

Aus dem  
Institut für Klinische Pharmakologie  
und Toxikologie  
Universitätsklinikum Benjamin Franklin  
Freie Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor:  
Prof. Dr. med. Martin Paul

**Endothelinabhängige morphologische Veränderungen  
hypoxischer Astrozyten**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

Kai Martin Schmidt-Ott  
Berlin

Referent: Herr Prof. Dr. M. Paul  
Korreferentin: Frau Prof. Dr. G. Stoltenburg-Didinger

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität  
Berlin

Promotionsdatum: 17.05.2002

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Mechanismen der zerebralen Schädigung durch Hypoxie und Ischämie .....</b>	<b>8</b>
3.1.1	Glutamat-Toxizität .....	8
3.1.2	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Erhöhung .....	9
3.1.3	<i>Spreading Depression</i> .....	10
<b>3.2</b>	<b>Die Rolle von Astrozyten in der Neuroprotektion bei zerebraler Hypoxie oder Ischämie .....</b>	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Auswirkungen der astrozytären Hypoxie auf deren neuroprotektives Potential .....</b>	<b>14</b>
<b>3.4</b>	<b>Der Einsatz kultivierter Astrozyten zur Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen der hypoxischen Schädigung ..</b>	<b>16</b>
<b>3.5</b>	<b>Das Endothelin-System und seine Rolle bei zerebraler Ischämie .....</b>	<b>18</b>
3.5.1	Komponenten des Endothelin-Systems .....	18
3.5.2	Die physiologische und pathophysiologische Rolle der Endotheline .....	21
3.5.2.1	Erkenntnisse aus Modellen genetischer ET-Defizienz .....	21
3.5.2.2	Erkenntnisse aus Modellen der pharmakologischen Blockade des ET-Systems .....	21
3.5.2.3	Endothelin bei arterieller und pulmonaler Hypertonie .....	22
3.5.2.4	Endothelin bei Herzinsuffizienz .....	24

3.5.2.5	Das Endothelin-System bei zerebraler Hypoxie oder Ischämie .....	25
<b>4</b>	<b>FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Lösungen, Puffer, Medien und Gele.....</b>	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>30</b>
5.2.1	Präparation der Astrozyten-Kulturen.....	30
<b>5.3</b>	<b>Experimentelles Protokoll.....</b>	<b>31</b>
5.3.1	Vorbehandlung der Zellen.....	31
5.3.2	Hypoxie.....	31
5.3.2.1	Evaluation des Hypoxie-Modells.....	32
5.3.3	Morphologische Analysen.....	33
<b>5.4</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungen.....</b>	<b>34</b>
5.4.1	RNA-Isolation.....	34
5.4.1.1	Isolation von astrozytärer Gesamt-RNA.....	34
5.4.1.2	RNA-Isolation aus Geweben.....	34
5.4.1.3	Ermittlung von Konzentration, Reinheit und Integrität der isolierten RNA .....	35
5.4.2	Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	36
5.4.2.1	Reverse Transkription (RT).....	37
5.4.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	37
5.4.2.3	<i>Primerdesign</i> .....	38
5.4.3	Subklonierung der RT-PCR-Produkte.....	40
5.4.4	Sequenzierung.....	40

5.4.5	Klonierung und Sequenzierung von partiellen Sequenzen muriner ECE-1- und ECE-2-cDNA.....	40
5.4.6	<i>Northern-Blot</i> -RNA-Analyse.....	43
5.4.6.1	<i>Northern Blot</i> .....	43
5.4.6.2	Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden .....	43
5.4.6.3	Hybridisierung.....	44
5.4.6.4	Autoradiographie .....	44
5.4.6.5	„ <i>Stripping</i> “ der Membranen und Rehybridisierung .....	44
5.4.6.6	Statistische Analyse der <i>Northern Blots</i> .....	45
<b>5.5</b>	<b>Biochemische Untersuchungen .....</b>	<b>46</b>
5.5.1	Endothelin- <i>Radioimmunoassay</i> (RIA).....	46
5.5.1.1	Extraktion von ET aus den Medienüberständen .....	46
5.5.1.2	ET-RIA.....	47
5.5.1.3	Qualitätskontrolle .....	47
5.5.1.4	Gesamtproteinbestimmung in Astrozyten-Extrakten.....	48
5.5.1.5	Statistische Analyse der Ergebnisse.....	48
<b>5.6</b>	<b>Materialliste und Bezugsquellen .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>6.1</b>	<b>Evaluation des Hypoxiemodells .....</b>	<b>52</b>
<b>6.2</b>	<b>Einfluss von Hypoxie auf die Morphologie kultivierter Astrozyten .....</b>	<b>55</b>
<b>6.3</b>	<b>Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von Komponenten des Endothelin-Systems .....</b>	<b>58</b>
6.3.1	Expression und Sekretion von ET.....	58

6.3.2	Einfluss von Hypoxie auf die Expression von mRNAs für ET <sub>A</sub> R, ET <sub>B</sub> R und ECE-2 .....	59
6.4	<b>Die Rolle der Aktivierung des Endothelin-Systems bei der durch Hypoxie induzierten morphologischen Transformation.....</b>	<b>61</b>
7.	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
7.1	<b>DBcAMP-stimulierte kultivierte Astrozyten als Modell der Situation <i>in vivo</i>.....</b>	<b>63</b>
7.2	<b>Effekte der Hypoxie auf kultivierte Astrozyten.....</b>	<b>65</b>
7.3	<b>Hypoxieinduzierte morphologische Transformation kultivierter Astrozyten .....</b>	<b>67</b>
7.4	<b>Regulation der Endothelin-System-Genexpression durch Hypoxie....</b>	<b>69</b>
7.4.1	Endothelin-Biosynthese .....	69
7.4.2	Endothelin-Rezeptoren .....	71
7.5	<b>Die Aktivierung des astrozytären Endothelin-Systems induziert die morphologische Transformation durch Hypoxie .....</b>	<b>73</b>
7.6	<b>Potentielle Bedeutung für die Situation <i>in vivo</i>.....</b>	<b>75</b>
8	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>76</b>
9	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
10	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>98</b>
11	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>100</b>

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abb. 3-1</b>	<b>Aufrechterhaltung der extrazellulären Homöostase durch Astrozyten.....</b>	<b>13</b>
<b>Abb. 3-2</b>	<b>Einfluss von Ischämie auf die astrozytäre Morphologie in vivo .....</b>	<b>15</b>
<b>Abb. 3-3</b>	<b>Induktion astrozytärer Stellation durch DBcAMP.....</b>	<b>17</b>
<b>Abb. 3-4</b>	<b>Endothelin-Biosynthese am Beispiel des humanen Endothelin-1....</b>	<b>20</b>
<b>Abb. 5-1</b>	<b>Schematische Darstellung der verwendeten Hypoxiekammer .....</b>	<b>32</b>
<b>Abb. 5-2</b>	<b>RNA-Qualitätsanalyse.....</b>	<b>36</b>
<b>Abb. 5-3</b>	<b>Sequenzen der murinen ECE-1- und ECE-2-cDNAs .....</b>	<b>42</b>
<b>Abb. 6-1</b>	<b>Induktion von ORP 150-mRNA in hypoxischen Astrozyten .....</b>	<b>54</b>
<b>Abb. 6-2</b>	<b>Zelluläre Integrität nach 24-stündiger Hypoxie .....</b>	<b>54</b>
<b>Abb. 6-5</b>	<b>Endothelinkonzentration in astrozytären Medienüberständen .....</b>	<b>59</b>
<b>Abb. 6-6</b>	<b>Endothelinsystem-Genexpression in kultivierten Astrozyten nach Hypoxie .....</b>	<b>60</b>
<b>Abb. 7-1</b>	<b>Endothelinabhängige Transformation hypoxischer Astrozyten .....</b>	<b>74</b>

## **TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tabelle 3-1 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabelle 5-1 Oligonukleotidprimer für die PCR-Analyse .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabelle 5-2 Zur Klonierung muriner ECE-1- und ECE-2-cDNA verwendete Primer .....</b>	<b>41</b>