

4 ERGEBNISSE

4.1 Klonierung eines antisense PARP-1-Vektors

4.1.1 RNA-Isolierung aus BV-2 Zellen

Durch Einklonieren einer gegen die mRNA des PARP-1-Moleküls gerichteten antisense-Sequenz in den multiplen Klonierungsbereich eines pcDNA3.1(+)-Vektors sollte die Expression des Zielproteins durch Behinderung der ribosomalen Translation der codierenden mRNA verhindert werden.

Im folgenden sind ausgesuchte Ergebnisse der Vektorklonierung dargestellt. Die einzelnen Schritte der Klonierung wurden bereits in Kapitel 3.2 ausführlich beschrieben. Zur Überprüfung der Intaktheit der isolierten RNA wurden die Proben auf ein denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen.

Abbildung 4.1 zeigt ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarose-Gel mit den aufgebrauchten Proben nach der RNA-Isolierung aus nativen BV-2 Mikrogliazellen. In der ersten Reihe ist der λ -DNA-Marker und in den Reihen zwei bis sechs ist die aus BV-2 Zellen isolierte RNA aufgetragen. Die Abbildung zeigt, daß die isolierte RNA intakt ist. Weiterhin sind deutlich zwei Banden zu erkennen: Auf der Höhe der 4,7 kb Markerbande befindet sich die 28s RNA und bei 1,9 kb ist die 18s RNA zu erkennen. In der zweiten Geltasche hat sich die RNA nicht gleichmäßig verteilt, wodurch nur auf der jeweils linken Bandenseite ein sehr starkes Signal zu erkennen ist. Mit der isolierten RNA wurde nachfolgend eine cDNA synthetisiert. Diese wurde für Amplifizierungsversuche in der PCR eingesetzt.

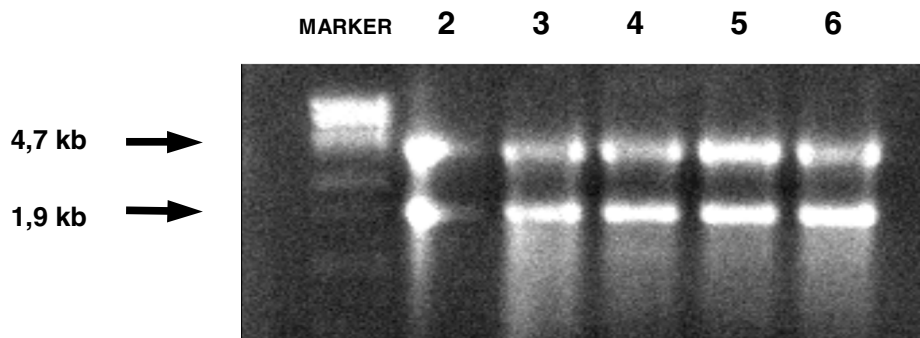


Abb. 4.1: RNA-Isolierung aus BV-2 Zellen. Denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel mit isolierter RNA in den Reihen 2 bis 6; 4,7 kb = 28s RNA, 1,9 kb = 18s RNA; Marker = λ -DNA-Größenmarker.

4.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

4.1.2.1 β -Actin-PCR

Zur Amplifizierung der DNA wurde für jeden DNA-Strang ein spezifischer Primer, der die Zielsequenz einrahmen sollte, eingesetzt. Um die cDNA zu überprüfen, wurde zunächst eine PCR mit β -Actin Primern durchgeführt. Jeweils 15 μ l der in der PCR amplifizierten DNA wurden mit Ladepuffer auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.2.5). Anhand eines mitgeführten λ -DNA-Markers wurden nach dem Lauf die amplifizierten Banden des β -Actins (520 bp) auf erfolgreiche Vervielfältigung und auf die Größe der Amplifikate überprüft und dokumentiert. **Abbildung 4.2** zeigt in der ersten Reihe auf dem Agarose-Gel den aufgetragenen λ -DNA-Marker. In der zweiten Reihe befindet sich die erste Kontrolle, welche die cDNA, aber keine Primer enthält. In der dritten Reihe ist die zweite Kontrolle mit der cDNA, aber ohne Zugabe der beiden Primer dargestellt. In der vierten bis achten Reihe sind die Proben nach der Amplifizierung des β -Actin-Gens abgebildet. Auf der Höhe der 514 kb-Markerbande ist ein deutliches Signal zu erkennen, welches eine erfolgreiche Amplifizierung des β -Actin-Gens erkennen läßt. Da in beiden mitgeführten Kontrollen kein Signal detektiert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß die Amplifizierung spezifisch für das β -Actin-Gen war.

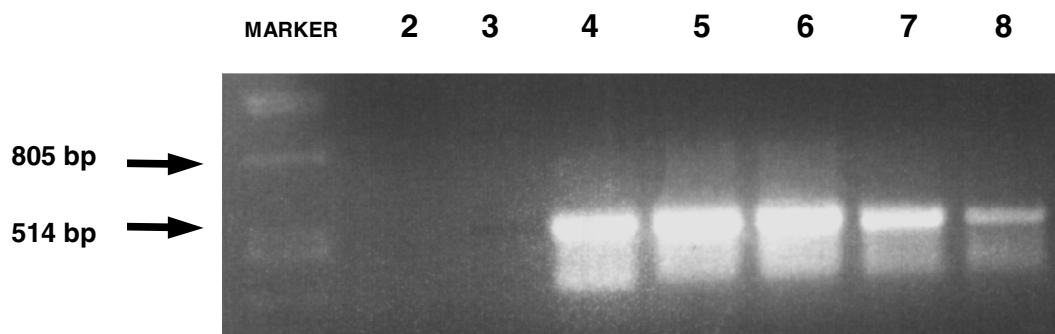


Abb. 4.2: β -Actin-PCR. Agarose-Gel nach Amplifizierung des β -Actin-Gens (514 bp) in den Reihen 4 bis 8 zur Kontrolle der Vollständigkeit der cDNA Synthese. Reihen 2 bis 3 = Kontrollen; Marker = λ -DNA-Größenmarker.

4.1.2.2 PARP-1-PCR

Nachfolgend wurde mit der PCR durch zwei genspezifische Primer das PARP-1-Konstrukt vervielfältigt. Zur Synthese des PARP-1-Konstruktes wurden zwei spezielle Oligonukleotide verwendet, die Schnittstellen für die beiden Restriktionsenzyme Eco RI und Xba I besaßen (siehe 3.2.4.1).

Abbildung 4.3 zeigt ein Agarose-Gel nach der Amplifizierung des PARP-1-Konstruktes. In der ersten Reihe ist der λ -DNA-Marker auf das Agarose-Gel aufgetragen worden. In der zweiten Reihe befindet

sich die erste Kontrolle, die eine cDNA, aber keine Primer enthält. In der fünften Reihe ist die zweite Kontrolle, bestehend aus der cDNA, aber ohne Zugabe der beiden Primer, abgebildet. Die mitgeführten Kontrollen dienten dazu, unspezifische Amplifizierungssignale aufzudecken. In den Reihen drei bis vier und sechs bis neun sind die Proben nach Amplifizierung des PARP-1-Konstruktes dargestellt. Auf der Höhe der 650 kb-Markerbande ist in diesen Reihen eine deutliche Bande zu erkennen, die auf eine erfolgreiche Amplifizierung schließen läßt. Da in beiden mitgeführten Kontrollen kein Signal detektiert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß die Amplifizierung spezifisch für das PARP-1-Konstrukt war. Das Konstrukt wurde anschließend in den pCR 2.1-TOPO Vektor ligiert.

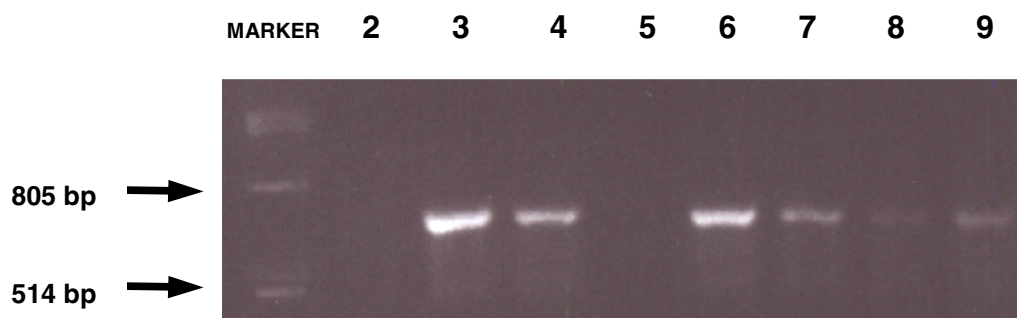


Abb. 4.3: PARP-1-PCR. Agarose-Gel nach Amplifizierung des PARP-1-Konstruktes (514 bp) in den Reihen 3 bis 4 und 6 bis 9. Reihen 2 und 5 = Kontrolle; Marker = λ -DNA-Größenmarker.

4.1.3 Ligation des PARP-1-Konstruktes in den pCR 2.1-TOPO Klonierungsvektor Vektor

Die Ligation der eluierten antisense-Konstrukte wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen durchgeführt. Damit konnten PCR-Produkte, die mit der Taq-Polymerase in der PCR amplifiziert worden waren, direkt mit Hilfe des Enzyms Topoisomerase I in den pCR 2.1-TOPO Vektor (Vektorkarte siehe Abbildung 3.2) eingefügt werden. Um den Einbau des Konstruktes in diesen Vektor nachzuweisen, wurde die DNA nach der Isolierung mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut. Das PARP-1-Insert wurde dafür mit den beiden Enzymen Eco RI und Xba I aus dem Vektor geschnitten.

Nach der Restriktion wurde die geschnittene Plasmid-DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen. **Abbildung 4.4** zeigt ein Gel nach Ligation und Restriktion des PARP-1-Konstruktes mit den Enzymen Eco RI und Xba I aus dem pCR 2.1-TOPO Vektor. In der ersten Reihe ist auf dem Agarose-Gel der aufgetragene λ -DNA-Marker zu erkennen. In den Reihen zwei bis drei und fünf bis sechs sind deutlich zwei Banden zu erkennen. Auf der Höhe der 3,9 kb Bande befindet sich jeweils der geschnittene Vektor. Das aus dem Vektor herausgeschnittene PARP-1-Konstrukt befindet sich mit

einer Größe von 650 kb jeweils unterhalb der Vektorbande. In der vierten Reihe konnte keine DNA nachgewiesen werden.

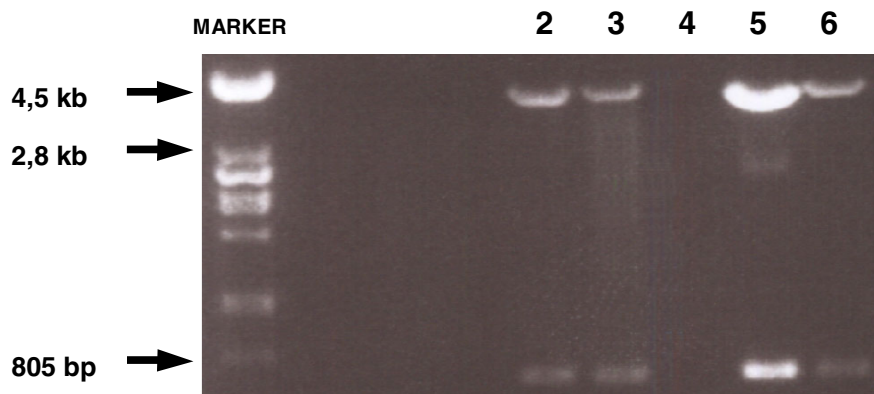


Abb. 4.4: Agarose-Gel nach Ligation und Restriktion des PARP-1-Konstruktes (650 bp) mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Xba I aus dem TOPO TA Cloning Vektor (3,9 kb) in den Reihen 2 bis 3 und 5 bis 6; Marker = λ -DNA-Größenmarker.

4.1.4 Ligation des PARP-1-Konstruktes in antisense-Orientierung in den pcDNA 3.1 (+) Vektor

Die Ligation der Inserts wurde mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Diese Ligase ist in der Lage, zueinander kompatible 5'-Phosphat- mit 3'-OH-Enden kovalent zu verknüpfen. Die Ligation der Konstrukte erfolgte in antisense-Orientierung in den vielfachen Klonierungsbereich eines pcDNA3.1(+)-Vektors (Vektorkarte siehe Abbildung 3.3) mit dem Ziel, die Expression des Zielproteins durch Behinderung der ribosomalen Translation der codierenden mRNA zu verhindern.

Um den Einbau der antisense-Konstrukte in den entsprechenden Vektor nachzuweisen, wurde die DNA nach der Isolierung mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. **Abbildung 4.5** zeigt ein Gel nach Ligation und Restriktion des PARP-1-Konstruktes mit den Enzymen Eco RI und Xba I aus dem Vektor. In der ersten Reihe ist der Marker zu erkennen. In den Reihen zwei bis fünf wurde der geschnittene Leervektor aufgetragen. In jeder dieser Reihen zeigte sich auf der Höhe der 5,0 kb Bande ein deutliches Signal. Der Leervektor wurde anschließend für die Transfektion von Kontrollzellen eingesetzt. In den Reihen sechs bis neun befinden sich die mit den Restriktionsenzymen geschnittenen Proben. Nach dem Gellauf waren deutlich jeweils zwei Banden, nämlich die des geschnittenen Vektors mit einer Größe von 5,0 kb und die des herausgeschnittenen PARP-1-Inserts mit einer Größe von 650 bp, zu erkennen. Alle aufgetragenen Proben zeigten eine intakte DNA. Die Vektor-DNA mit dem asPARP-1-Konstrukt wurde nachfolgend teilsequenziert.

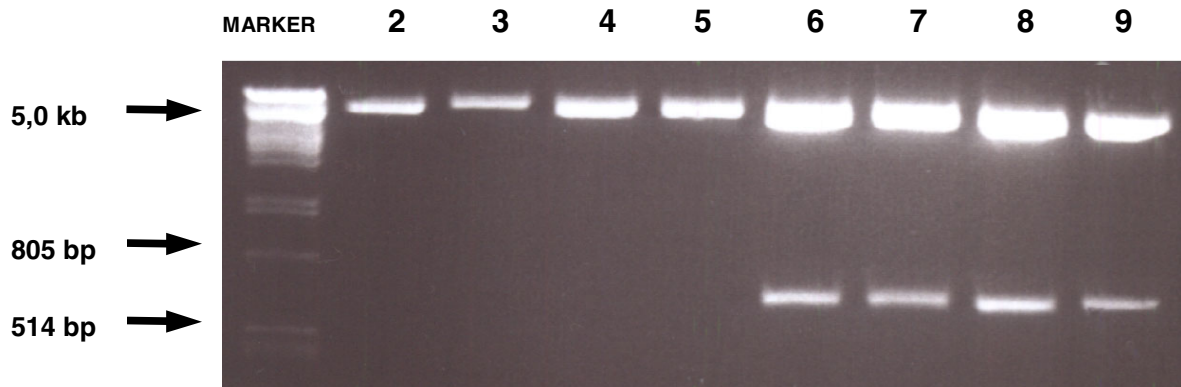


Abb. 4.5: Agarose-Gel nach Restriktion des pcDNA 3.1(+)-Vektors mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Xba I. Reihen 2 bis 5 = Leervektor (5,0 kb); Reihen 6 bis 9 = Vektor (5,0 kb) und asPARP-1-Konstrukt (650 bp); Marker = λ -DNA-Größenmarker.

4.1.5 Teilsequenzierung des antisense PARP-1-Vektors

Um die Insertion des PARP-1-DNA-Fragmentes in den pcDNA3.1(+)-Vektor zu bestätigen, wurden die Übergangsbereiche zwischen Ausgangsvektor und Insert von einer Seite ansequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse der Firma DLMBC in Berlin, die mit einem automatischen Sequenzierer (ABI 373) nach dem Sanger-Coulson-Verfahren (SANGER et al., 1977) mit dem T7 Standardprimer durchgeführt worden waren, wurden anschließend mit der original murinen PARP-1-Sequenz verglichen. **Abbildung 4.6** zeigt den Sequenzabgleich, der mit dem NCBI BLAST Programm ermittelt wurde. Die Analyse ergab eine 96 %ige Sequenzübereinstimmung des einklonierten Konstruktes mit der original murinen PARP-1-mRNA. Nach der Teilsequenzierung des antisense PARP-1-pcDNA3.1(+)-Vektors wurden BV-2 Mikrogliazellen mittels der Lipofectin-Methode und anschließender Zeocinselektion stabil damit transfiziert.

```

emb|X14206|MMADPRP Mouse mRNA for poly (ADP-ribose) polymerase (EC 2.4.2.30)
Length = 3172

Score = 638 bits (322), Expect = 0.0
Identities = 385/401 (96%), Gaps = 5/401 (1%)
Strand = Plus / Plus

Query: 86 aaggatggcggaggcctcggagaggctttatcgagtgaggtagcgaagagcgggcgcgc 145
      |||
Sbjct: 81 aaggatggcggaggcctcggagaggctttatcgagtgaggtagcgaagagcgggcgcgc 140

Query: 146 ctcttgcaagaaatgcagcgagagtattccaaggactccctccgcatggccatcatggt 205
      |||
Sbjct: 141 ctcttgcaagaaatgcagcgagagtattccaaggactccctccgcatggccatcatggt 200

Query: 206 gcggtcaccatggttcgatgggaaagtcccacactggtaccacttctcctgcttctgaa 265
      ||
Sbjct: 201 gcagtcaccatggttcgatgggaaagtcccacactggtaccacttctcctgcttctgaa 260

Query: 266 ggtgggcccactccatccggcagcctgatggtgaggtggatggcttctctgagctgcgctg 325
      |||
Sbjct: 261 ggtgggcccagtcctccatccggcaccctgatggtgaggtggatggcttctctgagctgcgctg 320

Query: 326 ggatgatcagccagaaggtcaagaagacggccgaggctggaggcgtggcagcgaaggcc 385
      |||
Sbjct: 321 ggatgatcag-cagaaggtcaagaagacggccgaggctggaggcgtggcagcgaagg-c 378

Query: 386 caggatggaagtcggcggccaaggcgggagaagacattgggtgacttttagcggagtag 445
      |||
Sbjct: 379 caggatggaagt--gggggcaaggcggag-aagacattgggtgactttgagcagagtag 435

Query: 446 gccaaagtccaacaggagcatgtgcaagggctgcctggagaa 486
      |||
Sbjct: 436 gccaaagtccaacaggagcatgtgcaagggctgcctggagaa 476

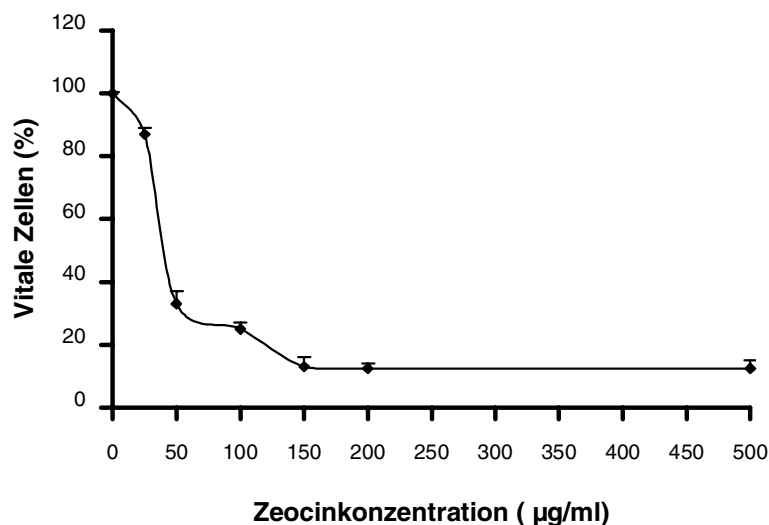
```

Abb. 4.6: Sequenzabgleich der in den pcDNA 3.1(+) einklonierten PARP-1-Sequenz mit der original murinen PARP-1 mRNA-Sequenz über das NCBI BLAST Programm. Die Analyse ergab eine 96 % ige Sequenzübereinstimmung (Identities 385 von 401).

4.2 Transfektion von BV-2 Zellen mit dem antisense PARP-1-Vektor

4.2.1 Selektion mit Zeocin

Der pcDNA 3.1(+) Klonierungsvektor mit und ohne ligiertes antisense PARP-1-Konstrukt wurde nachfolgend für Transfektionen von BV-2 Mikrogliazellen eingesetzt. Die Transfektion der permanenten Zelllinie mit dem antisense tragenden Vektor sollte dazu dienen, Auskünfte über das Aktivierungs- und Migrationsverhalten der Mikrogliazellen, bei entsprechender Inhibierung des Enzyms PARP-1, zu erhalten. Als Transfektionsreagenz wurde Roti-Fect, eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids, verwendet (siehe 3.3.1). Anschließend wurden die Zellen für zwei Wochen mit Zeocin behandelt, um erfolgreich transfizierte Zellen von den Zellen, die den Vektor nicht integriert hatten, zu selektionieren. Mit nativen BV-2 Zellen wurde vor der Transfektion und Zeocinselektion eine Toxizitätskurve erstellt, da Zelllinien teilweise eine natürliche Resistenz gegen verschiedene Antibiotika besitzen (siehe 3.3.3). **Abbildung 4.7** zeigt die Ergebnisse der Vitalität von BV-2 Zellen nach dreitägiger Zeocinbehandlung in Abhängigkeit von Zeocinkonzentrationen in einem Bereich von 0 µg/ml bis 500 µg/ml im Vergleich zu Kontrollzellen. Unbehandelte Kontrollzellen waren nach drei Tagen zu 100 % vital, während mit zunehmender Konzentration des Antibiotikums die Vitalität der BV-2 Mikrogliazellen abnahm. Bei der geringsten Zeocindosis von 25 µg/ml betrug die Rate der vitalen Zellen noch 87 %. Bereits bei 50 µg/ml eingesetztem Zeocin wurden 67 % der Zellen abgetötet. Bei 100 µg/ml Zeocin lag die Zelltodrate bei 75 %. Mit dem Einsatz noch höherer Zeocinkonzentrationen von 150, 200 und 500 µg/ml waren gerade noch ca 13 % der Zellen vital. Die Zelltodrate betrug damit 87 %. Für die Selektion der transfizierten BV-2 Mikrogliazellen wurden in den Versuchen 100 µg/ml Zeocin eingesetzt. Diese Konzentration ermöglichte einerseits ein Überleben der transfizierten Zellen und bewirkte andererseits, daß nicht transfizierte Zellen abgetötet wurden.



4.7: Ermittlung der Zeocintoxizität an nativen BV-2 Zellen.

4.2.2 Test auf Funktionalität des antisense PARP-1-Konstruktes

Bevor die stabil transfizierten Mikrogliazellen in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt wurden, erfolgte die Überprüfung der Effektivität des eingebrachten antisense-Konstruktes. Getestet wurde dabei, ob eine verminderte oder fehlende Expression des zu inhibierenden Moleküls PARP-1 im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor-transfizierten Zellen vorlag.

Der Nachweis der PARP-1-Expression an den mit dem asPARP-1-Vektor transfizierten BV-2 Zellen und den Kontrollzellen erfolgte mit der Immuno-Blotting-Technik (siehe 3.3.4.1). **Abbildung 4.8** zeigt ein SDS-Gel-Proteinmuster nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Durch die Auftrennung der Proteine wurde die Identifikation des PARP-1-Proteins möglich und erfolgte mit Hilfe eines mitgeführten Proteinmarkers. Auf der Höhe der 120 kDa Markerbande (Größe des PARP-1-Proteins: 116 kDa) war dabei ein deutliches Signal in Kontrollvektor-transfizierten Zellen zu erkennen. BV-2 Zellen, die mit dem asPARP-1-Vektor transfiziert worden waren, zeigten einen Tag nach der Transfektion eine im Vergleich zu den Kontrollzellen schwächere PARP-1-Expression. Bereits sieben Tage nach der Transfektion und mit dem Einsatz des Selektionsantibiotikums Zeocin konnte das PARP-1-Protein nur noch ganz schwach in asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen detektiert werden. Erfolgreich transfizierte Zellen, mit einer inhibierten PARP-1-Proteinexpression wurden nachfolgend für Experimente mit den organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (siehe 4.3) eingesetzt.

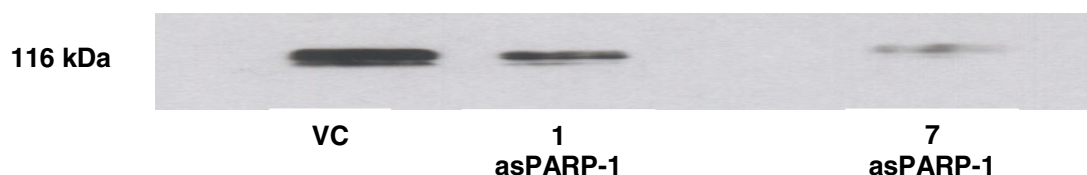


Abb. 4.8: Nachweis der PARP-1-Expression in Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen. VC = BV-2 Zellen transfiziert mit dem Kontrollvektor; 1 asPARP-1 = BV-2 Zellen einen Tag nach der Transfektion mit dem asPARP-1-Vektor; 7 asPARP-1 = BV-2 Zellen sieben Tage nach der Transfektion mit dem asPARP-1-Vektor und unter Zeocinselektion.

4.3 Superkultivierung vormarkierter antisense PARP-1 BV-2 Mikrogliazellen auf organotypischen hippocampalen Schnittkulturen

Exzitotoxische Hirnschädigungen, die beispielsweise nach einem Hirninfarkt oder Schädel-Hirn-Trauma auftreten, führen zunächst zu einer primären Schädigung des Hirnparenchyms. Innerhalb von Stunden bis Tagen nach diesem Ereignis kommt es dann zu einer Invasion aktivierter Mikrogliazellen in die Region des neuronalen Schadens. Die Zellen setzen dort große Mengen an toxischen Zytokinen und Sauerstoffradikalen frei, die zu einer weiteren, sekundären neuronalen Schädigung führen. Um zu untersuchen, ob eine Herunterregulierung der PARP-1-Expression in Mikrogliazellen zu einem verringerten sekundären neuronalen Schaden führt, wurde das Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSK) gewählt (siehe 3.4). Dieses System ermöglichte eine direkte Untersuchung der neuronal-mikroglialen-Interaktionen im lebenden Hirngewebe. **Abbildung 4.9** zeigt eine durchlichtmikroskopische Aufnahme des Hippokampus in der lebenden Hirnschnittkultur.

In den Versuchen mit der OHSK wurden sowohl Kontrollvektor- als auch antisense PARP-1-transfizierte BV-2 Zellen eingesetzt. Zur Induktion eines exzitotoxischen Schadens wurde das Hirngewebe mit 5 μ M NMDA vorbehandelt. Nachfolgend wurden die fluoreszenzformmarkierten BV-2 Zellen auf die Schnittkulturen gegeben (siehe 3.4.3). Die Stärke des neuronalen Zelltodes und das Migrationsverhalten dieser Zellen zu den Orten der Neurodegeneration wurden drei Tage nach dem Transfer der exogenen Mikrogliazellen ermittelt (siehe 3.4.5 und 3.4.6).

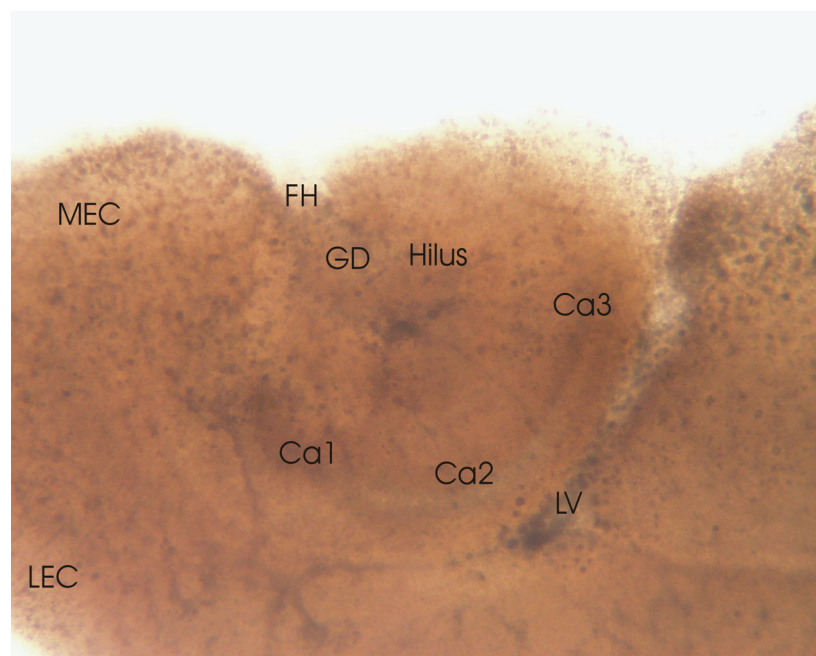


Abb. 4.9: Durchlichtmikroskopische Aufnahme des Hippokampus in einer lebenden Hirnschnittkultur (OHSK), LV = linker Ventrikel, MEC = medialer entorhinaler Kortex, LEC = lateraler entorhinaler Kortex, FH = Fissura hippocampi, GD = Gyrus dentatus, CA1-3 = Regionen des Cornu ammonis.

4.3.1 Untersuchungen zum neuronalen Zelltod

Mit diesen Versuchen sollte die Hypothese getestet werden, ob eine Hemmung der mikroglialen PARP-1 vor einem sekundären neuronalen Zellschaden schützt. Zur Ermittlung der neuronalen Zelltodrate in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis wurden die lebenden Hirnschnitte drei Tage nach dem Transfer von Mini Emerald (ME) vormarkierten Mikrogliazellen mit dem roten Fluoreszenz- und Zelltodmarker Propidiumjodid (PI) angefärbt. Die Anfärbung wurde zunächst im inversen Fluoreszenzmikroskop beobachtet und dokumentiert. Die statistische Auswertung erfolgte an Kryostatschnitten, die nach Fixierung der Lebendkulturen gemacht worden waren.

Abbildung. 4.10 zeigt Bilder der Fluoreszenzmikroskopie. Dargestellt sind die unterschiedlichen Versuchsgruppen nach Färbung des intakten Hirngewebes mit PI. Die Aufnahmen demonstrieren eine unterschiedliche Intensität in der Rotfluoreszenz, die mit dem neuronalen Schaden korrelieren. Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte nur eine leichte, diffuse Fluoreszenz. Nach Schädigung der Schnittkulturen mit NMDA wurde der Primärschaden als breites, rot gefärbtes Zellband in der CA-Region sichtbar. In dem Hirngewebe, das vor der Schädigung mit NMDA mit 3-ABA vorbehandelt worden war, war die Rotfluoreszenz dagegen schwächer ausgeprägt. Der größte neuronale Schaden und damit die höchste Fluoreszenzintensität konnte in der Gruppe mit Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen nach NMDA-Läsion ermittelt werden. In dem Hirngewebe, das mit dem unspezifischen PARP-Inhibitor 3-ABA behandelt und mit Mikrogliazellen inkubiert worden war, war eine geringere Rotfluoreszenz als in der Gruppe mit Kontrollvektor-transfizierten Mikrogliazellen und NMDA-Läsion zu erkennen. Die geringste Rotfluoreszenz konnte jedoch in den Hirnschnitten beobachtet werden, die mit Zellen inkubiert worden waren, deren mikrogliale PARP-1 ausgeschaltet worden war.

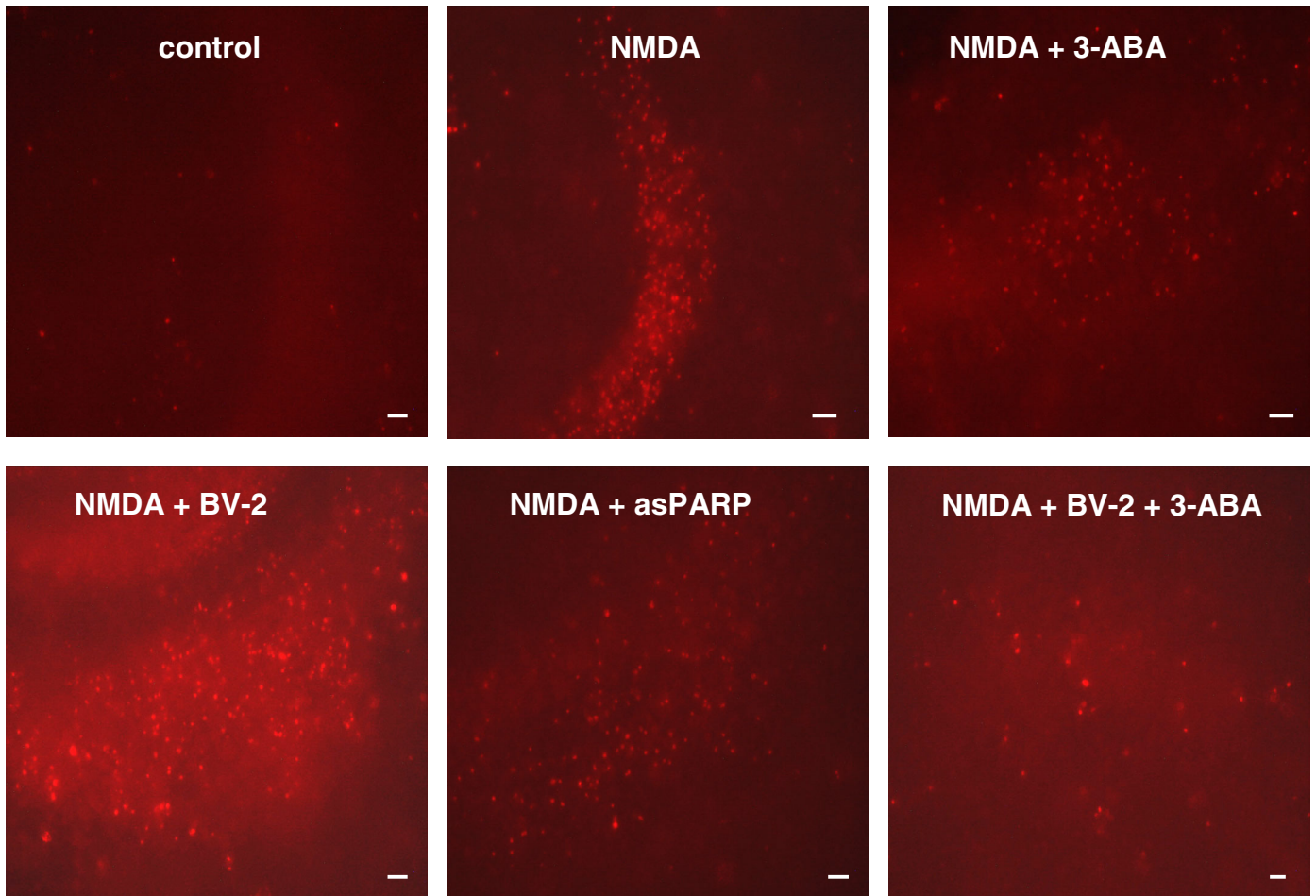


Abb 4.10: Propidiumjodid-Fluoreszenzmikroskopie der neuronalen Degenerationszonen in der CA-Region in lebenden organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSK) vor der Fixierung und nach Ausschaltung der PARP-1 in BV-2 Mikrogliazellen. NMDA = Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ m NMDA; control = ohne Mikrogliazellen, ohne NMDA; 3-ABA = ohne BV-2 Mikrogliazellen, 1 mM 3-Aminobenzamid; BV-2 = mit Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen, asPARP = mit antisense PARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen; Skala = 40 μ m.

Abbildung 4.11 zeigt die quantitative Auswertung der Anzahl PI positiver Zellen in den neuronalen Schichten des Gyrus dentatus (DG) und des Cornu ammonis (CA). Nach Vorschädigung mit NMDA kam es in allen Versuchsgruppen zu einem Anstieg der Zelltodrate (Primärschaden) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Schnittkulturen, die mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-ABA) vorbehandelt worden waren, wiesen jedoch eine um 45 % verminderte Zelltodrate im Vergleich zu dem Gewebe auf, das nur mit NMDA inkubiert worden war. Die Gruppe, in der Kontrollvektor-transfizierte Mikrogliazellen nach NMDA-Schädigung auf den Schnitt gegeben worden waren, zeigte einen massiven Sekundärschaden, der nahezu doppelt so groß wie der nur durch NMDA induzierte Primärschaden war. Dieser Sekundärschaden konnte erheblich, d. h. um mehr als die Hälfte, in Schnitten reduziert werden, die mit antisense PARP-1-transfizierten Zellen nach NMDA-Schädigung inkubiert worden waren. In Schnittkulturen, die vor dem Transfer von Kontrollvektor-transfizierten

Mikrogliazellen mit dem unspezifischen PARP-Inhibitor 3-ABA vorbehandelt worden waren, war ebenfalls eine Reduktion des neuronalen Sekundärschadens zu beobachten. Die residuale PARP-Aktivität lag dabei unter 5 %, und der Sekundärschaden wurde um 63 % reduziert. Trotzdem konnte ein größerer neuroprotektiver Effekt in der Gruppe, in der die mikrogliale PARP-1 spezifisch über den antisense-Vektor ausgeschaltet worden war, detektiert werden. Darüber hinaus zeigten die Schnittkulturen nach der Invasion der asPARP Mikrogliazellen, daß die neuronale Zelltodrate sogar unter der des mit NMDA induzierten Primärschadens lag. Daher scheint also die spezifische Ausschaltung der mikroglialen PARP-1 im lebenden Hirngewebe eine deutlich protektivere Wirkung auf Neurone zu haben, als die Hemmung der PARP durch 3-ABA im gesamten Gewebe. Dieses Ergebnis konnte in späteren Versuchen mit primären Mikrogliazellen nochmals bestätigt werden (siehe 4.9.3.1).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß eine Hemmung der mikroglialen PARP-1 vor einem sekundären neuronalen Schaden im lebenden Hirngewebe schützt.

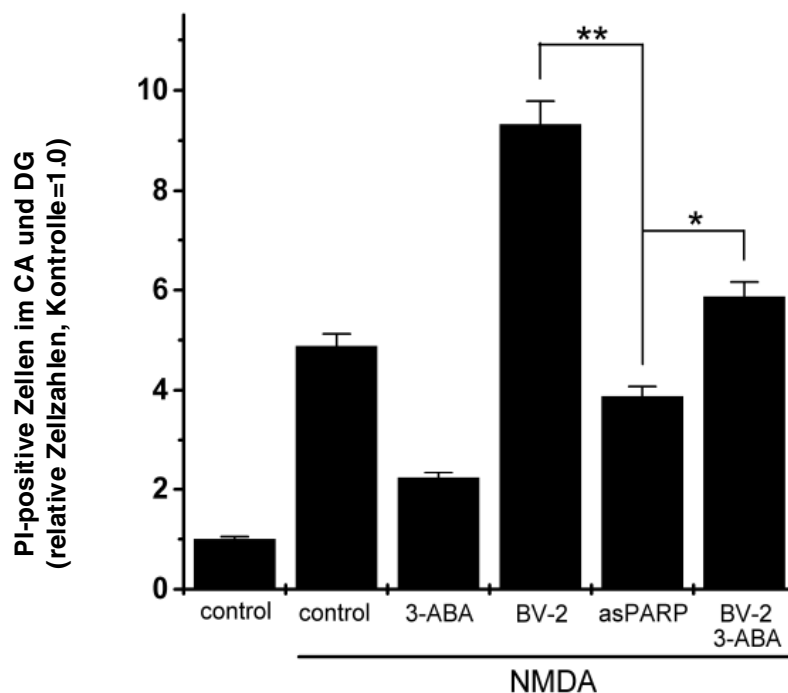


Abb. 4.11: Propidiumjodid positive (tote) Zellen in den neuronalen Schichten des Gyrus dentatus (DG) und des Cornu ammonis (CA). Zellzahlen relativ zur Zahl in ungeschädigten OHSK ohne Zugabe von BV-2 Mikrogliazellen, control = Kontrolle = 1; nicht vitale BV-2 Mikrogliazellen wurden subtrahiert. NMDA = Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 µm NMDA; control = ohne Mikrogliazellen, ohne NMDA; 3-ABA = ohne BV-2 Mikrogliazellen, 1 mM 3-Aminobenzamid; BV-2 = mit Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Mikrogliazellen, asPARP = mit dem antisense PARP-1-Vektor transfizierte BV-2 Mikrogliazellen. Mean ± S. D., n = 30, * = p < 0,05, ** = p < 0,005.

4.3.2 Vitalitätsbestimmung transfizierter BV-2 Mikrogliazellen in der Schnittkultur

Um aufzuklären, warum Mikrogliazellen mit fehlender PARP-1 keinen Sekundärschaden in NMDA vorgeschädigten Schnittkulturen verursachen, wurde die Vitalität dieser Zellen nach der Invasion in das Hirngewebe überprüft. Damit sollte die Hypothese getestet werden, ob der reduzierte neuronale Schaden auf eine eventuell verminderten Vitalität der aktivierten asPARP-1-transfizierten Mikrogliazellen zurückzuführen ist. In eigenen Vorarbeiten konnte in diesem Zusammenhang bereits gezeigt werden, daß eine Hemmung der PARP-1 zu einer verminderten Vitalität aktivierter BV-2 Mikrogliazellen in der Zellkultur führt (ULLRICH et al., 2001).

Die Vitalität der regionspezifisch eingewanderten vormarkierten Mikrogliazellen wurde bestimmt, indem das Verhältnis von PI negativen und ME positiven Zellen (PI-/ME+) zu ME positiven Zellen (ME+) ermittelt wurde. In Kontrollexperimenten konnte bestätigt werden, daß sich die ME-Anfärbbarkeit nur auf Mikrogliazellen beschränkt, indem die ME vormarkierten Zellen zusätzlich mit dem mikroglialen Marker IB4 angefärbt wurden. Tote Mikrogliazellen zeigten eine gleichzeitige Anfärbung mit PI und ME (PI+/ME+). Diese Zellen wurden von den rein PI positiven Zellen (PI+) in den Gebieten des Gyrus dentatus und der CA-Region subtrahiert.

Die **Abbildung 4.12** zeigt, daß bei den Kontrollvektor- und den asPARP-1-transfizierten Zellen die Zellvitalität ohne NMDA-Schädigung des Hirngewebes bei 96 bzw. 95% lag. In Gewebekulturen, die mit NMDA vorbehandelt worden waren, betrug die Vitalität der Kontrollvektor-transfizierten Zellen 82 % und die der asPARP-1-transfizierten Zellen 78 %. In beiden Zellgruppen zeigte sich eine leicht verminderte Vitalität in dem Hirngewebe, das mit NMDA geschädigt worden war, es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollvektor-transfizierten und asPARP-1-transfizierten Mikrogliazellen gefunden werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den in Vorarbeiten durchgeführten Zellkulturversuchen, in denen asPARP-1-transfizierte BV-2 Zellen eine deutlich verminderte Vitalität aufwiesen (ULLRICH et al., 2001).

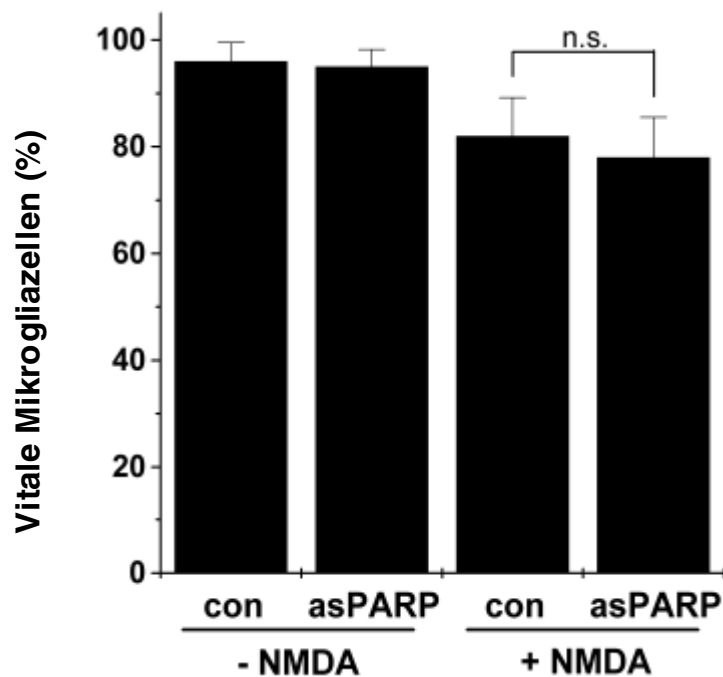


Abb. 4.12: Vitalitätsuntersuchungen an invadierten und transfizierten BV-2 Mikrogliazellen. Quantifizierung der vitalen, invadierten und ME vormarkierten BV-2 Mikrogliazellen. NMDA = Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ m NMDA; Con = Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Mikrogliazellen, asPARP = antisense-PARP-1-transfizierte BV-2 Mikrogliazellen. Mean \pm S. D., n = 30, n.s. = nicht signifikant.

Abbildung 4.13 zeigt Mini Emerald (ME) vormarkierte BV-2 Mikrogliazellen vor dem Transfer auf die OHSK. In **Abbildung 4.14** sind zusätzlich die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der neuronalen Zellschichten nach exzitotoxischer Schädigung abgebildet. Die Aufnahmen zeigen nur wenige PI und ME doppelgefärbte Zellen. Insgesamt konnte mit diesem Ergebnis bestätigt werden, daß der reduzierte neuronale Schaden nicht auf eine verminderte Vitalität der aktivierten asPARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen zurückzuführen ist. Da außerdem die Auswertungen der Doppelfärbungen auffällig zeigten, daß sich weniger ME+ Zellen in den neuronalen Schichten der asPARP-1 Gruppe im Vergleich zur Kontrollvektor-Gruppe finden ließen, erschien es als interessant und wegweisend, im nächsten Versuchsschritt das Migrationsverhalten der transfizierten Mikrogliazellen zu den Orten der Neurodegeneration näher zu untersuchen und zu vergleichen (siehe 4.3.3).

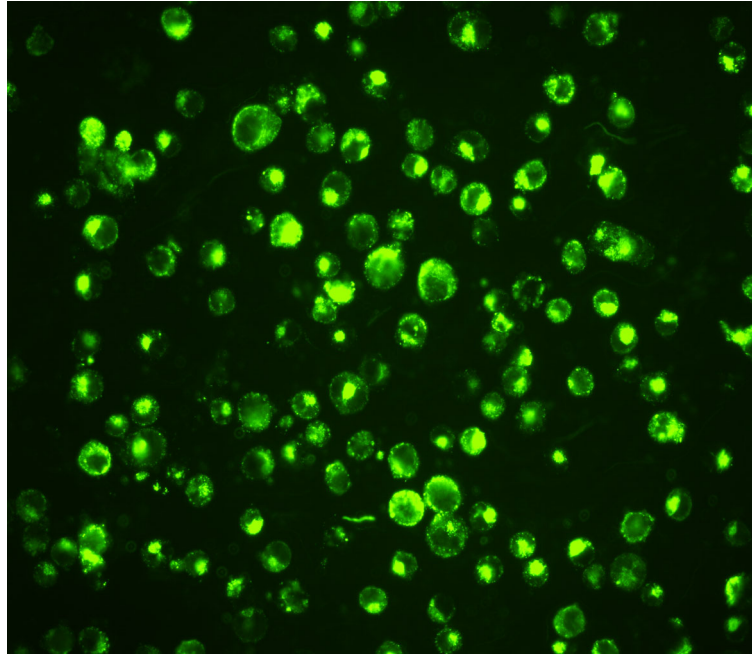


Abb. 4.13: Mini Emerald (ME) vormarkierte BV-2 Mikrogliazellen vor dem Transfer auf die organotypischen hippocampalen Schnittkulturen, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

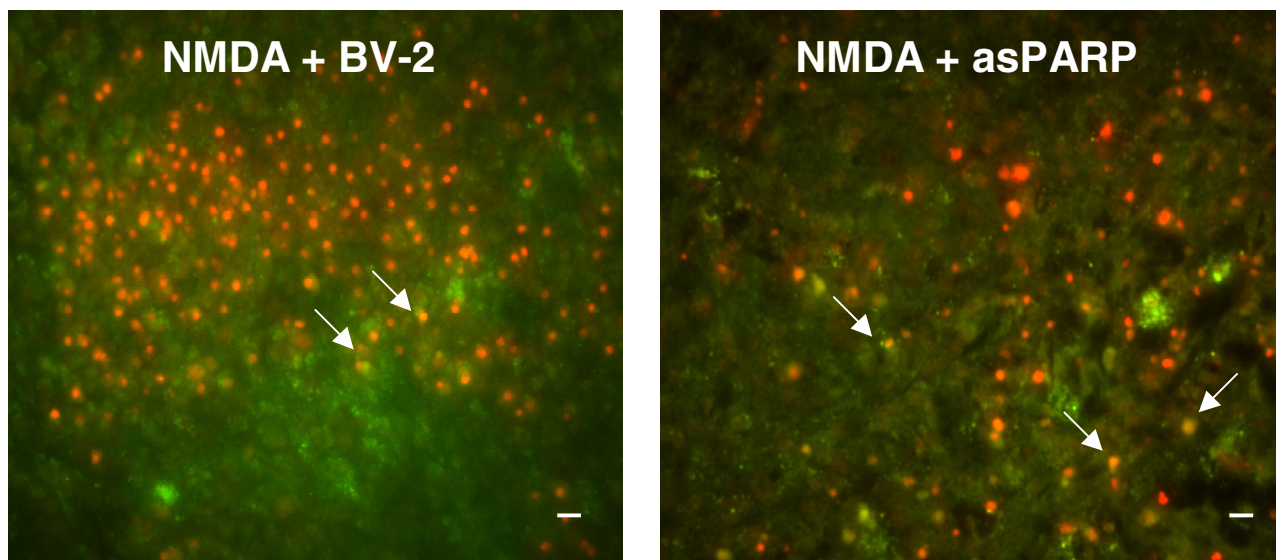


Abb.4.14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellvitalität transfizierter BV-2 Zellen. Die weißen Pfeile zeigen vereinzelte Kolokalisation (gelb) von Propidiumjodid positiven Zellen (Rotfluoreszenz) mit Mini-Emerald vormarkierten BV-2 Mikrogliazellen (Grünfluoreszenz). NMDA = Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ m NMDA; BV-2 = Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Mikrogliazellen, asPARP = antisense PARP-1-transfizierte BV-2 Mikrogliazellen; Skala = 20 μ m.

4.3.3. Analyse der regionspezifischen Migration

Für die Migrationsversuche wurden die transfizierten BV-2 Zellen zuvor mit Mini Ruby (MR), einem roten Fluoreszenzfarbstoff, vormarkiert und dann auf die Oberfläche der Schnittkulturen gegeben. Das Invasionsverhalten der Zellen zu den Orten der Neurodegeneration wurde über drei Tage im inversen Fluoreszenzmikroskop zunächst im intakten Hirngewebe beobachtet und dokumentiert. **Abbildung 4.15** zeigt die lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Bilder des Invasionsverhaltens von Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen im Vergleich zu asPARP-1-transfizierten Zellen mit und ohne NMDA-Schädigung drei Tage nach dem Transfer der Zellen. In den Gruppen ohne NMDA-Vorbehandlung war jeweils eine schwache Rotfluoreszenz zu erkennen, was auf keine gezielte Migration hindeutete. In den Gewebekulturen nach der neuronalen Schädigung zeigten Kontrollvektor-transfizierte Zellen dagegen eine massive Einwanderung in die Schadensgebiete des Cornu ammonis und des Gyrus dentatus, die sich in einer starken Rotfärbung äußerte. In NMDA vorgeschädigten Schnittkulturen mit transferierten asPARP-1 Zellen war dagegen nur eine diffuse Rotfluoreszenz zu erkennen, die gut mit der im ungeschädigten Kontrollgewebe beobachteten zu vergleichen war. Bezogen auf die nicht mit NMDA vorgeschädigten Schnitte zeigt **Abb. 4.15** eine etwas stärkere Rhodamin-Fluoreszenz in der Kontrollvektor-Gruppe als in den asPARP-1-transfizierten Mikrogliazellen. Dies bestätigte sich auch durch die Zellzahlermittlung in den Kryostatschnitten (**Abb. 4.16**). Präparationsbedingt fanden sich in den OHSK auch ohne NMDA-Vorschädigung kleine endogene Zelltodbereiche. Kontrollvektor-transfizierte Zellen, die nach einer NMDA-Läsion in die Schadensbereiche migrieren konnten, wanderten auch in den Kontrollschnitten in Bereiche des neuronalen Zelltodes ein. Mikrogliazellen mit inhibierter PARP-1 zeigten dagegen ein gestörtes Migrationsverhalten nach NMDA-Schädigung, und so waren die Zellen offensichtlich ebenfalls nicht in der Lage, zu den kleinen endogenen, präparationsbedingten Läsionsorten hinzuwandern.

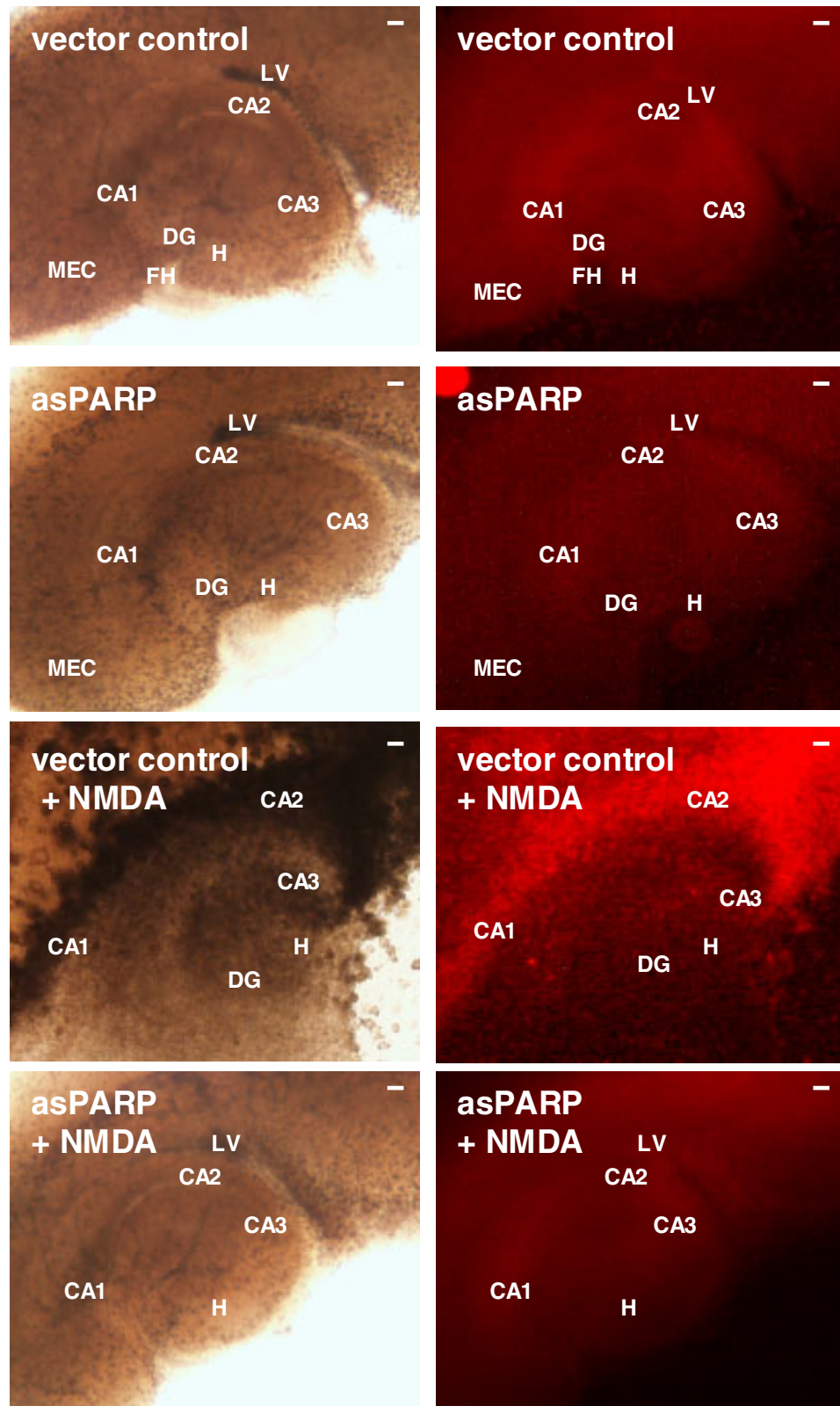


Abb. 4.15: Durchlicht- und Rhodaminfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der lebenden Hirnschnittkulturen (OHSK) zur Analyse der mikroglialen Migration in die neuronalen Degenerationszonen. Vektorkontrolle = Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Mikrogliazellen, asPARP = antisense PARP-1-Vektor-transfizierte BV-2 Mikrogliazellen, NMDA = Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ m NMDA, LV = linker Ventrikel, H = Hilus, MEC = medialer entorhinaler Kortex, FH = Fissura hippocampi, DG = Gyrus dentatus, CA 1-3= Regionen des Cornu ammonis. Skala = 40 μ m.

Abbildung. 4.16 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung der Migrationsversuche. Die Regionspezifität der Einwanderung wurde als das Verhältnis von IB4+ und MR+ Zellen in den Bereichen der neuronalen Schädigung der Pyramidenschicht des Cornu ammonis und der Körnerschicht des Gyrus dentatus zu IB4+ und MR+ Zellen in anderen Regionen, wie beispielsweise dem Stratum oriens, dem Stratum radiatum oder dem Stratum lacunosum, ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte an Kryostatschnitten, die nach Fixierung der Lebendkulturen gemacht worden waren. Eine zusätzliche Färbung der Kryostatschnitte mit dem mikroglialen Marker IB4 ermöglichte eine genaue Identifizierung der Zellen. Auch intrinsische Mikroglia konnte auf diesem Wege miterfasst werden und zeigte eine deutliche Grünfluoreszenz (IB4+/MR-). Endogene primäre Mikrogliazellen machten jedoch nur einen Anteil von weniger als 5 % der IB4 positiven Zellen in der Auswertung aus. Es wurden weiterhin keine anderen MR positiven Zelltypen (IB4-/MR+) neben den vormarkierten BV-2 Zellen gefunden. Da sich tote Mikrogliazellen nicht mit IB4 anfärben lassen (HEPPNER et al., 1998) kann davon ausgegangen werden, daß alle eingewanderten Mikrogliazellen in den untersuchten mittleren Schichten des Schnittes vital waren. Die Ergebnisse der Quantifizierung zeigen, daß Mikrogliazellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, bereits in Kontrollschnitten zu präparationsbedingten kleineren Läsionen einwanderten, während asPARP-1 Zellen dies um etwa die Hälfte vermindert taten. Nach einer NMDA-Schädigung migrierten Kontrollvektor-transfizierte Zellen massiv in die Regionen der neuronalen Schädigung (DG und CA-Region) ein. Dagegen konnten asPARP-1 Zellen zwar in das Hirngewebe eindringen, es ließ sich aber bei diesen Zellen keine Migrationspräferenz in die Schädigungsgebiete feststellen, so daß die Zellen diffus im Schnitt verteilt zu finden waren.

Aufgrund der in den OHSC gewonnenen Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, daß die PARP-1 an der Regulation der regionspezifischen mikroglialen Migration über einen bisher unbekanntem intrazellulären Mechanismus beteiligt ist. Weitergehende Versuche konzentrierten sich deshalb auf die Aufklärung dieser Regulationsvorgänge und der eventuell daran beteiligten Moleküle.

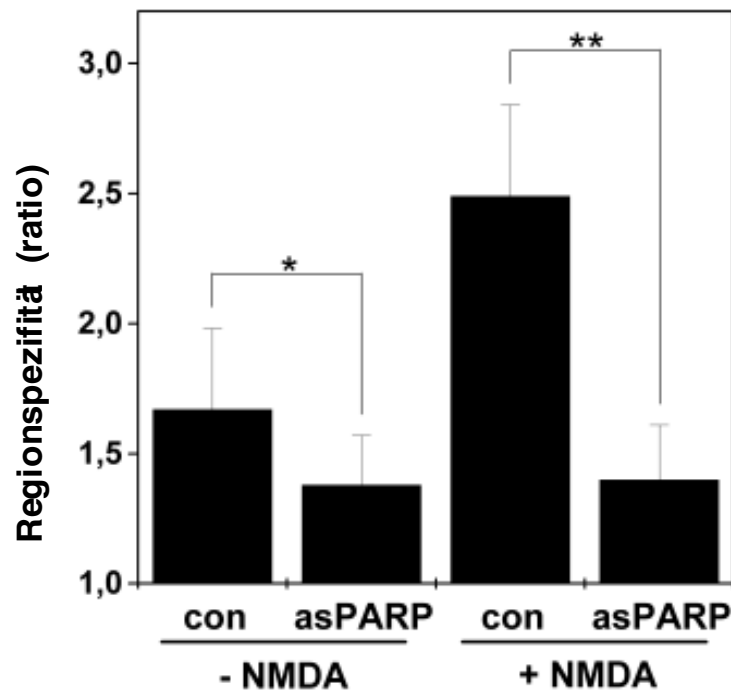


Abb. 4.16: Regionspezifität der mikroglialen Migration zum Ort der neuronalen Schädigung von Kontrollvektor-(Con) und antisense PARP-1 transfizierten BV-2 Mikrogliazellen (asPARP) vor und nach Induktion des neuronalen Schadens mit 5 μ m NMDA (NMDA). Regionspezifität = (Zellzahl in der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis und der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus) – (Zellzahl außerhalb der neuronalen Schichten). Mean \pm S. D., n = 30, * = p < 0,05, ** = p < 0,005.

4.4 Messung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf antisense PARP-1-transfizierten BV-2 Zellen

Aufgrund der in den OHSK gewonnenen Erkenntnisse über das gestörte Invasionsverhalten von asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen zu den Orten neuronaler Schädigung, wurde in den folgenden Versuchen auf die Expression von Oberflächenproteinen auf Mikrogliazellen fokussiert. Adhäsionsmoleküle werden vermehrt nach der Aktivierung von Mikrogliazellen gebildet, wodurch ihr Nachweis eine geeignete Methode darstellt, um den Grad der Zellaktivierung zu bestimmen. Weiterhin sind Adhäsionsmoleküle an der Migration von Mikrogliazellen und peripheren Leukozyten beteiligt. Deshalb wurde mit der FACS-Analyse die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen mit und ohne LPS-Stimulation untersucht.

Abbildung 4.17 zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse, mit der die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b, CD18 und ICAM-1 untersucht wurden. Beim Vergleich der Kontrollvektor-transfizierten mit den asPARP-1-transfizierten Zellen zeigten die beiden Gruppen ohne LPS-Stimulation keinen Unterschied bei der relativen Expression der Moleküle CD11b, CD18 und ICAM-1, die jeweils bei ca. 1 lag. Bezogen auf die CD11a-Expression zeigte sich jedoch ein

Unterschied zwischen der Vektorkontrolle und den Zellen mit inhibierter PARP-1. In asPARP-1 Zellen betrug die relative CD11a-Expression 0,5 und war damit, im Vergleich zu Kontrollzellen, um die Hälfte vermindert. Nach der Aktivierung der Zellen mit LPS wurde dieser Unterschied noch deutlicher: Während das Integrin in Kontrollvektor-transfizierten Zellen um mehr als die Hälfte anstieg, blieb die Expression in asPARP-1-Zellen auf dem Niveau nicht stimulierter Zellen. Es kam damit zu einer deutlich verminderten Expression des β_2 -Integrins CD11a in asPARP-1-transfizierten Mikrogliazellen im Vergleich zu BV-2 Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren. Bezogen auf die Adhäsionsmoleküle CD11b, CD18 und ICAM-1 konnte eine Hochregulation dieser Moleküle in beiden Zellgruppen nach der Stimulation der Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lipopolysaccharid beobachtet werden. Besonders ICAM-1 wurde dabei vermehrt exprimiert. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen Kontrollvektor-transfizierten Zellen und asPARP-1 Zellen bezogen auf die CD11b, CD18 und ICAM-1 Expression detektiert werden.

Da die Interaktion von CD11a/CD18 (LFA-1) mit ICAM-1 wichtig für die transendotheliale Migration von Leukozyten ist (ROEBUCK & FINNEGAN, 1999), wurde daraufhin in weiteren Versuchen die Hypothese überprüft, ob eine verminderte und PARP-1-abhängige Expression des Integrins CD11a zu der in den Schnittkulturversuchen beobachteten gestörten Migration der antisense PARP-1 Mikrogliazellen führen könnte.

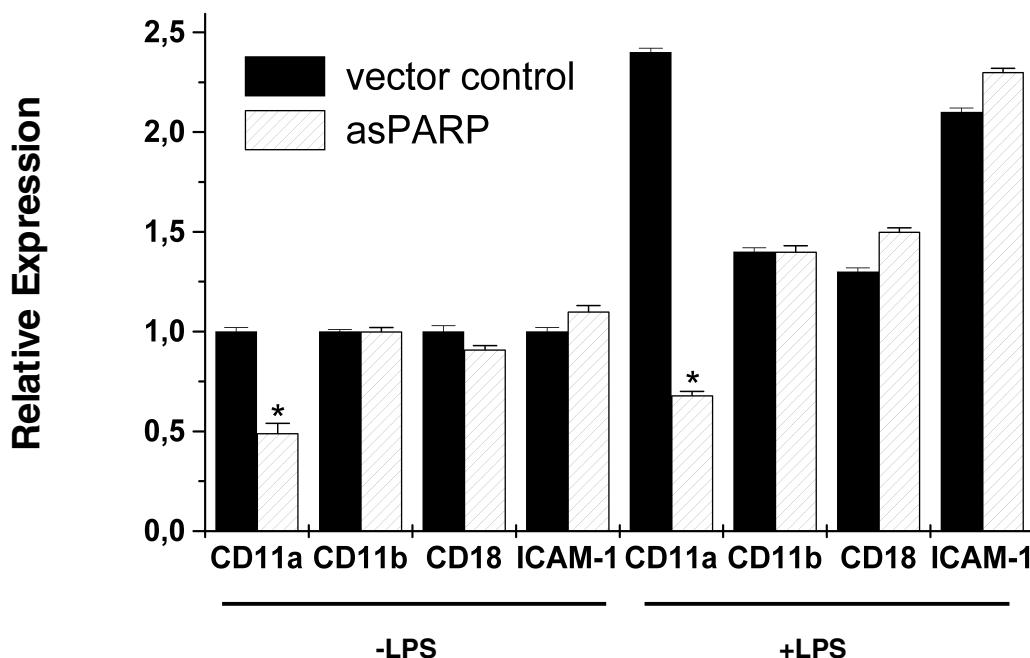


Abb. 4.17: FACS-Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen in Kontrollvektor-transfizierten (schwarze Säulen) und asPARP-1-Vektor transfizierten (graue Säulen) BV-2 Mikrogliazellen mit und ohne Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation (10 $\mu\text{g/ml}$). Mean S. D., n = 5, * = p < 0,005.

4.5. Klonierung eines antisense CD11a-Vektors

Um aufzuklären, ob eine verminderte CD11a-Expression zu dem gestörten Migrationsverhalten transfizierter asPARP-1 Mikrogliazellen in der Schnittkultur führt, wurde ein antisense CD11a-Vektor kloniert, um mit diesem Vektor die Migrationsversuche, die bereits mit asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen durchgeführt wurden (siehe Kapitel 4.3.3), zu wiederholen. Damit sollte untersucht werden, ob die stark verminderte CD11a-Expression, die in der FACS-Analyse auf der Oberfläche von antisense PARP-1 BV-2 Zellen ermittelt werden konnte (siehe Kapitel 4.4), auch wirklich die Ursache für das gestörte Migrationsverhalten war.

4.5.1 RNA-Isolierung und PCR

Durch das Einklonieren einer gegen die mRNA des CD11a-Moleküls gerichteten antisense-Sequenz in den multiplen Klonierungsbereich eines pcDNA3.1(+)-Vektors sollte die Expression des Zielproteins, durch Behinderung der ribosomalen Translation der codierenden mRNA verhindert werden. Die einzelnen Schritte bis zur Erstellung des Transfektionsvektors wurden in Kapitel 3.2 bereits ausführlich beschrieben.

Für die Klonierung eines asCD11a-Vektors wurden dieselbe RNA (siehe Abbildung 4.1) und cDNA eingesetzt, die auch zur Konstruktion des asPARP-1-Vektors verwendet worden waren. Nachfolgend wurde mit der PCR durch zwei genspezifische Primer das CD11a-Konstrukt vervielfältigt. Zur Synthese des CD11a-Konstruktes wurden zwei spezielle Oligonucleotide verwendet, die Schnittstellen für die beiden Restriktionsenzyme Not I und Xba I besaßen (siehe 3.2.4.1). Anhand eines Agarose-Gels wurde die Vollständigkeit und Intaktheit des Konstruktes, das eine Größe von 900 bp besaß, überprüft. In den mitgeführten Kontrollen konnte kein Signal detektiert werden, weshalb davon ausgegangen werden konnte, daß die Amplifizierung spezifisch für das CD11a-Konstrukt war. Das Konstrukt wurde anschließend in den pCR 2.1-TOPO Vektor ligiert.

4.5.2 Ligation des CD11a-Konstruktes in den pCR2.1-TOPO Klonierungsvektor

Die Ligation des eluierten antisense-Konstruktes wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen durchgeführt. Das PCR-Produkt, das mit der Taq-Polymerase in der PCR amplifiziert worden war, wurde direkt mit Hilfe des Enzyms Topoisomerase I in den pCR 2.1-TOPO Vektor (Vektorkarte siehe Abbildung 3.2) eingefügt. Um den Einbau des Konstruktes in den pCR 2.1-TOPO Vektor nachzuweisen, wurde die DNA nach der Isolierung mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut. Das CD11a-Insert wurde hierfür mit den beiden Enzymen Not I und Xba I aus dem Vektor geschnitten.

Nach der Restriktion wurde die geschnittene Plasmid-DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen. **Abbildung 4.18** zeigt ein Gel nach Ligation und Restriktion des CD11a-Konstruktes mit den Enzymen Not I und Xba I aus dem pCR 2.1-TOPO Vektor. In der ersten Reihe ist auf dem Agarose-Gel der aufgetragene λ -DNA-Marker zu erkennen. In den Reihen zwei bis neun befinden sich die mit

den Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Proben, wobei jeweils zwei Banden zu erkennen sind. Auf der Höhe der 3,9 kb Markerbande befindet sich jeweils der geschnittene Vektor. Das aus dem Vektor herausgeschnittene CD11a-Konstrukt befindet sich mit einer Größe von 900 bp jeweils unterhalb der Vektorbande. Die unterschiedliche Intensität der Banden ist darauf zurückzuführen, daß verschiedene DNA-Konzentrationen aufgetragen wurden. Stärkere Signale spiegeln dabei hohe und schwächere Signale niedrige DNA-Konzentrationen wider.

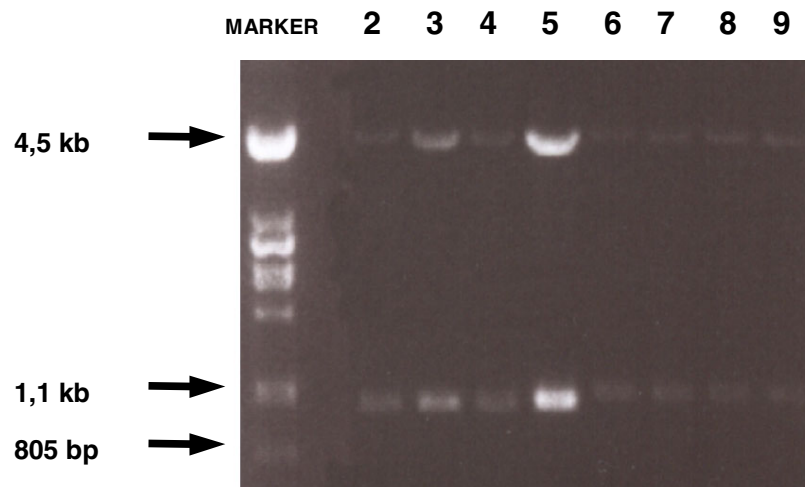


Abb. 4.18: Agarose-Gel nach Ligation und Restriktion des CD11a-Inserts (900 bp) mit den Enzymen Not I und Xba I aus dem pCR 2.1-TOPO Vektor (3,9 kb) in den Reihen 2 bis 9, Marker = λ -DNA-Größenmarker.

4.5.3 Ligation des CD11a-Konstruktes in antisense Orientierung in den pcDNA 3.1 (+) Vektor

Die Ligation des Inserts wurde mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt und erfolgte in antisense-Orientierung in den multiplen Klonierungsbereich des pcDNA3.1(+)-Vektors (Vektorkarte siehe Abbildung 3.3). Um den Einbau des antisense-Konstruktes in den entsprechenden Vektor nachzuweisen, wurde die DNA nach der Isolierung mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. **Abbildung 4.19** zeigt ein Gel nach Ligation und Restriktion des CD11a-Konstruktes mit den Enzymen Not I und Xba I aus dem Vektor. In der ersten Reihe ist der Marker zu erkennen. In den Reihen zwei bis vier wurde der geschnittene Vektor aufgetragen. Es sind jeweils zwei Banden zu erkennen, nämlich die des geschnittenen Vektors mit einer Größe von 5,0 kb und die des herausgeschnittenen CD11a-Inserts mit einer Größe von 900 bp. Alle aufgetragenen Proben zeigten eine intakte DNA. Die Vektor-DNA mit dem asCD11a-Konstrukt wurde nachfolgend teilsequenziert.

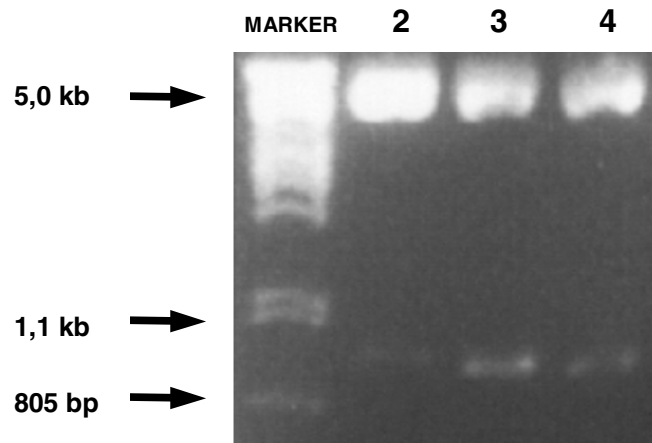


Abb. 4.19: Agarosegel nach Ligation und Restriktion des antisense CD11a-Konstruktes (900 bp) mit den Enzymen Not I und Xba I aus dem pcDNA3.1(+) Vektor (5,0 kb) in den Reihen 2 bis 4; Marker = λ -DNA-Größenmarker.

4.5.4 Teilsequenzierung des antisense CD11a-Vektors

Um die Insertion des CD11a-Fragmentes in den pcDNA3.1(+)-Vektor zu bestätigen, wurden die Übergangsbereiche zwischen Ausgangsvektor und Insert von einer Seite ansequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse der Firma DLMBC in Berlin, die mit einem automatischen Sequenzierer (ABI 373) nach dem Sanger-Coulson-Verfahren (SANGER et al.,1977) mit dem T7 Standardprimer durchgeführt wurden, wurden anschließend mit der original murinen CD11a-Sequenz verglichen. **Abbildung 4.20** zeigt den Sequenzabgleich, der mit dem NCBI BLAST Programm ermittelt wurde. Die Analyse ergab eine 100 %ige Sequenzübereinstimmung des inklonierten Konstruktes mit der original murinen CD11a-mRNA. Nach der Teilsequenzierung des antisense CD11a-pcDNA3.1(+) Vektors wurden BV-2 Mikrogliazellen mittels der Lipofectin-Methode und anschließender Zeocinselektion stabil damit transfiziert.

```

gb|AF065902.1|AF065902 Mus musculus strain DBA/2J integrin alpha L (Itgal) mRNA,
  cds
  Length = 3574

Score = 611 bits (308), Expect = e-173
Identities = 308/308 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 55  cttcacaattcctctacaggttctgaggcaaataatgtggagcgtcttttgcttttgtag 114
          |||
Sbjct: 941  cttcacaattcctctacaggttctgaggcaaataatgtggagcgtcttttgcttttgtag 882

Query: 115  gctcacaaaatgcttgccaatcccgatgatgtagcgggttatgtcgtgggccgactgat 174
          |||
Sbjct: 881  gctcacaaaatgcttgccaatcccgatgatgtagcgggttatgtcgtgggccgactgat 822

Query: 175  gttgcctttatcacttgctccccgtctgtaatgatgacaagcaccttgtagcatccgg 234
          |||
Sbjct: 821  gttgcctttatcacttgctccccgtctgtaatgatgacaagcaccttgtagcatccgg 762

Query: 235  cctggcaccagactcctctttgaacacgtgtgccaccacatagttgatggcacgaaagg 294
          |||
Sbjct: 761  cctggcaccagactcctctttgaacacgtgtgccaccacatagttgatggcacgaaagg 702

Query: 295  attggtcagcaagaacatgggctgcacgctgcctagcagaacatcggggttcttgttctg 354
          |||
Sbjct: 701  attggtcagcaagaacatgggctgcacgctgcctagcagaacatcggggttcttgttctg 642

Query: 355  cttaacgt 362
          |||
Sbjct: 641  cttaacgt 634
    
```

Abb. 4.20: Sequenzabgleich des in den pcDNA 3.1 (+) Vektor ligierten CD11a-Konstruktes mit der original murinen CD11a mRNA-Sequenz über das NCBI BLAST Programm. Die Analyse ergab eine 100 % ige Sequenzübereinstimmung (Identities 308 von 308).

4.6 Transfektion von BV-2 Zellen mit dem antisense CD11a-Vektor

4.6.1 Selektion mit Zeocin

Nach der Klonierung des antisense CD11a pcDNA3.1(+) Vektors wurden BV-2 Mikrogliazellen mit diesem Vektor oder dem Kontrollvektor stabil transfiziert. Die Erzeugung einer stabil transfizierten BV-2 Mikrogliazelllinie sollte dazu dienen, Zusammenhänge zwischen der verminderten CD11a-Expression in der Zellkultur und dem gestörten Migrationsverhalten von asPARP-1 BV-2 Mikrogliazellen in den Gewebeschnittkulturen aufzuklären. Als Transfektionsreagenz wurde Roti-Fect verwendet (siehe 3.3.1). Nach der Transfektion wurden die BV-2 Mikrogliazellen für zwei Wochen mit Zeocin selektiert (siehe 3.3.3). Die Konzentration des Selektionsantibiotikums wurde durch die Erstellung einer Toxizitätskurve an nativen BV-2 Zellen ermittelt (siehe Abb. 4.7). Die eingesetzte

Menge von 100 µg/ml Zeocin ermöglichte einerseits ein Überleben transfizierter Zellen und führte andererseits zum Tod der Zellen, die den Vektor nicht integriert hatten.

4.6.2 Nachweis der CD11a-Expression

Die Detektion der CD11a-Expression auf asCD11a-transfizierten BV-2 Zellen mit und ohne LPS-Stimulation erfolgte mit der FACS-Analyse (siehe 3.3.4.3). In **Abbildung 4.21** sind die Ergebnisse der FACS-Messung dargestellt. Auf der Oberfläche unstimulierter BV-2 Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, zeigte sich eine Basisexpression des Integrins von 9 %. Auf BV-2 Zellen, die mit dem asCD11a-Vektor transfiziert worden waren, konnte eine noch geringere Expression detektiert werden, diese betrug 4 %. So zeigten bereits unstimulierte Zellen eine signifikant verminderte Expression des Integrins auf asCD11a transfizierten BV-2 Zellen im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Zellen. Nach der Stimulation der Zellen mit 10 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS), stieg die Zahl an CD11a-Molekülen auf Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Zellen auf 20 % an. Die asCD11a transfizierten BV-2 Mikrogliazellen zeigten dagegen einen nur schwachen Anstieg auf 8 %, bezogen auf die Expression des Adhäsionsmoleküls auf ihrer Zelloberfläche. Die Expression des Integrins CD11a war dabei mit der auf unstimulierten Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Zellen ermittelten Expression vergleichbar. Damit ergab die Überprüfung der CD11a-Expression, daß das antisense-Konstrukt effektiv genug war, um sowohl mit als auch ohne LPS-Stimulation die Expression des CD11a-Moleküls auf asCD11a-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Zellen signifikant herabzusetzen. Die getesteten BV-2 Zellen wurden nachfolgend für Migrationsversuche in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur eingesetzt.

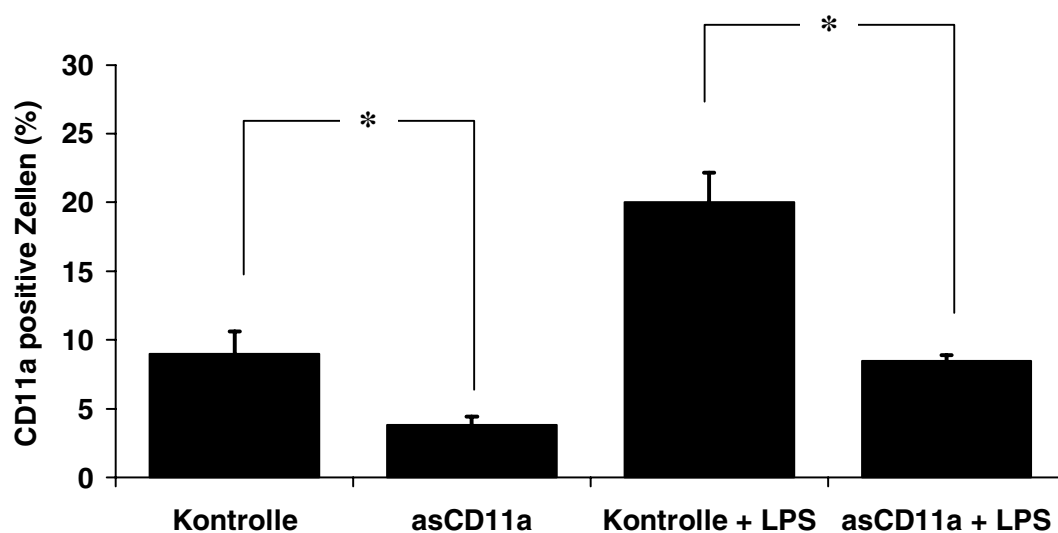


Abb. 4.21: Nachweis der CD11a-Expression auf asCD11a-transfizierten und Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen mit der FACS-Analyse. Kontrolle = Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Mikrogliazellen, asCD11a = antisense CD11a-transfizierte BV-2 Mikrogliazellen, LPS = 10 µg/ml Lipopolysaccharid. Mean±/± S.D, n = 5, * = p 0,05.

4.7 Superkultivierung vormarkierter antisense CD11a BV-2 Mikrogliazellen auf organotypischen hippocampalen Schnittkulturen und Analyse der regionspezifischen Migration

Mit den antisense CD11a-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen wurde der Migrationsversuch, der bereits mit asPARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen durchgeführt worden war (siehe 4.3.3), in der Schnittkultur wiederholt. In den Versuchen mit der organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSK) wurden sowohl Kontrollvektor- als auch antisense CD11a-transfizierte BV-2 Zellen eingesetzt. Das Hirngewebe wurde zur Induktion eines exzitotoxischen Schadens mit 5 μ M NMDA vorbehandelt. Nachfolgend wurden die Zellen, die mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Mini Ruby (MR) vormarkiert worden waren, auf die Schnittkulturen gegeben (siehe 3.4.3). **Abbildung 4.22** zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme MR vormarkierter asCD11a-transfizierter BV-2 Zellen. Die Zellen wurden unfixiert, nach dem Ablösen aus der Kulturflasche dokumentiert, weshalb ausschließlich amöboide Zellen auf der Abbildung zu erkennen sind. Mit dem Farbstoff konnten 100 % der Zellen rot vormarkiert werden. Die Zellen wiesen jedoch unterschiedliche Farbintensitäten auf. Das Migrationsverhalten dieser Zellen zu den Orten der neuronalen Schädigung wurde über drei Tage nach dem Transfer der Mikrogliazellen zunächst im intakten Hirngewebe im inversen Fluoreszenzmikroskop beobachtet und dokumentiert. Die statistische Auswertung erfolgte anschließend an Kryostatschnitten, die nach Fixierung der Lebendkulturen gemacht worden waren (siehe 3.4.4). Eine zusätzliche Färbung der Kryostatschnitte mit dem mikroglialen Marker IB4 ermöglichte eine genaue Identifizierung der Zellen, wobei auch intrinsische Mikroglia miterfasst werden konnte (siehe **Abbildung 4.23**).

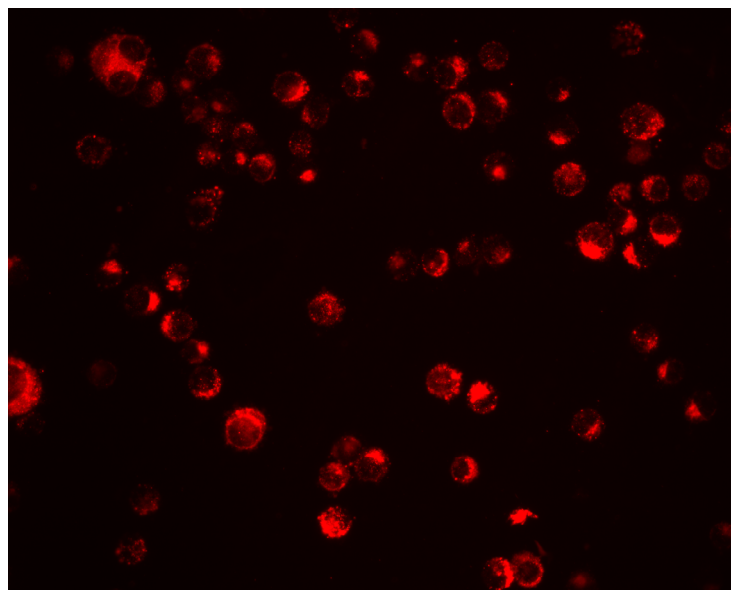


Abb. 4.22: Mini Ruby Vormarkierung asCD11a-transfizierter BV-2 Zellen vor dem Transfer auf die Gewebeschnittkulturen, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

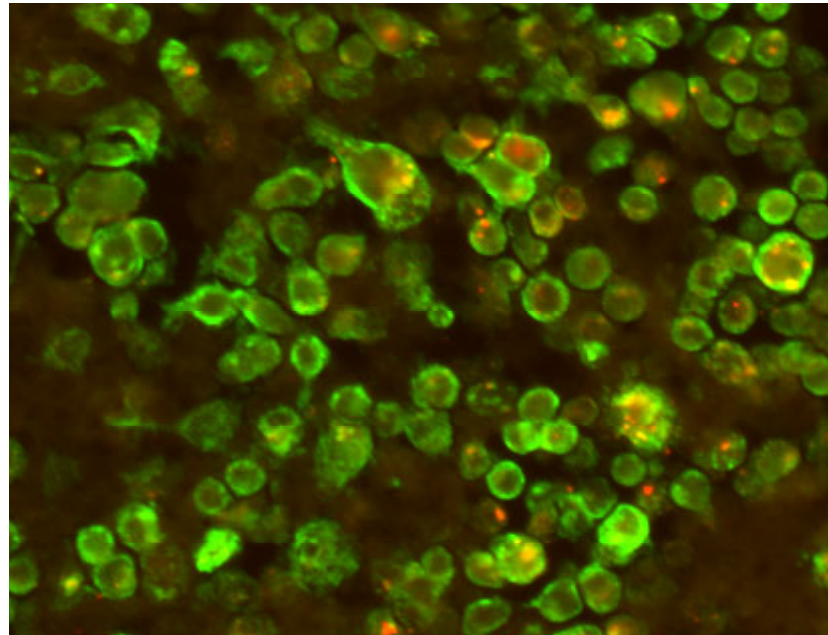


Abb. 4.23: Kolokalisation MR vormarkierter (Rotfluoreszenz) und IB4 gefärbter (Grünfluoreszenz) asCD11a BV-2 Mikrogliazellen in der OHSK nach Fixierung des Hirngewebes, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung.

Die **Abbildung 4.24** zeigt die quantitative Auswertung des Migrationsversuches. Die Regionspezifität der Einwanderung wurde als das Verhältnis von IB4+ und MR+ Zellen in den Bereichen der neuronalen Schädigung der Pyramidenschicht des Cornu ammonis und der Körnerschicht des Gyrus dentatus zu IB4+ und MR+ Zellen in anderen Regionen, wie beispielsweise dem Stratum oriens, dem Stratum radiatum oder dem Stratum lacunosum ermittelt. Die Ergebnisse der Quantifizierung zeigten, daß Mikrogliazellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, bereits in Kontrollschnitten zu präparationsbedingten kleineren Läsionen einwanderten. Das Verhältnis von spezifisch eingewanderten Zellen zu unspezifisch invadierten Zellen betrug 1,7. Bezogen auf das spezifische Migrationsverhalten von asCD11a BV-2 Zellen lag dieses Verhältnis in Kontrollschnitten bei 1,4. Es wanderten somit weniger Zellen spezifisch in die Läsionsgebiete ein. Nach einer Schädigung mit NMDA migrierten Kontrollvektor transfizierte Zellen massiv in die Regionen der neuronalen Schädigung (DG und CA-Region) ein, was sich in einer Erhöhung des Verhältnisses auf 3,3 von eingewanderten zu nicht invadierten Zellen äußerte. Das Migrationsverhalten der asCD11a Zellen nach einer NMDA-Schädigung war mit dem der Kontrollvektor-transfizierten Zellen in ungeschädigten Gewebekulturen vergleichbar. Das ermittelte Verhältnis von eingewanderten zu nicht invadierten Zellen betrug 1,7. Damit konnten BV-2 Zellen mit inhibierter CD11a-Expression in das Hirngewebe eindringen, es ließ sich aber bei diesen Zellen keine Migrationspräferenz in die Schädigungsgebiete feststellen, so daß die Zellen diffus im Schnitt verteilt zu finden waren.

Das Versuchsergebnis zeigt zusammenfassend mit den anderen in der OHSK gewonnenen Ergebnissen (siehe 4.3.3), daß die Fähigkeit von Mikrogliazellen, regionspezifisch zu Läsionsorten zu migrieren, zum einen von der CD11a-Expression abhängig ist und zum anderen, daß die Expression des Integrins CD11a durch das nukleäre Enzym PARP-1 in aktivierten Mikrogliazellen reguliert wird.

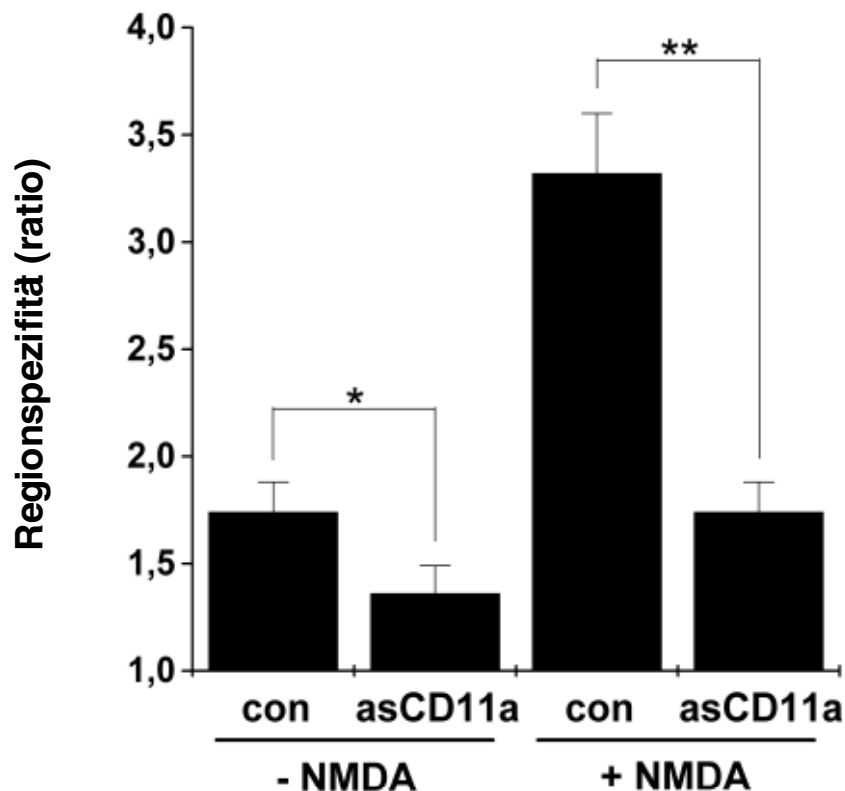


Abb. 4.24: Migrationsverhalten von asCD11a-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur. Regionspezifität der mikroglialen Migration zum Ort der neuronalen Schädigung von Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen (Con) und asCD11a-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen (asCD11a) vor und nach Induktion der neuronalen Schädigung mit 5 μ M NMDA (NMDA). Regionspezifität = (Zellzahl in der Pyramidenschicht des Cornu ammonis und der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus) – (Zellzahl außerhalb der neuronalen Schichten). Mean \pm S. D., n = 30, * = p < 0,05, ** = p < 0,005.

4.8 Untersuchungen zur PARP-1 regulierten mikroglialen CD11a-Expression

Mit der folgenden Versuchsreihe sollte der intrazelluläre Signalweg der Regulation der CD11a-Expression aufgeklärt werden. Von besonderem Interesse war dabei, ob das PARP-1-Protein allein oder die aktivierte und poly(ADP-ribosyl)ierte PARP-1 die CD11a-Expression in Mikrogliazellen reguliert. Weiterhin sollte analysiert werden, ob es weitere Moleküle neben der PARP-1 gibt, die einen Einfluß auf den intrazellulären Mechanismus der CD11a-Expression haben.

4.8.1 Messung der CD11a-Expression in Abhängigkeit von der PARP-1-Aktivität und der NF- κ B -Translokation

BV-2 Mikrogliazellen wurden mit 1mM des PARP-Inhibitors 3-Aminobenzamid (3-ABA) oder mit 20 μ M des NF- κ B-Phosphorylierungsinhibitors BAY 11-7085 (BAY) behandelt, mit 10 μ g/ml Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert und anschließend im FACS gemessen. Weiterhin wurde eine Kontrollgruppe, bestehend aus nativen BV-2 Zellen, mitgeführt. **Abbildung 4.25** zeigt, daß unstimulierte Kontrollzellen eine CD11a-Expression von 15 % besaßen. BV-2 Zellen, die mit LPS stimuliert worden waren, wiesen einen Anstieg des Oberflächenmoleküls auf 40 % auf. In der Gruppe, in der BV-2 Mikrogliazellen mit 3-ABA vorbehandelt worden waren, konnten 25 % CD11a positive Zellen ermittelt werden. Die Reduktion lag damit bei 15 % im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit LPS stimuliert worden waren. Die Abnahme der CD11a-Expression erreichte hier jedoch nicht das Niveau von Mikrogliazellen, die mit dem antisense PARP-1-Vektor transfiziert worden waren (siehe Abb. 4.18). In den asPARP-1-transfizierten Zellen sank die Expression auf 14 % CD11a positive Zellen im Vergleich zu LPS stimulierten Kontrollzellen. Damit wurde eine Reduktion von 26 % erzielt. Der Unterschied kann hier entweder damit begründet werden, daß in den 3-ABA behandelten Mikrogliazellen noch eine residuale PARP-1-Aktivität von <5 % vorlag oder daß ein PARP-1 unabhängiger Signalweg der CD11a-Expression existiert. Es liegt jedoch eher die Vermutung nahe, daß das PARP-Protein allein, auch ohne die katalytische Aktivität, einen Einfluß auf die Verminderung der CD11a-Expression nimmt. Hassa & Hottiger zeigten in ihrer Arbeit dazu, daß die PARP bei der Transkription vermutlich als Kofaktor wirkt, wobei es zu einer Protein-Protein-Interaktion zwischen der PARP und p65 im Nukleus und zu einer Modifizierung von NF- κ B und anderer Proteine kommt (HASSA & HOTTIGER, 1999). Auch Mikrogliazellen, die mit dem NF- κ B-Inhibitor und LPS behandelt worden waren, wiesen eine um 10 % verminderte CD11a-Expression nach LPS-Stimulation im Vergleich zu aktivierten Kontrollzellen auf. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, die mit der FACS-Messung gewonnen werden konnten, daß es bei der Inhibition der PARP durch 3-ABA zu einer verminderten CD11a-Expression auf der Oberfläche von BV-2 Mikrogliazellen nach der Stimulation mit LPS kam.

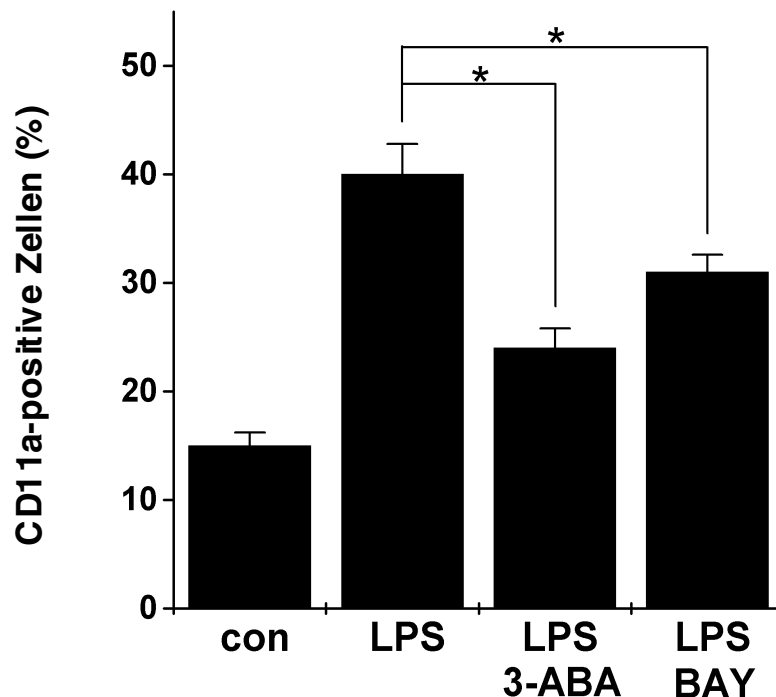


Abb. 4.25: CD11a-Expression in Abhängigkeit von der PARP-1-Aktivität und der NF- κ B-Translokation. FACS-Analyse der CD11a-Expression Kontrollvektor-transfizierter BV-2 Mikrogliazellen mit und ohne LPS Stimulation, Hemmung der PARP mit 3-Aminobenzamid (3-ABA) oder der I- κ B-Phosphoryllierung mit BAY 11-7085 (BAY). Mean \pm S.D., n = 5, * = p 0,05.

4.8.2 Bestimmung der PARP-1-Expression und der Translokation von NF- κ B nach Inhibition der PARP-1-Aktivität mit 3-ABA und der NF- κ B-Phosphoryllierung mit BAY

Abbildung 4.26 zeigt die Ergebnisse der Immunoblots isolierter Zellkerne. Die Expression des PARP-Proteins (116 kDa) wurde durch die Behandlung der Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen mit dem PARP-Inhibitor 3-ABA nicht verändert. In allen Versuchsgruppen konnte eine gleichmäßige Bande mit einer Größe von 116 kDa detektiert werden. In Bezug auf die NF- κ B-Translokation zeigten sich in den einzelnen Versuchsgruppen jedoch deutliche Unterschiede. In der unstimulierten Kontrollgruppe und in Zellen, die mit dem NF- κ B-Phosphoryllierungsinhibitor BAY 11-7085 (BAY) behandelt worden waren, konnte kein Signal für den Transkriptionsfaktor NF- κ B (nucleäre p65 Konzentration) detektiert werden. In Kontrollzellen, die mit LPS aktiviert worden waren, konnte dagegen eine starke Translokation des Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden. Diese wurde jedoch in Zellen, die mit 3-ABA inkubiert worden waren, reduziert. Um aufzuklären, ob dies auf einen PARP-abhängigen oder unabhängigen Effekt von 3-ABA zurückzuführen ist, wurde die nukleäre Translokation von NF- κ B in Lysaten isolierter Nuclei von unstimulierten und mit LPS-behandelten Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen untersucht (siehe **Abb. 4.29b**).

Zwischen beiden Versuchsgruppen konnte kein Unterschied in der nukleären p65 Konzentration ermittelt werden. Diese Ergebnisse bestätigen auch vorausgegangene Experimente von HASSA und OLIVER in denen gezeigt werden konnte, daß die nukleäre Translokation von p65 in PARP^{-/-} Zellen nach Stimulation mit ultraviolettem Licht oder TNF- α Behandlung nicht vermindert war (HASSA & HOTTIGER, 1999; OLIVER et al., 1999). Daher ist die geringgradige Abnahme der NF- κ B-Translokation nach der Behandlung mit 3-ABA vermutlich auf einen unspezifischen Effekt des Inhibitors zurückzuführen.

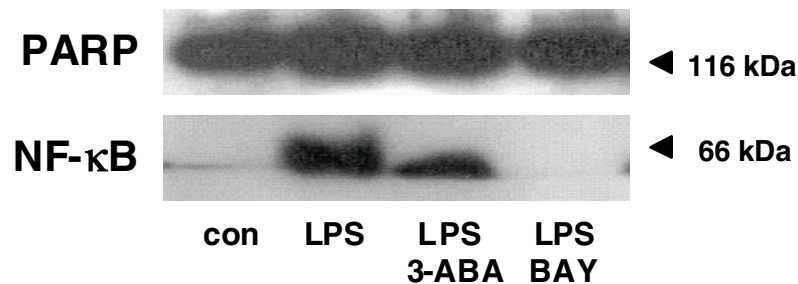


Abb. 4.26: Bestimmung der PARP-1-Proteinexpression und der Translokation von NF- κ B nach Inhibition der PARP-1-Aktivität mit 3-ABA und der NF- κ B-Phosphorylierung mit BAY. Immunoblot von Lysaten isolierter Zellkerne gegen PARP-1 und NF- κ B (p65).

4.8.3 Northern Blot Analyse der CD11a mRNA-Expression

Mit der Northern Blot Analyse (siehe 3.5.4) sollte untersucht werden, ob das PARP-1-Protein allein oder die aktivierte und poly(ADP-ribosyl)ierte PARP-1 die Expression der CD11a-mRNA direkt beeinflussen und somit auf der Transkriptionsebene regulierend eingreifen. Dafür wurden asPARP-1-transfizierte BV-2 Zellen und Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Zellen, die mit dem PARP-Inhibitor 3-ABA vorbehandelt worden waren, eingesetzt. In **Abbildung 4.27** ist eine verstärkte CD11a-mRNA-Expression nach Stimulation der Kontrollvektor-transfizierten Zellen mit LPS zu sehen. Diese konnte zum Teil durch die Inhibition der PARP mit 3-ABA oder durch die Hemmung der NF- κ B-Phosphorylierung mit BAY vermindert werden. Die Inkubation der Zellen mit beiden Inhibitoren gleichzeitig führte jedoch nicht zu einer doppelten bzw. noch stärkeren Verminderung der CD11a-mRNA-Expression.

Unstimulierte asPARP-1-transfizierte BV-2 Zellen zeigten eine deutlich schwächere CD11a-mRNA-Expression im Vergleich zu unstimulierten Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Zellen. Eine etwas stärkere Expression konnte nach LPS-Stimulation detektiert werden, jedoch lag diese ebenfalls niedriger als bei der Vektorkontrolle nach Aktivierung mit LPS. Weiterhin führte die Inhibition von NF- κ B in asPARP-1 Zellen nicht zu einer niedrigeren CD11a-mRNA-Expression als in asPARP Zellen ohne NF- κ B-Inhibition, was gegen eine NF- κ B-unabhängige Aktivität der PARP-1 spricht.

Die Ergebnisse zeigen, daß die CD11a-mRNA-Expression zum Teil auf transkriptioneller Ebene von einer kooperativen Aktion des PARP-1-Proteins und des Transkriptionsfaktors NF- κ B reguliert wird. In anderen Arbeiten konnte dazu gezeigt werden, daß die Expression von Adhäsionsmolekülen in anderen nicht mikroglialen Zellen durch NF- κ B reguliert wird (ROEBUCK & FINNEGAN, 1999) und weiterhin, daß die PARP-1 für eine spezifische transkriptionale Aktivierung von NF- κ B notwendig ist (OLIVER et al., 1999; KAMEOKA et al., 2000). Die verminderte Expression der CD11a-mRNA und die reduzierte Expression von CD11a-Molekülen auf der Oberfläche von BV-2 Zellen nach Inhibition der PARP reichte weiterhin aus (siehe Abb. 4.8 und Abb. 4.12), um die zielgerichtete mikrogliale Migration zu den neuronalen Läsionsorten zu unterbinden.

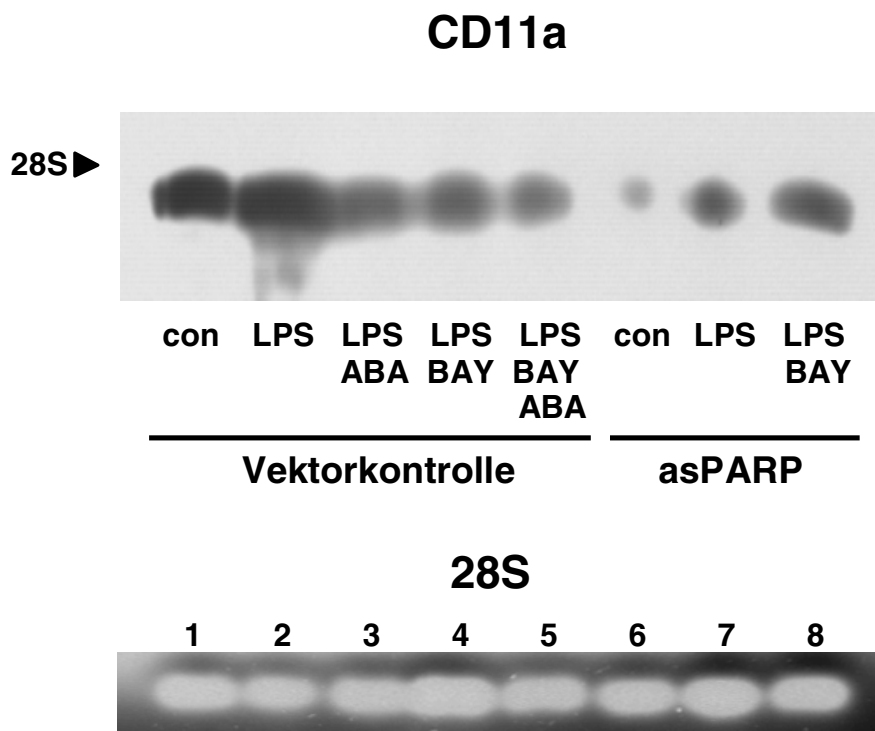


Abb. 4.27: Northern Blot Analyse der CD11a-mRNA-Expression in Kontrollvektor-transfizierten- und asPARP-1-transfizierten Mikrogliazellen mit und ohne LPS-Stimulation. Inhibition der PARP-1-Aktivität mit 3-ABA und der I- κ B-Phosphorylierung mit BAY. Con = unbehandelte BV-2 Mikrogliazellen. Der unterer Teil der Abbildung zeigt das Bandenmuster der 28s rRNA in dem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel. Das Bandenmuster bestätigt die gleichmäßige Probenladung.

4.8.4 Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen

Mit den bisherigen Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß die Expression des Integrins CD11a in aktivierten Mikrogliazellen durch die aktivierte PARP-1 und die Translokation von NF- κ B auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Es sollte nun weiterhin untersucht werden, ob eine Protein-Protein-Interaktion der aktivierten poly(ADP-ribose)ierten PARP-1 mit NF- κ B in aktivierten Mikrogliazellen vorliegt. Die direkten Protein-Protein-Interaktionen wurden mit Ko-Immunpräzipitationsexperimenten untersucht (siehe 3.5.5). Die Analysen wurden an Zellen durchgeführt, die mit dem pcDNA3.1(+) Kontrollvektor transfiziert worden waren. Da Histone und High-Mobility-Group (HMG) Proteine die wichtigsten Interaktionspartner der poly(ADP-ribose)ierten PARP-1 sind, wurden diese Moleküle in die Immunoblot-Analysen der Kernpräzipitate miteinbezogen. Während Histone keine Präzipitation mit dem PARP-1-NF- κ B-Komplex zeigten, konnte dagegen eine Interaktion von HMG-I (Y) mit dem PARP-1-NF- κ B-Komplex über die poly(ADP-ribose)ierte PARP-1 detektiert werden.

Abbildung 4.28 zeigt die Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitationsexperimente der direkten Protein-Protein-Interaktionen. In **Abbildung 4.28.a** ist die Expression des PARP-1-Proteins, des Transkriptionsfaktors NF- κ B und des High mobility group Proteins HMG-I(Y) nach der anti-PARP-1-Immunpräzipitation dargestellt. Die Expression des PARP-1-Proteins wurde durch die Behandlung der Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen mit dem PARP-Inhibitor 3-ABA oder mit dem I- κ B-Phosphorylierungsinhibitor BAY nicht verändert. In allen Versuchsgruppen konnte eine gleichmäßige Bande mit einer Größe von 116 kDa detektiert werden. In Bezug auf die NF- κ B-Expression zeigten sich in den einzelnen Versuchsgruppen jedoch deutliche Unterschiede. In der unstimulierten Kontrollgruppe und in Zellen, die mit dem NF- κ B-Phosphorylierungsinhibitor BAY 11-7085 (BAY) behandelt worden waren, konnte kein Signal für NF- κ B (nucleäre p65 Konzentration) detektiert werden. In Kontrollzellen, die mit LPS aktiviert worden waren, zeigte sich dagegen eine starke Expression des Transkriptionsfaktors. In aktivierten Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen mit einer PARP-Hemmung konnte ebenfalls eine Protein-Protein-Interaktion der PARP-1 mit NF- κ B nachgewiesen werden, jedoch war das Signal hier geringer. Diese Ergebnisse zeigen, daß zwischen der PARP-1 und NF- κ B in aktivierten Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen eine Protein-Protein-Interaktion zwischen der PARP-1 und NF- κ B besteht und zwar direkt über das PARP-1-Protein, ohne die katalytische Aktivität der PARP-1. Die Expression von HMG-I (Y) war in der mit LPS stimulierten Versuchsgruppe am stärksten. Das Signal nahm um etwa die Hälfte in den Versuchsgruppen ab, in denen die Zellen entweder mit dem PARP-Inhibitor 3-ABA oder dem NF- κ B-Phosphorylierungsinhibitor BAY behandelt worden waren. In der Kontrollgruppe konnte kein Signal detektiert werden. Die Ergebnisse zeigen, daß zwischen der PARP-1, NF- κ B und HMG-I (Y) eine direkte Interaktion in den Mikrogliazellen bestand, die mit LPS stimuliert worden waren und in denen die PARP aktiviert vorlag.

In **Abbildung 4.28b** sind die Ergebnisse der PARP-1- und der HMG-1(Y)-Expression nach der anti-NF- κ B-Immunpräzipitation dargestellt. Eine Interaktion zwischen der PARP-1 und NF- κ B konnte in Zellen nach LPS-Aktivierung und auch nach LPS-Stimulation und Inkubation mit dem PARP-Inhibitor 3-ABA detektiert werden. In Kontrollzellen konnte kein Signal nachgewiesen werden. Immunoblots, mit den Ergebnissen der NF- κ B-HMG-1(Y)-Interaktion, wiesen nach der Aktivierung mit LPS eine Ko-Immunpräzipitation der beiden Moleküle auf. In ruhenden Zellen konnte dagegen die Expression von HMG-1(Y) nicht gezeigt werden. Dieses Ergebnis bestätigt, daß nur in aktivierten Zellen mit einer ebenfalls aktivierten PARP das HMG-1(Y) exprimiert wird.

Die Immunoblots in **Abbildung 4.28 c** zeigen die PARP-1- und NF- κ B-Expression nach der anti-HMG-1(Y) Immunpräzipitation. Eine Ko-Immunpräzipitation konnte nur in LPS stimulierten Mikrogliazellen festgestellt werden. Wurde die PARP-1 mit 3-ABA inhibiert, so konnten anschließend weder die PARP-1 noch NF- κ B detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt nochmals deutlich, daß die direkte Interaktion zwischen der PARP-1, dem NF- κ B und dem HMG-1 (Y) nur in LPS stimulierten Mikrogliazellen mit aktivierter PARP-1 beobachtet werden konnte und dagegen nicht in ruhenden Mikrogliazellen oder Mikrogliazellen, in denen die PARP-1 mit 3-ABA inhibiert worden war.

Zusammenfassend wird die CD11a-Expression in aktivierten Mikrogliazellen auf der Transkriptionsebene über die Bildung eines Protein-Protein-Komplexes, bestehend aus der poly(ADPribose)lierten PARP-1, dem translozierten NF- κ B und dem High mobility group Protein HMG-1(Y), reguliert. Damit konnte der Nachweis eines direkten molekularen Signalweges von der PARP-1-Aktivität bis zur Kontrolle der regionspezifischen Migration in Mikrogliazellen erbracht werden.

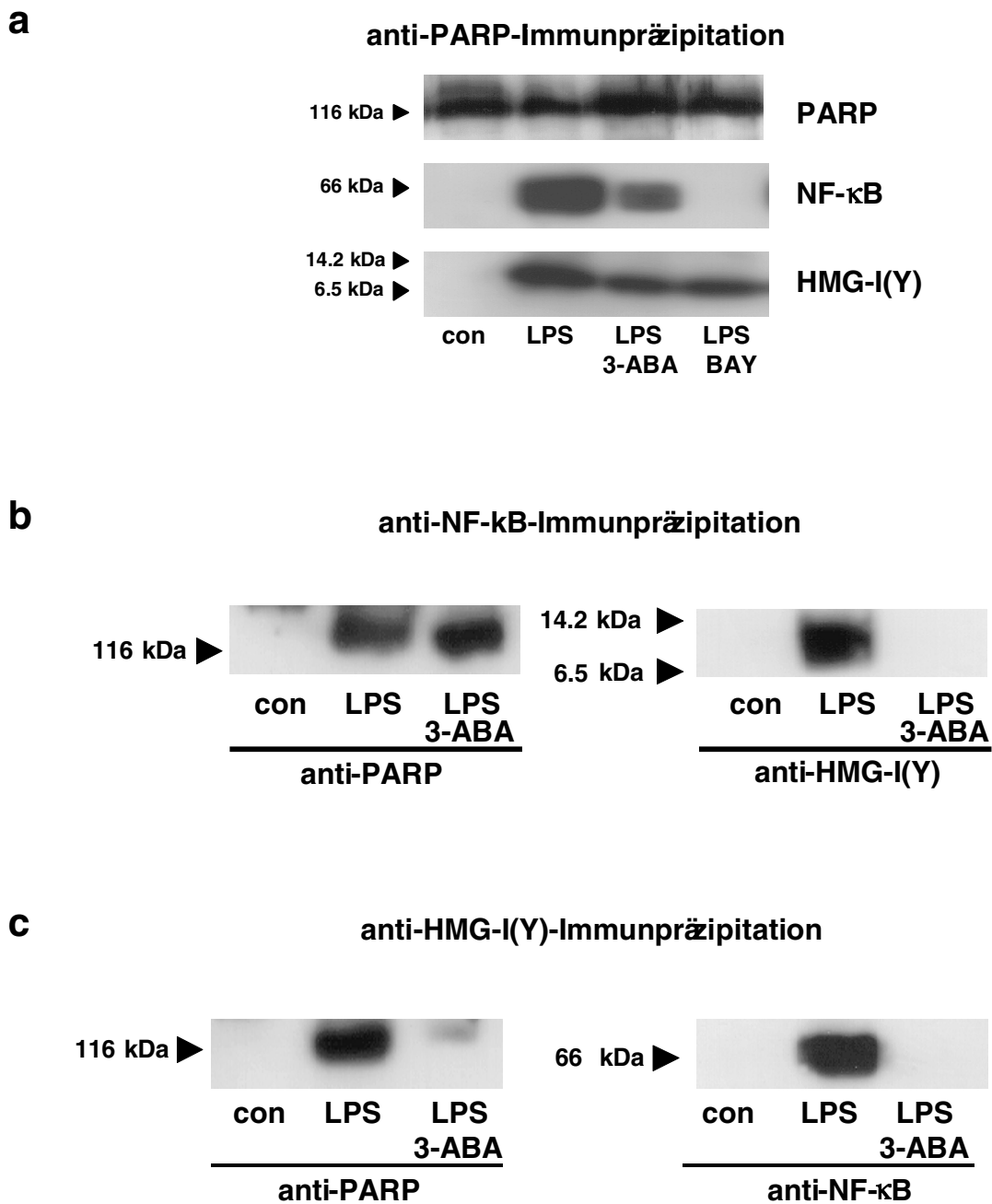


Abb. 4.28: Bildung eines PARP-1/NF-κB/HMG-I(Y)-Komplexes in aktivierten BV-2 Mikrogliazellen. **a)** anti-PARP-Immunpräzipitation **b)** anti-NF-κB-Immunpräzipitation **c)** anti-HMG-I(Y)-Immunpräzipitation. Ko-Immunpräzipitationsexperimente von Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen mit und ohne Stimulation mit LPS oder Hemmung der PARP-1- mit 3-Aminobenzamid (3-ABA), Inhibition der der I-κB-Phosphorylierung mit BAY, Con = unbehandelte BV-2 Mikrogliazellen.

4.8.5 Analysen zum Effekt des antisense PARP-1-Vektors auf die gesamtzelluläre Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B und des High mobility group Proteins HMG-I(Y) und auf die Translokation von NF- κ B

Da für die Ko-Immünpräzipitationsexperimente Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Zellen eingesetzt worden waren, und in den Funktionsanalysen asPARP-1-transfizierte BV-2 Zellen ihren Einsatz fanden (siehe 4.3 und 4.4), wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt, um einen Einfluß des antisense-Vektors auf die Gesamtproteinexpression von NF- κ B und von HMG-I(Y) und auf das Translokationsverhalten von NF- κ B auszuschließen.

Zunächst wurde die gesamtzelluläre Expression der PARP-1, sowie die von NF- κ B und HMG-1(Y) in Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen, ermittelt. **Abbildung 4.29a** zeigt, daß sich die beiden Versuchsgruppen nur in Bezug auf die PARP-1-Expression, die in asPARP-1 BV-2 Zellen durch den antisense-Vektor inhibiert worden war, unterschieden. Bezogen auf den Proteingehalt an NF- κ B und HMG-I(Y) zeigten die Immunoblots keinen detektierbaren Unterschied. Somit hatte der antisense-Vektor keinen Effekt auf die gesamtzelluläre Expression des NF- κ B und des HMG-I(Y). Zusätzlich erfolgte die Bestimmung von NF- κ B in Lysaten isolierter Nuclei aus Kontrollvektor- und antisense PARP-1-transfizierten BV-2 Zellen mit und ohne LPS-Stimulation. Die in **Abbildung 4.29b** dargestellten Immunoblots zeigen keinen Unterschied in der Signalintensität zwischen Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen. Damit hat der antisense-Vektor ebenfalls keinen Einfluß auf das Translokationsverhalten von NF- κ B.

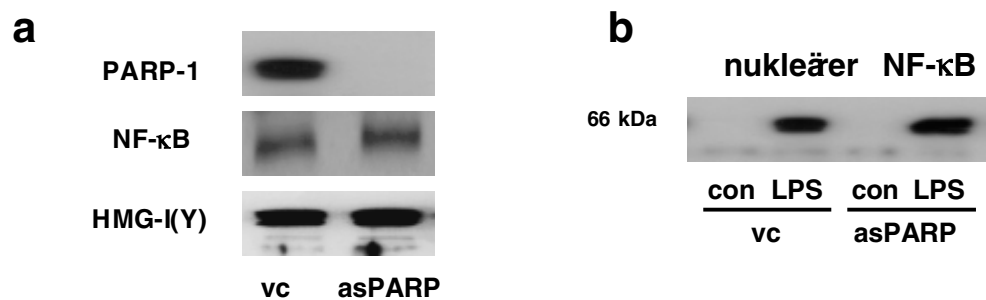


Abb. 4.29: Einfluß des antisense-Vektors auf die Gesamtproteinexpression der PARP, von NF- κ B und HMG-I(Y) und auf das Translokationsverhalten von NF- κ B. **a:** Gesamtzelluläre Expression der PARP, von NF- κ B und HMG-I(Y) in Kontrollvektor-transfizierten (VC) und asPARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen (asPARP). **b:** Nukleäre Translokation von NF- κ B (p65) in Lysaten isolierter Nuclei Kontrollvektor-transfizierter und asPARP-1-transfizierter BV-2 Mikrogliazellen mit und ohne LPS-Stimulation.

4.9 Inhibition der PARP-1 in primären Mikrogliazellen

Die bisherigen Versuche wurden an BV-2 Mikrogliazellen durchgeführt, einer permanenten Zelllinie, die ähnliche funktionelle und morphologische Eigenschaften wie primäre Mikrogliazellen aufweisen, aber dennoch nicht vollständig die physiologische Situation widerspiegeln. In den nun folgenden Versuchen mit der organotypischen hippokampalen Schnittkultur (OHSK) wurden primäre Mikrogliazellen eingesetzt, die transient mit dem asPARP-1-Vektor transfiziert worden waren. Ergebnisse, die bisher mit BV-2 Zellen über das Migrationsverhalten und die Induktion des neuronalen Zelltods nach Inhibition der PARP-1 gewonnen worden waren, sollten dadurch bestätigt werden.

4.9.1 Transfektion primärer Mikrogliazellen mit dem antisense PARP-1-Vektor und Selektion mit Zeocin

Primäre Mikrogliazellen wurden transient mit dem pcDNA 3.1(+) Vektor oder dem pcDNA 3.1(+) Vektor, ligiert mit dem antisense PARP-1-Konstrukt, transfiziert. Aufgrund der Schwierigkeit, mit konventionellen Transfektionssystemen eine hinreichend hohe Transfektionsrate und funktionelle Expression des antisense-Konstruktes zu erzielen, wurde eine neue Transfektionsmethode eingesetzt. Eine ursprünglich für die Gentherapie entwickelte Starburst-Dendrimer-Methode, bei der große Mengen an DNA mittels untoxischer Polyamidoamine (PAMAM-Dendrimere) in Zellen eingeschleust werden, wurde dafür optimiert.

Zunächst wurde getestet, ob PAMAM-Dendrimere bereits ohne den Einsatz von DNA einen Einfluß auf die PARP-1-Aktivität in primären Mikrogliazellen haben. Über die Inkorporation von radioaktiv markiertem NAD in 5×10^4 Zellen mit PAMAM-Dendrimer Behandlung wurde die PARP-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ermittelt. **Abbildung 4.30** zeigt die Ergebnisse der PARP-Aktivität nach der Inkubation mit verschiedenen PAMAM-Dendrimer-Konzentrationen. Bei niedrigen PAMAM-Dendrimer-Konzentrationen, die zwischen 10 µg und 50 µg lagen, konnten kaum Unterschiede in der PARP-Aktivität im Vergleich zu Kontrollzellen ermittelt werden. Bei einer Konzentration von 75 µg an PAMAM-Dendrimeren kam es zu einem leichten Anstieg der NAD Inkorporation von ca. 14.000 dpm in Kontrollzellen auf 15.000 dpm in mit PAMAM-Dendrimeren inkubierten Zellen. Bei den höher eingesetzten PAMAM-Konzentrationen von 175 µg und 350 µg konnte wiederum dieselbe PARP-1-Aktivität ermittelt werden, die auch in den unbehandelten Kontrollzellen gemessen worden war. Die Meßdaten zeigen insgesamt, daß die PAMAM-Dendrimere die PARP-1-Aktivität nicht wesentlich beeinflussten. Die eingesetzten Konzentrationen von 50 µg, 150 µg und 350 µg übten keinen Effekt auf die PARP-Aktivität aus. Für die Transfektionen primärer Mikrogliazellen wurde letztendlich eine Konzentration von 283 µg PAMAM-Dendrimeren auf 2×10^5 Zellen eingesetzt.

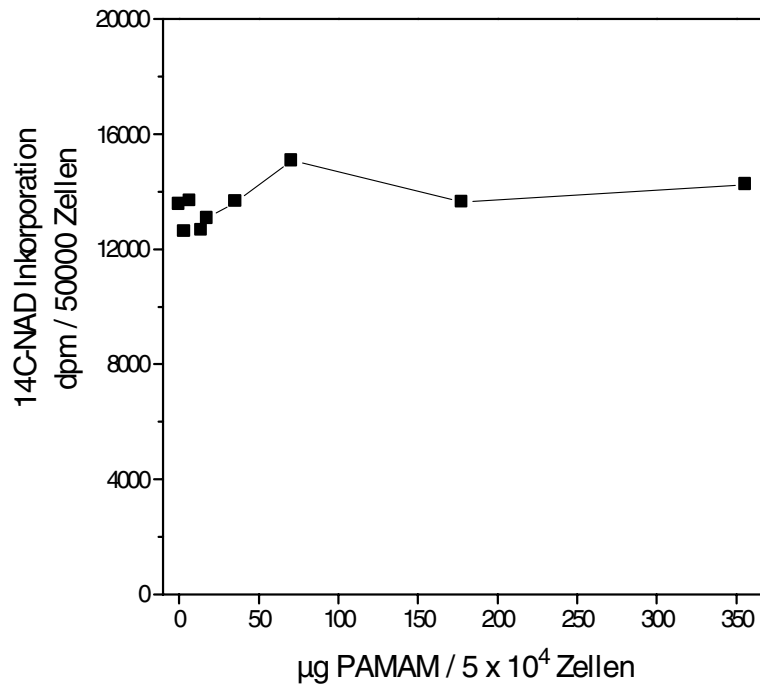


Abb. 4.30: Ermittlung des Effektes von PAMAM-Dendrimern auf die PARP-1-Aktivität in primären Mikrogliazellen über die Inkorporation von radioaktiv markiertem NAD.

Abbildung 4.31 zeigt die Ergebnisse von Vorversuchen, mit denen das optimale Verhältnis von DNA zu PAMAM-Dendrimern (mol/mol) für die transiente Transfektion primärer Mikrogliazellen ermittelt wurde. Die PARP-1-Aktivität wurde nach der Inkubation mit drei verschiedenen DNA-Konzentrationen des asPARP-1-Vektors (5, 10 und 50 µg) mit jeweils 5×10^4 Zellen und der Zugabe von PAMAM-Dendrimern in verschiedenen Überschüssen ermittelt. In den Versuchen, bei denen 50 µg DNA eingesetzt worden waren, ergab sich die stärkste Inhibition bei einem 1 zu 1 Verhältnis von DNA zu PAMAM-Dendrimern. Die Inkorporation von radioaktiv vormarkiertem NAD in die Zellen wurde dabei von ca. 12000 dpm auf 2000 dpm reduziert und sank damit um das sechsfache im Vergleich zu Kontrollzellen ab. Bei 10 µg eingesetzter DNA konnte die stärkste Inhibition bei einem doppelten Überschuss an PAMAM-Dendrimern ermittelt werden. Der Einbau von radioaktivem NAD sank von ca. 12000 dpm auf 5800 dpm. Die PARP-1-Aktivität wurde damit um die Hälfte reduziert. Die stärkste Inhibition der PARP-1-Aktivität konnte bei einer DNA-Konzentration von 5 µg und 5-fachen PAMAM-Dendrimerüberschuss erzielt werden. Für die Transfektionen mit primären Mikrogliazellen wurde dieses ermittelte Verhältnis von DNA zu PAMAM-Dendrimern eingesetzt, da der Einbau von vormarkiertem NAD von 12000 dpm auf nahezu 0 dpm reduziert werden konnte. Anschließend erfolgte eine Kurzzeitselektion mit 10 µg/ml des Antibiotikums Zeocin, um eine hinreichende Suppression der PARP-1-Proteinexpression zu erzielen. Die Zeocinkonzentration von 10 µg/ml wurde durch das Erstellen einer Toxizitätskurve an nativen primären Mikrogliazellen ermittelt.

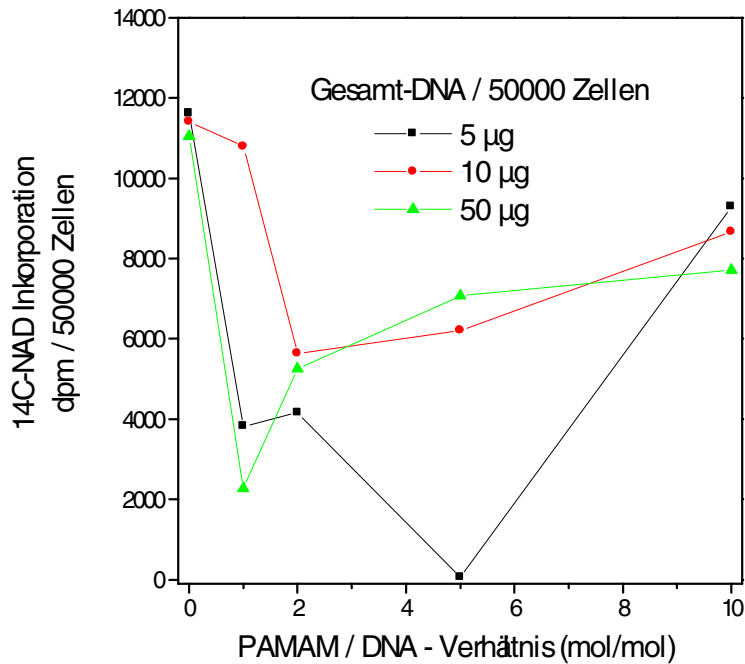


Abb. 4.31: Ermittlung des optimalen Verhältnisses von DNA zu PAMAM-Dendrimern (mol/mol) für die transiente Transfektion primärer Mikrogliazellen. Messung der PARP-1-Aktivität durch die Inkorporation von radioaktiv markiertem NAD in primäre Mikrogliazellen nach Transfektion der Zellen mit dem antisense PARP-1 pcDNA3.1(+)-Vektor und PAMAM-Dendrimern als Transfektionsreagenz.

4.9.2 Nachweis der PARP-1-Aktivität und der PARP-1-Protein-Expression in transfizierten primären Mikrogliazellen

Nach der transienten Transfektion mit den PAMAM-Dendrimern und der Kurzzeitselektion mit Zeocin wurden die primären Mikrogliazellen nach einem Tag und nach fünf Tagen in der Kultur auf die PARP-1-Aktivität überprüft. Die fünf Tage wurden übereinstimmend mit dem Zeitfenster der Versuche in den organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSK) gewählt, in denen die Primäzellen zunächst zwei Tage mit Mini Emerald (ME) vormarkiert und anschließend für drei Tage auf den Schnittkulturen inkubiert worden waren.

Abbildung 4.32a zeigt die Messung der PARP-1-Aktivität in Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen. Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, zeigten einen Tag nach der Transfektion eine ungestörte PARP-Aktivität, die 100 % betrug. Primäre Mikrogliazellen, die mit dem antisense PARP-1-Vektor transfiziert worden waren, wiesen einen Tag nach der Transfektion und mit Beginn der Zeocinselektion eine verminderte PARP-1-Aktivität auf. Die ermittelte PARP-Aktivität lag bei ca. 30 % und war damit um den dreifachen Wert, im Vergleich zu den Kontrollzellen, reduziert. Fünf Tage nach der transienten Transfektion stieg die PARP-1-Aktivität in den antisense PARP-1-transfizierten Zellen leicht an und betrug dann 40 %. Die ermittelte

Aktivität war jedoch im Vergleich zu Kontrollzellen immer noch deutlich und zwar um den Faktor 2,5 reduziert.

In **Abbildung 4.32b** sind die Ergebnisse von Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten Zellen fünf Tage nach der Transfektion dargestellt. Die Werte zeigen eine Verminderung der PARP-1-Aktivität um 40,4 +/- 3,0 % in transient asPARP-1-transfizierten Zellen im Vergleich zur unveränderten PARP-1-Aktivität in Kontrollvektor-transfizierten primären Mikrogliazellen, die bei 100 +/- 6,3 % lag.

Abbildung 4.32c zeigt die Ergebnisse des Immunoblots fünf Tage nach der Transfektion mit einer deutlichen Erniedrigung des PARP-1-Proteins in asPARP-1-transfizierten Primärzellen im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten Primärzellen.

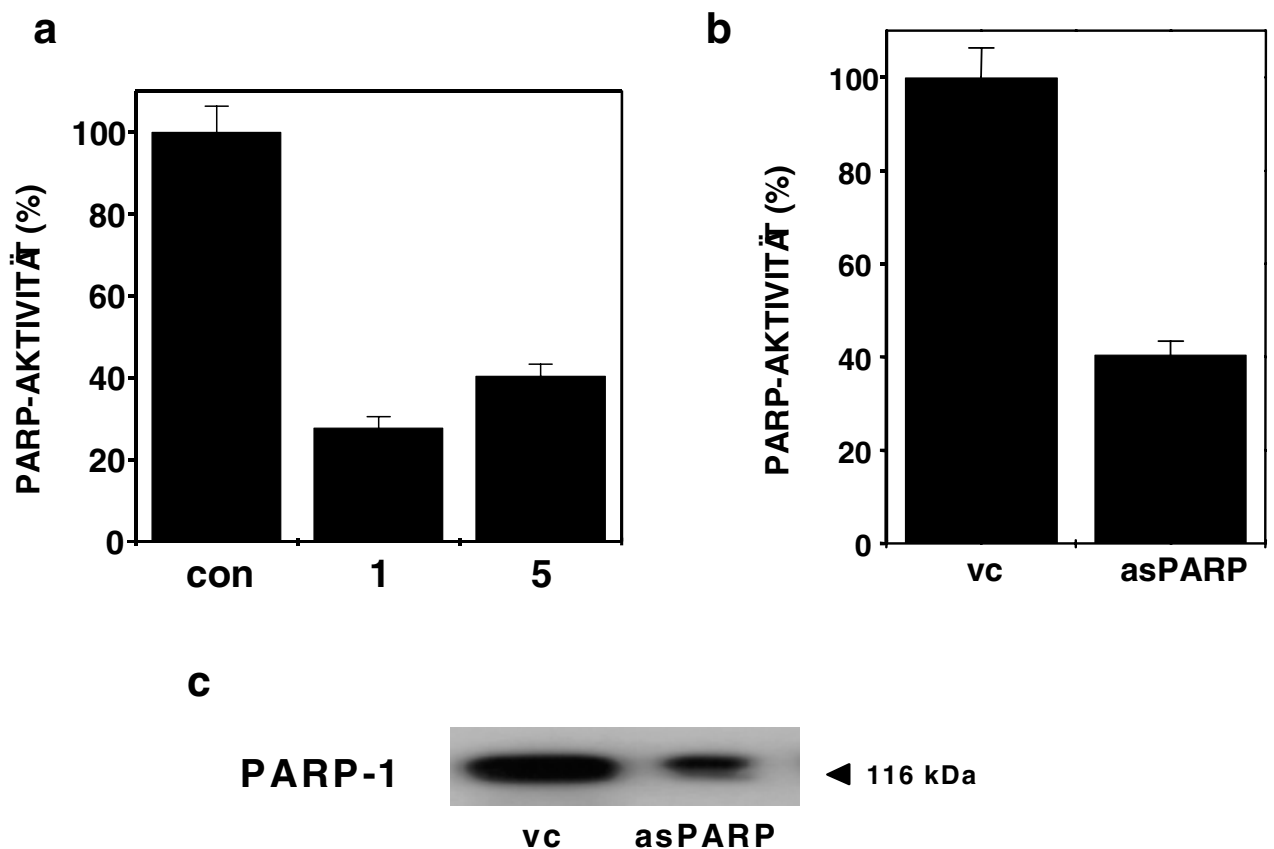


Abb. 4.32: a) PARP-Aktivität nach der transienten Transfektion mit PAMAM-Dendrimeren und der Kurzzeitselktion mit Zeocin in primären Kontrollvektor- (con) und asPARP-1-(asPARP) transfizierten Mikrogliazellen nach einem Tag (1) und nach fünf Tagen (5) in der Kultur. b) PARP-1-Aktivität von Kontrollvektor- (vc) und asPARP-1-(asPARP) transfizierten primären Mikrogliazellen fünf Tage nach der Transfektion. c) Residuale PARP-1-Proteinexpression in antisense PARP-1-transfizierten (asPARP) und Kontrollvektor-transfizierten (vc) primären Mikrogliazellen.

4.9.3 Superkultivierung vormarkierter primärer antisense PARP-1 Mikrogliazellen auf organotypischen hippocampalen Schnittkulturen

Nachdem eine ausreichende Suppression der PARP-1 in antisense PARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen festgestellt werden konnte (siehe 4.9.2), wurden diese Zellen, sowie Primärzellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, für Versuche in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSK) eingesetzt. Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei denen, die bereits für die Schnittkulturen mit BV-2 Mikrogliazellen beschrieben worden sind (siehe 3.4). Die Induktion des exzitotoxischen Schadens in den OHSK erfolgte ebenfalls mit 5 μ M NMDA. Nachfolgend wurden die transfizierten und mit Mini Emerald (ME) vormarkierten primären Mikrogliazellen auf die Schnittkulturen gegeben. Die Stärke des neuronalen Schadens und die Migration der extern aufgebrauchten Primärzellen zu den neuronalen Läsionsorten wurden drei Tage nach dem Transfer dieser Zellen ermittelt.

4.9.3.1 Untersuchungen zum neuronalen Zelltod und Vitalitätsbestimmung transfizierter Mikrogliazellen in der Schnittkultur

Mit diesen Versuchen sollte die Hypothese getestet werden, ob eine Hemmung der mikroglialen PARP-1 vor einem sekundären neuronalen Zellschaden schützt. Zur Ermittlung der neuronalen Zelltodrate in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis wurden die lebenden Hirnschnitte drei Tage nach dem Transfer von Mini Emerald (ME) vormarkierten Mikrogliazellen mit dem roten Fluoreszenz- und Zelltodmarker Propidiumjodid (PI) angefärbt. Die Anfärbung wurde zunächst im inversen Fluoreszenzmikroskop beobachtet und dokumentiert. Die statistische Auswertung erfolgte nachfolgend an Kryostatschnitten, die nach Fixierung der Lebendkulturen gemacht worden waren.

Abbildung. 4.33 zeigt Bilder der Fluoreszenzmikroskopie. Dargestellt sind die unterschiedlichen Versuchsgruppen nach Färbung des intakten Hirngewebes mit PI. Die Aufnahmen demonstrieren eine unterschiedliche Intensität in der Rotfluoreszenz, die mit dem neuronalen Schaden korreliert. Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte eine nur leichte und diffuse Fluoreszenz. Nach Schädigung der Schnittkulturen mit NMDA wurde der Primärschaden als breites, rot gefärbtes Zellband in der CA-Region sichtbar. In dem Hirngewebe, das vor der Schädigung mit 3-ABA vorbehandelt worden war, war die Rotfluoreszenz dagegen schwächer ausgeprägt. Der höchste neuronale Schaden und damit die größte Fluoreszenzintensität konnte in der Gruppe mit Kontrollvektor-transfizierten primären Mikrogliazellen und NMDA-Läsion ermittelt werden. In dem Hirngewebe, das mit dem unspezifischen PARP-Inhibitor 3-ABA behandelt und mit Mikrogliazellen inkubiert worden war, war eine geringere Rotfluoreszenz als in der Gruppe mit Kontrollvektor-transfizierten Mikrogliazellen und NMDA-Läsion zu erkennen. Die geringste Rotfluoreszenz wurde jedoch in Hirnschnitten beobachtet, die mit Zellen inkubiert worden waren, deren mikrogliale PARP-1 über den antisense-Vektor ausgeschaltet war.

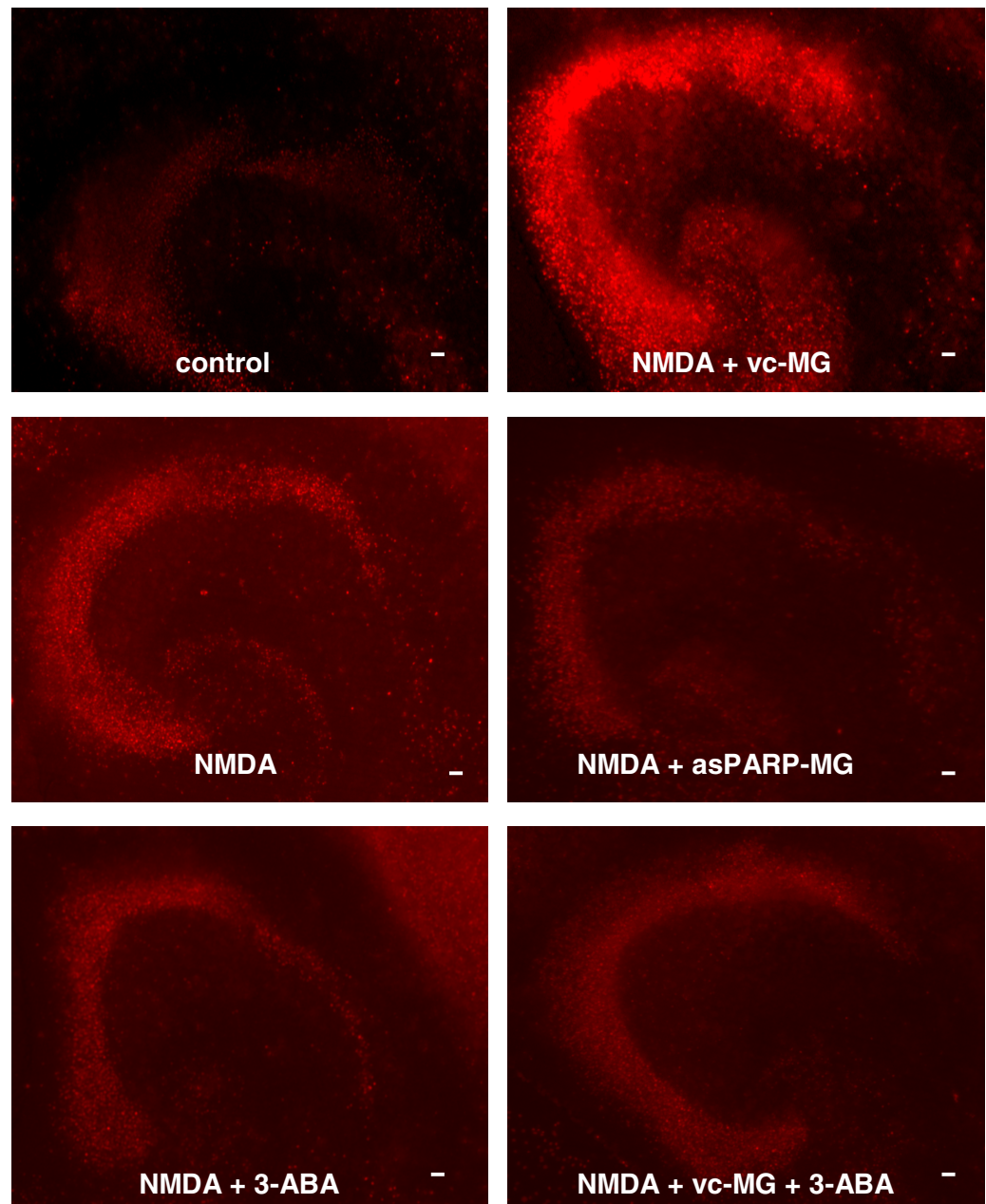


Abb. 4.33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen PI positiver Zellen in den neuronalen Schichten der OHSK drei Tage nach Induktion eines Primärschadens mit NMDA. Kontrolle = unbehandelte Schnittkulturen; NMDA = Induktion des Primärschadens mit 5 μ M NMDA; 3-ABA = Inhibition der PARP im gesamten Hirngewebe mit 1 mM 3-ABA, vc-MG = Transfer von Kontrollvektor-transfizierten primären Mikrogliazellen auf die Oberfläche der Schnittkulturen; asPARP-MG = Transfer von asPARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen auf die Oberfläche der Schnittkulturen. Skala: 40 μ m.

Abbildung 4.34 zeigt die quantitative Auswertung der Anzahl PI positiver Zellen in den neuronalen Schichten des Gyrus dentatus (DG) und des Cornu ammonis (CA). Nach Vorschädigung mit NMDA kam es in allen Versuchsgruppen zu einem Anstieg der Zelltodrate (Primärschaden) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Schnittkulturen, die mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-ABA) vorbehandelt worden waren, wiesen jedoch eine um die Hälfte verminderte Zelltodrate im Vergleich

zu dem Gewebe auf, das nur mit NMDA inkubiert worden war. Die Gruppe, in der Kontrollvektor-transfizierte Mikrogliazellen nach NMDA-Schädigung auf den Schnitt gegeben worden waren, zeigte einen massiven Sekundärschaden, der nahezu doppelt so groß wie der nur durch NMDA induzierte Primärschaden war. Dieser Sekundärschaden konnte erheblich, d. h. um mehr als die Hälfte in Schnitten reduziert werden, die mit antisense PARP-1-transfizierten Zellen nach NMDA-Schädigung inkubiert worden waren. In Schnittkulturen, die vor dem Transfer von Kontrollvektor-transfizierten Mikrogliazellen mit dem unspezifischen PARP-Inhibitor 3-ABA vorbehandelt worden waren, war ebenfalls eine Reduktion des neuronalen Sekundärschadens zu beobachten. Nach dem Transfer asPARP-1-transfizierter primärer Mikrogliazellen wurde dieser Sekundärschaden jedoch nahezu aufgehoben. Weiterhin war die neuronale Protektion durch primäre asPARP-1 Mikrogliazellen effektiver als die Protektion durch die PARP-Inhibition im gesamten Gewebe durch 3-ABA. Die asPARP-1 Mikrogliazellen waren sogar in der Lage, den neuronalen Schaden auf einen Wert herabzusetzen, der signifikant unter dem des Primärschadens durch NMDA-Behandlung lag. Dieses Ergebnis bestätigt die neuroprotektive Tendenz der Experimente, die mit asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen gemacht worden waren. Interessanterweise lag die Zahl der toten hippocampalen Neurone sogar unter dem Niveau des Primärschadens, ohne nachfolgende Zugabe von Mikrogliazellen und zwar noch deutlicher, als im Falle der zugegebenen asPARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen in den vorausgegangenen Experimenten (siehe Abb.4.10 und Abb. 4.11). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß eine Hemmung der mikroglialen PARP-1 vor einem sekundären neuronalen Schaden im lebenden Hirngewebe schützt. Die spezifische Ausschaltung der PARP-1 in primären Mikrogliazellen führte nicht nur zu einer kompletten Verhinderung eines neuroinflammatorischen Sekundärschadens, sondern sogar zu einer verbesserten Neuroprotektion initial geschädigter Neurone.

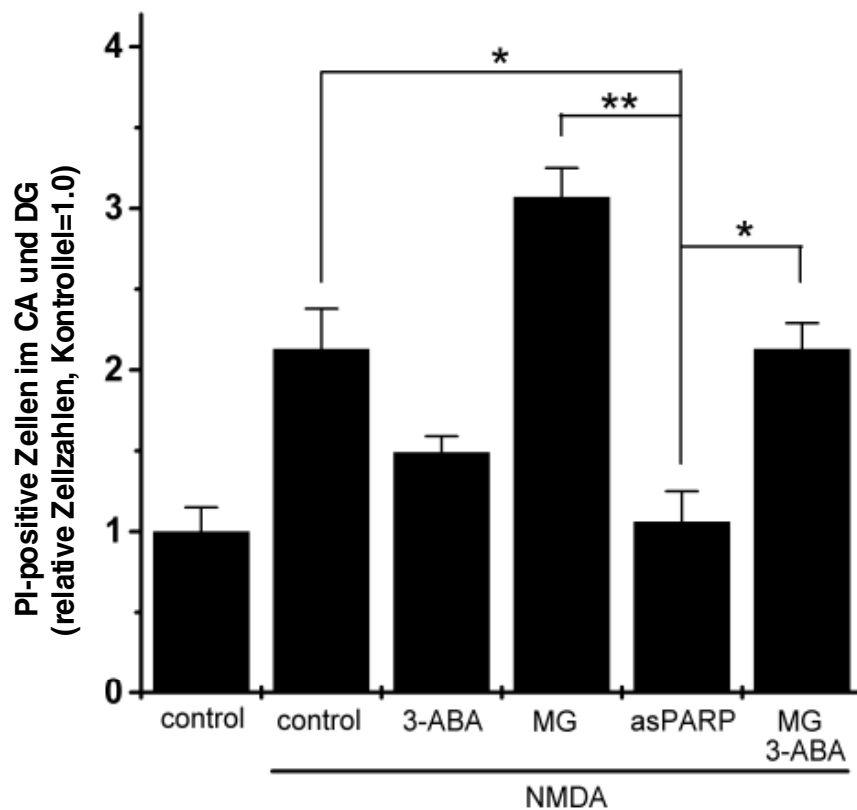


Abb. 4.34: Quantifizierung der PI-positiven Zellen in den neuronalen Zellschichten der OHSK drei Tage nach Induktion des exzitotoxischen Primärschadens und dem Transfer primärer Mikrogliazellen. control = Kontrolle = unbehandelte Schnittkulturen, NMDA = Induktion des Primärschadens mit 5 μ M NMDA; 3-ABA = Inhibition der PARP im gesamten Hirngewebe mit 1 mM 3-ABA, MG = Kontrollvektor-transfizierte primäre Mikrogliazellen, asPARP = asPARP-1-transfizierte primären Mikrogliazellen, Mean \pm S. D., n = 30, * = p < 0,05, ** = p < 0,005.

Wie bereits in den Versuchen mit den transfizierten BV-2 Mikrogliazellen wurde auch hier die Vitalität der primären Mikrogliazellen nach der Invasion in das Hirngewebe überprüft. (siehe 4.3.2). Primäre Mikrogliazellen zeigten nach dem Transfer auf die Schnittkulturen eine leicht verminderte Vitalität, die durch die Ermittlung des Verhältnisses von PI und ME doppelgefärbten zu rein ME positiven Zellen ermittelt wurde. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen festgestellt werden.

4.9.3.2 Analyse der regionspezifischen Migration

In der Schnittkultur wurde weiterhin die Fähigkeit der asPARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen, gerichtet zu den Orten der Neurodegeneration zu migrieren, untersucht. Die regionspezifische Migration wurde ebenso wie bei den Versuchen mit den transfizierten BV-2 Zellen ermittelt (siehe 4.3.3). **Abbildung 4.35** zeigt, daß Kontrollvektor-transfizierte primäre Mikrogliazellen

spezifisch in die Gebiete der neuronalen Läsion migrierten, während asPARP-1-transfizierte Zellen nicht in der Lage waren, regionspezifisch einzuwandern. Die Inhibition der PARP mit 3-ABA im gesamten Hirngewebe führte zu einer gestörten Migration der Mikrogliazellen, jedoch nicht in dem Maße, wie sie bei asPARP-1-transfizierten Mikrogliazellen zu finden war. Interessanterweise zeigten asPARP-1-transfizierte primäre Mikrogliazellen eine Restaktivität der PARP von $40,4 \pm 3,0 \%$ (siehe Abb. 4.31b) im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten Zellen, während die PARP-Aktivität primärer Mikrogliazellen, die mit 1 mM 3-ABA behandelt worden waren, unter 5 % lag. Trotzdem führte die Transfektion von Mikrogliazellen mit dem asPARP-1-Vektor im Vergleich zu primären Mikrogliazellen, deren PARP mit 3-ABA inhibiert worden war, zu einer höheren Neuroprotektion und vermehrten Störung der Migration im gesamten Hirngewebe.

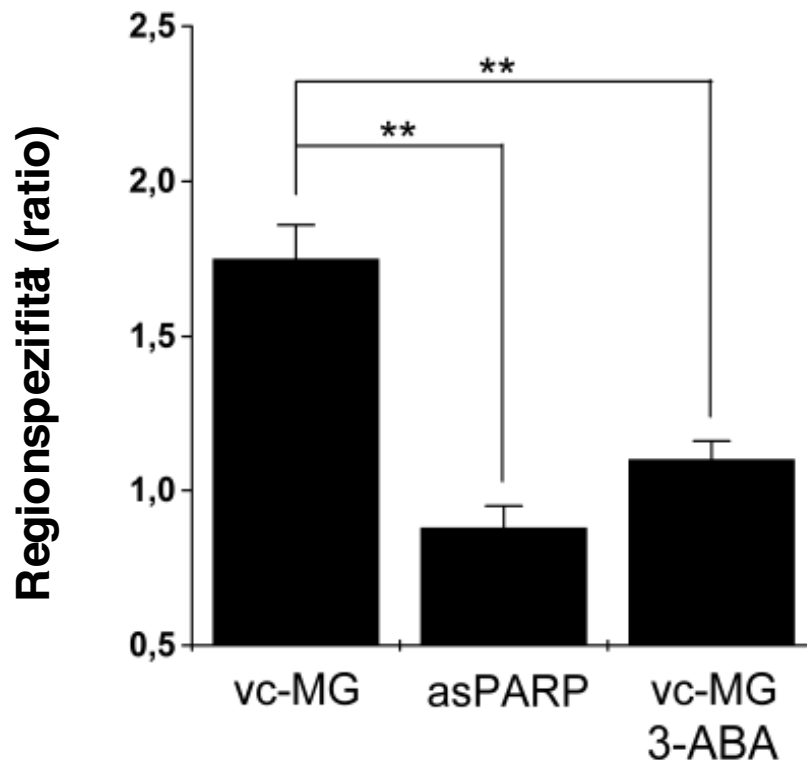


Abb. 4.35: Migration Kontrollvektor-transfizierter (vc-MG) und antisense PARP-1-Vektor transfizierter primärer Mikrogliazellen (asPARP) nach Induktion der neuronalen Schädigung mit $5 \mu\text{M}$ NMDA. 3-ABA = Inhibition der PARP im gesamten Hirngewebe mit 1 mM 3-ABA, vc-MG = Kontrollvektor-transfizierte primäre Mikrogliazellen, asPARP = asPARP-1-transfizierte primäre Mikrogliazellen, Regionspezifität = (Zellzahl in der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis und der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus) – (Zellzahl außerhalb der neuronalen Schichten). Mean \pm S. D., n = 30, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$.

4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit den Ergebnissen, die sowohl mit der permanenten Mikrogliazelllinie BV-2 als auch mit den primären Mikrogliazellen erzielt wurden, konnte zusammenfassend gezeigt werden, daß :

- ▶ **die spezifische Ausschaltung der PARP-1 in Mikrogliazellen exzitotoxisch geschädigte Neurone in lebendem Hirngewebe vor sekundärer Schädigung durch die Invasion aktivierter Mikrogliazellen schützt.**
- ▶ **dieser Schutz vor sekundärer neuronaler Schädigung mit einer gestörten Migration der Mikrogliazellen in die neuronale Degenerationszone korreliert.**
- ▶ **die Migration über die Expression des β_2 -Integrins CD11a reguliert wird, das transkriptionell über einen Protein-Protein-Komplex aus der poly(ADP-ribosyl)ierten PARP-1, dem translozierten NF- κ B und HMG-I(Y) reguliert wird.**
- ▶ **durch die spezifische Ausschaltung der mikroglialen PARP-1 eine deutlich höhere Neuroprotektion erreicht werden kann, als durch die Hemmung der PARP-1 im gesamten Hirngewebe.**

Die **Abbildung 4.36** zeigt schematisch die Beteiligung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) an der Mikrogliaaktivierung und an der CD11a-Expression. Durch NMDA wird im Hirngewebe ein Primärschaden induziert. Mikrogliazellen werden daraufhin durch bestimmte Signale aus der Umgebung stimuliert und verändern ihre morphologischen und funktionellen Eigenschaften. In aktivierten Mikrogliazellen werden der Transkriptionsfaktor NF- κ B und die PARP aktiviert. Die aktivierte PARP greift über die Interaktion mit dem translozierten NF- κ B und dem High Mobility Protein HMG-I(Y) in den Aktivierungsprozeß der Mikrogliazelle ein. Über die Bildung eines Protein-Protein-Komplexes erfolgt dann die Regulation der CD11a-mRNA-Expression. Durch den Anstieg des β_2 -Integrins CD11a auf der Oberfläche aktivierter Mikrogliazellen wird es diesen Zellen ermöglicht, regionspezifisch zu den Orten der Neurodegeneration zu migrieren, um sich dort an der Ausbildung eines neuronalen Sekundärschadens zu beteiligen.

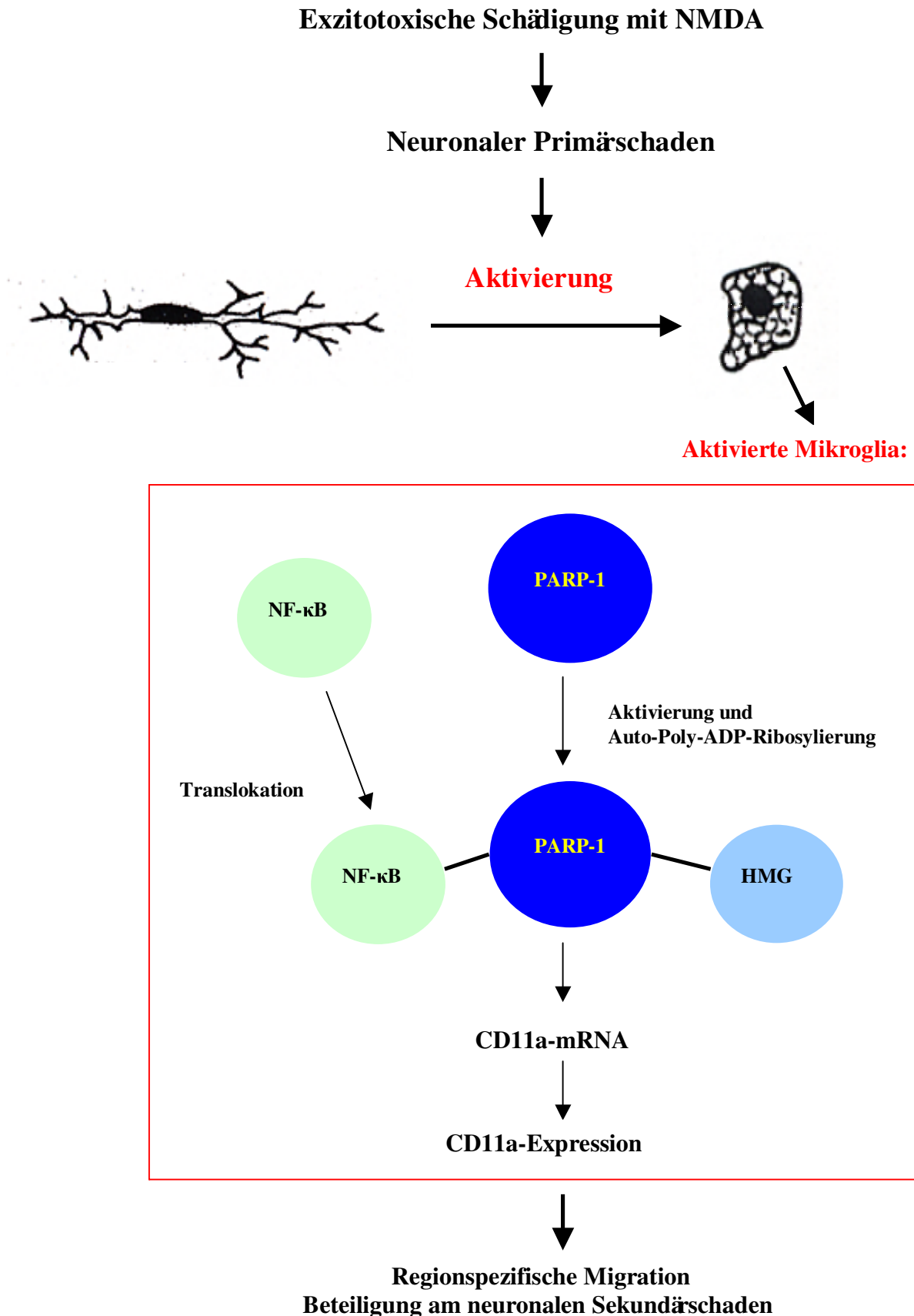


Abb. 4.36: Beteiligung der PARP-1 an der Mikrogliaaktivierung und der CD11a-Expression über die Bildung eines Protein-Protein-Komplexes bestehend aus der poly(ADPribose)lierten PARP-1, dem translozierten NF-κB und dem HMG-I (Y). NMDA = N-Methyl-D-Aspartat.