

**„Charakterisierung der
neuroprotektiven Eigenschaften des
Corticotropin Releasing Hormons“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

von

Regina Hanstein
geboren am 17. Mai 1980 in Erfurt

Mainz, im Juni 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, angefertigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht, die im Anhang aufgelistet sind.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das CRH-System	1
1.1.1 Das Corticotropin Releasing Hormon (CRH)	1
1.1.2 CRH-verwandte Peptide: die Urocortine	2
1.1.3 Die CRH-Rezeptoren	2
1.1.4 Das CRH-Bindungsprotein	4
1.2 CRH-induzierte Signalkaskaden	5
1.3 Auswirkungen pathophysiologischer Veränderungen des CRH-Systems	6
1.4 CRH & Neuroprotektion	7
1.5 CRH-Zielgene – das Neurotrophin BDNF	7
1.6 Weitere CRH-Zielgene – die Gap Junction-Proteine	9
1.6.1 Aufbau und Struktur von Gap Junctions	10
1.6.2 Das Gap Junction-Protein Connexin43 (Cx43)	12
1.6.3 Die Regulation des Cx43	13
1.6.4 Physiologische Funktionen und Regulation astrozytärer Gap Junctions	14
1.6.5 Physiologische Funktionen und Regulation neuronaler Gap Junctions	16
1.6.6 Einfluss von Gap Junctions auf die Neuroprotektion bzw. Apoptose	16
1.6.7 Einfluss von CRH auf Cx43	17
1.7 Pathogene Mechanismen	18
1.7.1 Oxidativer Stress	18
1.7.2 Exzitotoxizität	19
1.8 Der Hippocampus – Modell zur Untersuchung CRH-induzierter Neuroprotektion	20
1.9 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Materialien & Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Chemikalien & Kits	23
2.1.2 Geräte	25

2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellbiologische Methoden	26
2.2.1.1 Klonale Zelllinie	26
2.2.1.2 Primäre Zellkulturen	27
2.2.1.3 Transfektion von primären und klonalen Zellen mit siRNA	29
2.2.1.4 Organotypische hippocampale Schnittkulturen	29
2.2.2 Tiere	30
2.2.2.1 BDNF-defiziente Mäuse	30
2.2.2.2 CRH-überexprimierende Mäuse	31
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	32
2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien & Säugerzellen	32
2.2.3.2 Reverse Transkription/Synthese von cDNA	32
2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.3.4 RT-PCR	34
2.2.3.5 Real Time PCR-Analyse	34
2.2.3.6 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA	34
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	35
2.2.4.1 Proteinpräparation	35
2.2.4.2 Western Blot-Analyse	36
2.2.4.3 Immunhistochemie	38
2.2.5 Auslösen akuten exzitotoxischen Stresses mittels Kainat-Injektion	39
2.2.6 Cardiale Perfusion & Herstellung von Hirnschnittpräparaten	40
2.2.7 Nissl- & DAPI-Färbung von Gehirnschnitten	41
2.2.8 Immunhistochemische Färbungen von Gehirnschnitten	42
2.2.9 Zytotoxizitätstest - MTT	42
2.2.10 Farbstoff-Transfer-Tests	43
2.2.10.1 Mikroinjektion	43
2.2.10.2 Scrape loading	44
3. Ergebnisse	46
3.1 Die CRH-induzierte Neuroprotektion gegenüber akuter Exzitotoxizität <i>in vivo</i>	46
3.1.1 CRH-Überexpression verkürzt die Dauer Kainat-induzierter Epilepsie	46
3.1.2 CRH-Überexpression schützt hippocampale Neurone vor Exzitotoxizität	47
3.1.3 Hochregulation der BDNF-Proteinexpression nach exzitotoxischem Stress	51
3.1.4 CRH-Überexpression induziert eine erhöhte BDNF-Proteinexpression	52
3.1.5 BDNF als Mediator der Neuroprotektion	53
3.2 Identifizierung von Connexin43 (Cx43) als weiteres CRH-Zielgen	54
3.2.1 CRH induziert eine gesteigerte Expression von Cx43	54
3.2.2 CRH induziert den Aufbau von Cx43-Gap Junction-Plaques	56
3.2.3 CRH und Urocortin steigern die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions	58
3.2.4 CRH induziert die Hochregulation der Cx43-Expression über den CRH-R1	60
3.2.5 Einfluss von Proteinkinasen auf die CRH-induzierte Cx43-Expression	60
3.2.6 Effekte von CRH auf Cx43 in Astrozyten und organotypischen Schnittkulturen	63
3.2.7 Effekte von CRH auf die Cx43-Expression <i>in vivo</i>	63
3.3 Die CRH-induzierte Neuroprotektion über Regulation der Gap Junctions	65
3.3.1 CRH induziert Neuroprotektion über das Gap Junction-Protein Cx43	65
3.3.2 Einfluss der Gap Junction-Kommunikation auf die CRH-induzierte Neuroprotektion	68
3.3.3 Das astrozytäre Cx43 vermittelt die neuroprotektiven CRH-Effekte	70
3.3.4 Identifizierung potentieller Mechanismen der Cx43-vermittelten Neuroprotektion	71

4. Diskussion	74
4.1 Analyse der neuroprotektiven CRH-Eigenschaften	74
4.2 Untersuchung der CRH-induzierten Neuroprotektion <i>in vivo</i>	76
4.2.1 Einfluss der CRH-Überexpression auf die Kainat-induzierte Epilepsie	76
4.2.1.1 Schnelle Entstehung epileptischer Anfälle in CRH-überexprimierenden Mäusen	76
4.2.1.2 Die CRH-Überexpression verkürzt die Dauer der Epilepsie	77
4.2.2 Auswirkungen der CRH-Überexpression auf die Neuroprotektion	78
4.2.3 Bedeutung von BDNF für die CRH-induzierte Neuroprotektion	79
4.2.4 BDNF als Mediator der Neuroprotektion im Hippocampus	80
4.3 Bedeutung von Connexin43 (Cx43) als weiteres CRH-Zielgen	82
4.3.1 Einfluss von CRH auf die Cx43-Expression und die Gap Junction-Funktion	82
4.3.2 Mechanismen der CRH-induzierten Modulation des Cx43-Proteins	83
4.3.3 Regulation der Cx43-Expression über PKA- und MAP-Kinase-Signalwege	84
4.3.4 Physiologische Funktion der CRH-induzierten Cx43-Regulation	84
4.3.4.2 Bedeutung von Cx43-Halbkanälen für die Apoptose	86
4.3.4.3 Kanal-unabhängige Funktionen von Cx43	87
4.3.5 Wirkung des Gap Junction-Hemmstoffs Carbenoxolon	88
4.3.6 Bedeutung der astrozytären Gap Junction-Kommunikation für die Neuroprotektion	89
4.3.7 Mechanismen der Neuroprotektion über eine CRH-induzierten Cx43-Expression	90
4.3.8 Relevanz von Cx43 für die Pathologie neurodegenerativer Krankheiten	92
4.4 Ausblick	94
5. Zusammenfassung	97
6. Literaturverzeichnis	98
7. Anhang	118
7.1 Abkürzungsverzeichnis	118
7.2 Danksagung	119
7.3 Erklärung	120
7.4 Lebenslauf	121
7.5 Publikationen	122

1. Einleitung

1.1 Das CRH-System

1.1.1 Das Corticotropin Releasing Hormon (CRH)

Das Corticotropin Releasing Hormon (CRH), ein Neuropeptid bestehend aus 41 Aminosäuren, wurde 1981 als Hauptregulator der hypothalamisch-hypophysären-adrenalen Achse (engl. Bezeichnung **hypothalamic-pituitary-adrenal axis**, HPA-Achse) entdeckt (Abb. 1.1 A; Vale et al., 1981). Die HPA-Achse ist ein wichtiger Bestandteil des neuroendokrinen Systems von Säugetieren und kontrolliert die Stressreaktion sowie die interne Homöostase. Änderungen der Homöostase oder äußere Stresseinwirkung führen zur Ausschüttung des CRH aus Neuronen des Nucleus paraventricularis im Hypothalamus und dadurch zur Aktivierung des HPA-Systems, wodurch stressbedingte Verhaltens-, Stoffwechsel- und cardiovaskuläre Änderungen hervorgerufen werden (Holsboer, 1999). Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird CRH jedoch auch in Neuronen vieler weiterer Gehirnregionen exprimiert und agiert dort als exzitatorischer Neuromodulator (Abb. 1.1 B; Swanson et al., 1983; Sakanaka et al., 1986), wodurch es auch für die neuronale Plastizität, das Lernen und das Gedächtnis *in vivo* von Bedeutung ist (Behan et al., 1995). CRH scheint auch einen Einfluss auf das Überleben von Neuronen zu haben, denn eine neuroprotektive Wirkung des CRH gegenüber oxidativem Stress konnte bereits gezeigt werden (Bayatti et al., 2003). Die CRH-induzierte Neuroprotektion wird in Kapitel 1.4 näher betrachtet.

Auch in der Peripherie wird CRH in vielen Geweben wie Immunzellen (Baigent, 2001), der Haut (Slominski et al., 2001), dem Endometrium (Gravanis et al., 2001) und der Plazenta (Sasaki et al., 1988) gebildet und reguliert somit die Immunantwort, die Körpertemperatur und den Geburtsvorgang (Richard et al., 2000; Baigent, 2001).

Die diversen physiologischen Funktionen des CRH belegen seine duale Rolle als Neurotransmitter und Hormon.

1. Einleitung

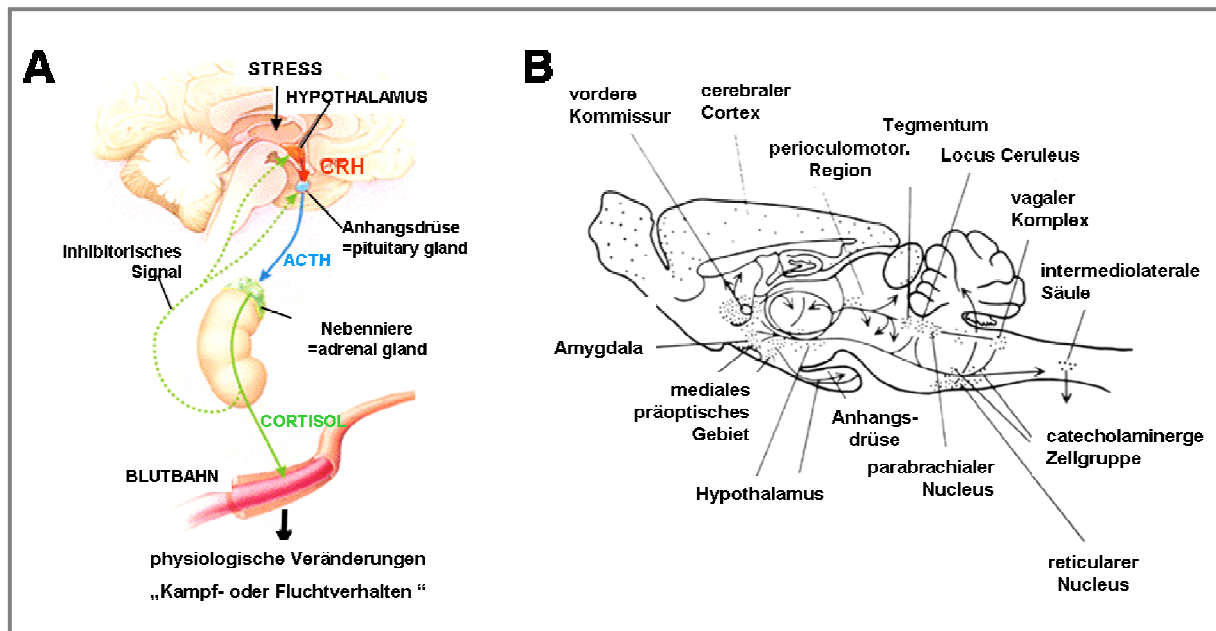


Abb. 1.1 Stress-induzierte Aktivierung der HPA-Achse und Verteilung CRH-exprimierender Neurone im Rattenhirn

A, Änderungen der internen Homöostase oder äußere Stresseinwirkung vermitteln über neurochemische Signalwege die Freisetzung von CRH aus Neuronen des Hypothalamus. CRH stimuliert die Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus der Hypophyse. ACTH induziert daraufhin die Sekretion von Glucocorticoiden und Androgenen aus der Nebennierenrinde, den letzten Schritt der hormonellen Achse vom Hypothalamus über die Hypophyse bis zur Nebennierenrinde (HPA-Achse; Rivier et al., 1982; Pavlov et al., 1986). Abb. nach Institut für Psychiatrie, Universität Leiden **B**, CRH-exprimierende Neurone und ihre Projektionen zu anderen Hirnregionen sind in einem Sagittalschnitt des Rattenhirns angegeben. Abb. nach De Souza und Grigoriadis, American College of Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress, 2000

1.1.2 CRH-verwandte Peptide: die Urocortine

In Säugetieren konnten weitere CRH-verwandte Peptide, die Urocortine, Ucn I, II und III, identifiziert werden (Vaughan et al., 1995; Lewis et al., 2001; Reyes et al., 2001). Sie zeigen lediglich eine moderate Aminosäuresequenz-Homologie zu CRH (34 bis 43%), sind aber strukturell ähnlich. Die Urocortine werden – wie CRH – sowohl im ZNS als auch in der Peripherie gebildet, zeigen aber kaum überlappende Expression mit CRH (Skelton et al., 2000; Li et al., 2002; Fukuda et al., 2005). Tierstudien mit Ucn I-defizienten Mäusen zeigten zudem, dass die Urocortine für die Regulation der Appetitkontrolle und des kardiovaskulären Systems von Bedeutung sind (Behan et al., 1995; Spina et al., 1996; Bale et al., 2004).

1.1.3 Die CRH-Rezeptoren

CRH und CRH-verwandte Peptide regulieren ihre diversen biologischen Funktionen über Aktivierung der CRH-Rezeptoren (CRH-R), die sieben Transmembrandomänen besitzen und

1. Einleitung

an G-Proteine gekoppelt sind (Abb. 1.2). In Säugetieren gibt es zwei CRH-R-Typen, den CRH-R1 und CRH-R2, die von verschiedenen Genen codiert werden und gewebespezifisch in unterschiedlichen Spliceformen vorliegen (Lovenberg et al., 1995a; Lovenberg et al., 1995b; Chen et al., 2005). Der CRH-R1 existiert in den Splicevarianten α bis h, während der CRH-R2 in den Spliceformen α , β und γ vorliegt. Beide CRH-Rezeptortypen haben eine Sequenzhomologie von 70%, jedoch weisen ihre extrazellulären N-Termini, die für die Ligandenbindung wichtig sind, nur eine geringe Homologie auf. Ihre pharmakologischen Eigenschaften sind daher sehr unterschiedlich. Der CRH-R1 bindet CRH und Ucn I mit gleich hoher Affinität ($K_d = 150$ pM; Chalmers et al., 1996), aber nicht Ucn II und Ucn III. Der CRH-R2 bindet alle Urocortine mit signifikant höherer Affinität ($K_d = 200$ pM) als CRH; Urocortine sind somit die natürlichen Liganden dieses Rezeptors.

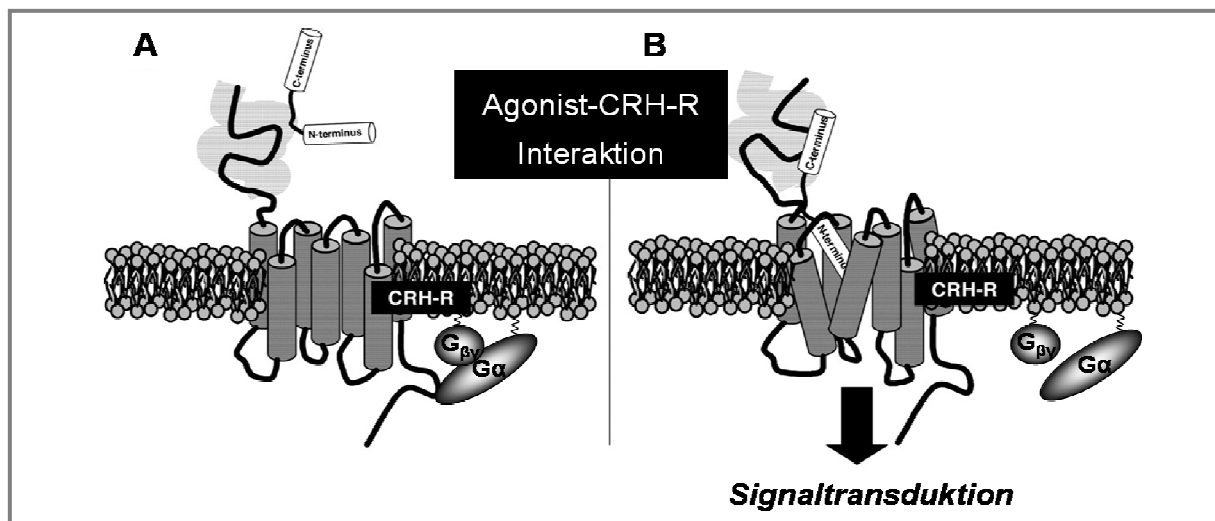


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Bindung von Agonisten an die CRH-Rezeptoren (CRH-R)

A, CRH-R-Agonisten binden spezifisch an den N-Terminus des CRH-R. **B**, Durch die Interaktion zwischen den Transmembranhelices des Rezeptors und dem N-Terminus des Liganden wird die Signaltransduktionskaskade ausgelöst. Abb. nach Hillhouse und Grammatopoulos, 2006

Auch die Expression beider CRH-Rezeptoren im ZNS unterscheidet sich; hohe Proteinspiegel des CRH-R1 sind im Neocortex, Cerebellum, Hippocampus und sensorischen Strukturen zu finden, während der CRH-R2 vorwiegend in subcorticalen Strukturen exprimiert wird (Behan et al., 1996; Steckler und Holsboer, 1999; Van Pett et al., 2000). Das impliziert verschiedene physiologische Funktionen der Rezeptoren, wie über die unterschiedlichen Phänotypen CRH-R1- oder CRH-R2-defizienter Mäuse bestätigt werden konnte. Während CRH-R1-defiziente Mäuse ein vermindertes Angstverhalten und eine Störung der HPA-Achse zeigen (Smith et al., 1998; Timpl et al., 1998), weisen CRH-R2-

1. Einleitung

defiziente Mäuse ein erhöhtes Angstverhalten und eine beschleunigte Aktivierung der HPA-Achse auf (Bale et al., 2000; Coste et al., 2000; Kishimoto et al., 2000).

1.1.4 Das CRH-Bindungsprotein

Für alle Wirbeltierklassen wurde ein hoch konserviertes CRH-Bindungsprotein (CRH-BP; 37 kDa) beschrieben, das CRH und Ucn I mit hoher Affinität *in vivo* bindet (Behan et al., 1995; Behan et al., 1996) und eine überlappende Expression mit CRH und Ucn I zeigt. CRH-BP bindet 40-90% des totalen CRH, zudem sind die CRH-BP-Proteinspiegel in vielen humanen Gehirnregionen 10-fach höher als die CRH-Proteinspiegel (Suda et al., 1988). CRH-BP agiert somit als negativer Regulator von CRH *in vivo* (Woods et al., 1994), indem es die „freie“ CRH-Konzentration moduliert und die synaptischen oder endokrinen Aktionen von CRH oder Ucn I beeinflusst (Lovejoy et al., 1998).

Eine Übersicht über alle Komponenten des CRH-Systems und dessen Bedeutung in Säugetieren zeigt die Abb. 1.3.

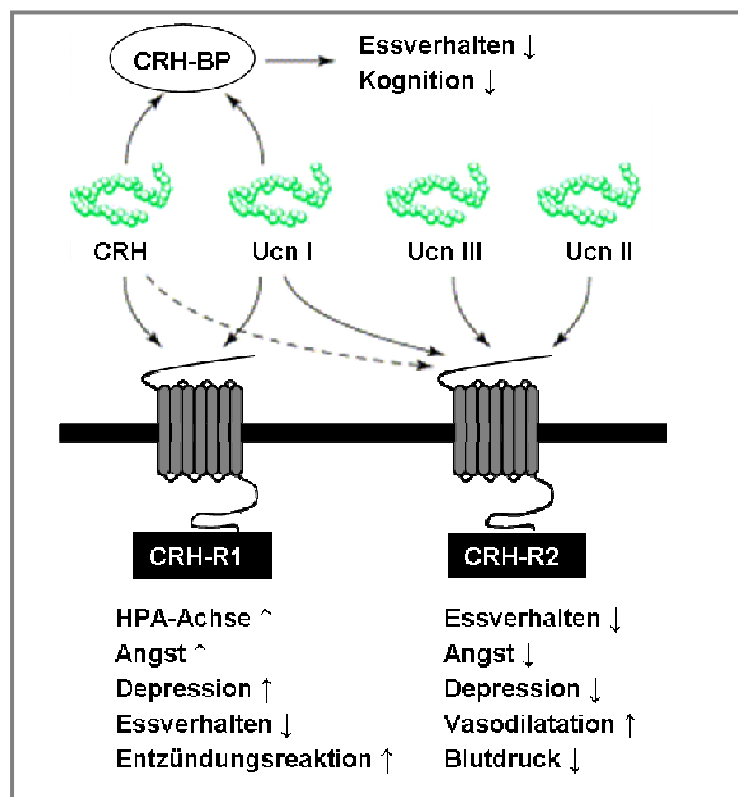


Abb. 1.3 Komponenten des CRH-Systems und seine physiologische Bedeutung

Wechselwirkungen zwischen CRH, Ucn I, Ucn II und Ucn III mit den CRH-Rezeptoren (CRH-R1 und CRH-R2) und mit dem CRH-Bindungsprotein (CRH-BP). Abb. nach Dautzenberg and Hauger, 2002

1. Einleitung

1.2 CRH-induzierte Signalkaskaden

Die Bindung von CRH und CRH-verwandten Peptiden induziert die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten CRH-Rezeptoren. Die Kopplung der CRH-Rezeptoren an heterotrimere G-Proteine erfolgt gewebespezifisch und ist dynamisch reguliert; die CRH-Rezeptoren können an folgende $G\alpha$ -Proteine gekoppelt sein: $G\alpha_s$, $G\alpha_o$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{i1/2}$ und $G\alpha_z$ (Grammatopoulos et al., 2001; Blank et al., 2003). Die Vielzahl der Interaktionen zwischen CRH-Rezeptoren und G-Proteinen zeigt das enorme Potential des CRH/CRH-Rezeptor-Systems, verschiedene Signalwege zu aktivieren.

Die meisten physiologischen Funktionen von CRH im ZNS werden über Bindung des CRH an den CRH-R1 vermittelt. Diese Interaktion führt zur Aktivierung von gekoppelten $G\alpha_s$ -Proteinen und nachfolgend zur Stimulation des AC/cAMP/PKA-Signalweges (Adenylatcyclase = AC; cyclic AMP = cAMP; Proteinkinase A = PKA; Millan et al., 1987; Kuryshev et al., 1995). Es wurde bereits gezeigt, dass die PKA über Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB Einfluss auf die Transkriptionsregulation zahlreicher Gene nehmen kann, wie z.B. auf die Expression des Transkriptionsfaktors cFos (Boutillier et al., 1991) und des Neurotrophins BDNF (Bayatti et al., 2005; Abb. 1.4 A).

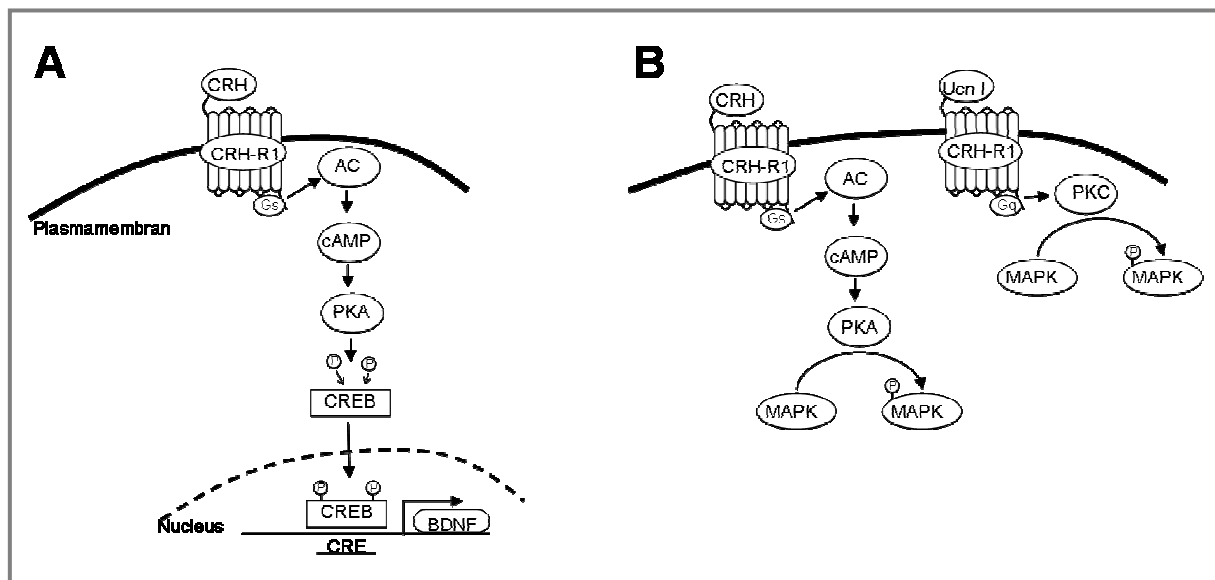


Abb. 1.4 Schematische Darstellung CRH- oder Ucn I-induzierter Signalkaskaden

A, Induktion des AC/cAMP/PKA-Signalweges, der über Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB Einfluss auf die Transkriptionsregulation vieler Gene, z.B. BDNF nehmen kann. **B**, Gewebespezifische Induktion des MAPK-Signalweges: Aktivierung der MAPK über den AC/cAMP/PKA-Signalweg in corticotropen Zellen (Kovalovsky et al., 2002) und über den PKC-Signalweg im Myometrium (Grammatopoulos et al., 2000). Abb. nach Bayatti et al., 2005

1. Einleitung

CRH kann gewebespezifisch auch viele andere Signalwege aktivieren; dazu gehören die PKC-, PKB/Akt-, ERK- und p38 MAPK-Signalwege (Kiang, 1997; Grammatopoulos et al., 1999; Malagoli et al., 2000; Makrigiannakis et al., 2001; Karteris et al., 2004; Abb. 1.4 B). Über die CRH-induzierte Aktivierung extrazellulär regulierter Proteinkinasen (ERK1/2) werden wichtige physiologische Funktionen, wie die Cardioprotektion (Brar et al., 2004), synaptische Plastizität (English und Sweatt, 1997), Verhaltens- und Gedächtnis-Adaption nach Stress (Sananbenesi et al., 2003) und Neuroprotektion (Elliott-Hunt et al., 2002) vermittelt. Für viele der CRH-aktivierten Signalwege sind die Zielgene jedoch bisher nicht bekannt.

1.3 Auswirkungen pathophysiologischer Veränderungen des CRH-Systems

Vielen psychischen Erkrankungen liegen Störungen des CRH-Systems zugrunde (Holsboer, 2003). Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen konnten Beeinträchtigungen des CRH-Systems identifiziert werden (De Souza et al., 1986).

Klinische Studien über psychische Erkrankungen bewiesen bereits einen kausalen Zusammenhang zwischen chronischer Depression oder Angststörungen und der CRH-Hypersekretion, die mit erhöhter HPA-Achsen-Aktivität und Hypophysen-/Nebennierenrinde-Hypertrophie einhergeht (Owens und Nemeroff, 1993; Behan et al., 1996; Steckler und Holsboer, 1999). Die psychopathologischen Effekte des CRH werden über den CRH-R1 vermittelt, da der Einsatz von selektiven CRH-R1-Antagonisten typische Symptome der Depression unterdrücken (Zobel et al., 2000).

Pathophysiologische Veränderungen des CRH-Systems wurden auch bei neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimer Demenz (AD) und der Parkinson Krankheit beobachtet (Bissette et al., 1985; Whitehouse et al., 1987). AD-Patienten und Tierstudien zur AD zeigten in betroffenen Gehirnregionen wie dem cerebralen Cortex eine Reduktion der CRH-Level (De Souza et al., 1986) und einen reziproken Anstieg der CRH-Rezeptorexpression (Bissette et al., 1985; De Souza et al., 1986; De Souza et al., 1987; Whitehouse et al., 1987). Die Reduktion der CRH-Konzentration in der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) dient als ein biochemischer Marker der AD (Mouradian et al., 1986; Davis et al., 1999). Zudem konnte eine Korrelation zwischen reduzierten CSF-CRH-Leveln mit größeren kognitiven Beeinträchtigungen bewiesen werden (Pomara et al., 1989). Zusätzlich gibt es in betroffenen Hirnregionen von AD-Patienten pathologisch veränderte CRH-immunopositive Neurone und auch die Anzahl von CRH-positiven Fasern ist reduziert

1. Einleitung

(Bissette et al., 1985; Powers et al., 1987). Erste Untersuchungen zeigten, dass eine Erhöhung der freien CRH-Konzentration positive Effekte auf Lernen und Gedächtnis *in vivo* hat (Behan et al., 1995). Eine therapeutische Erhöhung des CRH-Spiegels im Gehirn könnte sich daher positiv auf den Verlauf neurodegenerativen Krankheiten auswirken.

1.4 CRH & Neuroprotektion

Die physiologische Freisetzung von CRH im Cortex und Regionen des limbischen Systems unterstützt *in vivo* die Lern- und Merkfähigkeit (Lee et al., 1992; Behan et al., 1995; Radulovic et al., 1999). Zudem fördert CRH die neuronale Exzitabilität, sorgt für Bildung neuer Synapsen und ist an der Langzeitpotenzierung (engl. Bezeichnung Long Term Potentiation, LTP) und an der Langzeitdepression (engl. Bezeichnung Long Term Depression, LTD) im Hippocampus und Cerebellum beteiligt (Aldenhoff et al., 1983; Wang et al., 1998; Miyata et al., 1999; Wang et al., 2000). LTP und LTD sind Formen synaptischer Plastizität, die die Informationsspeicherung des ZNS nachhaltig modulieren. Darüber hinaus demonstrieren einige Studien neuroprotektive Eigenschaften von CRH gegenüber oxidativem Stress und nach ischämischen Reperfusionverletzungen oder Hypoxie *in vitro*, die über den CRH-R1 vermittelt werden (Fox et al., 1993; Lezoualc'h et al., 2000; Pedersen et al., 2001; Bayatti et al., 2003). Insgesamt zeigt sich, dass CRH als neuronaler Modulator wirkt und auch die Protektion von Neuronen induzieren kann.

Einige Signalwege, die für die neuroprotektiven Effekte des CRH verantwortlich sind, wurden zum Teil bereits identifiziert. Eine CRH-vermittelte PKA-Aktivierung sorgt für die Stimulation von Proteinen, die an der Modulation von neuronalem Zellüberleben beteiligt sind wie CREB (engl. Bezeichnung cAMP response element binding protein), MAPK (engl. Bezeichnung mitogen-activated protein kinase) und PKC (Proteinkinase C; Crowder und Freeman, 2000; Lezoualc'h et al., 2000; Lonze et al., 2002; Bayatti et al., 2003), und kann zudem apoptotische Caspase-Kaskaden inhibieren (Radulovic et al., 2003). Nur wenige CRH-Zielgene konnten jedoch bisher identifiziert werden.

1.5 CRH-Zielgene – das Neurotrophin BDNF

BDNF ist ein Mitglied der Neurotrophinfamilie, die das Zellüberleben, die Entwicklung des ZNS, die Differenzierung von Neuronen und den Erhalt vieler neuronaler Subpopulationen in

1. Einleitung

in vitro beeinflusst (Barde, 1989; Alderson et al., 1990; Hyman et al., 1991; Thoenen, 1995). BDNF kann zudem *in vivo* vor Neurodegeneration und Ischämie schützen (Morse et al., 1993; Beck et al., 1994). Eine BDNF-Defizienz führt zu Störungen der hippocampalen LTP; BDNF ist daher auch für das Lernen und die Gedächtnisbildung sehr wichtig (Korte et al., 1995).

BDNF wird in hohen Konzentrationen in Neuronen des Hippocampus und des Neocortex exprimiert (Ernfors et al., 1992), wobei die Synthese nach neuronaler Aktivierung erfolgt. Dabei wird zunächst eine glykosylierte proBDNF-Form synthetisiert, die kurz darauf in die reife BDNF-Form umgewandelt und in Vesikeln gespeichert wird (Matsumoto et al., 2008). Beide BDNF-Formen können nach Depolarisation der Neurone sezerniert werden (Blochl und Thoenen, 1995, 1996) und wirken parakrin und/oder autokrin (Ghosh et al., 1994). BDNF induziert seine biologischen Funktionen über Bindung an den spezifischen hoch-affinen BDNF-Rezeptor TrkB oder über den unspezifischen p75 Neurotrophin-Rezeptor, der alle proFormen der Neurotrophine mit hoher Affinität bindet (Abb. 1.5; zur Übersicht: Lu et al., 2005).

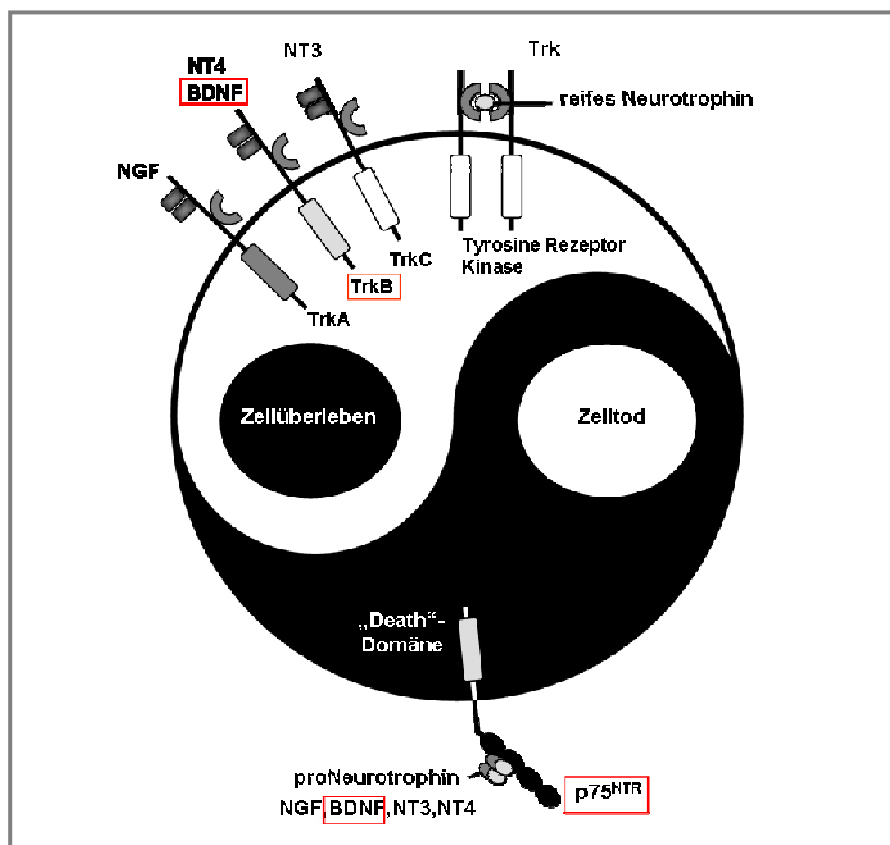


Abb. 1.5 Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Neurotrophine induzieren ihre physiologischen Funktionen über Bindung an Transmembranrezeptoren. Jeder Neurotrophin-Rezeptor – Trk A, B, C und p75 Neurotrophin-Rezeptor $p75^{NTR}$ – besitzt spezifische Affinitäten zu den Neurotrophinen (NGF, NT3, NT4, BDNF). Die Trk-Rezeptoren binden präferentiell reife Neurotrophine und induzieren Signalwege, die zum Zellüberleben führen. Dahingegen binden proNeurotrophine an den p75 Neurotrophin-Rezeptor und induzieren Apoptose. Abb. nach Lu et al., 2005

1. Einleitung

Beide Rezeptoren werden wie BDNF im Hippocampus exprimiert (Hennigan et al., 2007). Reifes BDNF bindet mit hoher Affinität an den TrkB-Rezeptor und fördert das Zellüberleben und die synaptische Transmission (Lee et al., 2001; Patapoutian und Reichardt, 2001) durch Aktivierung des anti-apoptotischen Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Signalweges (Brunet et al., 1999) und durch Aktivierung des MAPK-Signalweges (Aloyz et al., 1998). Nach Sekretion der proBDNF-Form kann diese entweder von extrazellulären Proteasen in reifes BDNF umgewandelt werden und aktiviert anschließend den TrkB-Rezeptor oder es bindet als proBDNF-Form mit hoher Affinität an den p75 Neurotrophin-Rezeptor und induziert Apoptose (Teng et al., 2005).

Ein Einfluss des CRH-Systems auf die BDNF-Expression konnte bereits in primären Neuronen des Cerebellum gezeigt werden. CRH induziert in diesen Neuronen die BDNF-Expression über cAMP/PKA-Signalwege (Bayatti et al., 2005). Das deutet daraufhin, dass CRH über eine Erhöhung der BDNF-Expression Einfluss auf die Neuroprotektion oder Apoptose nehmen kann.

1.6 Weitere CRH-Zielgene – die Gap Junction-Proteine

Gap Junctions sind Transmembrankanäle, die strukturell und funktionell zur Klasse der Ionenkanäle gehören. Sie setzen sich aus zwei Halbkanälen, den sogenannten Connexonen, zusammen. Jedes Connexon wird aus sechs Connexin-Proteinen aufgebaut, die eine ringförmige Struktur mit einer zentralen Pore bilden (Abb. 1.6; Musil und Goodenough, 1993; Cascio et al., 1995; Falk et al., 1997; Unger et al., 1999). Ein Connexon einer Zelle verbindet sich mit einem Connexon der benachbarten Zelle und beide fügen sich so über den extrazellulären Spalt hinweg zu einem Gap Junction-Kanal zusammen, der die Zytoplasmata beider Zellen verbindet und eine direkte interzelluläre Kommunikation ermöglicht (Goodenough et al., 1996; Unger et al., 1999). Gap Junctions werden bei nahezu allen Säugetieren in vielen Geweben in großer Zahl gebildet. Abgesehen von Blutzellen und Skelettmuskelzellen kommunizieren alle bislang untersuchten Körperzellen über diese Zell-Zell-Kanäle (Bruzzone et al., 1996; Kumar und Gilula, 1996). Die interzelluläre Kommunikation ist eine grundlegende Voraussetzung für die koordinierte Funktion von Organen oder Zellverbänden. Daher trägt sie zur Aufrechterhaltung der Homöostase und zur Anpassung des Körpers auf sich ständig ändernde Umweltbedingungen bei.

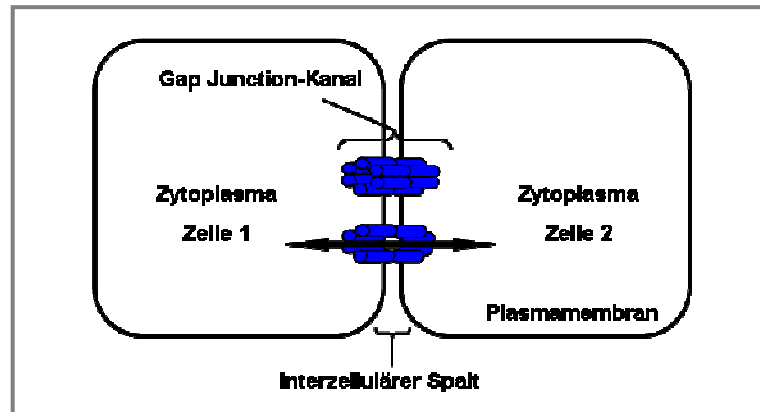


Abb. 1.6 Gap Junction-Kanäle

Gap Junctions sind membrangebundene Proteinstrukturen, welche die Zytoplasma zweier benachbarter Zellen verbinden und dadurch einen direkten Austausch von chemischen oder elektrischen Signalen ermöglichen.

Gap Junction-Kanäle haben einen Durchmesser von 1,2 nm und transportieren Moleküle mit einer Größe bis zu 1 kDa wie Nährstoffe, Ionen und intrazelluläre Signalmoleküle von einer Zelle in direkt benachbarte Zellen (Azarnia et al., 1988; Simon and Goodenough, 1998; Willecke et al., 2002; Saez et al., 2003). Gap Junctions tragen daher zum Transport von Metaboliten, zur Aufrechterhaltung der Ionen-Homöostase, zur elektrischen Synchronisation von Neuronen, zur Koordination von Zellantworten und somit zum Zellüberleben bzw. zur Apoptose bei (Loewenstein, 1988; Sohl und Willecke, 2004). Neuere Forschungsarbeiten zeigen, dass auch große lineare Moleküle wie Polypeptide und siRNA durch Gap Junctions transferiert werden und dadurch die Genexpression oder Antigen-Präsentation kontrollieren (Neijssen et al., 2005; Valiunas et al., 2005).

Connexone existieren auch als Halbkanäle in der Membran, ihre funktionale Rolle für den Transfer von Metaboliten zwischen Zytoplasma und extrazellulärer Matrix wird jedoch kontrovers diskutiert (Spray et al., 2006; Rodriguez-Sinovas et al., 2007).

1.6.1 Aufbau und Struktur von Gap Junctions

Gap Junction-Proteine, die Connexine, sind integrale Membranproteine und bestehen aus vier Transmembrandomänen, zwei konservierten extrazellulären Domänen (engl. Bezeichnung extracellular loop, EL), die für die Interaktion mit Connexonen benachbarter Zellen wichtig

1. Einleitung

sind, einer zytoplasmatischen Domäne (engl. Bezeichnung cytoplasmic loop, CL) sowie dem zytoplasmatischen C- und N-Terminus (Abb. 1.7).

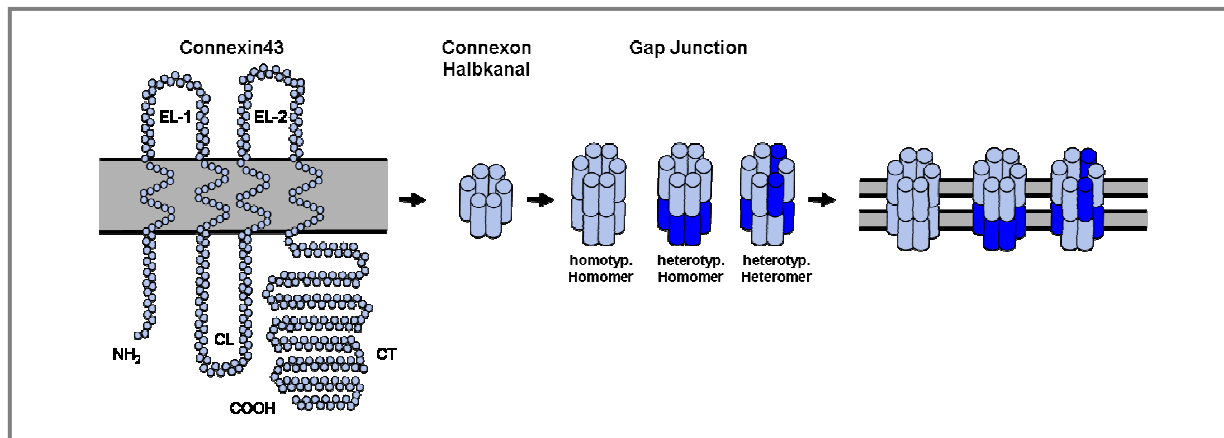


Abb.1.7 Bildung von Gap Junctions aus Connexin-Proteinen

Connexin43 ist als Beispiel für alle Connexin-Proteine gezeigt. Connexine sind integrale Membranproteine; sie bestehen aus vier Transmembrandomänen, zwei konservierten extrazellulären Domänen (extracellular Loop, EL), die für die Interaktion mit Connexonen der benachbarten Zelle wichtig sind, einer zytoplasmatischen Domäne (cytoplasmic loop, CL), sowie dem zytoplasmatischen C- und N-Terminus. Sechs Connexin-Monomere lagern sich zu einem Halbkanal, einem sog. Connexon, zusammen, wobei diese aus einem oder aus verschiedenen Connexintypen gebildet werden können. In der Plasmamembran lagern sich die Connexone benachbarter Zellen zusammen und bilden funktionale Kanäle, die Gap Junctions. Dadurch entstehen Kanäle aus verschiedenen Connexintypen mit unterschiedlichen Kanaleigenschaften. Abb. nach Laird, 2006

Die Connexone werden in Vesikeln entlang von Mikrotubuli zur Plasmamembran transportiert (Abb. 1.8; Thomas et al., 2001; Gaietta et al., 2002; Lauf et al., 2002) und migrieren innerhalb der Membran zu Zell-Zell-Kontaktzonen. Dort bilden sie mit einem Connexon der benachbarten Zelle einen vollständigen Gap Junction-Kanal und aggregieren mit anderen Gap Junction-Kanälen zu Gap Junction-Plaques (Gaietta et al., 2002; Lauf et al., 2002). Gap Junction-Plaques können bis zu einige tausend Gap Junction-Kanäle beinhalten (McNutt und Weinstein, 1970; Forge et al., 2003). Obwohl jede Connexin-Isoform gewebespezifisch exprimiert wird, exprimieren viele Zelltypen mehrere Connexin-Isoformen. Daher können Hetero-Oligomere und Homo-Oligomere von benachbarten Zellen Gap Junction-Kanäle bilden (zur Übersicht: Segretain und Falk, 2004). Zudem interagieren Connexinproteine in der Plasmamembran mit zytoplasmatischen „Scaffolding“-Proteinen, Molekülen des Zytoskeletts und intrazellulären Signalmolekülen, wodurch sie makromolekulare Komplexe bilden und Kanal-unabhängig wirken können (Brosnan et al., 2001; Iacobas et al., 2007). Zur lysosomalen und/oder proteosomalen Degradation werden die Gap Junctions entweder als ganzer Plaque („Annular“ Junction) oder in Vesikeln internalisiert (Abb. 1.8; Musil et al., 1990; Musil und Goodenough, 1991; Musil et al., 2000; Piehl et al., 2007).

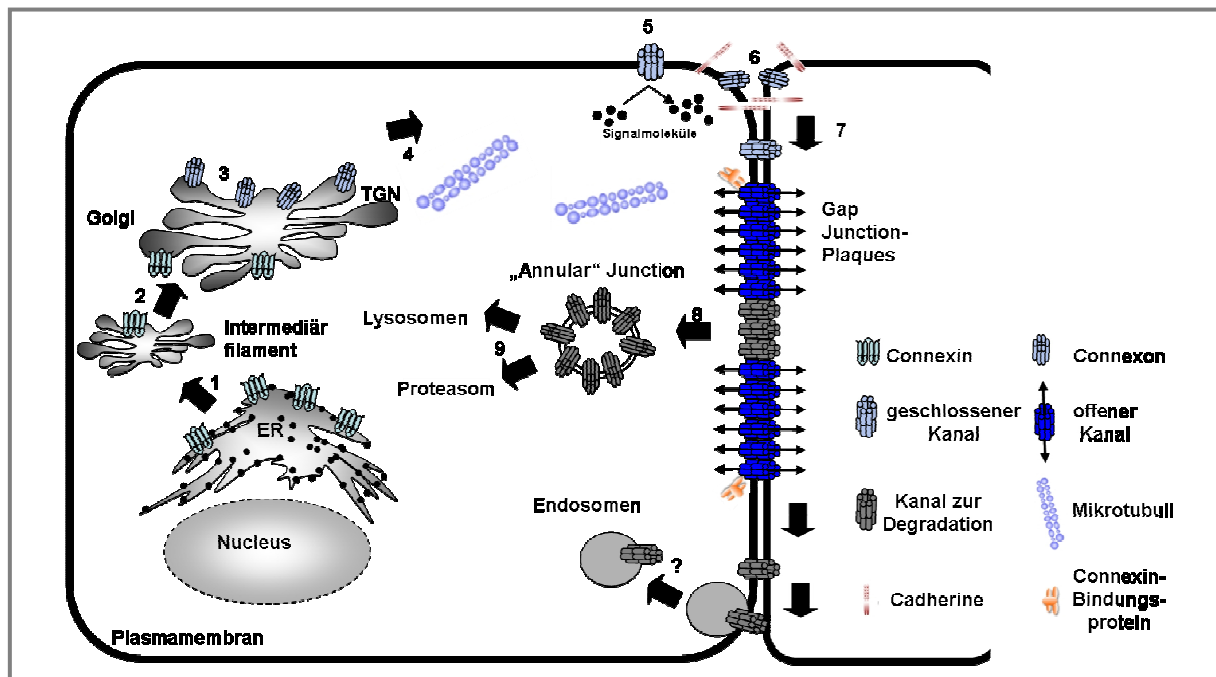


Abb. 1.8 Schematische Darstellung der Synthese, des Aufbaus und der Degradation von Gap Junctions

Die Gap Junction-Synthese und -Degradation bestehen aus folgenden Schritten: 1) Synthese der Connexin-Peptide an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), 2) Oligomerisierung in Connexone (Halbkkanäle) und Passage durch den Golgi, 3) intrazelluläre Lagerung im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), 4) Transport entlang der Mikrotubuli, 5) Insertion der Connexone in die Plasmamembran, 6) laterale Diffusion von Connexonen in der Plasmamembran, 7) Aggregation von einzelnen Gap Junction-Kanälen in Plaques, 8) Internalisierung der Plaques, Bildung der zyttoplasmatischen „Annular“ Junctions und 9) Degradation über lysosomale und proteasomale Abbauege. Abb. nach Laird, 2006

Connexine besitzen im Gegensatz zu anderen integralen Membranproteinen nur eine Halbwertszeit von 1,5 bis 5 Stunden *in vitro* (Musil et al., 1990; Laird et al., 1991; Beardslee et al., 1998), aber auch *in vivo* (Fallon und Goodenough, 1981). Die kurze Halbwertszeit der Connexine sorgt für die schnelle, dynamische Regulation der Gap Junction-Bildung und Degradation und beeinflusst daher auch die interzelluläre Kommunikation (Bukauskas et al., 2000; Musil et al., 2000).

1.6.2 Das Gap Junction-Protein Connexin43 (Cx43)

Bis heute wurden 20 unterschiedliche Connexine in Maus und 21 Connexine im Menschen beschrieben (Sohl und Willecke, 2003). Sie werden gewebespezifisch exprimiert, wobei mehrere Connexintypen von einer Zelle exprimiert werden können. Connexine werden ihrem Molekulargewicht in kDa entsprechend mit numerischen Suffixen bezeichnet (Saez et al., 2003; Sohl und Willecke, 2004).

1. Einleitung

Cx43 ist das am meisten verbreitete Gap Junction-Protein in Säugern, es wird in fast allen Geweben exprimiert (Willecke et al., 2002). Im Säugetier-Gehirn kommt Cx43 in Astrozyten und in aktivierten Mikroglia vor; es kann bereits früh in der Entwicklung detektiert werden und bleibt dann auf konstant hohem Expressionsniveau (Dermietzel, 1998; Eugenin et al., 2001). Es ist an vielen wichtigen physiologischen Prozessen, wie an der Aufrechterhaltung der Homöostase, dem zellulären Metabolismus, der Zellproliferation und der Differenzierung beteiligt (Steinberg, 1998). Eine Cx43-Defizienz in Mäusen verursacht Herzfehlbildungen, woran diese Mäuse schon kurz nach der Geburt sterben (Reaume et al., 1995); zudem weist deren Augenlinse osmotische Katarakte auf (Gao und Spray, 1998) und die Migration neuronaler Vorläuferzellen ist verändert (Fushiki et al., 2003). Im Menschen sind Mutationen im Cx43-Gen die Ursache der occulodentodigitalen Dysplasie, welche Zahn- und Finger-Anomalien, sowie Abnormalitäten der weißen Gehirnmasse zur Folge hat (Paznekas et al., 2003). Viele cardiovaskuläre und neurologische Krankheiten im Menschen sind zudem mit veränderter Cx43-Expression und -Verteilung assoziiert (De Groot und Coronel, 2004; Iacobas et al., 2004; Kanagaratnam und Peters, 2004; Saffitz und Kleber, 2004; Severs et al., 2004). Dadurch wird die Bedeutung des Cx43 für die Entwicklung und Physiologie multizellulärer Organismen erkennbar. Zudem wird deutlich, dass andere Connexintypen die Funktion von Cx43 nicht kompensieren können.

1.6.3 Die Regulation des Cx43

Gap Junction-Kanäle sind dynamische Strukturen mit schnellen Umsetzungsraten. Diese Dynamik erfordert zusätzlich zur Regulation der Connexin-Synthese durch die Kontrolle der Transkription auch andere, wesentlich schnellere Regulationsmechanismen. Posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung der Connexin-Proteine stellen mögliche Regulationsmechanismen dar. Nahezu alle Connexine werden durch Kinasen modifiziert, wobei sie hauptsächlich an ihren Serin- und Tyrosinresten am zytoplasmatischen C-Terminus phosphoryliert werden. Eine Phosphorylierung von Aminosäuren am N-Terminus ist bislang nicht bekannt (Lampe und Lau, 2004). Die Regulation von Cx43 erfolgt über Phosphorylierung von 12 Serin- und 2 Tyrosinresten des C-Terminus durch verschiedene Kinasen (Musil et al., 1990; Warn-Cramer et al., 1996; Lampe et al., 2000; Solan and Lampe, 2005). Die Phosphorylierung reguliert die Konformation von Cx43, die Kinetik des Cx43-Transports und daher die subzelluläre Cx43-Lokalisation, den Aufbau und die Selektivität der

1. Einleitung

Gap Junction-Kanäle sowie die Bildung der Plaques und deren Abbau (Ek-Vitorin et al., 2006; Solan und Lampe, 2007). Die Rolle der Phosphorylierung kann sich jedoch zwischen den Zelltypen, dem Zellzyklus-Status, dem Wachstumsfaktor-Milieu und den Interaktionen mit der extrazellulären Matrix unterscheiden (Laird, 2005).

1.6.4 Physiologische Funktionen und Regulation astrozytärer Gap Junctions

Im ZNS von Säugetieren sind Astrozyten die Zellpopulation mit der höchsten Connexin-Expression (Rouach et al., 2002) und den meisten Gap Junctions; jeder Astrozyt besitzt etwa 30.000 Gap Junctions (Dermietzel et al., 2000). Astrozyten exprimieren die Connexin-Isoform Cx43 am stärksten (Dermietzel et al., 1991; Giaume et al., 1991), aber auch die Isoformen Cx30 (Nagy et al., 1999; Nagy und Rash, 2000), Cx47 (Rouach et al., 2002), Cx40, Cx45, Cx46 und Cx26 (Dermietzel et al., 2000) und bilden über Gap Junctions Verbindungen zu anderen Astrozyten oder zu Oligodendrozyten (Wolburg und Rohlmann, 1995). Direkte Gap Junction-Verbindungen zwischen Gliazellen und Neuronen werden nur während der frühen Entwicklung gebildet, wenn Astrozyten über kurzzeitige Gap Junction-Adhäsionen Leitstrukturen für migrierende Neurone darstellen (Elias et al., 2007). Desweiteren sind sie im adulten Säugetiergehirn nur in definierten Gehirnregionen wie dem Locus Coeruleus (Alvarez-Maubecin et al., 2000) oder dem Cerebellum zwischen Bergmann-Gliazellen und Purkinje-Neuronen nachgewiesen worden (Pakhotin und Verkhratsky, 2005). Im adulten Gehirn exprimieren Neurone und Gliazellen verschiedene Connexintypen, wodurch Neurone und Gliazellen unabhängige Gap Junction-Kommunikationswege bilden (Rash et al., 2001). Astrozyten bilden über Gap Junctions ein funktionales Glia-Netzwerk untereinander; hunderte von Astrozyten sind so miteinander zu einem Synzytium verbunden.

Das astrozytäre Synzytium trägt über den Transport von Ionen zur Aufrechterhaltung der K^+ - und Na^+ -Homöostase im intrazellulären und extrazellulären Raum bei (Rouach et al., 2002). Es erlaubt zudem eine schnelle interzelluläre Kommunikation, z.B. werden Ca^{2+} -Signale so verbreitet (Kirchhoff et al., 2001). Neurone sind in das Glia-Netzwerk eingebettet und werden von Astrozyten aktivitätsabhängig mit wichtigen Substraten versorgt (Abb. 1.9). Verschiedene Studien zeigten, dass Astrozyten aus Blutkapillaren das energiereiche Substrat Glucose aufnehmen (Nagy et al., 1999; Pellerin und Magistretti, 2004; Blomstrand und Giaume, 2006), in Lactat umwandeln und über Gap Junctions zu Neuronen transportieren, die Lactat für die ATP-Produktion verwenden (Wiesinger et al., 1997; Magistretti und Pellerin,

1.6.5 Physiologische Funktionen und Regulation neuronaler Gap Junctions

Gap Junctions zwischen Neuronen werden auch als elektrische Synapsen bezeichnet und bestehen aus unterschiedlichen Connexintypen in Abhängigkeit vom Neurontyp. Die Cx36-, Cx45- oder Cx57-Proteine sind in Neuronen am meisten verbreitet (Condorelli et al., 1998; Sohl et al., 1998; Maxeiner et al., 2003; Hombach et al., 2004; Maxeiner et al., 2005). Die Bedeutung der neuronalen Gap Junctions liegt in der Synchronisation der elektrischen Signale und somit der Regulation der elektrophysiologischen Aktivität (Venance et al., 2000; Fukuda, 2007). Das ist beispielsweise wichtig für Vorgänge wie das Lernen oder das Gedächtnis; Cx36-defizienten Mäusen fehlt die elektrische Kopplung hippocampaler Interneurone, wodurch die Gedächtnisleistung negativ beeinflusst wird (Frisch et al., 2005). Weiterhin zeigen Cx36-defiziente Mäuse außer Beeinträchtigungen des Gedächtnisses keinen weiteren Phänotyp. In Neuronen scheinen die Connexine daher nur zur Optimierung neurophysiologischer Reaktionen wichtig zu sein.

Generell haben neuronale Gap Junctions daher andere Eigenschaften als astrozytäre Gap Junctions, denn 1) eine direkte Kommunikation von Neuronen über Gap Junctions wird im Laufe der Entwicklung stark reduziert (Fukuda und Kosaka, 2003) und bleibt in adulten Tieren auf definierte Regionen oder neuronale Subpopulationen beschränkt; 2) dendro-dendritische und dendro-somatische Gap Junctions zwischen Interneuronen eines Subtyps scheinen weiter verbreitet zu sein als zwischen exzitatorischen Neuronen (Sohl et al., 2005). Das neuronale Gap Junction-Netzwerk funktioniert daher nicht wie ein großes Synzytium, sondern wird vielmehr zur lokalen Regulation der Synchronisation spezifischer Neuronen verwendet (Fukuda, 2007).

1.6.6 Einfluss von Gap Junctions auf die Neuroprotektion bzw. Apoptose

Veränderungen der Gap Junction-Kommunikation sind bei der Pathophysiologie von ZNS-Schädigungen von großer Bedeutung. Wenn eine Zelle pathologische Veränderungen aufgrund der Akkumulation schädigender Moleküle im Zytoplasma zeigt, können toxische Moleküle auch über Gap Junctions in benachbarte gesunde Zellen transportiert werden. Das kann sowohl schädigende, als auch protektive Effekte haben. Toxische Substanzen können so verbreitet werden und sekundär weitere Zellen schädigen. Alternativ kann das Gap Junction-Netzwerk die toxischen Moleküle abpuffern und den Zelltod der primär geschädigten Zelle

1. Einleitung

verhindern. Es wurde bereits gezeigt, dass viele toxische Einflüsse molekulare Veränderungen der Connexin-Proteine und somit funktionale Änderungen der Gap Junction-Kanäle induzieren. Eine veränderte Gap Junction-Kommunikation wurde bei Ischämie (Anderson et al., 2003), Epilepsie (Carlen et al., 2000) und Tumorerkrankungen (Lin et al., 2001) des ZNS sowie bei neurodegenerativen Krankheiten (Rozenal et al., 2000) wie AD (Nagy et al., 1996) und PD (Rufer et al., 1996) beobachtet. Bisher ist jedoch noch nicht klar, welche Faktoren genau Veränderungen der Gap Junctions induzieren, ob die Veränderungen die Gap Junction-Kommunikation hemmen oder fördern und ob dadurch das Zellüberleben gesichert wird. Es gibt sowohl Daten für eine neuroprotektive, als auch eine neurodegenerative Wirkung der Gap Junction-Kommunikation. Welche Wirkung überwiegt, ist in einem zellulären Netzwerk schwer zu bestimmen. *In vivo* Experimente weisen eher auf einen protektiven Effekt der Connexine hin. Heterozygote Cx43-defiziente Mäuse zeigen einen signifikanten Anstieg der Infarktgröße nach Schlaganfall (Siushansian et al., 2001) und Mäuse mit einer konditionalen Deletion des astrozytären Cx43 zeigen ähnliche Ergebnisse (Nakase et al., 2003). Cx32-defiziente Mäuse weisen eine Hyperexzitabilität im Neocortex auf (Sutor et al., 2000) und diese Mäuse zeigen mehr Zelltod nach Ischämie (Oguro et al., 2001). Wahrscheinlich können Gliazellen in Cx32-defizienten Mäusen Ione und toxische Moleküle nicht mehr effizient abpuffern, wodurch Neurone stärker depolarisiert werden und so exzitotoxisch geschädigt werden.

Weitere experimentelle Beobachtungen, bei denen Connexine zelltypspezifisch herunterreguliert werden, können den Einfluss der Gap Junction-Kommunikation auf Zellüberleben bzw. Apoptose aufdecken.

1.6.7 Einfluss von CRH auf Cx43

CRH-Zielgene, die für die CRH-induzierte Neuroprotektion entscheidend sind, sind bisher weitgehend unbekannt. Vor kurzem konnte jedoch Cx43 als ein neues CRH-Zielgen in humanen glatten Muskelzellen des Myometriums identifiziert werden (Wu et al., 2007). Der Effekt von CRH auf die Cx43-Expression wurde in Myometriumzellen untersucht, da CRH und Cx43 beide eine wichtige Rolle bei Uteruskontraktionen und dem Einsetzen von Geburtswehen spielen; Cx43 sorgt hier für die Synchronisation der Muskelkontraktionen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Cx43 als neues CRH-Zielgen im ZNS untersucht und die Bedeutung dieser Cx43-Regulation für die CRH-induzierte Neuroprotektion überprüft.

1.7 Pathogene Mechanismen

Oxidativer Stress und Exzitotoxizität sind Mechanismen, die zu neuronalem Zelltod führen und zu vielen neurodegenerativen Krankheiten beitragen.

1.7.1 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress gilt als Hauptursache der Neurotoxizität in vielen neurodegenerativen Krankheiten wie AD und PD (Sayre et al., 2008). Er bezeichnet das Ungleichgewicht zwischen der Produktion freier Sauerstoffradikale und der Fähigkeit des biologischen Systems reaktive Intermediate mit Antioxidantien zu beseitigen und oxidative Schäden zu reparieren (Sies, 1987). Die meisten freien Radikale stammen von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. Bezeichnung reactive oxygen species, ROS), die beim ineffizienten Transfer von Elektronen auf Sauerstoff während der oxidativen ATP-Produktion in Mitochondrien entstehen (Abb. 1.10).

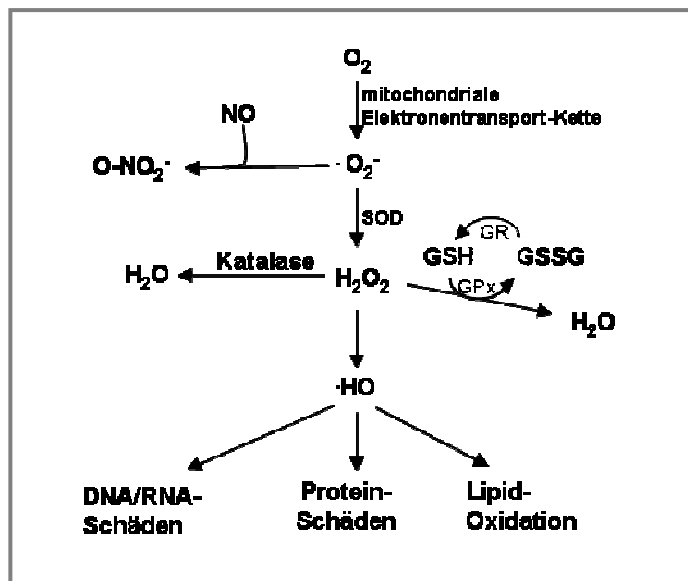


Abb. 1.10 Schematische Darstellung der Bildung von ROS und RNS sowie von antioxidativen Mechanismen

Zu den ROS gehören freie Radikale wie das Superoxid-Anion $O_2^{\cdot -}$, das Hydroxyl-Radikal $\cdot OH$ und etwas stabilere molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid H_2O_2 . Durch die Reaktion des Superoxid-Anions mit Stickstoffmonoxid NO entsteht zudem Peroxynitrit $O-NO_2^{\cdot -}$, das mit Stickstoffmonoxid zusammen als reaktive Stickstoffspezies (engl.

1. Einleitung

Bezeichnung reactive nitrogen species, RNS) bezeichnet wird. ROS und RNS sind hochreaktive Verbindungen und verursachen Schäden an allen zellulären Makromolekülen wie ungesättigten Fettsäuren, Zuckern, Proteinen und DNA (Crouch et al., 2008). Im Körper wirken Antioxidantien wie Glutathion und Ascorbat und antioxidative Enzyme wie die Katalase, Glutathion-Peroxidase (GPx), Glutathion Reduktase (GR) und Superoxid Dismutase (SOD) dem oxidativen Stress entgegen (Rae et al., 1999; Moosmann und Behl, 2002; Valko et al., 2005).

Im Vergleich zu anderen Organen produziert das Gehirn große Mengen an ROS und RNS, denn hier werden 20% des Gesamtsauerstoffs des Körpers für die ATP-Produktion umgesetzt. Es hat aber nur geringe antioxidative Kapazität und besitzt zudem sehr viele ungesättigte Fettsäuren und Lipide als Membranbestandteile (Cooper und Kristal, 1997; Dringen et al., 2000). Daher ist das Gehirn gegenüber zusätzlichen Erhöhungen der ROS- und/oder RNS-Produktion oder Reduktionen der antioxidativen Kapazität sehr vulnerabel.

1.7.2 Exzitotoxizität

Exzitotoxizität ist eine Form neuronaler Degeneration, die durch Überstimulation der Glutamat-Rezeptoren induziert wird und bei Epilepsie und vielen neurodegenerativen Krankheiten zu neuronalen Schädigungen beiträgt (Coyle und Puttfarcken, 1993; Doble, 1999). Exzitotoxizität entsteht, wenn die extrazelluläre Glutamat-Konzentration unphysiologisch erhöht ist oder wenn postsynaptische Neuronen empfindlicher gegenüber dem normalen Glutamat-Spiegel reagieren. Extrazelluläre Glutamat-Konzentrationen können durch vermehrte präsynaptische Sekretion oder mangelnde Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt entstehen. Zudem können aber auch lethale Verletzungen von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia für die Freisetzung des intrazellulären Glutamats sorgen (Van Damme et al., 2005). Glutamat vermittelt seine biologischen Funktionen über Aktivierung ionotroper und metabotroper Glutamat-Rezeptoren, durch die Ca^{2+} in die postsynaptische Zelle einströmt. Durch den Ca^{2+} -Einstrom werden toxische zelluläre Enzyme aktiviert und es kommt zu Funktionsstörungen der Mitochondrien mit erhöhter Bildung von ROS und letztlich zum Zelltod (Abb. 1.11; Van Damme et al., 2005).

1. Einleitung

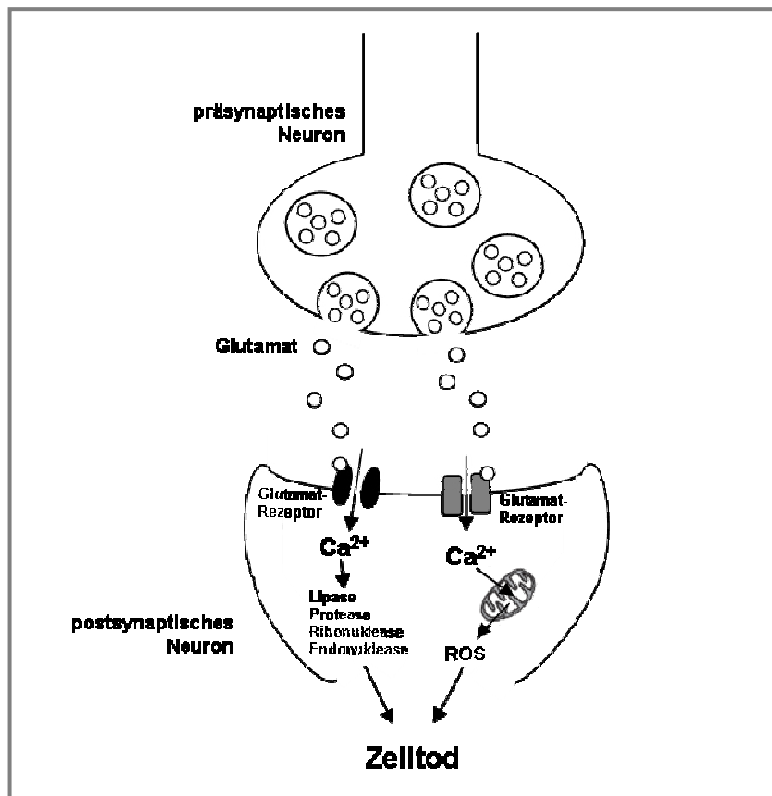


Abb. 1.11 Mechanismen der Exzitotoxizität

Eine Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration führt zur exzessiven Stimulation der Glutamat-Rezeptoren. Veränderungen der Glutamat-Rezeptor-Eigenschaften und eine erhöhte Empfindlichkeit der Neurone kann exzitotoxische Schäden verursachen. Der Ca²⁺-Einstrom über die Glutamat-Rezeptoren aktiviert toxische zelluläre Enzyme und stört die Mitochondrienfunktion, wodurch es zur Bildung von ROS kommt. Das resultiert letztendlich im neuronalen Zelltod. Abb. nach Van Damme et al., 2005

1.8 Der Hippocampus – Modell zur Untersuchung CRH-induzierter Neuroprotektion

Der Hippocampus liegt im medialen Temporallappen des Vorderhirns und ist Teil des limbischen Systems (Abb. 1.12 A). Er ist für die Gedächtniskonsolidierung, also für die Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis, und für die räumliche Orientierung wichtig (zur Übersicht: Neves et al., 2008). Bei Demenzerkrankungen wie der AD ist der Hippocampus eine der ersten betroffenen Hirnregionen und wird am schwersten geschädigt. Verlust von Synapsen, neuronaler Zelltod sowie Neuroinflammation treten auf (Boekhoorn et al., 2006), u.a. deshalb sind Gedächtnisverlust und Desorientierung erste Symptome der Demenzerkrankungen.

Der Hippocampus besteht aus verschiedenen Regionen, dem Gyrus dentatus (engl. Bezeichnung dentate gyrus, DG) und den Cornus ammonis-Regionen (CA-Regionen; Abb. 1.12 B). In seiner tangentialen Richtung wird der Hippocampus in die CA1- bis CA3-

1. Einleitung

Regionen unterteilt, wobei die CA1- und CA3-Region funktionell sehr wichtig sind. In den CA-Regionen liegen pyramidale glutamaterge Neurone (Abb. 1.12 B, pink und blau) und verschiedene Interneurone in einer Schicht, der Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale). Im Gyrus dentatus gibt es GABA-erge Interneurone und glutamaterge Körnerzellen im Stratum granulare (rot), die ihre Dendriten auf pyramidale Neurone der CA-Regionen projizieren (Neves et al., 2008).

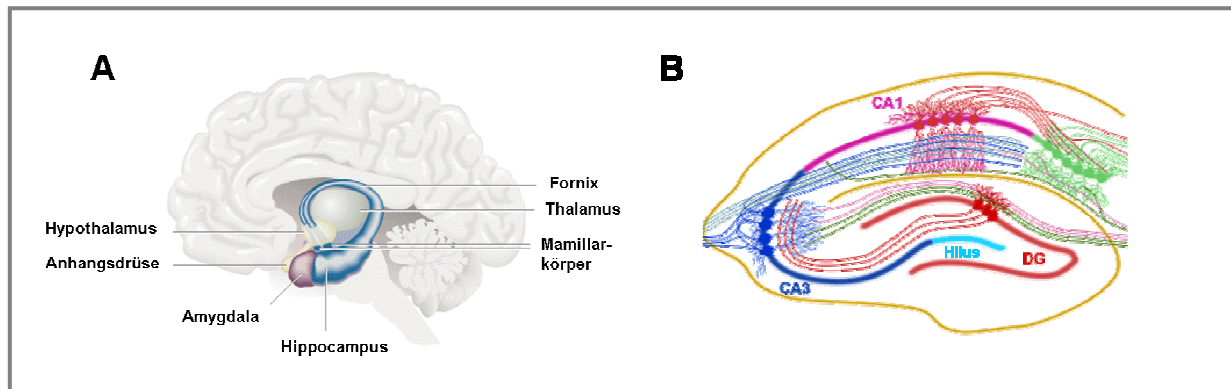


Abb. 1.12 Schematische Darstellung der Lage des Hippocampus im Gehirn und seiner anatomischen Organisation

A, Lage der Hippocampi im medialen Temporallappen des Vorderhirns und weiterer Strukturen des limbischen Systems sind angezeigt. **B**, Querschnitt durch den Hippocampus. Eingezeichnet sind die CA1- und CA3-Region (pink bzw. blau) des Cornus ammonis mit pyramidalen Neuronen sowie der Gyrus dentatus (DG) mit Hilusregion (hellblau) und dem Körnerzellband (Stratum granulare, rot). Abb. nach Universität Bristol, <http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pathway/figs>

Im Hippocampus werden sowohl CRH als auch beide CRH-Rezeptoren (CRH-R1 und 2) exprimiert. Unter Stressbedingungen wird CRH von GABA-ergen Interneuronen in der pyramidalen Zellschicht gebildet und ausgeschüttet (Sakanaka et al., 1986; Yan et al., 1998). CRH aktiviert wiederum CRH-Rezeptor-exprimierende pyramidale Neuronen und sorgt so für stressbedingte Änderungen der hippocampalen synaptischen Plastizität (Chen et al., 2004a) oder vermittelt Neuroprotektion (Elliott-Hunt et al., 2002). Experimente zur Untersuchung der CRH-induzierten Neuroprotektion wurden daher in hippocampalem Gewebe oder organotypischen hippocampalen Schnittkulturen durchgeführt.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) ist hauptverantwortlich für die Regulation der Stressantwort bei Säugetieren (Vale et al., 1981), hat aber auch einen Einfluss auf die

1. Einleitung

neuronale Plastizität, das Lernen und das Gedächtnis (Behan et al., 1995). So zeigte eine Erhöhung der CRH-Konzentration positive Effekte auf Lernen und Gedächtnis in Rattenmodellen der Alzheimer Demenz (Behan et al., 1995). Zellkulturstudien belegen zudem einen neuroprotektiven CRH-Effekt gegenüber oxidativem Stress und Exzitotoxizität, die zur Pathologie vieler neurodegenerativer Krankheiten beitragen (Lezoualc'h et al., 2000; Elliott-Hunt et al., 2002; Bayatti et al., 2003). Die durch verschiedenste Stressfaktoren induzierte Freisetzung von CRH im zentralen Nervensystem dient daher möglicherweise dem Schutz von Neuronen vor toxischen Einflüssen und dem Erhalt ihrer Funktionsfähigkeit während des Sresses. Bisher konnte jedoch *in vivo* eine CRH-induzierte Neuroprotektion noch nicht gezeigt werden. Auch sind CRH-Zielgene, die Neuroprotektion vermitteln, weitestgehend unbekannt. Daher stand die Erforschung der neuroprotektiven Eigenschaften von CRH in Gewebe und in Tiermodellen sowie die Identifizierung von CRH-Zielgenen im Fokus der vorliegenden Arbeit.

Zur Analyse der CRH-induzierten Neuroprotektion *in vivo* wurden die Auswirkungen akuten exzitotoxischen Stresses, einem Merkmal neurodegenerativer Krankheiten, in CRH-überexprimierenden Mäusen mit denen in Wildtyptieren verglichen. Dadurch konnte zum ersten Mal eine Untersuchung neuroprotektiver Eigenschaften von endogen exprimiertem CRH *in vivo* durchgeführt werden.

Zudem sollten Signalwege und Zielgene identifiziert werden, die die CRH-induzierte Neuroprotektion vermitteln. Die Beteiligung von BDNF an der CRH-eingeleiteten Neuroprotektion gegenüber der Exzitotoxizität sollte *in vivo* untersucht werden, denn BDNF wurde als CRH-Zielgen *in vitro* identifiziert (Bayatti et al., 2005). Eine andere Studie zeigte kürzlich, dass das Connexin43-Protein ein CRH-Zielgen im Myometrium ist. Connexine bilden interzelluläre Gap Junction-Kanäle, über die Metabolite, Nährstoffe, Ione, aber auch toxische Moleküle zwischen benachbarten Zellen transportiert werden können. Dadurch haben sie einen großen Einfluss auf das Zellüberleben bzw. die Apoptose. Cx43 ist das Haupt-Gap Junction-Protein der Astrozyten, dem häufigsten Zelltyp im ZNS; eine protektive Rolle der Astrozyten gegenüber Neuronen ist bereits in vielen Studien bewiesen worden. Daher stellte sich für diese Arbeit die Frage, ob CRH auch im ZNS, speziell in Astrozyten, die Regulation des Connexin43 induziert und ob Gap Junctions an den neuroprotektiven CRH-Effekten beteiligt sind. Für die Aufklärung der CRH-induzierten Connexin43-Regulation standen verschiedene Zellkultursysteme zur Verfügung

2. Materialien & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien & Kits

Zellkultur

B27-Supplement
Dimethylformamid
DMEM-Medium, steril
Fötale Kälberserum (fetal bovine serum, FBS), steril
Gentamicin
Kulturschalen
Kulturschalen für „Live Cell“-Experimente (60 μ -Dish)
MEM
Natriumpyrophosphat
Neurobasalmedium
Phosphat bufferd saline (PBS), steril
Penicillin/Streptomycin
Glutamin, Glutamax
Sucrose
Trypanblau
MTT

Firma

Invitrogen
Fluka
Gibco
Gibco
Gibco
Nunc
ibidi
Gibco
Gibco
Gibco
Gibco
Gibco
Gibco
Sigma
Sigma
Sigma

organotypische hippocampale Schnittkulturen

DNase I
Glucose
HBSS
Ham's F12-Medium
Hepes
Insulin
Millipore-Membranen
Paraformaldehyd
Pferdeserum (steril)
Poly-L-ornithin
Präparierbesteck (steril)
Propidiumjodid
Standard Guinea Pig Complement CL5000
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)
Trypsin

Firma

Roche
Sigma
Gibco
Gibco
Sigma
Sigma
Millipore
Sigma
Gibco
Sigma
Fine Science Tools
Sigma
Linaris
Merck
Invitrogen

Molekularbiologie

Absolutely RNA reverse transcription-PCR miniprep Kit
Agarose
Bromphenolblau
Diethyl-Pyrocyanat (DEPC)

Firma

Stratagene
Biozym
Sigma
Sigma

2. Materialien & Methoden

DNA-Marker	Fermentas
DNase	Stratagene
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd 37%	T. Baker
Formamid	Fluka
β -Mercaptoethanol	Fluka
Omniscrypt reverse transcriptase kit	Qiagen
dNTP	peqLab
Primer	MWG
RNase-Inhibitor	Promega
siRNA	MWG
SYBR Green Supermix	Biorad
Taq-Polymerase	Invitrogen

Proteinbiochemie

Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
BCA-Reagenz	Bio-Rad
Blotpapier	Whatman
Bovine Albumin Serum (BSA)	Serva
Bromphenolblau	Sigma
Calyculin A	Sigma
Chemilucifer ECL Detection System	Millipore
DAPCO	Sigma
DAPI (4', 6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether) N, N, N', N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma
Glycin	Roth
Glycerin	Merck
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma
Methanol	Roth
Natriumacetat	Fluka
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma
Natriumfluorid	Sigma
Natriumorthovanadat	Fluka
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad
Okadaische Säure	Sigma
Phosphatpuffer (+Salze; PBS)	Sigma
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween20)	Sigma
Ponceau	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Proteinmarker	peqLab
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Sulphosalicylsäure	Sigma
TEMED (Tetramethylendiamin)	Sigma
Tris Base	Roth
Tris-HCl	Roth
Trockenmilchpulver	Sanalac
Tween20	Roth

Firma

2. Materialien & Methoden

sonstige Stoffe und Materialien

α -helical CRH 9-41	Sigma
Amyloid β Peptid 25-35	Bachem
Carbenoxolon	Sigma
Corticotropin Releasing Hormon (CRH)	Calbiochem-Novabiochem
DNPB (2,4-dinitrophenylhydrazine)	Sigma
Fettstift	DAKO Diagnostic
Glycyrrhizinsäure	Sigma
H89	Calbiochem-Novabiochem
Halothan	Hoechst
Kainat	Ocean Produce International
Kanülen, 0,45 mm	Braun
Lucifer Yellow	Sigma
R121919	privat; Keck et al, 2001
Spritzen, 1 ml	Braun
SuperPlus Objektträger	Hartenstein
Tetramethylrhodamine isothiocyanate-dextran	Sigma
Tissue Freezing Medium	Jung
U0126	Promega
Urocortin	Calbiochem-Novabiochem

2.1.2 Geräte

Zellbiologie & Präparation hippocampaler Schnittkulturen

Amata Elektroporationssystem	Amata
Inkubatoren	Binder
Sterilbänke	Heraeus
Absaug-System	VacuSafe Integra
Mikroinjektionsequipment	Eppendorf
McIlwain tissue chopper	Campden Instruments

Molekularbiologie

iCycler	BioRad
PCR DNA Thermozykler	Biometra
Sub-CellGT Agarose Gel Elektrophorese System	BioRad

Proteinbiochemie

Mikrotiterplatten-Lesegerät	Thermo Labsystems
Brutschränke	Binder
Heizblock	Eppendorf
Mini Protean III, Western Blotting System	BioRad
Trans-Blot	BioRad
Fuji LAS-3000 intelligent dark box	Fuji

Mikroskope

Axiovert 200 Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss
CCD Kamera	Visitron Systems
IX81 Fluoreszenz-Mikroskop	Olympus
Cell ^R -Imaging-Station	Olympus

2. Materialien & Methoden

Allgemeines

Dampfsterilisator
Spektrophotometer
pH-Meter
Zentrifuge Universal 32 R
Mikrowelle Discover 1
Wasserbad
Kryostat CM1900

Firma

VarioClav H+P
Beckmann
inoLab
Hettich
CEM
P-D Industriegesellschaft
Leica

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Klonale Zelllinie

In dieser Arbeit wurden humane IMR32-Neuroblastomzellen (ATCC/LCG Promochem, Middlesex, UK) verwendet. Diese wurden 1967 aus einem Neuroblastom im Abdomen eines 13 Monate alten kaukasischen Jungen gewonnen (Tumilowicz et al., 1970). Die IMR32-Zelllinie besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen, prädominant liegen kleine Neuroblastenartige Zellen vor und zu einem verschwindend geringen Anteil große hyaline Fibroblasten.

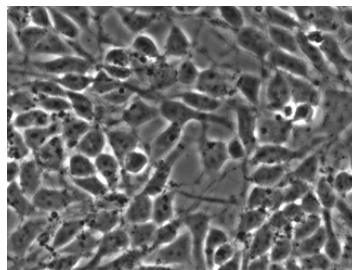


Abb. 2.1 IMR32 Neuroblastomzellen

Kultivierung von IMR32-Neuroblastomzellen

Adhärente IMR32-Zellen wurden in Zellkulturmedium (DMEM, 10% FBS, 1x Natriumpyruvat, je 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) in 20,8 cm² Zellkulturschalen ausplattiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5%. Vor Ausführung der Experimente wurden 70-80% konfluente IMR32-Zellen mit 1x PBS gewaschen und über Nacht in Serumfreiem Medium (DMEM, 1x Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) inkubiert.

Für die langfristige Aufbewahrung wurden IMR32-Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden subkonfluente Zellen von den Zellkulturschalen gespült und durch Zentrifugation (1200 rpm, RT, 4 min) pelletiert. Anschließend wurden sie in 50% FCS, 40%

2. Materialien & Methoden

Kulturmedium und 10% DMSO resuspendiert. In einer Isopropanol-haltigen Einfrierbox wurden die Zellen bei -80 °C langsam eingefroren und nach 6-8 h in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.2 Primäre Zellkulturen

Primäre Astrozytenkulturen

Primäre Astrozyten wurden aus embryonalen (e14-16) NMRI-Mäusen präpariert (Trotter et al., 1989). NMRI-Mäuse stammen ursprünglich aus dem Naval Medical Research Institute. Sie wurden 1955 an die Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten in Tübingen weitergegeben und dort als Auszuchtstamm weitergezüchtet.

Die Präparation primärer Astrozytenkulturen erfolgte nach Trotter et al. (Trotter et al., 1989). 14 bis 16 Tage alte NMRI-Embryone wurden dekapitiert und die Gehirne freigelegt, in gekühltes HBSS gegeben und für 1 min mit 1% Trypsin verdaut. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS wurden sie mit 1 ml 0,05% DNase aufgenommen und zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (800 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert, in HBSS resuspendiert und erneut pelletiert. Zellpellets wurden in Kulturmedium (DMEM, 10% Pferdeserum) resuspendiert und in Poly-L-lysin beschichteten 250 ml Kulturflaschen in einer Dichte von $3-3,5 \times 10^7$ Zellen/10 ml ausgesät. 5 bis 6 Tage nach der Präparation wurden die Neurone durch Inkubation (3 h, 37 °C) mit 358-Hybridomaüberstand (1:10) und Standard-Meerschwein-Complement (1:15) entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit DMEM und 10% Pferdeserum zur Entfernung der Neurone, wurden die Gliazellen mit 10 ml DMEM, 10% Pferdeserum und Insulin (5 µl/10 ml Medium) bei 36,5 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5% inkubiert. Nach 14 Tagen wurden unter mikroskopischer Kontrolle die Makrophagen mechanisch durch leichtes Klopfen und die Oligodendrozyten durch kräftiges Schütteln abgelöst. Die am Boden der Zellkulturflaschen verbleibenden Astrozyten wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS abtrypsiniert (1x Trypsin, 10 min, 37 °C), in Zellkulturmedium (MEM, 10% Pferdeserum, Gentamicin 50 mg/ml Medium) aufgenommen und pelletiert (1200 rpm, RT, 4 min). Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf Poly-L-ornithin beschichteten Zellkulturschalen bei 36,5 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5%. Zu Beginn der Experimente wurden 70-80% konfluente Astrozyten mit 1x PBS gewaschen und über Nacht in Serum-freien Medium (50% HBSS, 50% F12-Medium, B27-Supplement, Gentamicin 50 mg/ml Medium) inkubiert.

2. Materialien & Methoden

Primäre hippocampale Neuronenkulturen

Primäre Neurone wurden aus embryonalen (e17-18) Sprague Dawley-Ratten präpariert. Die Embryone wurden dekapitiert, die Gehirne freigelegt und in gekühltes HBSS gegeben. Die Hippocampi wurden isoliert und für 20 min mit 1x Trypsin bei RT verdaut. Die Hippocampi wurden in HBSS mit 10% FCS aufgenommen, durch wiederholtes Pipettieren und Pipettieren durch eine Gaze wurden die Zellen vereinzelt und durch Zentrifugation (1200 rpm, 4 min, RT) pelletiert. Die primären Neurone wurden in Neurobasalmedium resuspendiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Neurobasalmedium mit 10% FCS, Glutamax, B27-Supplement und Gentamicin (50 mg/ml) in einer Dichte von 1×10^6 Zellen auf Poly-L-ornithin beschichteten Zellkulturschalen bei 36,5 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5%.

Primäre Astrozyten-Neuron-Co-Kulturen

Etwa 250.000 primäre Neurone wurden auf eine 6 cm-Zellkulturschale mit einer dichten primären Astrozytenkultur gesetzt und in Neurobasalmedium mit 10% FCS, Glutamax, B27-Supplement und Gentamicin (50 mg/ml) bei 36,5 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert. Die immunhistochemische Färbung der Ausgangskulturen mit neuronalen (MAP2) und astrozytären (GFAP, Cx43) Markern zeigte, dass diese > 95% rein neuronal bzw. rein astrozytär waren (Abb. 2.2).

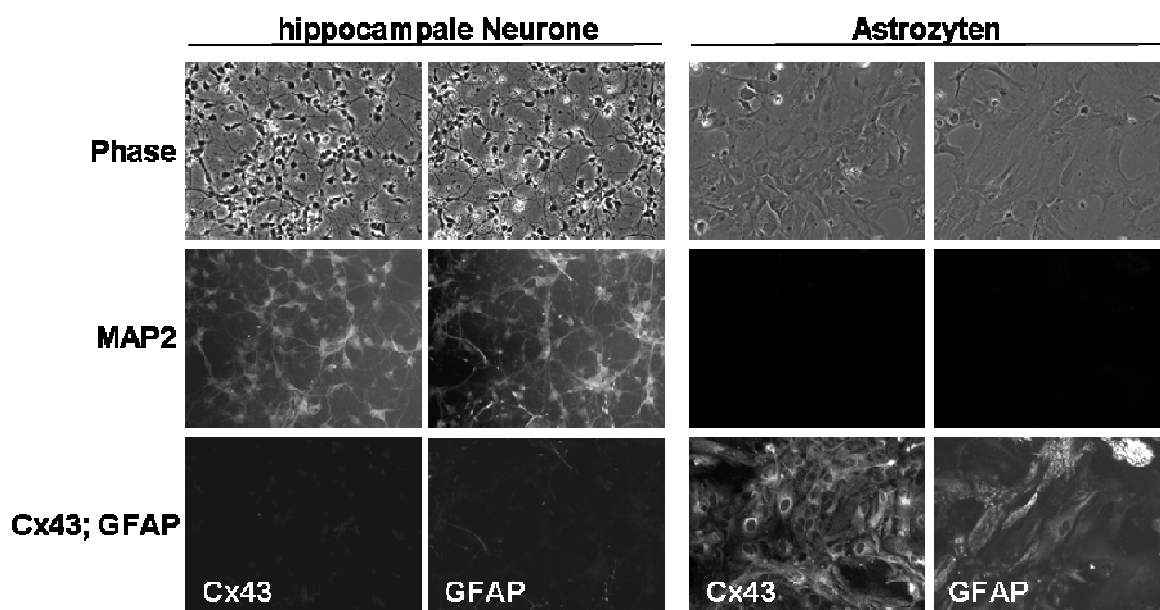


Abb. 2.2 Immunhistochemische Färbungen der primären Neuron- bzw. Astrozytenkulturen

Primäre hippocampale Neurone und primäre Astrozyten wurden wie vorher beschrieben kultiviert. Die Reinheit dieser Kulturen wurde mittels immunhistochemischen Färbungen verifiziert, wobei MAP2 ein neuronaler Marker ist und GFAP und Cx43 astrozytäre Marker darstellen. Abb. nach Hanstein et al., 2008b

2. Materialien & Methoden

2.2.1.3 Transfektion von primären und klonalen Zellen mit siRNA

Primäre Astrozyten und IMR32-Zellen wurden mit siRNA mittels des Amaxa Elektroporationssystems nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die Cx43 siRNA-Sequenzen sind: 5'-UAA UUC UGG CCA GGA AUA ATT-3' für humanes Cx43 and 5'-AAC AGU CUG CCU UUC GCU GUA TT-3' für Ratten Cx43 (Gj α 1). Die Sequenz für die nonsense siRNA (ns siRNA) ist 5'-GGG AAA UGC GUU AGC AGU GAU TT-3'. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für die Experimente verwendet und die Cx43-Proteinmenge wurde mittels Western Blotting für jedes Experiment bestimmt.

2.2.1.4 Organotypische hippocampale Schnittkulturen

In dieser Arbeit wurden organotypische hippocampale Schnittkulturen verwendet, da sie viele Vorteile gegenüber dissoziierten Primärkulturen besitzen, wie den Erhalt der synaptischen und anatomischen Organisation von Neuronen und des Neuron-Glia-Netzwerkes. Zusätzlich sind ihre funktionalen Eigenschaften ähnlich denen *in vivo* (Adamchik et al., 2000). Hippocampale organotypische Schnittkulturen wurden aus 7 bis 8 Tage alten Sprague Dawley-Ratten oder aus neugeborenen BDNF-defizienten Mäusen und altersentsprechenden Kontrollmäusen präpariert. Die Präparation der hippocampalen organotypischen Schnittkulturen erfolgte in Anlehnung an vorhergehende Publikationen (Stoppini et al., 1991; Heimrich und Frotscher, 1993). Sprague Dawley-Ratten wurden dekapitiert und die Köpfe wurden sofort in eiskaltem PBS (4 °C) gekühlt. Danach wurde das Gehirn herauspräpariert und in kaltes Kulturmedium (50% MEM, 25% HBSS, 25% inaktiviertes Pferdeserum, 30 mM HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin, 5 mg/ml Glucose) überführt. Die Trennung der Hemisphären und das Herauslösen beider Hippocampi erfolgten auf Eis. Mittels eines McIlwain tissue choppers wurden 350 μ m dicke hippocampale Schnitte angefertigt. Sieben bis zehn Hippocampuschnitte wurden auf eine Millipore-Membran platziert, die in eine Zellkulturschale gefüllt mit 1 ml Kulturmedium (36,5 °C) gesetzt wurde. Die Schnittkulturen wurden bei 36,5 °C in befeuchteter CO₂-angereicherter Atmosphäre für 7 Tage inkubiert. Alle zwei Tage folgte ein Austausch von 250 μ l Medium.

Experimenteller Ablauf:

In jedem Experiment wurden die hippocampalen Schnittkulturen in Experiment- und Kontrollkulturen unterteilt. 24 h vor Beginn der Experimente wurden die Membranen in Serum-freies Medium (75% MEM, 25% HBSS, 30 mM HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin, 5 mg/ml Glucose), das mit Propidiumjodid (PI) und 0.05% BSA versetzt war, überführt. PI ist

2. Materialien & Methoden

ein polarer Fluoreszenz-Farbstoff, der Zellen mit normaler Membranintegrität nicht färbt. Wenn die Membran jedoch geschädigt ist, bindet er an Nukleinsäuren in den betroffenen Zellen und färbt sie leuchtend rot (Vornov et al., 1998). PI ist daher ein Marker für apoptotische und nekrotische Zellen und bereits geschädigte Hippocampus-Schnitte konnten so identifiziert werden. In den Experimenten wurden die Hippocampuschnitte für 24 h mit CRH 100 nM, dem Toxin H_2O_2 500 μM und dem selektiven CRH-R1-Antagonisten R121919 100 nM oder einer Kombination der Reagenzien behandelt. In einem zweiten Experiment wurden die Schnittkulturen mit CRH 100 nM, dem Toxin H_2O_2 500 μM und dem Gap Junction-Hemmstoff Carbenoxolon 20 μM für 24 h behandelt. Danach wurden die Hippocampuschnitte mit einer CCD Kamera (Visitron Systems) an einem inversen Axiovert 200 Fluoreszenz Microscop photographiert. Alle Bilder wurden mit einem 4x Objektiv aufgenommen, da ein Bild in dieser Vergrößerung den gesamten Schnitt wiedergibt. Es wurden jeweils ein Phasenkontrastbild mit deutlich erkennbarer CA1/CA3-Region und dem Gyrus dentatus und ein PI-Fluoreszenzbild mit einem Rhodaminfilter photographiert. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe der MetaVue Imaging System Software (Molecular Devices, Munich, Germany) bestimmt. Die Lichtintensität und die Exposition (Verstärkung der Bilddaten durch die Kamera „camera gain“ und Expositionszeit) waren konstant während jeder Aufnahmeserie. Die maximale Fluoreszenz der Kulturen wurde zur Bestimmung der Expositionsparameter („camera gain“ und Expositionszeit) benutzt, um den vollen Intensitätsbereich des Imaging Systems auszunutzen, ohne eine Sättigung desselben zu erreichen. Zur Bestimmung des neuronalen Schadens wurde die PI-Fluoreszenz über die Fläche der hippocampalen Schnitte gemessen. Die Fläche der Schnitte konnte durch Analyse der Phasenkontrastbilder genau bestimmt werden. Der PI-Fluoreszenzmittelwert der Kontrollkulturen entsprach 100% Zellüberleben; die PI-Fluoreszenzwerte der Toxin-behandelten Schnitten wurden dazu in Bezug gesetzt und das Zellüberleben ermittelt. Pro Kulturschale wurden vier bis sechs hippocampale Schnitte untersucht. Alle Behandlungen erfolgten in doppelten Ansätzen und sechs unabhängige Experimente wurden durchgeführt.

2.2.2 Tiere

2.2.2.1 BDNF-defiziente Mäuse

Zur Untersuchung der CRH-vermittelten Neuroprotektion wurden BDNF-defiziente Mäuse (Korte et al., 1995) in einem C57/Bl6-Hintergrund verwendet. Die Mäuse wurden über den Austausch eines 560 bp-Fragments der codierenden BDNF-Sequenz durch einen

2. Materialien & Methoden

Selektionsmarker hergestellt; somit wurde der codierende Bereich für die reife BDNF-Sequenz deletiert. Northern-Blot Analysen zeigten eine Reduktion der BDNF mRNA um 50% in heterozygoten BDNF(+/-)-Mäusen und konnten keine BDNF mRNA in homozygoten BDNF(-/-)-Mäusen nachweisen. Obwohl für homozygote BDNF(-/-)-Mäuse eine Lebenszeit von 2 bis 4 Wochen publiziert wurde, überlebten sie in der zentralen Versuchstierhaltung der Universität Mainz nur für 1 bis 3 Tage nach der Geburt. Zusätzlich waren sie durch Wachstumsstörungen und einem reduzierten Gewicht (bis zu 25% geringer als Wildtypmäuse) gekennzeichnet. Zudem weisen BDNF-defiziente Mäuse zusätzlich eine signifikant reduzierte Langzeitpotenzierung auf und somit eine veränderte Neuroplastizität (Hennigan et al., 2007).

2.2.2.2 CRH-überexprimierende Mäuse

In dieser Arbeit wurden 2-3 Monate alte männliche, konditional CRH-überexprimierende Mäuse (CRH-COE^{hom}-NES) und altersentsprechende Kontrollmäuse (CRH-COE^{con}-NES) verwendet (Lu et al., 2008). In diesen Mäusen ist die CRH-Überexpression auf das ZNS und das Rückenmark beschränkt; die höchste CRH mRNA-Konzentration liegt im Hippocampus, Cortex und dem Bulbus olfactorius. Die Mäuse zeigen keine Störungen des endokrinen Systems, d.h. sie haben ein normales Gewicht und zeigen eine normale basale HPA-Achsenaktivität. Jedoch löst die CRH-Überexpression in den Mäusen bei Stress eine CRH-R1-abhängige Hypersekretion von Stresshormonen aus und führt zu vermehrtem Stress-Bewältigungsverhalten. Zur Herstellung der konditional CRH-überexprimierenden Mäuse wurde das Cre/loxP System mit dem ubiquitär exprimierten *ROSA26* locus kombiniert (Lu et al., 2008). Eine einzige Kopie der murinen *Crh* cDNA mit einer loxP-flankierten (floxed) transkriptionellen “Stop”-Sequenz wurde in den Target-Vektor pROSA26-1 eingefügt und es wurden Mäuse mit diesem modifizierten *R26* Allel (*R26*^{+*flopCrh*}, floxed stop) hergestellt. Diese *R26*^{+*flopCrh*}-Mäuse wurden mit transgenen *nestin-cre*-Mäusen verpaart, um die Überexpression von CRH auf das ZNS und das Rückenmark zu beschränken. Heterozygote *R26*^{+*flopCrh*} und *R26*^{+*flopCrh*} *nestin-cre* Tiere der F1-Generation wurden wiederum miteinander gekreuzt, um konditional CRH-überexprimierende Mäuse *R26*^{*flopCrh/flopCrh*} *nestin-cre* (CRH-COE^{hom}-NES) und Kontrollmäuse *R26*^{*flopCrh/flopCrh*} (CRH-COE^{con}-NES) in der F2-Generation zu erhalten. Alle Mäuse waren Mischungen der Mausstämme 129S2/Sv x C57BL/6J. Die Mäuse wurden in Käfigen mit einer Größe von 20×25×14 cm bei einem 12:12 h Tag-Nacht-Zyklus gehalten; Futter und Wasser standen nach Belieben zur Verfügung. Die Experimente wurden entsprechend den Richtlinien der European Communities Council Directive vom 24. November 1986 (86/609/EEC) und der German Council on Animal Care ausgeführt.

2. Materialien & Methoden

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien & Säugerzellen

RNA ist im Vergleich zu DNA anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse, weswegen das Arbeiten mit RNA spezielle Vorkehrungen verlangt. Daher wurde zur RNA-Isolierung Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes bidestilliertes Wasser verwendet. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation eines Histidinrestes im aktiven Zentrum. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das RNA RT-PCR Miniprep Kit (Stratagene) verwendet, das die Gewinnung von RNA über ein Silika-Säulenprinzip erlaubt. Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Um DNA-Kontaminationen der RNA zu vermeiden, wurde die RNA für 15 min mit DNaseI (Stratagene) bei 37 °C behandelt. Die Konzentrationsbestimmung von RNA basiert auf der Absorption der Nukleinsäuren bei 260-280 nm. Die Messung wurde in Quarzküvetten gegen RNA-Elutionspuffer (RNA RT-PCR Miniprep Kit) als Nullwert durchgeführt.

2.2.3.2 Reverse Transkription/Synthese von cDNA

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) lassen sich RNA-Sequenzen spezifisch in cDNA umschreiben. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Omniscript reverse transcriptase kit (Qiagen). 500 ng RNA wurden mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Der Reaktionsansatz wurde anschließend sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der RNA-Moleküle zu verhindern. Zum gleichen Ansatz wurden 2 µl 10x Puffer (Qiagen), 2 µl 5 mM dNTPs, 2 µl 10 µmol Oligo-dT₁₅-Primer, 0,25 µl RNase-Inhibitor (40 U, Promega) und 4 U Reverse Transkriptase (Omniscript, Qiagen) in einem Endvolumen von 20 µl gegeben. Eine Kontrolle, die keine Reverse Transkriptase enthielt, wurde zum Nachweis auf Kontamination mit DNA mitgeführt (Mock). Der Ansatz wurde 60 min bei 37 °C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente *in vitro*. Dieser Prozess wird durch die hitzestabile *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen) katalysiert. Die PCR wurde unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

2. Materialien & Methoden

PCR-Ansatz: Gesamtvolumen von 25 μ l
2 μ l cDNA
jeweils 15 pmol *sense* sowie *antisense* Primer
2,5 μ l 10x PCR-Puffer
0,5 μ l 10 mM dNTPs
0,75 μ l MgCl₂
0,5 U *Taq*-Polymerase

Der Ansatz wurde mit bidestilliertem Wasser auf 25 μ l aufgefüllt.

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Biometra) mit dem folgenden Programmschema durchgeführt:

1-	94 °C	3 min	Vor-Denaturierung der DNA
2-	94 °C	30 sec	Denaturierung der DNA
3-	Annealing Temp. (T _A)	30 sec	Anlagerung der Primer
4-	72 °C	1 min/1 kb	Elongation
5-	72 °C	10 min	finale Elongation
6-	4 °C	∞	

Für den Nachweis eines spezifischen Nukleinsäureabschnittes wurden 25-35 Zyklen der Schritte 2 bis 4 durchgeführt.

Folgende Primer wurden verwendet:

Primername	Primersequenz	T _A
β -Aktin <i>sense</i>	5'- CCAGACAGCACTGTGTTG -3'	55 °C
β -Aktin <i>antisense</i>	5'- CTGAGAGGGAAATCGTGC -3'	
humaner CRH-Rezeptor1 <i>sense</i>	5'- GCCAGCAACATCTCAGGACT -3'	60 °C
humaner CRH-Rezeptor1 <i>antisense</i>	5'- CTGCGAAACATCATCCACTG -3'	
humaner CRH-Rezeptor2 <i>sense</i>	5'- CCGAGGGTCCCTACTCCTAC -3'	66 °C
humaner CRH-Rezeptor2 <i>antisense</i>	5'- GCGGCACCAGACCTCATTGC -3'	
Maus Crh-Rezeptor1 <i>sense</i>	5'- GGTGTGCCTTTCCCCATCATT -3'	64 °C
Maus Crh-Rezeptor1 <i>antisense</i>	5'- CAACATGTAGGTGATGCCAG -3'	
Maus Crh-Rezeptor2 <i>sense</i>	5'- GGCAAGGAAGCTGGTGATTTG -3'	64 °C
Maus Crh-Rezeptor2 <i>antisense</i>	5'- GGCGTGGTGGTCCTGCCAGCG -3'	
Ratte Crh-Rezeptor1 <i>sense</i>	5'- CTGCACACAGCCATTGTGC -3'	60 °C
Ratte Crh-Rezeptor1 <i>antisense</i>	5'- GGAGCGGACCTCACTGTTC -3'	
Ratte Crh-Rezeptor2 <i>sense</i>	5'- CGGAATGCCTACAGAGAATGC -3'	62 °C
Ratte Crh-Rezeptor2 <i>antisense</i>	5'- AGCCTTCCACAAACATCCAGA -3'	
humanes Connexin 43 <i>sense</i>	5'- TCAAGCCTACTCAACTGCTGG -3'	64 °C
humanes Connexin 43 <i>antisense</i>	5'- TGTTACAACGAAAGGCAGACTG -3'	

2. Materialien & Methoden

2.2.3.4 RT-PCR

Zur Bestimmung der Expression der CRH-Rezeptoren auf Transkriptionsebene wurden RT-PCR Analysen durchgeführt. Ein Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 25 µl, enthielt 1 µl cDNA, jeweils 15 pmol *sense* sowie *antisense* Primer, 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,75 µl MgCl₂, 0,5 U *Taq*-Polymerase und bidestilliertes Wasser. Die PCR-Bedingungen waren mit denen der konventionellen PCR vergleichbar.

2.2.3.5 Real Time PCR-Analyse

Zur Quantifizierung der Genexpression von Cx43 auf Transkriptionsebene wurden *Real Time PCR*-Analysen durchgeführt. Das Endvolumen der PCR betrug 25 µl und enthielt neben der zu untersuchenden cDNA 12,5 µl PCR SYBR Green Supermix sowie 100 pmol der *sense* und *antisense* Primer. Die PCR wurde im iCycler der Firma BioRad durchgeführt. Die PCR Bedingungen glichen denen der konventionellen PCR. Es wurde der PCR-Zyklus bestimmt, nach dem die Amplifikation des PCR-Produktes in die exponentielle Phase übergeht („threshold cycle“, C_T). Die Bildung spezifischer PCR-Produkte wurde über die Analyse der Schmelzkurve überprüft. Die relative Expression (= R) von Cx43 in IMR32-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit CRH (100 nM, 10 nM für 4 h) wurde mit Hilfe der relativen Expressionssoftware tool (REST) bestimmt (Pfaffl et al., 2002) und mit der folgenden Formel berechnet: $R = 2^{\Delta C_T(Cx43)} / 2^{\Delta C_T(Aktin)}$, mit $\Delta C_T(Cx43) = (C_T \text{ Ctrl} - C_T \text{ CRH})$ für Cx43 und $C_T(Aktin) = (C_T \text{ Ctrl} - C_T \text{ CRH})$ für Aktin.

2.2.3.6 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die polyanionische DNA lässt sich in Agarosegelen elektrophoretisch auftrennen und analysieren. Die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen DNA-Moleküle wandern, ist dabei antiproportional zum Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichts. Demzufolge kann das Molekulargewicht eines DNA-Moleküls abgeschätzt werden, indem man seine Mobilität mit einem Standard bekannter Größe (DNA-Marker) vergleicht. Dabei wurden je nach Größe des erwarteten Fragments in Basenpaaren 1 bis 2%-ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die gewünschte Menge Agarose (w/v) durch Aufkochen in 1x TAE Puffer gelöst und 1 Tropfen Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml) hinzugegeben. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenz-Farbstoff und ermöglicht die spätere Visualisierung der DNA nach Anregung mit UV-Licht. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die DNA mit 1x Auftragspuffer versehen. Der Auftragspuffer erhöht die Dichte der DNA-Lösung und ermöglicht so ein Absinken in die Geltaschen. Zusätzlich gewährleistet

2. Materialien & Methoden

das Bromphenolblau im Auftragspuffer die Visualisierung der DNA im Gel, da es etwa auf Höhe eines 500 bp DNA-Fragments wandert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen in bp wurden 5 µl des DNA Markers (Fermentas) aufgetragen. Die Gele wurden unter UV-Beleuchtung (254-366 nm) photographiert.

1x TAE Puffer

5 mM Tris pH 7,5
5 mM Borsäure
1 mM EDTA

6x Auftragspuffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0
50% (v/v) Ficoll
0,006% Bromphenolblau

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinpräparation

Subkonfluente IMR32-Neuroblastomzellen und primäre Astrozyten wurden mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, danach mit 1x PBS mechanisch von den Zellkulturschalen geschabt und bei 4 °C und 3000 rpm für 8 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellpellets in frisch angesetztem 1x Lysispuffer (150-200 µl /Pellet) resuspendiert.

Organotypische hippocampale Schnittkulturen wurden mit einem feinen Spatel von der Millipore-Membran direkt in eiskalten Erntepuffer überführt. Sie wurden danach bei 4 °C und 3000 rpm für 8 min zentrifugiert und in frisch angesetztem 1x Lysispuffer (200 µl/Pellet) resuspendiert.

Die Lysate wurden 3x für 10 s sonifiziert und anschließend erfolgte die Lagerung der Proteinpräparate bei -80 °C.

1 x Erntepuffer

5 mM Hepes pH 7,4
320 mM Sucrose
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 mM Natriumorthovanadat
Protease Inhibitor Cocktail (1:100)
50 nM Calyculin A
0,6 µM Okadaische Säure
1 mM Natriumfluorid

1 x Lysispuffer

60 mM Tris-HCl pH 6,8
2% (w/v) SDS
10% (w/v) Saccharose
15 mM Hepes
0,5 mM EDTA
0,5 mM EGTA
1 mM Natriumorthovanadat
Protease Inhibitor Cocktail (1:100)
1 mM Natriumfluorid

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der BCA-Methode (BioRad). Die Proteinproben wurden mit dem BCA-Reagenz versehen und bei 60 °C für 25 min inkubiert. Im Anschluss wurden sie photometrisch bei 562 nm gemessen und mittels einer BSA-Standardkurve quantifiziert.

2. Materialien & Methoden

2.2.4.2 Western Blot-Analyse

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde die von Laemmli beschriebene Methode der denaturierenden SDS-PAGE eingesetzt (Laemmli, 1970). Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung von Polyacrylamidgelen (PAA-Gele) und Miniblot-Kammern (BioRad). PAA-Gele wurden nach folgendem Pipettierschema gegossen, wobei das Trenngel zunächst mit H₂O überschichtet wurde und nach vollständiger Polymerisation mit der Präparation des Sammelgels fortgefahren wurde. Die angegebenen Volumina entsprechen zwei 1,5 mm Gelen. Die Gele wurden entweder unmittelbar zur Gelelektrophorese eingesetzt oder für bis zu maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert.

Lösung	Trenngel (9%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (4,5%)
40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2,25 ml	3,75 ml	0,75 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS	2,5 ml	2,5 ml	-
dH ₂ O	5,25 ml	3,75 ml	6,5 ml
0,6 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS	-	-	2,5 ml
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Vor dem Auftragen auf das PAA-Gel wurden die Proteine mit 1x Auftragspuffer versehen und 5 min bei 97 °C inkubiert. Als Größenstandard wurde der Prestained Marker IV (Peqlab) eingesetzt. Die Proben wurden zunächst bei 70 V in das Sammelgel einlaufen gelassen und dann bei 150 V getrennt. Als Laufpuffer diente 1x SDS-Laufpuffer.

4x Auftragspuffer

100 mM Tris-HCl pH 6,8
4% (w/v) SDS
24% (v/v) Glycerin
20 mM Bromphenolblau
1,4 M β-Mercaptoethanol

1x SDS-Laufpuffer

25 mM Tris-HCl pH 8,3
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Die in einem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch einen elektrophoretischen *Wet Blot* auf die Oberfläche einer Nitrozellulosemembran übertragen. Auf dieser Trägermembran waren die Proteine immobilisiert und besser für Antikörper zugänglich. Nach beendeter PAGE wurde das PAA-Gel wie vom Hersteller vorgesehen

2. Materialien & Methoden

zusammen mit der Membran, Schaumstoff und Filterpapier in eine Transfereinheit gespannt. Alle Komponenten wurden zuvor in 1x Transferpuffer äquilibriert. Die Transfereinheit wurde in eine Tankblot-Kammer eingesetzt und die Kammer mit kaltem 1x Transferpuffer gefüllt. Das Blotten erfolgte bei 40 V für 2,5 h bzw. bei 30 V über Nacht. Im Anschluss wurden die transferierten Proteine mittels Ponceau S-Färbung reversibel angefärbt, um den Erfolg und die Qualität des Transfers zu überprüfen. Dafür wurde die geblottete Nitrozellulosemembran für einige Minuten in Ponceau S-Lösung inkubiert und danach mit dH₂O gewaschen. Die Proteinbanden wurden sichtbar sobald der Hintergrund entfärbt war.

1x Transferpuffer

25 mM Tris-HCl pH 8,3
192 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS
20% (v/v) Methanol

1x Ponceau S

0,02% (w/v) Ponceau
0,3% (w/v) Trichloressigsäure
0,3% (w/v) Sulphosalicylsäure

Immunologischer Nachweis der Proteine

Nach erfolgreichem Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte ihr immunologischer Nachweis. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran zunächst unter Schütteln für 1-2 h in Blockierungspuffer inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung (1:500 bis 1:1000) des primären Antikörpers bei 4 °C über Nacht. Monoklonale und polyklonale Antikörper wurden in TBS/Tween20 0,02% Natriumazid angesetzt. Danach wurde die Membran dreimal für je 15 min mit TBS/Tween20 gewaschen und anschließend für 1-2 h mit einem geeigneten sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS/Tween20 erfolgte die Nachweisreaktion mit Hilfe des Chemilucifer ECL Detection Systems der Firma Millipore. Die Membran wurde mit 1 ml ECL-Lösung benetzt und Signale mit der Fuji LAS-3000 intelligent dark box visualisiert. Die Messung der Signalintensität (optische Dichte, OD) erfolgte mit der Aida Image Analyzer version 3.28 Software (Ray-test). ODs der BDNF- oder Cx43-Banden wurden zu ODs der Aktinbanden normalisiert. Die Normalisierung der OD von Banden phosphorylierter Proteine (z.B. phospho-CREB, phospho-GSK3 β , phospho-ERK1/2) erfolgte zur OD der Gesamtmenge des untersuchten Proteins (CREB, GSK3 β , ERK1/2).

Blockierungspuffer

1x TBS
0,05% (v/v) Tween20
4% (w/v) Trockenmilchpulver

TBS/Tween20

1x TBS
0,05% (v/v) Tween20

10x TBS

100 mM Tris-HCl pH 7,5
1,5 M NaCl

2. Materialien & Methoden

Primäre Antikörper

Aktin	Sigma
BDNF C-terminale Domäne, polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
cFOS, polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
Connexin43, polyklonaler Antikörper	Zymed
CREB, polyklonaler Antikörper	Calbiochem-Novabiochem
phospho-CREB, polyklonaler Antikörper	Upstate Biotechnologies
DNP, polyklonaler Antikörper	Molecular Probes
ERK1/2, polyklonaler Antikörper	Cell Signaling
phospho-ERK1/2, monoklonaler Antikörper	Cell Signaling
FITC-conjugated Tomatolectin	Sigma
GFAP, polyklonaler Antikörper	Dako
MAP2, monoklonaler Antikörper	Sigma

Immunologischer Nachweis carbonylierter Proteine

Für den Nachweis von erhöhtem oxidativem Stress in Zellen, wurde der Carbonylierungsstatus als Maß der oxidativen Modifikation von Proteinen bestimmt (Witan et al., 2008). Dafür wurden 15 µg Proteinlysat für 5 min gekocht und danach für 20 min mit 5 mM DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine, Sigma-Aldrich) bei RT inkubiert. Danach wurde der pH mit 3 M Tris neutralisiert, die Proteinproben auf PAA-Gele geladen und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mittels Blockierungspuffer, der 10% Trockenmilchpulver in TBS/Tween20 (0.5%) enthielt, für 1 h bei RT inkubiert. Carbonylierte Proteine wurden mit Hilfe des polyklonalen DNP-Antikörpers detektiert.

2.2.4.3 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie werden Proteine *in situ* in Zellen oder Gewebeschnitten detektiert. IMR32-Zellen wurden zunächst unter Standardbedingungen kultiviert bis eine Konfluenz von circa 80% erreicht wurde. Die Zellen wurden kurz mit 1x PBS gewaschen, anschließend bei RT für 20 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert und für 15 min mit 0.2% Tween20/PBS permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation mit 3% BSA/PBS blockiert. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und danach mit dem anti-Cx43 Antikörper (1:200 in 1% BSA/PBS), mit dem anti-GFAP Antikörper (1:200) oder mit dem anti-MAP2 Antikörper (1:100) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen bei RT für 1 h mit dem sekundären, Fluoreszenzfarbstoff (Cy3)- oder (Cy2)-gekoppelten Antikörper (1:200, Jackson Laboratories) in 0,5 µg/ml DAPI/1% BSA/PBS inkubiert. Der ungebundene sekundäre

2. Materialien & Methoden

Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Um die Präparate vor dem raschen Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu schützen, wurden sie mit 2% DAPCO in Glycerol/PBS 1:1 eingebettet und ein Deckglas mit Nagellack auf den Objekten fixiert. Nach Aushärten des Nagellacks wurden die Präparate unter einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Dabei wurde Cy3 bei 545 nm analysiert.

PBS/Tween20

1x PBS
0,1% (v/v) Tween20

Blockierungspuffer

1x PBS
3% (v/v) BSA

Primär-Antikörperlösung

Antikörper 1:100 oder 1:200
1x PBS
0,1% (v/v) Tween20
1% (v/v) BSA

10x PBS

1,3 M NaCl
27 mM KCl
70 mM NaH₂PO₄
15 mM KH₂PO₄
Der pH wurde auf 7,4 eingestellt.

2.2.5 Auslösen akuten exzitotoxischen Stresses mittels Kainat-Injektion

Im Dissertationsprojekt wurde *in vivo* untersucht, ob durch die Überexpression von CRH im ZNS von Mäusen eine neuroprotektive Wirkung in akuten Stressmodellen zu beobachten ist. Ein akuter exzitotoxischer Insult, wie er u.a. bei epileptischen Anfällen auftritt, kann im Tiermodell durch die Injektion von Kainat induziert werden. Kainat, ein zyklisches Analogon des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat, aktiviert und überstimuliert die ionotropen Kainat- und AMPA-Rezeptoren, die sehr stark von den pyramidalen Neuronen der CA-Regionen und den Körnerzellen des Gyrus dentatus im Hippocampus exprimiert werden (Boulter et al., 1990). Dadurch kommt es zu einem massiven Ca²⁺-Einstrom in die aktivierten Neurone, der einen Verlust der Ca²⁺-Homöostase und eventuellen Zelltod zur Folge hat (Hollmann et al., 1994; Lindvall et al., 1994).

In den injizierten Tieren löst Kainat zunächst dosisabhängig epileptische Anfälle aus, die der Ammonshornsklerose, einer besonders häufigen Form der Schläfenlappenepilepsie beim Menschen, ähneln und führt langfristig zum spezifischen Absterben pyramidaler Neurone in der CA-Region des Hippocampus. Die epileptischen Krämpfe entwickeln sich nach einem bestimmten Muster und können so in verschiedene Schweregrade eingeteilt werden. Zusätzlich wurde der Zeitverlauf der epileptischen Anfälle dokumentiert.

2. Materialien & Methoden

Experimenteller Ablauf:

2 bis 3 Monate alte männliche, konditional CRH-überexprimierende Mäuse (CRH-COE^{hom}-NES) und altersentsprechende Kontrollmäuse (CRH-COE^{con}-NES) wurden mindestens 24 h vor Beginn der Experimente in Einzelkäfige umgesetzt und in den Experimentierraum transferiert, damit sie sich an die neue Umgebung gewöhnen konnten. 7 Mäuse jedes Genotyps wurden intraperitoneal mit 35 mg/kg Kainat (Ocean Produce International), gelöst in 0,9% NaCl, injiziert. Als Kontrollen dienten 4 Mäuse jedes Genotyps, die mit 0,9% NaCl injiziert wurden. Kainat induziert epileptische Anfälle, die sich in einem bestimmten Muster entwickeln und daher in verschiedene Schweregrade einteilen lassen (Racine, 1972). Nach Kainat-Injektion wurden die Mäuse für 6 h beobachtet und die Schwere der epileptischen Anfälle mit Hilfe des Racine-Systems dokumentiert. Dieses System bewertet die Schwere der epileptischen Anfälle mit Zahlen von 0 bis 6: 0, keine Auffälligkeiten; 1, Erstarren, starrer Blick, Mund- und Gesichtszuckungen; 2, Kopfnicken oder vereinzelt Zucken, starre Körperhaltung; 3, Aufstellen des Schwanzes, unilateraler/bilateraler Vorderpfotenklonus; 4, aufrechtes starres Sitzen auf den Hinterpfoten, eine oder beide Vorderpfoten sind ausgestreckt; 5, klonische Anfälle, d.h. unkontrolliertes Hüpfen und Fallen; 6, tonische Anfälle mit Extensionen der Hinterpfoten, Anfälle führen zum Tod der Maus.

2.2.6 Cardiale Perfusion & Herstellung von Hirnschnittpräparaten

Etwa 24 h nach Kainat-Injektion wurden die Mäuse mit einer 4% PFA-Lösung transcardial perfundiert, um Hirnschnittpräparate herzustellen. Zur Vorbereitung der transcardialen Perfusion wurden die Mäuse mit Halothan narkotisiert, sodass sie keinen Fußreflex mehr zeigten, aber eine unerwünschte Atemdepression noch nicht auftrat. Nach Fixierung der narkotisierten Mäuse wurde der Bauchraum durch einen kleinen Schnitt in der Mitte des Rippenbogens in Höhe des Zwerchfells geöffnet. Die Bauchhaut wurde mit einer Pinzette angehoben, das Zwerchfell gelöst und der Brustkorb wurde über parasternale Schnitte bis zur Clavikula geöffnet. Durch Aufklappen des Brustkorbes wurde das schlagende Herz sichtbar und es erfolgte eine PBS-Infusion (15 ml) in die linke Herzkammer in Richtung der Aorta zum Spülen des Gefäßsystems. Ein kleiner Schnitt öffnete den rechten Vorhof, sodass das Blut aus dem Gefäßsystem herausgespült werden konnte. Nachfolgend wurde das Gewebe durch Infusion einer 4% PFA-Lösung fixiert und danach das Gehirn entnommen. Zur Nachfixierung wurden die Gehirne für 24 h in 4% PFA inkubiert (4 °C) und eine

2. Materialien & Methoden

Kryoprotektion der Gehirne durch eine 24-stündige Inkubation mit 30% Sucrose erfolgte. Mit Hilfe von Trockeneis wurde Ethanol stark gekühlt und die Gehirne auf dieser kalten Unterlage in Tissue Freezing Medium (Jung) eingebettet. Die eingebetteten Gehirne wurden bei -80 °C gelagert. Mit einem Kryostat (CM 1900, Leica) wurden 10 µm Hirnschnitte angefertigt, die mit einem feinen Pinsel auf SuperPlus Objektträger (Hartenstein) platziert wurden. Die Objektträger wurden bei -20 °C bis zur Anfertigung immunhistochemischer Färbungen gelagert.

2.2.7 Nissl- & DAPI-Färbung von Gehirnschnitten

Schwere epileptische Anfälle führen zu einem Absterben von Hippocampusneuronen, was durch DAPI- und neuronenspezifischer Nissl-Färbung von Hirnschnitten sichtbar gemacht werden kann. Ein Merkmal geschädigter Zellen ist kondensiertes Chromatin im Zellkern, das nach DAPI-Färbung verstärkt fluoresziert (Ryu et al., 2003). 10 µm dicke Hirnschnitte durch den Hippocampus wurden daher zur Nachfixierung für 7 min in 5% Essigsäure/95% Ethanol inkubiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Schnitte mit 3% BSA (Sigma) in 0,1% TritonX-100/PBS für 20 min und die Färbung mit 0,5 µg/ml 4'-6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma) in PBS für 60 min. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und einem kurzen Spülen mit dH₂O wurden die Schnitte mit 2% DAPCO in Glycerol/PBS 1:1 eingebettet und ein Deckglas mit Nagellack auf den Objekten fixiert. Nach Aushärten des Nagellacks wurden die Präparate unter einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die Zellschädigung in der hippocampalen CA3-Region wurde über den Anteil der geschädigten Zellen mit kondensierten, hell fluoreszierenden Nuclei in Bezug zur Gesamtzellzahl in fünf Gehirnschnitten jedes Tieres bestimmt. Zusätzlich können neuronale Schädigungen mit Hilfe der Nissl-Färbung sichtbar gemacht werden. Dafür wurden Hirnschnitte kurz mit 0,25% (w/v) Thionin/Acetat pH 4 behandelt und danach sofort mit dH₂O gewaschen. Schädigungen der Neurone wurden so durch dunkel gefärbte, geschrumpfte Neurone mit pyknotischen Zellkernen oder dem Verlust von Neuronen im Gewebe sichtbar (Liu et al., 1999). Die neuronale Schädigung im Hippocampus wurde auch hier in fünf zufälligen Schnitten jedes Tieres bestimmt und nach folgender Skala bewertet: 0, keine Schädigung; 1, einzelne geschädigte Neuronen in der CA3-Region; 2, neuronale Schädigung der CA3-Region beträgt < 50% und 3, CA3-Region zeigt > 50% Neuronenschädigung.

2. Materialien & Methoden

2.2.8 Immunhistochemische Färbungen von Gehirnschnitten

10 µm dicke Hirnschnitte durch den Hippocampus wurden zur Nachfixierung für 7 min in 5% Essigsäure/95% Ethanol inkubiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Schnitte mit 3% BSA (Sigma) in 0,1% TritonX-100/PBS für 20 min und die Färbung mit dem primären Antikörper für 24 h bei 4 °C. Als primäre Antikörper wurden polyklonale anti-BDNF-Antikörper (1:500, Santa Cruz Biotechnology) und polyklonale anti-GFAP-Antikörper (1:500, Dako) verwendet. Zusätzlich wurde FITC-konjugiertes Tomatolectin (1:200, Sigma) eingesetzt. Nach Färbung wurden die Schnitte dreimal mit 1x PBS gewaschen und für 1 h mit Cy3-konjugierten Zweitantikörpern (1:200, Dianova), verdünnt in 0,5 µg/ml DAPI/PBS, inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 1x PBS wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gespült, mit 2% DAPCO in Glycerol/PBS 1:1 bedeckt und ein Deckglas mit Nagellack auf den Objekten fixiert. Nach Aushärten des Nagellacks wurden die Präparate unter einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

2.2.9 Zytotoxizitätstest - MTT

Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Test und wird zur Bestimmung der Zytotoxizität verschiedenster Reagenzien verwendet. Zellen werden *in vitro* mit dem MTT-Farbstoff (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid), einem gelben Tetrazol, behandelt. Nur lebende Zellen setzen dieses in den Mitochondrien in blau-violettes Formazan um (Abb. 2.3). Durch Zugabe eines Solubilisierungspuffers (20% SDS, 40% Dimethylformamid, Essigsäure pH 3,6) wird das unlösliche Formazan gelöst und die Absorption der Lösung mit einem Photometer bestimmt. Die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Farbstoffs entspricht damit der Glykolyserate der Zellen per se und ist direkt proportional zum Anteil lebender Zellen.

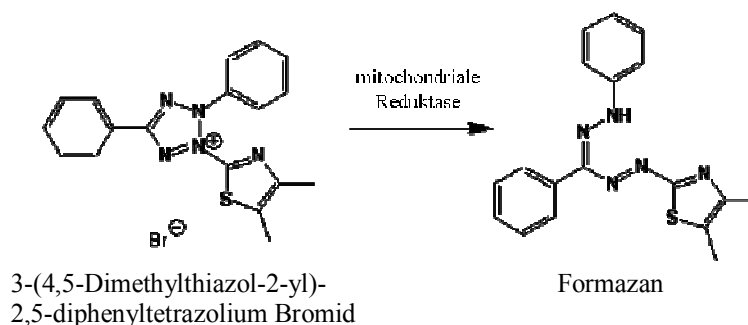


Abb.2.3 Umsetzung von MTT-Farbstoff (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid)

2. Materialien & Methoden

Experimenteller Ablauf:

Etwa 50.000 Zellen resuspendiert in 50 µl Serum-freien Medium wurden pro Well einer 96-Wellplatte ausgesät. Bei Erreichen von 70-80%-iger Konfluenz wurden die Zellen für 30 min mit CRH (100 nM) präinkubiert und danach mit den Toxinen H₂O₂ (100 µM) oder Amyloid β Peptid 25-35 (20 µM) behandelt. Um den Einfluss der Gap Junction-Kommunikation bei der CRH-vermittelten Neuroprotektion zu untersuchen, wurden die Zellen gleichzeitig mit dem Gap Junction-Hemmstoffs Carbenoxolon und den Toxinen behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde MTT-Lösung (5 mg/ml) zugegeben und nach weiteren 4 h wurden die Zellen über Nacht solubilisiert. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs wurde mit einem Photometer (OD_{560 nm}; Thermo Labsystems) gemessen.

2.2.10 Farbstoff-Transfer-Tests

Die Analyse der Farbstoffausbreitung nach Injektion oder Laden einer Einzelzelle stellt eine gut etablierte Methode zur Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions dar. Das Grundprinzip der Methode ist, dass der injizierte Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow CH, dilithium salt (LY, 5 mg/ml in PBS, Sigma) nicht membrangängig ist und sich daher ausschließlich über Gap Junctions in benachbarte Zellen ausbreiten kann. Somit charakterisiert die Geschwindigkeit bzw. das Ausmaß der Diffusion des Farbstoffes zwischen benachbarten Zellen den funktionellen Zustand der Zell-Zell-Kommunikation via Gap Junctions. Die gleichzeitige Injektion von Rhodamin-Dextran (5 mg/ml; Sigma-Aldrich), ein Farbstoff der nicht über Gap Junctions transportiert werden kann, ist ein Marker für die injizierte Zelle und dient als Kontrolle für die korrekte Ausführung der Injektion.

2.2.10.1 Mikroinjektion

Für die Injektionsversuche wurden IMR32-Zellen, die auf Poly-L-ornithin-beschichteten 60 µ-Zellkulturschalen mit Glasboden (ibidi) kultiviert waren, verwendet. Wenn die IMR32-Zellen eine 60-70%-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie über Nacht in Serum-freiem Medium weiter kultiviert. Nach Behandlung der Zellen mit CRH (100 nM, 10 nM) für 4 h wurde eine LY-Rhodamin-Dextran-Lösung mit dem Mikroinjektionssystem (Eppendorf) injiziert (Abb. 2.4). Für jede Messreihe wurden jeweils zehn Zellen pro Kulturschale zufällig für die Injektionen ausgewählt und jede Behandlung erfolgte in Duplikaten. Die Anzahl der benachbarten, fluoreszierenden Zellen 3 min nach der Injektion stellt ein direktes Maß für die

2. Materialien & Methoden

interzelluläre Kommunikation dar. Die Aufnahme (40fache Vergrößerung) und Auswertung der fluoreszierenden Zellen erfolgte mit einem IX81 Fluoreszenz-Mikroskop verbunden mit der Cell[^]R Imaging Station (Olympus).

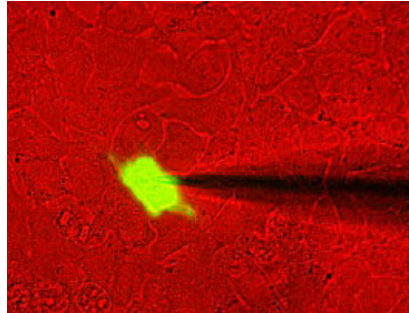


Abb. 2.4: Farbstoff-Transfer-Test: Injektion von Lucifer Yellow in eine Zelle

2.2.10.2 Scrape loading

Für die Scrape Loading-Experimente wurden Zellen, die auf Poly-L-ornithin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert waren, verwendet. Wenn die Zellen eine 60-70%-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie über Nacht in Serum-freiem Medium kultiviert. Nach Behandlung der Zellen mit CRH (100 nM, 10 nM) oder Urocortin (100 nM, 10 nM) für 4 h wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, die Zellschicht mit einer Rasierklinge angeritzt und danach für 10 min mit einer LY-Lösung bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert. Die LY-Lösung wurde nach 10 min entfernt, die Zellen viermal mit 1x PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Der Farbstofftransport wurde über Fluoreszenzmikroskopie (Axiovert 200 Fluoreszenz-Mikroskop, Zeiss; CCD Kamera, Visitron Systems) ausgewertet; für die Quantifizierung wurde die Anzahl der LY-markierten Zellen vom initialen Rasierklingschnitt gezählt, wobei die erste angeschnittene Zelle „1“ zählte. Jede Behandlung erfolgte in Duplikaten und zehn Felder pro Kulturschale wurden fotografiert (10fache Vergrößerung). Fünf unabhängige Experimente wurden untersucht und die Daten werden als arithmetische Mittelwerte \pm SEM angegeben.

2.2.10 Statistik

Die Durchführung jedes Experimentes erfolgte unabhängig drei- bis sechsmal. Die Behandlungen mit den verschiedenen Reagenzien erfolgten immer in doppelten oder dreifachen Ansätzen. In allen Graphiken wurden der arithmetische Mittelwert und die

2. Materialien & Methoden

Standardabweichung aus den Mittelwerten aller Experimente (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz für den Vergleich unterschiedlich behandelter Ansätze (> 3) wurde mit Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks und dem Dunn`s-Test als post-hoc Test bestimmt. Wenn die Daten eine Normalverteilung und gleiche Varianz aufwiesen, wurde ein One Way ANOVA mit dem post hoc Tukey-Test durchgeführt. Für den Vergleich von zwei unterschiedlich behandelten Gruppen wurde die statistische Signifikanz mit dem Mann-Whitney Rank Sum-Test durchgeführt, wenn die Daten aber eine Normalverteilung und gleiche Varianz aufwiesen, wurde der Students t-Test verwendet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,005$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Die CRH-induzierte Neuroprotektion gegenüber akuter Exzitotoxizität *in vivo*

3.1.1 CRH-Überexpression verkürzt die Dauer Kainat-induzierter Epilepsie

Zur Untersuchung der neuroprotektiven Eigenschaften von CRH *in vivo*, wurde das Modell des akuten exzitotoxischen Stresses verwendet. Exzitotoxischer Stress wurde in CRH-überexprimierenden Mäusen (CRH-COE^{hom}-NES) und altersentsprechenden Kontrollmäusen (CRH-COE^{con}-NES) durch Injektion von Kainat, einem zyklischen Analogon des exzitotoxischen Neurotransmitters Glutamat, induziert. Exzitotoxizität ist ein Hauptmerkmal der Epilepsie, die interessanterweise bei AD-Patienten und Patienten mit psychischen Erkrankungen zehn- bzw. fünfmal häufiger auftritt als bei einer Referenzpopulation (zur Übersicht: Menendez, 2005; Kanner, 2007). Da bei beiden Patientengruppen auch eine Störung des CRH-Systems zu beobachten ist, sollte der Effekt einer CRH-Überexpression im Hinblick auf eine verbesserte Neuroprotektion betrachtet werden.

Kainat induziert dosisabhängig epileptische Anfälle, die der Ammonshornsklerose, einer besonders häufigen Form der Schläfenlappenepilepsie beim Menschen, ähneln. Die epileptischen Anfälle entwickeln sich in einem bestimmten Muster und lassen sich daher in verschiedene Schweregrade einteilen (s. Kapitel 2.2.5, Racine, 1972). Die Stärke und die Dauer der epileptischen Anfälle wurden nach der intraperitonealen Kainat-Injektion (35 mg/kg) kontinuierlich über 6 h dokumentiert (Abb. 3.1). Die CRH-überexprimierenden Mäuse (CRH-COE^{hom}-NES) und die Kontrollmäuse (CRH-COE^{con}-NES) zeigten 20-30 min nach Kainat-Injektion epileptische Anfälle. Die Mausstämme unterschieden sich nicht in der maximalen Stärke der Anfälle (Abb. 3.1 A), jedoch traten zwischen den Kainat-injizierten CRH-COE^{hom}-NES- und CRH-COE^{con}-NES-Mäusen signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Epilepsie auf (Abb. 3.1 B). CRH-COE^{hom}-NES-Mäuse entwickelten bereits nach 20 min signifikant stärkere epileptische Anfälle als CRH-COE^{con}-NES-Mäuse; zwei der neun CRH-COE^{hom}-NES-Mäuse starben daran innerhalb von 30 min nach der Injektion. Bereits nach 120 min hatten sich die CRH-COE^{hom}-NES-Mäuse aber wieder von den epileptischen Anfällen erholt. Dahingegen zeigten CRH-COE^{con}-NES-Mäuse erst nach 30-40 min starke

3. Ergebnisse

Anfälle. Jedoch traten diese noch vier Stunden nach Injektion auf und äußerten sich bei einigen Tieren auch nach 24 h in spontanen Zuckungen und Krämpfen. Kontrolltiere beider Mausstämme, die mit 0,9% NaCl-Lösung injiziert wurden, wiesen keine Verhaltensänderungen auf.

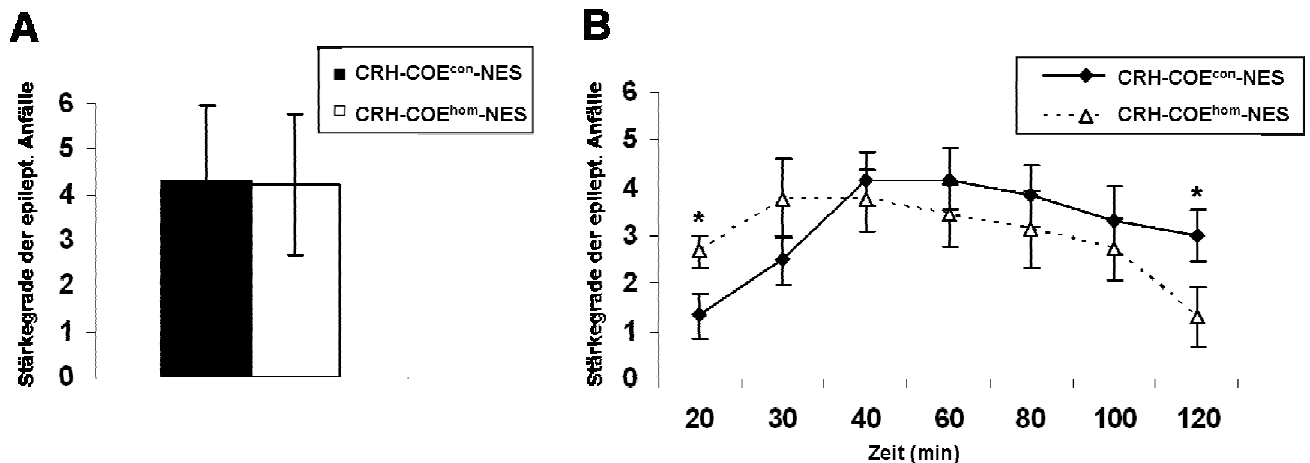


Abb. 3.1 Maximale Stärkegrade und zeitlicher Verlauf der epileptischen Anfälle nach Kainat-Injektion

Die Stärke der epileptischen Anfälle nach intraperitonealer Kainat-Injektion (35 mg/kg) in CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-NES-Mäusen und in CRH-COE^{con}-NES-Kontrollmäusen wurde nach Racine (1972) dokumentiert. Hohe Werte entsprechen starken epileptischen Anfällen, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. **A**, Mittelwert der maximalen Stärken der epileptischen Anfälle \pm Standardabweichung sind angegeben. **B**, Zeitverlauf der Stärke der epileptischen Anfälle über 120 min nach Kainat-Injektion; Mittelwerte der Stärkegrade 20, 30, 40, 60, 80, 100 und 120 min nach Kainat-Injektion \pm Standardabweichung sind angegeben (* $P < 0,05$, Student's t-Test, $n = 6-9$). Abb. nach Hanstein et al., 2008a

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine CRH-Überexpression zwar nicht vor Kainat-induzierter Exzitotoxizität schützen kann, aber die Dauer der epileptischen Anfälle verkürzt.

3.1.2 CRH-Überexpression schützt hippocampale Neurone vor Exzitotoxizität

CRH-Überexpression schützt vor neuronaler Schädigung im Hippocampus

Die Kainat-Injektion löst lang anhaltenden exzitotoxischen Stress aus, wodurch neuronale Schädigung, Apoptose und Nekrose sowie eine Aktivierung von Gliazellen im Hippocampus induziert werden. Speziell die pyramidalen Neuronen der hippocampalen CA3-Region sind sehr vulnerabel gegenüber Kainat-induzierter Exzitotoxizität (Nadler et al., 1978; Ben-Ari, 1985). Deshalb wurde der neuronale Schaden 24 h nach Kainat-Injektion in Gehirnschnitten durch den Hippocampus der CRH-COE^{hom}-NES- und CRH-COE^{con}-NES-Mäuse mittels DAPI- und Nissl-Färbung untersucht (Abb. 3.2). Durch die DAPI-Färbung erscheinen geschädigte Zellen stark fluoreszierend (Ryu et al., 2003), während in der Nissl-Färbung

3. Ergebnisse

geschädigte Neuronen dunkel gefärbt sind und auch der Verlust von Neuronen im Gewebe sichtbar wird (Liu et al., 1999).

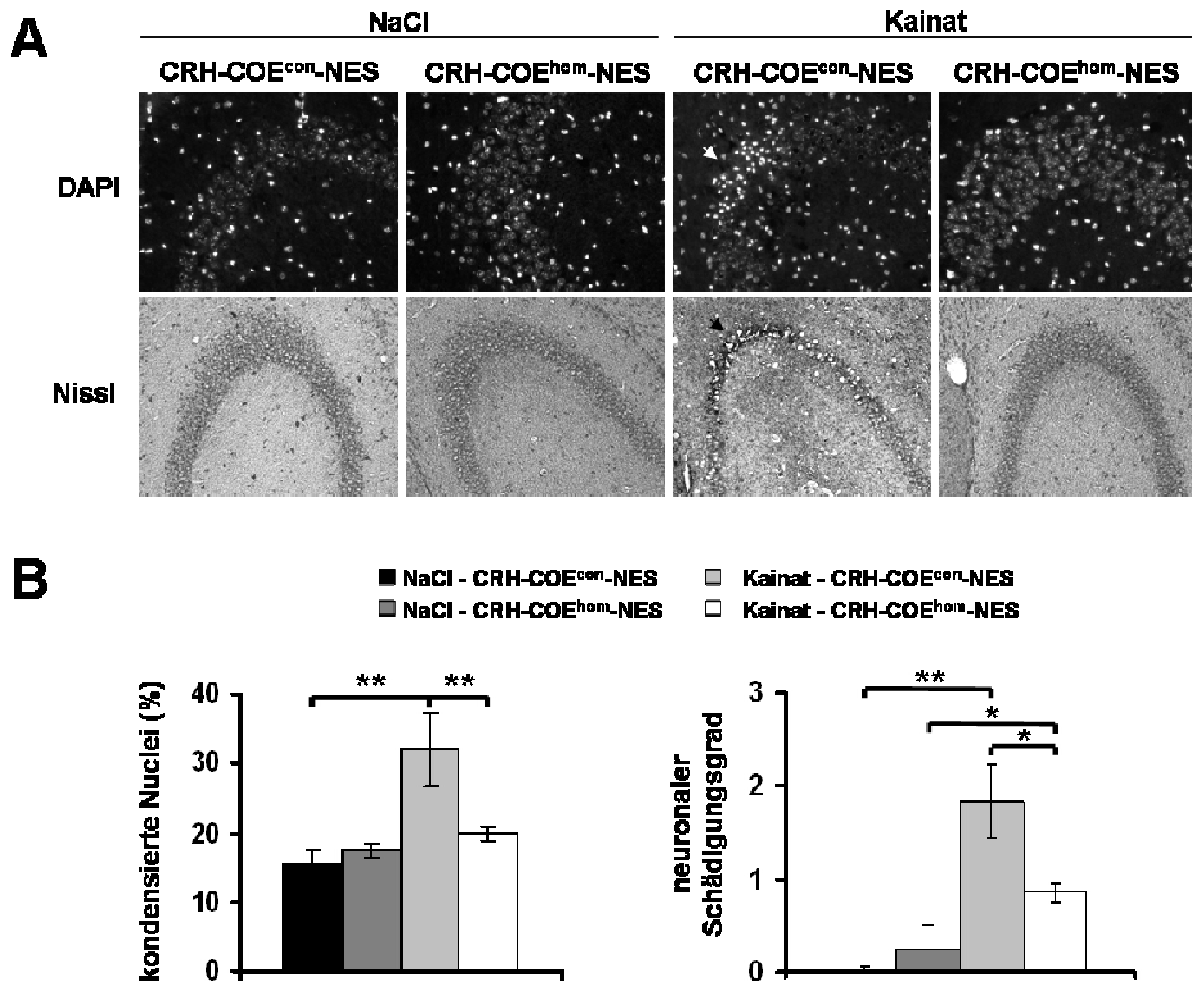


Abb. 3.2. Neuronaler Zelltod in der CA3-Region der Hippocampi von CRH-COE^{hom}-NES- und CRH-COE^{con}-NES-Mäusen 24 h nach Kainat-Injektion

A, Repräsentative DAPI- und Nissl-Färbungen von Hippocampus-Gewebeschnitten der NaCl- oder Kainat-injizierten CRH-COE^{hom}-NES- und CRH-COE^{con}-NES-Mäuse zur Untersuchung der neuronalen Schädigung. Nach DAPI-Färbung können geschädigte Zellen durch eine sehr starke Fluoreszenz der kondensierten Nuclei identifiziert werden. Bei der Nissl-Färbung sind betroffene Hirnareale durch dunkel gefärbte Neuronen oder Gewebeläsionen charakterisiert. Pfeile zeigen auf geschädigte Neurone in der hippocampalen CA3-Region. **B**, Quantifizierung der Gewebeschädigung nach DAPI- und Nissl-Färbung in fünf unabhängigen Hippocampusschnitten jedes Tieres. *Graph links* – Anteil der geschädigten Zellen mit kondensierten, hell fluoreszierenden Nuclei in Bezug zur Gesamtzellzahl. *Graph rechts* – Bewertung der Nissl-gefärbten Schnitte nach folgender Skala: 0, keine Schädigung; 1, einzelne geschädigte Neuronen in der CA3-Region; 2, neuronale Schädigung der CA3-Region beträgt < 50% und 3, CA3-Region zeigt > 50% Neuronenschädigung. Mittelwerte ± Standardabweichung sind angegeben (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Students t-Test, Kontrollmäuse $n = 4$, Kainat-injizierte Mäuse $n = 6-7$). Abb. nach Hanstein et al., 2008a

In Gehirnschnitten der sieben überlebenden Kainat-injizierten CRH-COE^{hom}-NES-Mäuse war der neuronale Zelltod gering (Abb. 3.2 A, B), obwohl nach Kainat-Injektion sowohl CRH-überexprimierende CRH-COE^{hom}-NES-Mäuse wie auch die CRH-COE^{con}-NES-Mäuse

3. Ergebnisse

schwere epileptische Anfälle entwickelt hatten (Abb. 3.1 A, B). Dahingegen wiesen Nissl- und DAPI-gefärbte Gehirnschnitte von vier der sechs Kainat-injizierten CRH-COE^{con}-NES-Mäuse schwerwiegende Schädigungen der pyramidalen Neuronen in der Hippocampus CA3-Region auf, zwei Mäuse hatten geringere Schädigungen (Abb. 3.2 A, B). Tiere mit beträchtlicher Schädigung der CA3-Region zeigten zudem Neurone mit pyknotischen Nuclei in der Hippocampus CA1-Region und im Stratum granulare des Gyrus dentatus (Abb. 3.3). Kontrolltiere, die mit 0,9% NaCl-Lösung injiziert wurden, wiesen keinen Zelltod im Hippocampus auf.

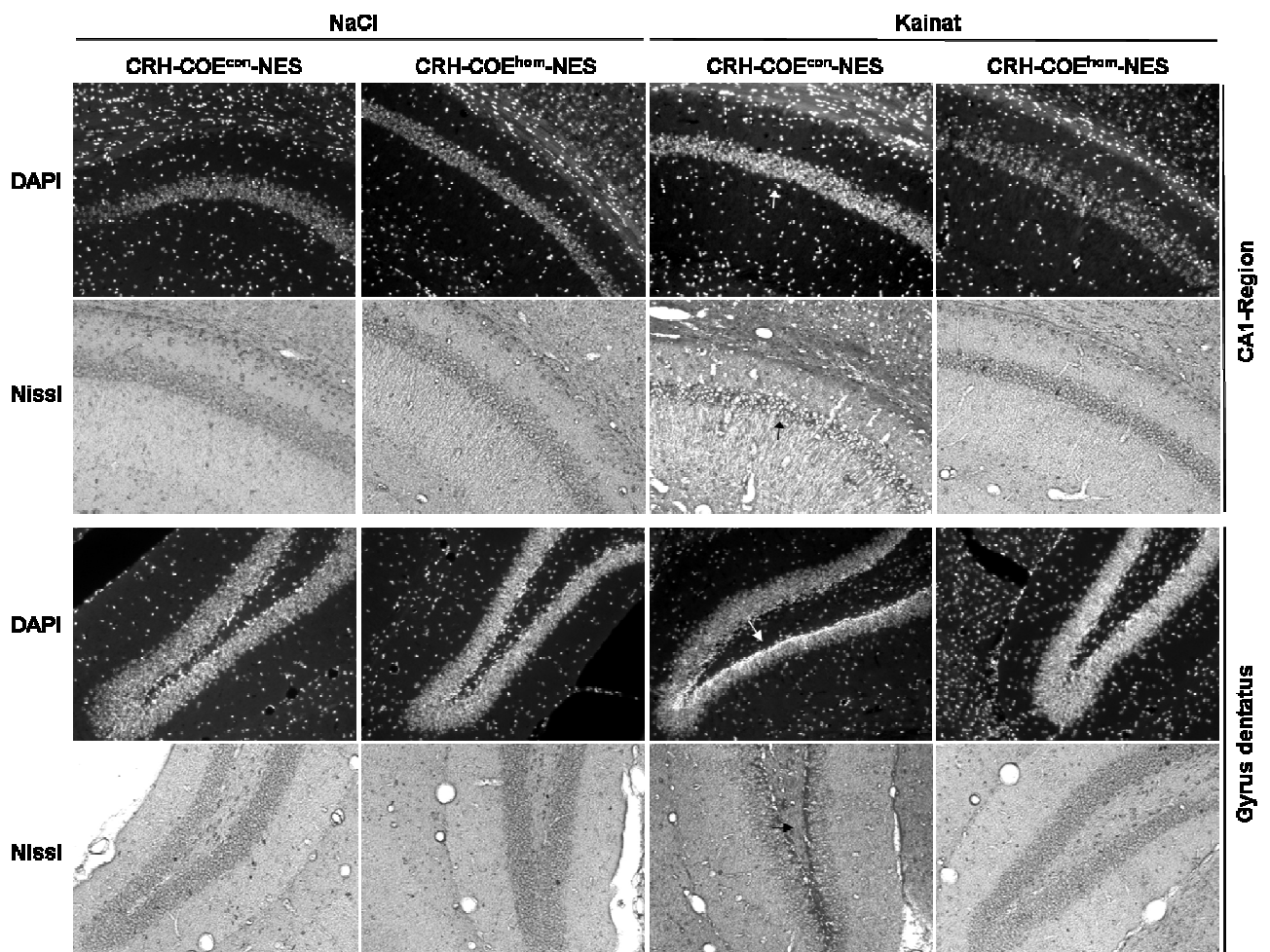


Abb. 3.3 Neuronaler Zelltod in der CA1-Region und im Gyrus dentatus der Hippocampi von CRH-COE^{hom}-NES- und CRH-COE^{con}-NES-Mäusen 24 h nach Kainat-Injektion

Repräsentative DAPI- und Nissl-Färbungen von hippocampalen Gewebeschnitten der NaCl- oder Kainat-injizierten CRH-COE^{hom}-NES- und CRH-COE^{con}-NES-Mäuse zur Untersuchung der neuronalen Schädigung. Geschädigte Zellen können nach DAPI-Färbung durch eine sehr starke Fluoreszenz der kondensierten Nuclei identifiziert werden. Bei der Nissl-Färbung sind dunkel gefärbte Neurone oder Gewebeläsionen Charakteristika der betroffenen Hirnareale. Pfeile zeigen auf geschädigte pyramidale Neurone und Läsionen in der CA1-Region (1. & 2. Reihe) oder auf geschädigte Neuronen im Stratum granulare des Gyrus dentatus (3. & 4. Reihe); Kontrollmäuse n = 4, Kainat-injizierte Mäuse n = 6-7 jeweils pro Genotyp. Abb. nach Hanstein et al., 2008a

3. Ergebnisse

CRH-Überexpression schützt vor Neuroinflammation im Hippocampus

Die geschädigten Hippocampusregionen wiesen auch Merkmale von Neuroinflammation auf wie die Aktivierung und Proliferation GFAP-positiver Astrozyten und Tomatolectin-positiver Mikroglia. Aktivierte Astrozyten und Mikroglia migrierten speziell in die Hippocampus CA3-Region und akkumulierten dort um geschädigte pyramidale Neuronen (Abb. 3.4).

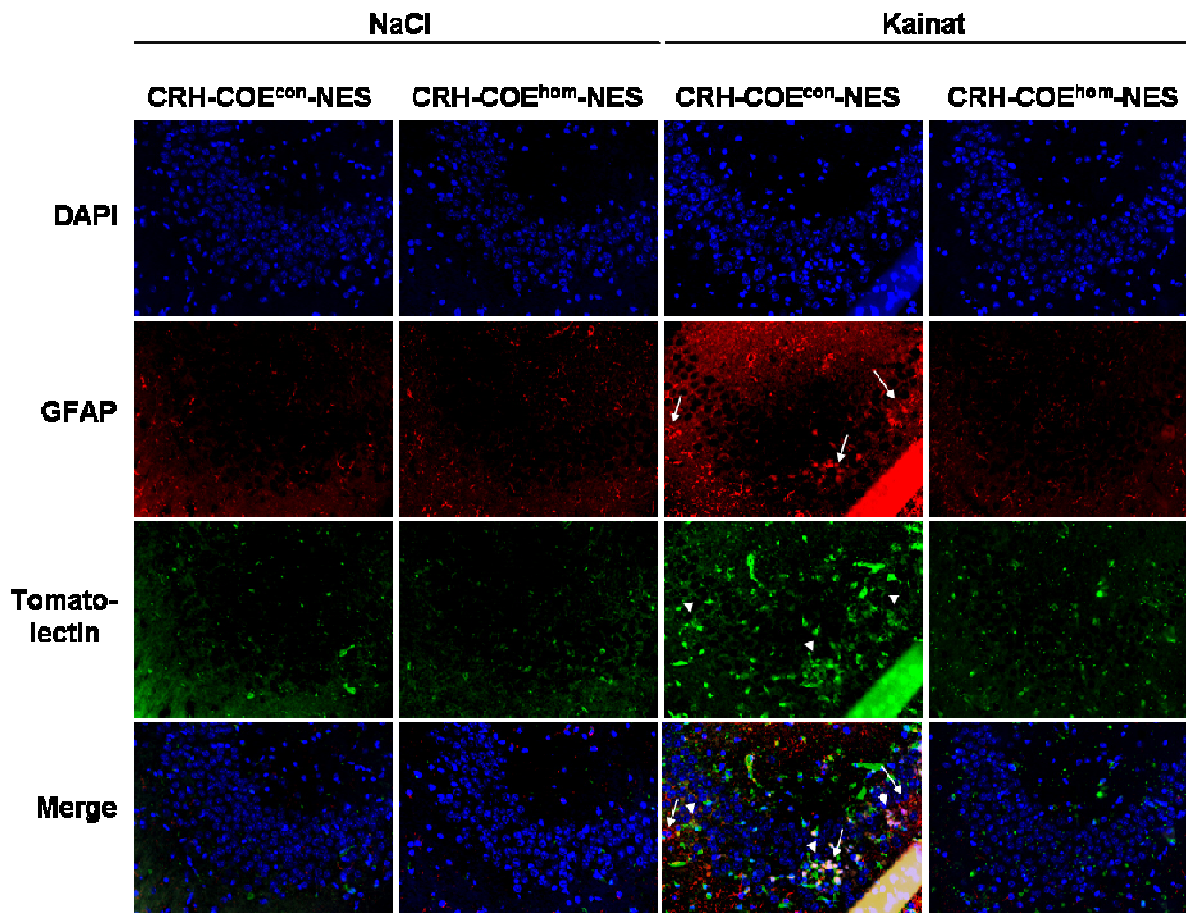


Abb. 3.4 Analyse der Neuroinflammation in Hippocampi von CRH-COE^{con}-NES- und CRH-COE^{hom}-NES-Mäusen 24 h nach Kainat-Injektion

Hippocampus-Gewebeschnitte wurden dreifach mit DAPI (blau) für die Zellkerne, mit GFAP (rot) für aktivierte Astrozyten und mit FITC-gekoppeltem Tomatolectin (grün) für aktivierte Mikroglia gefärbt. Geschädigte Zellen zeigen nach DAPI-Färbung eine sehr starke Fluoreszenz der kondensierten Nuclei. Die Überlagerung der Färbungen (= Merge) zeigt eine verstärkte Migration der aktivierten Gliazellen in die geschädigte hippocampale CA3-Region der Kainat-injizierten CRH-COE^{con}-NES-Mäuse. Zudem akkumulierten aktivierte Gliazellen um geschädigte pyramidale Neuronen. Aktivierte Astrozyten sind durch Pfeile markiert, Pfeilköpfe weisen auf aktivierte Mikroglia hin. Bei Kainat-injizierten CRH-COE^{hom}-NES-Mäusen und NaCl-injizierten Kontrollmäusen gibt es keine Anzeichen einer Neuroinflammation. Abb. nach Hanstein et al., 2008a

In den Hippocampuschnitten der Kainat-injizierten CRH-überexprimierenden Mäuse (CRH-COE^{hom}-NES) zeigten sich nur geringe neuronale Schädigungen (Abb.3.2, 3.3), auch gab es keine Anzeichen von Neuroinflammation im Hippocampus (Abb. 3.4).

3. Ergebnisse

Diese Ergebnisse bestätigen, dass CRH hippocampale Neuronen gegenüber Kainat-induzierter Exzitotoxizität *in vivo* schützt. Kontrollmäuse, die mit 0,9%-iger NaCl-Lösung injiziert worden waren, zeigten keine neuronalen Schädigungen und Neuroinflammation im Hippocampus.

3.1.3 Hochregulation der BDNF-Proteinexpression nach exzitotoxischem Stress

Kainat-induzierter exzitotoxischer Stress löst eine Hochregulation des BDNF-Proteins im Hippocampus aus, die mit der Schwere der Schädigung korreliert und 24 h nach Injektion am höchsten ist (Rudge et al., 1998; Sathanoori et al., 2004; Dong et al., 2006). In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass BDNF in verschiedenen Neurotoxizitätsmodellen *in vivo* und *in vitro* entscheidend für die Neuroprotektion ist (Dugich-Djordjevic et al., 1992; Khaspekov et al., 2004). Deshalb wurde die BDNF-Expression in Gehirnschnitten der Kainat-injizierten CRH-COE^{con}-NES- und CRH-COE^{hom}-NES-Mäuse untersucht. In Hippocampusregionen der CRH-COE^{con}-NES-Mäuse mit starker neuronaler Schädigung trat eine sehr hohe BDNF-Expression im betroffenen Areal auf. Die Intensität der BDNF-Färbung korrelierte mit dem Schädigungsgrad und war in der CA3-Region am stärksten (Abb. 3.5).

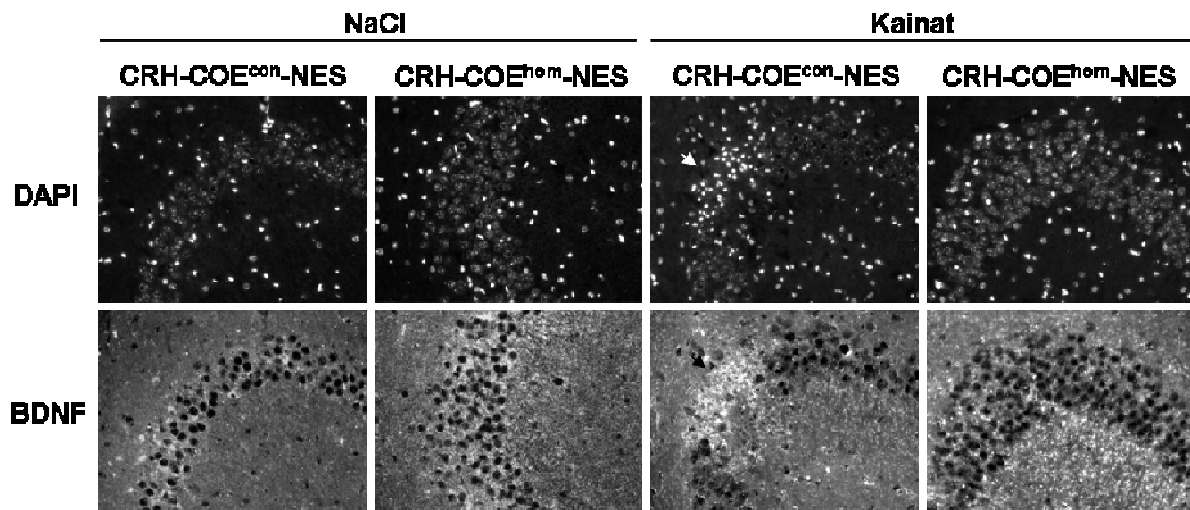


Abb. 3.5 Vergleich der BDNF-Expression in CRH-COE^{con}-NES- und CRH-COE^{hom}-NES-Mäusen nach exzitotoxischem Stress

obere Bildreihe – Repräsentative DAPI-Färbungen von Hippocampus-Gewebeschnitten der NaCl- oder Kainat-injizierten CRH-COE^{hom}-NES- und CRH-COE^{con}-NES-Mäuse. Mittels DAPI-Färbung können geschädigte Zellen durch eine sehr starke Fluoreszenz der kondensierten Nuclei identifiziert werden.

untere Bildreihe – Repräsentative BDNF-Färbungen der Hippocampusschnitte. Der Pfeil deutet auf eine starke BDNF-Färbung in der geschädigten hippocampalen CA3-Region von CRH-COE^{con}-NES-Mäusen hin.

Abb. nach Hanstein et al., 2008a

3. Ergebnisse

Die BDNF-Expression im Hippocampus der Kainat-injizierten CRH-COE^{hom}-NES-Mäuse war jedoch gegenüber den NaCl-injizierten CRH-COE^{hom}-NES-Mäusen kaum erhöht, da hier nur geringfügige neuronale Schädigungen auftraten (Abb. 3.5).

3.1.4 CRH-Überexpression induziert eine erhöhte BDNF-Proteinexpression

Interessanterweise konnte in den Hippocampuschnitten der NaCl-injizierten CRH-überexprimierenden Mäuse (CRH-COE^{hom}-NES) eine höhere basale BDNF-Expression im Hippocampus detektiert werden als in Mäusen mit endogenem CRH-Spiegel (CRH-COE^{con}-NES; Abb. 3.5). Diese Steigerung der BDNF-Proteinexpression in CRH-überexprimierenden Mäusen konnte auch durch eine Western Blot-Analyse von Gesamtproteinlysaten aus den Hippocampi von unbehandelten CRH-COE^{con}-NES- und CRH-COE^{hom}-NES-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Diese Ergebnisse bestätigen *in vitro* Studien, die eine gesteigerte BDNF-Expression nach CRH-Behandlung fanden (Bayatti et al., 2005), zeigen aber auch erstmals BDNF als CRH-Zielgen *in vivo*. Da BDNF bereits als neuroprotektiver Faktor beschrieben wurde, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass BDNF für die CRH-vermittelte Neuroprotektion relevant ist und somit die pyramidalen Neurone im Hippocampus vor Kainat-induziertem exzitotoxischem Stress schützt.

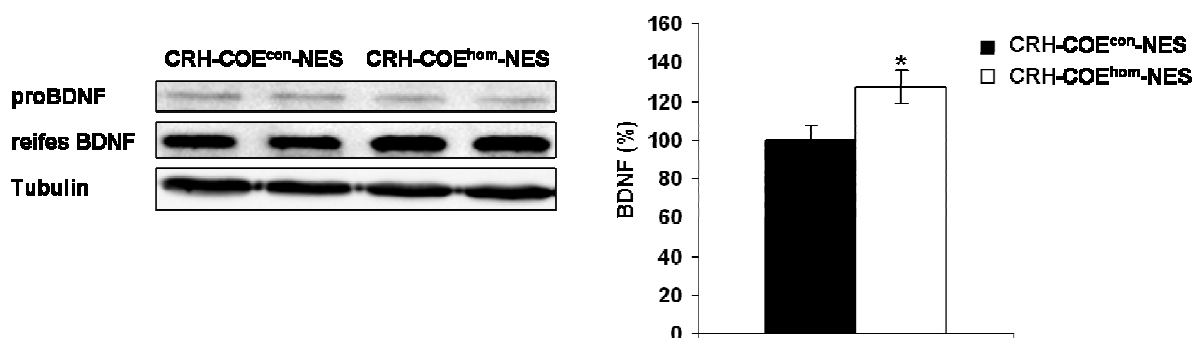


Abb. 3.6 Effekte der CRH-Überexpression auf die endogene BDNF-Expression im Hippocampus

BDNF-Spiegel in Proteinlysaten aus Hippocampi von unbehandelten CRH-COE^{con}-NES- und CRH-COE^{hom}-NES-Mäusen wurden über Western Blots analysiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von zwei Tieren jedes Genotyps. Die Quantifizierung von reifem BDNF erfolgte über eine densitometrische Analyse der Western Blots. Mittelwerte \pm Standardabweichung sind angegeben. (* $P < 0,05$, Students t-Test, $n = 7$). Abb. nach Hanstein et al., 2008a

3. Ergebnisse

3.1.5 BDNF als Mediator der Neuroprotektion

Zur weiteren Untersuchung der BDNF-vermittelten Neuroprotektion, wurde der Effekt von BDNF gegenüber dem oxidativen Stressor H_2O_2 in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen von neugeborenen BDNF-defizienten Mäusen analysiert. Hierzu wurden hippocampale organotypische Schnittkulturen aus homozygoten BDNF(-/-)-defizienten Mäusen, heterozygoten BDNF(+/-)-Mäusen, die 50% der endogenen BDNF-Menge exprimieren, und aus wildtypischen Kontrolltieren hergestellt. Eine 24-stündige Inkubation mit H_2O_2 (500 μ M) induzierte in den Hippocampuschnitten der Mäuse überraschenderweise vergleichbare neuronale Schäden (Abb. 3.7).

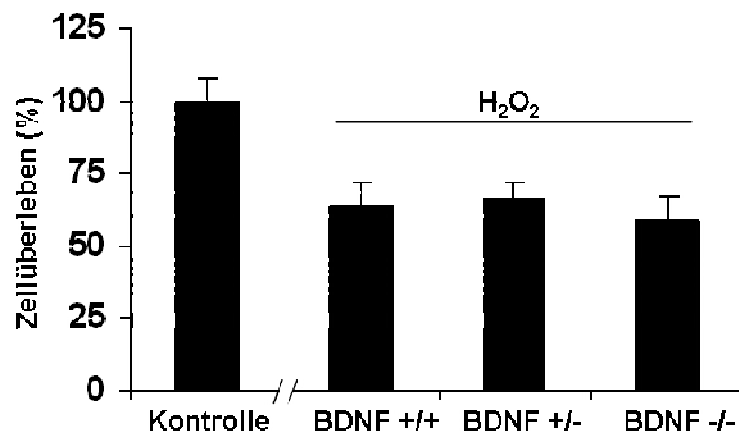


Abb. 3.7 Analyse der BDNF-vermittelten Neuroprotektion gegenüber dem oxidativen Stressor H_2O_2

Zur Bestimmung des neuronalen Schadens wurde die PI-Fluoreszenz über die Fläche der hippocampalen Schnitte gemessen. Die Fläche der Schnitte konnte durch Analyse der Phasenkontrastbilder genau bestimmt werden. Der PI-Fluoreszenzmittelwert der Kontrollkulturen entsprach 100% Zellüberleben; die PI-Fluoreszenzwerte der H_2O_2 -behandelten Schnitte wurden dazu in Bezug gesetzt und das Zellüberleben ermittelt. Pro Kulturschale wurden vier bis sechs hippocampale Schnitte untersucht und alle Behandlungen erfolgten in doppelten Ansätzen. Vier unabhängige Experimente wurden durchgeführt.

Obwohl schon gezeigt wurde, dass Neuroprotektion in hippocampalen Schnitten gegenüber Glutamat-induzierter Exzitotoxizität durch BDNF vermittelt werden kann (Kaur et al., 2007), zeigten in dieser Studie die Hippocampuschnitte mit endogener BDNF-Expression gegenüber den Hippocampi mit verringertem BDNF-Spiegel kein höheres Zellüberleben. In diesem komplexen Zellsystem scheint daher die fehlende Neuroprotektion von BDNF gegenüber oxidativem Stress in den BDNF-defizienten Mäusen durch weitere neuroprotektive Faktoren – möglicherweise durch das Antioxidans Glutathion – kompensiert zu werden.

3.2 Identifizierung von Connexin43 (Cx43) als weiteres CRH-Zielgen

Im Folgenden wurden Gap Junction-Proteine, die Connexine, als potentielle Zielgene des CRH untersucht. Connexine bilden an der Plasmamembran interzelluläre Kanäle, sogenannte Gap Junctions, die den Transport von kleinen (< 1 kDa) intrazellulären Signalen, Nährstoffen und Metaboliten zwischen benachbarten Zellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase und zur Vermittlung von Zellüberleben bzw. Apoptose erlauben (Azarnia et al., 1988; Simon und Goodenough, 1998; Willecke et al., 2002; Saez et al., 2003). In dieser Arbeit konnte das Gap Junction-Protein Connexin43 (Cx43) als weiteres CRH-Zielgen identifiziert werden. Im Säugetier-Gehirn ist Cx43 nur in Astrozyten exprimiert (Dermietzel, 1998) und hat in Abhängigkeit vom Zelltyp eine sehr kurze Halbwertszeit von 1,5 bis 5 h (Laird et al., 1991).

3.2.1 CRH induziert eine gesteigerte Expression von Cx43

Zur Untersuchung von Cx43 als potentielles Zielgen von CRH wurden humane IMR32-Neuroblastomzellen verwendet, da sie im Vergleich zu Astrozyten Cx43 nur moderat exprimieren und sie somit die Analyse einer CRH-induzierten Erhöhung oder Verminderung der Cx43-Expression und die Untersuchung der Gap Junction-Assemblierung zu Gap Junction-Plaques zulassen. Um CRH-Rezeptor-vermittelte Effekte in IMR32-Zellen untersuchen zu können, wurde zunächst die Expression der CRH-Rezeptoren 1 und 2 (CRH-R1, CRH-R2) in den IMR32-Zellen über RT-PCR verifiziert (Abb. 3.8).

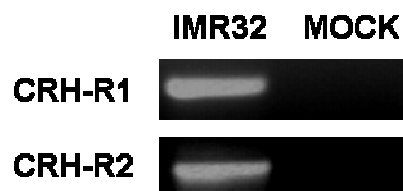


Abb. 3.8 Verifizierung der CRH-Rezeptor 1 und 2 (CRH-R1, CRH-R2) Genexpression in humanen IMR32-Neuroblastomzellen über RT-PCR Abb. nach Hanstein et al., 2008b

Da IMR32-Zellen sowohl den CRH-R1 wie auch den CRH-R2 exprimieren, war eine Analyse der CRH-Effekte auf die Cx43-Expression möglich.

3. Ergebnisse

Mittels quantitativer RT-PCR (*Real Time-PCR*) konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von IMR32-Zellen mit CRH (100 nM und 10 nM) für 4 h zu einer signifikanten Zunahme der Cx43-Genexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte (Abb. 3.9 A). Zudem korrelierte diese Steigerung der Cx43 mRNA mit einer signifikanten Erhöhung des Cx43-Proteins von 30% bzw. 20% (Abb. 3.9 B).

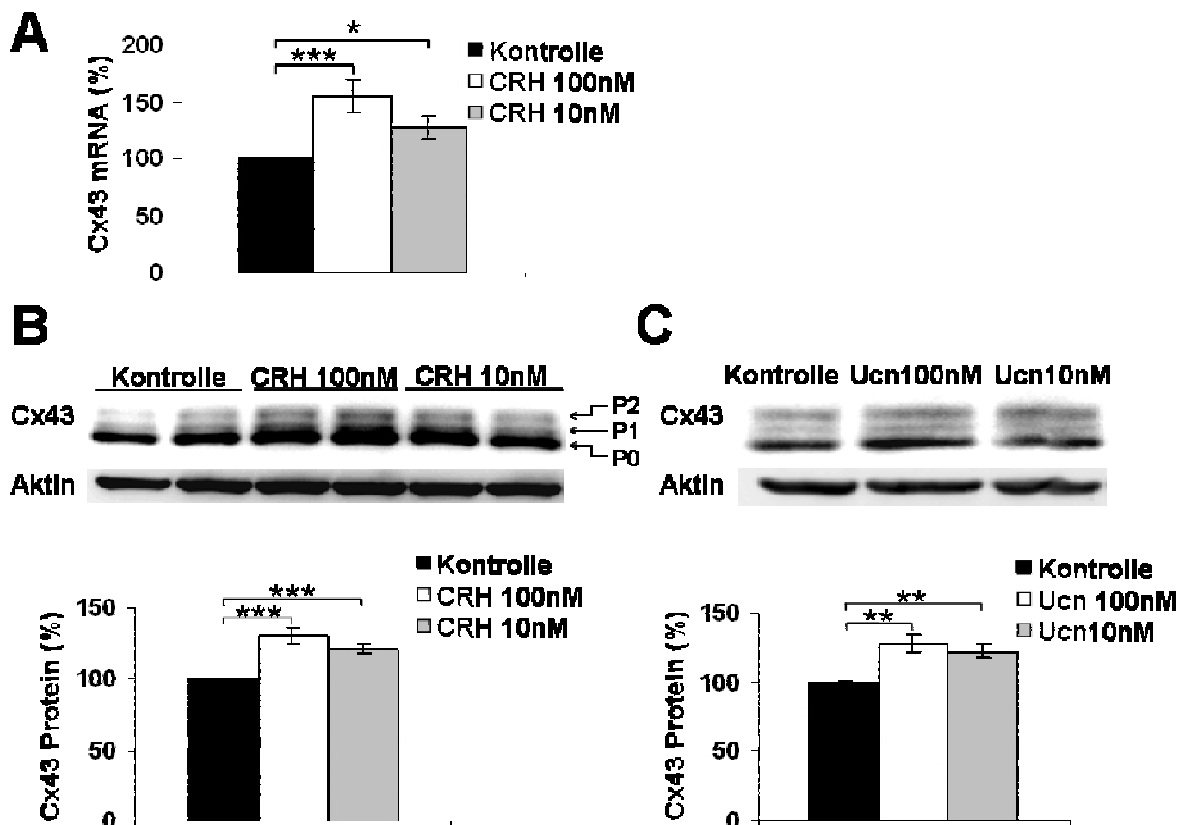


Abb. 3.9 CRH induziert eine Erhöhung der Cx43-Genexpression und des Cx43-Proteinspiegels in IMR32-Zellen

A, Cx43 mRNA-Spiegel sind nach einer CRH-Behandlung (100 nM, 10 nM) für 4 h im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die Cx43-Genexpression wurde mittels quantitativer RT-PCR (*Real Time-PCR*) untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben: $***P < 0,005$, $*P < 0,05$ berechnet mittels One Way ANOVA und dem post hoc Tukey-Test ($n = 3$); **B & C**, Western Blot-Analyse und Quantifizierung der Cx43 Proteinexpression in IMR32-Zellen nach Behandlung mit CRH oder Urocortin (Ucn; jeweils 100 nM und 10 nM) für 4 h; Aktin diente als interne Ladekontrolle. Unterschiedlich phosphorylierte Cx43-Formen (P0 = 42 kDa, P1 = 44 kDa, P2 = 46 kDa) sind mit Pfeilen markiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen sind angegeben: $***P < 0,005$; $**P < 0,01$ berechnet mittels Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks und dem post hoc Dunn's-Test ($n = 4-6$ für jede Behandlung). Abb. nach Hanstein et al., 2008b

Cx43 kann an Serin- und Tyrosinresten im C-Terminus mehrfach phosphoryliert werden und zeigt deshalb im Western Blot von IMR32-Zelllysaten drei Banden mit den Molekulargewichten von 42 (nicht-phosphorylierte Form), 44 und 46 kDa (phosphorylierte

3. Ergebnisse

Formen), die auch als P0-, P1- und P2-Form bezeichnet werden (Crow et al., 1990; Musil et al., 1990). Die CRH-Behandlung (100 nM, 10 nM) für 4 h induzierte eine signifikante Zunahme aller drei Cx43-Formen (Abb. 3.9 B). Eine vierstündige Behandlung der IMR32-Zellen mit Urocortin (Ucn; 100 nM, 10 nM), einem weiteren endogenen CRH-Rezeptorliganden (Vaughan et al., 1995), induzierte auch eine 20%-ige Erhöhung des Cx43-Proteinspiegels (Abb. 3.9 C), wobei, wie für CRH gezeigt, eine signifikante Zunahme aller drei Cx43-Formen auftrat (Abb. 3.9 C). Da für die CRH- und Urocortin-Konzentrationen von 100 nM und 10 nM schon eine neuroprotektive Wirkung gegenüber oxidativem Stress gezeigt werden konnte (Lezoualc'h et al., 2000), wurden CRH und Urocortin auch in diesen Konzentrationen verwendet.

3.2.2 CRH induziert den Aufbau von Cx43-Gap Junction-Plaques

Die Zunahme der am stärksten phosphorylierten Cx43-Form (P2-Form), die wichtig für die Gap Junction-Assemblierung ist (Cooper und Lampe, 2002) und nur in Gap Junction-Plaques nachgewiesen werden konnte (Musil und Goodenough, 1991), deutet auf eine Zunahme der Cx43-Lokalisation und Gap Junction-Kanalbildung in der Plasmamembran hin. An Zell-Zell-Kontakten lagern sich die Kanäle oft zu sogenannten Gap Junction-Plaques zusammen, die im Mikroskop nach Fluoreszenz-Immunfärbung als helle Punkte oder längere Linien an der Plasmamembran sichtbar sind (Paul, 1986). Um zu analysieren, ob der Transport von Cx43 an die Zell-Zell-Kontaktstellen und die Bildung der Gap Junction-Plaques durch eine Behandlung mit CRH beeinflusst wird, wurden immunhistochemische Färbungen der IMR32-Zellen mit einem anti-Cx43-Antikörper durchgeführt (Abb. 3.10 A, B, E). Die Anzahl der Zellnachbarn, die über Gap Junction-Plaques miteinander verbunden waren, wurde bei einer Zugabe von CRH 100 nM um 25% und bei einer Zugabe von CRH 10 nM um 20% gesteigert. (Abb. 3.10 A-C). Auch die Anzahl der Gap Junction-Plaques pro Zelle konnte durch CRH erhöht werden (Abb. 3.10 A, B, D). Zusätzlich wurde auch die Länge der Gap Junction-Plaques gemessen; die CRH-Behandlung führte zu einer signifikanten Zunahme der Plaques mit einer Länge über 1 μm ("übergroßer Plaque", nach Qin et al., 2003; Abb. 3.10 E). Gegenüber den Kontrollzellen mit gepunkteter Färbung der Cx43-Gap Junction-Plaques zeigen CRH-behandelte Zellen deutlich größere und längere Cx43-Gap Junction-Plaques an den Zell-Zell-Kontaktstellen. Diese Daten zeigen, dass CRH zu einer Zunahme der Cx43-Lokalisation und einer verstärkten Gap Junction-Kanalbildung in der Plasmamembran führt.

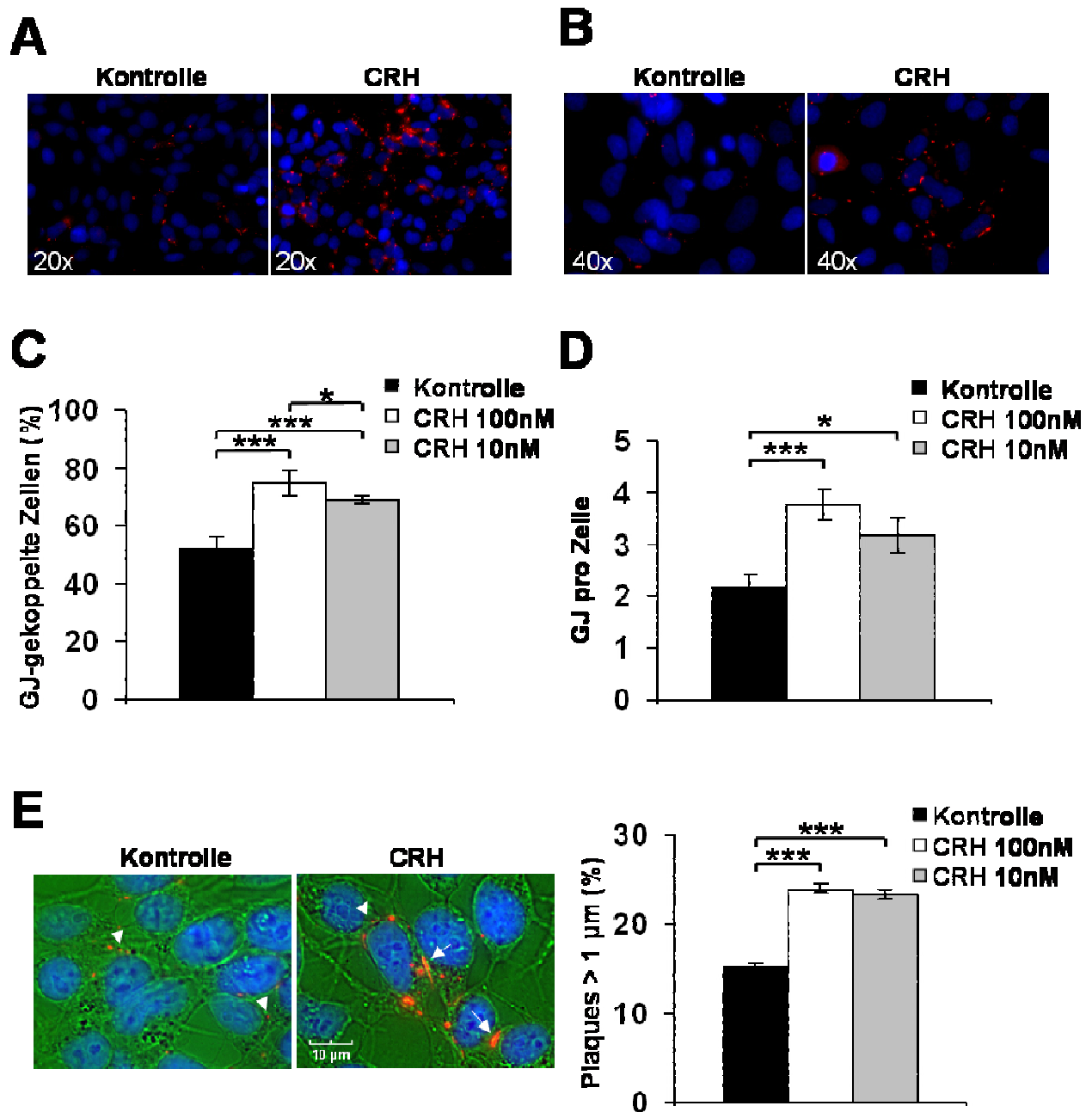


Abb. 3.10 CRH induziert die Bildung von Cx43-Gap Junction-Plaques (GJ) an Zell-Zell-Kontakten

A & B, IMR32-Zellen wurden für 4 h mit CRH (100 nM oder 10 nM) stimuliert. Mittels Immunhistochemie wurde das Cx43-Protein markiert (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Vergrößerung: 20x (*A*) und 40x (*B*) vor Wiedergabe. *A-C*, Die Anzahl der Zellen, die über Gap Junction-Plaques (GJ) mit ihren benachbarten Zellen verbunden sind, wurden gezählt und zur Anzahl aller Zell-Zell-Kontakte in Bezug gesetzt. *A, B & D*, Die Anzahl der Gap Junction-Plaques (GJ) pro Zelle wurde auch durch die CRH-Behandlung erhöht. *E*, CRH führt zur Zunahme der Größe der Gap Junction-Plaques; Plaques mit einer Länge > 1 μm "übergroße Plaques" nach Qin et al., 2003 wurden gezählt und zur Gesamtzahl der Plaques in Bezug gesetzt (Plaques > 1 μm sind mit weißen Pfeilen markiert, Pfeilspitzen zeigen auf Plaques < 1 μm). Vergrößerung: 60x vor Wiedergabe; Balken = 10 μm. Jede Behandlung wurde in Doppelansätzen durchgeführt. 10 Bereiche jeder Kulturschale wurden zufällig ausgewählt und Cx43-positive Plaques gezählt und mit Hilfe der Meta Vue Software vermessen. Mittelwert ± SEM sind angegeben, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ berechnet über One Way ANOVA mit dem post hoc Tukey-Test ($n = 5$). Abb. nach Hanstein et al., 2008b

3.2.3 CRH und Urocortin steigern die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions

Zur Untersuchung der CRH-Effekte auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions wurde der Transport des Farbstoffs Lucifer Yellow (LY) über Gap Junctions in LY-Scrape Loading- und LY-Mikroinjektionsexperimenten analysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff LY ist nicht membrangängig und kann sich daher ausschließlich über Gap Junctions in die benachbarten Zellen ausbreiten, wodurch die Geschwindigkeit bzw. das Ausmaß der Diffusion von LY zwischen benachbarten Zellen den funktionellen Zustand der Zell-Zell-Kommunikation via Gap Junctions charakterisiert. Somit wurde überprüft, ob CRH neben der Hochregulation der Cx43-Gap Junction-Plaques auch eine Steigerung des interzellulären Transports in IMR32-Zellen bewirkt. Mit beiden Methoden konnte eine Zunahme des LY-Transfers zwischen IMR32-Zellen über Gap Junctions nach Behandlung mit CRH (100 nM und 10 nM) beobachtet werden (Abb. 3.11).

Die Scrape Loading-Experimente zeigten, dass der Farbstoff LY nach einer Inkubation bei 37 °C für 10 min von den Kontrollzellen in die Zellschichten 3 bis 4 vom initialen Rasierklingschnitt transportiert wurde, während die CRH-Behandlung zu einem LY-Transport in die Zellschichten 5 bis 6 führte (Abb. 3.11 A, B). Neben CRH konnte auch Urocortin (100 nM und 10 nM) den interzellulären Transfer von LY über Gap Junctions in Scrape Loading-Experimenten signifikant steigern (Abb. 3.11 C). Eine 15-minütige Inkubation mit dem spezifischen Gap Junction-Hemmstoff Carbenoxolon (Cbx, 20 µM) inhibierte den LY-Transfer zwischen IMR32-Zellen auch nach vorheriger Behandlung mit CRH oder Urocortin vollständig (Abb. 3.11 A-C).

Auch die Mikroinjektionsstudien zeigten, dass die CRH-Behandlung (100 nM oder 10 nM) zu einem signifikant erhöhten Transport von LY in die umliegenden Zellen führte (Abb. 3.11 D, E). Die gleichzeitige Injektion des Farbstoffs Rhodamin-Dextran mit LY diente als Kontrolle für die Injektion in eine einzelne Zelle. Rhodamin-Dextran ist ein Farbstoff, der nicht über Gap Junctions transportiert werden kann, und dient als Marker für die injizierte Zelle.

Die Scrape Loading- und Mikroinjektionsexperimente zeigen somit, dass CRH und Urocortin neben der Hochregulation der Cx43-Gap Junction Plaques-Assemblierung auch den interzellulären Transport und somit die Funktionalität der Gap Junctions zwischen IMR32-Zellen steigern.

3. Ergebnisse

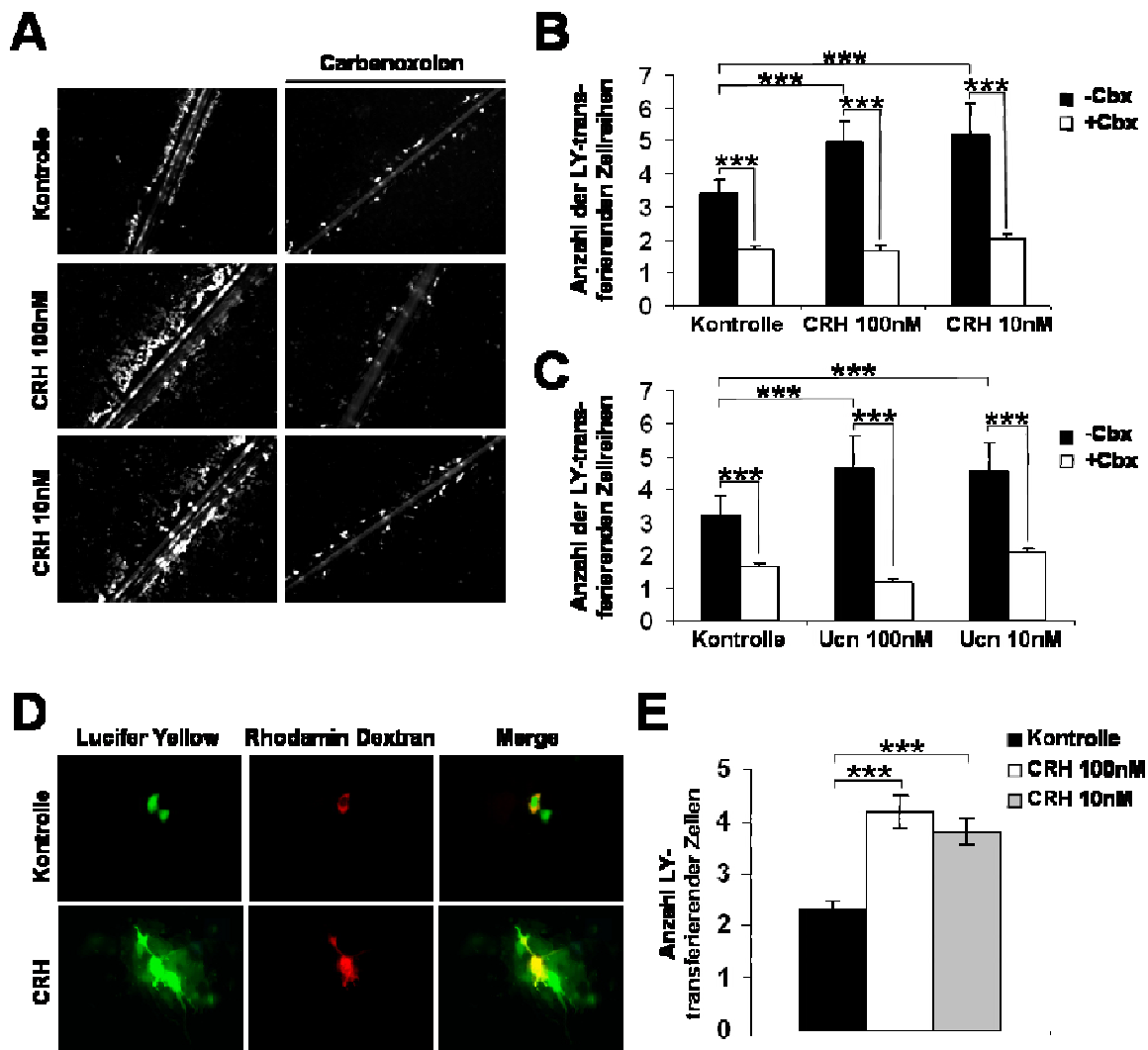


Abb. 3.11 Förderung der interzellulären Gap Junction-Kommunikation durch CRH und Urocortin

A, linke Spalte: CRH steigert den Lucifer Yellow-Transfer zwischen IMR32-Zellen in Scrape Loading-Experimenten; repräsentative Fluoreszenzbilder des Lucifer Yellow (LY)-Transfers zwischen IMR32-Zellen nach Behandlung mit CRH (100 nM oder 10 nM) für 4 h. Vergrößerung: 10x vor Wiedergabe; *rechte Spalte:* Behandlung der Zellen mit 20 μ M Carbenoxolon (Cbx) über 15 min blockiert den interzellulären Transfer von LY. **B,** Quantifizierung des LY-Transfers; die Anzahl der LY-markierten Zellen vom initialen Rasierklingenschnitt wurde gezählt, wobei die erste angeschnittene Zelle „1“ zählte. **C,** Quantifizierung des LY-Transfers nach Behandlung der Zellen mit Urocortin (100 nM oder 10 nM) alleine für 4 h oder zusätzlich für 15 min mit Cbx (20 μ M). Jede Behandlung erfolgte in Doppelansätzen und zehn Felder pro Kulturschale wurden photographiert (10x Vergrößerung). Fünf bis sechs unabhängige Experimente wurden untersucht und die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($***P < 0,005$) wurden mittels Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks mit dem post hoc Dunn's-Test berechnet. **D & E,** Mikroinjektionsstudien zeigten, dass die Behandlung der IMR32-Zellen mit CRH (100 nM oder 10 nM) für 4 h den Transport von LY über Gap Junctions steigerte. **D,** Eine einzelne IMR32-Zelle in einer konfluenten Kultur wurde mit einem Farbstoffgemisch aus LY und Rhodamin Dextran injiziert und 3 min nach Mikroinjektion photographiert Vergrößerung: 20x. **E,** Quantitative Analyse der LY-transportierenden Zellen. Die Anzahl der Zellen, in die LY von der injizierten Zelle aus in 3 min transportiert worden ist, wurde bestimmt. Sechs Mikroinjektionsexperimente wurden durchgeführt, wobei jede Behandlung in Doppelansätzen erfolgte und zehn Zellen pro Zellkulturschale injiziert wurden. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ($***P < 0,005$) vs. Kontrolle wurden mittels One Way ANOVA mit dem post hoc Tukey-Test berechnet. Abb. nach Hanstein et al., 2008b

3. Ergebnisse

3.2.4 CRH induziert die Hochregulation der Cx43-Expression über den CRH-R1

Um zu analysieren, ob CRH seine Effekte auf die Cx43-Expression über Aktivierung der CRH-Rezeptoren vermittelt, wurden IMR32-Zellen mit CRH und einem CRH-Rezeptor-Antagonisten, α -helical CRH 9-41 (100 nM) oder R121919 (100 nM), für 4 h co-inkubiert. α -helical CRH 9-41 ist ein unspezifischer CRH-Rezeptor-Antagonist, bindet daher sowohl an den CRH-R1 als auch an den CRH-R2, wohingegen R121919 ein spezifischer Antagonist des CRH-R1 ist. Über Western Blots konnte gezeigt werden, dass beide Antagonisten den Effekt von CRH auf die Cx43-Proteinexpression vollständig inhibierten (Abb. 3.12 A, B). Diese Ergebnisse beweisen, dass CRH über Aktivierung des CRH-R1 die Stimulation der Cx43-Expression bewirkt.

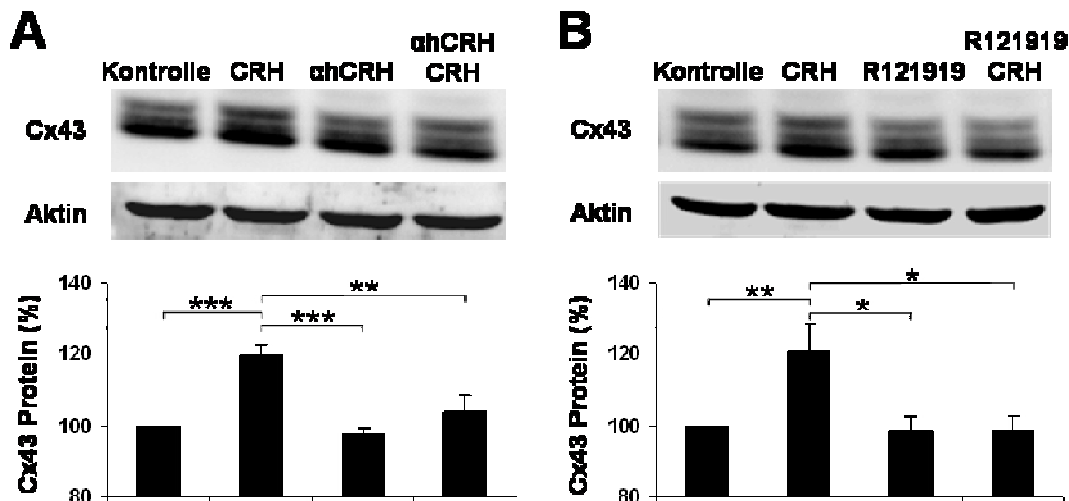


Abb. 3.12 Die CRH-induzierte Hochregulation von Cx43 wird über den CRH-R1 vermittelt

Die Western Blots zeigen, dass die CRH-Rezeptor Antagonisten α -helical CRH 9-41 und R121919 die Effekte von CRH auf die Cx43-Proteinspiegel in IMR32-Zellen inhibieren. Die Zellen wurden für 4 h mit CRH (100 nM) alleine oder in Kombination mit (A) dem unspezifischen CRH-Rezeptor-Antagonist α -helical CRH 9-41 (α hCRH, 100 nM) oder (B) dem spezifischen CRH-R1-Antagonist R121919 (100 nM) behandelt. Der Cx43-Proteinspiegel in Bezug zur Kontrolle wurde mittels densitometrischer Analyse der Western Blots bestimmt. Die Werte aus fünf unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,005 wurden mittels Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks und dem post hoc Dunn`s-Test berechnet. Abb. nach Hanstein et al., 2008b

3.2.5 Einfluss von Proteinkinasen auf die CRH-induzierte Cx43-Expression

Viele CRH-Effekte werden über MAP-Kinase- und Protein Kinase A (PKA)-Signalwege vermittelt (Graziani et al., 2008; Rossant et al., 1999; McEvoy et al., 2002; Bayatti et al., 2003). Für diese Signalwege wurde wiederum gezeigt, dass sie die Expression von Cx43

3. Ergebnisse

induzieren können und/oder die interzelluläre Gap Junction-Kommunikation über Phosphorylierung des Cx43 modulieren können (Kawasaki et al., 2002; Somekawa et al., 2005). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob PKA- und MAPK-Signalwege auch an der CRH-induzierten Cx43-Regulation beteiligt sind.

Zunächst wurde ein Einfluss von CRH auf die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und die Aktivierung der PKA-Signalkaskade in IMR32-Zellen untersucht. Western Blot-Analysen zeigten, dass eine CRH-Behandlung (100 nM) innerhalb von 5 min die Phosphorylierung von ERK1/2 induzierte (Abb. 3.13 A). Die CRH-vermittelte Aktivierung der PKA wurde indirekt über die PKA-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB überprüft. Western Blots der IMR32-Zellen zeigten, dass CRH (100 nM) nach 15-20-minütiger Inkubation die PKA-induzierte Phosphorylierung und somit Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB fördern konnte (Abb. 3.13 B). Über den cAMP/PKA-abhängigen Signalweg hat CRH auch einen Einfluss auf die Expression von cFos (Abb. 3.13 B), einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors Activator Protein 1 (AP-1) (Boutillier et al., 1991; Autelitano und Cohen, 1996; Becquet et al., 2001). Nach Behandlung der IMR32-Zellen mit 100 nM CRH konnte ein Anstieg des cFos-Proteinniveaus gezeigt werden (Abb. 3.13 B). Da in der Promotorregion des Cx43-Gens sowohl Bindungsstellen für CREB als auch für AP-1 existieren, ist ein CRH-vermittelter Effekt auf die Cx43-Expression über die PKA-abhängige Aktivierung von CREB und cFos denkbar (Bailey et al., 2002; Mitchell und Lye, 2005). Diese Daten zeigen, dass der MAPK-Signalweg und der cAMP/PKA-Signalweg, der für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB und cFos sorgt, an der CRH-induzierten Regulation der Cx43-Expression und Phosphorylierung beteiligt sein können.

Zur Bestätigung der MAP-Kinase- und PKA-Beteiligung an der CRH-induzierten Zunahme und Phosphorylierung der Cx43-Expression wurden der MAP-Kinase Kinase Inhibitor U0126 und der PKA-Inhibitor H89 verwendet. Eine 30-minütige Vorbehandlung der IMR32-Zellen mit U0126 und H89 (30 min) blockierte die CRH-vermittelte Hochregulation der Cx43-Expression und die Cx43-Phosphorylierung (Abb. 3.13 C, D).

Aus diesen Daten ergibt sich, dass MAP-Kinase- und PKA-Signalkaskaden in die CRH-induzierten Effekte auf die Expression und Phosphorylierung von Cx43-Protein involviert sind.

3. Ergebnisse

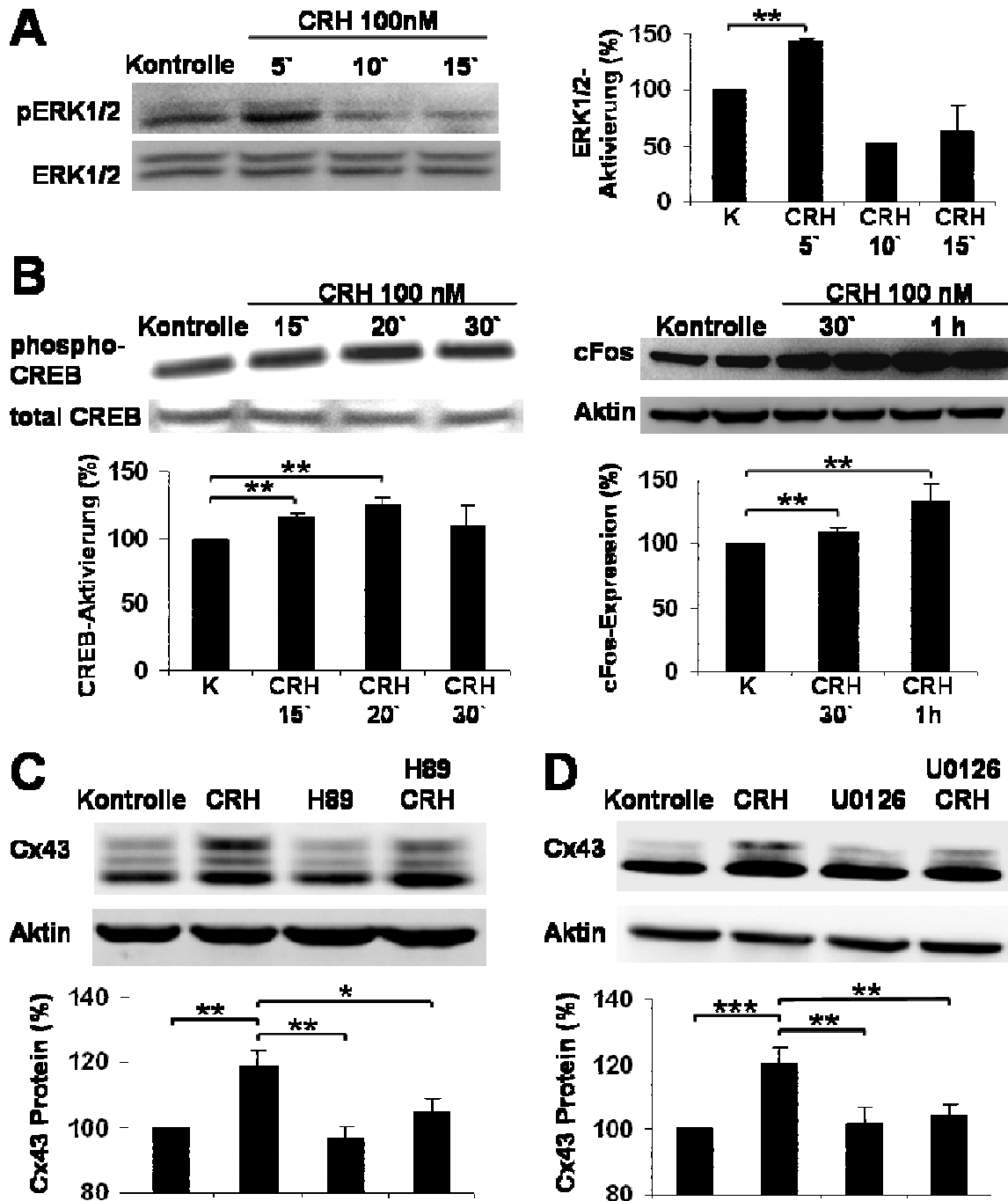


Abb. 3.13 Identifizierung der CRH-induzierten Signalwege zur Vermittlung der Cx43-Regulation

A & B, Identifizierung von CRH-induzierten Signalwegen in IMR32 Zellen. IMR32-Zellen wurden mit CRH (100 nM) für die angegebenen Zeitspannen behandelt. Zur Analyse von phosphoryliertem und totalem ERK1/2-Protein (**A**), von phosphoryliertem und totalem CREB-Protein (**B**, *Blot links*) und der cFos-Expression (**B**, *Blot rechts*) wurden Western Blots nach CRH-Behandlung durchgeführt. Aktin diente als interne Ladekontrolle. **C & D**, Beteiligung der CRH-induzierten Aktivierung von PKA- und ERK1/2-Signalkaskaden an der Steigerung der Cx43-Proteinexpression. Repräsentative Western Blots zeigen die Inhibition der CRH-vermittelten Steigerung der Cx43-Expression durch H89 (10 μ M, PKA-Inhibitor) oder U0126 (5 μ M, MAPK-Inhibitor). Für die Experimente mit U0126 wurde das U0126-Lösungsmittel 0,1% DMSO auch zu der Kontrolle und den CRH-behandelten Zellen zugegeben. Bestimmung der Cx43-Proteinspiegel erfolgte über densitometrische Analyse der Immunoblots. Die Werte aus fünf bis sechs unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,005$ wurden über One Way ANOVA und dem post hoc Tukey-Test ermittelt. Abb. nach Hanstein et al., 2008b

3.2.6 Effekte von CRH auf Cx43 in Astrozyten und organotypischen Schnittkulturen

Zur Bestimmung der physiologischen Relevanz der CRH-Effekte auf die Gap Junction-Kommunikation, wurden die Experimente mit primären Astrozyten aus Mäusen und organotypischen hippocampalen Schnittkulturen aus Ratten durchgeführt. Im Säugetiergehirn ist Cx43 das Hauptprotein der Gap Junctions in Astrozyten, es wird nicht von Neuronen exprimiert (Dermietzel, 1998). In organotypischen hippocampalen Schnittkulturen bleibt die anatomische Organisation von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia erhalten, somit werden zelluläre Interaktionen nicht beeinträchtigt (Stoppini et al., 1991; Skibo et al., 2000).

Zunächst wurde die Expression beider CRH-Rezeptoren in den primären Maus-Astrozyten und in den hippocampalen Schnittkulturen aus postnatalen sieben bis acht Tage alten Ratten über RT-PCR verifiziert (Abb. 3.14 A). CRH- oder Urocortin-Behandlung (100 nM, 4 h) konnten in den primären Astrozyten den Proteinspiegel der Cx43 P0-, P1- und P2-Form signifikant erhöhen (Abb. 3.14 B). In den hippocampalen Schnittkulturen induzierte CRH (100 nM und 10 nM, 4 h) hauptsächlich eine Zunahme der Cx43 P1- und P2-Form (Abb. 3.14 C).

3.2.7 Effekte von CRH auf die Cx43-Expression *in vivo*

Um die CRH-induzierte Zunahme der Cx43-Expression auch *in vivo* zu bestätigen, wurden die Cx43-Proteinspiegel in Hippocampi der CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-NES-Mäuse im Vergleich zu den Cx43-Proteinspiegeln in Kontrolltieren (CRH-COE^{con}-NES) über Western Blot-Analyse bestimmt. Die Überexpression von CRH in den CRH-COE^{hom}-NES-Mäusen führte zu einer signifikanten Zunahme der Expression aller drei Cx43-Proteinformen (Abb. 3.14 D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass CRH auch *in vivo* einen Einfluss auf die Cx43-Expression hat und dadurch zu einer Zunahme an Cx43-Protein im Hippocampus führt. Ob dieser CRH-Effekt auf Cx43 und die Gap Junction-Kommunikation einen Einfluss auf die CRH-induzierte Neuroprotektion hat, soll im folgenden Abschnitt aufgezeigt werden.

3. Ergebnisse

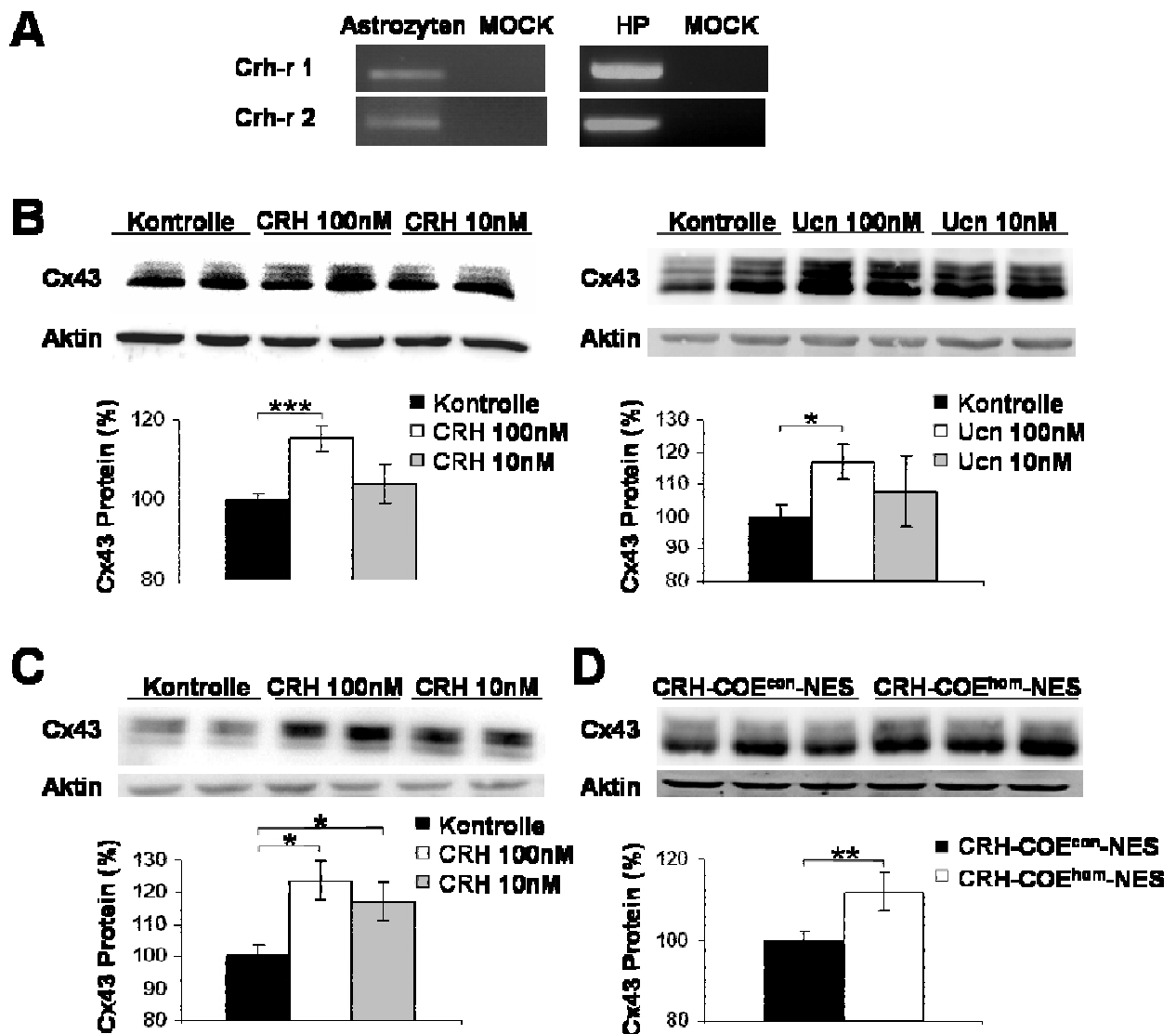


Abb. 3.14 CRH und Urocortin induzieren eine Zunahme von Cx43-Protein in primären Astrozyten, in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen und *in vivo*

A, Verifizierung der CRH-R1- und CRH-R2-Genexpression in primären Maus-Astrozyten und in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (HP) aus Ratten über RT-PCR. **B & C**, Western Blots von CRH- oder Urocortin-behandelten (100 nM, 10 nM, 4 h) primären Astrozyten (**B**) oder von CRH-behandelten (100 nM, 10 nM, 4 h) hippocampalen Schnittkulturen (**C**) zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung von Cx43-Protein. Die Experimente mit Astrozyten wurden sechsmal unabhängig voneinander durchgeführt; die Experimente mit hippocampalen Schnittkulturen wurden viermal unabhängig voneinander ausgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den CRH- oder Urocortin-behandelten und den unbehandelten Zellen sind angegeben: *** $P < 0,005$; * $P < 0,05$ wurden über One Way ANOVA mit dem post hoc Tukey-Test berechnet. **D**, Analyse der Cx43-Proteinspiegel in Proteinlysaten aus Hippocampi von CRH-COE^{con}-NES- und CRH-COE^{hom}-NES-Mäusen über Western Blots. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von drei Tieren jedes Genotyps. Darunter befindet sich die Quantifizierung von Cx43 über densitometrische Analyse der Western Blots. Mittelwerte \pm Standardabweichung sind angegeben. (** $P < 0,01$, Students t-Test, $n = 7$). Abb. nach Hanstein et al., 2008b

3.3 Die CRH-induzierte Neuroprotektion über Regulation der Gap Junctions

3.3.1 CRH induziert Neuroprotektion über das Gap Junction-Protein Cx43

Es konnte bereits gezeigt werden, dass CRH gegenüber verschiedensten Toxinen neuroprotektiv wirkt (Lezoualc'h et al., 2000; Elliott-Hunt et al., 2002; Bayatti et al., 2003). Um die Beteiligung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions an der CRH-induzierten Neuroprotektion gegenüber oxidativem Stress zu untersuchen, wurden Zellüberlebensstests (MTTs) durchgeführt (Abb. 3.15). Dazu wurden die Toxine H_2O_2 und Amyloid β Peptid ($A\beta$) verwendet. H_2O_2 ist ein molekulares Oxidans, besitzt eine hohe Membranpermeabilität (Halliwell, 1992) und löst in der primär betroffenen Zelle und in benachbarten Zellen oxidativen Stress aus. Das Amyloid β Protein ($A\beta$), ein für die AD-Pathogenese wichtiges toxisches Peptid, bildet neurotoxische $A\beta$ -Aggregate und kann selbst direkt über die vermehrte Bildung von H_2O_2 in betroffenen Zellen zu oxidativem Stress führen (Behl et al., 1994). IMR32-Zellen wurden mit $A\beta$ (20 μ M) oder mit H_2O_2 (100 μ M) für 24 h behandelt, was einen Zelltod von ungefähr 50% bzw. 30% zur Folge hatte (Abb. 3.15 A, B). Die gleichzeitige Behandlung von Toxin und CRH (100 nM) reduzierte den $A\beta$ - und H_2O_2 -induzierten Zelltod der IMR32-Zellen. Dieser protektive Effekt des CRH wurde über Co-Inkubation mit dem Gap Junction-Hemmstoff Carbenoxolon (Cbx, 20 μ M) komplett aufgehoben. Die 24-stündige Inkubation der IMR32-Zellen mit Cbx (20 μ M) alleine beeinträchtigte das Zellüberleben im Vergleich zur Kontrolle nicht (Abb. 3.15 A-C). Dahingegen war eine 24-stündige Behandlung der IMR32-Zellen mit Cbx-Konzentrationen > 20 μ M toxisch (Abb. 3.15 C). Das inaktive Derivat von Cbx, Glycyrrhizinsäure (GC, 20 μ M, 24 h) hatte hingegen keinen Einfluss auf die neuroprotektiven Effekte von CRH gegenüber $A\beta$ -induziertem Stress (Abb. 3.15 A).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die CRH-induzierte interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions für die Vermittlung der Neuroprotektion essentiell ist. Aber auch die alleinige Blockade der Gap Junctions mittels Cbx in hohen Konzentrationen über 24 h reichte schon aus, Neurotoxizität zu induzieren. Diese Beobachtung wird auch von anderen Studien unterstützt, die eine erhöhte Glutamat-Zytotoxizität in Neuron-Astrozyten-Co-Kulturen nach Blockade der Gap Junctions zeigen (Ozog et al., 2002).

3. Ergebnisse

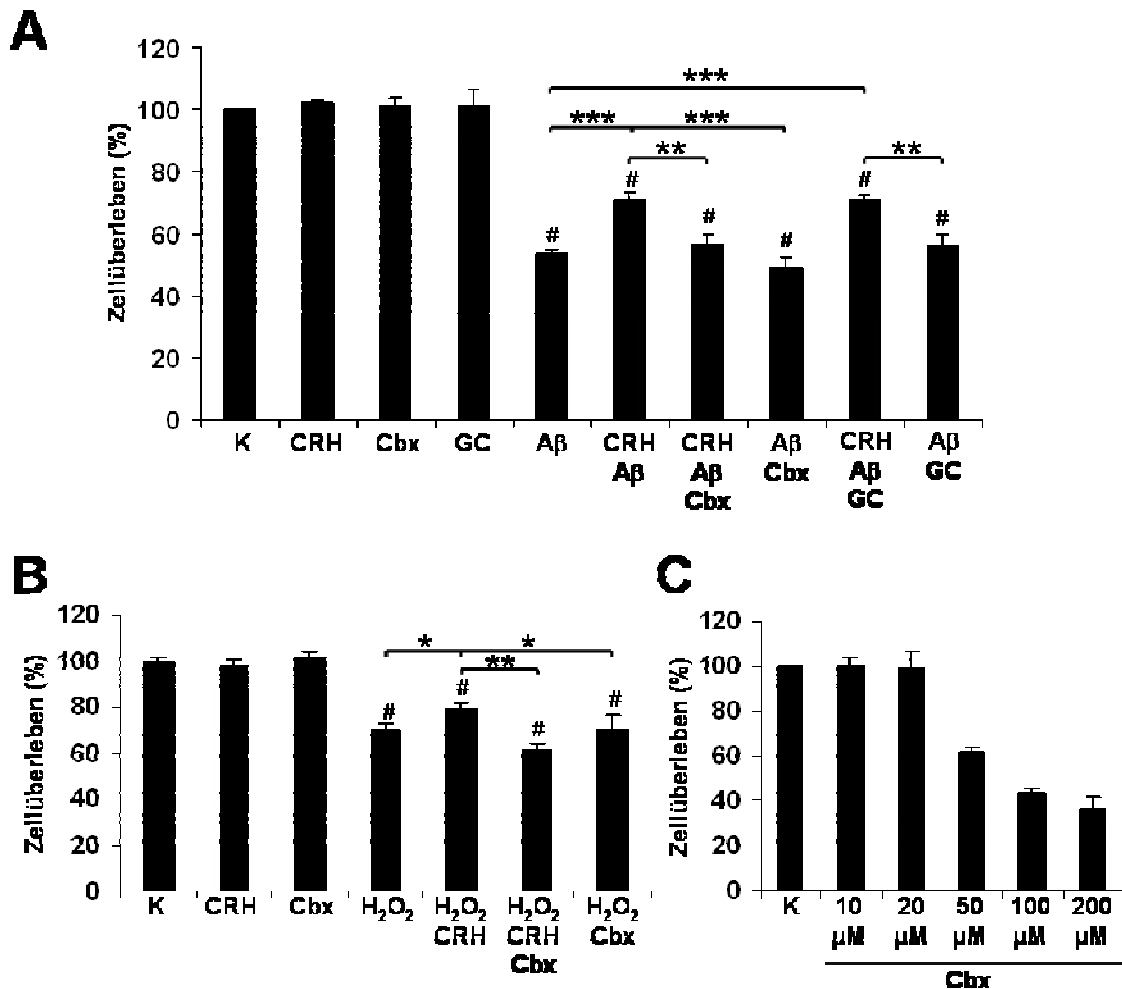


Abb. 3.15 Einfluss der CRH-induzierten Gap Junction-Kommunikation auf die Neuroprotektion in IMR32-Zellen

Zellüberlebens-Tests (MTTs) wurden in IMR32-Zellen durchgeführt, um die Beteiligung der Gap Junction-Kommunikation an den neuroprotektiven Effekten des CRH zu analysieren. Die protektiven Effekte von 100 nM CRH gegenüber (A) Amyloid β Peptid (A β) 25-35 (20 μ M)- oder (B) H₂O₂ (100 μ M)-induzierter Neurotoxizität wurden durch Co-Inkubation mit dem Gap Junction-Hemmstoff Cbx (20 μ M) inhibiert, während das inaktive Derivat von Cbx, Glycyrrhizinsäure (GC, 20 μ M, 24 h), keinen Einfluss auf die neuroprotektiven Effekte von CRH gegenüber A β hatte (A). MTT-Tests wurden nach 24-stündiger Behandlung der IMR32-Zellen mit CRH, den Toxinen A β oder H₂O₂, Cbx und GC ausgeführt. Die Balkendiagramme repräsentieren das Zellüberleben in Bezug zur Kontrolle (K). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen sind angegeben: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$ wurden über One Way ANOVA mit dem post hoc Tukey-Test berechnet ($n = 6$). C, IMR32-Zellen wurden mit dem Gap Junction-Hemmstoff Cbx in den angegebenen Konzentrationen für 24 h behandelt. Die Behandlung der IMR32-Zellen mit höheren Cbx-Konzentrationen (> 20 μ M für 24 h) war toxisch. Das Balkendiagramm repräsentiert das Zellüberleben der behandelten Zellen in % zur Kontrolle. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Abb. nach Hanstein et al., 2008b

Cbx ist jedoch kein spezifischer Gap Junction-Hemmstoff und kann in höheren Konzentrationen Effekte auf weitere Membrankanäle besitzen (Perez Velazquez et al., 2003). Es ist zurzeit aber der beste Inhibitor der Gap Junction-Kommunikation. Um trotzdem Nebeneffekte des Cbx für die CRH-induzierte Neuroprotektion auszuschließen, wurde die Cx43-Expression mittels Cx43 siRNA reduziert. IMR32-Zellen wurden mit Cx43 siRNA oder

3. Ergebnisse

nonsense (ns) siRNA transfiziert und die neuroprotektiven Eigenschaften von CRH gegenüber A β oder H $_2$ O $_2$ wurden mittels MTT-Tests analysiert. Die Transfektion mit Cx43 siRNA regulierte die Cx43-Proteinspiegel um 50% nach 48 h herunter (Abb. 3.16 A). Zellen, die aufgrund der Transfektion mit Cx43 siRNA eine reduzierte Cx43-Proteinkonzentration hatten, waren gegenüber der A β (20 μ M)- oder H $_2$ O $_2$ (100 μ M)-induzierten Toxizität vulnerabler als Zellen, die mit ns siRNA transfiziert waren (Abb. 3.16 B). Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz von Cx43 für das Zellüberleben. Interessanterweise induzierte die CRH-Behandlung auch eine Hochregulation des Cx43, wenn die Zellen mit Cx43 siRNA transfiziert waren; die Konzentration von Cx43 war in diesen Zellen jedoch geringer als in CRH-behandelten, ns siRNA-transfizierten Zellen (Abb. 3.16 A). CRH induzierte daher auch in Cx43 siRNA-transfizierten Zellen Neuroprotektion, auch wenn diese geringer ausfiel als in den ns siRNA-transfizierten Zellen (Abb. 3.16 B). Die CRH-induzierte Hochregulation von Cx43 korrelierte hier mit der CRH-induzierten Neuroprotektion.

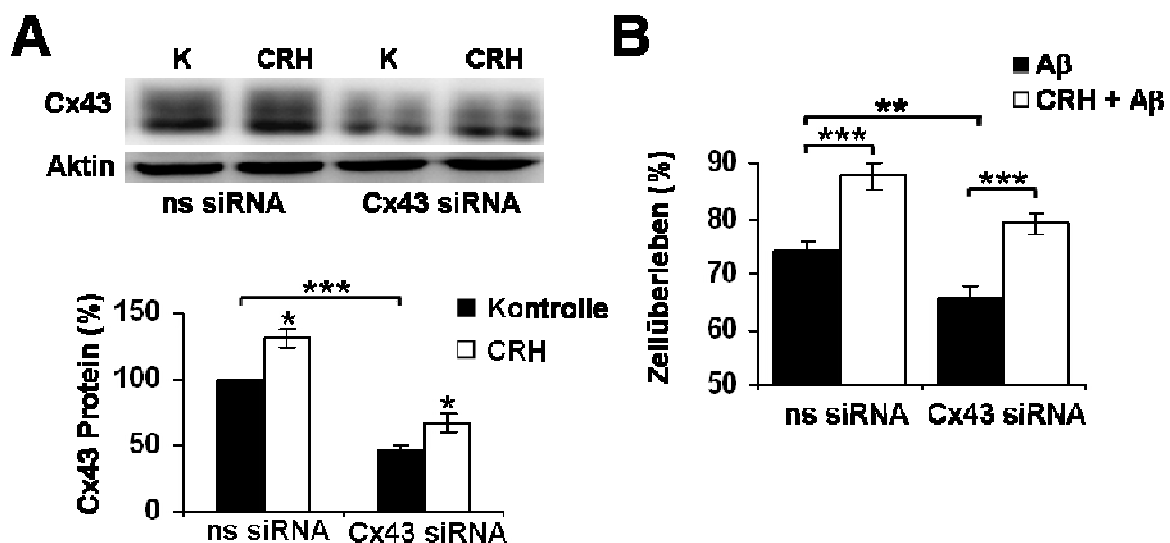


Abb. 3.16 Die CRH-induzierte Regulation von Cx43 und Neuroprotektion in IMR32-Zellen

IMR32-Zellen wurden mit ns siRNA oder Cx43 siRNA transfiziert und 48 h später mit CRH (100 nM) für weitere 24 h behandelt. **A**, Die Western Blot-Analyse zeigte eine reduzierte Cx43-Expression nach der Transfektion mit Cx43 siRNA im Vergleich zur Transfektion mit ns siRNA; jedoch konnte CRH in beiden Fällen die Cx43-Expression signifikant hochregulieren. Der Graph zeigt die densitometrische Analyse von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen sind angegeben: * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$ wurden über One Way ANOVA mit dem post hoc Tukey-Test berechnet. **B**, MTT-Tests; Transfektion mit Cx43 siRNA reduzierte das Zellüberleben von IMR32-Zellen nach der Behandlung mit dem toxischen Amyloid β Peptid (A β , 20 μ M, 24 h) im Vergleich zur Transfektion mit ns siRNA. Die gleichzeitige Behandlung mit CRH förderte das Zellüberleben von ns siRNA- und Cx43 siRNA-transfizierten Zellen. Das Balkendiagramm repräsentiert das Zellüberleben der behandelten Zellen in % zur Kontrolle. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen sind angegeben: * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$ wurden über One Way ANOVA mit dem post hoc Tukey-Test berechnet. Acht unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Abb. nach Hanstein et al., 2008b

3.3.2 Einfluss der Gap Junction-Kommunikation auf die CRH-induzierte Neuroprotektion

Zur Untersuchung der CRH-vermittelten Neuroprotektion in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen wurde der oxidative Stressor H_2O_2 verwendet. Die Behandlung der hippocampalen Schnittkulturen mit H_2O_2 (500 μM) für 24 h löste massiven Zelltod in den pyramidalen Neuronen der Hippocampus CA1/CA3-Region und in den glutamatergen Körnerzellen des Gyrus dentatus (DG) im Vergleich zu den Kontrollschnitten aus. Der Zelltod konnte über Färbung mit Propidiumjodid, einem Marker für apoptotische und nekrotische Zellen angezeigt werden (Abb. 3.17 A). Es ist anzumerken, dass die Neuronen am stärksten von der Toxizität betroffen waren, während Gliazellen kaum Schädigung zeigten.

Ein neuroprotektiver Effekt von CRH (100 nM) gegenüber H_2O_2 -induziertem oxidativen Stress (Co-Inkubation, 24 h) konnte auch in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen bestätigt werden (Abb. 3.17 A, B). Zur weiteren Analyse der neuroprotektiven CRH-Effekte wurde der spezifische CRH-R1-Antagonist R121919 (R) verwendet, der alleine keinen Einfluss auf das Zellüberleben hatte. Jedoch inhibierte R121919 (Co-Inkubation für 24 h) den protektiven CRH-Effekt gegenüber H_2O_2 (Abb. 3.17 A, B). Die CRH-induzierte Neuroprotektion in hippocampalen Schnittkulturen wurde über den CRH-R1 vermittelt, da eine Inhibition dieses Rezeptors mit dem Antagonisten R121919 die Protektion reduzierte.

In einem weiteren Experiment mit organotypischen hippocampalen Schnittkulturen wurde die Bedeutung der Gap Junction-Kommunikation für die CRH-vermittelte Neuroprotektion untersucht. Die Inhibition der Gap Junction-Kommunikation in den Hippocampuschnitten mittels Cbx (20 μM , 24 h) beeinträchtigte das Zellüberleben nicht. Jedoch reduzierte Cbx (20 μM , 24 h) bei Co-Inkubation mit CRH (100 nM) und H_2O_2 (500 μM) die CRH-vermittelte Neuroprotektion gegenüber H_2O_2 -induzierter Neurodegeneration (Abb. 3.17 C). Eine 24-stündige Behandlung der organotypischen Schnittkulturen mit Cbx in Konzentrationen $> 20 \mu M$ induzierte starke Toxizität. (Abb. 3.17 D). Diese Ergebnisse zeigen, dass auch in organotypischen hippocampalen Schnitten die CRH-induzierte interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions für die Vermittlung der Neuroprotektion essentiell ist. Die Blockade der Gap Junctions mittels Cbx in hohen Konzentrationen $> 20 \mu M$ über 24 h reichte aus, zunächst den Zelltod in Neuronen (25 μM) und in höheren Konzentrationen in Gliazellen (100 bzw. 200 μM) zu induzieren.

3. Ergebnisse

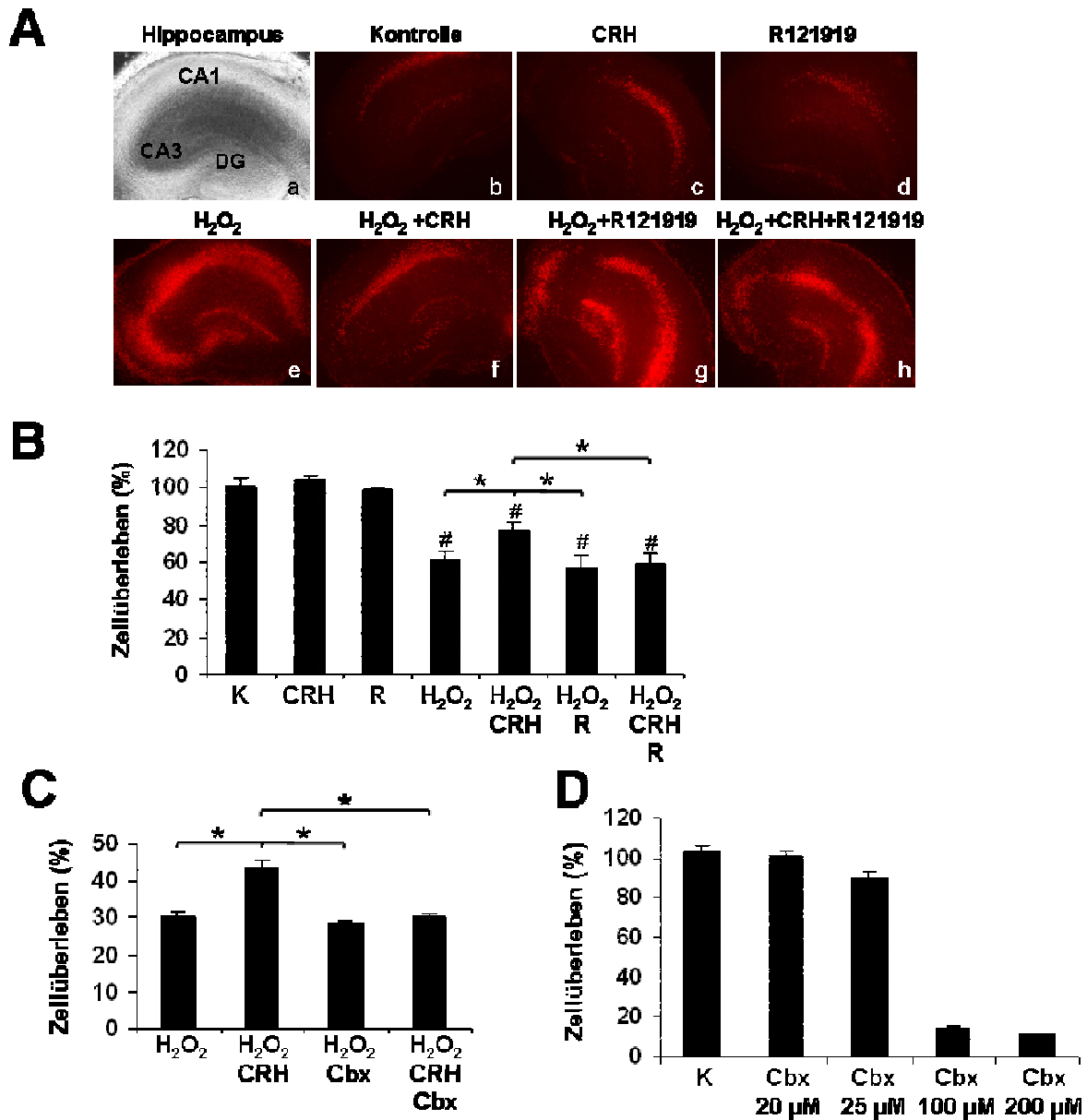


Abb. 3.17 Neuroprotektive Effekte von CRH in hippocampalen Schnittkulturen werden über den CRH-R1 und über die Gap Junction-Kommunikation vermittelt

A, Repräsentative Bilder von organotypischen hippocampalen Schnitten, die den CRH-R1-vermittelten neuroprotektiven Effekt von CRH (100 nM) gegenüber dem H₂O₂-induzierten neuronalen Zelltod zeigen. **(a)** Phasenkontrastbild eines Hippocampuschnittes mit der CA1- und CA3-Region und dem Gyrus dentatus (DG). **(b-h)** Bilder von PI-gefärbten hippocampalen Schnitten: unbehandelte Kontrolle **(b)**, Schnitte 24-stündig behandelt mit CRH 100 nM **(c)**, R121919 100 nM **(d)**, dem Toxin H₂O₂ 500 µM **(e)** alleine oder in Kombination, wie in der Graphik angegeben **(f-h)**. **B**, Zur Bestimmung des neuronalen Schadens wurde die PI-Fluoreszenz über die Fläche der hippocampalen Schnitte gemessen, wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben. Der Mittelwert der PI-Fluoreszenz der Kontrollkulturen entsprach 100% Zellüberleben; die PI-Fluoreszenzwerte der Toxin-behandelten Schnitte wurden dazu in Bezug gesetzt und das Zellüberleben ermittelt. Sechs unabhängige Experimente wurden durchgeführt. **C**, Analyse des neuronalen Zellüberlebens in hippocampalen Schnittkulturen, die mit H₂O₂ 500 µM, CRH (100 nM) oder Cbx (20 µM) für 24 h behandelt wurden, via PI-Färbung. Es wurden sechs unabhängige Experimente durchgeführt. **D**, Organotypische hippocampale Schnittkulturen wurden mit den angegebenen Cbx-Konzentrationen für 24 h behandelt und das Zellüberleben via PI-Färbung ermittelt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Pro Kulturschale wurden vier bis sechs hippocampale Schnitte untersucht und alle Behandlungen erfolgten in doppelten Ansätzen. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben: **P* < 0.05 (zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen) und #*P* < 0.05 (behandelte Gruppen vs. Kontrolle) wurden über Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks und dem post hoc Dunn's-Test berechnet. Abb. nach Hanstein et al., 2008b

3. Ergebnisse

3.3.3 Das astrozytäre Cx43 vermittelt die neuroprotektiven CRH-Effekte

Cx43 ist das Gap Junction-Protein, das von Astrozyten am stärksten exprimiert wird, jedoch nicht von Neuronen. Es wurde daher untersucht, ob die CRH-induzierte Regulation von astrozytärem Cx43 die neuroprotektiven Eigenschaften von CRH vermittelt. Zur Aufklärung dieser Frage wurden primäre Co-Kulturen aus hippocampalen Neuronen und Astrozyten verwendet. Die Astrozyten wurden entweder mit Cx43 siRNA oder mit nonsense siRNA (ns siRNA) transfiziert; die Transfektion der Astrozyten regulierte somit spezifisch das astrozytäre Cx43 herunter, und zwar um 70% nach 48 h im Vergleich zur Transfektion mit ns siRNA (Abb. 3.18 A).

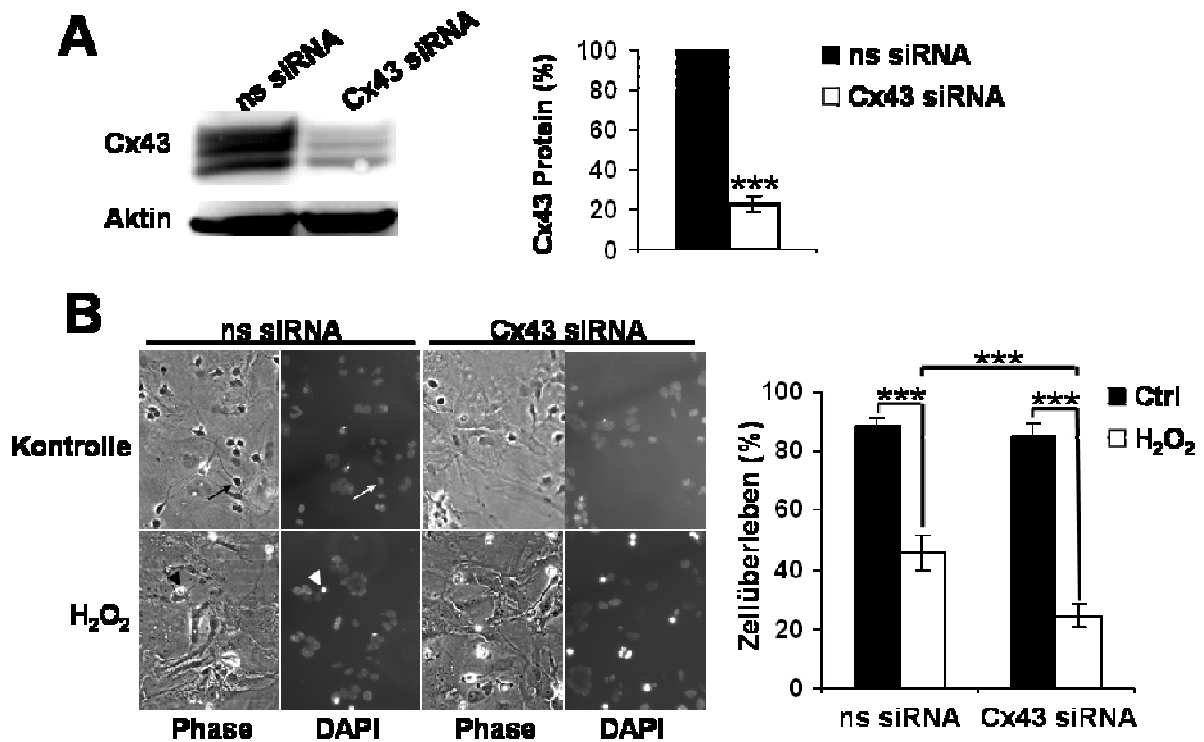


Abb. 3.18 Die neuroprotektiven CRH-Effekte werden über astrozytäre Cx43-Expression vermittelt

Es wurden Co-Kulturen aus primären hippocampalen Neuronen auf einer Einzelschicht aus primären Astrozyten verwendet, wobei die Astrozyten mit Cx43 siRNA oder ns siRNA transfiziert waren. **A**, Die Transfektion der Astrozyten reduzierte die Cx43-Expression um 70%. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben: $***P < 0,005$ und wurden über den Students t-Test berechnet. **B**, 24 h nach Transfektion und Co-Kultivierung wurden die Zellen mit H₂O₂ (200 μ M, 24 h) behandelt oder nicht behandelt (Kontrolle). Die Co-Kulturen wurden danach mit DAPI gefärbt, um tote Zellen zu markieren (tote Zellen mit kondensierten Nuclei fluoreszieren hell, weiße Pfeilköpfe im DAPI-Bild). Für die Quantifizierung der toten Zellen wurden Neurone und Astrozyten über morphologische Kriterien unterschieden. Im Phasenkontrastbild erscheinen Neurone dunkler und kleiner als Astrozyten, zudem besitzen sie kleinere Nuclei. Die Pfeile im Phasenkontrast- und DAPI-Bild zeigen auf Neurone. Das Balkendiagramm repräsentiert das Überleben der Neurone nach Behandlung mit H₂O₂ (Gesamtanzahl der Neurone in einer Zellkulturschale = 100%). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen sind angegeben: $***P < 0,005$ wurden über One Way ANOVA mit dem post hoc Tukey-Test berechnet. Für jede Behandlung wurden 10-15 Gesichtsfelder ausgezählt (ca. 100 Zellen pro Gesichtsfeld). Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Bildvergrößerung vor Wiedergabe: 20x. Abb. Hanstein et al., 2008b

3. Ergebnisse

Auf transfizierten Astrozyten wurden hippocampale Neurone ausgesät und diese Co-Kulturen wurden für 48 h kultiviert bevor sie mit H₂O₂ (200 µM, 24 h) behandelt wurden. Die Behandlung mit dem oxidativen Stressor H₂O₂ reduzierte das Überleben der hippocampalen Neurone stark (nur 45% der Neurone überlebten im Vergleich zur Kontrolle, Abb. 3.18 B), beeinträchtigte jedoch nicht das Überleben der Astrozyten (> 95% Zellüberleben, nicht gezeigte Daten). Diese Beobachtung bestätigte frühere Untersuchungen, die für Astrozyten eine stärkere Resistenz gegenüber H₂O₂ zeigten als für Neurone. Interessanterweise waren Neurone vulnerabler gegenüber H₂O₂, wenn sie in Co-Kultur mit Cx43 siRNA-transfizierten Astrozyten waren, als wenn sie mit ns siRNA-transfizierten Astrozyten co-kultiviert wurden (Abb. 3.18 B). Diese Daten bestätigen die Resultate der MTT-Tests mit Cx43 siRNA-transfizierten IMR32-Zellen und deuten daraufhin, dass das astrozytäre Cx43 für das neuronale Zellüberleben in Co-Kulturen entscheidend ist. Es ist daher zu vermuten, dass das astrozytäre Cx43 auch für die CRH-induzierte Resistenz hippocampaler Neurone in organotypischen Schnitten gegenüber oxidativem Stress sehr wichtig ist.

3.3.4 Identifizierung potentieller Mechanismen der Cx43-vermittelten Neuroprotektion

Um den Mechanismus der CRH-induzierten und über Cx43-vermittelten Neuroprotektion aufzuklären, wurden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen.

Zuerst wurde die Proteincarbonylierung als ein Indikator von oxidativem Stress in IMR32-Zellen und primären Astrozyten untersucht. Oxidativer Stress führt zur Anlagerung von Carbonylgruppen an Proteine, die die enzymatischen Funktionen oder Bindungsaktivitäten der Proteine inhibieren (England et al., 2004). Die Behandlung der Zellen mit dem Amyloid β Peptid 25-35 (20 µM, 24 h) induzierte eine verstärkte Proteincarbonylierung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.19, hier gezeigt für IMR32-Zellen). Dieser Effekt wurde verstärkt, wenn die Zellen mit Cx43 siRNA transfiziert waren, also niedrige Cx43-Proteinkonzentration besaßen. Diese Daten deuten daraufhin, dass Cx43 durch Reduktion des oxidativen Stresses die CRH-induzierte Neuroprotektion vermittelt.

3. Ergebnisse

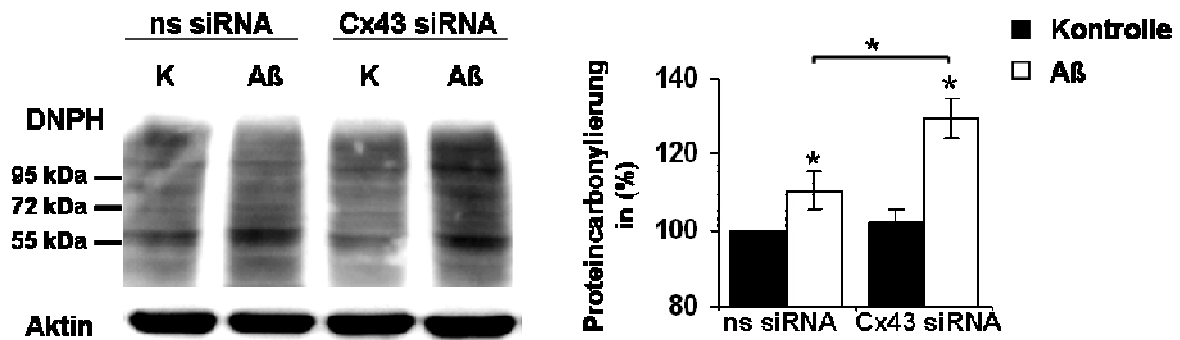


Abb. 3.19 Niedrige Cx43-Proteinlevel verstärken den Amyloid β Peptid-induzierten oxidativen Stress

IMR32-Zellen, transfiziert mit ns siRNA oder mit Cx43 siRNA, wurden 48 h nach Transfektion mit dem Amyloid β Peptid (A β) 25-35 (20 μ M, 24 h) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle, K). Um den Carbonylierungsstatus der Proteine zu bestimmen, wurden die Proteinlysate mit DNPH behandelt, um die Carbonylgruppen zu DNP-Gruppen modulieren. Diese können dann mit einem monoklonalen anti-DNP Antikörper detektiert werden. Einer von drei repräsentativen Blots ist hier gezeigt. Das Verhältnis zwischen dem DNP-Signal und dem Aktin-Signal, das auf einem separaten Blot detektiert wurde, wurde bestimmt. Die Amyloid β Peptid-induzierte Proteincarboxylierung ist in den Zellen erhöht, die mit Cx43 siRNA transfiziert waren (Vergleich zu ns siRNA-transfizierten Zellen). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen sind angegeben: * $P < 0,05$ wurden über den Students t-Test berechnet. Abb. nach Hanstein et al., 2008b

Zudem wurde analysiert, ob neurotrophe Faktoren in die CRH-induzierte Neuroprotektion via Cx43 involviert sind. BDNF konnte bereits im Kapitel 3.1 als CRH-Zielgen identifiziert werden. Es war somit möglich, dass die CRH-induzierte Regulation von BDNF und Cx43 miteinander verknüpft sind. Daher wurde untersucht, ob Cx43 an der CRH-induzierten Hochregulation von BDNF beteiligt ist. Western Blot-Analysen CRH-behandelter IMR32-Zellen zeigten erhöhte BDNF-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 3.20 A). Jedoch zeigten Zellen, die mit Cx43 siRNA transfiziert worden waren, einen ähnlichen Anstieg der BDNF-Proteinexpression wie ns siRNA-transfizierte Zellen (Abb. 3.20 A). Somit ist eine Beteiligung von Cx43 an der CRH-induzierten BDNF-Regulation ausgeschlossen. BDNF kann als CRH-Zielgen aber auch an der Regulation der Cx43-Expression beteiligt sein. Die Behandlung von IMR32-Zellen und primären Astrozyten mit BDNF (20 ng/ml, 4 h) zeigte, dass BDNF die Cx43-Proteinexpression steigern kann; dieser Effekt war in primären Astrozyten stärker als in IMR32-Zellen. (Abb. 3.20 B). Die CRH-induzierte Steigerung der Cx43-Expression kann daher auch über erhöhte BDNF-Proteinspiegel vermittelt werden.

3. Ergebnisse

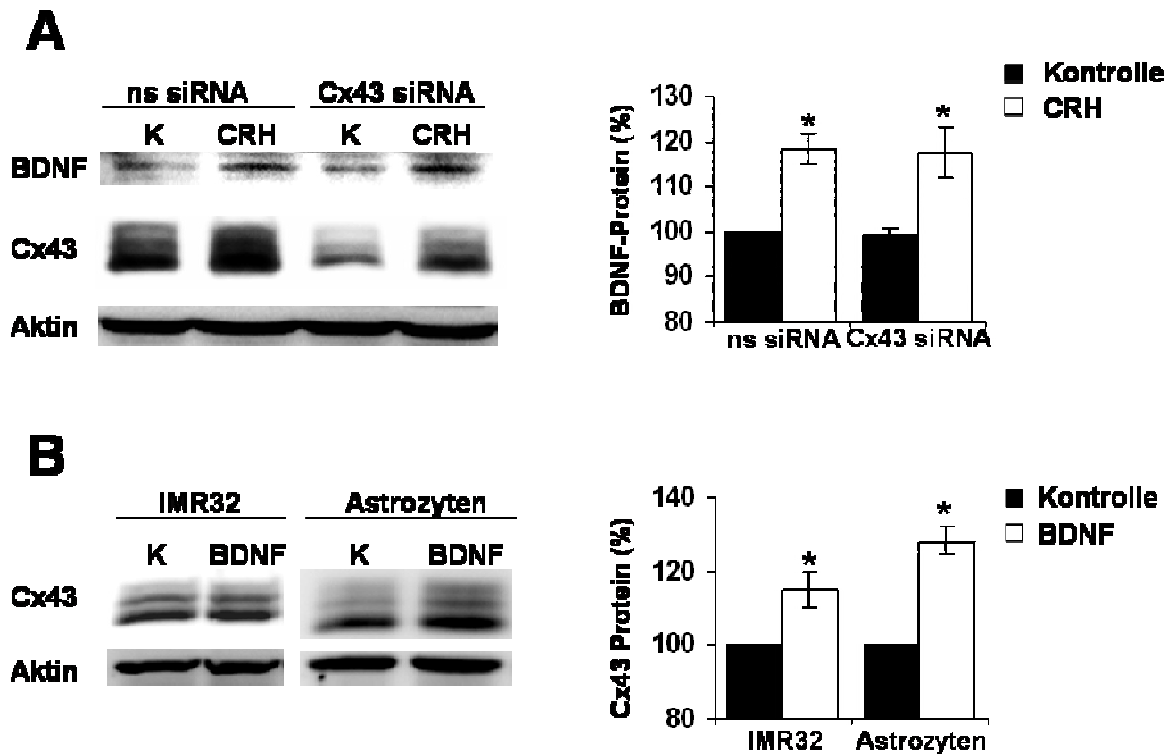


Abb. 3.20 Verknüpfung der CRH-induzierten Regulation von BDNF und Cx43

A, IMR32-Zellen wurden mit ns siRNA oder Cx43 siRNA transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit CRH (100 nM, 4 h) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle, K). BDNF- und Cx43-Expression wurden mittels Western Blots analysiert. Die CRH-Behandlung stimulierte die BDNF-Expression im ähnlichen Ausmaß in ns siRNA- und Cx43 siRNA-transfizierten Zellen. **B**, IMR32-Zellen und primäre Astrozyten wurden mit BDNF (20 ng/ml, 4 h) behandelt und auf Veränderungen der Cx43-Expression untersucht. Die Behandlung der Zellen mit BDNF steigerte die Cx43-Expression in beiden Zelltypen.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen sind angegeben: $*P < 0,05$ wurden über den Students t-Test berechnet. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Abb. nach Hanstein et al., 2008b

Die Ergebnisse zeigen, dass CRH seine neuroprotektiven Eigenschaften über eine gesteigerte Expression des neurotrophen Faktors BDNF und des Gap Junction-Proteins Cx43 vermittelt. Die Hochregulation des Cx43-Proteins und die dadurch gesteigerte Gap Junction-Kommunikation vermindern den oxidativen Stress in einzelnen Zellen über eine verbesserte Verteilung der toxischen Moleküle und können so das Zellüberleben fördern. Für das CRH-Zielgen BDNF konnten bereits neuroprotektive Effekte gezeigt werden. Zudem konnte es in dieser Arbeit erstmals als Aktivator der Cx43-Expression identifiziert werden. Es sorgt somit für eine zusätzliche Hochregulation des Cx43-Proteins.

4. Diskussion

Das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) ist ein wichtiger Mediator im ZNS, dessen Stress-induzierte Ausschüttung möglicherweise zentral Neuroprotektion gegenüber toxischen Einflüssen induziert. Eine Störung des CRH-Systems ist mit vielen neurodegenerativen Krankheiten assoziiert (Bissette et al., 1985; Behan et al., 1996), was die Bedeutung von CRH für die Funktion und das Überleben von Neuronen unterstreicht. Obwohl bereits neuroprotektive CRH-Effekte gegenüber oxidativem Stress und Exzitotoxizität *in vitro* bewiesen werden konnten (Lezoualc'h et al., 2000; Elliott-Hunt et al., 2002; Bayatti et al., 2003), fehlte dafür bislang die Bestätigung *in vivo*. Daher stand die Erforschung neuroprotektiver Eigenschaften von CRH *in vivo* und die Identifizierung von CRH-Zielgenen im Fokus der vorliegenden Arbeit. Die Analyse der CRH-induzierten Neuroprotektion *in vivo* erfolgte in CRH-überexprimierenden Mäusen und BDNF-defizienten Mäusen. Die Identifizierung der CRH-Zielgene, BDNF und Connexin43 (Cx43), und von CRH-aktivierten Signalwegen wurde zunächst in humanen IMR32-Neuroblastomzellen durchgeführt. Die Bedeutung dieser Zielgene für die CRH-induzierte Neuroprotektion wurde in primären Astrozyten und organotypische hippocampale Schnittkulturen bestimmt, da sie eher den physiologischen Gegebenheiten entsprechen. *In vivo* und *in vitro* konnten ein neuroprotektiver Effekt des CRH nachgewiesen werden, der über BDNF und Connexin43 vermittelt wird, und dieser wird im Folgenden diskutiert.

4.1 Analyse der neuroprotektiven CRH-Eigenschaften

Zum Nachweis einer CRH-induzierten Neuroprotektion *in vivo*, wurden die Auswirkungen akuten exzitotoxischen Stresses auf CRH-überexprimierende Mäuse und Kontrollmäuse verglichen. Exzitotoxizität ist ein Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen (Van Damme et al., 2005) und ein etabliertes Modell für die Analyse protektiver Moleküle. Die CRH-Überexpression verhinderte zwar nach Induktion der Exzitotoxizität nicht die akut auftretende Epilepsie, schützte aber langfristig Neurone des Hippocampus vor Neurodegeneration und bewahrte das ZNS vor einer Inflammation. Zudem konnte eine Hochregulation des Neurotrophins BDNF in CRH-überexprimierenden Mäusen nachgewiesen

4. Diskussion

werden. BDNF wurde bereits als wichtiger Überlebensfaktor für Neurone beschrieben (zur Übersicht: Yuan and Yankner, 2000), die Modulation des BDNF durch CRH *in vivo* ist somit ein Bestandteil der protektiven CRH-Wirkung und trägt zum Überleben der Neurone nach Exzitotoxizität bei.

Die Analyse weiterer CRH-Zielgene identifizierte Connexin43 (Cx43), das Haupt-Gap Junction-Protein der Astrozyten. Gap Junctions stellen die direkte Verbindung der Zytoplasmata direkt benachbarter Zellen dar; Metabolite und Nährstoffe, aber auch toxische Moleküle können darüber zwischen Zellen transportiert werden, die entweder die Abwehr der Toxizität fördern oder für die Ausbreitung der Toxizität sorgen (Perez Velazquez et al., 2003). Die Bedeutung von Gap Junction-Kanälen für die Neuroprotektion wird daher zurzeit verstärkt diskutiert. CRH induzierte die Cx43-Gen- und Proteinexpression, die Bildung von Gap Junction-Kanälen und steigerte die interzelluläre Kommunikation in klonalen IMR32-Zellen und primären Astrozyten. Die gesteigerte interzelluläre Kommunikation scheint ein wichtiger Faktor der CRH-induzierten Neuroprotektion zu sein, denn eine Blockade der Gap Junction-Kanäle verhinderte den protektiven CRH-Effekt in MTT-Tests und organotypischen Hippocampus-Schnittkulturen. Der erhöhte Transfer protektiver Moleküle von gesunden in geschädigte Zellen („guter Samariter“ Effekt; Contreras et al., 2004) und die bessere Verteilung bzw. Verdünnung toxischer Moleküle wird somit durch CRH verstärkt. Dadurch wird der toxische Stress für die einzelnen Zellen verringert, was durch die Analyse der Proteincarbonylierung bestätigt wurde. Die Relevanz von astrozytärem Cx43 für das neuronale Zellüberleben konnte in Astrozyten-Neuron-Co-Kulturen nachgewiesen werden, wobei die Reduktion der Cx43-Expression in Astrozyten die Degeneration von Neuronen nach oxidativem Stress förderte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das CRH-Zielgen BDNF selbst für eine zusätzliche Steigerung der Cx43-Expression sorgen kann.

Die CRH-induzierte Steigerung der Cx43-Expression und der interzellulären Kommunikation zwischen Astrozyten ist somit entscheidend für die Neuroprotektion und unterstreicht die Bedeutung der Astrozyten für das neuronale Zellüberleben (zur Übersicht: Lobsiger and Cleveland, 2007).

Im Folgenden soll die neuroprotektive Wirkung von CRH *in vivo* und *in vitro* beschrieben und die CRH-Zielgene und ihr Beitrag zum Schutz der Neurone diskutiert werden.

4.2 Untersuchung der CRH-induzierten Neuroprotektion *in vivo*

Für die *in vivo* Analyse der neuroprotektiven CRH-Effekte gegenüber experimentell ausgelöstem Stress, hier der Exzitotoxizität, wurden CRH-überexprimierende Mäuse (CRH-COE^{hom}-NES) und altersentsprechende Kontrollmäuse (CRH-COE^{con}-NES) verwendet (Lu et al., 2008). Akuter exzitotoxischer Stress ist ein wichtiges pathogenes Merkmal der Epilepsie, die sowohl mit neurodegenerativen Krankheiten, z.B. der AD, als auch mit psychischen Krankheiten assoziiert werden kann, da betroffene Patienten zehnmal bzw. fünfmal häufiger von Epilepsie betroffen sind als eine Referenzpopulation (zur Übersicht: Menendez, 2005; Kanner, 2007).

4.2.1 Einfluss der CRH-Überexpression auf die Kainat-induzierte Epilepsie

In Übereinstimmung mit früheren Studien löste die Injektion von Kainat (35 mg/kg, i.p.) progressive epileptische Anfälle in beiden Mausstämmen aus. Interessanterweise entwickelten die CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-Nes-Mäuse 20 min nach Kainat-Injektion signifikant stärkere epileptische Krämpfe als CRH-COE^{con}-Nes-Kontrollmäuse. Sie waren daher nicht besser vor den akuten Effekten der Exzitotoxizität geschützt. Im weiteren Verlauf traten jedoch in beiden Mausstämmen vergleichbare Stärkegrade der epileptischen Anfälle auf. Zwei Stunden nach Injektion erholten sich die CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-Nes-Mäuse bereits von der Kainat-induzierten Exzitotoxizität, während die CRH-COE^{con}-Nes-Kontrollmäuse auch noch nach vier Stunden epileptische Krämpfe aufwiesen. Diese Unterschiede in dem Verlauf der Epilepsie werden im Folgenden diskutiert.

4.2.1.1 Schnelle Entstehung epileptischer Anfälle in CRH-überexprimierenden Mäusen

CRH wirkt in vielen neuronalen Schaltkreisen als exzitatorischer Neuromodulator (Aldenhoff et al., 1983; Ehlers et al., 1983). Eine chronische CRH-Gabe kann CRH-R1-abhängig eine schnellere Entstehung epileptischer Anfälle in neonatalen Ratten induzieren, durch die hippocampale Neuronen geschädigt werden (Baram und Schultz, 1995; Baram et al., 1997). In adulten Ratten erzeugen chronische CRH-Gaben einen leicht erregbaren Status der Neurone, der die Wirksamkeit von Aktivatoren der Glutamat-Rezeptoren wie z.B. Kainat *in vivo* erhöht (Brunson et al., 1998). CRH scheint daher additiv zur Exzitotoxizität zu wirken. In den CRH-überexprimierenden Mäusen ist der CRH-Spiegel chronisch erhöht. Die

4. Diskussion

exzitatorischen CRH-Eigenschaften könnten daher einen schnellen Beginn der epileptischen Anfälle fördern.

Zudem können auch Glucocorticoide für die unmittelbare Entwicklung der epileptischen Anfälle in den CRH-überexprimierenden Mäusen verantwortlich sein. Die CRH-Überexpression verursacht unter Stressbedingungen die Hypersekretion von Stresshormonen (Lu et al., 2008), die dadurch zu einer verstärkten Aktivierung der HPA-Achse und zu einer erhöhten Glucocorticoid-Freisetzung führen. Glucocorticoide tragen in Gegenwart eines Stressors wie der Exzitotoxizität zum Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration an Synapsen des Hippocampus *in vivo* und *in vitro* bei (Stein-Behrens et al., 1992; Stein-Behrens et al., 1994). Diese Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration verstärkt die Exzitotoxizität. In CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-Nes-Mäusen löst die Kainat-Injektion eine hyperreaktive Stressantwort aus, die in den Mäusen für eine erhöhte Glucocorticoid-Sekretion sorgt und so zu einem zusätzlichen Anstieg des exzitotoxischen Stresses führt und die epileptischen Anfälle zu Beginn verstärken kann. Die Stärke der HPA-Achsen-Aktivierung ist jedoch individuell sehr unterschiedlich (Raadsheer et al., 1995), wodurch nicht alle Tiere in gleichem Ausmaß von der Epilepsie betroffen sind.

Nach Kainat-Injektion tragen sowohl die exzitatorischen CRH-Eigenschaften, als auch die verstärkte Glucocorticoid-Sekretion zu einer Verstärkung der Exzitotoxizität bei und könnten so zu einem frühen Beginn der schweren epileptischen Anfälle beitragen oder sogar zum Tod einzelner Mäuse führen.

4.2.1.2 Die CRH-Überexpression verkürzt die Dauer der Epilepsie

Die akute CRH-induzierte Stressantwort führt zur Freisetzung von Glucocorticoiden, wobei die Glucocorticoid-Konzentration im Blut ihren Maximalwert 15-30 min nach Stressinduktion erreicht und nach 60-90 min auf ihr Ausgangsniveau abfällt (zur Übersicht: de Kloet et al., 2005). Die akute Stressantwort wird über sekretierte Glucocorticoide schnell über Aktivierung von „Feedback“-Mechanismen herunterreguliert, denn sie sorgen über Bindung an Glucocorticoid-Rezeptoren im Gehirn für eine Reduktion der CRH-Sekretion und somit zu einer verringerten HPA-Achsenaktivität und Glucocorticoid-Sekretion (zur Übersicht: Swaab et al., 2005). Eine langfristige Verstärkung der Exzitotoxizität wird dadurch verhindert. Deswegen treten trotz des frühen Beginns der Epilepsie in CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-Nes-Mäusen im weiteren Verlauf vergleichbare Stärkegrade der epileptischen

4. Diskussion

Anfälle in CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-Nes-Mäusen und CRH-COE^{con}-Nes-Kontrollmäusen auf.

4.2.2 Auswirkungen der CRH-Überexpression auf die Neuroprotektion

CRH-überexprimierende CRH-COE^{hom}-Nes-Mäuse erholten sich schneller von den epileptischen Anfällen als CRH-COE^{con}-Nes-Kontrollmäuse. Nach der Induktion der akuten Stressantwort, die die Exzitotoxizität kurzfristig verstärkt, scheint CRH langfristig der toxischen Aktivität entgegenzuwirken und Neuroprotektion zu vermitteln. Diese CRH-induzierte Neuroprotektion trägt somit zur reduzierten Dauer der Epilepsie bei und wurde im Hippocampus, der sehr vulnerabel gegenüber Exzitotoxizität ist, genauer analysiert.

Die CRH-Überexpression kann adaptive Änderungen der neuronalen Physiologie bewirken. Chen et al. bewiesen bereits einen Einfluss des CRH auf die neuronale Konnektivität während der Entwicklung des Hippocampus (Chen et al., 2004b). In CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-Nes-Mäusen konnte in diesem Zusammenhang die Hochregulation der CRH-R1-Expression gezeigt werden (Lu et al., 2008). Viele Studien deuten daraufhin, dass die neuroprotektiven CRH-Effekte über den CRH-R1 vermittelt werden (Lezoualc'h et al., 2000; Pedersen et al., 2001; Bayatti et al., 2003) und *in vitro* wurde demonstriert, dass CRH Neuroprotektion gegenüber dem exzitotoxischen Neurotransmitter Glutamat via CRH-Rezeptor-abhängigen Signalwegen in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen induzieren kann (Elliott-Hunt et al., 2002). In den CRH-überexprimierenden Mäusen können daher über erhöhte CRH- und CRH-R1-Proteinspiegel „mehr“ CRH-R1-abhängige neuroprotektive Signalwege aktiviert werden, die zu einer verkürzten Dauer der Epilepsie beitragen.

Einen weiteren Beweis für einen neuroprotektiven Effekt der CRH-Überexpression lieferte auch der verringerte Zelltod der pyramidalen Neurone der CA3/CA1-Region und der Körnerzellen im Hippocampus in den CRH-überexprimierenden Mäusen nach Kainat-Behandlung. Obwohl Kainat lang anhaltenden exzitotoxischen Stress induziert und zu neuronalen Schädigungen im Hippocampus führt (Nadler et al., 1978; Ben-Ari, 1985), waren die Neurone der CRH-überexprimierenden Mäuse im Gegensatz zu hippocampalen Neuronen der Mäuse mit endogenem CRH-Spiegel geschützt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen einen neuroprotektiven Effekt von CRH *in vivo*. Sie zeigen, dass die CRH-Überexpression in CRH-COE^{hom}-Nes-Mäusen zwar nicht vor

4. Diskussion

Kainat-induzierter Exzitotoxizität schützen konnte, aber die Dauer der epileptischen Anfälle verkürzte. Zudem förderte sie im Hippocampus den Schutz der Neurone vor Zelltod und verhinderte eine Neuroinflammation.

4.2.3 Bedeutung von BDNF für die CRH-induzierte Neuroprotektion

Das Neurotrophin BDNF wurde bereits als Zielgen von CRH in Neuronen des Cerebellums identifiziert (Bayatti et al., 2005). Zudem bewirken epileptische Anfälle auch einen starken Anstieg der BDNF-Genexpression und des BDNF-Proteinspiegels, der mit der Stärke der Anfälle korreliert und speziell im Gyrus dentatus und in den CA1/CA3-Regionen des Hippocampus zu beobachten ist (Ernfors et al., 1991; Scharfman, 1991; Takahashi et al., 1999). Übereinstimmend dazu zeigten Kainat-injizierte CRH-COE^{con}-Nes-Kontrollmäuse, die schwere neuronale Schäden und Neuroinflammation im Gyrus dentatus und in den CA1/CA3-Regionen des Hippocampus aufwiesen, in diesen Regionen einen Anstieg des BDNF-Proteinspiegels. Dahingegen entsprach das BDNF-Proteinniveau der Kainat-injizierten CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-Nes-Mäuse, die weder Anzeichen für eine Neurodegeneration noch für Neuroinflammation hatten, dem Kontrollniveau der NaCl-injizierten CRH-COE^{hom}-Nes-Mäuse. BDNF ist ein neurotropher Faktor der Neurotrophin-Proteinfamilie und wird im ZNS stark exprimiert. Es ist ein wichtiger Regulator des Zellüberlebens, der Differenzierung, der neuronalen Aktivität und somit der Plastizität (Barde, 1989). Nach neuronaler Schädigung wird die Expression von BDNF zur Unterstützung der Neuroprotektion induziert (Dugich-Djordjevic et al., 1992) und diese Unterstützung des neuronalen Zellüberlebens durch BDNF wurde bereits in vielen Studien beschrieben (zur Übersicht: Yuan and Yankner, 2000). Eine BDNF-vermittelte Protektion gegenüber Glutamat-induzierter Neurotoxizität *in vitro* (Lindholm et al., 1993; Shimohama et al., 1993) und eine Verminderung der neuronalen Schädigung in *in vivo* Modellen der Neurodegeneration und Ischämie konnten zudem bereits gezeigt werden (Morse et al., 1993; Beck et al., 1994; Tsukahara et al., 1994). In Kainat-injizierten CRH-COE^{con}-Nes-Kontrollmäusen führt die neuronale Schädigung zur Hochregulation der BDNF-Expression, um die Neuronen gegenüber der Exzitotoxizität zu schützen.

Eine Erhöhung des BDNF-Proteinspiegels konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nur nach Kainat-Behandlung in geschädigten Hirnregionen beobachtet werden, sondern trat auch in CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-Nes-Mäusen im Vergleich zu CRH-COE^{con}-Nes-

4. Diskussion

Mäusen unter Kontrollbedingungen auf. Da BDNF schon als CRH-Zielgen beschrieben werden konnte, führt vermutlich die CRH-Überexpression zur Hochregulation des BDNF-Proteinniveaus in diesen Mäusen. Auch die Western Blot-Analyse hippocampaler Lysate zeigte eine Hochregulation der reifen BDNF-Form und eine geringe Reduktion der proBDNF-Form in NaCl-injizierten CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom}-Nes-Mäusen im Vergleich zu CRH-COE^{con}-Nes-Kontrollmäusen. Die reife BDNF-Form fördert über Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors TrkB das neuronale Zellüberleben, das Auswachsen der Axone, die Differenzierung von Dendriten und die Induktion von LTP im Hippocampus; dahingegen bindet proBDNF mit hoher Affinität an den p75^{NTR} Neurotrophin Rezeptor und induziert Apoptose, die Degeneration von Axonen, es reduziert die Dendritenverzweigungen und LTD (Lu et al., 2005; Amaral und Pozzo-Miller, 2007). Da die CRH-überexprimierenden Mäuse mit einem erhöhten reifen BDNF-Proteinniveau besser gegenüber Kainat-induzierter Exzitotoxizität geschützt waren, könnte BDNF Neuroprotektion direkt oder über die gesteigerte neuronale Plastizität vermitteln.

Generell ist jedoch zu sagen, dass das Überleben von Neuronen immer von der Unterstützung eines neurotrophen Faktors abhängig ist (zur Übersicht: Yuan and Yankner, 2000). Wird im ZNS weniger BDNF produziert, erholen sich Neurone langsamer von Schädigungen (Chen et al., 2003), wird jedoch mehr BDNF produziert, wird das Überleben von Neuronen gefördert (Berger et al., 2004; Kurozumi et al., 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die chronische Hochregulation von CRH gegenüber Exzitotoxizität protektiv wirkte und dass diese CRH-Hochregulation von erhöhten BDNF-Proteinspiegeln begleitet war. Das deutet daraufhin, dass BDNF teilweise die CRH-induzierten neuroprotektiven Effekte vermitteln kann. Weil CRH aber viele unterschiedliche Zielgene aktivieren kann, können auch weitere Faktoren an der Neuroprotektion beteiligt sein.

4.2.4 BDNF als Mediator der Neuroprotektion im Hippocampus

Um die Abhängigkeit der Neuroprotektion im Hippocampus vom neurotrophen BDNF-Protein zu analysieren, wurde das Ausmaß der H₂O₂-induzierten Toxizität in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen von neugeborenen homozygoten und heterozygoten BDNF-defizienten Mäusen (-/-) bzw. (+/-) im Vergleich zu Wildtyptieren mit endogenem BDNF-Proteinspiegel bestimmt. Die hippocampalen Schnitte der Wildtyptiere zeigten keine bessere

4. Diskussion

Protektion gegenüber den durch H₂O₂ induzierten oxidativen Stress, als die der homozygoten und heterozygoten BDNF-defizienten Tiere. Die Schnitte aller drei Mausstämme zeigten vergleichbare Zellschädigungen, wobei die pyramidalen Neurone der CA1- und CA3-Region am stärksten betroffen waren. Diese Ergebnisse können folgenderweise erklärt werden: 1) Die H₂O₂-induzierte Toxizität könnte zu groß gewesen sein, um eine Protektion durch endogenes BDNF zu erreichen. Da aber bei allen Mäusen 60-70% der Zellen überlebten, erscheint dies unwahrscheinlich. 2) In den homozygoten und heterozygoten BDNF-defizienten Mäusen könnten andere protektive Mechanismen die fehlende Neuroprotektion durch BDNF kompensiert haben. Nach toxischen Einflüssen kommt es zur Aktivierung verschiedenster protektiver Mechanismen wie der Aktivierung weiterer Neurotrophine (NGF, NT3, NT4; Lu et al., 2005) oder der Aktivierung des Glutathion-Systems, das oxidative freie Radikale in der Zelle unschädlich macht (Franco et al., 2007). 3) Weil die endogene BDNF-Expression im Hippocampus sehr gering ist (Kokaia et al., 1996), wird die Neuroprotektion dort wahrscheinlich nur zum Teil von BDNF abhängig sein. Diese Vermutung wird unterstützt durch Untersuchungen, bei denen eine Reduktion der BDNF-Konzentration in der CA1-Region *in vivo* keinen Einfluss auf die Zellschädigung der pyramidalen Neurone der CA1-Region nach globaler Ischämie zeigte (Larsson et al., 1999). In der CA3-Region ist die endogene BDNF-Konzentration zwar etwas höher als in der CA1-Region, BDNF hatte aber auch hier keinen Einfluss auf die Neuroprotektion nach Ischämie (Larsson et al., 1999). Nur die chronische exogene Administration von BDNF erzeugte Neuroprotektion gegenüber Ischämie in verschiedenen Studien (Beck et al., 1994; Wu und Pardridge, 1999). Es ist deshalb zu vermuten, dass die kurzfristige Erhöhung der endogenen BDNF-Proteinspiegel aufgrund des oxidativen Stresses in den hippocampalen Schnitten der Wildtyp- und heterozygoten BDNF-Mäuse nicht ausreichten, um neuroprotektiv zu wirken, auch wenn BDNF in höheren Konzentrationen neuroprotektive Effekte zeigt.

In den CRH-überexprimierenden Mäusen konnte die chronische Hochregulation von CRH einen dauerhaft erhöhten BDNF-Proteinspiegel im Hippocampus erzeugen. Da viele Studien einen protektiven Effekt der chronischen BDNF-Hochregulation schon beschrieben haben (Beck et al., 1994; Larmer et al., 1995; Wu und Pardridge, 1999; Reibel et al., 2000), könnte BDNF unter diesen Umständen mindestens teilweise für die CRH-induzierte Neuroprotektion verantwortlich sein.

CRH kann jedoch viele unterschiedliche Signalwege aktivieren, die an der Neuroprotektion beteiligt sind (Bayatti und Behl, 2005). Die CRH-induzierte Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges kann Neuroprotektion über eine Aktivierung des cyclic AMP

4. Diskussion

response element binding protein (CREB), MAPK und PKC oder über die Inhibition der proapoptischen Kinase GSK3 β und des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermitteln (Crowder und Freeman, 2000; Lezoualc'h et al., 2000; Lonze und Ginty, 2002; Bayatti et al., 2003). Diese aktivieren möglicherweise neue Zielgene mit neuroprotektiven Eigenschaften, deren Identifizierung im Fokus der vorliegenden Arbeit stand.

4.3 Bedeutung von Connexin43 (Cx43) als weiteres CRH-Zielgen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Gap Junction-Protein Cx43 als neues CRH-Zielgen im Gehirn identifiziert und Signalwege, die zur CRH-induzierten Regulation von Cx43 führen, aufgeklärt werden. Cx43 ist das am meisten verbreitete Gap Junction-Protein in Säugern und wird ubiquitär exprimiert (Willecke et al., 2002). Homozygote Cx43-defiziente Mäuse (-/-) sterben schon nach der Geburt an Fehlbildungen des Herzens, wodurch die Relevanz von Cx43 für die Entwicklung und Physiologie multizellulärer Organismen deutlich wird (Reaume et al., 1995). Im Säugetier-Gehirn wird Cx43 nur in Astrozyten, dem häufigsten Gliazelltyp im Gehirn, und in aktivierten Mikrogliazellen, aber nicht von Neuronen exprimiert (Dermietzel, 1998; Eugenin et al., 2001).

Der Einfluss von CRH auf Cx43 und Gap Junctions wurde zunächst in humanen IMR32-Neuroblastomzellen untersucht. Obwohl diese Zellen neuronalen Ursprungs sind, exprimieren sie sowohl Cx43, als auch die CRH-Rezeptoren und viele Komponenten bekannter CRH-induzierter Signalkaskaden. Um die physiologische Relevanz der CRH-induzierten Cx43-Regulation genauer zu untersuchen, wurde der Einfluss von CRH auf Cx43 auch in primären Astrozyten, organotypischen hippocampalen Schnittkulturen und in CRH-überexprimierenden Mäusen untersucht. Die Bedeutung von Cx43 und von Gap Junctions für die CRH-induzierte Neuroprotektion wird im Folgenden diskutiert.

4.3.1 Einfluss von CRH auf die Cx43-Expression und die Gap Junction-Funktion

CRH oder das CRH-verwandte Peptid Urocortin (Ucn) induzierten eine erhöhte Cx43-Genexpression und einen erhöhten Cx43-Proteinspiegel in humanen IMR32-Zellen, in primären Astrozyten und in organotypischen hippocampalen Schnitten. In Übereinstimmung mit dem erhöhten Gesamt-Cx43-Proteinspiegel und dem Anstieg der phosphorylierten Cx43-

4. Diskussion

Form, die nur in den Gap Junction-Plaques detektierbar ist (Solan und Lampe, 2007), zeigten immunhistochemische Analysen, dass die Anzahl der Gap Junction-Plaques an den Zell-Zell-Grenzen benachbarter Zellen erhöht und die Plaques größer waren. Zudem waren mehr Zellen über Gap Junctions miteinander verbunden. Farbstoff-Transfer-Tests zeigten, dass die CRH-induzierte Hochregulation der Gap Junction-Plaques an der Plasmamembran gleichzeitig zu einer verstärkten Kommunikation zwischen benachbarten Zellen führte und daher auch für die Funktionalität der Kanäle relevant ist. Der CRH- oder Ucn-induzierte Anstieg des Cx43-Proteins und speziell der phosphorylierten Cx43-Formen hat somit einen direkten Einfluss auf den interzellulären Transfer, wodurch vermehrt Nährstoffe, Ionen und intrazelluläre Signalmoleküle zwischen benachbarten Zellen transportiert werden können (Azarnia et al., 1988; Simon und Goodenough, 1998; Willecke et al., 2002; Saez et al., 2003).

4.3.2 Mechanismen der CRH-induzierten Modulation des Cx43-Proteins

Die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions ist ein dynamischer und stark kontrollierter Prozess (zur Übersicht: Solan and Lampe, 2007), der über Phosphorylierung der Connexine innerhalb von Minuten reguliert wird. Die Cx-Phosphorylierung ist so für den Transport, die Bildung und Degradation der Gap Junctions entscheidend (Stagg und Fletcher, 1990; Lampe et al., 2000; Lampe und Lau, 2004; Laird, 2005; Moreno, 2005; Solan und Lampe, 2005) und kann die Gap Junction-Kommunikation positiv sowie negativ beeinflussen (Bissette et al., 1985; Crow et al., 1990; Musil et al., 1990; Kadle et al., 1991; Laird et al., 1991; Berthoud et al., 1992). CRH und Ucn sorgten für eine erhöhte Cx43-Expression, -Phosphorylierung und einen gesteigerten Transfer über Gap Junctions, der über die Aktivierung des CRH-R1 und die nachfolgende Stimulation der cAMP/PKA- und/oder der MAP-Kinase-Signalkaskade induziert wurde. Die Verwendung des spezifischen CRH-R1-Antagonisten R121919, des PKA-Inhibitors H89 oder des MAPK-Kinase Inhibitors U0126 blockierte die Hochregulation des Cx43-Proteinspiegels und die Cx43-Phosphorylierung durch CRH. Obwohl bereits bekannt war, dass die Aktivierung des CRH-R1 zur Stimulation der intrazellulären cAMP/PKA-Signalkaskade und der MAP-Kinasen ERK1/2 führen kann (Grammatopoulos et al., 1996; Bayatti et al., 2003) und dass diese Kinasen einen Einfluss auf die Cx43-Phosphorylierung sowie die Gap Junction-Kommunikation haben können (zur Übersicht: Solan and Lampe, 2007), ist dies die erste Arbeit, die einen Zusammenhang zwischen CRH, den PKA- und MAPK-Signalkaskaden und der Cx43-Regulation aufzeigt.

4.3.3 Regulation der Cx43-Expression über PKA- und MAP-Kinase-Signalwege

Neben der Hochregulation des Cx43-Proteinspiegels wurde auch die Expression von Cx43 CRH-abhängig erhöht. In der Promotorregion des Cx43-Gens existieren Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CREB und AP-1 (Zhang et al., 2005; Wu et al., 2007). Die Western Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten einen CRH-induzierten Anstieg des aktiven phosphorylierten Transkriptionsfaktors CREB und eine erhöhte Expression des cFos-Proteins, das eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors Activator Protein-1 (AP-1) darstellt (zur Übersicht: Shaulian und Karin, 2002). Beide Transkriptionsfaktoren sind Zielproteine der PKA- und ERK1/2-Kinasen (Boutillier et al., 1992; Bayatti et al., 2003; Tully et al., 2003; Carlezon et al., 2005). Während CREB direkt von beiden Kinasen phosphoryliert und aktiviert werden kann, wird cFos auf Transkriptionsebene von PKA- und ERK1/2-Proteinen reguliert. Die PKA- und ERK1/2-Kinasen können daher neben dem direkten Einfluss auf die Phosphorylierung des Cx43-Proteins auch die Cx43-Genexpression über Phosphorylierung und Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren indirekt regulieren.

Obwohl hier nicht gezeigt wurde, dass CRH in IMR32-Zellen und Astrozyten die Cx43-Expression über Bindung von CREB oder AP-1 an den Cx43-Promotor reguliert, ist ein CRH-vermittelter Effekt auf die Cx43-Expression über die PKA- und/oder MAP-Kinase ERK1/2-abhängige Aktivierung von CREB oder Expression von cFos denkbar (Geimonen et al., 1996; Echetebe et al., 1999; Bailey et al., 2002; Mitchell and Lye, 2005; Wu et al., 2007). Dafür sprechen Untersuchungen von Wu et al., die eine Bindung von cFos an den Cx43-Promotor nach CRH-Behandlung von humanen Myometriummzellen zeigten (Wu et al., 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen einen Zusammenhang zwischen CRH-induzierten CRH-R1/PKA- oder CRH-R1/MAPK-Signalwegen und der Regulation von Cx43.

4.3.4 Physiologische Funktion der CRH-induzierten Cx43-Regulation

Verschiedene Studien zeigten, dass CRH und verwandte Peptide Neuroprotektion über Bindung an den CRH-R1 und Aktivierung der PKA- und MAP-Kinasen induzieren (Pedersen et al., 2001; Pedersen et al., 2002; Bayatti et al., 2003; Facci et al., 2003). Da PKA- und MAP-Kinasen auch an der Erhöhung des Cx43-Proteinspiegels beteiligt sind, war es denkbar, dass CRH seine neuroprotektiven Effekte eventuell über die Förderung der interzellulären

4. Diskussion

Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions vermittelt. Um diese Hypothese zu beweisen, wurden Zellüberlebenstests mit IMR32-Zellen und organotypischen hippocampalen Schnittkulturen durchgeführt. CRH konnte sowohl in IMR32-Zellen als auch in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen Neuroprotektion gegenüber oxidativem Stress, ausgelöst durch H₂O₂ oder dem A β -Peptid, induzieren. Jedoch verhinderte die Blockade der Gap Junction-Kommunikation durch Cbx die neuroprotektive Funktion von CRH vollständig, wodurch mehr Zellen vom Zelltod betroffen waren. Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass Gap Junctions eine Komponente der CRH-induzierten Neuroprotektion darstellen.

4.3.4.1 Bedeutung der Gap Junctions für die Neuroprotektion bzw. Apoptose

Über den Einfluss der astrozytären Gap Junction-Kommunikation auf die Neuroprotektion existieren widersprüchliche Daten und Modelle (Abb. 4.1).

1) Über Gap Junctions können inflammatorische Moleküle und apoptotische Signale von der primär geschädigten Zelle oder Hirnregion ins restliche Astrozyten-Synzytium transportiert werden und so sekundär gesunde Zellen bzw. Zellregionen (Penumbra) schädigen; dies wird als „bystander effect“ bezeichnet (Freeman et al., 1993). Eine Blockade der Gap Junction-Kommunikation verhindert in diesem Fall die Ausbreitung der Inflammation und Apoptose in das restliche Synzytium (Ochalski et al., 1995; Lin et al., 1998; Chanson et al., 2001). Es wurde schon gezeigt, dass unter Ischämie-Bedingungen astrozytäre Gap Junctions reduziert werden, die verbleibenden Gap Junction-Kanäle aber geöffnet bleiben (Cotrina et al., 1998; Li und Nagy, 2000) und so den Transfer intrazellulärer apoptotischer Moleküle erlauben. Dadurch erfolgt die sekundäre Ausbreitung des Zelltods, der im Folgenden auch benachbarte Neurone betreffen kann.

2) Jedoch verhindert die Blockade der Gap Junction-Kommunikation auch die Fähigkeit des Synzytiums, toxische Signale über mehrere Zellen zu verteilen bzw. zu verdünnen und protektive und trophische Signale von gesunden Zellen in die geschädigte Region zu transportieren (Yasui et al., 2000). Dies wird auch als „guter Samariter“-Effekt bezeichnet. Beispielsweise führten nach Blockade der Gap Junctions in Neuron-Astrozyten-Co-Kulturen oxidativer Stress oder Glutamat-induzierte Exzitotoxizität zu verstärktem neuronalen Zelltod (Blanc et al., 1998; Ozog et al., 2002). Jede Zelle (Neuron und Astrozyt) ist nach Blockade der Gap Junction-Kommunikation nicht mehr Teil eines Synzytiums, sondern muss sich alleine gegenüber dem toxischen Einfluss behaupten. Auch *in vivo*

4. Diskussion

Analysen der Auswirkungen einer Ischämie in heterozygoten Cx43-defizienten Mäusen zeigten eine protektive Rolle der Gap Junctions (Siushansian et al., 2001; Nakase et al., 2003).

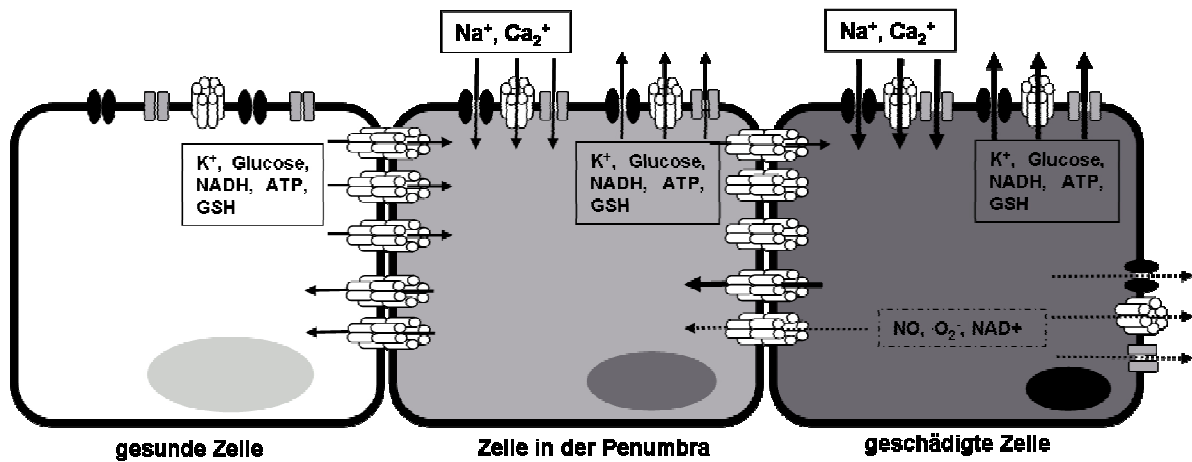


Abb. 4.1 Gap Junctions und die Ausbreitung von Signalen zum Zellüberleben bzw. Zelltod

Nach der Schädigung einer Zelle durch Toxine kommt es zur Membran-Depolarisation und der Öffnung von verschiedenen Ionenkanälen. Dadurch strömen Ca²⁺- und Na⁺-Ione verstärkt in die Zelle, wodurch die interzelluläre Homöostase gestört wird und Ca²⁺-abhängige toxische zelluläre Enzyme aktiviert werden. Zudem gehen protektive Moleküle (K⁺, Glucose, NADH, ATP, GSH) über Ausstrom in das extrazelluläre Milieu verloren. Apoptotische und inflammatorische Moleküle werden auch in den extrazellulären Raum abgegeben und können wiederum benachbarte Zellen schädigen. Apoptotische und protektive Moleküle, wie O₂⁻, NO und NAD⁺ werden aber auch direkt an benachbarte Zellen über Gap Junctions weitergegeben. Dadurch kann es zur sekundären Ausbreitung des Zelltods („bystander effect“) kommen oder die Toxizität in der primär betroffenen Zelle kann verringert werden. Gleichzeitig können über Gap Junction-Transfer protektive Moleküle von gesunden in geschädigte Zellen gebracht werden („guter Samariter“-Effekt). Abb. nach Contreras et al., 2004

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass CRH die Gap Junction-Kommunikation steigert und Neuroprotektion gegenüber oxidativem Stress, ausgelöst durch H₂O₂ oder dem A β -Peptid, in IMR32-Zellen und in organotypischen hippocampalen Schnitten induziert. Die Blockade der Gap Junctions mittels Cbx verhinderte diesen protektiven CRH-Effekt. Die CRH-induzierte Erhöhung der Gap Junction-Kommunikation förderte daher vermutlich in den IMR32-Zellen und in den hippocampalen Schnitten die Verteilung trophischer Faktoren, also den „guten Samariter“-Effekt, und könnte zudem die Verdünnung toxischer Moleküle bewirkt haben, wodurch das Zellüberleben gesteigert wurde.

4.3.4.2 Bedeutung von Cx43-Halbkanälen für die Apoptose

Nach der Schädigung einer Zelle durch Toxine kommt es zur Membran-Depolarisation und der Öffnung von verschiedenen Ionenkanälen. Neuere Studien behaupten, dass dadurch auch Connexin-Halbkanäle geöffnet werden, über die unspezifisch wichtige Metabolite und

4. Diskussion

protektive Moleküle in den extrazellulären Raum transferiert werden und Ionen in die Zelle einströmen (Abb. 4.1; Ramachandran et al., 2007). Dadurch würden die Halbkanäle den Zelltod möglicherweise verstärken. Es ist jedoch umstritten, ob Connexin-Halbkanäle überhaupt funktionsfähig sind und nicht andere Membrankanäle, wie Pannexine, P2X oder VDAC-Kanäle, für diese Effekte verantwortlich sind (zur Übersicht: Spray et al., 2006).

CRH erhöhte den Cx43-Proteinspiegel und die Anzahl von Cx43-Gap Junctions an der Plasmamembran. Es ist deswegen sehr wahrscheinlich, dass auch die Anzahl von Cx43-Halbkanälen nach CRH-Behandlung angestiegen ist. Jedoch vermittelte CRH Protektion gegenüber oxidativem Stress, wodurch die Bedeutung der Halbkanäle für die Neuroprotektion bzw. Apoptose unklar bleibt.

4.3.4.3 Kanal-unabhängige Funktionen von Cx43

Cx43 hat neben seiner Funktion als Gap Junction-Protein auch weitere physiologische Aufgaben. Nach diversen toxischen Einflüssen wie oxidativem Stress und intrazellulär erhöhter Ca^{2+} -Konzentration kann Cx43 als Membranprotein über die Reorganisation des Zytoskeletts und schnellere Normalisierung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration das Zellüberleben fördern (Lin et al., 2003). Unter Ischämiebedingungen ist die Konzentration des Cx43 in Mitochondrien erhöht (Boengler et al., 2005; Kardami et al., 2007) und diese Translokation in die Mitochondrien scheint entscheidend für bestimmte Formen der Cardioprotektion zu sein (Rodriguez-Sinovas et al., 2007).

Zudem beeinflusst das Cx43-Protein selbst die Transkription verschiedener Gene; die Tatsache, dass der Cx43 C-Terminus eine „Nucleus Targeting“-Sequenz enthält und an DNA binden kann, legt die Vermutung nahe, dass er über Bindung an cis-Elemente in Promotorenbereichen direkt die Gentranskription regulieren kann (de Feijter et al., 1996; Huang et al., 1998; Dang et al., 2003), z.B. verhindert er in verschiedenen Zelllinien die Zellproliferation über Transkriptionsregulation (Moorby and Patel, 2001; Dang et al., 2003; Dang et al., 2006). Cx43 scheint aber auch einen direkten Einfluss auf die Transkription von Zellüberlebensgenen zu haben, beispielsweise kann es die Expression des Apoptose-Inhibitors bcl2 regulieren (Huang et al., 2001). Alternativ ist auch eine Interaktion von Cx43 mit anderen Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren denkbar. Membrangebundenes Cx43 kann über seine SH2-, SH3- und ZO1-Bindungsstellen im C-Terminus mit Signalmolekülen oder Transkriptionsfaktoren interagieren (Kanemitsu et al., 1997; Loo et al., 1999). Dadurch können sich diese Faktoren nicht mehr frei im Zytosol und Nukleus bewegen, um Signalwege zu induzieren oder die Genexpression zu stimulieren (Herve et al., 2004; Giepmans, 2006).

4. Diskussion

Beispielsweise interagiert Cx43 mit β -Catenin, wodurch dessen Konzentration im Zytosol verringert wird. Ein Mangel von Cx43 hat zur Folge, dass β -Catenin in den Nucleus gelangen kann, um die Expression von Cx43 zu steigern (Ai et al., 2000). Ähnlich wird der Transkriptionsfaktor CCN-3 von Cx43 abgefangen, wodurch die Expression von Zellproliferationsgenen im Nucleus nicht mehr aktiviert wird (Fu et al., 2004; Gellhaus et al., 2004).

Da CRH eine Hochregulation des Cx43-Proteinspiegels induzierte, kann es auch Kanal-unabhängige Funktionen des Cx43 verstärken. So könnte Cx43 direkt die Genexpression protektiver Moleküle induzieren und über Interaktion mit weiteren Signalmolekülen oder Transkriptionsfaktoren neuroprotektive Signalwege fördern oder schädigende Signalwege inhibieren. Die Analyse der Kanal-unabhängigen Cx43-Funktionen und deren möglicher Beitrag zur CRH-induzierten Neuroprotektion waren jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit.

4.3.5 Wirkung des Gap Junction-Hemmstoffs Carbenoxolon

Der neuroprotektive CRH-Effekt wurde durch den Gap Junction-Hemmstoff Cbx vollständig inhibiert. Dies stimmt mit früheren Studien überein, die in Gegenwart von Cbx oder dem Gap Junction-Inhibitor 18α -Glycyrrhetinsäure eine verstärkte Toxizität von Glutamat oder NMDA in Neuron-Astrozyten-Co-Kulturen zeigten (Ozog et al., 2002; Zundorf et al., 2007). Die Gap Junction-Blockade durch 18α -Glycyrrhetinsäure kann auch den Kainat- und FeSo_4 -induzierten oxidativen Stress auf pyramidale Neurone in hippocampalen Schnittkulturen verstärken (Blanc et al., 1998). Der Gap Junction-Hemmstoff Cbx hatte in der eingesetzten Konzentration von 20 μM keinen Effekt auf das Zellüberleben in Scrape Loading-Experimenten und Zellüberlebenstests, konnte aber die Gap Junction-Kommunikation und dadurch den neuroprotektiven CRH-Effekt inhibieren. Wurde Cbx jedoch in Konzentrationen höher als 20 μM eingesetzt, wirkte es selbst zytotoxisch.

Cbx beeinflusst neben den Gap Junctions verschiedene Ionenkanäle und Rezeptoren (Salvi et al., 2005). In isolierten Leber-Mitochondrien kann Cbx einen Kollaps des Membranpotentials und der ROS-Produktion über Interaktion mit der mitochondrialen Atmungskette induzieren. In Neuronen und Astrozyten hat Cbx keinen Effekt auf das Membranpotential und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, jedoch induziert es die ROS-Produktion in Neuronen und die Depolarisation der Mitochondrien in Astrozyten und

4. Diskussion

Neuronen. Zundorf et al. zeigten bereits, dass diese toxischen Cbx-Effekte abhängig von der Konzentration und Inkubationsdauer sind (Zundorf et al., 2007). In dieser Arbeit wirkten nur Cbx-Konzentrationen höher als 20 μM zytotoxisch. Es ist deshalb zu vermuten, dass nur diese hohen Cbx-Konzentrationen die ROS-Produktion und die Depolarisation von Mitochondrien induzierten und zum Zelltod führten. Die 24-stündige Inkubation der IMR32-Zellen oder hippocampalen Schnitte mit 20 μM Cbx alleine führte nicht zum Zelltod und beeinflusste auch nicht die Zellmorphologie. Ein Einfluss auf die ROS-Produktion oder Depolarisation von Mitochondrien ist somit auszuschließen. Daher ist davon auszugehen, dass allein die Inhibition des interzellulären Transfers von Molekülen über Gap Junctions für den vermehrten Zelltod in Gegenwart von CRH verantwortlich ist. Neben Cbx und 18 α -Glycyrrhetinsäure wurde in anderen Studien Alkohole (Octanol, Heptanol) oder pH-Änderungen verwendet, um die Gap Junctions zu blockieren. Jedoch beeinflussen diese auch die Zellphysiologie stark. Daher sind Cbx oder Derivate der Glycyrrhetinsäure die derzeit spezifischsten Gap Junction-Hemmstoffe (Perez Velazquez et al., 2003) und wurden in dieser Arbeit verwendet. Um die Spezifität von Carbenoxolon zu untermauern, wurde die inaktive Form der Glycyrrhetinsäure verwendet. Diese Form zeigte alleine oder in Kombination mit dem Toxin und/oder CRH keinen signifikanten Einfluss auf den Zelltod.

4.3.6 Bedeutung der astrozytären Gap Junction-Kommunikation für die Neuroprotektion

In dieser Arbeit wurde die Relevanz der astrozytären Gap Junction-Kommunikation für die Neuroprotektion in hippocampalen Schnitten und in Astrozyten-Neuron-Co-Kulturen deutlich.

In hippocampalen Schnitten zeigte sich, dass Astrozyten, die ein starkes Synzytium über Gap Junctions bilden, kaum von den toxischen Effekten des oxidativen Stresses betroffen sind. Werden die Gap Junctions in Gegenwart eines Stressors durch Cbx blockiert, sind auch die Astrozyten vom Zelltod betroffen, was durch die verstärkte PI-Färbung im gesamten hippocampalen Schnitt deutlich wurde. Das astrozytäre Synzytium vermittelt somit Schutz gegenüber toxischen Einflüssen.

Die hippocampalen Neurone reagierten dahingegen viel sensitiver auf oxidativen Stress als Astrozyten und wurden somit stärker von oxidativem Stress geschädigt. Neurone sind zwar auch über Gap Junctions miteinander gekoppelt, bilden aber nur regional begrenzte

4. Diskussion

Netzwerke zur Regulation der elektrischen Synchronisation (Sohl et al., 2005; Fukuda, 2007). Sie sind u.a. daher vulnerabler gegenüber Stressfaktoren als Astrozyten. Das spiegelt sich auch in der spezifischen Schädigung der pyramidalen Neurone der CA1/3- Region und der Interneurone der DG-Region in den hippocampalen Schnitten nach H₂O₂-Behandlung wieder. In Gegenwart von CRH zeigte sich jedoch eine Reduktion der Stress-induzierten neuronalen Schädigung in den hippocampalen Schnitten. Cx43 ist das Hauptprotein astrozytärer Gap Junctions. Western Blot-Experimente zeigten, dass nach CRH- oder Urocortin-Behandlung primäre Astrozyten und Gliazellen der hippocampalen Schnitte mehr Cx43-Protein bilden und die Phosphorylierung von Cx43 erhöhen. Die astrozytäre Kopplung scheint daher in den hippocampalen Schnitten eine große Rolle für das neuronale Zellüberleben zu haben.

Auch in Astrozyten-Neuron-Co-Kulturen zeigte sich, dass die Verbindung der Astrozyten über Cx43-Gap Junctions das neuronale Zellüberleben bei oxidativem Stress stark beeinflusst. Die Verminderung der Cx43-Expression in den Astrozyten über eine Transfektion mit Cx43 siRNA reduzierte das Überleben der Neurone nach Behandlung mit H₂O₂ im Vergleich Neuronen, die mit ns siRNA transfizierten Astrozyten co-kultiviert wurden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der Astrozyten für die Neuroprotektion hin. Entscheidend für diese protektive Rolle der Astrozyten scheint Cx43 und die Kopplung der Astrozyten über Gap Junctions zu sein. Interessanterweise kann das von Neuronen sekretierte CRH die Cx43-Expression und die Gap Junction-Kommunikation steigern.

4.3.7 Mechanismen der Neuroprotektion über eine CRH-induzierten Cx43-Expression

Wie eine CRH-induzierte Verstärkung der Cx43-Expression Neurone nach toxischen Einflüssen unterstützen kann, wurde in verschiedenen Ansätzen untersucht. Die Analyse der Proteincarbonylierung als ein Marker oxidativen Stresses zeigte eine erhöhte Carbonylierung der Zellen nach Behandlung mit dem Amyloid β Peptid. Dieser Effekt wurde verstärkt, wenn die Zellen geringe Cx43-Spiegel durch Transfektion mit Cx43 siRNA besaßen. Cx43 scheint daher den oxidativen Stress innerhalb der Zellen für Proteine und evtl. auch andere zelluläre Komponenten zu verringern.

Zudem konnte ein interessanter Zusammenhang zwischen der CRH-induzierten BDNF-Expression und der CRH-geförderten Cx43-Expression hergestellt werden. BDNF, das

4. Diskussion

bereits als neurotropher Faktor beschrieben wurde, förderte auch die Cx43-Expression. Andere neurotrophe Faktoren könnten daher auch die Expression von Cx43 oder anderen Gap Junction-Proteinen zeit- und zelltypspezifisch regulieren und so die Vulnerabilität der Zellen gegenüber oxidativem Stress beeinflussen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine CRH-induzierte Erhöhung der Cx43-Expression und Verstärkung der Gap Junction-Kommunikation für den Schutz der Neurone nach toxischen Einflüssen verantwortlich ist. Ob CRH neben Cx43 auch die Expression weiterer Gap Junction-Proteine, die von Neuronen und Mikroglia gebildet werden, verändert und ob diese potentiellen Änderungen der Gap Junction-Kommunikation gegen neurotoxische Einflüsse wirken, muss noch gezeigt werden. Aktivierte Mikroglia, die CRH-Rezeptoren exprimieren könnten zusätzliche molekulare Ziele des CRH sein. Es ist bereits bekannt, dass die Aktivierung von Mikroglia durch Lipopolysaccharide die astrozytäre Cx43-Expression und die Gap Junction-Kommunikation inhibiert (Meme et al., 2006). Für Urocortin wurde nachgewiesen, dass es die Mikroglia-Aktivierung hemmt und somit dopaminerge Neurone vor dem Lipopolysaccharid-induziertem Zelltod schützt (Wang et al., 2007). Ob diese Neuroprotektion auch astrozytäre Gap Junctions betrifft oder auf mikrogliale Gap Junctions beschränkt ist, ist unklar. Neuroprotektive Effekte des CRH konnten auch in primären Neuronen aus unterschiedlichen Hirnregionen, die ohne Astrozyten kultiviert wurden, beschrieben werden (Bayatti et al., 2003). Es bleibt daher offen, ob neuronale Gap Junctions auch von CRH reguliert werden können und zur Neuroprotektion beitragen oder ob CRH andere neuroprotektive Mechanismen aktiviert. Ein Einfluss neuronaler Connexine auf das Zellüberleben wurde bisher nur in der Arbeit von Condorelli et al. untersucht (Condorelli et al., 2003). Exzitotoxischer Stress führte in apoptotischen Neuronen zu einer Hochregulation der Cx26 und Cx45 mRNA, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Cx26- und Cx45-Proteinspiegel. Zudem war der Proteinspiegel von Cx36, dem am stärksten exprimierten neuronalen Connexin, herunterreguliert. Es ist daher zu vermuten, dass neuronale Connexine nicht für das Zellüberleben entscheidend sind.

Es ist jedoch festzuhalten, dass CRH das astrozytäre Cx43-Protein und somit die astrozytäre Cx43-Gap Junction-Kommunikation hochreguliert. Astrozyten sind der Hauptzelltyp im Gehirn und bilden über Gap Junctions ein Synzytium, in das die Neurone eingebettet sind (Dermietzel, 1998). Zudem sind sie bidirektionale Kommunikationspartner im ZNS, sie erhalten Signale von den benachbarten Neuronen und antworten auf diese mittels Freisetzung neuroaktiver Substanzen, energiereicher Substrate, trophischer Faktoren und antioxidativer Substanzen (Tsacopoulos und Magistretti, 1996; Araque et al., 1998). Sie

4. Diskussion

regulieren sowohl die Aufnahme des exzitotoxischen Neurotransmitters Glutamat und des inhibitorischen Neurotransmitters GABA aus dem synaptischen Spalt, als auch die Natrium- und Kalium-Homöostase (Hansson et al., 2000). Astrozyten enthalten auch die höchsten Mengen verschiedenster Antioxidantien im Gehirn (Peuchen et al., 1997; Wilson, 1997; Dringen et al., 2000) und unterstützen andere Zelltypen, vor allem Neurone, in der Abwehr von oxidativem Stress (Dringen et al., 2000). Da oxidativer Stress die Progression neurodegenerativer Krankheiten wie AD, PD oder amyotropher Lateralsklerose maßgeblich beeinflusst (Bains und Shaw, 1997; Schulz et al., 2000), haben Änderungen der astrozytären Funktion einen starken Einfluss auf das Überleben der Neurone und die Pathologie von neurodegenerativen Krankheiten.

4.3.8 Relevanz von Cx43 für die Pathologie neurodegenerativer Krankheiten

Ein Hauptmerkmal aller neurodegenerativen Krankheiten ist die reaktive Astrozytose, die Proliferation der Astrozyten, die durch geschädigte Neurone ausgelöst wird (Norenberg, 1994). Fehlen reaktive Astrozyten, sind nach Zellschädigung mehr Neurone vom Zelltod betroffen als unter Kontrollbedingungen (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004). Reaktive Astrozyten wurden in beiden Studien aus dem Gehirn dadurch entfernt, indem sie die Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase unter einem *Gfap*-Promotor exprimierten und mit dem antiviralen Agens Ganciclovir behandelt wurden. Hirngewebe, dem GFAP-positive Astrozyten fehlten zeigten substantielle neuronale und oligodendrozytäre Degeneration sowie Demyelinierung der Axone. Auch eine Blockade der Gap Junctions mittels 18 α -Glycyrrhetinsäure, die die Gap Junction-Kommunikation modifiziert, erhöht die neuronale Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress (Blanc et al., 1998). Dies konnte in dieser Arbeit in Neuron-Astrozyten-Co-Kulturen und in organotypischen hippocampalen Schnitten bestätigt werden. Einen Überblick über den potentiellen Einfluss der Astrozyten und des astrozytären Netzwerks auf neurodegenerative Krankheiten gibt Abb. 4.2.

Veränderungen der astrozytären Cx43-Expression und der Gap Junction-Kommunikation wurden bei Hirnpathologien neurodegenerativer Erkrankungen wie AD, HD und PD beobachtet (Rozental et al., 2000; Rouach et al., 2002). Alzheimer Patienten weisen in geschädigten Hirnarealen eine gesteigerte Immunfärbung für Cx43 in Astrozyten um amyloide Plaques und um geschädigte Neuronen auf (Nagy et al., 1996). *In vitro* Studien in PC12-Zellen zeigten, dass das Amyloid β Peptid für die höhere Cx43-Expression und eine

4. Diskussion

gesteigerte Gap Junction-Kommunikation verantwortlich ist (Lynn et al., 1995). In betroffenen Gehirnbereichen von Huntington Patienten konnte auch eine verstärkte Cx43-Expression zusammen mit einem verstärkten GFAP-Signal um betroffene Neuronen nachgewiesen werden (Vis et al., 1998), die Expression der Gap Junction-Proteine Cx26 und Cx32 blieb jedoch unverändert. In einem Ratten-Parkinson-Modell wurde auch deutlich, dass die Cx43-Expression erhöht war und die Behandlung mit dem trophen Faktor FGF-2 (fibroblast growth factor 2) zu einer weiteren Verstärkung des Cx43-Proteinniveaus führte (Rufer et al., 1996).

Die Modulation der astrozytären Cx43-Expression und der astrozytären Gap Junction-Kommunikation scheint daher relevant für die Pathologie neurodegenerativer Krankheiten zu sein und weist zudem auf die physiologische Bedeutung eines funktionalen astrozytären Synzytiums für das neuronale Zellüberleben hin.

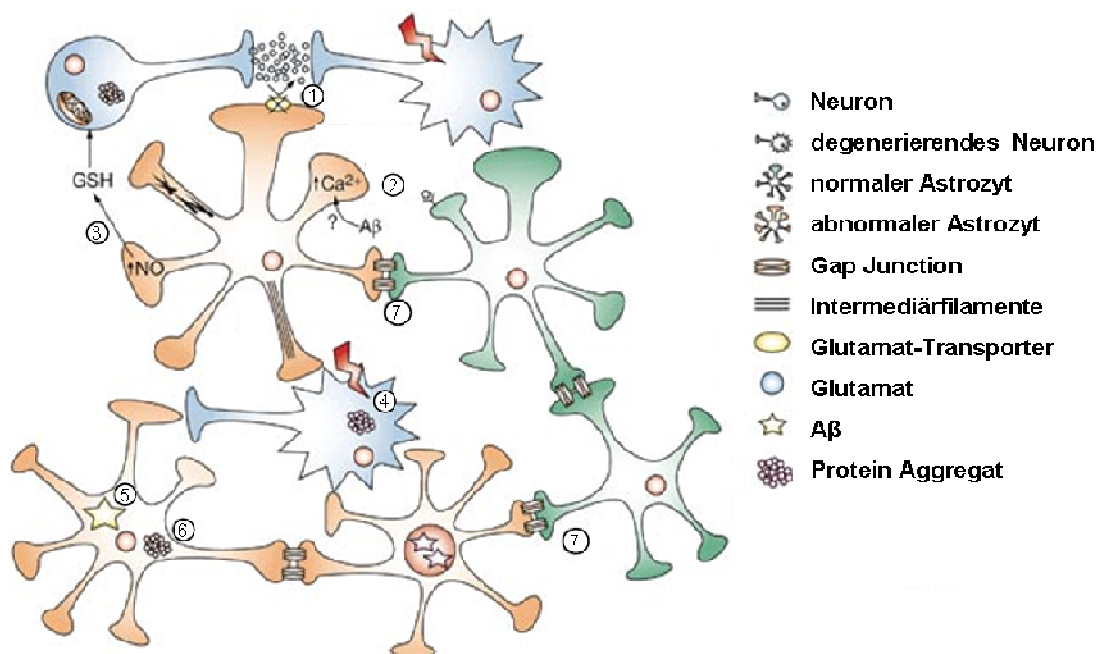


Abb. 4.2 potentieller Einfluss geschädigter Astrozyten auf neurodegenerative Krankheiten

4. Diskussion

Obwohl CRH auf zellulärer Ebene neuroprotektiv wirkt und auch das Lernen und die Merkfähigkeit positiv beeinflusst, zeigt es negative Wirkungen auf die menschliche Psyche. Ergebnisse klinischer Studien legen bereits einen kausalen Zusammenhang zwischen der CRH-Hypersekretion, die mit erhöhter HPA-Aktivität und Hypophysen-/Nebennierenrinde-Hypertrophie einhergeht, und chronischen Depressionen oder Angststörungen nahe (Owens und Nemeroff, 1993; Behan et al., 1996; Steckler und Holsboer, 1999). Deshalb wäre eine Behandlung neurodegenerativer Krankheiten durch eine Erhöhung der CRH-Konzentration nur in einem bestimmten Konzentrationsrahmen denkbar. Daher sollten weitere CRH-Zielgene erforscht werden, um spezifische neuroprotektive Signalwege und deren Komponenten zu identifizieren, die dann als Grundlage therapeutischer Maßnahmen dienen könnten. Die Identifizierung des Cx43-Proteins könnte einen solchen Ansatz liefern.

Modulation der interzellulären Kommunikation zwischen Neuron-Gliazellen sowie zwischen Glia-Gliazellen als potentiell therapeutisches Ziel

Bisher galt die klassische Ansicht, dass ZNS-Krankheiten primär „Neuro“-degenerative Erkrankungen sind, d.h. dass eine spezifische neuronale Population sehr vulnerabel gegenüber einem toxischen Einfluss, z.B. der Akkumulation eines mutanten Proteins, ist und ihre Funktion nicht mehr ausüben kann. Daher lag der Focus bei der Suche nach Therapien für neurodegenerative Krankheiten auf der Gabe von fehlenden Neurotransmittern wie dem Glutamat-Rezeptor-Antagonist für die Behandlung von AD oder Dopamin für PD. Zudem wurden viele Studien durchgeführt, um protektive Strategien zur Behandlung neuronaler Zellen zu entwickeln. Zurzeit zeigen jedoch viele Arbeiten, dass die Neurodegeneration stark von der Toxizität oder einer mutanten Proteinexpression in neuronalen wie auch in nicht-neuronalen Zellen, den Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia, in der Umgebung eines vulnerablen Neurons beeinflusst wird (zur Übersicht: Lobsiger und Cleveland, 2007). Es ist jedoch unklar, ob die Interaktion zwischen Glia-Gliazellen oder Gliazellen-Neuronen Ursache der Neurodegeneration ist oder ob sie zu ihr beiträgt. Denkbar ist, dass die Toxizität in einem betroffenen Neuron bei Gliazellen schädigende Reaktionen stimulieren kann. Auch eine Toxizität oder die Expression eines mutanten Proteins in Gliazellen könnte die normale Gliazellfunktion stören und zur Verstärkung einer bereits vorhandenen Schädigung beitragen oder sogar die Ursache einer Neurotoxizität darstellen. Co-Kulturen von primären mutanten SOD1-exprimierenden Astrozyten mit primären Motoneuronen zeigten, dass diese Astrozyten das neuronale Zellüberleben stark beeinträchtigten (Di Giorgio et al., 2007). Eine

4. Diskussion

andere Studie zeigte, dass Motorneuronen, die mutantes SOD1 in hohen Mengen exprimierten, besser überlebten, wenn sie von Wildtyp-Gliazellen umgeben waren (Clement et al., 2003). Diese Studien verdeutlichen die wichtige Rolle der Gliazellen beim Erhalt einer normalen Neuronenfunktion und in der Pathologie von neurodegenerativen Krankheiten.

Zukünftige Therapieansätze für neurodegenerative Erkrankungen sollten daher auch die wichtige Rolle der Gliazellen, speziell der Astrozyten, einbeziehen. Zudem ist es denkbar, dass bereits gängige neuroprotektive Therapeutika auch die Glia-Gliazell- oder die Neuron-Gliazell-Interaktion stärken. Ein Beispiel ist das Antibiotikum Ceftriaxon, das die astrozytäre Genexpression und die Glutamat-Transporterexpression und Funktion in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen sowie in transgenen Modellen chronischer Neurodegeneration (mutante SOD1-Mausmodelle) erhöhte (Rothstein et al., 2005). Zukünftige Forschungen zur Entwicklung von Therapien für neurodegenerative Erkrankungen sollten daher die Modulation der Interaktionen/interzellulären Kommunikation zwischen Neuron-Gliazellen sowie zwischen Glia-Gliazellen im Hinblick auf die Neuroprotektion in den Mittelpunkt stellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CRH die Expression von astrozytärem Connexin43-Protein *in vitro* und *in vivo* induziert und einen Einfluss auf die astrozytäre Gap Junction-Kommunikation nehmen kann. Die Modulation der Kommunikation des astrozytären Synzytiums zeigte einen protektiven Effekt für das neuronale Zellüberleben bei oxidativem Stress. CRH ist ein zentraler Mediator im ZNS und es sind bisher nur wenige CRH-Zielgene bekannt. Daher sollten zukünftig neben CRH-Zielgenen in Neuronen auch Zielgene in Gliazellen identifiziert werden und ihr Beitrag zur Neuroprotektion als Basis neuer Therapien neurodegenerativer Erkrankungen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) ist ein zentraler Mediator des neuroendokrinen Systems von Säugetieren und kontrolliert die physiologische Stressreaktion des Körpers. Zudem zeigten *in vitro* Daten, dass es Neuroprotektion gegenüber oxidativem Stress induzieren kann. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein neuroprotektiver Effekt des CRH *in vivo* gezeigt werden. Die Überexpression des CRH im ZNS von Mäusen konnte Nervenzellen *in vivo* vor Exzitotoxizität schützen; nach Injektion des Exzitotoxins Kainat verkürzte die CRH-Überexpression die Dauer der epileptischen Anfälle, schützte die Neurone der betroffenen Hippocampusregion vor Zelltod und verhinderte die bei Exzitotoxizität und vielen neurodegenerativen Erkrankungen auftretende Neuroinflammation. Desweiteren konnten in CRH-überexprimierenden Tieren erhöhte BDNF-Proteinspiegel nachgewiesen werden. BDNF, ein bedeutender neurotropher Faktor im ZNS, vermittelt daher teilweise die CRH-induzierte Neuroprotektion gegenüber der Exzitotoxizität *in vivo*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Connexin43, dem Haupt-Gap Junction-Protein der Astrozyten, ein neues CRH-Zielgen im ZNS identifiziert. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass CRH sowohl die Expression des Connexin43-Gens als auch den Connexin43-Proteinspiegel *in vitro* und *in vivo* erhöht. Diese Effekte werden über die Aktivierung des CRH-Rezeptor 1 und nachfolgend der PKA- und MAPK-Signalwege vermittelt. In Übereinstimmung mit der Hochregulation des Connexin43-Proteinspiegels verstärkte CRH auch die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions. Physiologisch hat diese CRH-induzierte Verstärkung der astrozytären Gap Junction-Kommunikation eine große Bedeutung für die Neuroprotektion, da eine Hochregulation der interzellulären Kommunikation schnell toxische Moleküle verdünnt, Energiesubstrate und protektive Faktoren verteilt und Ionen abpuffert. Dadurch werden Schädigungen durch oxidativen Stress in den Zellen reduziert, was über die Analyse der Proteincarbonylierung gezeigt wurde. Die Relevanz der astrozytären Gap Junction-Kommunikation für das Überleben der Neurone konnte in organotypischen hippocampalen Schnitten und in Neuron-Astrozyten-Co-Kulturen deutlich gemacht werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die Stress-induzierte Sekretion von CRH im ZNS zur verstärkten Expression neuroprotektiver Moleküle wie BDNF und Connexin43 beiträgt. Diese vermögen Neurone gegenüber toxischen Einflüssen zu schützen und zum Erhalt ihrer Funktion beizutragen. Die protektiven CRH-Effekte könnten speziell bei chronischen neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimerschen Demenz und der Parkinsonschen Krankheit hilfreich sein.

6. Literaturverzeichnis

- Adamchik Y, Frantseva MV, Weisspapir M, Carlen PL, Perez Velazquez JL (2000) Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc* 5:153-158.
- Ai Z, Fischer A, Spray DC, Brown AM, Fishman GI (2000) Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 105:161-171.
- Aldenhoff JB, Gruol DL, Rivier J, Vale W, Siggins GR (1983) Corticotropin releasing factor decreases postburst hyperpolarizations and excites hippocampal neurons. *Science* 221:875-877.
- Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM (1990) Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 5:297-306.
- Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD (1998) p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol* 143:1691-1703.
- Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ (2000) Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci* 20:4091-4098.
- Amaral MD, Pozzo-Miller L (2007) TRPC3 channels are necessary for brain-derived neurotrophic factor to activate a nonselective cationic current and to induce dendritic spine formation. *J Neurosci* 27:5179-5189.
- Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M (2003) Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res* 28:293-305.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.
- Autelitano DJ, Cohen DR (1996) CRF stimulates expression of multiple fos and jun related genes in the AtT-20 corticotroph cell. *Mol Cell Endocrinol* 119:25-35.
- Azarnia R, Reddy S, Kmiecik TE, Shalloway D, Loewenstein WR (1988) The cellular src gene product regulates junctional cell-to-cell communication. *Science* 239:398-401.
- Baigent SM (2001) Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22:809-820.
- Bailey J, Phillips RJ, Pollard AJ, Gilmore K, Robson SC, Europe-Finner GN (2002) Characterization and functional analysis of cAMP response element modulator protein and activating transcription factor 2 (ATF2) isoforms in the human myometrium during pregnancy and labor: identification of a novel ATF2 species with potent transactivation properties. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1717-1728.
- Bains JS, Shaw CA (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev* 25:335-358.
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24:410-414.
- Bale TL, Hoshijima M, Gu Y, Dalton N, Anderson KR, Lee KF, Rivier J, Chien KR, Vale WW, Peterson KL (2004) The cardiovascular physiologic actions of urocortin II: acute effects in murine heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3697-3702.
- Baram TZ, Schultz L (1995) ACTH does not control neonatal seizures induced by administration of exogenous corticotropin-releasing hormone. *Epilepsia* 36:174-178.

6. Literaturverzeichnis

- Baram TZ, Chalmers DT, Chen C, Koutsoukos Y, De Souza EB (1997) The CRF1 receptor mediates the excitatory actions of corticotropin releasing factor (CRF) in the developing rat brain: in vivo evidence using a novel, selective, non-peptide CRF receptor antagonist. *Brain Res* 770:89-95.
- Barde YA (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2:1525-1534.
- Bayatti N, Behl C (2005) The neuroprotective actions of corticotropin releasing hormone. *Ageing Res Rev* 4:258-270.
- Bayatti N, Zschocke J, Behl C (2003) Brain region-specific neuroprotective action and signaling of corticotropin-releasing hormone in primary neurons. *Endocrinology* 144:4051-4060.
- Bayatti N, Hermann H, Lutz B, Behl C (2005) Corticotropin-releasing hormone-mediated induction of intracellular signaling pathways and brain-derived neurotrophic factor expression is inhibited by the activation of the endocannabinoid system. *Endocrinology* 146:1205-1213.
- Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE (1998) Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83:629-635.
- Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A (1994) Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:689-692.
- Becquet D, Guillaumond F, Bosler O, Francois-Bellan AM (2001) Long-term variations of AP-1 composition after CRH stimulation: consequence on POMC gene regulation. *Mol Cell Endocrinol* 175:93-100.
- Behan DP, Heinrichs SC, Troncoso JC, Liu XJ, Kawas CH, Ling N, De Souza EB (1995) Displacement of corticotropin releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease [see comments]. *Nature* 378:284-287.
- Behan DP, Grigoriadis DE, Lovenberg T, Chalmers D, Heinrichs S, Liaw C, Desouza EB (1996) NEUROBIOLOGY OF CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR (CRF) RECEPTORS AND CRF-BINDING PROTEIN - IMPLICATIONS FOR THE TREATMENT OF CNS DISORDERS [Review]. *Molecular Psychiatry* 1:265-277.
- Behl C, Davis JB, Klier FG, Schubert D (1994) Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Research* 645:253-264.
- Ben-Ari Y (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375-403.
- Berger C, Schabitz WR, Wolf M, Mueller H, Sommer C, Schwab S (2004) Hypothermia and brain-derived neurotrophic factor reduce glutamate synergistically in acute stroke. *Exp Neurol* 185:305-312.
- Berthoud VM, Ledbetter ML, Hertzberg EL, Saez JC (1992) Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca²⁺. *Eur J Cell Biol* 57:40-50.
- Bissette G, Reynolds GP, Kilts CD, Widerlov E, Nemeroff CB (1985) Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in senile dementia of the Alzheimer type. Reduced cortical and striatal concentrations. *Jama* 254:3067-3069.
- Blanc EM, Bruce-Keller AJ, Mattson MP (1998) Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurochem* 70:958-970.
- Blank T, Nijholt I, Grammatopoulos DK, Randeva HS, Hillhouse EW, Spiess J (2003) Corticotropin-releasing factor receptors couple to multiple G-proteins to activate diverse intracellular signaling pathways in mouse hippocampus: role in neuronal excitability and associative learning. *J Neurosci* 23:700-707.
- Blochl A, Thoenen H (1995) Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur J Neurosci* 7:1220-1228.

6. Literaturverzeichnis

- Bloch A, Thoenen H (1996) Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 7:173-190.
- Blomstrand F, Giaume C (2006) Kinetics of endothelin-induced inhibition and glucose permeability of astrocyte gap junctions. *J Neurosci Res* 83:996-1003.
- Boekhoorn K, Joels M, Lucassen PJ (2006) Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis* 24:1-14.
- Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, Konietzka I, Lopez-Iglesias C, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Heusch G, Schulz R (2005) Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 67:234-244.
- Boulter J, Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C, Heinemann S (1990) Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science* 249:1033-1037.
- Boutillier AL, Sassone-Corsi P, Loeffler JP (1991) The protooncogene c-fos is induced by corticotropin-releasing factor and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 5:1301-1310.
- Boutillier AL, Barthel F, Roberts JL, Loeffler JP (1992) Beta-adrenergic stimulation of cFOS via protein kinase A is mediated by cAMP regulatory element binding protein (CREB)-dependent and tissue-specific CREB-independent mechanisms in corticotrope cells. *J Biol Chem* 267:23520-23526.
- Brar BK, Chen A, Perrin MH, Vale W (2004) Specificity and regulation of extracellularly regulated kinase1/2 phosphorylation through corticotropin-releasing factor (CRF) receptors 1 and 2beta by the CRF/urocortin family of peptides. *Endocrinology* 145:1718-1729.
- Brosnan CF, Scemes E, Spray DC (2001) Cytokine regulation of gap junction connectivity: an open-and-shut case or changing partners at the Nexus? *Am J Pathol* 158:1565-1569.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
- Brunson KL, Schultz L, Baram TZ (1998) The in vivo proconvulsant effects of corticotropin releasing hormone in the developing rat are independent of ionotropic glutamate receptor activation. *Brain Res Dev Brain Res* 111:119-128.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238:1-27.
- Bukauskas FF, Jordan K, Bukauskiene A, Bennett MV, Lampe PD, Laird DW, Verselis VK (2000) Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2556-2561.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297-308.
- Carlen PL, Skinner F, Zhang L, Naus C, Kushnir M, Perez Velazquez JL (2000) The role of gap junctions in seizures. *Brain Res Brain Res Rev* 32:235-241.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28:436-445.

6. Literaturverzeichnis

- Cascio M, Kumar NM, Safarik R, Gilula NB (1995) Physical characterization of gap junction membrane connexons (hemi-channels) isolated from rat liver. *J Biol Chem* 270:18643-18648.
- Chalmers DT, Lovenberg TW, Grigoriadis DE, Behan DP, De Souza EB (1996) Corticotrophin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. *Trends Pharmacol Sci* 17:166-172.
- Chanson M, Berclaz PY, Scerri I, Dudez T, Wernke-Dollries K, Pizurki L, Pavirani A, Fiedler MA, Suter S (2001) Regulation of gap junctional communication by a pro-inflammatory cytokine in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-expressing but not cystic fibrosis airway cells. *Am J Pathol* 158:1775-1784.
- Chen A, Perrin M, Brar B, Li C, Jamieson P, Digruccio M, Lewis K, Vale W (2005) Mouse corticotropin-releasing factor receptor type 2alpha gene: isolation, distribution, pharmacological characterization and regulation by stress and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 19:441-458.
- Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302:885-889.
- Chen Y, Brunson KL, Adelmann G, Bender RA, Frotscher M, Baram TZ (2004a) Hippocampal corticotropin releasing hormone: pre- and postsynaptic location and release by stress. *Neuroscience* 126:533-540.
- Chen Y, Bender RA, Brunson KL, Pomper JK, Grigoriadis DE, Wurst W, Baram TZ (2004b) Modulation of dendritic differentiation by corticotropin-releasing factor in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15782-15787.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahan AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Scienc.* 302(5642):113-7
- Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Mirone MB, Belluardo N (2003) Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells
doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02910.x. *European Journal of Neuroscience* 18:1807-1827.
- Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato Salinaro A, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F (1998) Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 10:1202-1208.
- Contreras JE, Sanchez HA, Veliz LP, Bukauskas FF, Bennett MV, Saez JC (2004) Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Res Brain Res Rev* 47:290-303.
- Cooper AJ, Kristal BS (1997) Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem* 378:793-802.
- Cooper CD, Lampe PD (2002) Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem* 277:44962-44968.
- Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P, Stenzel-Poore MP (2000) Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 24:403-409.
- Cotrina ML, Kang J, Lin JH, Bueno E, Hansen TW, He L, Liu Y, Nedergaard M (1998) Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *J Neurosci* 18:2520-2537.

6. Literaturverzeichnis

- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Crouch PJ, Harding SM, White AR, Camakaris J, Bush AI, Masters CL (2008) Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 40:181-198.
- Crow DS, Beyer EC, Paul DL, Kobe SS, Lau AF (1990) Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol Cell Biol* 10:1754-1763.
- Crowder RJ, Freeman RS (2000) Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J Biol Chem* 275:34266-34271.
- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52:1-6.
- Dang X, Doble BW, Kardami E (2003) The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem* 242:35-38.
- Dang X, Jeyaraman M, Kardami E (2006) Regulation of connexin-43-mediated growth inhibition by a phosphorylatable amino-acid is independent of gap junction-forming ability. *Mol Cell Biochem* 289:201-207.
- Dautzenberg FM, Hauger RL (2002) The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 23:71-77.
- Davis KL, Mohs RC, Marin DB, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V (1999) Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 56:981-987.
- de Feijter AW, Matesic DF, Ruch RJ, Guan X, Chang CC, Trosko JE (1996) Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epithelial cells. *Mol Carcinog* 16:203-212.
- De Groot JR, Coronel R (2004) Acute ischemia-induced gap junctional uncoupling and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 62:323-334.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.
- De Souza EB, Whitehouse PJ, Price DL, Vale WW (1987) Abnormalities in corticotropin-releasing hormone (CRH) in Alzheimer's disease and other human disorders. *Ann N Y Acad Sci* 512:237-247.
- De Souza EB, Whitehouse PJ, Kuhar MJ, Price DL, Vale WW (1986) Reciprocal changes in corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity and CRF receptors in cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Nature* 319:593-595.
- Dermietzel R (1998) Diversification of gap junction proteins (connexins) in the central nervous system and the concept of functional compartments. *Cell Biol Int* 22:719-730.
- Dermietzel R, Hertberg EL, Kessler JA, Spray DC (1991) Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11:1421-1432.
- Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M, Bennett MV, Spray DC (2000) Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev* 32:45-56.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K (2007) Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608-614.
- Doble A (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81:163-221.

6. Literaturverzeichnis

- Dong M, Wu Y, Fan Y, Xu M, Zhang J (2006) c-fos modulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampal CA3 and dentate gyrus neurons. *Neurosci Lett* 400:177-180.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912-4916.
- Dugich-Djordjevic MM, Tocco G, Willoughby DA, Najm I, Pasinetti G, Thompson RF, Baudry M, Lapchak PA, Hefti F (1992) BDNF mRNA expression in the developing rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neuron* 8:1127-1138.
- Echetebeu CO, Ali M, Izban MG, MacKay L, Garfield RE (1999) Localization of regulatory protein binding sites in the proximal region of human myometrial connexin 43 gene. *Mol Hum Reprod* 5:757-766.
- Ehlers CL, Henriksen SJ, Wang M, Rivier J, Vale W, Bloom FE (1983) Corticotropin releasing factor produces increases in brain excitability and convulsive seizures in rats. *Brain Res* 278:332-336.
- Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, Lampe PD, Burt JM (2006) Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circ Res* 98:1498-1505.
- Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448:901-907.
- Elliott-Hunt CR, Kazlauskaitė J, Wilde GJ, Grammatopoulos DK, Hillhouse EW (2002) Potential signalling pathways underlying corticotrophin-releasing hormone-mediated neuroprotection from excitotoxicity in rat hippocampus. *J Neurochem* 80:416-425.
- England K, O'Driscoll C, Cotter TG (2004) Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death Differ* 11:252-260.
- English JD, Sweatt JD (1997) A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 272:19103-19106.
- Ernfors P, Merlio JP, Persson H (1992) Cells Expressing mRNA for Neurotrophins and their Receptors During Embryonic Rat Development. *Eur J Neurosci* 4:1140-1158.
- Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Persson H, Lindvall O (1991) Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 7:165-176.
- Eugenin EA, Eckardt D, Theis M, Willecke K, Bennett MV, Saez JC (2001) Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4190-4195.
- Facci L, Stevens DA, Pangallo M, Franceschini D, Skaper SD, Strijbos PJ (2003) Corticotropin-releasing factor (CRF) and related peptides confer neuroprotection via type 1 CRF receptors. *Neuropharmacology* 45:623-636.
- Falk MM, Buehler LK, Kumar NM, Gilula NB (1997) Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *Embo J* 16:2703-2716.
- Fallon RF, Goodenough DA (1981) Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol* 90:521-526.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.
- Forge A, Marziano NK, Casalotti SO, Becker DL, Jagger D (2003) The inner ear contains heteromeric channels composed of cx26 and cx30 and deafness-related mutations in cx26 have a dominant negative effect on cx30. *Cell Commun Adhes* 10:341-346.

6. Literaturverzeichnis

- Forman MS, Lal D, Zhang B, Dabir DV, Swanson E, Lee VM, Trojanowski JQ (2005) Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. *J Neurosci* 25:3539-3550.
- Fox MW, Anderson RE, Meyer FB (1993) Neuroprotection by corticotropin releasing factor during hypoxia in rat brain. *Stroke* 24:1072-1075.
- Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI (2007) The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem* 113:234-258.
- Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN (1993) The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 53:5274-5283.
- Frisch C, De Souza-Silva MA, Sohl G, Guldenagel M, Willecke K, Huston JP, Dere E (2005) Stimulus complexity dependent memory impairment and changes in motor performance after deletion of the neuronal gap junction protein connexin36 in mice. *Behav Brain Res* 157:177-185.
- Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC (2004) CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 279:36943-36950.
- Fukuda T (2007) Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex. *Neuroscientist* 13:199-207.
- Fukuda T, Kosaka T (2003) Ultrastructural study of gap junctions between dendrites of parvalbumin-containing GABAergic neurons in various neocortical areas of the adult rat. *Neuroscience* 120:5-20.
- Fukuda T, Takahashi K, Suzuki T, Saruta M, Watanabe M, Nakata T, Sasano H (2005) Urocortin 1, urocortin 3/stresscopin, and corticotropin-releasing factor receptors in human adrenal and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4671-4678.
- Fushiki S, Perez Velazquez JL, Zhang L, Bechberger JF, Carlen PL, Naus CC (2003) Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:304-314.
- Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY, Ellisman MH (2002) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296:503-507.
- Gao Y, Spray DC (1998) Structural changes in lenses of mice lacking the gap junction protein connexin43. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1198-1209.
- Geimonen E, Jiang W, Ali M, Fishman GI, Garfield RE, Andersen J (1996) Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J Biol Chem* 271:23667-23674.
- Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M, Traub O, Willecke K, Perbal B, Lye SJ, Winterhager E (2004) Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 279:36931-36942.
- Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263:1618-1623.
- Giaume C, McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19:319-325.
- Giaume C, Fromaget C, el Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D (1991) Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6:133-143.
- Giepmans BN (2006) Role of connexin43-interacting proteins at gap junctions. *Adv Cardiol* 42:41-56.

6. Literaturverzeichnis

- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65:475-502.
- Grammatopoulos D, Stirrat GM, Williams SA, Hillhouse EW (1996) The biological activity of the corticotropin-releasing hormone receptor-adenylate cyclase complex in human myometrium is reduced at the end of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81:745-751.
- Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine MA, Katsanou ES, Hillhouse EW (2000) Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1alpha and R2beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *Mol Endocrinol* 14:2076-2091.
- Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine MA, Kanellopoulou KA, Hillhouse EW (2001) Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J Neurochem* 76:509-519.
- Grammatopoulos DK, Dai Y, Randeve HS, Levine MA, Karteris E, Easton AJ, Hillhouse EW (1999) A novel spliced variant of the type 1 corticotropin-releasing hormone receptor with a deletion in the seventh transmembrane domain present in the human pregnant term myometrium and fetal membranes. *Mol Endocrinol* 13:2189-2202.
- Gravanis A, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Margioris AN (2001) Endometrial and myometrial corticotropin-releasing hormone (CRH): its regulation and possible roles. *Peptides* 22:785-793.
- Graziani G, Tentori L, Muzi A, Vergati M, Tringali G, Pozzoli G, Navarra P Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRH-R1 receptor subtype. *Molecular and Cellular Endocrinology* In Press, Corrected Proof.
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623.
- Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Ronnback L (2000) Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int* 37:317-329.
- Haughey NJ, Mattson MP (2003) Alzheimer's amyloid beta-peptide enhances ATP/gap junction-mediated calcium-wave propagation in astrocytes. *Neuromolecular Med* 3:173-180.
- Heimrich B, Frotscher M (1993) Slice cultures as a model to study entorhinal-hippocampal interaction. *Hippocampus* 3 Spec No:11-17.
- Hennigan A, O'Callaghan RM, Kelly AM (2007) Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem Soc Trans* 35:424-427.
- Herve JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D (2004) Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochim Biophys Acta* 1662:22-41.
- Hillhouse EW, Grammatopoulos DK (2006) The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27:260-286.
- Hollmann M, Boulter J, Maron C, Heinemann S (1994) Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. *Ren Physiol Biochem* 17:182-183.
- Holsboer F (1999) The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J Psychiatr Res* 33:181-214.
- Holsboer F (2003) The role of peptides in treatment of psychiatric disorders. *J Neural Transm Suppl*:17-34.

6. Literaturverzeichnis

- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Sohl G, Schubert T, Bussow H, Ott T, Weiler R, Willecke K (2004) Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 19:2633-2640.
- Huang RP, Fan Y, Hossain MZ, Peng A, Zeng ZL, Boynton AL (1998) Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res* 58:5089-5096.
- Huang RP, Hossain MZ, Huang R, Gano J, Fan Y, Boynton AL (2001) Connexin 43 (cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Int J Cancer* 92:130-138.
- Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM (1991) BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350:230-232.
- Iacobas DA, Scemes E, Spray DC (2004) Gene expression alterations in connexin null mice extend beyond the gap junction. *Neurochem Int* 45:243-250.
- Iacobas DA, Iacobas S, Spray DC (2007) Connexin43 and the brain transcriptome of newborn mice. *Genomics* 89:113-123.
- Kadle R, Zhang JT, Nicholson BJ (1991) Tissue-specific distribution of differentially phosphorylated forms of Cx43. *Mol Cell Biol* 11:363-369.
- Kanagaratnam P, Peters NS (2004) Conduction, gap junctions, and atrial fibrillation: an eternal triangle? *Heart Rhythm* 1:746-749.
- Kanemitsu MY, Loo LW, Simon S, Lau AF, Eckhart W (1997) Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions. *J Biol Chem* 272:22824-22831.
- Kanner AM (2007) Epilepsy and mood disorders. *Epilepsia* 48 Suppl 9:20-22.
- Kardami E, Dang X, Iacobas DA, Nickel BE, Jeyaraman M, Srisakuldee W, Makazan J, Tanguy S, Spray DC (2007) The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog Biophys Mol Biol* 94:245-264.
- Karteris E, Papadopoulou N, Grammatopoulos DK, Hillhouse EW (2004) Expression and signalling characteristics of the corticotrophin-releasing hormone receptors during the implantation phase in the human endometrium. *J Mol Endocrinol* 32:21-32.
- Kaur P, Jodhka PK, Underwood WA, Bowles CA, de Fiebre NC, de Fiebre CM, Singh M (2007) Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants. *J Neurosci Res* 85:2441-2449.
- Kawasaki Y, Tsuchida A, Sasaki T, Yamasaki S, Kuwada Y, Murakami M, Chayama K (2002) Irsogladine malate up-regulates gap junctional intercellular communication between pancreatic cancer cells via PKA pathway. *Pancreas* 25:373-377.
- Khaspekov LG, Brenz Verca MS, Frumkina LE, Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2004) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 19:1691-1698.
- Kiang JG (1997) Corticotropin-releasing factor-like peptides increase cytosolic [Ca²⁺] in human epidermoid A-431 cells. *Eur J Pharmacol* 329:237-244.
- Kirchhoff F, Dringen R, Giaume C (2001) Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251:159-169.
- Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Hermanson O, Rosenfeld MG, Spiess J (2000) Deletion of crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 24:415-419.

6. Literaturverzeichnis

- Kokaia Z, Nawa H, Uchino H, Elmer E, Kokaia M, Carnahan J, Smith ML, Siesjo BK, Lindvall O (1996) Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels following transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 38:139-144.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8856-8860.
- Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E (2002) Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* 16:1638-1651.
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.
- Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Ishii K, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H (2005) Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther* 11:96-104.
- Kuryshv YA, Childs GV, Ritchie AK (1995) Corticotropin-releasing hormone stimulation of Ca²⁺ entry in corticotropes is partially dependent on protein kinase A. *Endocrinology* 136:3925-3935.
- Kvamme E, Roberg B, Torgner IA (2000) Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain. *Neurochem Res* 25:1407-1419.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laird DW (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim Biophys Acta* 1711:172-182.
- Laird DW (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394:527-543.
- Laird DW, Puranam KL, Revel JP (1991) Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* 273(Pt 1):67-72.
- Lampe PD, Lau AF (2004) The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1171-1186.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF (2000) Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* 149:1503-1512.
- Larmet Y, Reibel S, Carnahan J, Nawa H, Marescaux C, Depaulis A (1995) Protective effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of hippocampal kindling in the rat. *Neuroreport* 6:1937-1941.
- Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, Lindvall O (1999) Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1220-1228.
- Lauf U, Giepmans BN, Lopez P, Braconnot S, Chen SC, Falk MM (2002) Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10446-10451.
- Lee EH, Hung HC, Lu KT, Chen WH, Chen HY (1992) Protein synthesis in the hippocampus associated with memory facilitation by corticotropin-releasing factor in rats. *Peptides* 13:927-937.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-1948.

6. Literaturverzeichnis

- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW (2001) Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7570-7575.
- Lezoualc'h F, Engert S, Berning B, Behl C (2000) Corticotropin-releasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increased release of non-amyloidogenic amyloid beta precursor protein and with the suppression of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 14:147-159.
- Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW (2002) Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression. *J Neurosci* 22:991-1001.
- Li WE, Nagy JI (2000) Connexin43 phosphorylation state and intercellular communication in cultured astrocytes following hypoxia and protein phosphatase inhibition. *Eur J Neurosci* 12:2644-2650.
- Lin JH, Yang J, Liu S, Takano T, Wang X, Gao Q, Willecke K, Nedergaard M (2003) Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. *J Neurosci* 23:430-441.
- Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, Hansen TW, Goldman S, Nedergaard M (1998) Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1:494-500.
- Lin R, Warn-Cramer BJ, Kurata WE, Lau AF (2001) v-Src-mediated phosphorylation of connexin43 on tyrosine disrupts gap junctional communication in mammalian cells. *Cell Commun Adhes* 8:265-269.
- Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP, Thoenen H (1993) Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 5:1455-1464.
- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M (1994) Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 17:490-496.
- Liu H, Cao Y, Basbaum AI, Mazarati AM, Sankar R, Wasterlain CG (1999) Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12096-12101.
- Lobsiger CS, Cleveland DW (2007) Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci* 10:1355-1360.
- Loewenstein WR (1988) Genetic regulation of cell-to-cell communication. *Braz J Med Biol Res* 21:1213-1223.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.
- Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* 34:371-385.
- Loo LW, Kanemitsu MY, Lau AF (1999) In vivo association of pp60v-src and the gap-junction protein connexin 43 in v-src-transformed fibroblasts. *Mol Carcinog* 25:187-195.
- Lovejoy DA, Aubry JM, Turnbull A, Sutton S, Potter E, Yehling J, Rivier C, Vale WW (1998) Ectopic expression of the CRF-binding protein: minor impact on HPA axis regulation but induction of sexually dimorphic weight gain. *J Neuroendocrinol* 10:483-491.
- Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB (1995a) CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 136:4139-4142.

6. Literaturverzeichnis

- Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T (1995b) Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:836-840.
- Lu A, Steiner MA, Whittle N, Vogl AM, Walser SM, Ableitner M, Refojo D, Ekker M, Rubenstein JL, Stalla GK, Singewald N, Holsboer F, Wotjak CT, Wurst W, Deussing JM (2008) Conditional mouse mutants highlight mechanisms of corticotropin-releasing hormone effects on stress-coping behavior. *Mol Psychiatry*.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6:603-614.
- Lynn BD, Marotta CA, Nagy JI (1995) Propagation of intercellular calcium waves in PC12 cells overexpressing a carboxy-terminal fragment of amyloid precursor protein. *Neurosci Lett* 199:21-24.
- Magistretti PJ, Pellerin L (1999) Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci* 14:177-182.
- Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP (2001) Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol* 2:1018-1024.
- Malagoli D, Franchini A, Ottaviani E (2000) Synergistic role of cAMP and IP(3) in corticotropin-releasing hormone-induced cell shape changes in invertebrate immunocytes. *Peptides* 21:175-182.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:679-689.
- Maragakis NJ, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD (2004) Altered expression of the glutamate transporter EAAT2b in neurological disease. *Ann Neurol* 55:469-477.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA (2008) Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci* 11:131-133.
- Maxeiner S, Kruger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K (2003) Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience* 119:689-700.
- Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Ammermuller J, Brune H, Kirsch T, Pieper M, Degen J, Kruger O, Willecke K, Weiler R (2005) Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the rod/cone signaling pathway between AII amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *J Neurosci* 25:566-576.
- McEvoy AN, Bresnihan B, Fitzgerald O, Murphy EP (2002) Corticotropin-releasing hormone signaling in synovial tissue vascular endothelium is mediated through the cAMP/CREB pathway. *Ann N Y Acad Sci* 966:119-130.
- McNutt NS, Weinstein RS (1970) The ultrastructure of the nexus. A correlated thin-section and freeze-cleave study. *J Cell Biol* 47:666-688.
- Medina JM, Giaume C, Tabernero A (1999) Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis. *Adv Exp Med Biol* 468:361-371.
- Meme W, Calvo CF, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, Giaume C (2006) Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *Faseb J* 20:494-496.
- Menendez M (2005) Down syndrome, Alzheimer's disease and seizures. *Brain Dev* 27:246-252.
- Millan MA, Samra AB, Wynn PC, Catt KJ, Aguilera G (1987) Receptors and actions of corticotropin-releasing hormone in the primate pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1036-1041.

6. Literaturverzeichnis

- Mitchell JA, Lye SJ (2005) Differential activation of the connexin 43 promoter by dimers of activator protein-1 transcription factors in myometrial cells. *Endocrinology* 146:2048-2054.
- Miyata M, Okada D, Hashimoto K, Kano M, Ito M (1999) Corticotropin-releasing factor plays a permissive role in cerebellar long-term depression. *Neuron* 22:763-775.
- Moorby C, Patel M (2001) Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* 271:238-248.
- Moosmann B, Behl C (2002) Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 11:1407-1435.
- Moreno AP (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating. *Biochim Biophys Acta* 1711:164-171.
- Morse JK, Wiegand SJ, Anderson K, You Y, Cai N, Carnahan J, Miller J, DiStefano PS, Altar CA, Lindsay RM, et al. (1993) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents the degeneration of medial septal cholinergic neurons following fimbria transection. *J Neurosci* 13:4146-4156.
- Mouradian MM, Farah JM, Jr., Mohr E, Fabbrini G, O'Donohue TL, Chase TN (1986) Spinal fluid CRF reduction in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 8:393-400.
- Musil LS, Goodenough DA (1991) Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 115:1357-1374.
- Musil LS, Goodenough DA (1993) Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74:1065-1077.
- Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA (1990) Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* 111:2077-2088.
- Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM (2000) Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem* 275:25207-25215.
- Nadler JV, Perry BW, Cotman CW (1978) Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 271:676-677.
- Nagy JI, Rash JE (2000) Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 32:29-44.
- Nagy JI, Hossain MZ, Hertzberg EL, Marotta CA (1996) Induction of connexin43 and gap junctional communication in PC12 cells overexpressing the carboxy terminal region of amyloid precursor protein. *J Neurosci Res* 44:124-132.
- Nagy JI, Patel D, Ochalski PA, Stelmack GL (1999) Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88:447-468.
- Nakase T, Fushiki S, Naus CC (2003) Astrocytic gap junctions composed of connexin 43 reduce apoptotic neuronal damage in cerebral ischemia. *Stroke* 34:1987-1993.
- Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J (2005) Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434:83-88.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9:65-75.
- Norenberg MD (1994) Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:213-220.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161:303-310.

6. Literaturverzeichnis

- Ochalski PA, Sawchuk MA, Hertzberg EL, Nagy JI (1995) Astrocytic gap junction removal, connexin43 redistribution, and epitope masking at excitatory amino acid lesion sites in rat brain. *Glia* 14:279-294.
- Oguro K, Jover T, Tanaka H, Lin Y, Kojima T, Oguro N, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS (2001) Global ischemia-induced increases in the gap junctional proteins connexin 32 (Cx32) and Cx36 in hippocampus and enhanced vulnerability of Cx32 knock-out mice. *J Neurosci* 21:7534-7542.
- Owens MJ, Nemeroff CB (1993) The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. *Ciba Found Symp* 172:296-308; discussion 308-216.
- Ozog MA, Siushansian R, Naus CC (2002) Blocked gap junctional coupling increases glutamate-induced neurotoxicity in neuron-astrocyte co-cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:132-141.
- Pakhotin P, Verkhratsky A (2005) Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci* 28:79-84.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11:272-280.
- Paul DL (1986) Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol* 103:123-134.
- Pavlov EP, Harman SM, Chrousos GP, Loriaux DL, Blackman MR (1986) Responses of plasma adrenocorticotropin, cortisol, and dehydroepiandrosterone to ovine corticotropin-releasing hormone in healthy aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 62:767-772.
- Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW (2003) Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 72:408-418.
- Pedersen WA, Wan R, Zhang P, Mattson MP (2002) Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I. *J Neurosci* 22:404-412.
- Pedersen WA, McCullers D, Culmsee C, Haughey NJ, Herman JP, Mattson MP (2001) Corticotropin-releasing hormone protects neurons against insults relevant to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8:492-503.
- Pellerin L, Magistretti PJ (2004) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* 10:53-62.
- Perez Velazquez JL, Frantseva MV, Naus CC (2003) Gap junctions and neuronal injury: protectants or executioners? *Neuroscientist* 9:5-9.
- Peuchen S, Bolanos JP, Heales SJ, Almeida A, Duchen MR, Clark JB (1997) Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog Neurobiol* 52:261-281.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36.
- Piehl M, Lehmann C, Gumpert A, Denizot JP, Segretain D, Falk MM (2007) Internalization of large double-membrane intercellular vesicles by a clathrin-dependent endocytic process. *Mol Biol Cell* 18:337-347.
- Pomara N, Singh RR, Deptula D, LeWitt PA, Bissette G, Stanley M, Nemeroff CB (1989) CSF corticotropin-releasing factor (CRF) in Alzheimer's disease: its relationship to severity of dementia and monoamine metabolites. *Biological Psychiatry* 26:500-504.

6. Literaturverzeichnis

- Powers RE, Walker LC, Desouza EB, Vale WW, Struble RG, Whitehouse PJ, Price DL (1987) Immunohistochemical study of neurons containing corticotropin-releasing factor in Alzheimer's disease. *Synapse* 1:405-410.
- Qin H, Shao Q, Igdoura SA, Alaoui-Jamali MA, Laird DW (2003) Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J Biol Chem* 278:30005-30014.
- Raadshcer FC, van Heerikhuize JJ, Lucassen PJ, Hoogendijk WJ, Tilders FJ, Swaab DF (1995) Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. *Am J Psychiatry* 152:1372-1376.
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281-294.
- Radulovic J, Ruhmann A, Liepold T, Spiess J (1999) Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J Neurosci* 19:5016-5025.
- Radulovic M, Hippel C, Spiess J (2003) Corticotropin-releasing factor (CRF) rapidly suppresses apoptosis by acting upstream of the activation of caspases. *J Neurochem* 84:1074-1085.
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284:805-808.
- Ramachandran S, Xie LH, John SA, Subramaniam S, Lal R (2007) A novel role for connexin hemichannel in oxidative stress and smoking-induced cell injury. *PLoS ONE* 2:e712.
- Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI (2001) Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci* 21:1983-2000.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267:1831-1834.
- Reibel S, Larmet Y, Le BT, Carnahan J, Marescaux C, Depaulis A (2000) Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat. *Neuroscience* 100:777-788.
- Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE (2001) Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2843-2848.
- Richard D, Huang Q, Timofeeva E (2000) The corticotropin-releasing hormone system in the regulation of energy balance in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S36-39.
- Rivier C, Rivier J, Vale W (1982) Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. *Science* 218:377-379.
- Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Lopez D, Torre I, Morente M, Abellan A, Miro E, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D (2007) The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Prog Biophys Mol Biol* 94:219-232.
- Rossant CJ, Pinnock RD, Hughes J, Hall MD, McNulty S (1999) Corticotropin-releasing factor type 1 and type 2alpha receptors regulate phosphorylation of calcium/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 140:1525-1536.

6. Literaturverzeichnis

- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77.
- Rouach N, Glowinski J, Giaume C (2000) Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol* 149:1513-1526.
- Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C (2002) Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94:457-475.
- Rouach N, Pebay A, Meme W, Cordier J, Ezan P, Etienne E, Giaume C, Tence M (2006) S1P inhibits gap junctions in astrocytes: involvement of G and Rho GTPase/ROCK. *Eur J Neurosci* 23:1453-1464.
- Rozental R, Campos de Carvalho AC, Spray DC (2000) Nervous system diseases involving gap junctions. *Brain Res Brain Res Rev* 32:189-191.
- Rudge JS, Mather PE, Pasnikowski EM, Cai N, Corcoran T, Acheson A, Anderson K, Lindsay RM, Wiegand SJ (1998) Endogenous BDNF protein is increased in adult rat hippocampus after a kainic acid induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective. *Exp Neurol* 149:398-410.
- Rufer M, Wirth SB, Hofer A, Dermietzel R, Pastor A, Kettenmann H, Unsicker K (1996) Regulation of connexin-43, GFAP, and FGF-2 is not accompanied by changes in astroglial coupling in MPTP-lesioned, FGF-2-treated parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 46:606-617.
- Ryu H, Lee J, Zaman K, Kubilis J, Ferrante RJ, Ross BD, Neve R, Ratan RR (2003) Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons. *J Neurosci* 23:3597-3606.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359-1400.
- Saffitz JE, Kleber AG (2004) Effects of mechanical forces and mediators of hypertrophy on remodeling of gap junctions in the heart. *Circ Res* 94:585-591.
- Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K (1986) Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res* 382:213-238.
- Salvi M, Fiore C, Battaglia V, Palermo M, Armanini D, Toninello A (2005) Carbenoxolone induces oxidative stress in liver mitochondria, which is responsible for transition pore opening. *Endocrinology* 146:2306-2312.
- Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2003) Mitogen-activated protein kinase signaling in the hippocampus and its modulation by corticotropin-releasing factor receptor 2: a possible link between stress and fear memory. *J Neurosci* 23:11436-11443.
- Sasaki A, Tempst P, Liotta AS, Margioris AN, Hood LE, Kent SB, Sato S, Shinkawa O, Yoshinaga K, Krieger DT (1988) Isolation and characterization of a corticotropin-releasing hormone-like peptide from human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 67:768-773.
- Sathanoori M, Dias BG, Nair AR, Banerjee SB, Tole S, Vaidya VA (2004) Differential regulation of multiple brain-derived neurotrophic factor transcripts in the postnatal and adult rat hippocampus during development, and in response to kainate administration. *Brain Res Mol Brain Res* 130:170-177.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA (2008) Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21:172-188.

6. Literaturverzeichnis

- Scharfman HE (1991) Dentate hilar cells with dendrites in the molecular layer have lower thresholds for synaptic activation by perforant path than granule cells. *J Neurosci* 11:1660-1673.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4904-4911.
- Schurr A, Miller JJ, Payne RS, Rigor BM (1999) An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *J Neurosci* 19:34-39.
- Segretain D, Falk MM (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662:3-21.
- Severs NJ, Copen SR, Dupont E, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T (2004) Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res* 62:368-377.
- Shaulian E, Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4:E131-136.
- Shimohama S, Tamura Y, Akaike A, Tsukahara T, Ohara O, Watanabe S, Kimura J (1993) Brain-derived neurotrophic factor pretreatment exerts a partially protective effect against glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Neurosci Lett* 164:55-58.
- Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ (2005) Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol* 171:1001-1012.
- Sies, H (1986) *Biochemistry of Oxidative Stress*. *Angew Chem*. 98: 1061-1076.
- Simon AM, Goodenough DA (1998) Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* 8:477-483.
- Siushansian R, Bechberger JF, Cechetto DF, Hachinski VC, Naus CC (2001) Connexin43 null mutation increases infarct size after stroke. *J Comp Neurol* 440:387-394.
- Skelton KH, Owens MJ, Nemeroff CB (2000) The neurobiology of urocortin. *Regul Pept* 93:85-92.
- Skibo GG, Nikonenko IR, Savchenko VL, McKanna JA (2000) Microglia in organotypic hippocampal slice culture and effects of hypoxia: ultrastructure and lipocortin-1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96:427-438.
- Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, Wei ET (2001) Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *Faseb J* 15:1678-1693.
- Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W, Lee KF (1998) Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20:1093-1102.
- Sohl G, Willecke K (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10:173-180.
- Sohl G, Willecke K (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62:228-232.
- Sohl G, Maxeiner S, Willecke K (2005) Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6:191-200.
- Sohl G, Degen J, Teubner B, Willecke K (1998) The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett* 428:27-31.
- Solan JL, Lampe PD (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta* 1711:154-163.
- Solan JL, Lampe PD (2007) Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membr Biol* 217:35-41.

6. Literaturverzeichnis

- Somekawa S, Fukuhara S, Nakaoka Y, Fujita H, Saito Y, Mochizuki N (2005) Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ Res* 97:655-662.
- Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, Basso AM, Rivier J, Vale W, Koob GF (1996) Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* 273:1561-1564.
- Spray DC, Ye ZC, Ransom BR (2006) Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* 54:758-773.
- Stagg RB, Fletcher WH (1990) The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation. *Endocr Rev* 11:302-325.
- Steckler T, Holsboer F (1999) Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol Psychiatry* 46:1480-1508.
- Stein-Behrens BA, Lin WJ, Sapolsky RM (1994) Physiological elevations of glucocorticoids potentiate glutamate accumulation in the hippocampus. *J Neurochem* 63:596-602.
- Stein-Behrens BA, Elliott EM, Miller CA, Schilling JW, Newcombe R, Sapolsky RM (1992) Glucocorticoids exacerbate kainic acid-induced extracellular accumulation of excitatory amino acids in the rat hippocampus. *J Neurochem* 58:1730-1735.
- Steinberg TH (1998) Gap junction function: the messenger and the message. *Am J Pathol* 152:851-854.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- Suda T, Iwashita M, Tozawa F, Ushiyama T, Tomori N, Sumitomo T, Nakagami Y, Demura H, Shizume K (1988) Characterization of corticotropin-releasing hormone binding protein in human plasma by chemical cross-linking and its binding during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1278-1283.
- Sutor B, Schmolke C, Teubner B, Schirmer C, Willecke K (2000) Myelination defects and neuronal hyperexcitability in the neocortex of connexin 32-deficient mice. *Cereb Cortex* 10:684-697.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ (2005) The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 4:141-194.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36:165-186.
- Taberner A, Medina JM, Giaume C (2006) Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *J Neurochem* 99:1049-1061.
- Takahashi M, Hayashi S, Kakita A, Wakabayashi K, Fukuda M, Kameyama S, Tanaka R, Takahashi H, Nawa H (1999) Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res* 818:579-582.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen Z-Y, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005) ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75NTR and Sortilin 10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005. *J Neurosci* 25:5455-5463.
- Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270:593-598.
- Thomas T, Jordan K, Laird DW (2001) Role of cytoskeletal elements in the recruitment of Cx43-GFP and Cx26-YFP into gap junctions. *Cell Commun Adhes* 8:231-236.
- Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 19:162-166.

6. Literaturverzeichnis

- Trotter J, Bitter-Suermann D, Schachner M (1989) Differentiation-regulated loss of the polysialylated embryonic form and expression of the different polypeptides of the neural cell adhesion molecule by cultured oligodendrocytes and myelin. *J Neurosci Res* 22:369-383.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-885.
- Tsukahara T, Yonekawa Y, Tanaka K, Ohara O, Wantanabe S, Kimura T, Nishijima T, Taniguchi T (1994) The role of brain-derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurosurgery* 34:323-331; discussion 331.
- Tully T, Bourtchouladze R, Scott R, Tallman J (2003) Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nat Rev Drug Discov* 2:267-277.
- Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ, Greene AE (1970) Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res* 30:2110-2118.
- Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M (1999) Expression, two-dimensional crystallization, and electron cryo-crystallography of recombinant gap junction membrane channels. *J Struct Biol* 128:98-105.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-1397.
- Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Potapova IA, Valiuniene L, Doronin S, Mathias RT, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, Brink PR (2005) Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol* 568:459-468.
- Valko M, Morris H, Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12:1161-1208.
- Van Damme P, Dewil M, Robberecht W, Van Den Bosch L (2005) Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2:147-159.
- Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 428:191-212.
- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al. (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378:287-292.
- Venance L, Rozov A, Blatow M, Burnashev N, Feldmeyer D, Monyer H (2000) Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10260-10265.
- Vis JC, Nicholson LF, Faull RL, Evans WH, Severs NJ, Green CR (1998) Connexin expression in Huntington's diseased human brain. *Cell Biol Int* 22:837-847.
- Vornov JJ, Park J, Thomas AG (1998) Regional vulnerability to endogenous and exogenous oxidative stress in organotypic hippocampal culture. *Exp Neurol* 149:109-122.
- Wang HL, Tsai LY, Lee EH (2000) Corticotropin-releasing factor produces a protein synthesis--dependent long-lasting potentiation in dentate gyrus neurons. *J Neurophysiol* 83:343-349.
- Wang HL, Wayner MJ, Chai CY, Lee EH (1998) Corticotrophin-releasing factor produces a long-lasting enhancement of synaptic efficacy in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 10:3428-3437.
- Wang MJ, Lin SZ, Kuo JS, Huang HY, Tzeng SF, Liao CH, Chen DC, Chen WF (2007) Urocortin modulates inflammatory response and neurotoxicity induced by microglial activation. *J Immunol* 179:6204-6214.
- Warn-Cramer BJ, Lampe PD, Kurata WE, Kanemitsu MY, Loo LW, Eckhart W, Lau AF (1996) Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *J Biol Chem* 271:3779-3786.

6. Literaturverzeichnis

- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD (2001) Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8:933-941.
- Whitehouse PJ, Vale WW, Zweig RM, Singer HS, Mayeux R, Kuhar MJ, Price DL, De Souza EB (1987) Reductions in corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in cerebral cortex in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and progressive supranuclear palsy. *Neurology* 37:905-909.
- Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R (1997) Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* 21:22-34.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383:725-737.
- Wilson JX (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1149-1163.
- Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B (1991) Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun* 180:1528.
- Witan H, Kern A, Koziollek-Drechsler I, Wade R, Behl C, Clement AM (2008) Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. *Hum Mol Genet* 17:1373-1385.
- Wolburg H, Rohlmann A (1995) Structure--function relationships in gap junctions. *Int Rev Cytol* 157:315-373.
- Woods RJ, Kennedy KM, Gibbins JM, Behan D, Vale W, Lowry PJ (1994) Corticotropin-releasing factor binding protein dimerizes after association with ligand. *Endocrinology* 135:768-773.
- Wu D, Pardridge WM (1999) Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:254-259.
- Wu X, Shen H, Yu L, Peng M, Lai WS, Ding YL (2007) Corticotropin-releasing hormone activates connexin 43 via activator protein-1 transcription factor in human myometrial smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1789-1794.
- Yan XX, Toth Z, Schultz L, Ribak CE, Baram TZ (1998) Corticotropin-releasing hormone (CRH)-containing neurons in the immature rat hippocampal formation: light and electron microscopic features and colocalization with glutamate decarboxylase and parvalbumin. *Hippocampus* 8:231-243.
- Yasui K, Kada K, Hojo M, Lee JK, Kamiya K, Toyama J, Opthof T, Kodama I (2000) Cell-to-cell interaction prevents cell death in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 48:68-76.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Zhang F, Cheng J, Lam G, Jin DK, Vincent L, Hackett NR, Wang S, Young LM, Hempstead B, Crystal RG, Rafii S (2005) Adenovirus vector E4 gene regulates connexin 40 and 43 expression in endothelial cells via PKA and PI3K signal pathways. *Circ Res* 96:950-957.
- Zobel AW, Nickel T, Kunzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, Holsboer F (2000) Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J Psychiatr Res* 34:171-181.
- Zundorf G, Kahlert S, Reiser G (2007) Gap-junction blocker carbenoxolone differentially enhances NMDA-induced cell death in hippocampal neurons and astrocytes in co-culture. *J Neurochem* 102:508-521.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid β Peptid
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
CA-Region	Cornus Ammonis-Region
COE	<i>Conditional overexpressors</i>
CRH	<i>Corticotropin Releasing Hormone</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
Cx43	Connexin43
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
FBS	Fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
h	Stunde (<i>hour</i>)
HPA-Achse	<i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis</i>
i.p.	intraperitoneal
min	Minute
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
sec	Sekunde
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N ² ,N ² ,N ² ,N ² -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
Ucn	Urocortin
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Anhang

7.2 Danksagung

7. Anhang

7.4 Lebenslauf

7.5 Publikationen