

6 ERGEBNISSE

6.1 Evaluation des Hypoxiemodells

Hypoxie kultivierter Astrozyten wurde in einer selbstkonstruierten Hypoxiekammer durch Erzeugung einer 95% N₂/5% CO₂-Atmosphäre bei kontinuierlichem Gasstrom für 24 Stunden induziert. Zur Evaluation der Effizienz dieser Methode wurde in Vorexperimenten der Sauerstoffpartialdruck im Medium mit Hilfe eines pO₂-Messgerätes zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnte bei den hypoxischen Zellen die Sauerstoffsättigung auf ca. 0,3 % (entsprechend ca. 0,48 mmHg) gesenkt werden. Zusätzlich wurde durch RT-PCR-Analyse die mRNA-Expression des Stressproteins ORP 150 gemessen. ORP 150 ist ein selektiv in hypoxischen Astrozyten exprimiertes Protein und kann daher als Marker für eine erfolgreiche Induktion von Hypoxie verwendet werden (139). RT-PCR auf ORP 150 wurde routinemäßig mit astrozytären cDNAs der unterschiedlichen Ansätze durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur tatsächlich hypoxische Zellen in die Analyse eingeschlossen wurden. **Abb. 6-1** zeigt ein repräsentatives Gel einer solchen RT-PCR-Analyse. ORP 150-mRNA wurde in hypoxischen, nicht aber in normoxischen Astrozyten gefunden. Dies wurde als deutlicher Hinweis dafür gewertet, dass im verwendeten Hypoxiemodell tatsächlich die korrespondierenden pathophysiologischen Veränderungen induziert wurden.

Des Weiteren war es erforderlich zu testen, ob die 24-stündige Hypoxie zytotoxisch auf die kultivierten Astrozyten wirkt, um sicherzustellen, dass unsere Beobachtungen Folge der astrozytären Hypoxie und nicht Zeichen einer diffusen Zellschädigung sind. Zu diesem Zweck wurde einerseits die Phasenkontrastmikroskopie verwendet, die keine morphologischen Kriterien der Zellschädigung zeigte. Die Zelldichte nach Hypoxie war identisch mit der normoxischer Astrozyten (s.u.). Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen im Anschluß an die Hypoxie für die Propidiumjodidfärbung verwendet, welche Zellen mit kompromittierter Membranfunktion identifiziert. Dabei zeigte sich, dass der Anteil positiv gefärbter Zellen in den hypoxischen Kulturen unter 2% lag

und sich nicht von dem in normoxischen Kulturen unterschied. Die meisten Sichtfelder (100x) zeigten keine angefärbten Zellkerne. In **Abb. 6-2** wird ein Sichtfeld mit einem positiv gefärbten Astrozyten gezeigt (**A**). Dagegen zeigte sich bei durch Trocknung geschädigten Astrozyten, die als Positivkontrolle verwendet wurden, eine deutliche Anfärbung der Zellkerne (**B**).

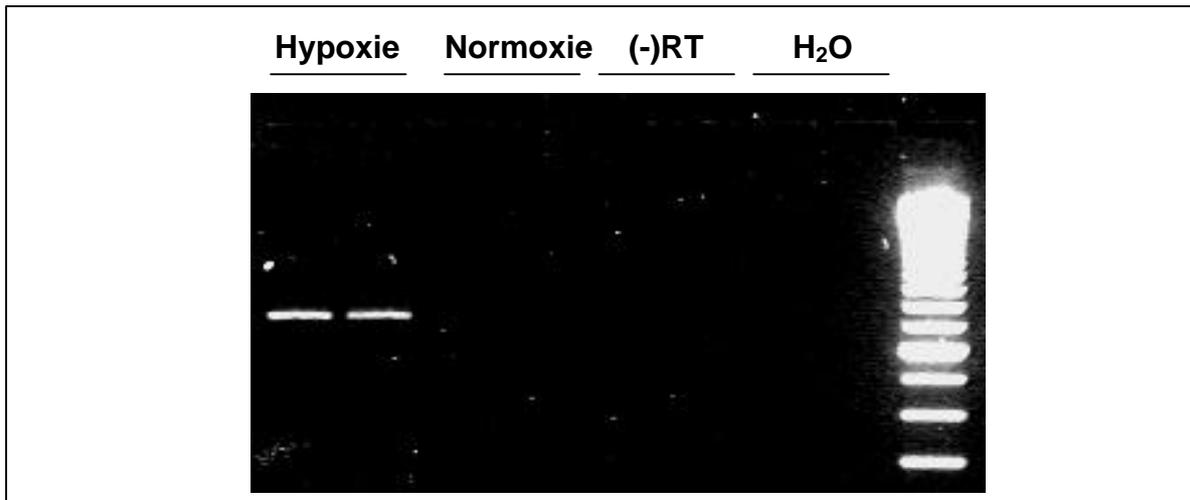


Abb. 6-1 Induktion von ORP 150-mRNA in hypoxischen Astrozyten Ergebnisse einer RT-PCR auf ORP 150 mRNA in je 2 Extrakten aus hypoxischen bzw. normoxischen Astrozyten. Die spezifische 733-bp-ORP-150-Bande wird in cDNAs hypoxischer, nicht aber normoxischer Astrozyten gefunden. Als Kontroll-*Templates* wurden nicht revers-transkribierte RNA ((-)RT) und *Aqua bidest.* (H₂O) verwendet.

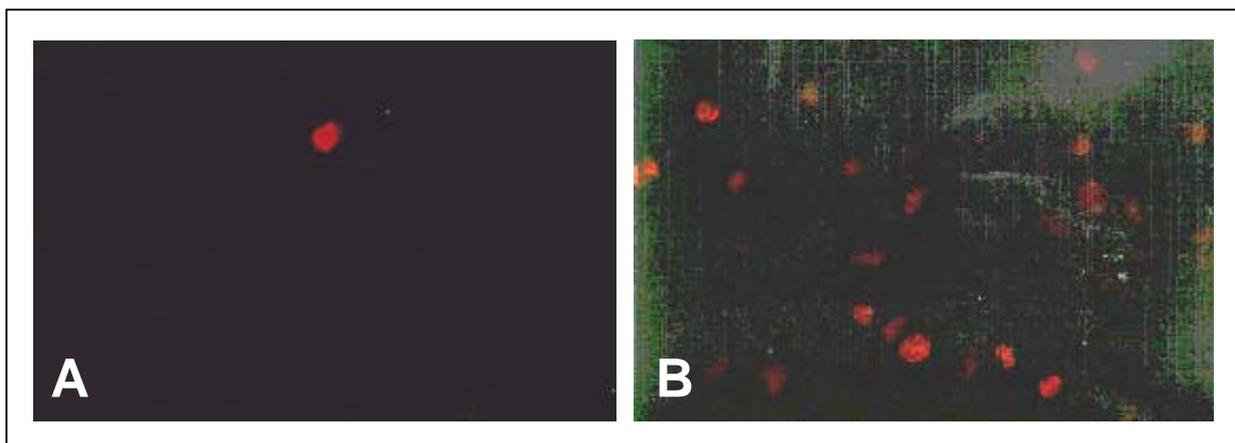


Abb. 6-2 Zelluläre Integrität nach 24-stündiger Hypoxie Die Fluoreszenz-Mikroskopie hypoxischer Astrozyten nach Propidiumjodid-Färbung zeigt kaum angefärbte Zellkerne (A). Dagegen zeigt die Positivkontrolle mit durch Trocknung geschädigten Astrozyten eine deutliche Anfärbung der Zellkerne (B).

6.2 Einfluss von Hypoxie auf die Morphologie kultivierter Astrozyten

Unter Basisbedingungen in serumfreiem Medium weisen kultivierte Astrozyten eine epitheloide, pflastersteinartige Morphologie mit wenigen Zellfortsätzen auf (**Abb 6-3 A**). Dagegen induziert die Vorbehandlung dieser Zellen mit 1 mM DBcAMP für 3 h deutliche morphologische Veränderungen (**Abb. 6-3 B**). Die Zellen bilden zahlreiche Fortsätze aus und ähneln Astrozyten *in vivo* (vgl. **Abb. 3-2**). Diese als *Stellation* bezeichnete Veränderung ist nach Kimelberg (74) durch das Vorhandensein von mindestens zwei Zytoplasmafortsätzen je Zelle charakterisiert, deren Länge mindestens der doppelten Länge des Zellkörperdurchmessers entspricht.

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss von Hypoxie auf die Morphologie dieser mit DBcAMP vorbehandelten Zellen untersucht. Während nach 24-stündiger Inkubation unter normoxischen Bedingungen der *stellate* Phänotyp weiterhin beobachtet wurde (**Abb. 6-3 C**), führte die 24-stündige Hypoxie zu einem Verlust der zytoplasmatischen Fortsätze (**Abb. 6-3 D**). Die hypoxischen Zellen unterschieden sich also morphologisch nicht mehr von kultivierten Astrozyten unter Basisbedingungen.

Zur Quantifizierung der morphologischen Veränderungen wurden je experimentellem Ansatz mindestens 500 Zellen ausgezählt und als *stellat* bzw. *nicht-stellat* klassifiziert. In **Abb. 6-4** wird der Anteil *stellater* Zellen an der Gesamtzellzahl für die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen graphisch dargestellt. Die Unterschiede zwischen unbehandelten und DBcAMP-vorbehandelten Zellen waren ebenso wie die Unterschiede zwischen hypoxischen und normoxischen DBcAMP-behandelten Zellen signifikant (**Abb. 6-4, Säulen 1-3 v.l.**).

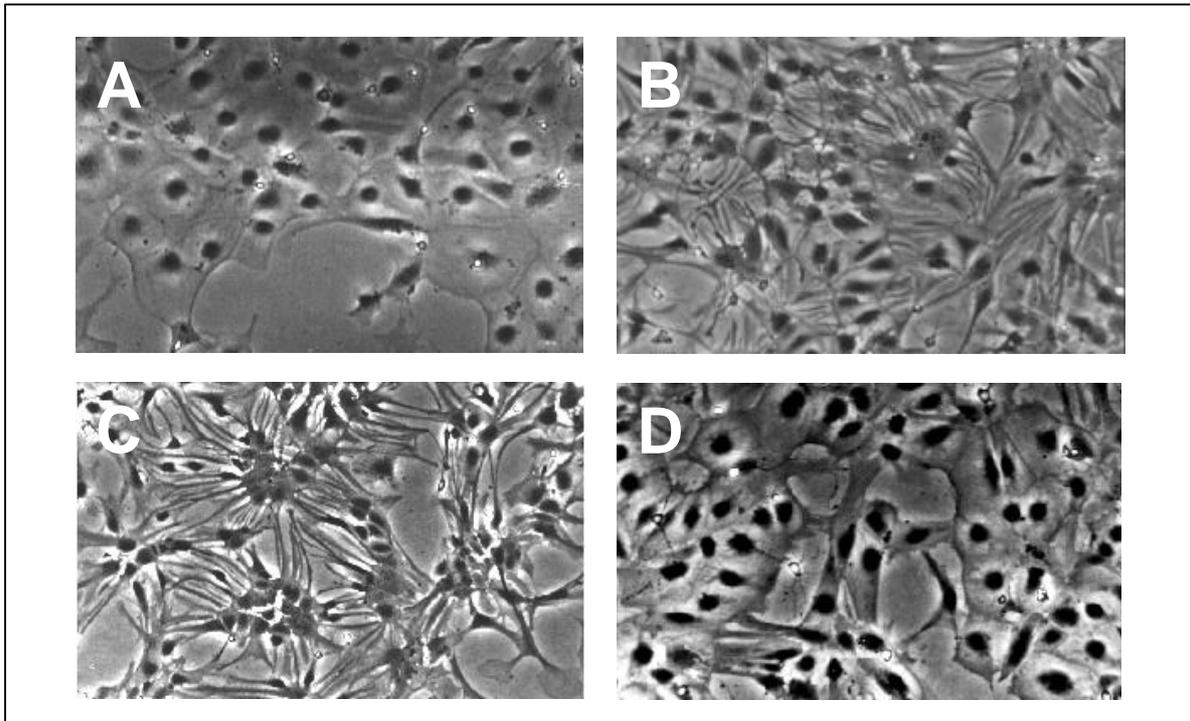


Abb. 6.3 Hypoxieinduzierte morphologische Transformation Im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten (A) induziert die dreistündige Inkubation mit 1 mM DBcAMP eine fortsatzreiche, stellate Morphologie (B). Diese bleibt auch nach 24 h unter normoxischen Bedingungen erhalten (C). Dagegen führt 24-stündige Hypoxie zur Verlust der Zellfortsätze auch in Anwesenheit von 1 mM DBcAMP (D).

A keine Stimulation;

B 1 mM DBcAMP, 3 h;

C 1 mM DBcAMP, 24 h Normoxie;

D 1 mM DBcAMP, 24 h Hypoxie

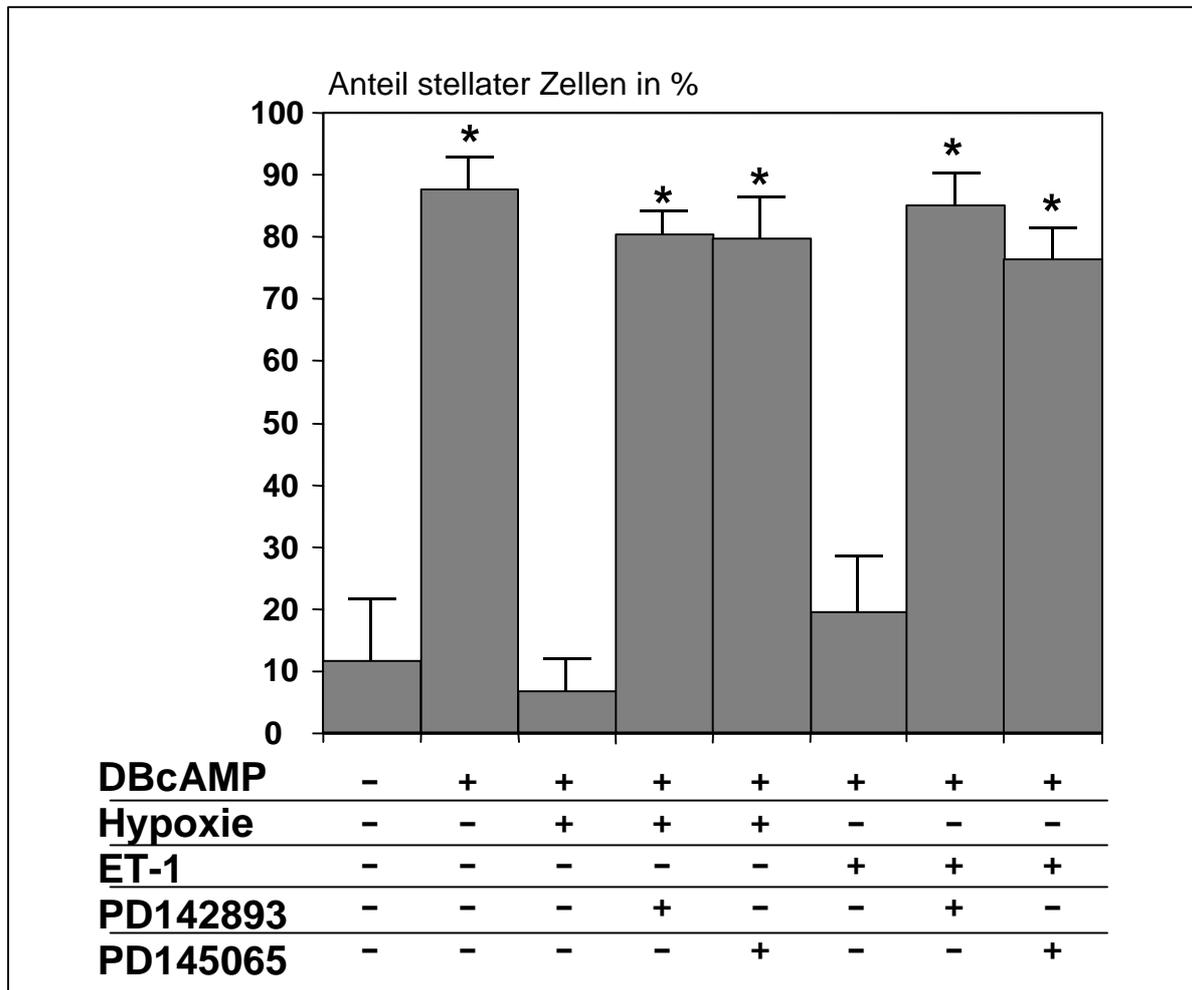


Abb. 6-4 Zusammenfassung der morphologischen Analysen Ergebnisse der Zellzählungen mit Darstellung des Anteils stellater Astrozyten an der Gesamtzellzahl. Astrozyten wurden für 24 h in der Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von 1 mM DBcAMP, Hypoxie, 100 nM ET-1, 5 μ M PD142893 bzw. 5 μ M PD145065 inkubiert und anschließend morphologisch analysiert. * $p < 0,01$ vs. 1., 3. und 6. Gruppe (von links)

6.3 Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von Komponenten des Endothelin-Systems

Kultivierte Astrozyten bilden konstitutiv Komponenten des ET-Systems. Zur Charakterisierung des Effekts von Hypoxie auf die Expression von Komponenten des Endothelin-Systems und auf die Sekretion von ET in die Medienüberstände wurden *Northern Blots* und Endothelin-*Radioimmunoassays* durchgeführt.

6.3.1 Expression und Sekretion von ET

Zur Messung der ET-Sekretion wurde in den Medienüberständen hypoxischer bzw. normoxischer Astrozyten mittels RIA die Konzentration immunoreaktiven Endothelins gemessen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen wie im Rahmen der morphologischen Untersuchungen (s. 6.2) mit DBcAMP vorbehandelt und anschließend für 24 h entweder Hypoxie oder Normoxie ausgesetzt. Die ET-Konzentration in Überständen normoxischer Astrozyten lag anschließend bei $2,92 \pm 0,20$ pg/mg astrozytären Proteins (n=4). Demgegenüber induzierte die 24-stündige Hypoxie einen Anstieg der ET-Konzentration um etwa 50% auf $4,23 \pm 0,56$ pg/mg Protein (n=4) (**Abb. 6-5**).

Um zu untersuchen, ob diesem Anstieg der ET-Sekretion eine transkriptionelle Aktivierung der Expression von Präpro-ET-1 mRNA zugrunde liegt, wurden mit Extrakten der für die morphologischen Analysen verwendeten Zellen (s. 6.2) *Northern-Blot*-Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Präpro-ET-1 mRNA in normoxischen Astrozyten basal exprimiert wird (**Abb. 6-6**) und unter Hypoxie signifikant auf etwa 300% des Basiswerts ansteigt.

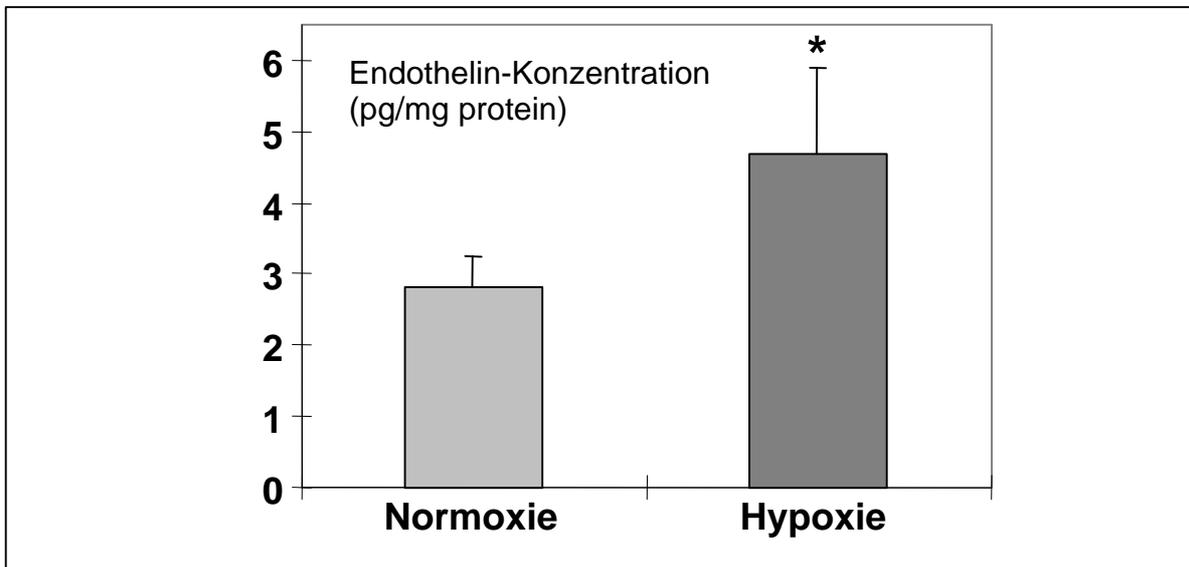


Abb. 6-5 Endothelinkonzentration in astrozytären Medienüberständen 24-stündige Hypoxie induziert einen 50-prozentigen Anstieg des im RIA bestimmten immunoreaktiven ET. * $p < 0,05$ vs. Normoxie

6.3.2 Einfluss von Hypoxie auf die Expression von mRNAs für ET_A R, ET_B R und ECE-2

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von Hypoxie auf die Expression von Komponenten des ET-Systems wurden die im letzten Abschnitt erwähnten *Northern Blots* zusätzlich mit cDNA-Sonden für ET_A R-, ET_B R- und ECE-2-mRNA hybridisiert. Es zeigte sich, dass die Hypoxie eine signifikante Verminderung der ET_A R- und ET_B R-mRNAs auf etwa 20% der normoxischen Kontrollen bewirkte (**Abb. 6-6**). Dagegen zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Expression von ECE-2-mRNA (**Abb. 6-6**).

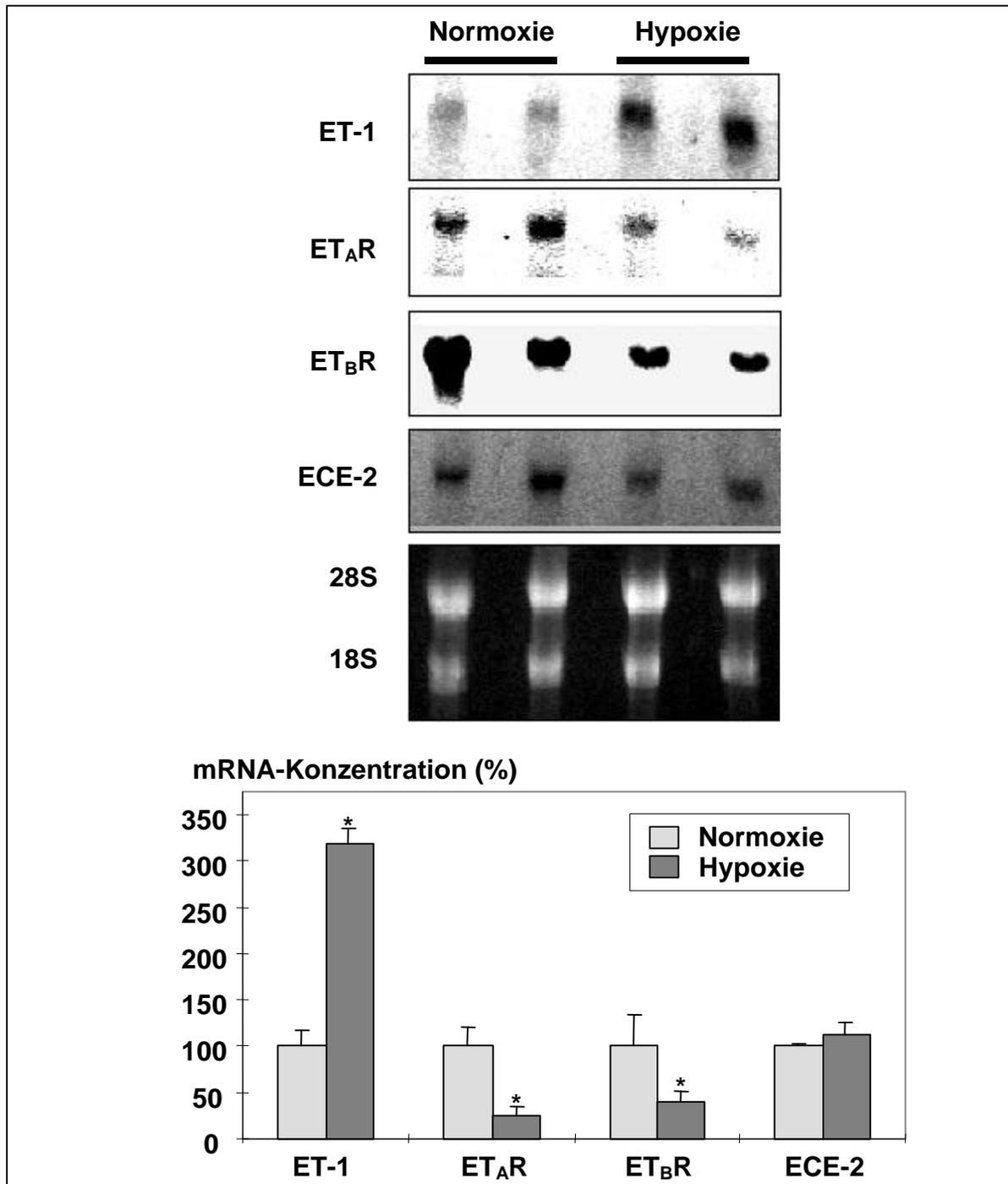


Abb. 6-6 Endothelin-System-Genexpression in kultivierten Astrozyten nach Hypoxie

Oben: Repräsentative *Northern Blots* auf Präproendothelin-1- (ET-1), ET_AR-, ET_BR- und ECE-2-mRNA aus astrozytärer RNA nach 24 h Hypoxie bzw. Normoxie. Für jede experimentelle Bedingung sind zwei Proben aus unterschiedlichen Experimenten aufgetragen. 18S und 28S rRNA wurden zur Standardisierung benutzt.

Unten: Statistische Analyse der densitometrischen Auswertung der *Northern Blot* Banden.

* $p < 0,05$ versus Normoxie

6.4 Die Rolle der Aktivierung des Endothelin-Systems bei der durch Hypoxie induzierten morphologischen Transformation

Durch Hypoxie wurde in DBcAMP-behandelten Astrozyten sowohl eine Aktivierung des Endothelin-Systems mit verstärkter Sekretion von ET als auch eine morphologische Transformation mit dem Verlust zytoplasmatischer Fortsätze induziert. Daher wurde die Möglichkeit einer kausalen Verknüpfung dieser Prozesse untersucht.

Zunächst wurden DBcAMP-vorbehandelte Astrozyten für 24 h mit 100 nM synthetischem ET-1 stimuliert. Dies bewirkte ähnlich der Hypoxie einen Verlust der zytoplasmatischen Fortsätze (**Abb. 6-4; Abb. 6-7A**). Durch gleichzeitige Gabe der nicht-selektiven ET-Rezeptor-Antagonisten PD142893 oder PD145065 (5 μ M) konnte dieser ET-induzierte Verlust der Zellfortsätze verhindert werden (**Abb. 6-4; Abb. 6-7B**). Um zu untersuchen, ob die hypoxieinduzierte morphologische Transformation durch ET vermittelt wird, wurden die ET-Rezeptor-Antagonisten ebenfalls bei hypoxischen Astrozyten angewendet. Dabei zeigte sich, dass der normalerweise durch Hypoxie induzierte Verlust der Zellfortsätze (**Abb. 6-4; Abb. 6-7C**) durch gleichzeitige Gabe von PD142893 oder PD145065 verhindert wird (**Abb. 6-4; Abb. 6-7D**).

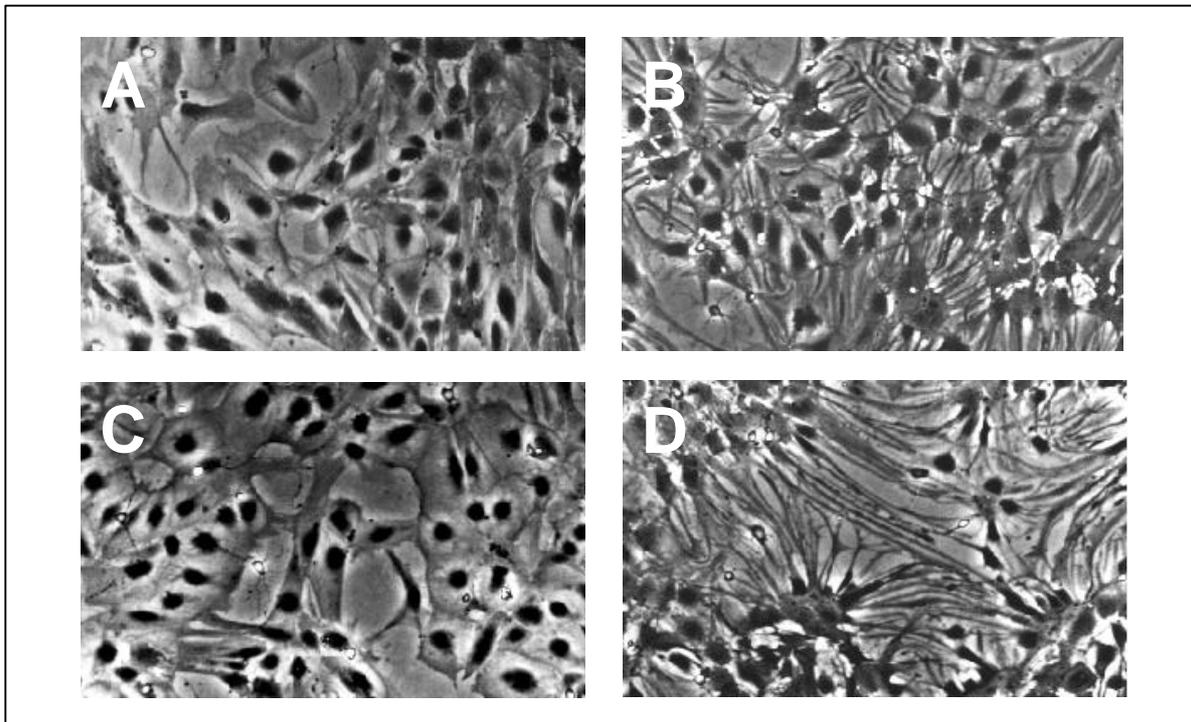


Abb. 6-7 Endothelin vermittelt die morphologische Transformation nach Hypoxie
 Inkubation DBcAMP-stimulierter Astrozyten mit 100 nM ET-1 induziert eine fortsatzarme Morphologie (A). Gleichzeitige Gabe des Endothelin-Rezeptor-Antagonisten PD 142893 blockiert diesen Prozess (B). Die hypoxieinduzierten Veränderungen ähneln denen, die Endothelin induziert werden (C). Blockade der Endothelinwirkung durch PD142893 ist in der Lage, die hypoxieinduzierten Veränderungen aufzuheben (D).

A 1 mM DBcAMP, 24 h 100 nM ET-1,

B 1 mM DBcAMP, 24 h 100 nM ET-1, 5 μ M PD142893

C 1 mM DBcAMP, 24 h Hypoxie

D 1 mM DBcAMP, 24 h Hypoxie, 5 μ M PD142893