: H₂O₂, 50µM) ausgesetzt. Zellextrakte wurden nach 24h präpariert und der Immunoblot-Analyse unterzogen. Die jeweiligen identifizierten Produkte sind rechts angegeben. Co: unbehandelte Kontrolle

3.2.3 Untersuchung zur Genexpression von HSPs in Neuronen und Astrozyten mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR

Um festzustellen, ob die Induktion der HSPs auch mit einer verstärkten Synthese ihrer mRNA einhergeht, wurden die mRNA verschiedener HSPs 3h und 7h nach HS oder OS mit Hilfe der RT-PCR-Methode untersucht. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert und die Gesamt-RNA extrahiert. Nach reverser Transkription der mRNA in cDNA erfolgten die PCR mit den entsprechenden Primerpaaren und die anschließende Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese (Abb. 16). Die Amplifikationsbedingungen wurden für jedes Amplifikat so gewählt, dass der exponentielle Bereich eingehalten wurde. Um die Expression des Target-Gens quantifizieren zu können, wurde parallel das konstitutiv exprimierte Haushaltenszym GAPDH amplifiziert. Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ, indem das Verhältnis der PCR-Produkte des Haushaltenszyms zur Target-DNA gebildet wurde (Abb. 17). Abbildung 16 zeigt exemplarisch für jedes PCR-Produkt das Ergebnis einer Amplifikation nach Gelelektrophorese. Jede Amplifikation wurde 2 bis 4 Mal durchgeführt. Für die quantitative Auswertung wurden die Mittelwerte gebildet und der Quotient mit der zugehörigen GAPDH-Kontrolle bestimmt.

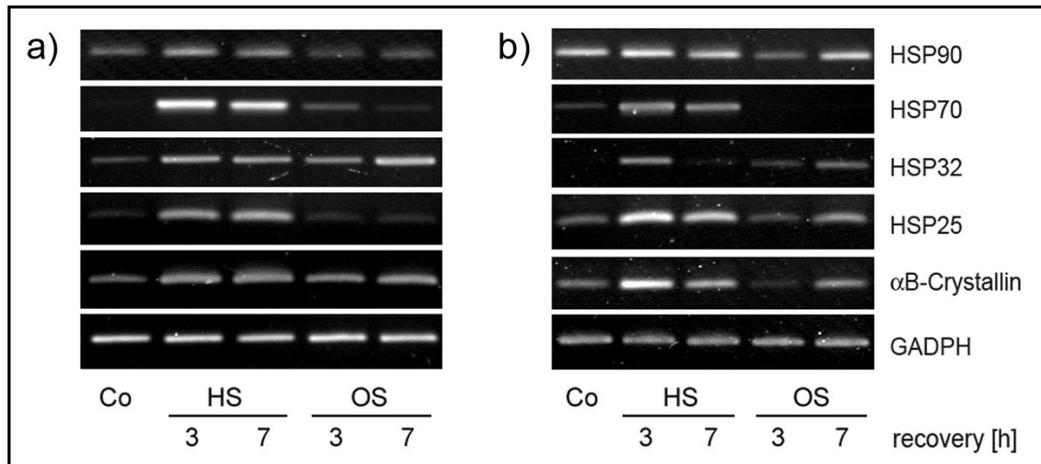


Abb. 16: RT-PCR-Analyse der HSP-Expression in Neuronen und Astrozyten nach Stress. Die mRNA von Neuronen (a) und Astrozyten (b) wurde 3 bzw. 7h nach Hitzestress (HS) oder oxidativem Stress (OS) mit dem RNeasy Mini-Kit von QIAGEN extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit verschiedenen Primerpaaren auf das Vorkommen von HSPs analysiert. Die PCR-Produkte sind rechts angegeben. Co: unbehandelte Kontrolle.

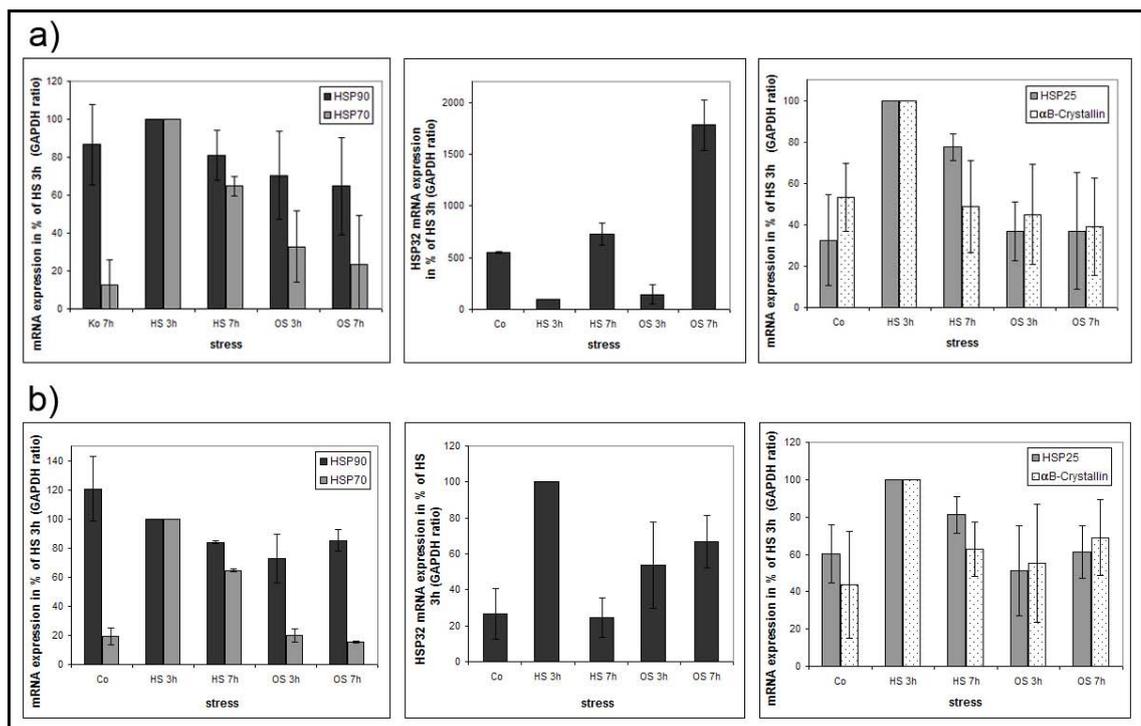


Abb. 17: Quantitative Auswertung der HSP-mRNA in Neuronen und Astrozyten (Abb. 16). Die Expressionslevel der einzelnen mRNAs wurden durch densitometrische Auswertung der korrespondierenden Banden bestimmt und in Relation zu GAPDH angegeben. a: Neurone, b: Astrozyten; Co: unbehandelte Kontrolle, HS: Hitzestress, OS: oxidativer Stress. n=3

Während in Neuronen und Astrozyten konstitutiv die mRNA von HSP90, HSP32 und α B-Crystallin vorkommt, weisen Astrozyten zudem HSP25 auf. HSP25 ist zwar auch immer in geringen Mengen in Neuronen zu detektieren, allerdings

variierten die Ergebnisse der Einzelversuche, was sich in der hohen Standardabweichung widerspiegelt. Die Induktion der einzelnen HSPs nach Stress ist in Neuronen und Astrozyten quantitativ ähnlich. Nach Stress kommt es in beiden Zelltypen zur Zunahme der mRNA von HSP70, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin. Dabei werden HSP25, α B-Crystallin und HSP70 nur nach HS induziert. In beiden Zelltypen werden α B-Crystallin und HSP70 bereits 3h nach HS verstärkt exprimiert, 7h nach Stress verringert sich die Menge wieder. Nach OS kommt es in Neuronen und Astrozyten zur Induktion der Transkription von HSP32, während die HSP90-mRNA abnimmt. In beiden Zelltypen kommt es auch nach HS zu einer Zunahme der HSP32-mRNA, eine Induktion des Proteins 24h nach Stress kann dagegen nicht beobachtet werden. Entweder wird die mRNA nicht translatiert oder die Proteinmenge hat zum Zeitpunkt der Analyse schon wieder das Kontrollniveau erreicht.

Die Ergebnisse des stress-spezifischen Vorkommens der analysierten mRNAs bestätigen die Immunoblot-Analyse. Auffällig ist, dass bei HSP90 sowohl die Proteinmenge wie auch die mRNA nach OS zurückgehen. In Neuronen ist HSP-mRNA bereits konstitutiv vorhanden, während kein Protein zu detektieren ist. Die mRNA liegt also ständig, auch unter normalen Bedingungen, in der Zelle vor, vermutlich damit als schnelle Antwort auf Stress sofort das Protein synthetisiert werden kann.

3.2.4 Assoziation von HSPs mit dem Cytoskelett in Neuronen und Astrozyten

HSPs sind wichtig für die Regulation des Cytoskeletts. Es gibt viele Untersuchungen, in denen die Bindung von HSPs mit Mikrotubuli (MT), Intermediärfilamenten, Mikrofilamenten und mikrotubuli-assoziierten Proteinen nachgewiesen wurde.

3.2.4.1 Mikrotubuli in Neuronen und Astrozyten nach HS und OS *in vitro*

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde die Verteilung der MT in kultivierten Neuronen und Astrozyten untersucht. Die MT wurden mit Antikörpern gegen α -Tubulin und sekundären FITC-gekoppelten Antikörpern

detektiert und im Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener Kamera aufgenommen.

Neurone besitzen ein ausgeprägtes MT-Netzwerk. Da die Neuronen-Kulturen jedoch empfindlich gegenüber der Durchführung dieser Methode sind und zudem auf Coverslips aus Glas nicht optimal wachsen, kann es mitunter bereits bei Kontrollbedingungen zu Störungen der MT-Organisation kommen. Nach Stress sind die Schädigungen jedoch deutlich ausgeprägter. Feine Verästelungen der neuronalen Fortsätze gehen verloren, manche Zellen scheinen besonders nach OS nur noch aus dem Zellsoma zu bestehen. Zusätzlich sind Zelltrümmer auf dem Untergrund zu beobachten (Abb. 18c). Astrozyten hingegen weisen auch nach Stress ein intaktes MT-Netzwerk auf. Ein hochorganisiertes Netzwerk durchzieht die ganze Zelle, deutlich ist das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) zu erkennen (Abb. 18e). Nach OS machen sich erste Schädigungen bemerkbar, die MTs scheinen nicht mehr vollständig geordnet (Abb. 18f).

Neurone reagieren also unter Stresseinwirkung deutlich empfindlicher mit Änderungen der MT-Organisation, während das MT-Netzwerk von Astrozyten noch unbeeinträchtigt ist.

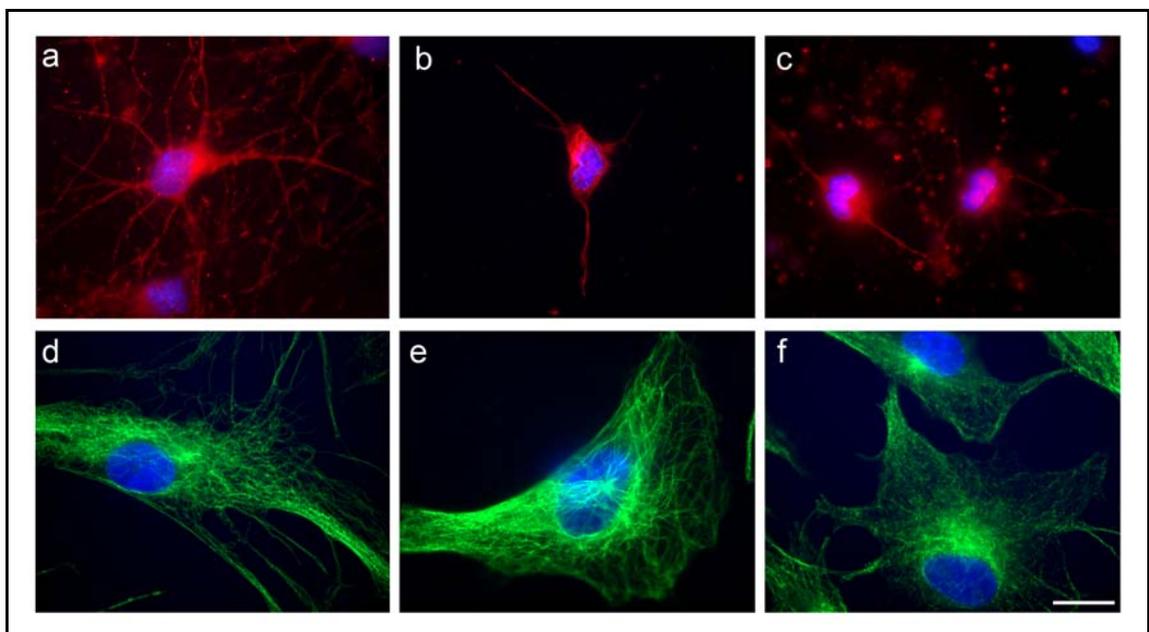


Abb. 18: Immunfluoreszenz-Darstellung des Tubulin-Netzwerks in Neuronen und Astrozyten nach Stress. Die Zellen wurden 24h nach HS (44°C, 30 min; b+e) oder OS (H₂O₂, 50µM; c+f) mit Methanol fixiert und mit anti-α-Tubulin markiert. Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Neuronen: a-c, Astrozyten: d-f. a+d: unbehandelte Kontrollen
Balken = 20µm

3.2.4.2 Colokalisation von HSP25 mit Mikrotubuli

Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen in Abb. 19 bestätigen, dass HSP25 in Neuronen nach HS nur schwach und nach OS nicht nachweisbar ist (s. Abb. 15). Die diffuse Verteilung von HSP25 in der Zelle lässt vermuten, dass hier keine Assoziation mit dem Cytoskelett vorliegt.

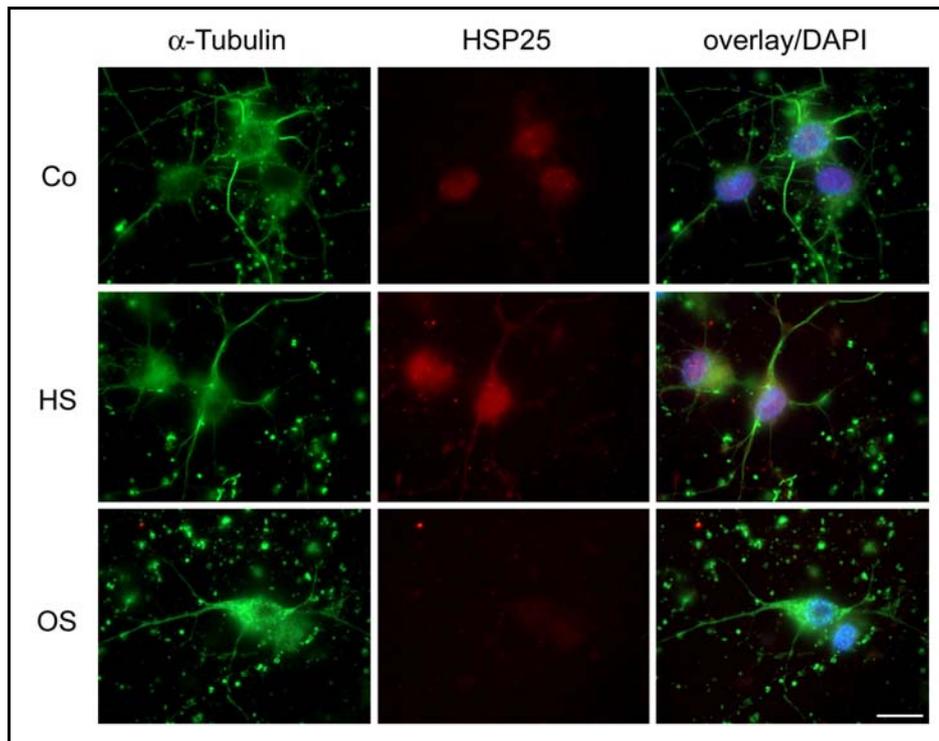


Abb. 19: Immunfluoreszenz-Darstellung von HSP25 in Neuronen. Die Zellen wurden 24h nach Stress mit Paraformaldehyd fixiert und mit 0,1% Triton permeabilisiert. Die Detektion von HSP25 erfolgte mit einem polyclonalen AK (rot). Kernfärbung mit DAPI (blau). Balken = 20µm. Co: unbehandelte Kontrolle, HS: Hitzestress, OS: oxidativer Stress. n=4

In Astrozyten, die einen hohen konstitutiven Level von HSP25 haben, ist nach Stress nur eine geringe Zunahme von HSP25 zu beobachten. HSP25 befindet sich in der gesamten Zelle verteilt. In Bereichen, in denen das Cytoskelett dichter ist, lässt sich auch eine deutlichere Immunreaktivität von HSP25 detektieren (Abb. 20 + Abb. 21). HSP25 colokalisiert vermutlich mit GFAP (Abb. 20). Das GFAP-Netzwerk reicht allerdings nicht bis in die Zellperipherie. In den feineren Fortsätzen ist es nicht zu detektieren. Da dort aber noch HSP25 nachzuweisen ist, assoziiert das sHSP wahrscheinlich mit weiteren Cytoskelett-Komponenten. Abbildung 21 zeigt, dass HSP25 auch mit den MT colokalisiert vorliegt. Die Immunreaktivität von HSP25 reicht genauso weit in die

Zellperipherie wie die von α -Tubulin. Dies ist in den vergrößerten Ausschnitten deutlicher zu sehen (Abb. 20b, 21b).

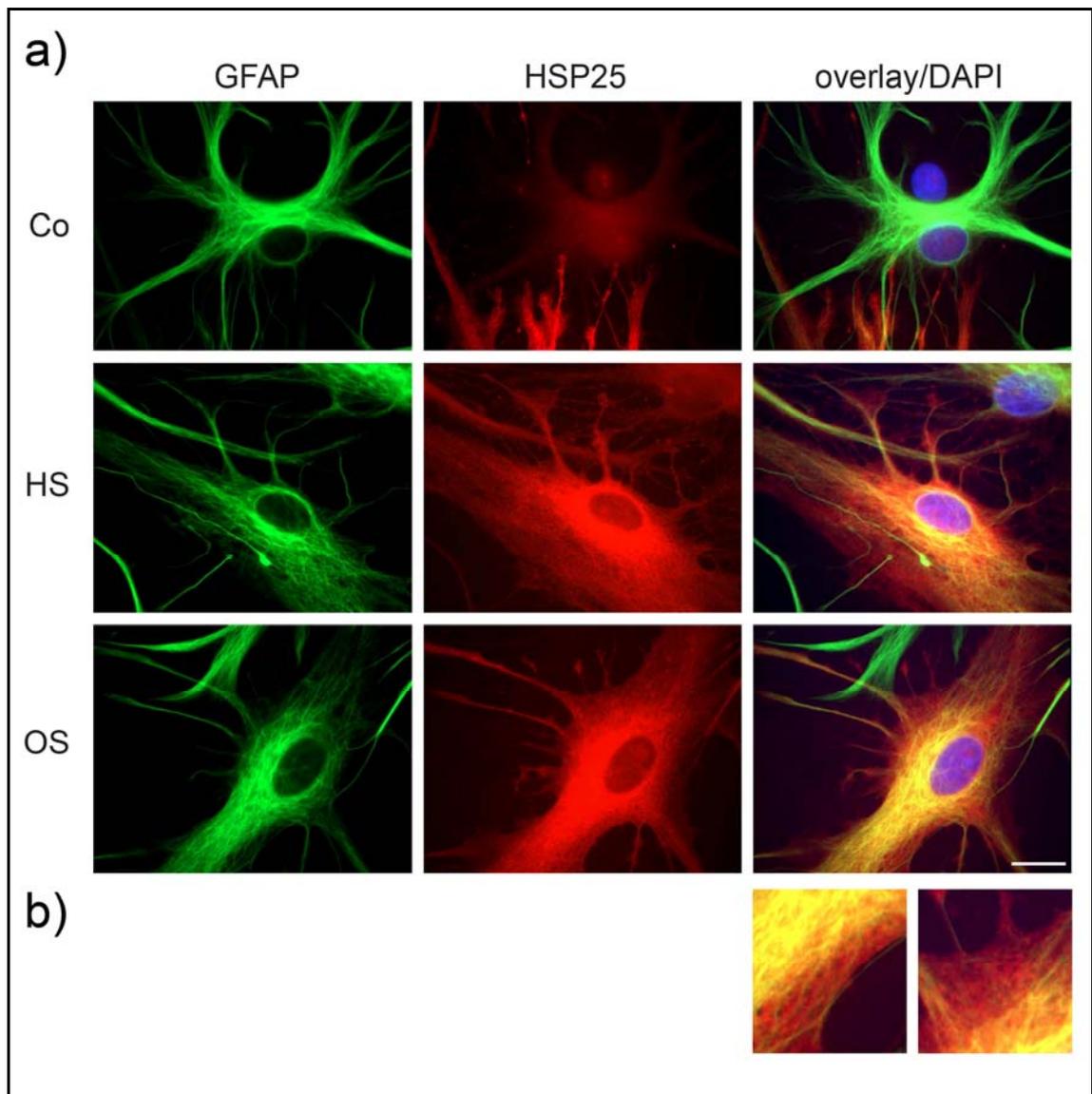


Abb. 20: Immunfluoreszenz-Darstellung von GFAP und HSP25 in Astrozyten. Astrozyten wurden 24h nach Stress mit Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit anti-HSP25 (rot) und anti-GFAP (grün) markiert. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). b) zeigt eine vergrößerte Darstellung aus a). Balken = 20µm. Co: unbehandelte Kontrolle, HS: Hitzestress, OS: oxidativer Stress. n=3

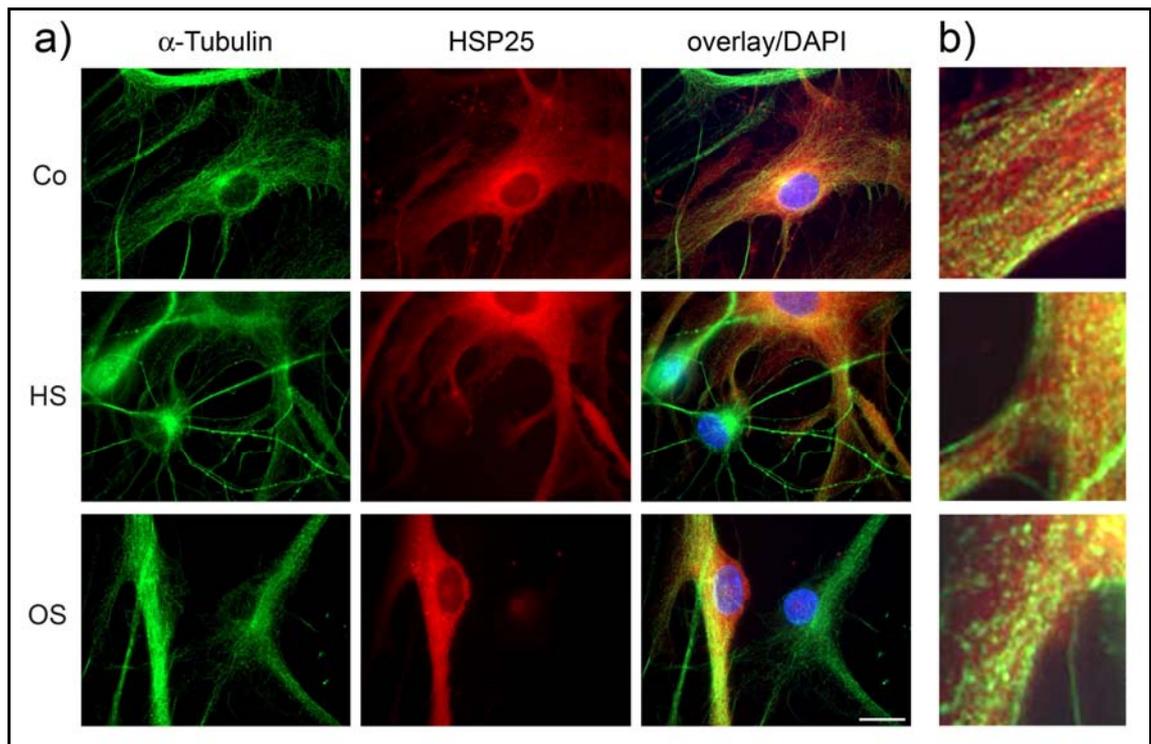


Abb. 21: Colokalisation von HSP25 und α -Tubulin in Astrozyten. Die Zellen wurden 24h nach Stress der indirekten Immunfluoreszenz unterzogen. Doppelfärbung mit α -Tubulin (grün) und HSP25 (rot), Kernfärbung mit DAPI (blau) b) Vergrößerungen von Ausschnitten der *overlay*-Bilder aus a). Balken = 20 μ m. Co: unbehandelte Kontrolle, HS: Hitzestress, OS: oxidativer Stress. n=3

HSP25 ist in Astrozyten hauptsächlich mit den MT assoziiert. Es besteht wahrscheinlich auch eine Interaktion mit GFAP, diese ist jedoch nicht so vollständig wie die mit den MT. In Neuronen kann auch nach Stress keine Colokalisation von HSP25 mit den MT beobachtet werden (Abb. 19).

3.2.4.3 Assoziation von HSPs mit MT in Neuronen und Astrozyten *in vitro*

Zur weiteren Analyse der Bindefähigkeit von HSPs an MT wurde ein MT-*Binding*-Assay durchgeführt. Die MT wurden nach Stabilisierung mit Taxol isoliert. Dies ermöglicht im Immunoblot die Analyse von Proteinen, die an MT gebunden sind. Die Ergebnisse des MT-*Binding*-Assays sind in Abb. 22 dargestellt.

Unter Kontrollbedingungen sind in Neuronen nur HSP90, welches vorwiegend cytosolisch vorkommt, und geringe MT-gebundene Mengen HSP25 zu detektieren. In Astrozyten dagegen kommen unter Kontrollbedingungen HSP90, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin vor. Alle HSPs sind gebunden an die MT,

wobei HSP25 zum Teil auch im Cytosol vorkommt. HSP90 liegt in Astrozyten gleichermaßen MT-gebunden und ungebunden vor. Nach HS kommt es in Neuronen und Astrozyten zur Induktion von HSP70, HSP25 und α B-Crystallin. Dabei liegt HSP70 in beiden Zelltypen zum größten Teil cytosolisch vor, zeigt aber auch eine Assoziation mit MT. HSP25 befindet sich vorwiegend MT-assoziiert, kommt aber zum Teil auch im Cytosol vor. In beiden Zelltypen ausschließlich in der MT-Fraktion zu detektieren ist α B-Crystallin. Nach OS kommt es in Neuronen und Astrozyten zur Induktion von HSP32 und α B-Crystallin. Während beide HSPs in Neuronen ausschließlich MT-gebunden sind, ist HSP32 in Astrozyten zu einem geringen Anteil auch im Cytosol zu detektieren. Die HSP90-Menge nimmt nach OS in Neuronen und Astrozyten ab.

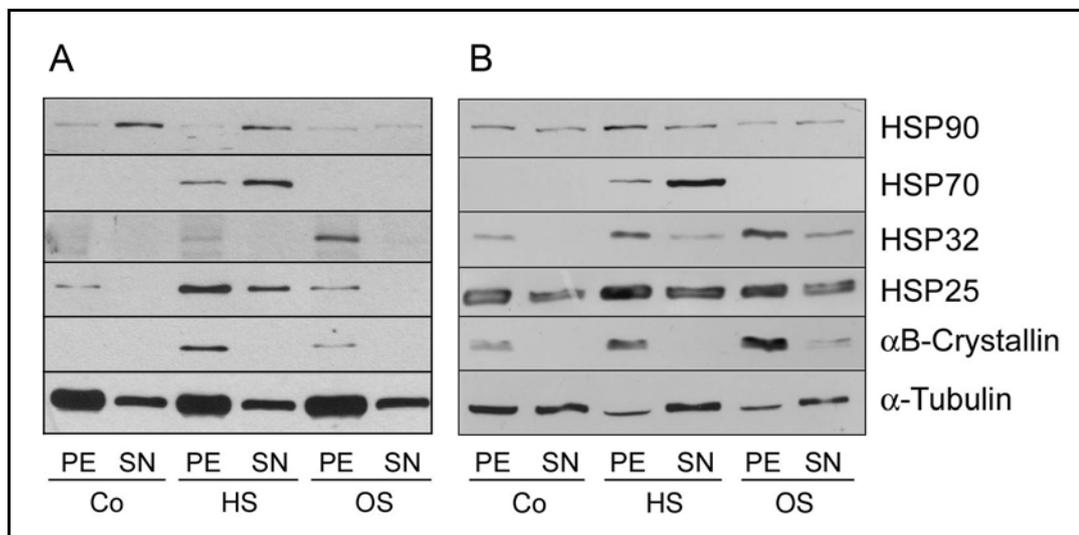


Abb. 22: Analyse des Bindungsverhaltens von HSPs an Mikrotubuli in Neuronen und Astrozyten. Die Zellen wurden behandelt und die Zelllysate in eine cytoskelettale (PE) und in eine lösliche Fraktion (SN) aufgetrennt. Die Zellfraktionen von Neuronen (A) und Astrozyten (B) wurden 24h nach Stress der Immunoblot-Analyse unterzogen. Co: unbehandelte Kontrolle, HS: Hitzestress, OS: oxidativer Stress. n=3

Die Ergebnisse des MT-*Binding*-Assays bestätigen die in Astrozyten mit der indirekten Immunfluoreszenz beobachtete Colokalisation von HSP25 (s. 3.2.4.2). HSP25 ist sowohl nach Stress als auch unter Kontrollbedingungen mit den MT assoziiert. In Neuronen kann nach HS eine Assoziation von HSP25 mit den MT gezeigt werden, die mittels indirekter Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden konnte. Nach Stress zeigt sich, dass die HSPs, die in Astrozyten mit den MT assoziiert sind, auch in Neuronen MT-gebunden sind (s. auch Tab. 5).

Tab. 5: Lokalisation von HSPs in Neuronen und Astrozyten

	ausschließlich MT-gebunden	vorwiegend MT-gebunden	vorwiegend cytosolisch	cytosolisch + MT-gebunden
Beide Zelltypen	α B-Crystallin	HSP25	HSP70	
Neurone	HSP32		HSP90	
Astrozyten		HSP32		HSP90

3.2.5 Reaktion von Neuronen und Astrozyten auf Proteasomen-Inhibition *in vitro*

Nach HS und OS wurde eine weitere Stress-Situation untersucht: Neurone und Astrozyten wurden proteasomalem Stress ausgesetzt. Dabei wurde untersucht, ob nach proteasomalem Stress ähnliche Effekte wie nach Hitzestress und oxidativem Stress zu beobachten sind. Mit dem synthetischen Peptid MG132 (Abb. 23) lassen sich die Proteasomen reversibel inhibieren (Lee und Goldberg, 1998).

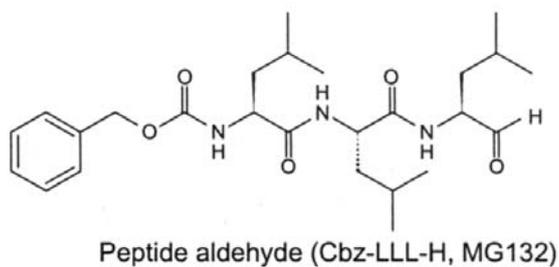


Abb. 23: Struktur des Proteasomen-Inhibitors MG132. MG132 gelangt leicht in die Zelle und blockiert die proteolytische Aktivität des Proteasoms (aus Lee und Goldberg, 1998).

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Proteasomen mit MG132 in der glialen Zelllinie OLN-t40 (Goldbaum et al., 2003) und in kultivierten Oligodendrozyten die Synthese von HSPs induziert (Goldbaum und Richter-Landsberg, 2004).

3.2.5.1 HSP-Induktion nach Inhibierung des proteasomalen Apparats in Neuronen und Astrozyten

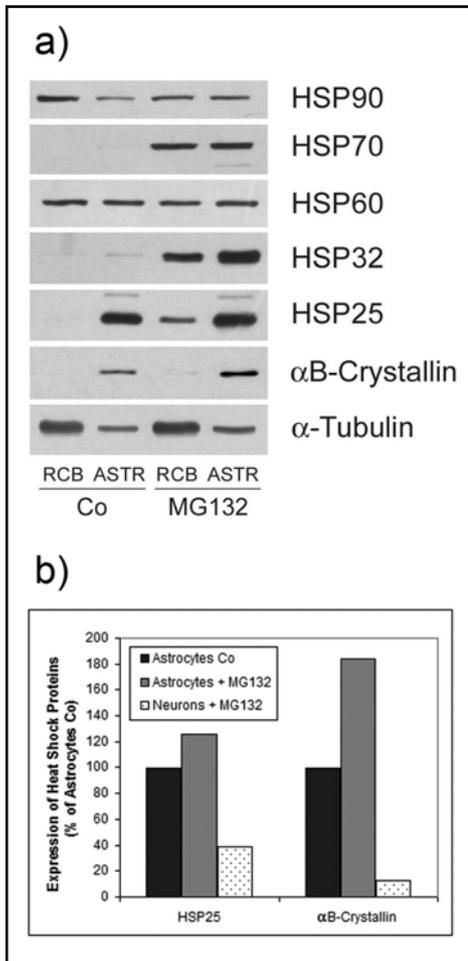


Abb. 24: Einfluss von MG132 auf die HSP-Induktion in Neuronen und Astrozyten.

Neuronen (RCB) und Astrozyten (ASTR) wurden mit 1 μ M MG132 behandelt und 24h später Zellextrakte präpariert. a) Immunoblot-Analyse. b) Quantitative Auswertung einer exemplarischen Immunoblot-Analyse von sHSPs. Die Proteinmengen wurden auf die Astrozyten Kontrolle bezogen. Co: unbehandelte Kontrolle.

Abbildung 24 zeigt, dass Inhibition des proteasomalen Apparats sowohl in Astrozyten wie auch in Neuronen zur Induktion von HSPs führt. Die durch HS und OS induzierbaren HSPs HSP70, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin wurden mit MG132 induziert. Interessanterweise ist dieser Effekt in Astrozyten ausgeprägter als in Neuronen. In beiden Zelltypen ist HSP32 nach Behandlung mit MG132 stark induziert. Im Gegensatz dazu ist die Induktion von HSP32

in Neuronen und Astrozyten nach OS nicht so stark ausgeprägt und nach HS konnte gar keine Induktion beobachtet werden (Abb. 15). Nach Behandlung mit MG132 wird auch HSP90 in beiden Zelltypen leicht induziert. Die in dem dargestellten Versuch vergleichsweise hohe Menge an HSP90 in Neuronen unter Kontrollbedingungen konnte sonst nicht detektiert werden (vgl. Abb. 28). In weiteren Versuchen zeigte sich zwischen Neuronen und Astrozyten unter Kontrollbedingungen kein Unterschied der HSP90-Menge. Die Menge an HSP60 bleibt durch proteasomalen Stress wie auch durch HS und OS in beiden Zelltypen unbeeinflusst.

In Abb. 24b ist zu sehen, dass Astrozyten bereits unter konstitutiven Bedingungen die 2,5-fache Menge an HSP25 exprimieren die Neurone nach Induktion aufweisen. Die konstitutive Menge von α B-Crystallin ist in Astrozyten sogar neunmal so hoch wie die in Neuronen nach Induktion.

Die quantitative Analyse zeigt, dass der konstitutive Level der sHSPs in Astrozyten bedeutend höher als in Neuronen ist. Die Ergebnisse zeigen, dass proteasomaler Stress alle HSPs induziert, die in Neuronen und Astrozyten auch durch HS oder OS induziert werden.

3.2.5.2 HSP-Genexpression in Neuronen und Astrozyten nach Inhibierung des proteasomalen Apparats

Um die Genexpression von HSPs in Neuronen und Astrozyten zu untersuchen, wurde 3 und 7h nach Behandlung mit MG132 die RNA isoliert und mit Hilfe der *Reversen Transkriptase* zu cDNA umgeschrieben. Nach Amplifikation mit spezifischen Primern wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 25). Die Auswertung der RT-PCR-Analyse erfolgte in Relation zu GAPDH (Abb. 26). Durch Hemmung des proteasomalen Apparats in Neuronen und in Astrozyten nimmt auch die mRNA verschiedener HSPs zu. Dabei kommt es in Neuronen nach 3h zur gesteigerten Expression von HSP70, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin, welche 7h nach Stress noch weiter zunimmt. Die HSP-mRNA ist in Astrozyten bereits 3h nach Stress auf dem höchsten Niveau. Neurone besitzen konstitutiv kaum HSP25-mRNA, aber einen Grundlevel von α B-Crystallin, während in Astrozyten die mRNA beider sHSPs in großen Mengen vorhanden ist. Nach Stress nimmt die mRNA beider sHSPs in beiden Zelltypen nur wenig zu (Abb. 26). Nach proteasomalem Stress kommt es in beiden Zelltypen auch zur verstärkten Synthese der HSP90-mRNA. Die Induktion von HSPs geht in beiden Zelltypen mit einer gesteigerten Synthese ihrer mRNA einher. Wiederum ist zu erkennen, dass Neurone auch konstitutiv die mRNA der HSPs exprimieren, welche als Protein nur induzierbar sind (vgl. 3.2.3).

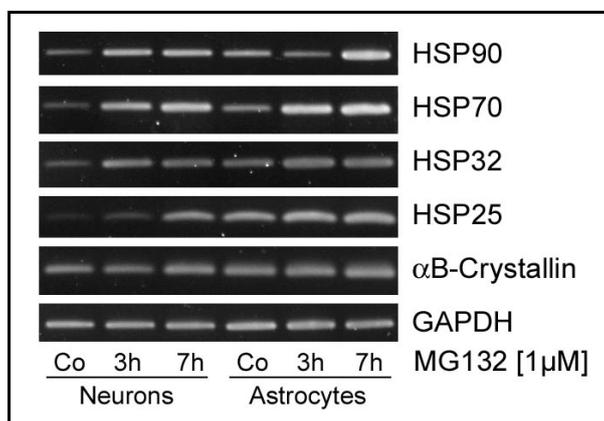


Abb. 25: Einfluss von MG132 auf HSP-mRNA. Neuronen- und Astrozyten-Kulturen wurden mit 1 μ M MG132 behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die RNA wurde mit dem RNeasy[®] Mini Kit extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR-Produkte sind rechts angegeben. Co: unbehandelte Kontrollen.

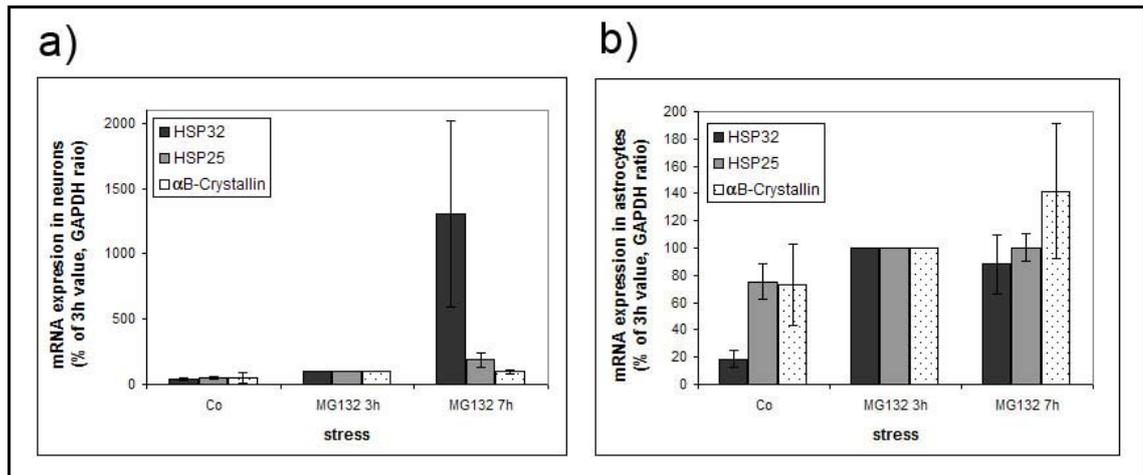


Abb. 26: Quantitative Auswertung der RT-PCR-Analyse (Ergebnisse aus Abb. 25). Durch densitometrische Auswertung der Amplikons und Normalisierung mit der dazugehörigen GAPDH-Kontrolle wurden die Expressionslevel der mRNAs bestimmt. Die Mittelwerte aus drei Versuchen wurden in Prozent zu den Werten von MG132 3h angegeben, welche gleich 100% gesetzt wurden. a) Neurone, b) Astrozyten Co: unbehandelte Kontrolle. n=3

3.2.5.3 Mikrotubuli-Verteilung in Neuronen und Astrozyten nach Proteasomen-Inhibition

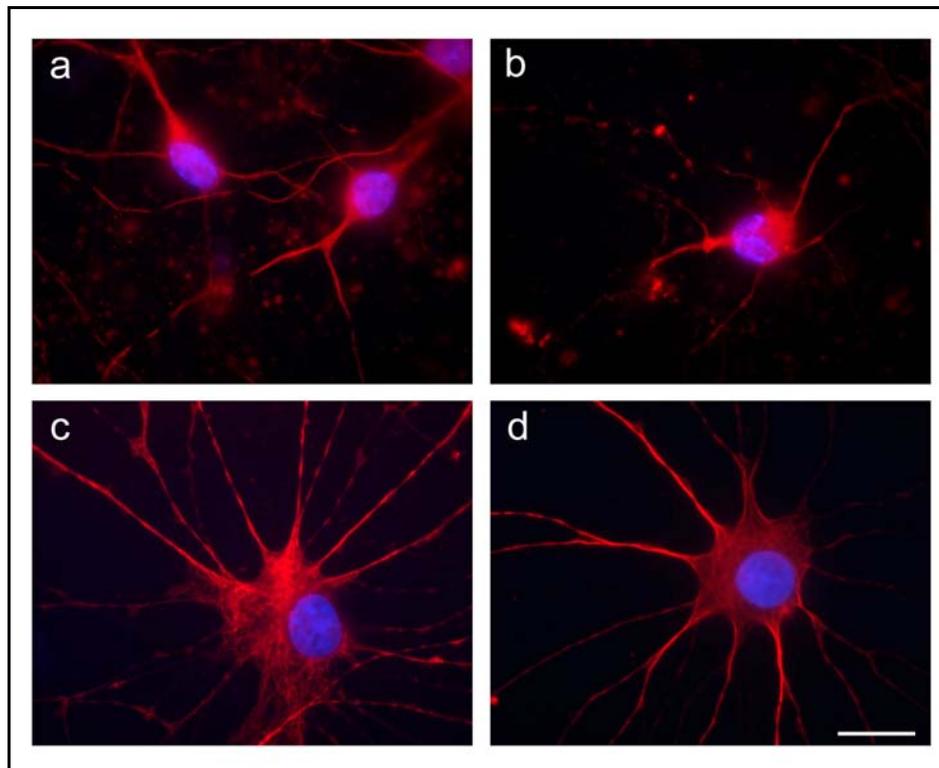


Abb. 27: Darstellung der Mikrotubuli von kultivierten Neuronen und Astrozyten nach Proteasomen-Stress. Neurone (a, b) und Astrozyten (c, d) wurden mit 1 μ M MG132 behandelt (b, d) und nach 24h der Methode der indirekten Immunfluoreszenz unterzogen. Die Markierung der Mikrotubuli erfolgte mit anti- α -Tubulin (rot), die Kerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Balken = 20 μ m. a, c: unbehandelte Kontrollen.

Die Verteilung der MT in kultivierten Neuronen und Astrozyten nach Behandlung mit MG132 wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. In Neuronen führt die Inhibierung von Proteasomen mit MG132 zu starken Schädigungen der Mikrotubuli (Abb. 27b). Es kommt zur Desorganisation des MT-Netzwerks. Die Fortsätze sind zum Teil fragmentiert und viele Zelltrümmer sind zu sehen. Außerdem sind pyknotische Kerne zu beobachten. Astrozyten reagieren auf die gleichen aversiven Einflüsse weniger empfindlich (Abb. 27d). Zwar kommt es in einigen Zellen auch zu einer Umorganisation des Tubulin-Netzwerks, die Gestalt der Zelle wird dabei jedoch größtenteils beibehalten.

Neurone reagieren auch unter dem Einfluss von proteasomalem Stress deutlich empfindlicher als Astrozyten.

3.2.5.4 Bindungsverhalten von HSPs an Mikrotubuli nach Behandlung mit MG132

Neurone und Astrozyten wurden mit MG132 behandelt und MT wurden wie zuvor beschrieben (s. 3.2.4.3) isoliert. In der Immunoblot-Analyse wurde das Vorkommen verschiedener HSPs untersucht (Abb. 28).

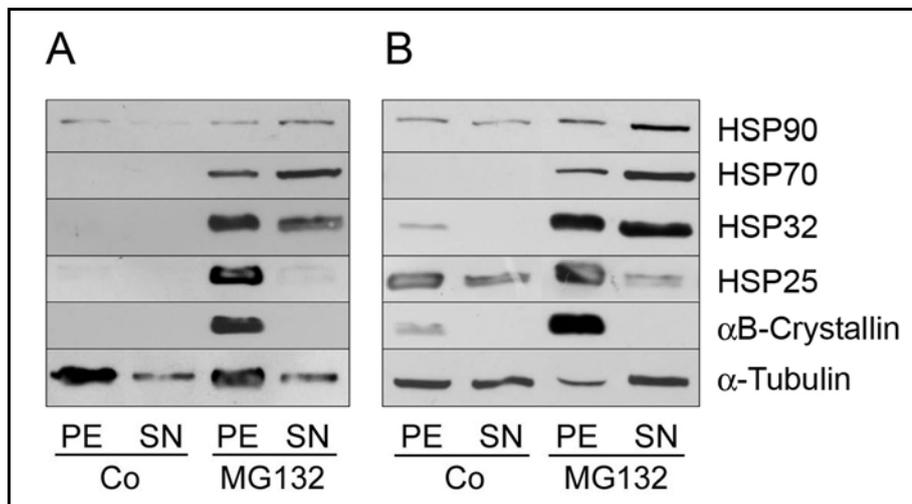


Abb. 28: Analyse des Bindungsverhaltens von HSPs an Mikrotubuli nach proteasomalem Stress. Die Zellen wurden 24h nach Stress mit der Methode des MT-Binding-Assays in eine Fraktion löslicher Proteine (SN) und eine Fraktion MT-gebundener Proteine unterteilt (PE). Im Immunoblot wurden die immunreaktiven Banden in Neuronen (A) und Astrozyten (B) mit den rechts angegebenen Antikörpern detektiert. Co: unbehandelte Kontrolle. n=2

Abbildung 28 zeigt, dass HSP70, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin in Neuronen nicht konstitutiv vorkommen. In Astrozyten kommen unter Kontrollbedingungen HSP90 und HSP25 sowohl gebunden an MT wie auch cytosolisch vor. HSP32 und α B-Crystallin sind ausschließlich MT-gebunden.

Nach proteasomaler Inhibition lässt sich auch in Neuronen eine Assoziation von HSPs mit den MT beobachten. Nach Behandlung mit MG132 liegen HSP70, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin in Neuronen und Astrozyten MT-gebunden vor, wobei HSP70 größtenteils cytosolisch ist. Während α B-Crystallin in beiden Zelltypen ausschließlich mit den MT assoziiert vorkommt, ist HSP25 auch im Cytosol zu detektieren. In Neuronen ist der cytosolische Anteil von HSP25 sehr gering (Abb. 28A). In Astrozyten ist dieser Anteil zwar höher, HSP25 ist jedoch hauptsächlich MT-gebunden (Abb. 28B). Die Induktion von HSP32 ist in beiden Zelltypen nach Behandlung mit MG132 stärker als nach OS (vgl. auch Abb. 15 u. Abb. 24). HSP32 kommt etwa zu gleichen Teilen im Cytosol und gebunden an die MT vor. Dagegen ist HSP32 nach OS in Neuronen im Cytosol nicht zu detektieren und in Astrozyten nur zu einem geringen Teil (Abb. 22).

Im Gegensatz zu HS und OS kommt es nach Behandlung mit MG132 in beiden Zelltypen zu einer schwachen Induktion von HSP90. Während HSP90 unter Kontrollbedingungen zu gleichen Teilen cytosolisch und MT-gebunden vorliegt, ist nach Stress die Menge im Cytosol größer.

In beiden Zelltypen assoziieren nach proteasomalem Stress alle untersuchten HSPs mit den MT, dies ist besonders deutlich bei HSP32, HSP25 und α B-Crystallin.

3.3 Einfluss von Stress auf Zelltod

Um zu analysieren, ob der unter Einfluss von Stress beobachtete neuronale Zelltod apoptotisch oder nekrotisch ist, wurde die Fragmentation der DNA überprüft. Der apoptotische Zelltod ist u.a. durch eine Fragmentation der genomischen DNA in Fragmente von ~180bp und deren Vielfache charakterisiert. Eine DNA-Fragmentation lässt sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Gesamt-DNA überprüfen.

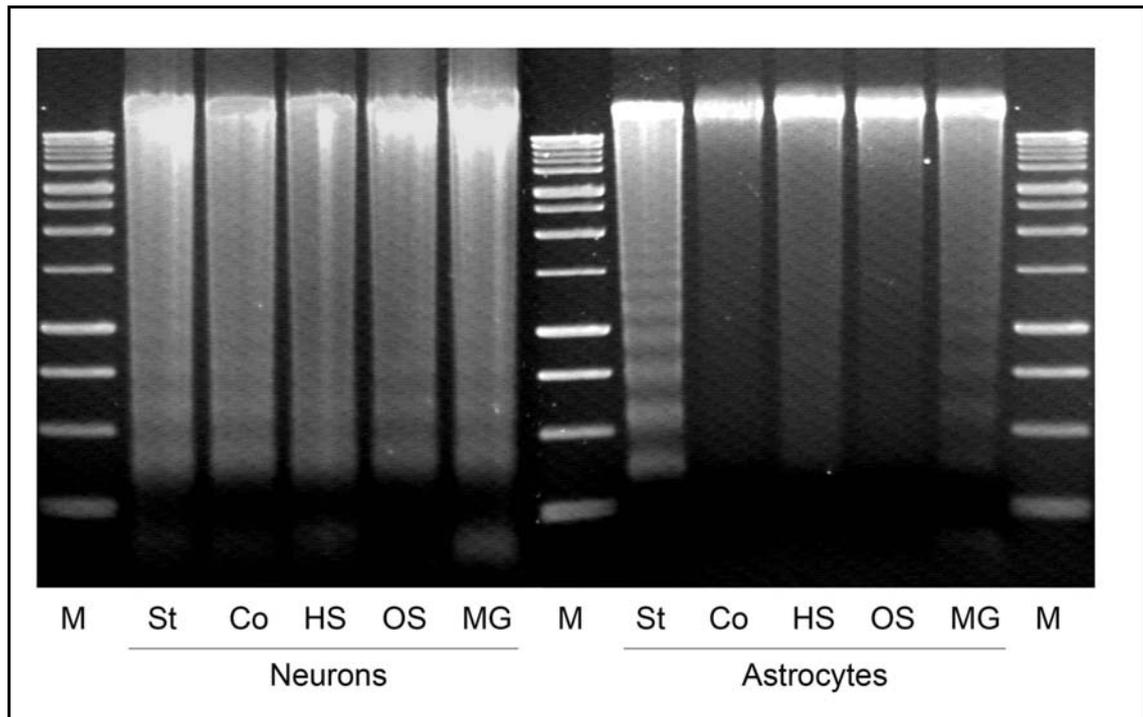


Abb. 31: Detektion einer DNA-Leiter zum Nachweis des apoptotischen Zelltods in Neuronen und Astrozyten. Neurone und Astrozyten wurden mit HS (44°C), OS (50µM) oder MG132 (MG, 1µM) behandelt. Nach 24h Erholung wurde die DNA isoliert, in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und am Geldokumentationsgerät aufgenommen. St: Staurosporin, Co: unbehandelte Kontrolle, M: Marker. n=4

Die Zellen wurden mit HS (44°C), OS (50µM) oder MG132 (1µM) behandelt. Nach einer Erholung von 24h wurden die Zellen lysiert und die DNA isoliert. Es wurden jeweils 4µg DNA elektrophoretisch untersucht. Als Positivkontrolle dienten mit Staurosporin (250nM) behandelte Neurone bzw. Astrozyten.

Neurone sterben bereits unter normalen Kulturbedingungen apoptotisch (siehe Abb. 31), einhergehend mit einer Fragmentierung der DNA. Nach Behandlung mit MG132 und Staurosporin wird der apoptotische Zelltod ausgelöst, wie an der, im Vergleich zur Kontrollbedingung, deutlicheren DNA-Leiter zu sehen. Nach HS und OS nimmt die Fragmentierung der DNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht zu. Auch in Astrozyten lösen HS und OS keinen apoptotischen Zelltod aus. Nach Behandlung mit MG132 kommt es dagegen zu einer schwachen DNA-Leiter, welche aber nicht so stark ist wie nach Behandlung mit Staurosporin.

Im Gegensatz zu Astrozyten sind Neurone so empfindlich, dass viele Zellen bereits bei normalen Bedingungen apoptotisch sterben. In Astrozyten-Kulturen stirbt selbst unter Stress-Situationen nur ein geringer Teil der Zellen apoptotisch.

3.4 Zellulärer Stress durch Eingriff in die Hirnentwicklung

Es wurden in dieser Arbeit zwei Modelle getestet, welche vermutlich eine Rolle bei Störungen der Hirnentwicklung spielen. Zum einen wurde das chemische Agens Ethanol verwendet, welches zellulären Stress erzeugt. In weiteren Untersuchungen wurde die Proteinsynthese von Reelin unterdrückt. Eine verminderte Expression von Reelin trägt vermutlich zu Hirnentwicklungsstörungen bei und könnte an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sein. Da ein Eingriff in die Hirnentwicklung auch eine Stress-Situation darstellt, wurden Stressproteine als Marker für zellulären Stress untersucht.

3.4.1 Einfluss der Unterdrückung von Reelin

Es wurde *in vitro* an Neuronen-Kulturen und *in vivo* an Ratten untersucht, welchen Einfluss eine verminderte Expression von Reelin auf die Entwicklung hat. Hierbei handelte es sich um eine Zusammenarbeit mit der AG Neuropharmakologie (Prof. M. Koch) der Universität Bremen. An der Universität Bremen sollte die Expression von Reelin im präfrontalen Cortex (PFC) von Ratten durch Mikroinjektion von Antisense-Oligonucleotiden (AS-ODNs) unterdrückt werden. An der Universität Oldenburg wurden Zellkulturversuche durchgeführt und die biochemische Analyse der *in vivo* und *in vitro* Versuche.

Die Folgen von AS-ODNs sollten in folgenden Versuchen ermittelt werden:

- a) Verhaltensversuche und Histologie
- b) biochemische Analyse des PFC
- c) *in vitro* Versuche an Neuronen-Kulturen zur
 - 1) Wirksamkeit der AS-ODNs
 - 2) Auswirkung der AS-ODNs auf die Neuronenentwicklung *in vitro*

3.4.1.1 Vorkommen von Reelin in kultivierten Neuronen

Untersuchungen an Neuronen-Kulturen sollten zum Verständnis der Funktion von Reelin beitragen.

Der verwendete Reelin-Antikörper bindet nahe des N-terminalen Endes und erkennt somit sowohl das Gesamtprotein, als auch die 180kDa- und 320kDa-Spaltprodukte. In den Zellen ist vor allem das etwa 400kDa Gesamtprotein (Main protein) zu detektieren (Abb. 32a). Die schwache Bande bei etwa

180kDa repräsentiert eines der Spaltprodukte (Cleavage product). Die Immunfluoreszenz-Darstellung zeigt das Vorkommen von Reelin an der Oberfläche von Neuronen (Abb. 32b). Die Zellen wurden nach der Fixierung nicht permeabilisiert, weshalb nur rezeptorgebundenes Reelin detektiert werden kann. Reelin ist punktförmig in kleineren Clustern auf der Zelloberfläche von Neuronen mit unterschiedlicher Morphologie zu identifizieren.

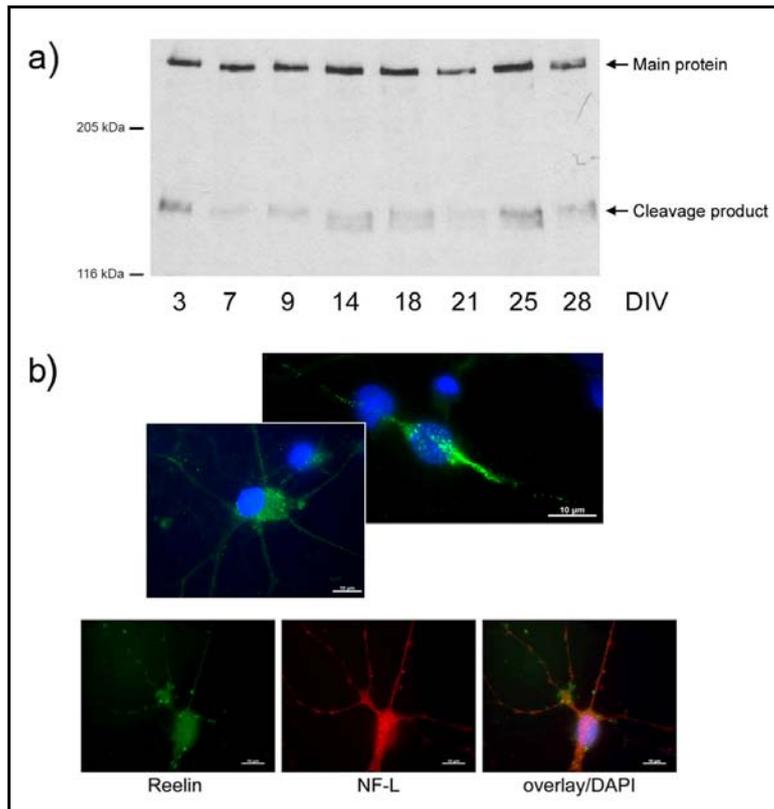


Abb. 32: Charakterisierung von Reelin in Neuronen-Kulturen. a) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte der neuronalen Primärkultur im Immunoblot auf das Vorkommen von Reelin untersucht. b) Für die Immunfluoreszenz-Darstellung wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, aber nicht permeabilisiert. Die Detektion erfolgte mit monoclonalem anti-Reelin (Clone G10, Calbiochem) (grün) und polyclonalem anti-NF-L (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI dargestellt (blau). Balken = 10µm.

Um zu analysieren, ob Stress einen Einfluss auf das Vorkommen von Reelin hat, wurden Neuronen-Kulturen einem OS oder HS ausgesetzt. Nach OS lässt sich eine Zunahme der 180kDa-Spaltprodukte beobachten (Abb. 33). HS scheint keinen Einfluss auf die verschiedenen Formen von Reelin zu haben. Abbildung 33 zeigt zudem die schon zuvor beschriebene (siehe auch Abb. 15) stress-spezifische Induktion von HSPs.

Während Reelin unter Kontrollbedingung innerhalb der Zellen hauptsächlich als Gesamtprotein vorkommt und nur wenig des 180kDa-Spaltprodukts, scheint OS die intrazelluläre Spaltung von Reelin zu fördern.

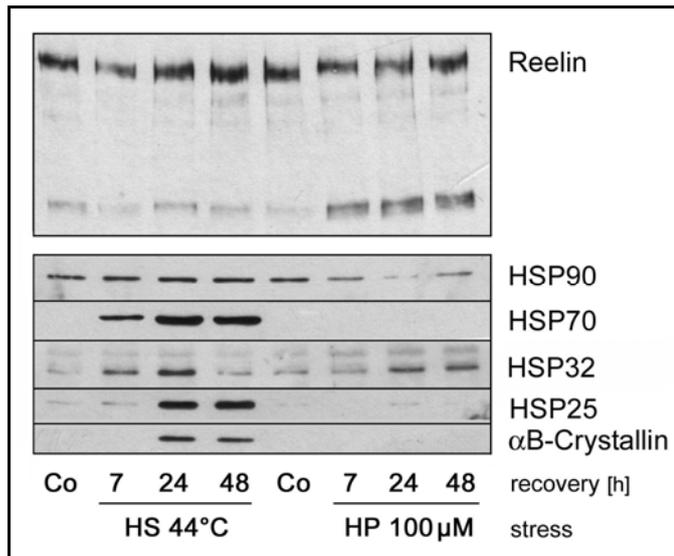


Abb. 33: Untersuchung zum Einfluss von Stress auf die Expression von Reelin. Neuronen-Kulturen wurden einem HS (44°C) oder einem OS (HP, 100µM) ausgesetzt. Zu den angegebenen Erholungszeiten wurden Zell-extrakte hergestellt und eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. n=1

3.4.1.2 Unterdrückung der Synthese von Reelin mit Antisense-Oligonucleotiden *in vitro*

Mit Hilfe der Antisense-Technik sollte eine Minderexpression des Reelin-Proteins *in vitro* und *in vivo* ausgelöst werden, um Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung von Reelin zu gewinnen. AS-ODNs binden an eine spezifische mRNA-Sequenz und inhibieren somit die Translation der Zielproteine (Summerton und Weller, 1997).

Als Vorbereitung für die späteren *in vivo* Versuche wurden zunächst in Neuronen-Kulturen die Versuchsbedingungen ermittelt. Dazu gehörte die Bestimmung einer geeigneten Sequenz der AS-ODNs. Es wurden drei Sequenzen getestet: Ree1 und ree2 wurden von *BIOGNOSTIK* erstellt. Die Sequenz ree3 ist bereits publiziert (Lacor et al., 2000), es besteht jedoch keine 100%ige Komplementarität zur mRNA der Ratte (*rattus norvegicus*), da die Sequenz für die mRNA der Maus (*mus musculus*) erstellt wurde.

Die Effektivität der AS-ODNs hängt entscheidend von geeigneten Zielstrukturen in der mRNA ab. Die in diesen Versuchen verwendeten Sequenzen wurden von *BIOGNOSTIK* mit spezieller Software entwickelt. Versprochen wird eine optimale selektive Bindung an die Ziel- („target“)-mRNA, während unspezifische Bindungen an andere mRNAs oder Proteine minimiert sind. Um unspezifische oder toxische Nebenwirkungen auszuschließen sind die AS-ODNs durch eine Prozedur in sechs Schritten gereinigt worden. Eine Modifikation der Phosphatgruppen mit Schwefel gibt den ODNs einen Schutz vor der

Degradation durch Nucleasen (sog. Phosphorothioat-Oligonucleotid; Abb. 34) (Hoke et al., 1991).

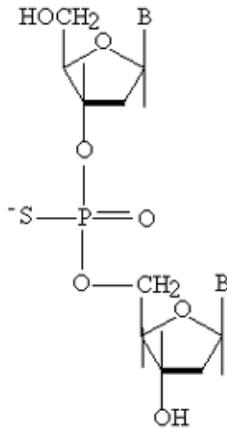


Abb. 34: Phosphorothioat-Oligonucleotid. Ein Sauerstoffatom der Phosphatgruppe ist durch ein Schwefelatom ausgetauscht.

Mit FITC-markierten ODNs wurde zunächst sichergestellt, dass die AS-ODNs von den Zellen aufgenommen werden. Die negativ geladenen ODNs werden durch aktive Transportprozesse aufgenommen. In der Zelle werden die ODNs zunächst in Endosomen eingeschlossen, aber stetig ins Cytoplasma freigelassen, wo sie an die mRNA binden können. Die Inkubation der Neuronen-Kulturen mit 2µM FITC-ODNs zeigt, dass sich die Nucleotide innerhalb von 48h in der Zelle anreichern (Abb. 35).

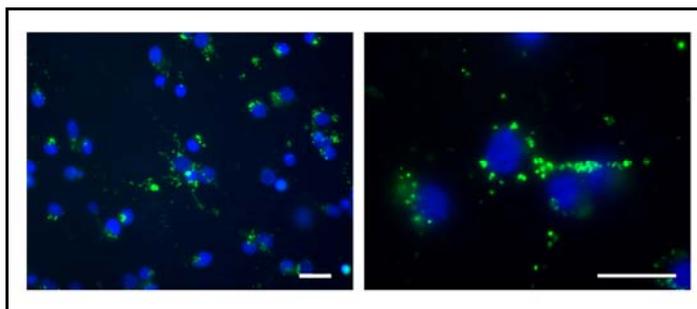


Abb. 35: AS-ODN Uptake-Kontrolle. Kultivierte Neurone erhielten 2µM FITC-markierte ODNs (grün). Nach 48h Inkubation wurden die Zellen fixiert und im Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Kernfärbung mit DAPI (blau). Balken = 20µM

Im Vorversuch zur Auswahl der Antisense-Sequenz wurden 8µM der AS-ODN-Lösung in das Medium der Neuronen-Kultur (3 DIV) gegeben. Nach 48h erfolgte eine erneute Gabe. Weitere 48h später wurden das Medium und der Zellrasen für die Immunoblot-Analyse vorbereitet. Das Medium wurde dazu über Filterzentrifugationseinheiten aufkonzentriert, so dass die im Medium vorkommenden Proteine analysiert werden konnten. Das Konzentrat und die Zellen wurden in 1xSB lysiert und der Immunoblot-Analyse unterzogen.

Abbildung 36a zeigt den deutlichen Rückgang des Reelin-Proteins im Medium nach Behandlung mit den verschiedenen AS-ODNs. Der Anteil des im Medium vorherrschenden 180kDa-Spaltprodukts geht zurück. Die unspezifischen *scrambled* (*scr*) Sequenzen scheinen einen Einfluss auf die sekretorischen Produkte zu haben. So ist eine Verminderung des 180kDa-Spaltprodukts und eine gleichzeitige Zunahme des hochmolekularen Gesamtproteins zu beobachten, die Gesamtmenge von Reelin im Medium bleibt jedoch gleich. Daneben nimmt nach Behandlung mit ODNs das intrazelluläre Gesamtprotein zu (Abb. 36b). Tubulin und Synaptophysin verändern sich unter diesen Bedingungen nicht.

Die getesteten AS-ODNs sind unter den gewählten Versuchsbedingungen wirksam darin, die Menge von sekretiertem Reelin zu reduzieren. Das intrazelluläre Protein wird jedoch durch keine der Sequenzen unterdrückt. Alle drei Sequenzen haben einen Effekt auf die Synthese von Reelin. In den weiteren Versuchen wurde mit *ree1* gearbeitet, da diese Sequenz Reelin am deutlichsten unterdrückt.

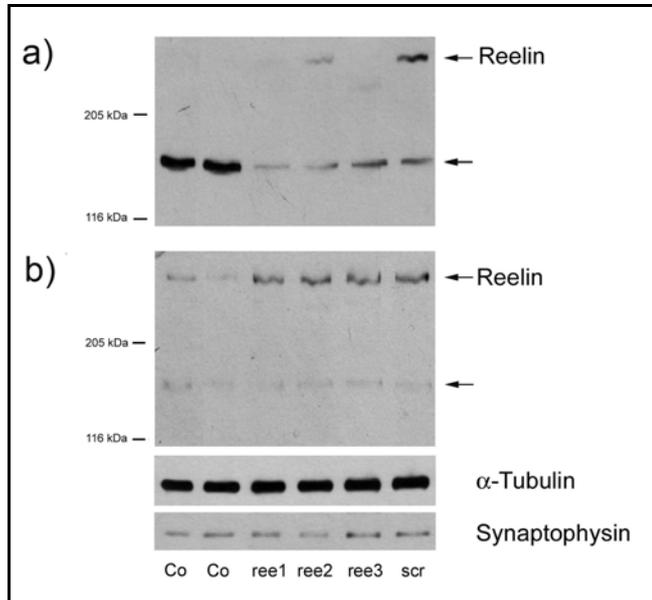


Abb. 36: Auswahl einer geeigneten AS-Sequenz für die Inhibierung der Translation von Reelin. In Neuronen-Kulturen wurde die effizienteste Sequenz evaluiert. Die Kulturen erhielten nach 3 DIV und 5 DIV 8 μ M AS- oder scr-ODNs. Nach 96h wurde für die Immunoblot-Analyse das Medium konzentriert (a) und die Zellen (b) präpariert. Es standen drei unterschiedliche Sequenzen zur Auswahl (*ree1-3*). In den folgenden Versuchen wurde die Sequenz *ree1* verwendet. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen (Co) und ein Versuchsansatz mit unspezifischer (*scrambled*) Sequenz (*scr*).

Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde *in vitro* mit der Sequenz *ree1* zudem der Einfluss auf dendritische und axonale Proteine untersucht und morphologische Veränderungen beobachtet (Abb. 37). Die Behandlung wurde an noch nicht voll ausdifferenzierten Neuronen-Kulturen durchgeführt. So sollte es möglich sein, einen eventuellen Einfluss der Unterdrückung von Reelin auf die Entwicklung zu untersuchen. Der Beginn der Behandlung entspricht *in vivo* dem Zeitpunkt der Geburt, da Ratten eine Tragezeit von 21 Tagen haben.

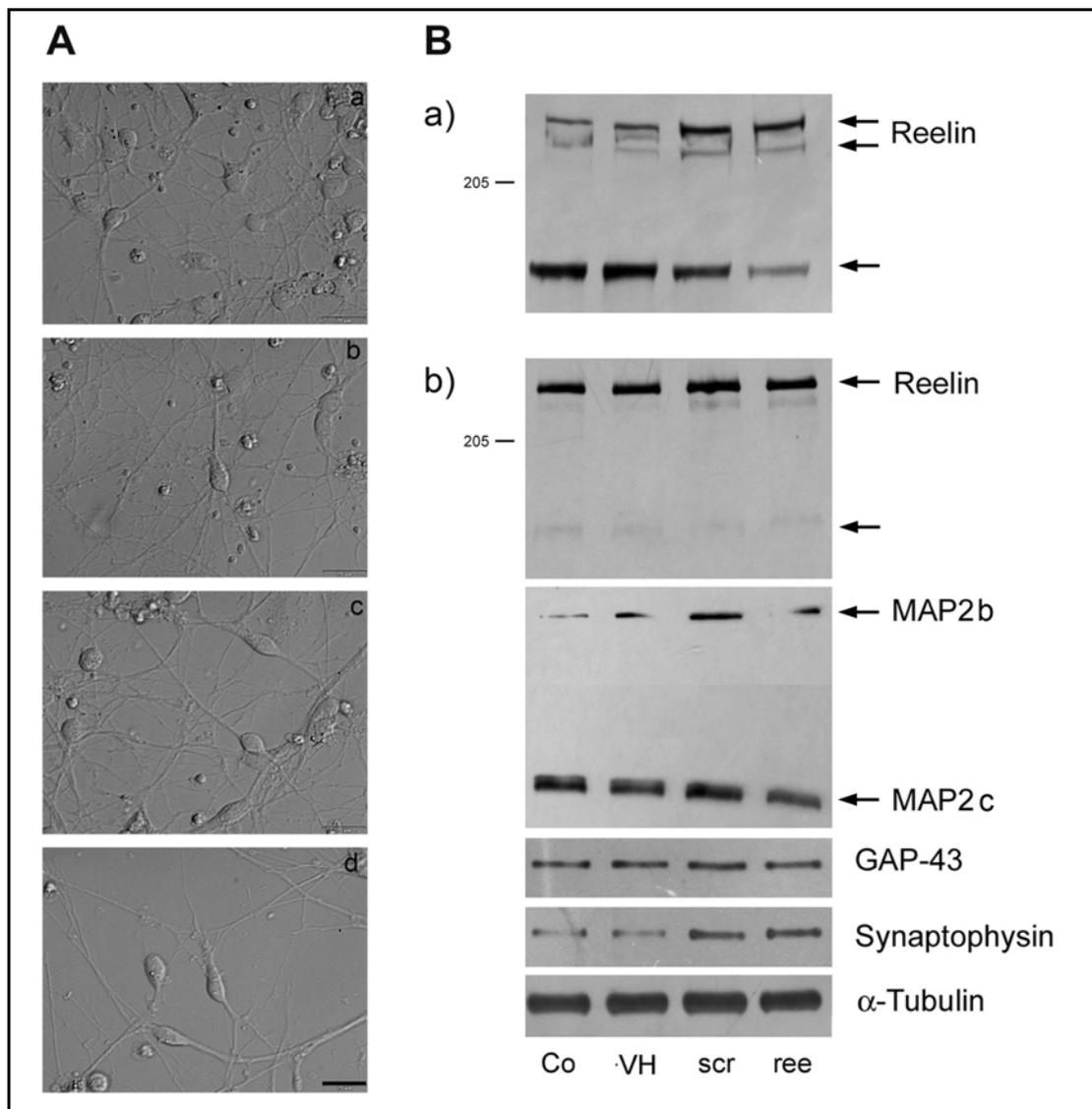


Abb. 37: Effekte von Reelin-AS auf kultivierte Neurone. Kultivierte Neurone erhielten 6 μ M der AS-ODN-Lösung (*ree*) oder einer Kontrollsequenz (*scr*). Die Behandlung wurde nach 48h wiederholt. B: 96h nach der ersten Gabe wurden die Proben für die Immunoblot-Analyse präpariert. Das Medium (a) wurde aufkonzentriert, die Zellen (b) geerntet und beide Fraktionen in Probenpuffer aufgenommen; Co: unbehandelte Kontrolle, VH: Vehicle, *scr*: *scrambled*-Sequenz, *ree*: AS-Sequenz. A: Im Hoffman-Modulationskontrast-Mikroskop wurde zuvor die Morphologie der Zellen dokumentiert; a: Co, b: VH, c: *scr*, d: *ree*; Balken = 20 μ m. n=3

Die Immunoblot-Analyse in Abb. 37B zeigt, dass die Behandlung mit AS-ODNs (ree) im Medium von Neuronen-Kulturen zu einer Verminderung der 180kDa-Form von Reelin führt. Dagegen bleibt die Menge des intrazellulären Proteins gleich. Während die axonalen bzw. synaptischen Marker GAP-43 und Synaptophysin unbeeinflusst bleiben, kann eine minimale Abnahme der Immunreaktivität des dendritischen Proteins MAP2c beobachtet werden. Auch im Hoffman-Modulationskontrast-Mikroskop ist zu beobachten, dass es bei den Neuronen unter AS-Behandlung zur Rückbildung sekundärer Fortsätze, vermutlich der Dendriten, kommt (Abb. 37A). Die ursprünglich weite Verzweigung der neuronalen Fortsätze geht verloren, es bilden sich Faszikel. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse ist jedoch in AS-behandelten Zellen kein Unterschied der Menge oder Verteilung von MAP2 im Vergleich zu den Kontrollen zu erkennen (Abb. 38). Mit dieser Methode kann jedoch nicht, wie in der Immunoblot-Analyse, zwischen den einzelnen Isoformen unterschieden werden. Da MAP2c nur in Dendriten vorkommt, die sich noch differenzieren und nicht in ausdifferenzierten Neuronen (Binder et al., 1986), kommt es in diesem Versuch vermutlich zur Rückbildung unreifer Dendriten. MAP2b, welches sowohl postnatal wie auch adult vorhanden ist, bleibt unverändert.

Stressproteine werden durch die Behandlung nicht induziert (nicht gezeigt).

Die *in vitro* durch anti-Reelin AS-ODNs erzielte Verringerung des extrazellulären 180kDa-Spaltprodukts, geht einher mit morphologischen Veränderungen der neuronalen Fortsätze. Dies deutet darauf hin, dass das sekretierte Reelin-Spaltprodukt einen Einfluss auf die Plastizität von Neuriten haben könnte.

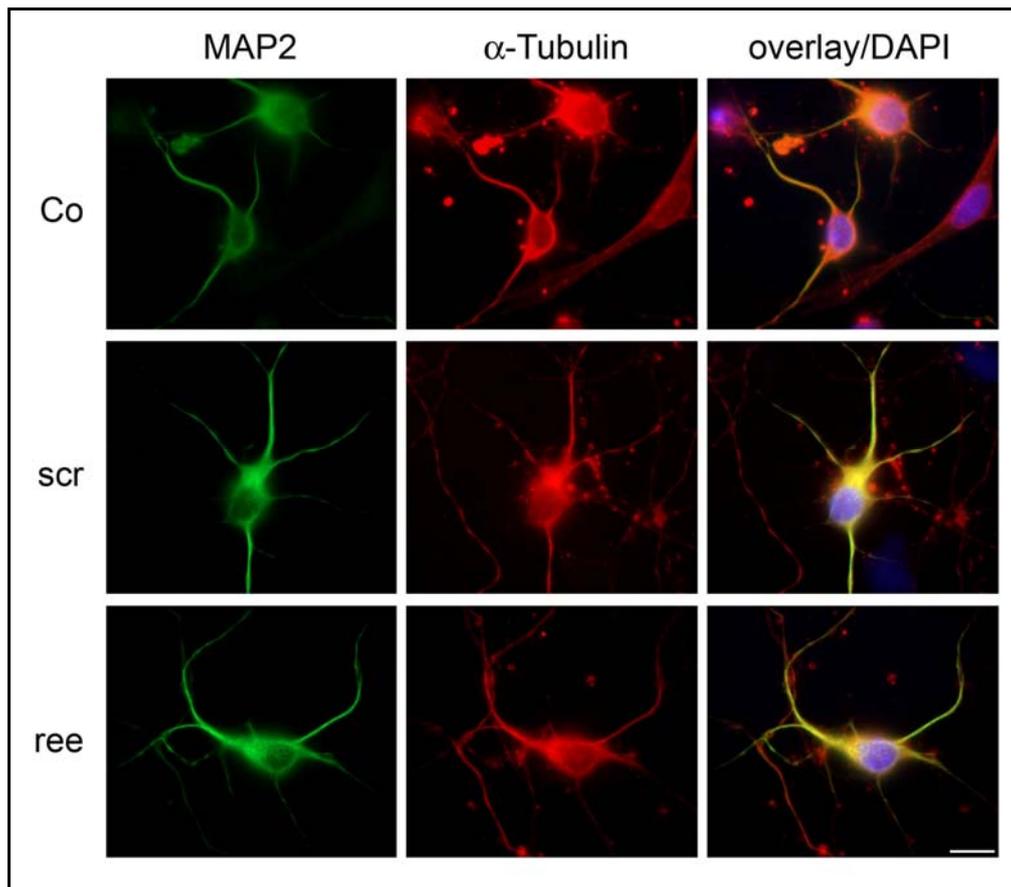


Abb. 38: Immunfluoreszenz-Darstellung von AS-behandelten Neuronen. Neuronen-Kulturen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und eine indirekte Immunfluoreszenzmarkierung mit monoclonalem anti-MAP2 (grün) und polyclonalem anti- α -Tubulin (rot) durchgeführt. Kernfärbung mit DAPI (blau). Co: unbehandelte Kontrolle, scr: *scrambled*-Kontrollen, ree: AS-ODNs. Balken = 20 μ m. n=1

3.4.1.3 Unterdrückung der Reelin-Synthese mit Antisense-Oligonucleotiden *in vivo*

Ratten erhielten Mikroinjektionen von AS-ODNs in den PFC einer Hemisphäre. Die andere Hemisphäre blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. An adulten Tieren wurden folgende Versuchsbedingungen getestet:

- a) 1 Injektion von 0,1nM: 1 Tier
- b) 1 Injektion von 0,2nM: 3 Tiere
- c) 1 Injektion von 1nM: 2 Tiere
- d) 6 Injektionen von 0,1nM: 1 Tier

Nach 12h wurden die PFCs beider Hemisphären nach Dekapitation der Tiere herausgenommen und für die Immunoblot-Analyse in Probenpuffer homogenisiert.

Abbildung 40 zeigt, dass durch die Behandlung mit 0,2nM AS-ODNs ein Effekt auf Reelin erzielt werden konnte. So kommt es zu einer Verminderung des Gesamtproteins und des 180kDa-Spaltprodukts, und zum Verschwinden des 320kDa-Spaltprodukts. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme der Immunreaktivität von Synaptophysin, MAP2 und MBP im Vergleich zur unbehandelten Hemisphäre. Zugrunde liegt jedoch vermutlich keine Degeneration von Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten, denn die zelltyp-spezifischen Marker NF-L, NF-M, GFAP und CNP bleiben unverändert. Auch GAP-43 und Tau bleiben unbeeinflusst.

Eine Menge von 0,1nM ist nicht ausreichend, um Reelin zu unterdrücken.

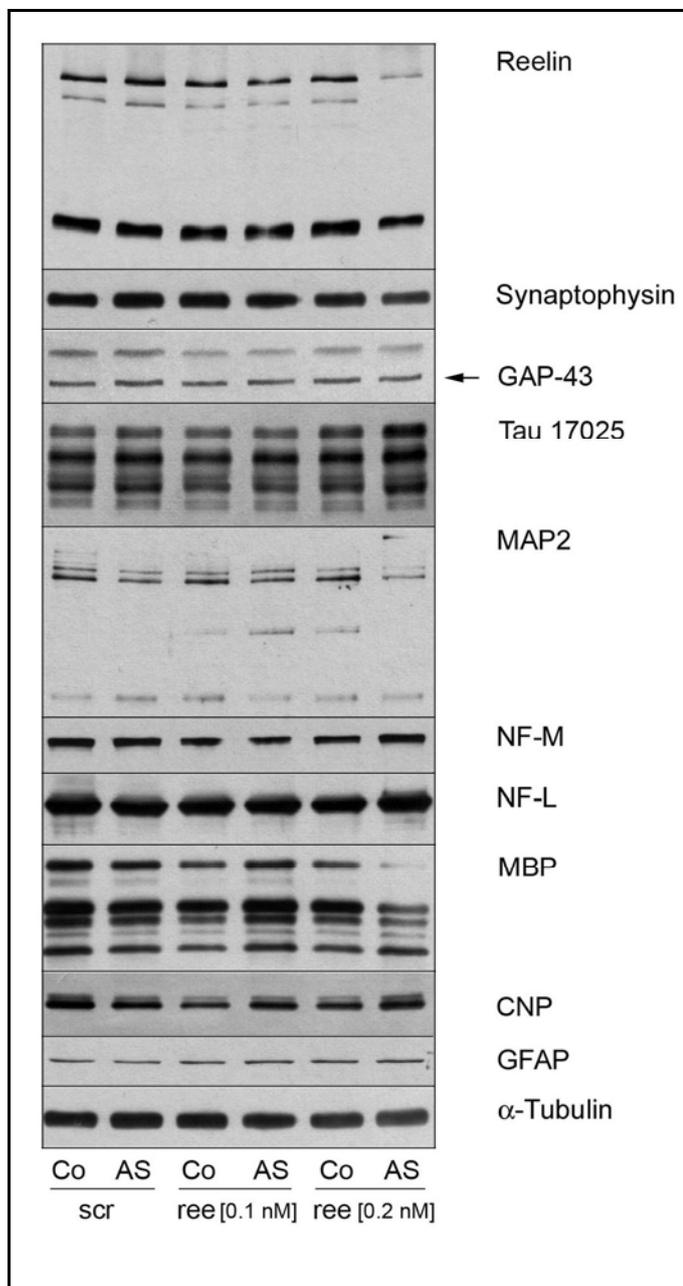


Abb. 40: Effekte von Reelin-AS in vivo. Adulte Ratten erhielten Mikroinjektionen von 0,1 bzw. 0,2nM AS-ODNs in den PFC einer Hemisphäre (AS). Die andere Seite blieb unbehandelt (Co). Nach 12h wurden die PFCs beider Hemisphären herauspräpariert und der Immunoblot-Analyse unterzogen. scr: *scrambled*-Kontrollen, ree: AS-ODNs.

Der in Abb. 40 gezeigte Effekt konnte nicht repliziert werden. Bei zwei weiteren Tieren konnten mit der Behandlung von 0,2nM AS-ODNs unter gleichen Versuchsbedingungen keine Veränderungen der Reelin-Formen gesehen werden (nicht gezeigt). Auch eine Konzentration von 1nM bewirkte nur eine minimale Verminderung des 180kDa-Spaltprodukts, während das Gesamtprotein unverändert blieb (nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment erhielt eine adulte Ratte sechs Mikroinjektionen von 0,1nM AS-ODNs in einem Abstand von jeweils 12h. Zwar konnte Reelin unter diesen Bedingungen fast vollständig unterdrückt werden, die Behandlung führte jedoch zu einer starken Läsion im PFC (nicht gezeigt). Da außerdem die Menge aller anderen untersuchten Proteine reduziert war, auch α -Tubulin, lag hier vermutlich ein toxischer Effekt zugrunde.

Insgesamt wurden sieben adulte Tiere mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen behandelt, aber nur bei einem, mit einer Konzentration von 0,2nM behandelten, Tier war eine Wirkung der AS-ODNs zu beobachten.

Zum Vergleich wurden neonatale Tiere mit 0,2nM AS-ODNs behandelt und das Vorkommen von Reelin nach 12h in histologischen Schnitten untersucht. Abbildung 41 zeigt in Gewebeschnitten der Antisense-behandelten Hemisphäre einen Rückgang der Immunreaktivität von Reelin. In Abb. 41e ist zu sehen, dass die Anzahl Reelin-positiver Zellen im Vergleich zur unbehandelten Hemisphäre (Abb. 41f) abnimmt. Dass dies nicht auf den Verlust von Zellen zurückzuführen ist, zeigt die Nissl-Färbung (Abb. 41a).

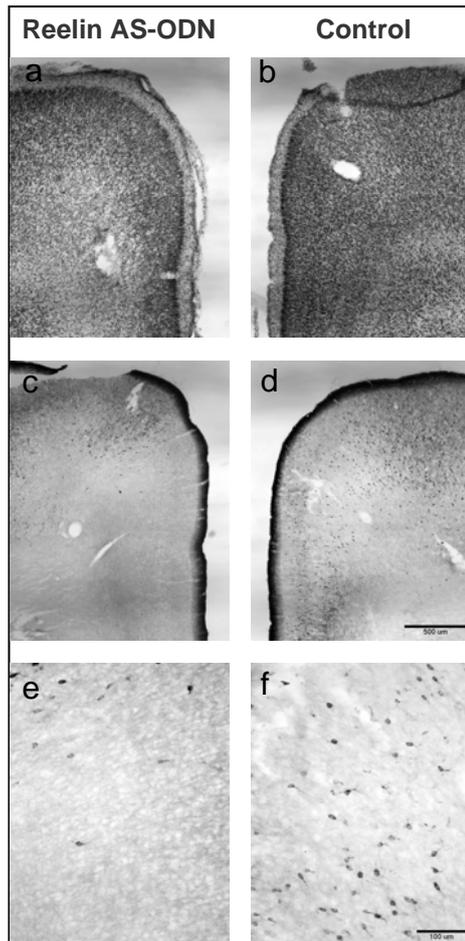


Abb. 41: Immunhistochemische Detektion von Reelin nach AS-Behandlung in neonatalen Ratten. Eine sieben Tage alte Ratte erhielt eine Mikroinjektion von 0,2nM AS-ODNs in den PFC einer Hemisphäre (a,c,e). Nach 12h wurde der PFC entnommen, mit Paraformaldehyd perfundiert und Gewebeschnitte von 40µm erstellt. Die Detektion mit monoklonalem anti-Reelin zeigt einen Rückgang Reelin-positiver Zellen nach Behandlung mit AS-ODNs (c,e) im Vergleich zur unbehandelten Hemisphäre (d,f) (Balken = 500µm). e,f: vergrößerte Ausschnitte aus c bzw. d (Balken = 100µm). Die Nissl-Färbung (a,b) zeigt, dass die Behandlung keine Läsion hervorruft. n=1

Dagegen hat eine Behandlung mit nur 0,1nM AS-ODNs keine Wirkung bei neonatalen Tieren. Abbildung 42B zeigt, dass in der Immunoblot-Analyse keine Verminderung der Reelin-Menge zu beobachten ist. Vermutlich ist der basale Level von Reelin im neonatalen Gehirn zu hoch (Abb. 42A), so dass bei dieser geringen Konzentration ein Rückgang der Proteinsynthese möglicherweise nicht zu detektieren ist (Vollmer et al., 2005).

Werden neonatale oder adulte Tiere mit 0,1nM AS-ODNs behandelt, kann keine Wirkung auf das Vorkommen von Reelin beobachtet werden. Erst durch höhere Konzentrationen von 0,2nM kann ein Effekt erzielt werden.

Die erfolgreiche Unterdrückung der Reelin-Formen und die gleichzeitige Wirkung auf andere Proteine konnte jedoch nicht immer wiederholt werden. Vermutlich sind die entnommenen Gewebestücke zu groß bzw. reichen in nicht getroffene Gebiete, so dass Veränderungen hier nicht zu detektieren sind.

Zu den Antisense-Experimenten wurden keine Verhaltensversuche durchgeführt.

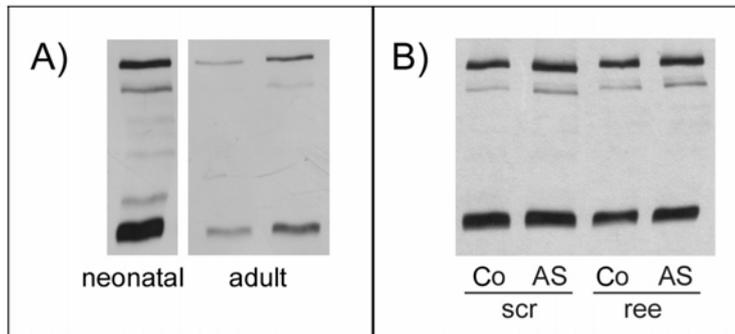


Abb. 42: Neonatales und adultes Vorkommen von Reelin. Die Reelin-Menge ist im PFC neonataler Ratten größer als in adulten (A). Die Behandlung neonataler Tiere mit 0,1nM AS-ODNs zeigt keinen Effekt (B). Co: unbehandelte Hemisphäre. scr: *scrambled*-Kontrollen, ree: AS-ODNs.

3.4.2.2 Hemmung der Spaltung des Reelin-Proteins

Die Ergebnisse der AS-Versuche zeigen einen Einfluss auf das Vorkommen der Spaltprodukte von Reelin. Deshalb wurde versucht, die Spaltung von Reelin zu beeinflussen. Hierfür wurden drei Agenzien, die proteasehemmende Wirkung haben, eingesetzt:

- a) Aprotinin
- b) Phenanthrolin
- c) MG132

Mit Aprotinin (AP) sollten Serinproteasen und mit Phenanthrolin (PA) Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gehemmt werden. Serinproteasen und MMPs sind extrazelluläre proteolytische Enzyme, die Komponenten der ECM degradieren. Diese Proteasen können z.B. bei der Zellmigration Matrixmoleküle örtlich begrenzt abbauen. Da einige MMPs Zn²⁺-abhängig sind, ist es möglich, durch den Einsatz des Zink-Chelators PA, deren Aktivität zu hemmen. AP hemmt die Aktivität der Serinprotease Plasmin reversibel. Plasmin degradiert verschiedene Proteine der ECM, so auch Reelin (Lugli et al., 2003), und ist zudem in der Lage MMPs zu aktivieren (Mazzieri et al., 1997). MG132 hemmt die proteolytische Aktivität des Proteasoms und somit den proteasomalen Abbau (s. 3.2.5).

Anhand morphologischer Betrachtungen und der Analyse entwicklungs-spezifischer Marker sollte untersucht werden, ob sich durch die Hemmung der Reelin-Spaltung die *in vitro*-Differenzierung der Neurone verändert.

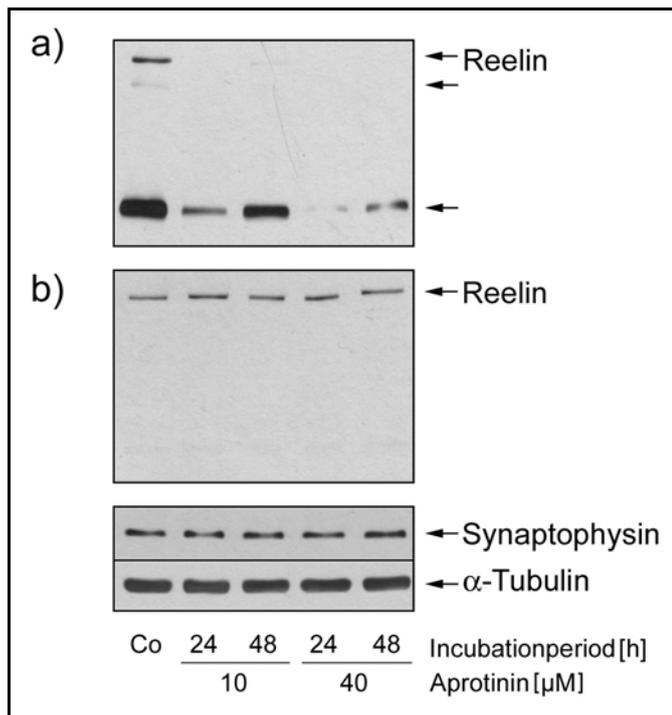


Abb. 43: Einfluss von Aprotinin auf die Spaltung von Reelin. Neuronen-Kulturen wurden mit 10 oder 40 μ M Aprotinin behandelt. Nach angegebener Inkubationsdauer wurde der Überstand abgenommen und über Filtereinheiten aufkonzentriert (a). Parallel wurden Zellextrakte hergestellt (b). Die Pfeile kennzeichnen die Banden der Reelin-Formen. Co: unbehandelte Kontrolle.

Die Wirkung von AP auf die Spaltung des Reelin-Proteins wurde im Zellüberstand und in den Zellen untersucht. Einen Tag nach Inkubation mit AP ist ein deutlicher Rückgang der 180kDa-Form im Medium zu sehen, ein Effekt der bei höheren Konzentrationen noch deutlicher ist (Abb. 43a). Nach längeren Inkubationszeiten verschwindet die Wirkung, das Spaltprodukt nimmt wieder zu. Zudem verschwindet nach Behandlung mit AP das Gesamtprotein, von dem sich unter Kontrollbedingungen auch ein kleiner Teil im Medium befindet. Die Menge an intrazellulärem Protein bleibt unverändert (Abb. 43b). Unter diesen Bedingungen ist keine Verminderung von Synaptophysin oder α -Tubulin zu beobachten. Die Behandlung der Zellen mit AP hat keinen Einfluss auf die Morphologie (nicht gezeigt). Da keine HSP-Induktion vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen durch diese Behandlung keinem Stress ausgesetzt sind (nicht gezeigt).

Um die Spaltung von Reelin mit PA zu unterdrücken, wurden die Neuronen-Kulturen 24 oder 48h mit 300 μ M oder 1mM PA gelöst in Ethanol behandelt. Im Immunoblot zeigt sich, dass PA das extrazelluläre Vorkommen von Reelin

vermindert (Abb. 44A). Dabei ist eine hohe Konzentration von 1mM wirksamer als 300 μ M PA. Im Medium nehmen die Mengen des 180kDa-Spaltprodukts und auch des Gesamtproteins ab. Gleichzeitig kommt es bei PA-Behandlung zur Abnahme der Immunreaktivität von HSP90 und HSP32. Zusätzlich kommt es zur Degradation von α -Tubulin und zum Verlust der Immunreaktivität von NF-L. Womöglich ist PA zu toxisch für die Zellen. Dies wird unterstützt durch die morphologische Betrachtung, in der zu sehen ist, dass es zu starken Schädigungen der Neurone kommt (Abb. 44B).

Der Proteasomen-Inhibitor MG132 beeinflusst die Bildung des Spaltprodukts nicht (nicht gezeigt).

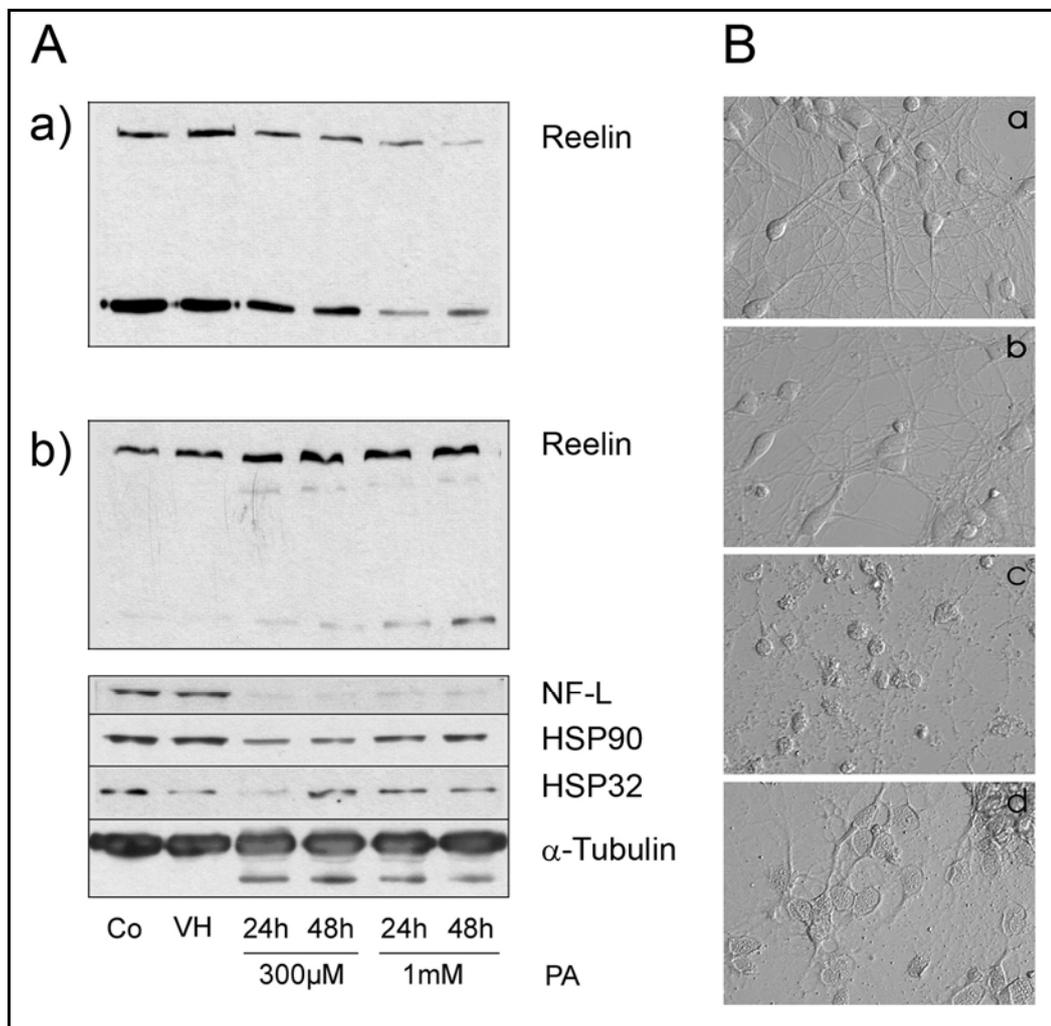


Abb. 44: Einfluss von Phenanthrolin (PA) auf die Spaltung von Reelin. Neuronen-Kulturen wurden 24 oder 48h mit 300 μ M oder 1mM PA behandelt. A: Das Medium (a) und die Zell-Lysate (b) wurden im Immunoblot analysiert. Die identifizierten Proteine sind rechts angegeben. B: Hoffman-Modulationskontrast-Aufnahmen; a: Kontrolle, b: VH, c: PA 300 μ M, d: PA 1mM. Co: unbehandelte Kontrolle, VH: Vehicle.

Weitere Untersuchungen zur Auswirkung der Hemmung der Spaltung des Reelin-Proteins auf synaptische, axonale und dendritische Marker und die morphologische Entwicklung der Neurone wurden deshalb nur mit AP durchgeführt.

Im Folgenden wurden 1 Tag alte Kulturen über einen Zeitraum von sieben Tagen täglich mit AP (30 μ M) behandelt, um Langzeiteffekte zu untersuchen. Die Morphologie der Zellen wurde innerhalb dieses Zeitraums beobachtet. Dabei waren keine Auffälligkeiten oder Veränderungen zur Kontrolle festzustellen. Abbildung 45B zeigt exemplarisch zwei Zeitpunkte. Mit dem Immunoblot-Verfahren wurden Proteine untersucht, deren Veränderung auf eine Umorganisation von neuronalen Fortsätzen hindeuten könnte. Dabei konnte bei keinem Protein eine Zu- oder Abnahme beobachtet werden. Axon-spezifische Marker wie GAP-43, das MT-assoziierte Tau und Synaptophysin nehmen zwar während der Entwicklung der Neuronen-Kultur zu. Im Vergleich zur Kontrolle des gleichen Kulturtages sind jedoch keine Veränderungen vorhanden.

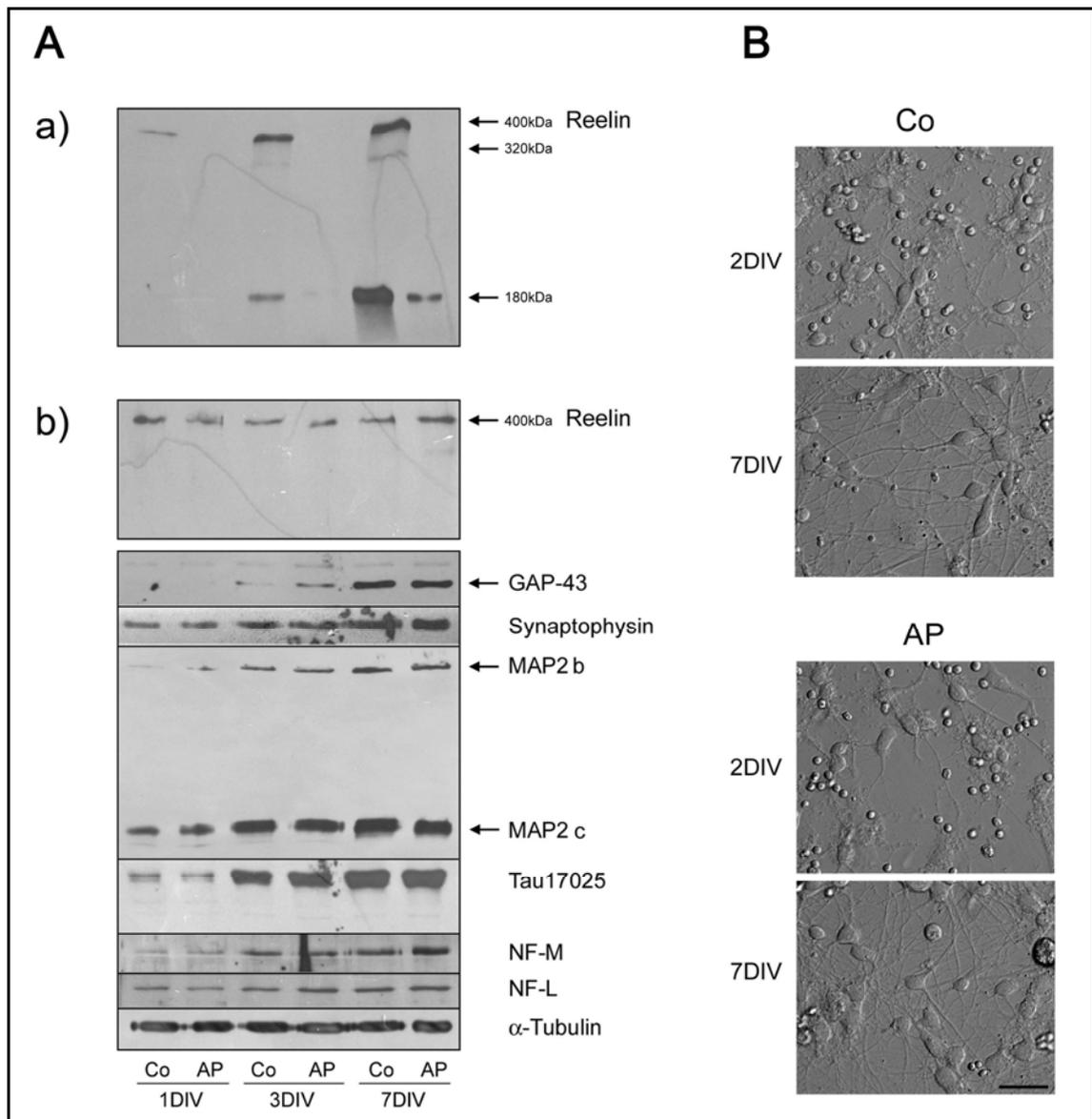


Abb. 45: Einfluss von Aprotinin auf die Entwicklung von Neuronen-Kulturen. Neuronen-Kulturen erhielten täglich 30 μ M Aprotinin (AP). A: Die behandelten Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Entwicklung der Immunoblot-Analyse unterzogen. Parallel wurden unbehandelte Zellen untersucht (Co). a) Medium, b) Zellen. B: Hoffman-Modulationskontrast-Aufnahmen. Balken = 20 μ m. n=2

Auch die beiden Formen des hauptsächlich in den Dendriten lokalisierten MT-gebundenen MAP2 und Neurofilament-Proteine bleiben von Veränderungen der Reelin-Formen unbeeinflusst, obgleich sezerniertes Reelin im Medium nach Behandlung mit AP nicht mehr nachzuweisen ist (Abb. 45a). Intrazelluläres Reelin bleibt unbeeinflusst. Die Behandlung mit AP führt auch unter diesen Bedingungen zu keiner Induktion von HSPs (nicht gezeigt).

Obwohl in den Kulturen kein extrazelluläres Reelin mehr nachzuweisen ist, lässt sich kein Effekt auf die Zellen beobachten. Das Gesamtprotein scheint ausreichend, um die normale Entwicklung der Neurone zu gewährleisten.

3.4.2 Einfluss von Ethanol auf Nervenzellen in Kultur

Eine frühkindliche Exposition mit Ethanol ist vermutlich an Störungen der Hirnentwicklung beteiligt. Hirnentwicklungsstörungen können *in vivo* mit Hilfe des *Two-Hit*-Modells untersucht werden. In der AG Koch wurde an Ratten ein *in vivo* Modell entwickelt, an dem die Wirkung von postnatal verabreichtem Ethanol auf die Entwicklung des Gehirns und den damit einhergehenden biochemischen Veränderungen sowie auf kognitive, emotionale und perzeptuelle Leistungen der Ratte aufgeklärt werden soll. An Neuronen-Kulturen wurden die Auswirkungen von Ethanol untersucht, um das *in vivo* Modell zu unterstützen.

Es wurde zunächst getestet, wie Neuronen-Kulturen auf unterschiedliche Konzentrationen von Ethanol reagieren. Um in Zellkultur einen Effekt zu erzielen, müssen sehr hohe Mengen Ethanol eingesetzt werden. Erst bei einer Konzentration von 1M, das entspricht 36‰, ist in der Kultur eine Wirkung zu beobachten (Abb. 46). Es kommt zu einer Induktion von HSP70 und HSP32 und zur Verminderung von HSP90. Die Immunreaktivität von NF-L nimmt ab und α -Tubulin degradiert. Auch die CAMs L1 und D2 (oder NCAM) zeigen eine veränderte Immunreaktivität: Während die Behandlung mit 1M EtOH zu einer Verminderung von D2 führt, ist eine zusätzliche, niedermolekulare Bande von L1 zu detektieren. Eventuell repräsentiert diese Bande dephosphoryliertes L1. Möglicherweise übt Ethanol über eine Veränderung der Expression oder des Phosphorylierungsstatus von CAMs einen Einfluss auf Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen aus und könnte so die Hirnentwicklung stören (Hirai et al., 1999; Bearer et al., 1999). So wurde gezeigt, dass die Interaktion von L1 mit intrazellulären Signalmolekülen oder Cytoskelett-Elementen über Unterschiede in der Phosphorylierung reguliert werden kann, was einen Einfluss auf das Neuritenwachstum haben kann (Wong et al., 1996).

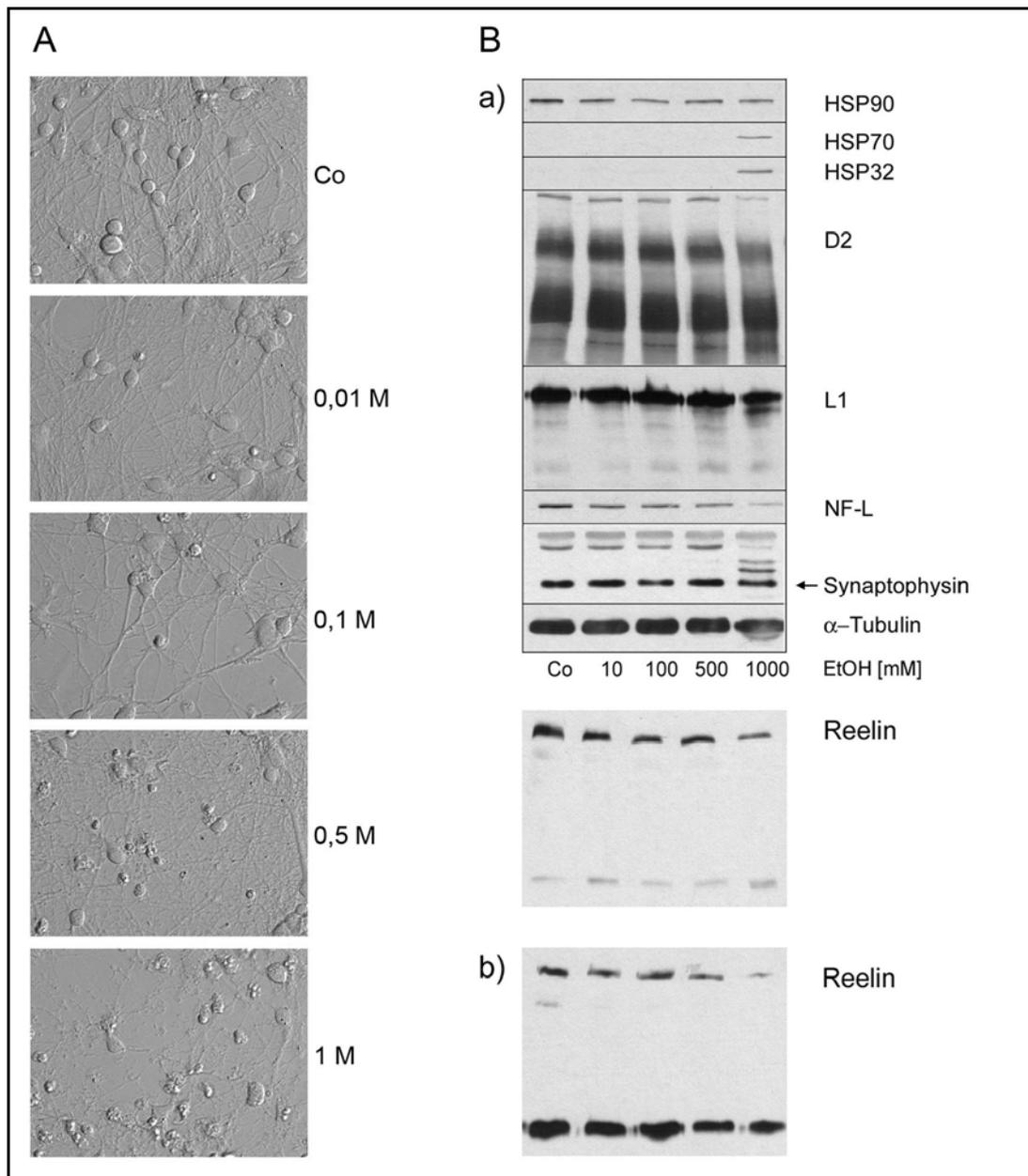


Abb. 46: Reaktion von kultivierten Neuronen auf Ethanol. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Ethanol (EtOH [mM]) behandelt und 24h später analysiert. Co: unbehandelte Kontrolle. A: Hoffman-Modulationskontrast-Aufnahmen. B: Immunoblot-Analyse von Zellrasen (a) und Mediumkonzentrat (b).

Von Synaptophysin sind zusätzlich zur 38kDa-Bande höhermolekulare Banden zu detektieren, wobei es sich vermutlich um phosphoryliertes Synaptophysin handelt. Da eine Phosphorylierung von Synaptophysin vermutlich die Freisetzung von Acetylcholin aus synaptischen Vesikeln hemmt (Asermely et al., 1999), könnte Ethanol so die synaptische Transmission beeinflussen. (Abb. 46B). Morphologische Veränderungen treten bereits bei einer Konzentration

von 0,5M EtOH (Ethanol) auf (Abb. 46A). Nach einer Behandlung mit 1M sind die Schädigungen auffälliger und es sind mehr tote Zellen zu beobachten.

Die EtOH-Konzentration, bei der HSPs induziert werden, ist so toxisch, dass sie in der Neuronen-Kultur nicht eingesetzt werden kann. Außerdem ist eine Konzentration von 36‰ in *in vivo* Untersuchungen nicht umzusetzen.

Die *in vivo* Untersuchungen wurden in Kooperation mit der AG Neuropharmakologie der Universität Bremen durchgeführt. Dabei sollten mögliche biochemische Veränderungen in verschiedenen Hirnregionen und die Auswirkungen der Ethanol-Behandlung auf das Verhalten der Tiere getestet werden. Sieben Tage alte Ratten erhielten intraperitoneal 5g/kg (zweimal täglich 2,5g/kg) Ethanol (20%ig). Eine Gruppe erhielt eine Zweitbehandlung: Nach 40 Tagen wurde über einen Zeitraum von 25 Tagen 1g/kg Ethanol (20%ig) verabreicht. Definierte Hirngebiete wurden nach Dekapitation der Tiere entnommen und für die proteinbiochemische Analyse aufgearbeitet. Das Gewebe wurde in 1xSB homogenisiert und mittels Immunoblot analysiert. Untersucht wurden Proteine, die bei der Hirnentwicklung und speziell bei der Differenzierung von Neuronen eine Rolle spielen, wie L1, Reelin, SNAP-25, Synaptophysin, GAP-43, MAP2, Tau und NFs. In keiner Hirnregion sind nennenswerte Proteinveränderungen zu detektieren (nicht gezeigt). Vermutlich ist die Konzentration des verabreichten Ethanols zu gering.

Erste Verhaltensversuche zeigten, dass adulte Ratten, die im Alter der Pubertät eine Zweitbehandlung erhielten, in Tests zu Fortbewegung weniger aktiv sind als Tiere, die keinen oder nur postnatal Alkohol verabreicht bekamen. Die für die Fortbewegung verantwortlichen neuronalen Strukturen scheinen besonders vulnerabel für die Kombination von postnatalem und pubertärem Alkoholeinfluss zu sein (Röskam und Koch, 2005).

4. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen:

- a) die differentielle Expression von HSPs
- b) die stress-spezifische Induktion von HSPs in Neuronen
- c) das spezifische Vorkommen von HSPs in Neuronen und Astrozyten
- d) die Assoziation von HSPs mit dem Cytoskelett
- e) die Folgen von Eingriffen in die Hirnentwicklung mit
 - 1) durch Ethanol erzeugtem zellulären Stress
 - 2) einer Unterdrückung der Translation des ECM-Proteins Reelin

4.1 Stressproteine in Neuronen und Astrozyten

4.1.1 Stressproteine in der neuronalen Entwicklung

In Neuronen kommen *in vitro* HSP90, HSC70, HSP60, HSP40, GRP94 und GRP78 über einen Zeitraum von 28 DIV konstitutiv vor. Astrozyten exprimieren zudem konstitutiv die sHSPs HSP25 und α B-Crystallin. Dabei sind HSP90 und HSC70 in Neuronen in größeren Mengen als in Astrozyten zu detektieren. Morphologische Betrachtungen zeigen, dass sich die Neurone während vier Wochen in Kultur immer weiter differenzieren. Die in diesem Zeitraum konstitutiv vorhandenen HSPs könnten an den Differenzierungsprozessen *in vitro* beteiligt sein.

Konstitutive HSPs spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems. Die differentielle Expression von HSPs in verschiedenen Zellen des Gehirns, in unterschiedlichen Hirnregionen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung lässt darauf schließen, dass ihnen, neben der Chaperon-Funktion, spezifische Funktionen zuteil werden (Calabrese et al., 2002; Loones et al., 2000; Ohtsuka und Suzuki, 2000). So spielt HSP90 vermutlich eine bedeutende Rolle bei der frühen Hirnentwicklung, da es mit Zellzyklusproteinen, Signaltransduktionsmolekülen, neurotrophen Faktoren und Cytoskelett-Bestandteilen interagiert (Pratt und Toft, 2003; Young et al., 2001; Rousseau et al., 2000; Craig et al., 1994). HSC70 ist vermutlich beteiligt am axonalen Transport und, zusammen mit HSP40, an der synaptischen Plastizität. Für das mitochondriale HSP60 wurde bisher keine entwicklungsspezifische Funktion gezeigt, aber da differenzierende Neurone

einen hohen Energieverbrauch haben, spiegelt das Vorkommen von HSP60 wahrscheinlich den Gehalt von Mitochondrien wider (Reed Herbert et al. in Richter-Landsberg, 2005).

HSP70, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin kommen erst in älteren Neuronen-Kulturen vor, wobei die Zunahme der sHSPs wahrscheinlich aufgrund einer Vermehrung von Astrozyten in der Kultur erfolgt. HSP25 hat vermutlich eine Funktion bei der Entwicklung *in vivo*. So ist es in migrierenden Neuronen an der Umorganisation des Cytoskeletts beteiligt. Durch seine phosphorylierungsabhängige Assoziation mit F-Actin kann HSP25 die Zellgestalt und -beweglichkeit beeinflussen (Lavoie et al., 1995). Möglicherweise wurde der Zeitraum, in dem HSP25 konstitutiv in Neuronen vorkommt, hier *in vitro* nicht erfasst. Die *in vitro* Untersuchungen begannen an E17, wogegen HSP25 in Neuronen *in vivo* nur zu sehr frühen Entwicklungsphasen, von E12-17, exprimiert wird und danach wieder verschwindet (Loones et al., 2000). Das Vorkommen von HSP32 und HSP70 ab 21 bzw. 28 DIV könnte auf Stress zurückzuführen sein. So wird HSP70 durch metabolischen Stress wie Glutamat (Wischmeyer et al., 1997) und Glukose-Entzug (Williams et al., 1993) induziert. Da HSP70 *in vivo* im postnatalen Rattenhirn nachgewiesen werden kann (Bodega et al., 2002; D'Souza und Brown, 1998), ist es auch möglich, dass das *in vitro* späte Vorkommen von HSP70 entwicklungsbedingt ist. Eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung könnte HSP70 eventuell durch eine Funktion beim langsamen axonalen Transport haben (Reed Herbert et al. in Richter-Landsberg, 2005). Das induzierbare HSP32 scheint bei der Hirnentwicklung keine Rolle zu spielen, sondern nur nach Stress synthetisiert zu werden.

4.1.2 Stressreaktion von kultivierten Neuronen und Astrozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie Neurone und Astrozyten *in vitro* auf unterschiedliche Arten von Stress reagieren: Hitzestress (HS), oxidativer Stress (OS) und durch MG132 induzierter proteasomaler Stress. Alle drei Stressarten führen bei Neuronen zu morphologischen Veränderungen, während Astrozyten morphologisch intakt bleiben. Nach Stress weisen Neurone eine Desorganisation der MT und Anzeichen von apoptotischem Zelltod auf.

Die Daten zeigen, dass zelltyp-spezifische Antworten zu beobachten sind. In Neuronen werden nach HS spezifisch HSP70, HSP25 und α B-Crystallin induziert, nach OS vor allem HSP32 und in geringerem Maße HSP25. In Astrozyten werden nach HS auch HSP70 und α B-Crystallin und nach OS HSP32 induziert. Außerdem kommt es in Astrozyten nach OS zur Induktion von α B-Crystallin. In beiden Zelltypen ist nach OS eine Verminderung der HSP90-Menge zu beobachten. Proteasomaler Stress induziert in beiden Zelltypen alle HSPs, die auch durch die beiden anderen Stress-Situationen induziert werden. Eine Inhibierung der Proteasomen scheint, durch die Anhäufung denaturierter Proteine, zu einer generellen Synthese von HSPs zu führen. Insgesamt ist die Stressantwort in Astrozyten stärker als in Neuronen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich der Induktion von HSPs in Neuronen und Astrozyten nur 24h nach Stress analysiert. An Untersuchungen der mRNA ist jedoch zu sehen, dass die HSP-Induktion in Neuronen und Astrozyten schon früher erfolgt. So kann sowohl in Neuronen wie auch in Astrozyten eine Zunahme der mRNA von HSP70, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin bereits 3h nach Stress nachgewiesen werden. Es kommt also in beiden Zelltypen zu einer schnellen Stressantwort. Frühere Untersuchungen zeigen, dass die Proteinsynthese von HSP70 in Neuronen 7h nach HS schwach einsetzt und ihr Maximum erst nach 24h erreicht. Die Translation scheint in Neuronen langsam einzusetzen und lange anzudauern.

In Neuronen kommt konstitutiv die mRNA von HSP32, HSP25 und α B-Crystallin vor, die Proteinsynthese findet jedoch erst nach Stress statt. Es ist also ständig ein Vorrat der mRNA vorhanden, vermutlich damit es im Falle einer Stress-Situation schnell zur Induktion der HSPs kommen kann.

Tabelle 6 zeigt einen Vergleich von *in vitro* Untersuchungen von HSPs in Gehirnzellen unserer Arbeitsgruppe mit den Studien anderer Gruppen.

Tab. 6: HSPs in Gehirnzellen

Hitzeschock-protein	AG Molekulare Neurobiologie		Literaturdaten	
	Konstitutiv	Induzierbar	Konstitutiv	Induzierbar
HSP90	RCB, ODC, ASTR		Hauptsächlich in Neuronen	eher in Glia
HSP70		RCB, ODC, ASTR	Mikroglia ³	Vorw. in Glia ^{1,3,5} einige Neuronentypen ⁵
HSP32		RCB, ODC, ASTR	Mikroglia ⁷	Mikroglia ⁶ Astrozyten ⁴
Small HSPs				
• HSP25	ASTR	ODC, RCB, ASTR	Astrozyten ^{2,8}	Astrozyten ^{2,8} Neurone ²
• α B-Crystallin	ASTR	ASTR, ODC, RCB	Astrozyten ² , Oligodendrozyten ⁸	Astrozyten ^{2,8} Oligodendrozyten ⁹

RCB: Neuronen-Kulturen, ODC: Oligodendrozyten-Kulturen, ASTR: Astrozyten-Kulturen

1: Satoh und Kim, 1994; 2: Satoh und Kim, 1995; 3: Voisin et al., 1996; 4: Dwyer et al., 1995; 5: Nishimura und Dwyer, 1996; 6: Koistinaho et al., 1996; 7: Calabrese et al., 2002; 8: Brzyska et al., 1998; 9: Bajramovic et al., 1997

Untersuchungen von Nishimura und Dwyer (1996) zur zelltyp-spezifischen Stressreaktion zeigten bereits anhand der HSP70-Induktion, dass kultivierte corticale Neurone aus Rattenembryonen anders auf Hitzestress reagieren als kultivierte Astrozyten neugeborener Ratten. Nach vergleichbarem HS setzte in Astrozyten die Proteinsynthese von HSP70 früher ein, außerdem war die Induktion stärker als in Neuronen. Während Astrozyten schon zwei Stunden nach HS HSP70 induzierten, wiesen Neurone eine verzögerte Induktion von HSP70 auf. Außerdem war die Induktion in der Neuronenpopulation nicht heterogen, sondern in den meisten kleinen Neuronen gar nicht vorhanden (Nishimura und Dwyer, 1996). Interessanterweise kann es einen interzellulären Transfer von HSP70 von Astrozyten zu benachbarten Neuronen geben, womöglich um eine unzureichende Stressreaktion von Neuronen zu unterstützen (Guzhova et al., 2001; Sheller et al., 1998; Tytell et al., 1986). Ob Neurone auch *in vivo* durch von Astrozyten sekretierte HSPs unterstützt werden, ist unklar.

Satoh und Kim (1995) zeigten, dass HSP27, das humane Äquivalent von HSP25, auch konstitutiv in großen Mengen in Astrozyten, aber gering in Neuronen exprimiert wird. In humanen Astrozyten blieb die HSP27-Menge

nach HS nahezu unverändert, erhöhte sich aber deutlich in Neuronen. HSP27 wird in ungestressten humanen Astrozyten und nach HS gemeinsam mit α B-Crystallin exprimiert (Satoh und Kim, 1995).

In den Neuronen-Kulturen führen alle untersuchten Stress-Situationen zur Induktion von HSP25. Im Vergleich zu Astrozyten ist jedoch auch in gestressten Neuronen weniger HSP25 vorhanden. Astrozyten besitzen bereits konstitutiv große Mengen HSP25 und nach Stress kommt es nur noch zu einer schwachen Zunahme. Auch α B-Crystallin kommt in den Astrozyten-Kulturen der vorliegenden Arbeit konstitutiv und nach Stress vor.

Die im Vergleich zu Astrozyten geringe Induktion von HSPs in Neuronen könnte möglicherweise mit dem spezifischen Vorkommen von HSFs zusammenhängen. So assoziiert HSP70 normalerweise mit HSF-1 und hält es in einem inaktiven Zustand. Da HSPs eine hohe Affinität zu denaturierten Proteinen besitzen, verlieren die HSPs bei der Anhäufung missgefalteter Proteine ihre Assoziation zu den HSF. Das inaktive HSF-Monomer wird aus dem Komplex entlassen, trimerisiert und aktiviert, nach Translokation in den Nucleus, die Transkription von HSPs (Goldbaum, 2003). Über das Vorkommen verschiedener HSFs in Neuronen gibt es widersprüchliche Aussagen. Während Untersuchungen an primären Hippocampus-Neuronen nur die Expression von HSF-2 nachweisen (Marcucilli et al., 1996) und kein HSF-1 (Kaarniranta et al., 2002), ist HSF-2 in anderen Studien in Neuronen nicht detektierbar (Nishimura und Dwyer, 1996). Da die verschiedenen HSFs aber vermutlich überlappende Funktionen haben (Pirkkala et al., 2001), muss es sich nicht unbedingt in der HSP-Synthese widerspiegeln, wenn eines der HSF in der Zelle nicht vorkommt.

Neben der hohen Empfindlichkeit der Neurone gegenüber Stress fällt auf, dass diese auch schon unter normalen Kulturbedingungen apoptotisch sterben. Dies mag zum einen dadurch erklärbar sein, dass die Zellen zu einem Zeitpunkt entnommen werden, zu dem sich das Gehirn der Ratte noch in der Entwicklung befindet. Während dieser Zeit ist der apoptotische Zelltod ein normaler Prozess um überflüssige Neurone zu eliminieren (Hetts, 1998), der sich vermutlich in Kultur fortsetzt. Auch neigen unreife Neurone mehr zum programmierten Zelltod als ausdifferenzierte Neurone (Benjelloun et al., 2003). Möglicherweise aber sterben die kultivierten Neurone bereits unter normalen Bedingungen

apoptotisch, weil ihnen die vielseitige Unterstützung von Astrozyten fehlt. Die neurotrophe Unterstützung seitens der Astrozyten, z.B. durch Faktoren der FGF- (*fibroblast growth factor*), TGF- (*transforming growth factor*) und EGF- (*epidermal growth factor*) Familien, ist wichtig für das neuronale Überleben (Gomes et al., 2001). Durch die Trennung der beiden Zelltypen und den Wegfall dieser Unterstützung kommt es vermutlich zum apoptotischen Zelltod der Neurone (Ohgoh et al., 1998). Das Kulturmedium enthält zwar alle Substanzen, die Neurone zum Überleben benötigen. Vermutlich fehlen Astrozyten jedoch, um neuronale Stoffwechselprodukte wie Glutamat zu entsorgen. Eine Anreicherung toxischer Produkte führt wahrscheinlich dazu, dass eine Vielzahl der Neurone die Apoptose einleitet. Da HSPs wie HSP70, HSP25 und α B-Crystallin auch anti-apoptotische Funktionen haben (Söti et al., 2003; Mehlen et al., 1996), ist es möglich, dass Neurone durch die geringe Expression dieser HSPs der Schutz vor Apoptose fehlt. Neben ihrer Chaperon-Funktion üben HSPs auch eine Schutzfunktion aus, indem sie durch die Interaktion mit Schlüsselproteinen der Apoptose direkt in apoptotische Prozesse eingreifen. HSPs sind z.B. in der Lage die Aktivierung von Caspasen zu verhindern. So verhindern HSP25 durch Interaktion mit Cytochrom c und HSP70 und HSP90 durch Interaktion mit Apaf-1 die Bildung der für die Aktivierung von Caspasen notwendigen Apoptosomen (Söti et al., 2003). HSP70 kann zudem direkt an den pro-apoptotischen AIF (Apoptose induzierender Faktor) binden und ihn so neutralisieren (Parcellier et al., 2003). HSP70 und HSP25 können auch generell vor oxidativen Schäden schützen. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von HSP70 oder HSC70 Zellen resistenter gegenüber ROS macht (Chong et al., 1998). Eine Überexpression von HSP27 vermindert den Gehalt an ROS und erhöht den von Gluthation. Der Schutz vor oxidativem Stress ist jedoch nur durch unphosphoryliertes, Oligomere bildendes HSP27 gegeben (Wytttenbach et al., 2002).

Eine höhere endogene Konzentration an HSPs hat möglicherweise für Astrozyten in Kultur eine schützende Wirkung. Zusätzlich befinden sich Astrozyten im teilungsfähigen Stadium und sind daher weniger empfindlich als die postmitotischen Neurone. Diese sind besonders empfindlich, weil sie bereits ausdifferenziert und in der G₀-Phase des Zellzyklus befindlich sind.

Möglicherweise könnte die vorherrschende ATP-Konzentration bei der relativen Unempfindlichkeit von Astrozyten eine Rolle spielen. Die Bindung von ATP ändert vermutlich die Konformation der sHSPs und es kommt zu einer schwächeren Bindungskapazität für denaturierte Proteine. Laut Wang und Spector (2001) können sHSPs effizienter denaturierte Proteine binden, wenn es nach Stress zu einer Abnahme der ATP-Konzentration kommt. Wenn ATP während der Erholungsphase wieder einen normalen Level erreicht, wird die Bindung des sHSP-Protein-Komplexes schwächer und andere Chaperone wie HSP70 können das denaturierte Protein renaturieren. In der Abwesenheit von ATP sind sHSPs allerdings weitaus effizienter als HSP70, um stress-induzierte Proteinaggregationen zu verhindern (Wang und Spector, 2001). Die ATP-Konzentrationen wurden in den Kulturen jedoch nicht untersucht.

4.1.3 Assoziation von HSPs mit dem Cytoskelett in Neuronen und Astrozyten

Neurone verfügen über ein ausgeprägtes Netzwerk von Mikrotubuli (MT). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in Neuronen HSP90 und in Astrozyten HSP90, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin unter Kontrollbedingung mit den MT assoziiert sind. Nach Stress liegen in Neuronen und in Astrozyten HSP90, HSP70, HSP32, HSP25 und α B-Crystallin MT-gebunden vor. Während diese HSPs in beiden Zelltypen anteilig auch cytosolisch vorliegen, kommt α B-Crystallin ausschließlich MT-gebunden vor.

Während Astrozyten bereits unter konstitutiven Bedingungen große Mengen an HSP25 exprimieren, kommt es in Neuronen erst nach Stress vor. Astrozyten besitzen auch nach Stress mehr HSP25 als Neurone. In ungestressten Astrozyten, sowie nach Stress ist HSP25 vermutlich hauptsächlich mit den MT assoziiert, und zum Teil auch mit GFAP. In Neuronen liegt HSP25 nach HS MT-gebunden vor, wie mit Hilfe des *MT-Binding-Assays* nachgewiesen werden konnte. Allerdings konnte mit der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse keine Assoziation von HSP25 mit α -Tubulin in Neuronen beobachtet werden. Bei diesen unterschiedlichen Ergebnissen könnte die Methode einen Einfluss haben: Die für die indirekte Immunfluoreszenz nötige Kultivierung der Zellen

auf Glas könnte für die Neurone einen zusätzlichen Stress darstellen, weshalb die normalen *in vitro* Bedingungen nicht dargestellt worden sein könnten.

Auch α B-Crystallin kommt in Astrozyten *in vitro* schon konstitutiv vor. Unklar bleiben allerdings die Ergebnisse aus der indirekten Immunfluoreszenzanalyse, in der nur wenig α B-Crystallin in Astrozyten nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund war es für α B-Crystallin nicht möglich Colokalisationsstudien mittels indirekter Immunfluoreszenz durchzuführen. Mit Hilfe des *Binding Assays* konnte jedoch gezeigt werden, dass α B-Crystallin in Astrozyten MT-gebunden ist. Die sHSPs HSP25 und α B-Crystallin bilden in der Zelle gemischte Oligomere und haben ähnliche physiologische Ziele und Funktionen (Perng et al., 1999). Möglicherweise können geringe Mengen α B-Crystallin durch das Vorkommen von HSP25 kompensiert werden. Damit könnte eine Schutzfunktion allein durch HSP25 gewährleistet sein. Eine geringe Expression von α B-Crystallin wäre somit für die kultivierten Astrozyten kein Nachteil, wenn HSP25 dessen Aufgaben übernimmt.

Sowohl HSP25 als auch α B-Crystallin assoziieren unter Stress und unter normalen Bedingungen mit verschiedenen Cytoskelett-Bestandteilen, wie Tubulin, GFAP, Vimentin, Actin und Desmin (Verschuure et al., 2002; Mournier und Arrigo, 2002; Gusev et al., 2002; Perng et al., 1999; Liang und MacRae, 1997). α B-Crystallin scheint MTs vor Depolymerisation zu bewahren (Fujita et al., 2004) und die Integrität von IFs aufrechtzuerhalten (Djabali et al., 1997). HSP25 stabilisiert Mikrofilamente (Geum et al., 2002) und reguliert die Interaktionen von GFAP-Filamenten (Perng et al., 1999). In DRG (*dorsal root ganglion*)-Neuronen ist HSP25 während der Ausbildung der Neuriten mit Actin und Tubulin assoziiert und stabilisiert das Cytoskelett vermutlich insbesondere an Verzweigungspunkten und Wachstumskegeln (Williams et al., 2005).

Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Mikrofilamente werden zwar unabhängig voneinander reguliert, sie interagieren aber über spezifische Proteine wie z.B. Kinesin oder MACF (*Microtubule actin cross-linking factor*) miteinander (Fujita et al., 2004), möglicherweise spielen auch sHSPs hierbei eine Rolle.

Die hier erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Assoziation von HSPs mit den MT Astrozyten vor stress-induzierten Schäden schützt. Vermutlich ist insbesondere HSP25 für den Schutz des Cytoskeletts in Astrozyten

verantwortlich. Neurone sind womöglich sensitiver gegenüber Stress, weil sie auch nach Stress nur wenig HSP25 exprimieren und somit das Cytoskelett weniger Schutz hat als in Astrozyten.

Die im Vergleich zu Neuronen hohe Unempfindlichkeit von Astrozyten ist erklärbar: Bei Erkrankungsprozessen erfüllen Astrozyten eine neuroprotektive Rolle und tragen zum Überleben von Neuronen bei. Jegliche Dysfunktion von Astrozyten kann schwerwiegende Folgen für die neuronale Lebensfähigkeit haben. So regulieren sie etwa, wie auch unter normalen Bedingungen, die extrazelluläre Ionen- und Transmitterkonzentrationen und geben Neuronen trophische Unterstützung. Durch den hohen Gehalt an Antioxidantien können Astrozyten Neurone vor oxidativem Stress schützen. Andererseits aber können bei Verletzungen im ZNS toxische Substanzen, die von aktivierten Astrozyten produziert werden, zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen beitragen (Takuma et al., 2004).

4.2 Eingriff in die Hirnentwicklung

Hirnentwicklungsstörungen, wie Schizophrenie, haben auch eine genetische Grundlage (Harrison und Owen, 2003). Bei der Schizophrenie gibt es Hinweise, dass 19 Gebiete auf 15 verschiedenen Chromosomen an der Ätiologie der Erkrankung beteiligt sein könnten (Lewis et al., 2003). Die identifizierten Risikogene spielen eine Rolle beim Metabolismus von den an der Pathologie der Schizophrenie beteiligten Neurotransmittern Glutamat, Dopamin und GABA oder deren Rezeptoren, oder sind involviert in die Hirnentwicklung (Perkins et al., 2005). Das Erkrankungsrisiko wird wahrscheinlich erst durch epigenetische Modifizierungen, vermutlich ausgelöst durch Umweltfaktoren, gesteigert (Perkins et al., 2005). Eine verminderte Expression von Reelin ist wahrscheinlich ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der Schizophrenie (Impagnatiello et al., 1998). *Post-mortem*-Untersuchungen psychiatrischer Störungen zeigen die auffälligsten Veränderungen u.a. bei der Expression von Reelin (Torrey et al., 2005). Interessanterweise wurde der Genlocus von Reelin in genetischen Kopplungsanalysen nicht als eines der Risikogebiete identifiziert (Perkins et al., 2005). Es wird angenommen, dass es durch Umwelteinflüsse zur epigenetischen gen-spezifischen DNA-Methylierung kommt und dadurch

die Genaktivität verändert wird. Eine Hypermethylierung der Promotoregion des *reelin*-Gens wird mit einer reduzierten Genexpression in Zusammenhang gebracht (Abdolmaleky et al., 2005; Abdolmaleky et al., 2004).

4.2.1 Einfluss von Reelin auf kultivierte Neurone

Die hier unternommenen Experimente sollen zum Verständnis der Funktion von Reelin beitragen. Reelin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix (ECM). Die Interaktion von Bestandteilen der ECM, Zelloberflächenmolekülen und proteolytischen Enzymen spielt bei Entwicklungsprozessen wie dem Auswachsen von Neuriten eine wichtige Rolle. Störungen dieser Zusammenarbeit können die normale Entwicklung beeinflussen. Aber auch die synaptische Plastizität im adulten ZNS wird durch Interaktionen von Zellen mit der ECM reguliert. Verschiedene Moleküle, die an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind, wie Integrine, N-Syndecan, Plasmin und CAMs wie Cadherine und L1, spielen auch eine Rolle bei der LTP im Hippocampus (Nakagami et al., 2000). Reelin ist sowohl im embryonalen Gehirn an der neuronalen Migration und Positionierung wie auch an der synaptischen Plastizität im adulten Gehirn beteiligt. Während der Wanderung von Neuronen entlang von Radialglia beeinflusst Reelin vermutlich Neuron-Glia-Interaktionen (Dulabon et al., 2000). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass insbesondere Reelin für die postnatale Reifung von Neuronen im Hippocampus erforderlich ist. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass ECM-Moleküle sowohl während der Entwicklung wie auch im reifen Zustand wesentlich für die Funktion von Neuronen sind (Sinagra et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde die Unterdrückung des Reelin-Proteins mit Antisense-Oligonucleotiden (AS-ODNs) *in vivo* und *in vitro* untersucht. Der Einfluss dieser Unterdrückung auf die Entwicklung von Nervenzellen, insbesondere der Einfluss auf neuronale Fortsätze wurde *in vitro* analysiert. Außerdem wurde in Neuronen-Kulturen überprüft, ob die Spaltprodukte des Proteins bei diesen Prozessen eine Rolle spielen. Das sekretierbare Reelin-Protein wird an zwei definierten Stellen gespalten (Jossin et al., 2003; Lambert de Rouvroit, 1999). In den untersuchten Neuronen-Kulturen existiert Reelin zum einen intrazellulär. In den Zellen ist vor allem das etwa 420kDa schwere Gesamtprotein

vorhanden. Abhängig von der im Immunoblot eingesetzten Proteinmenge und der Entwicklungszeit erscheint auch eine Bande mit niedrigerem MW bei etwa 180kDa. Im Medium dominiert das 180kDa-Fragment, aber auch das Gesamtprotein ist zu detektieren. Im Verhältnis dazu ist der Anteil des 320kDa-Spaltprodukts gering. Das Protein scheint demnach z.T. schon intrazellulär gespalten zu werden.

Experimente anderer Gruppen zeigen, dass der Großteil von Reelin extrazellulär oder in einem post-ER-Kompartiment gespalten wird. *Reln^{rl-Orl}*-Mäuse produzieren zwar das fast komplette Reelin-Protein (205 C-terminale Reste fehlen), sekretieren es aber nicht (Lambert de Rouvroit, 1999). In diesen Mäusen akkumuliert das defekte Protein in Axonen von Cajal-Retzius-Zellen in kugelförmigen Aggregaten, was dafür spricht, dass die Sekretion gestört ist. Eine Sekretion scheint nur dann erfolgen zu können, wenn das Protein den C-Terminus vollständig besitzt. Es wird vermutet, dass das Reelin-Protein nach seiner Produktion in das Axon transportiert wird, wo es sich in axonalen Speichern anreichert und im Normalfall von dort aus in den Extrazellularraum sekretiert wird (Derer et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nur extrazelluläres, rezeptorgebundenes Protein detektiert, intrazelluläres Protein wurde mit dieser Methode nicht analysiert. Dulabon et al. (2000) sahen erhöhte Level des 180kDa-Reelins, wenn keine $\alpha3\beta1$ Integrine exprimiert wurden und vermuten deshalb, dass normalerweise durch die Rezeptorbindung eine Beseitigung von extrazellulärem Reelin erfolgt. Allerdings wird auch die Möglichkeit betrachtet, dass die Funktion dieser Rezeptoren darin besteht, durch eine Veränderung der Aktivität von Metalloproteinasen die Produktion des Reelin-Fragments zu unterdrücken.

In kultivierten CGNs (*cerebellar granule neurons*) scheint die Verteilung der Reelin-Formen ähnlich wie in dieser Arbeit beschrieben zu sein. In den Zellen kommt hauptsächlich das Gesamtprotein vor, während das 180kDa-Spaltprodukt dort kaum zu detektieren ist, im Medium jedoch die vorherrschende Form darstellt (Lacor et al., 2000). Auch in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) ist die 180kDa-Form vorherrschend, während 420kDa-Reelin praktisch nicht vorhanden ist (Ignatova et al., 2004). Die in den Neuronen-Kulturen detektierte große Menge an 180kDa-Spaltprodukt im

Medium spricht dafür, dass Reelin direkt nach der Sekretion oder kurz davor gespalten wird. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass methodische Aspekte einen Einfluss auf die Reelin-Formen haben. So ist Reelin in humanem Plasma empfindlich gegenüber Proteolyse, wiederholtem Einfrieren und Auftauen, Hitze und Langzeitlagerung. Eine Degradation des Proteins wird auch in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren entdeckt. Längeres Kochen der Proben führte zu einer sukzessiven Zunahme der Spaltprodukte und einer allmählichen Abnahme des Gesamtproteins. Vermutlich besitzt Reelin mehrere hitze-labile Bindungen (Lugli et al., 2004). Daher könnte die große Menge der Spaltprodukte auch erst nach dem Lysieren der Zellen entstanden sein.

Nach Behandlung mit H_2O_2 nimmt das 180kDa-Produkt in den Zellen zu, die Mengen im Medium wurden nicht untersucht. Bei Patienten mit frontotemporaler Demenz und AD, Erkrankungen bei denen oxidativer Stress eine Rolle spielt, konnte in der CSF im Vergleich zu gesunden Probanden auch eine Zunahme des 180kDa-Reelin-Fragments beobachtet werden (Sáez-Valero et al., 2003). Möglicherweise ist Reelin bei neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt. Da aber die funktionelle Bedeutung der Spaltprodukte nicht bekannt ist, bleibt die Art der Beteiligung unklar. Womöglich spielt der Einfluss von Reelin auf Tau eine Rolle (s.u.).

Die Applikation von AS-ODNs zu den Neuronen-Kulturen unterdrückt das extrazelluläre 180kDa-Spaltprodukt, es verschwindet jedoch nicht vollständig. Extrazellulär vorliegendes HMW-Reelin ist in unveränderter Menge vorhanden. Es ist auch keine Abnahme des intrazellulären Proteins zu beobachten. Möglicherweise ist das Fehlen eines Effekts auf methodische Aspekte zurückzuführen. Denkbar ist, dass die AS-ODNs in zu geringer Konzentration eingesetzt wurden oder nicht lange genug auf die Proteinsynthese eingewirkt haben. Allerdings erfolgte eine zweimalige Gabe, um den Pool an verbrauchten ODNs wieder aufzufüllen, außerdem konnten bei höheren Konzentrationen toxische Effekte beobachtet werden (nicht gezeigt). Lacor et al. (2000) ermittelten in ihren Antisense-Versuchen ($10\mu M$) an kultivierten CGNs einen Rückgang des Gesamtproteins im Medium schon nach 8h. Bei täglicher Gabe der AS-ODNs verschwindet in den Zellen das Gesamtprotein nach 72h. Zu den Spaltprodukten werden keine Angaben gemacht. Die von Lacor et al. verwendete AS-ODN-Sequenz wurde in der vorliegenden Arbeit nur in

Vorversuchen getestet und weitere Versuche mit einer anderen Sequenz durchgeführt.

Die durch die Behandlung mit AS-ODNs bewirkte Änderung der Morphologie der kultivierten Neurone spricht dafür, dass extrazelluläres Spaltprodukt funktionell bedeutsam ist. Die Signaltransduktionskaskade, an der Reelin beteiligt ist, beeinflusst letztendlich wahrscheinlich auch die Expression cytoskelettaler Komponenten (Costa et al., 2001). Deshalb wäre denkbar, dass durch Verminderung des Signalgebers Reelin diese Expression gestört ist und es darum zur Veränderung der cytoskelettalen Struktur kommt.

Durch die Regulation der Phosphorylierung von MAPs könnte Reelin einen Einfluss auf die Organisation der Mikrotubuli haben (Hiesberger et al., 1999). So wurde gezeigt, dass Reelin durch die Aktivierung von GSK3 und CDK5 die Phosphorylierung von MAP1b induzieren (Gonzalez-Billault et al., 2004) und so die Stabilität der MT beeinflussen kann. Andererseits soll Reelin die CDK5-Aktivität unterdrücken und somit die Phosphorylierung von Tau verhindern (Ohkubo et al., 2002). Ein durch AS-ODNs verursachter Mangel an Reelin könnte also zur Hyperphosphorylierung von Tau führen (Ohkubo et al., 2002). Eine Phosphorylierung von Tau führt zur reduzierten Affinität zu MT (Biernat et al., 1993) und zur Instabilität der MT (Drechsel et al., 1992). Die destabilisierten MT können depolymerisieren und sich reorganisieren. Bei der Reorganisation könnte es aufgrund fehlender Assoziation mit Tau, welches durch seine Projektionsdomäne als Abstandshalter der MT dient, zu einer engeren Organisation einzelner MT kommen. Die Zusammenlagerung der neuronalen Fortsätze *in vitro*, die nach Antisense-Behandlung beobachtet wird, könnte eine Folge davon sein. Allerdings wurde das Vorkommen von Tau *in vitro* nicht untersucht. *In vivo* ist keine Veränderung der Tau-Phosphorylierung zu detektieren, auch die Gesamtmenge von Tau bleibt unverändert.

Das MAP Tau ist hauptsächlich axonal und nicht in den Dendriten lokalisiert (Binder et al., 1985). HMW MAPs wie MAP2 kommen ausschließlich in den Dendriten vor (Matus, 1988). Eine veränderte Tau-Phosphorylierung sollte sich also nur in axonalen Umstrukturierungen widerspiegeln, Veränderungen von HMW MAPs nur in der dendritischen Organisation. Costa et al. (2001) nehmen an, die Rückbildung dendritischer Spines, die auch bei der Schizophrenie gefunden wird, ist eine Folge der verminderten Expression von Reelin in der

ECM. Da die Pyramidenzellen in Gehirnen Schizophrener kürzere Dendriten und weniger dendritische Spines haben (Garey et al., 1998), ist es möglich, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der Rolle von Reelin bei der Plastizität dendritischer Spines und der gestörten Konnektivität gibt, welche als ein Kernproblem der Schizophrenie betrachtet wird (Costa et al., 2002). Reelin ist wahrscheinlich an der Regulation der lokalen Proteinsynthese von Cytoskelett-Elementen in Dendriten beteiligt, indem es die Translation von in Dendriten befindlichen mRNAs, wie Arc (*activity-regulated-cytoskeleton-associated protein*) stimuliert. Reelin reguliert somit die Ausbildung dendritischer Spines (Dong et al., 2003; Costa et al., 2001). Der in dieser Arbeit beobachtete Rückgang sekundärer Verzweigungen nach Unterdrückung von Reelin könnte auch eine Rückbildung von Spines und, durch den Verlust der Plastizität von Dendriten, eine damit einhergehende Gestaltveränderung darstellen. Die sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* beobachteten Veränderungen der MAP2-Menge könnten Folge der dendritischen Modifikationen, also sekundär sein.

Zu einem Verlust der dendritischen Verzweigung kann es auch kommen, wenn Veränderungen der NF-Menge vorliegen. Bei steigendem Level von NF-H oder NF-M können diese perikaryal akkumulieren und weniger Neurofilamente werden ins Axon und die Dendriten transportiert, was zu strukturellen Änderungen führt (Kong et al., 1998). Ein Mangel an NF-L kann in Mäusen zur reduzierten Verzweigung der Dendriten führen (Zhang et al., 2002). In den *in vitro* Experimenten wurden die Mengen der NF-Proteine nicht analysiert. *In vivo* kommt es durch den Antisense-induzierten Rückgang von Reelin nicht zur Abnahme der NF-Menge.

CDK5 interagiert mit verschiedenen weiteren Proteinen, welche die Dynamik der MT regulieren, wie NUDEL (*nuclear distribution element-like*), Lis1 und Dynein (Beffert et al., 2004). NUDEL und Lis1 interagieren mit Dynein und haben somit einen Einfluss auf die MT-Organisation (Shu et al., 2004). Da NUDEL auch Neurofilamente reguliert (Nguyen et al., 2004), kann Reelin auch auf diese Cytoskelett-Komponente einen indirekten Einfluss haben. Eine Übersicht der möglichen Wirkungen von Reelin auf das Cytoskelett gibt Abb. 43.

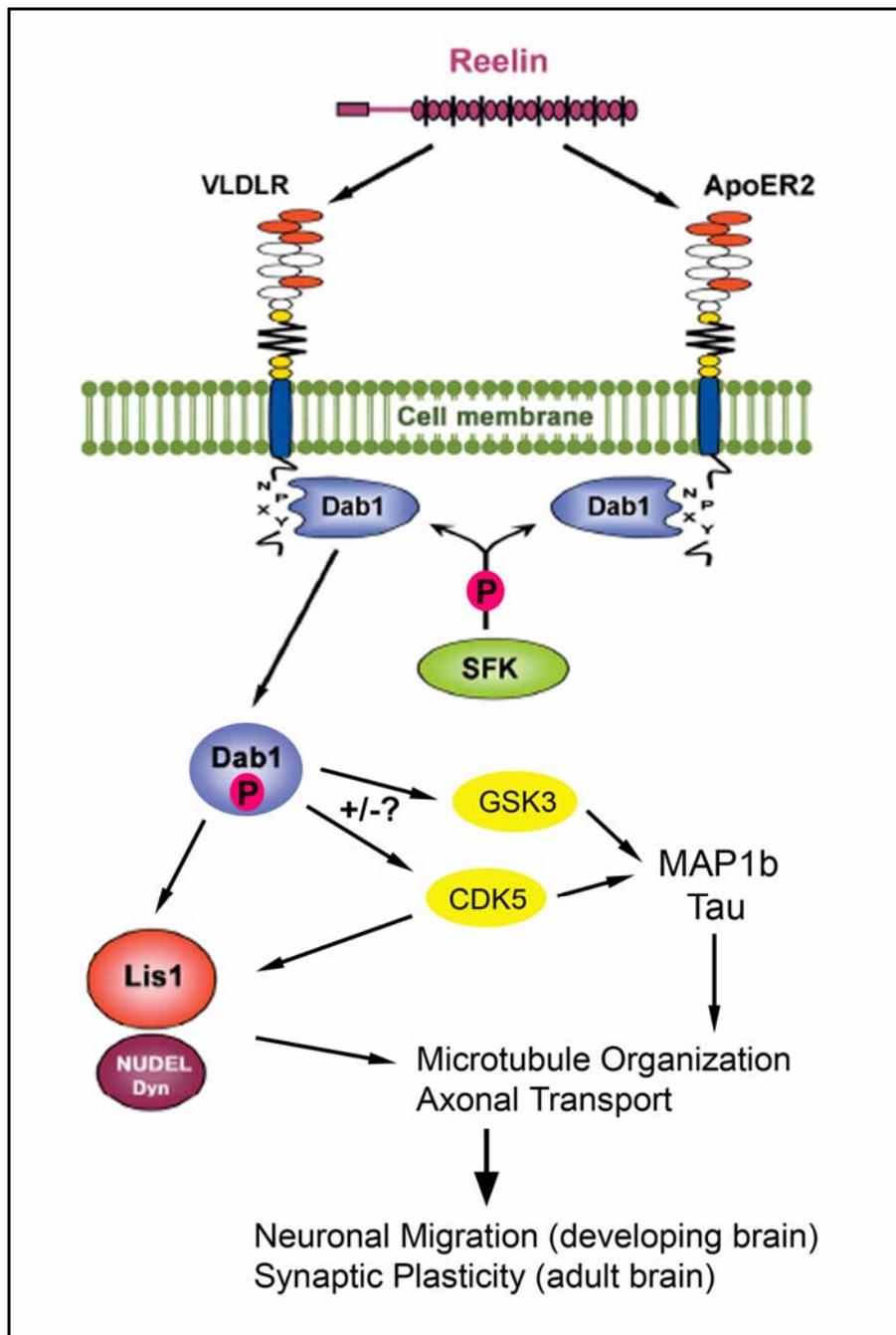


Abb. 43: Einfluss von Reelin auf das Cytoskelett. Die Signaltransduktionskaskade, die durch die Bindung von Reelin an VLDLR oder ApoER2 ausgelöst wird, kann in Umstrukturierungen des Cytoskeletts resultieren und auf diese Weise die synaptische und dendritische Plastizität beeinflussen: Phosphoryliertes DAB1 interagiert mit den Kinasen GSK3 und CDK5, welche mit MAPs und cytoskelett-regulierenden Proteinen, wie LIS1, NUDEL und Dynein interagieren (modifiziert nach Assadi et al., 2003). VLDLR: *very low density-lipoprotein receptor*, ApoER2: Apolipoprotein E Rezeptor-2, Dab1: Disabled1, SFK: *Src family kinase*, P: Phosphorylierung, GSK3: Glykogen Synthase Kinase 3, CDK5: Cyclin-abhängige Kinase 5, NUDEL: *NudE-like protein*, Dyn: Dynein.

Neuere Studien zeigen, dass Reelin den Phosphorylierungsstatus von CDK5-Substraten nicht direkt beeinflusst, vermutlich aber Reelin- und CDK5-abhängige Signaltransduktionswege interagieren. Beffert et al. (2004)

vermuten, dass sich die beiden Wege auf der Ebene der MT treffen, indem sie evtl. die Aktivität von GSK3 verändern.

Die zur Absicherung der Antisense-Daten unternommenen Experimente zur Hemmung der Reelin-Spaltung mit AP zeigen dagegen keinen Einfluss auf die Zellen. Es scheint, dass die normalen zellulären Prozesse unbeeinträchtigt sind, obwohl nur intrazelluläres Gesamtprotein, aber keine Reelin-Fragmente und kein extrazelluläres Protein vorhanden ist. Die kultivierten Neurone differenzieren sich dennoch normal, bilden Verknüpfungen untereinander und zeigen mengenmäßig keine Veränderung von dendritischen, axonalen oder cytoskelettalen Proteinen. Diese Ergebnisse deuten, im Gegensatz zu den Beobachtungen aus den Antisense-Experimenten, darauf hin, dass das intrazelluläre Gesamtprotein für eine normale Zellhomöostase ausreichend und eine Spaltung nicht unbedingt erforderlich ist. Im Widerspruch dazu steht die Erkenntnis, dass der Phänotyp der *reeler*-Mäuse eine Konsequenz von nicht vorhandenem extrazellulärem Reelin ist (D'Arcangelo et al., 1997). Das Gehirn von homozygoten *reeler*-Mäusen weist, als Folge von Migrationsdefekten, eine umgekehrte Schichtung von Cortex, Cerebellum und Hippocampus auf. Die Mäuse haben schwere motorische Störungen, wie Ataxie, Tremor und Schwierigkeiten bei Gleichgewicht und Fortbewegung (Rice und Curran, 1999; D'Arcangelo et al., 1997). Im Gegensatz zur Reelin-Nullmutante weisen heterozygote *reeler*-Mäuse diese Symptome nicht auf. Im Gehirn heterozygoter *reeler*-Mäuse wie auch im Gehirn Schizophrener werden nur 50% der normalen Reelin-Menge exprimiert. Interessanterweise zeigen sich in beiden Fällen ähnliche neuroanatomische Auffälligkeiten, wie eine Verminderung des Neuropils und die damit einhergehende gesteigerte Packungsdichte von Neuronen, sowie Verhaltensauffälligkeiten, wie z.B. Defizite beim Lernen (Costa et al., 2001).

Es bleibt demnach zu klären, aus welchem Grund die Spaltung von Reelin erfolgt. Der mittlere Teil des Proteins, der sowohl im Gesamtprotein wie auch in den natürlichen Spaltprodukten enthalten ist, sorgt für die Rezeptorbindung und das Auslösen der DAB1-Phosphorylierung (Jossin et al., 2004). Womöglich können bei einem Ausfall von Reelin andere kompensatorische Prozesse einsetzen, um die Signaltransduktion dennoch auszuführen oder eine andere

Kaskade mit ähnlicher Funktion in Gang zu setzen. Die Möglichkeit eines weiteren Systems, welches parallel zu Reelin, VLDLR, ApoER2, DAB1 und den cytoplasmatischen Kinasen arbeitet, wird spekuliert (Jossin et al., 2004). Um einen Effekt auf die Zelldifferenzierung zu erzielen, müssten zudem evtl. andere Komponenten des Reelin-Signaltransduktionswegs ausgeschaltet werden.

5. Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten zum Verständnis von Hirnentwicklungsstörungen beitragen. Diese entstehen wahrscheinlich durch eine Kombination von schädigenden Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition. Viele Umweltfaktoren wie chemische Agenzien können zellulären Stress verursachen. Zellen reagieren auf Stress i.d.R. mit der Induktion von Hitzeschockproteinen (HSPs). HSPs haben auch unter physiologischen Bedingungen und bei der Hirnentwicklung wichtige Funktionen. Einige HSPs zeigen ein stress-spezifisches oder zelltyp-spezifisches Vorkommen, d.h. sie können speziell entweder in Neuronen oder Gliazellen oder in beiden Zelltypen konstitutiv oder induziert vorkommen. Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen sind für die normale Entwicklung und Funktion des Nervensystems von großer Bedeutung. Unter pathologischen Bedingungen und auch bei Hirnentwicklungsstörungen kann diese Interaktion gestört sein und zu Funktionsausfällen führen. So kann es z.B. durch Veränderungen der extrazellulären Matrix (ECM) zu gestörten Neuron-Glia- oder Neuron-Neuron-Interaktionen kommen.

In dieser Arbeit wurde die Reaktion von Neuronen in Kultur auf verschiedene Stressoren, wie Hitzeschock (HS), oxidativer Stress (OS) und proteasomaler Stress, untersucht und mit der Stressantwort von Astrozyten verglichen. Zudem wurde analysiert, ob Reelin, ein Glykoprotein der ECM, in den Neuronen-Kulturen exprimiert wird, und welche Folgen eine Hemmung der Reelin-Synthese durch den Einsatz von Antisense-Oligonucleotiden (AS-ODNs) für die Zellen hat. Reelin spielt normalerweise eine Rolle bei der Hirnentwicklung, wo es ein extrazellulärer Signalgeber für migrierende Neurone ist. Im adulten

Gehirn scheint das Protein für die Plastizität von dendritischen Spines und Synapsen und somit für die LTP und Gedächtnisbildung wichtig zu sein. Reelin wird bei der entwicklungsneurobiologischen Erkrankung Schizophrenie vermindert vorgefunden.

Die Ergebnisse zeigten, dass HSPs in Neuronen und Gliazellen *in vitro* bereits konstitutiv unterschiedlich exprimiert wurden. In Astrozyten kamen im Gegensatz zu Neuronen konstitutiv die sHSPs HSP25 und α B-Crystallin vor. Zudem wurden stress-spezifische und zelltyp-spezifische Stressantworten beobachtet. Nach HS wurden in Neuronen spezifisch HSP70, HSP25 und α B-Crystallin induziert, nach OS vor allem HSP32 und in geringerem Maße HSP25. In Astrozyten wurden nach HS HSP70 und α B-Crystallin und nach OS HSP32 und α B-Crystallin induziert. Proteasomaler Stress führte in beiden Zelltypen zur Induktion der HSPs, die auch durch HS und OS induziert wurden. Die Stressantwort war in Astrozyten stärker als in Neuronen.

Ein wichtiger Befund dieser Untersuchungen war, dass Astrozyten generell, sowohl unter physiologischen Bedingungen wie auch nach Stress, ein höheres endogenes Vorkommen an HSPs aufwiesen als Neurone. Auch waren Astrozyten gegenüber Stress-Situationen unempfindlicher als Neurone, wie morphologische Betrachtungen und Untersuchungen zum apoptotischen Zelltod zeigten, was vermutlich auf die hohe Expression von HSPs in Astrozyten zurückzuführen ist. Vor allem HSP25 kam in Astrozyten sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch nach Stress in großen Mengen vor, so dass HSP25 in histologischen Untersuchungen als Marker für Astrozyten angesehen werden kann.

Bei neurologischen Erkrankungen, in denen Stress eine Rolle spielt, kommt es häufig zu Veränderungen in der Organisation des Cytoskeletts. HSPs spielen eine Rolle beim Schutz des Cytoskeletts. Ein wichtiger Befund dieser Arbeit ist, dass Astrozyten, nicht aber Neurone die Cytoskelett-assoziierten sHSPs bereits konstitutiv exprimierten. HSP25 liegt nur in Astrozyten mit dem Cytoskelett assoziiert vor. Es wurde vor allem eine Assoziation mit den MT, aber auch mit Gliafilamenten beobachtet. In Astrozyten blieb die Organisation des Mikrotubuli-Netzwerks auch unter Stresseinfluss erhalten, was auf eine schützende Funktion von HSP25 speziell in Astrozyten hindeutet. Auch andere

HSPs, wie HSP70 und α B-Crystallin, die mit dem Cytoskelett interagieren können und in Astrozyten nach Stress induziert waren, könnten zum Schutz des Cytoskeletts beitragen. Neurone mit ihrem ausgeprägten Cytoskelett sind durch die vergleichsweise niedrigere endogene Konzentration von HSPs vermutlich empfindlicher und reagieren stärker auf toxische Einflüsse. Dies könnte unter anderem auch dazu führen, dass bei störenden Faktoren, die in die Hirnentwicklung eingreifen, vor allem Nervenzellen betroffen sind, und ihre Schädigung zu empfindlichen Funktionsausfällen führen.

Die vorliegenden Daten zeigen des Weiteren, dass Reelin in neuronalen Zellkulturen sowohl in löslicher Form im Kulturmedium als auch in zellulärer gebundener Form nachzuweisen ist. Es scheint aber für die normale Entwicklung und Differenzierung von Neuronen *in vitro* nicht notwendig zu sein. Zwar kam es *in vitro* bei der Unterdrückung des extrazellulären Reelin-Proteins mit AS-ODNs zu morphologischen Veränderungen der Neurone. Möglicherweise war die Unterdrückung von Reelin mit AS-ODNs zu uneffektiv, worauf auch der Befund hindeutet, dass das Vorkommen von intrazellulärem Protein unbeeinflusst blieb. Aber auch Experimente mit Proteaseinhibitoren, welche das Auftreten von extrazellulärem Reelin hemmten, hatten keinen Einfluss auf die morphologische Differenzierung der Nervenzellen.

Zusammenfassend zeigen die grundlegenden Daten dieser Arbeit deutlich, dass Nervenzellen sich von Gliazellen in ihrer Stressantwort unterscheiden. Vermutlich durch das geringere Vorkommen von HSPs reagieren sie auf toxische Stimuli durch Veränderungen der Morphologie und Einleitung des apoptotischen Zelltods, und sind somit empfindliche Targets bei Stress-Situationen, die auch zu Entwicklungsstörungen beitragen können. Ob eine Überexpression von HSPs Neurone vor Schäden schützen kann, bleibt festzustellen und ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

6. Literatur

- Abdolmaleky H.M., Cheng K.-h., Russo A., Smith C.L., Faraone S.V., Wilcox M., Shafa R., Glatt S.J., Nguyen G., Ponte J.F., Thiagalingam S., Tsuang M.T. (2005). Hypermethylation of the reelin (*RELN*) promoter in the brain of schizophrenic patients: A preliminary report. *Am J Med Genet* 134B: 60-66
- Abdolmaleky H.M., Smith C.L., Faraone S.V., Shafa R., Stone W., Glatt S.J., Tsuang M.T. (2004). Methylomics in psychiatry: Modulation of gene–environment interactions may be through DNA methylation. *Am J Med Genet* 127B: 51-59
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Alcantara S., Ruiz M., D'Arcangelo G., Ezan F., de Lecea L., Curran T., Sotelo C., Soriano E. (1998). Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci* 18: 7779-7799
- Asermely K.E., Sterling G.H., McCafferty M.R., O'Neill J.J. (1999). Synaptophysin is phosphorylated in rat cortical synaptosomes treated with botulinum toxin A. *Life Sci* 64: PL297-303
- Assadi A.H., Zhang G., Beffert U., McNeil R.S., Renfro A.L., Niu S., Quattrocchi C.C., Antalfy B.A., Sheldon M., Armstrong D.D., Wynshaw-Boris A., Herz J., D'Arcangelo G., Clark G.D. (2003). Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet* 35: 270-276
- Bajramovic J.J., Lassmann H., van Noort J.M. (1997). Expression of alphaB-crystallin in glia cells during lesional development in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 78: 143-151
- Bayer T.A. (1999). Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "Two hit hypothesis". *J Psychiatr Res* 33: 543-548
- Bearer C.F., Swick A.R., O'Riordan M.A., Cheng G. (1999). Ethanol inhibits L1-mediated neurite outgrowth in postnatal rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 274: 13264-13270
- Bechtold D.A., Rush S.J., Brown I.R. (2000). Localization of the heat-shock protein hsp70 to the synapse following hyperthermic stress in the brain. *J Neurochem* 74: 641-646
- Beffert U., Weeber E.J., Morfini G., Ko J., Brady S.T., Tsai L.-H., Sweatt J.D., Herz J. (2004). Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. *J Neurosci* 24: 1897-1906
- Benjelloun N., Joly L.-M., Palmier B., Plotkine M., Charriaut-Marlangue C. (2003). Apoptotic mitochondrial pathway in neurones and astrocytes after neonatal hypoxia-ischaemia in the rat brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29: 350-360
- Biernat J., Gustke N., Drewes G., Mandelkow E.M., Mandelkow E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11: 153-163
- Binder L.I., Frankfurter A., Rebhun L.I. (1986). Differential localization of MAP-2 and tau in mammalian neurons in situ. *Ann N Y Acad Sci* 466: 145-166

- Binder L.I., Frankfurter A., Rebhuhn L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Mol Biol* 101: 1371-1378
- Biranowska J., Dziewiatkowski J., Ludkiewicz B., Morys J. (2002). Developmental changes of synaptic proteins expression within the hippocampal formation of the rat. *Anat Embryol* 206: 85-96
- Birbaumer N. und Schmidt R.F. (1996). *Biologische Psychologie*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Bock H.H. und Herz J. (2003). Reelin activates src family tyrosine kinases in neurons. *Curr Biol* 13: 18-26
- Bodega G., Hernández C., Suárez I., Martín M., Fernández B. (2002). HSP70 constitutive expression in rat central nervous system from postnatal development to maturity. *J Histochem Cytochem* 50: 1161-1168
- Brenner M., Johnson A.B., Boespflug-Tanguy O., Rodriguez D., Goldman J.E., Messing A. (2001). Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 27: 117-20
- Brown I.R. (1994). Induction of heat shock genes in mammalian brain by hyperthermia and tissue injury. In: Mayer J. und Brown I. (Hrsg.). *Heat shock proteins in the nervous system*. Academic Press, New York, 31-53
- Bruey J.M., Ducasse C., Bonniaud P., Ravagnan L., Susin S.A., Diaz-Latoud C., Gurbuxani S., Arrigo A.P., Kroemer G., Solary E., Garrido C. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2: 645-652
- Brzyska M., Stege G.J., Renkawek K., Bosman G.J. (1998). Heat shock, but not the reactive state per se, induces increased expression of the small stress proteins hsp25 and alpha B-crystallin in glial cells in vitro. *Neuroreport* 9:1549-1552
- Calabrese V., Renis M., Calderone A., Russo A., Barcellona M.L., Rizza V. (1996). Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cell damage after acute ethanol administration in rat. *Free Radic Biol Med* 20: 391-397
- Calabrese V., Scapagnini G., Ravagna A., Giuffrida Stella A.M., Butterfield D.A. (2002). Molecular chaperones and their roles in neural cell differentiation. *Dev Neurosci* 24: 1-13
- Campos-Ortega J.A. (1996). Ontogenie des Nervensystems und der Sinnesorgane. In: Dudel J., Menzel R., Schmidt R.F. (Hrsg.). *Neurowissenschaft*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 63-86
- Carden M.J., Trojanowski J.Q., Schlaepfer W.W., Lee V. M.-Y. (1987). Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci* 7: 3489-3504
- Chen Y., Sharma R.P., Costa R.H., Costa E., Grayson D.R. (2002). On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res* 30: 2930-2939
- Chong K.Y., Lai C.C., Lille S., Chang C., Su C.Y. (1998). Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection. *J Mol Cell Cardiol* 30: 599-608
- Cohen-Kerem R. und Koren G. (2003). Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicol Teratol* 25: 1-9

- Costa E., Davis J., Grayson D.R., Guidotti A., Pappas G.D., Pesold C. (2001). Dendritic spine hypoplasticity and downregulation of reelin and GABAergic tone in schizophrenia vulnerability. *Neurobiol Dis* 8: 723-742
- Costa E., Chen Y., Davis J., Dong E., Noh J.S., Tremolizzo L., Veldic M., Grayson D.R., Guidotti A. (2002). Reelin and schizophrenia: A disease at the interface of the genome and the epigenome. *Mol Interv* 2: 47-57
- Craig E.A., Weissman J.S., Horwich A.L. (1994). Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 78: 365-372
- Dani J.W., Armstrong D.M., Benowitz L.I. (1991). Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. *Neuroscience* 40: 277-287
- D'Arcangelo G., Nakajima K., Miyata T., Ogawa M., Mikoshiba K., Curran T. (1997). Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J Neurosci* 17: 23-31
- D'Souza S.M. und Brown I.R. (1998). Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsp70 and Hsp60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development. *Cell Stress Chaperones* 3: 188-199
- de Bergeyck V., Nakajima K., Lambert de Rouvroit C., Naerhuyzen B., Goffinet A.M., Miyata T., Ogawa M., Mikoshiba K. (1997). A truncated reelin protein is produced but not secreted in the 'orleans' reeler mutation (*Reln^{rl-Orl}*). *Brain Res Mol Brain Res* 50: 85-90
- Derer P., Derer M., Goffinet A. (2001). Axonal secretion of reelin by cajal-retzius cells: Evidence from comparison of normal and *Reln^{Orl}* mutant mice. *J Comp Neurol* 440: 136-143
- Djabali K., de Néchaud B., Landon F., Portier M.-M. (1997). α B-Crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J Cell Sci* 110: 2759-2769
- Dong E., Caruncho H., Liu W.S., Smalheiser N.R., Grayson D.R., Costa E., Guidotti A. (2003). A reelin-integrin receptor interaction regulates Arc mRNA translation in synaptoneurosomes. *Proc Natl Acad Sci* 100: 5479-5484
- Drechsel D.N., Hyman A.A., Cobb M.H., Kirschner M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3: 1141-1154
- Dulabon L., Olson E.C., Taglienti M.G., Eisenhuth S., McGrath B., Walsh C.A., Kreidberg J.A., Anton E.S. (2000). Reelin binds α 3 β 1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27: 33-44
- Dwyer B.E. und Nishimura R.N. (1994). Heat shock proteins and neuroprotection in CNS culture. In: Mayer J. und Brown I. (Hrsg.). Heat shock proteins in the nervous system. Academic Press, New York, 101-121
- Dwyer B.E., Nishimura R.N., Lu S.Y. (1995). Differential expression of heme oxygenase-1 in cultured cortical neurons and astrocytes determined by the aid of a new heme oxygenase antibody. Response to oxidative stress. *Mol Brain Res* 30: 37-47
- Ewing J.F., Haber S.N., Maines M.D. (1992). Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. *J Neurochem* 58: 1140-1149

- Fauconneau B., Petegnief V., Sanfeliu C., Piriou A., Planas A.M. (2002). Induction of heat shock proteins (HSPs) by sodium arsenite in cultured astrocytes and reduction of hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurochem* 83: 1338-1348
- Feinberg I. (1982). Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J Psychiatry Res* 17: 319-334
- Fort P., Marty L., Piechaczyk M., el Sabrouy S., Dani C., Jeanteur P., Blanchard J.M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res* 13: 1431-1442
- Foster J.A. und Brown I.R. (1996). Intracellular localization of heat shock mRNAs (hsc70 and hsp70) to neural cell bodies and processes in the control and hyperthermic rabbit brain. *J Neurosci Res* 46: 652-665
- Frotscher M. (1998). Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol* 8: 570-575
- Fujita Y., Ohto E., Katayama E., Atomi Y. (2004). α B-Crystallin-coated MAP microtubule resists nocodazole and calcium-induced disassembly. *J Cell Sci* 117: 1719-1726
- Garey L., Ong W., Patel T., Kanani M., Davis A., Mortimer A., Barnes T., Hirsch S. (1998). Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 446-453
- Geum D., Son G.H., Kim K. (2002). Phosphorylation-dependent cellular localization and thermoprotective role of heat shock protein 25 in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* 277: 19913-19921
- Gilmore E.C. und Herrup K. (2000). Cortical development: receiving reelin. *Curr Biol* 10: R162-R166
- Goldbaum O. (2003). Funktion und Pathologie des Cytoskeletts in Oligodendrozyten. Dissertation, Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg
- Goldbaum O. und Richter-Landsberg C. (2001). Stress proteins in oligodendrocytes: differential effects of heat shock and oxidative stress. *J Neurochem* 78: 1233-1242
- Goldbaum O. und Richter-Landsberg C. (2004). Proteolytic stress causes heat shock protein induction, tau ubiquitination, and the recruitment of ubiquitin to tau-positive aggregates in oligodendrocytes in culture. *J Neurosci* 24: 5748- 5757
- Goldbaum O., Oppermann M., Handschuh M., Dabir D., Zhang B., Forman M.S., Trojanowski J.Q., Lee V. M.-Y., Richter-Landsberg C. (2003). Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells which occur after treatment with okadaic acid. *J Neurosci* 23: 8872-8880
- Gomes F.C.A., Spohr T.C.L.S., Martinez R., Moura Neto V. (2001). Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. *Braz J Med Biol Res* 34: 611-620
- Gomes F.C., Paulin D., Moura Neto V. (1999). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 32: 619-631.
- Gonzalez-Billault C., Del Rio J.A., Urena J.M., Jimenez-Mateos E.M., Barallobre M.J., Pascual M., Pujadas L., Simo S., La Torre A., Gavin R., Wandosell F., Soriano

- E., Avila J. (2005). A role of MAP1b in reelin-dependent neuronal migration. *Cereb Cortex* 15: 1134-1145
- Grabs D., Bergmann M., Schuster T., Fox P.A., Bricht M., Gratz M. (1994). Differential expression of synaptophysin and synaptoporin during pre- and postnatal development of the rat hippocampal network. *Eur J Neurosci* 6: 1765-1771
- Gusev N.B., Bogatcheva N.V., Marston S.B. (2002). Structure and properties of small heat shock proteins (sHSP) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Mosc.)* 67: 511-519
- Guzhova I., Kislyakova K., Moskaliova O., Fridlanskaya I., Tytell M., Cheetham M., Margulis B. (2001). In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res* 914: 66-73
- Hack I., Bancila M., Loulier K., Carroll P., Cremer H. (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* 5: 939-945
- Hakak Y., Walker J.R., Li C., Wong W.H., Davis K.L., Buxbaum J.D., Haroutunian V., Fienberg A.A. (2001). Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci* 98: 4746-4751
- Harrison P.J. (1999). The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122: 593-624
- Harrison P.J. und Owen M.J. (2003). Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 361: 417-419
- Head M.W. und Goldman J.E. (2000). Small heat shock proteins, the cytoskeleton and inclusion body formation. *Neuropath Appl Neurobiol* 26: 304-312
- Hetts S.W. (1998). To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279: 300-307
- Hiesberger T., Trommsdorff M., Howell B.W., Goffinet A., Mumby M.C., Cooper J.A., Herz J. (1999). Direct binding of reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24: 481-489
- Hino M., Kurogi K., Okubo M.A., Murata-Hori M., Hosoya H. (2000). Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 164-169
- Hirai K., Yoshioka H., Kihara M., Hasegawa K., Sawada T., Fusiki S. (1999). Effects of ethanol on neuronal migration and neural cell adhesion molecules in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study. *Dev Brain Res* 118: 205-210
- Hoke G.D., Draper K., Freier S.M., Gonzalez C., Driver V.B., Zounes M.C., Ecker D.J. (1991). Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection. *Nucleic Acid Res* 19: 5743-5748
- Ignatova N., Sindic C.J.M., Goffinet A.M. (2004). Characterization of the various forms of the reelin protein in the cerebrospinal fluid of normal subjects and in neurological diseases. *Neurobiol Dis* 15: 326-330

- Impagnatiello F., Guidotti A.R., Pesold C., Dwivedi Y., Caruncho H., Piso M.G., Uzunov D.P., Smalheiser N.R., Davis J.M., Pandey G.N., Pappas G.D., Tueting P., Sharma R.P., Costa E. (1998). A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci* 95: 15718-15723
- Iwaki T., Iwaki A., Tateishi J., Sakaki Y., Goldman J.E. (1993). Alpha B-crystallin and 27-kd heat shock protein are regulated by stress conditions in the central nervous system and accumulate in Rosenthal fibers. *Am J Pathol* 143: 487-495
- Jossin Y., Bar I., Ignatova N., Tissir F., Lambert de Rouvroit C., Goffinet A.M. (2003). The reelin signaling pathway: Some recent developments. *Cereb Cortex* 13: 627-633
- Jossin Y., Ignatova N., Hiesberger T., Herz J., Lambert de Rouvroit C., Goffinet A.M. (2004). The central fragment of reelin, generated by proteolytic processing *in vivo*, is critical to its function during cortical plate development. *J Neurosci* 24: 514-521
- Kaarniranta K., Oksala N., Karjalainen H.M., Suuronen T., Sistonen L., Helminen H.J., Salminen A., Lammi M.J. (2002). Neuronal cells show regulatory differences in the hsp70 gene response. *Brain Res Mol Brain Res* 101: 136-140
- Keane R.W., Srinivasan A., Foster L.M., Testa M.-P., Örd T., Nonner D., Wang H.-G., Reed J.C., Bredesen D.E., Kayalar C. (1997). Activation of cpp32 during apoptosis of neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* 48: 168-180
- Kenwrick S., Watkins A., De Angelis E. (2000). Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 9: 879-886
- Keshavan M.S. (1999). Development, disease and degeneration in schizophrenia: a unitary pathophysiological model. *J Psychiat Res* 33: 513-521
- Kimelberg H.K. und Norenberg M.D. (1989). Astrocytes. *Scientific American*, April 44-52
- Knable M.B., Torrey E.F., Webster M.J., Bartko J.J. (2001). Multivariate analysis of prefrontal cortical data from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Brain Res Bull* 55: 651-659
- Knaus P., Betz H., Rehm H. (1986). Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J Neurochem* 47: 1302-1304
- Koch M. (2002). Tiermodelle in der Schizophrenie-Forschung. *Neuroforum* 3: 236-244
- Koistinaho J., Miettinen S., Keinanen R., Vartianen N., Roivainen R., Laitinen J.T. (1996). Long-term induction of haem oxygenase-1 (HSP-32) in astrocytes and microglia following transient focal brain ischaemia in the rat. *Eur J Neurosci* 8: 2265-2272
- Kong J., Tung V.W., Aghajanian J., Xu Z. (1998). Antagonistic roles of neurofilament subunits NF-H and NF-M against NF-L in shaping dendritic arborization in spinal motor neurons. *J Cell Biol* 140: 1167-1176
- Kubo K.-i., Mikoshiba K., Nakajima K. (2002). Secreted reelin molecules form homodimers. *Neurosci Res* 43: 381-388
- Kutty R.K., Kutty G., Wiggert B., Chader G.J., Darrow R.M., Organisciak D.T. (1995). Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light:

- suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Proc Natl Acad Sci* 92: 1177-1181
- Lacor P.N., Grayson D.R., Auta J., Sugaya I., Costa E., Guidotti A. (2000). Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation. *Proc Natl Acad Sci* 97: 3556-3561
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lambert de Rouvroit C., de Bergeyck V., Cortvrindt C., Bar I., Eeckhout Y., Goffinet A.M. (1999). Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Exp Neurol* 156: 214-217
- Lariviere R.C. und Julien J.-P. (2003). Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* 58: 131-148
- Lavoie J.N., Lambert H., Hickey E., Weber L.A., Landry J. (1995). Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 15: 505-516
- Leclerc N., Beesley P.W., Brown I., Colonnier M., Gurd J.W., Paladino T., Hawkes R. (1989). Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 280: 197-212
- Lee D.H. und Goldberg A.L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8: 397-403
- Lee M.K. und Cleveland D.W. (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19: 187-217
- Lee J.E., Yenari M.A., Sun G.H., Xu L., Emond M.R., Cheng D., Steinberg G.K., Giffard R.G. (2001). Differential neuroprotection from human heat shock protein 70 overexpression in in vitro and in vivo models of ischemia and ischemia-like conditions. *Exp Neurol* 170: 129-139
- Lemmon V., Farr K.L., Lagenaur C. (1989). L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2: 1597-1603
- Lewis C.M., Levinson D.F., Wise L.H., DeLisi L.E., Straub R.E., Hovatta I. et al. (2003). Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, Part II: schizophrenia. *Am J Hum Genet* 73: 34-48
- Lewis D.A. und Levitt P. (2002). Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25: 409-432
- Lewis D.A. und Lieberman J.A. (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28: 325-334
- Liang P. und MacRae T.H. (1997). Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci* 110: 1431-1440
- Loones M.-T., Chang Y., Morange M. (2000). The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress Chaperones* 5: 291-305
- Loones M.-T., Rallu M., Mezger V., Morange M. (1997). HSP gene expression and HSF2 in mouse development. *Cell Mol Life Sci* 53: 179-190
- Lopez-Picon F.R., Uusi-Oukari M., Holopainen I.E. (2003). Differential expression and localization of the phosphorylated and nonphosphorylated neurofilaments

- during the early postnatal development of rat hippocampus. *Hippocampus* 13: 767-779
- Lugli G., Krueger J.M., Davis J.M., Persico A.M., Keller F., Smalheiser N.R. (2003). Methodological factors influencing measurement and processing of plasma reelin in humans. *BMC Biochem* 4: 9
- Mangoura D. und Dawson G. (1998). Programmed cell death in cortical chick embryo astrocytes is associated with activation of protein kinase PK60 and ceramide formation. *J Neurochem* 70: 130-138
- Marcucilli C.J., Mathur S.K., Morimoto R.I., Miller R.J. (1996). Regulatory differences in the stress response of hippocampal neurons and glia cells after heat shock. *J Neurosci* 16: 478-485
- Mathew A. und Morimoto R.I. (1998). Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Ann N Y Acad Sci* 851: 99-111
- Mathew A., Mathur S.K., Morimoto R.I. (1998). Heat shock response and protein degradation: Regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* 18: 5091-5098
- Matus A. (1988). Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci* 11: 29-44
- Mazzieri R., Masiero L., Zanetta L., Monea S., Onisto M., Garbisa S., Mignatti P. (1997). Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J* 16: 2319-2332
- Mehlen P., Schulze-Osthoff K., Arrigo A.P. (1996). Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1 and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* 271: 16510-16514
- Meiri K.F., Pfenninger K.H., Willard M.B. (1986). Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proc Natl Acad Sci* 83: 3537-3541
- Meiri K.F., Willard M., Johnson M.I. (1988). Distribution and phosphorylation of the growth-associated protein GAP-43 in regenerating sympathetic neurons in culture. *J Neurosci* 8: 2571-2581
- Miles M.F., Wilke N., Elliot M., Tanner W., Shah S. (1994). Ethanol-responsive genes in neural cells include the 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78) and 94-kilodalton glucose-regulated protein (GRP94) molecular chaperones. *Mol Pharmacol* 46: 873-879
- Miller M.W. und Robertson S. (1993). Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. *J Comp Neurol* 337: 253-266
- Mirnic K., Middleton F.A., Marquez A., Lewis D.A., Levitt P. (2000). Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 28: 53-67
- Miyata T., Nakajima K., Mikoshiba K., Ogawa M. (1997). Regulation of purkinje cell alignment by reelin as revealed with CR-50 antibody. *J Neurosci* 17: 3599-3609

- Morimoto R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12: 3788-3796
- Mournier N. und Arrigo A.-P. (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress&Chaperones* 7: 167-176
- Müller R., Heinrich M., Heck S., Blohm D., Richter-Landsberg C. (1997). Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res* 288: 239-249
- Nakagami Y., Abe K., Nishiyama N., Matsuki N. (2000). Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation. *J Neurosci* 20: 2003-2010
- Neckers L. (2002). Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 8: S55-61
- Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26: 523-530
- Neuhoff V., Phillip K., Zimmer H.-G., Mesecke S. (1979). A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 360: 1657-1670
- Newman E.A. (2003). New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26: 536-542
- Nguyen M.D., Shu T., Sanada K., Lariviere R.C., Tseng H.C., Park S.K., Julien J.P., Tsai L.H. (2004). A NUDEL-dependent mechanism of neurofilament assembly regulates the integrity of CNS neurons. *Nat Cell Biol* 6: 595-608
- Nishimura R.N. und Dwyer B.E. (1996). Evidence for different mechanisms of induction of HSP70i: a comparison of cultured rat cortical neurons with astrocytes. *Mol Brain Res* 36: 227-239
- Nishimura R.N., Dwyer B.E., Clegg K.B., deVellis J. (1991). Comparison of the heat shock response in cultured cortical neurons and astrocytes. *Mol Brain Res* 9: 39-45
- Nollen E.A.A. und Morimoto R.I. (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* 115: 2809-2816
- Ohgoh M., Kimura M., Ogura H., Katayama K., Nishizawa Y. (1998). Apoptotic cell death of cultured cerebral cortical neurons induced by withdrawal of astroglial trophic support. *Exp Neurol* 149: 51-63
- Ohkubo N., Lee Y.-D., Morishima A., Terashima T., Kikkawa S., Tohyama M., Sakanaka M., Tanaka J., Maeda N., Vitek M.P., Mitsuda N. (2003). Apolipoprotein E and reelin ligands modulate tau phosphorylation through an apolipoprotein E receptor/disabled-1/glycogen synthase kinase-3 β cascade. *FASEB J* 17: 295-297
- Ohtsuka K. und Suzuki T. (2000). Roles of molecular chaperons in the nervous system. *Brain Res Bull* 53: 141-146
- Olney J.W. (2001). New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 23: 659-668
- Owen M.J., O'Donovan M., Gottesman I.I. (2003). *Psychiatric genetics and genomics*. Oxford: Oxford University Press 247-266

- Pandey P., Saleh A., Nakazawa A., Kumar S., Srinivasula S.M., Kumar V., Weichselbaum R., Nalin C., Alnemri E.S., Kufe D., Kharbanda S. (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19: 4310-4322
- Perkins D.O., Jeffries C., Sullivan P. (2005). Expanding the 'central dogma': the regulatory role of nonprotein coding genes and implications for the genetic liability to schizophrenia. *Mol Psychiatry* 10: 69-78
- Perng M.D., Cairns L., van den IJssel P., Prescott A., Hutcheson A.M., Quinlan R.A. (1999). Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and B-crystallin. *J Cell Sci* 112: 2099-2112
- Perrone-Bizzozero N.I., Isaacson T.V., Keidan G.M.O., Eriqat C., Meiri K.F., Savage D.D., Allan A.M. (1998). Prenatal ethanol exposure decreases GAP-43 phosphorylation and protein kinase C activity in the hippocampus of adult rat offspring. *J Neurochem* 71: 2104-2111
- Pesold C., Impagnatiello F., Pisu M.G., Uzunov D.P., Costa E., Guidotti A., Caruncho H.J. (1998). Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing γ -aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc Natl Acad Sci* 95: 3221-3226
- Pirkkala L., Nykänen P., Sistonen L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in the regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15: 1118-1131
- Pratt W.B. und Toft D.O. (2003). Regulation of signaling by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* 228: 111-133
- Quattrocchi C.C., Wannenes F., Persico A.M., Ciafré S.A., D'Arcangelo G., Farace M.G., Keller F. (2002). Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 277: 303-309
- Rakonczay Z. Jr, Boros I., Jarmay K., Hegyi P., Lonovics J., Takacs T. (2003). Ethanol administration generates oxidative stress in the pancreas and liver, but fails to induce heat-shock proteins in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 858-67
- Raine C.S. (1994). Neurocellular Anatomy. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. (eds.). *Basic Neurochemistry*, 5th Edition, Raven Press, New York
- Ransom B., Behar T., Nedergaard M. (2003). New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* 26: 520-522
- Reed Herbert K., Samali A., Gorman A. (2005). The role of Hsps in neuronal differentiation and development. In: *Heat shock proteins in neural cells* (ed. Richter-Landsberg C.) Landes Biosciences *in press*
- Rice S.R. und Curran T. (1999). Mutant mice with scrambled brains: understanding the signaling pathways that control cell positioning in the CNS. *Genes & Dev* 13: 2758-2773
- Rice S.R. und Curran T. (2001). Role of the reelin signalling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24: 1005-1039
- Richter-Landsberg C. (1988). Nerve growth factor-inducible, large external (NILE) glycoprotein in developing rat cerebral cultures. *Cell Tiss Res* 252: 181-190
- Richter-Landsberg C. und Goldbaum O. (2003). Stress proteins in neural cells: functional roles in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 60: 337-349

- Richter-Landsberg C. und Gorath M. (1999). Developmental regulation of alternatively spliced isoforms of mRNA encoding MAP2 and tau in rat brain oligodendrocytes during culture maturation. *J Neurosci Res* 56: 259-270
- Richter-Landsberg C. und Vollgraf U. (1998). Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp Cell Res* 244: 218-229
- Roberts R.C., Xu L., Roche J.K., Kirkpatrick B. (2005). Ultrastructural localization of reelin in the cortex in post-mortem human brains. *J Comparative Neurology* 482: 294-308
- Röskam S. und Koch M. (2005). Differential effects of chronic intermittent ethanol treatment during adolescence on sensorimotor gating and motor activity in rats postnatally exposed to ethanol. *Proceedings of the 6th Meeting of the German Neuroscience Society/ 30th Göttingen Neurobiology Conference 2005* eds: Zimmermann H. and Kriegstein K. *Neuroforum* 2005, 1 Suppl.: (332A)
- Rousseau S., Houle F., Kotanides H., Witte L., Waltenberger J., Landry J., Huot J. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 275: 10661-10672
- Sáez-Valero J., Costell M., Sjögren M., Andreasen N., Blennow K., Luque J.M. (2003). Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 72: 132-136
- Saleh A., Srinivasula S.M., Balkir L., Robbins P.D., Alnemri E.S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70. *Nat Cell Biol* 2: 476-483
- Samali A., Cai J., Zhivotovsky B., Jones D.P., Orrenius S. (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, HSP60 and HSP10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J* 18: 2040-2048
- Sari Y. und Zhou F.C. (2004). Prenatal alcohol exposure causes long-term serotonin neuron deficit in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 941-948
- Sarnat H.B., Born D.E. (1999). Synaptophysin immunocytochemistry with thermal Intensification: a marker of terminal axonal maturation in the human fetal nervous system. *Brain Dev* 21: 41-50
- Satoh J und Kim S.U. (1994). HSP72 induction by heat stress in human neurons and glia cells in culture. *Brain Res* 653: 243-250
- Satoh J.I. und Kim S.U., (1995). Differential expression of heat shock protein HSP72 in human neurons and glial cells in culture. *J Neurosci Res* 41: 805-818
- Savage D.D., Cruz L.L., Duran L.M., Paxton L.L. (1996). Effect of prenatal alcohol exposure on presynaptic mechanisms of long-term potentiation in hippocampus of adult rat offspring. *Soc Neurosci Abstr* 22: 328
- Sawa A. und Snyder S.H. (2002). Schizophrenia: Diverse approaches to a complex disease. *Science* 296: 692-695
- Sawant L.A., Hasgekar N.N., Vyasrayani L.S. (1994). Developmental expression of neurofilament and glial filament proteins in rat cerebellum. *Int J Dev Biol* 38: 429-437
- Schipper H.M. (2000). Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Exp Gerontology* 35: 821-830

- Schwartz A.L. und Ciechanover A. (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human disease. 50: 57-74
- Sharp F.R., Massa S.M., Swanson F.A. (1999). Heat-shock protein protection. Trends Neurosci 22: 97-99
- Sheller R.A., Smyers M.E., Grossfeld R.M., Ballinger M.L., Bittner G.D. (1998). Heat-shock protein in axoplasm: High constitutive levels and transfer of inducible forms from glia. J Comp Neurol 396: 1-11
- Shu T., Ayala R., Nguyen M.D., Xie Z., Gleeson J.G., Tsai L.H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. Neuron 44: 263-277
- Sinagra M., Verrier D., Frankova D., Korwek K.M., Blahos J., Weeber E.J., Manzoni O.J., Chavis P. (2005). Reelin, very-low-density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor 2 control somatic NMDA receptor composition during hippocampal maturation *in vitro*. J Neurosci 25: 6127-6136
- Slezak M. und Pfrieder F.W. (2003). New roles for astrocytes: Regulation of CNS synaptogenesis. Trends Neurosci 26: 531-535
- Sokolov B.P., Jiang L., Trivedi N.S., Aston C. (2003). Transcription profiling reveals mitochondrial, ubiquitin and signaling systems abnormalities in postmortem brains from subjects with a history of alcohol abuse or dependence. J Neurosci Res 72: 756-767
- Söti C., Sreedhart A.S., Csermely P. (2003). Apoptosis, necrosis and cellular senescence : chaperone occupancy as a potential switch. Aging Cell 2: 39-45
- Stahnke T. (2004). Oxidativer Stress in Oligodendrozyten und die Bedeutung bei demyelinisierenden Erkrankungen. Dissertation, Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg
- Summerton J., Weller D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7: 187-195
- Sutherland R.J., McDonald R.J, Savage D.D. (1997). Prenatal exposure to moderate levels of ethanol can have long-lasting effects on hippocampal synaptic plasticity in adult offspring. Hippocampus 7: 1-8
- Suzuki S., Li A.J., Ishisaki A., Hou X., Hasegawa M., Fukumura M., Akaike T., Imamura T. (2001). Feeding suppression by fibroblast growth factor-1 is accompanied by selective induction of heat shock protein 27 in hypothalamic astrocytes. Eur J Neurosci 13: 2299-308
- Takuma K., Baba A., Matsuda T. (2004). Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. Prog Neurobiol 72: 111-127
- Tissir F. und Goffinet A.M. (2003). Reelin and brain development. Nat Rev Neurosci 4: 496-505
- Torrey E.F., Barci B.M., Webster M.J., Bartko J.J., Meador-Woodruff J.H., Knable M.B. (2005). Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. Biol Psychiatry 57: 252-260
- Tremolizzo L., Carboni G., Ruzicka W.B., Mitchell C.P., Sugaya I., Tueting P., Sharma R., Grayson D.R., Costa E., Guidotti A. (2002). An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. Proc Natl Acad Sci 99: 17095-17100

- Tsuang M.T., Stone W.S., Faraone S.V. (2001). Genes, environment and schizophrenia. *Br J Psychiatry* 178: 18-24
- Tytell M., Greenberg S.G., Lasek R.J. (1986). Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res* 363: 161-164
- Ullian E.M., Sapperstein S.K., Christopherson K.S., Barres B.A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science* 291: 657-661
- Uher B.F. und Golden J.A. (2000). Neuronal migration defects of the cerebral cortex: a destination debacle. *Clin Genet* 58: 16-24
- Utsunomiya-Tate N., Kubo K.-i., Tate S.-i., Kainosho M., Katayama E., Nakajima K., Mikoshiba K. (2000). Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proc Natl Acad Sci* 97: 9729-9734
- Van Stipdonk M.J.B., Willems A.A., Plomp A.C., Van Noort J.M., Boog C.J.P. (2000). Tolerance controls encephalitogenicity of α B-crystallin in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 102: 103-111
- Venstrom K.A. und Reichardt L.F. (1993). Extracellular matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J* 7: 996-1003
- Verschuure P., Croes Y., van den IJssel P.R.L.A., Quinlan R.A., de Jong W.W., Boelens W.C. (2002). Translocation of small heat shock proteins to the actin cytoskeleton upon proteasomal inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 34: 117-128
- Vogel P., Dux E., Wiessner C. (1997). Effect of heat shock on neuronal cultures: importance of protein synthesis and HSP72 induction for induced tolerance and survival. *Metab Brain Dis* 12: 203-217
- Vollmer G., Schwabe K., Koch M., Richter-Landsberg C. (2005). Effect of antisense oligonucleotides on reelin translation and synaptic/dendritic protein expression in the rat brain. *Proceedings of the 6th Meeting of the German Neuroscience Society/ 30th Göttingen Neurobiology Conference 2005* eds: Zimmermann H. and Kriegstein K. *Neuroforum* 2005, 1 Suppl.: (336B)
- Voisin P.J., Pardue S., Macouillard F., Yehia G., Labouesse J., Morrison-Bogorad M. (1996). Differential expression of heat shock 70 proteins in primary cultures from rat cerebellum. *Brain Res* 739: 215-234
- Wang K. und Spector A. (2001). ATP causes small heat shock proteins to release denatured protein. *Eur J Biochem* 268: 6335-6345
- Weeber E.J., Beffert U., Jones C., Christian J.M., Förster E., Sweatt J.D., Herz J. (2002). Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 277: 39944-39952
- Weinberger D.R. (1987). Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44: 660-669
- Weinberger D.R. (1994). Schizophrenia as a neurodevelopmental disorder. In: Hirsch S.R. und Weinberger D.R.(eds.). *Schizophrenia*. Blackwood, London, 293-323
- Weller N.K. (1988). A 70 kDa microtubule-associated protein in NIL8 cells comigrates with the 70 kDa heat shock protein. *Biol Cell* 63: 307-317
- Wen Z. und Kim H.-Y. (2004). Alterations in hippocampal phospholipid profile by prenatal exposure to ethanol. *J Neurochem* 89: 1368-1377

- Williams K.L., Rahimtula M., Mearow K.M. (2005). Hsp27 and axonal growth in adult sensory neurons *in vitro*. BMC Neurosci 6: doi:10.1186/1471-2202-6-24
- Williams R.S., James A. Thomas J.A., Fina M., German Z., Benjamin I.J. (1993). Human heat shock protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress. J Clin Invest 92: 503-508
- Wischmeyer P.E., Musch M.W., Madonna M.B., Thisted R., Chang E.B. (1997). Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. Am J Physiol 272: G879-884
- Wong E. V., Schaefer A. W., Landreth G., Lemmon V. (1996). Involvement of p90*rsk* in neurite outgrowth mediated by the cell adhesion molecule L1. J Biol Chem 271: 18217-18223
- Wytenbach A., Sauvageot O., Carmichael J., Diaz-Latoud C., Arrigo A.-P., Rubinsztein D.C. (2002). Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. Hum Mol Genet 11: 1137-1151
- Yenari M.A., Giffard R.M., Steinberg G.K. (1999). The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). Molecular Med Today 5: 525-531
- Young J.C., Moarefi I., Hartl F.U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. J Cell Biol 154: 267-273
- Zhang Z., Casey D.M., Julien J.P., Xu Z. (2002). Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L. J Comp Neurol 450: 144-152
- Zheng Y.-I., Li B.-S., Pant V., Pant H.C. (2003). Phosphorylation of the head domain of neurofilament protein (NF-M). J Biol Chem 278: 24026-24032
- Zilles K. und Rehkämper G. (1998). Funktionelle Neuroanatomie, 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Zimmermann H. (1996). Molekulare Funktionsträger der Nervenzelle. In: Dudel J., Menzel R., Schmidt R.F. (Hrsg.). Neurowissenschaft. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 33-61

7. Anhang

Tab. 7 (zu Abb. 17a): mRNA-Expression von HSPs in Neuronen *in vitro* nach HS und OS. Mittelwerte (MW) in Prozent zu „HS 3h“ in Relation zu GAPDH und Standardabweichungen (SD).

	HSP90	HSP70	HSP32	HSP25	α B-Crystallin
MW [%]					
Co	86,7	12,6	549,8	32,5	53,1
HS 3h	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
HS 7h	81,0	64,7	727,8	77,4	48,7
OS 3h	70,5	32,9	144,8	36,9	44,9
OS 7h	64,7	23,6	1779,8	36,9	38,9
SD [%]					
Co	21,2	13,3	10,2	21,9	16,4
HS 3h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HS 7h	13,4	5,1	103,8	6,2	22,1
OS 3h	23,4	18,9	91,0	14,0	24,1
OS 7h	25,5	25,5	242,7	28,1	23,5

Tab. 8 (zu Abb. 17b): mRNA-Expression von HSPs in Astrozyten *in vitro* nach HS und OS. Mittelwerte (MW) in Prozent zu „HS 3h“ und Standardabweichungen (SD) in Relation zu GAPDH.

	HSP90	HSP70	HSP32	HSP25	α B-Crystallin
MW [%]					
Co	120,5	19,3	26,8	60,1	43,6
HS 3h	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
HS 7h	83,9	64,6	24,4	81,1	62,7
OS 3h	72,7	20,2	53,7	51,0	55,2
OS 7h	85,2	15,4	66,9	61,3	68,8
SD [%]					
Co	22,2	6,0	14,1	15,5	28,5
HS 3h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HS 7h	0,9	1,1	10,9	10,0	14,4
OS 3h	16,8	4,5	24,1	24,0	31,7
OS 7h	7,3	0,6	14,7	13,9	20,3

Tab. 9 (zu Abb. 24b): Einfluss von MG132 auf die HSP-Induktion in Neuronen und Astrozyten. Prozentuale Werte der HSP-Proteine in Bezug auf die Astrozyten Kontrolle (ein Versuch).

	HSP25	α B-Crystallin
Astrozyten Co	100,0	100,0
Astrozyten + MG132	125,5	184,0
Neurone + MG132	38,9	12,6

Tab. 10 (zu Abb. 26a,b): mRNA-Expression von HSPs in Neuronen und Astrozyten *in vitro* nach Behandlung mit MG132. Mittelwerte (MW) aus drei Versuchen in Prozent zu „MG132 3h“ in Relation zu GAPDH, mit Standardabweichungen (SD).

	Neurone			Astrozyten		
	HSP32	HSP25	α B-Crystallin	HSP32	HSP25	α B-Crystallin
MW						
Co	38,9	52,7	50,7	18,6	75,4	73,1
MG132 3h	100,0	100,0	100	100,0	100,0	100,0
MG132 7h	1303,1	187,7	96,3	88,2	100,4	141,4
SD						
Co	1,2	11,7	37,0	5,9	12,6	30,0
MG132 3h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MG132 7h	406,8	56,9	13,7	21,6	10,0	49,6

Curriculum vitae

Grit Vollmer

Heinrich-Neu-Str. 2
69123 Heidelberg

Geburtsdatum: 24.11.1976
Geburtsort: Recklinghausen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1996 Abitur, SZ Rübekamp, Bremen

1996 – 2001 Studium der Biologie, Universität Bremen
1998 Vordiplom
2001 Diplomarbeit, AG Molekulare Neurobiologie/
Neurochemie, Frau Prof. Dr. C. Richter-Landsberg,
Universität Oldenburg, „Proteinveränderungen bei
demyelinisierenden Erkrankungen“

2002 – 2005 Promotionsstudium, Universität Oldenburg
AG Molekulare Neurobiologie/Neurochemie, Prof. Dr.
Christiane Richter-Landsberg
Kooperation: Institut für Neuropharmakologie, Prof. Dr.
Michael Koch, Universität Bremen

Publikationen

Abstracts zu Tagungsbeiträgen:

Vollmer G., Goldbaum O., Richter-Landsberg C. (2003). Heat shock proteins in cultured rat brain neurons: Developmental expression and differential regulation after stress. Proceedings of the 5th Meeting of the German Neuroscience Society/ 29th Göttingen Neurobiology Conference, eds: Elsner N. und Zimmermann H., Thieme Verlag (Poster 880)

Vollmer G. and Richter-Landsberg C. (2004). Differential stress response of cultured rat brain neural cells and heat shock protein association with the cytoskeleton. Annual International Conference GBM Study Group Neurochemistry, Leipzig, Germany. Int J Dev Neurosci

Vollmer G., Schwabe K., Koch M., Richter-Landsberg C. (2005). Effect of antisense oligonucleotides on reelin translation and synaptic/dendritic protein expression in the rat brain. Proceedings of the 6th Meeting of the German Neuroscience Society/ 30th Göttingen Neurobiology Conference, eds: Zimmermann H. und Kriegstein K., Neuroforum 2005, 1 Suppl.: (336B)

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Heidelberg, 20.10.2005

Grit Vollmer

Summary

The investigations in this study were carried out to contribute to the understanding of neurodevelopmental disorders. Neurodevelopmental disorders can develop from a combination of harmful environmental factors and genetic predisposition. Many environmental factors like chemical agents can induce cellular stress. Cells normally react to stress by the induction of heat shock proteins (HSPs). HSPs also have important functions under physiological conditions and in brain development. HSPs may be stress specific or cell type specific expressed, i.e. they can be found constitutively or inducible especially either in neurons or glia or in both cell types. Interactions between neurons and glia are important for normal development and function of the nervous system. Under pathological conditions and neurodevelopmental disorders this interaction might be disturbed and lead to functional losses. For example changes in the extracellular matrix (ECM) can lead to the disturbance of neuron-glia- or neuron-neuron-interactions.

In the present study, the reaction of neurons to different stressors, like heat shock (HS), oxidative stress (OS) and proteasomal stress, was investigated and compared to the stress response of astrocytes. Furthermore, the expression of Reelin, a glycoprotein of the ECM, in the neuronal cultures was analyzed, and the consequences of suppressing the synthesis of Reelin with antisense oligonucleotides (AS-ODNs) for the cells were investigated. Reelin normally plays a role in brain development, where it is an extracellular signalling molecule for migrating neurons. In the adult brain, the protein seems to be important for dendritic spine plasticity and synaptic plasticity and therefore for LTP and memory. Reelin is found to be decreased in the neurodevelopmental disorder schizophrenia.

The data showed that, *in vitro* HSPs were already constitutively differentially expressed in neurons and glia. In contrast to neurons, the sHSPs HSP25 and α B-Crystallin were found constitutively in astrocytes. Additionally, stress specific and cell type specific stress responses were observed. In neurons HS specifically induced HSP70, HSP25 and α B-Crystallin, and OS induced particularly HSP32 and to a lower extent HSP25. In astrocytes after HS HSP70

and α B-Crystallin, and after OS HSP32 and α B-Crystallin were induced. In both cell types proteasomal stress led to the induction of all HSPs induced by HS and OS. Astrocytes in culture respond to stress by a stronger induction of HSPs.

An important finding of these investigations was that under physiological as well as under stress astrocytes contained higher endogenous concentrations of HSPs than neurons. Also, astrocytes were less susceptible to stressful situations than neurons, as shown by morphological examination and investigation of apoptotic cell death. This is probably linked to the high expression of HSPs in astrocytes. Under physiological conditions as well as after stress, particularly high amounts of HSP25 were found in astrocytes. HSP25 can therefore be used as a marker for astrocytes in histological investigations.

In neurological disorders where stress is involved, cytoskeletal changes can often be observed. HSPs play a role in protecting the cytoskeleton. An important finding of the present study was that astrocytes, but not neurons already constitutively expressed the cytoskeleton-associated sHSPs. HSP25 was associated with the cytoskeleton only in astrocytes. Mainly an association with the MT, but also with glia filaments was observed. In astrocytes the organization of the microtubule network was preserved also under stress, which points to a protective function of HSP25 particularly in astrocytes. In addition other HSPs like HSP70 and α B-Crystallin which can also interact with the cytoskeleton could contribute to the protection of the cytoskeleton. Neurons with their elaborated cytoskeleton are more vulnerable and respond stronger to toxic influences due to the comparatively low endogen concentration of HSPs. Therefore, aversive influences which interfere with the brain development, mainly affect nerve cells, and their damage can lead to functional losses.

The data presented here indicate that Reelin can be detected in neuronal cell cultures in soluble form in the culture media as well as bound in cellular form. But it seems not to be necessary for the normal development and differentiation of neurons *in vitro*, however, suppression of extracellular Reelin by AS-ODNs led to morphological changes of neurons. Possibly the suppression of Reelin with AS-ODNs was too ineffective, what is supported by the finding that intracellular Reelin was not affected. Also, experiments with protease inhibitors

which suppressed the appearance of extracellular Reelin did not show any influence on the morphological differentiation of the nerve cells.

To summarize the fundamental data of this study show that nerve cells differ in their stress response from glia cells. Probably due to the low expression of HSPs they react to toxic stimuli by morphological changes and apoptotic cell death, and therefore they are vulnerable targets in stress situations which can also lead to neurodevelopmental disorders. If an overexpression of HSPs might protect neurons from damage remains to be investigated and is object to further examinations.