

Charité Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum

Aus dem Institut für Neuropathologie
Abteilungsleiter: Prof. Dr. Andreas von Deimling

Gehirnveränderungen bei Endothelin-1 transgenen Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Charité Universitätsmedizin Berlin

Vorgelegt von: Silke Schäfer
aus: Lahn-Gießen

Referent: Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Blottner

Gedruckt mit Genehmigung der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 16.09.2005

| | |
|--|-----------|
| <u>Inhaltsverzeichnis</u> | 1 |
| Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| Sinn und Ziel dieser Arbeit | 5 |
| 1. Allgemeiner Teil | 6 |
| 1.1 Das Endothelinsystem | 6 |
| 1.1.1 Die Entdeckung | 6 |
| 1.1.2 Komponenten des Endothelinsystems | 6 |
| 1.1.3 Vorkommen, Steuerung und Funktion des Endothelinsystems | 8 |
| 1.1.4 Endothelin im zentralen Nervensystem | 14 |
| 1.2 Die Astroglia | 18 |
| 1.2.1 Die Funktion der Astrozyten | 18 |
| 1.2.2 Regionale Unterschiede der Astrozyten | 19 |
| 1.2.3 Das Zytoskelett und seine Funktion bei der reaktiven Gliose | 20 |
| 1.3 Die Mikroglia | 22 |
| 1.3.1 Die Morphologie | 23 |
| 1.3.2 Die Funktion der Mikroglia | 25 |
| 2. Spezieller Teil | 28 |
| 2.1 Material und Methoden | 28 |
| 2.1.1 Die Tiere | 28 |
| 2.1.2. Endotheligenmarkierung mit LacZ | 30 |
| 2.1.3. GFAP-Immunhistochemie mit der ABC-Methode | 30 |
| 2.1.4. Mikroglialektinhistochemie mit Tomato Lectin | 31 |
| 2.1.5. Das Bildauswertungssystem Quantimet 570 von Leica | 33 |
| 2.1.6. Statistische Auswertung | 35 |
| 2.2 Ergebnisse | 38 |
| 2.2.1 Körper- und Gehirngewichte | 38 |
| 2.2.2. Nachweis der Endothelinexpression mit LacZ | 41 |
| 2.2.3. Auswertung der GFAP-Immunhistochemie mit dem Quantimet | 48 |
| 2.2.4. Auswertung der Mikroglialektinhistochemie mit dem Quantimet | 62 |
| 2.2.5. Beurteilung der Mikrogliamorphologie | 72 |
| 3. Diskussion | 79 |
| 3.1 Körper- und Gehirngewichte | 79 |
| 3.2 Endothelinexpression im Gehirn | 80 |
| 3.3 Folgen der Endothelin-1-Überexpression | 82 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.3.1 | Diskussion der Ergebnisse der GFAP-Immunhistochemie | 83 |
| 3.3.2 | Diskussion der Ergebnisse der Mikroglialektin histochemie | 84 |
| 3.3.3 | Kritik der Methode | 85 |
| 3.3.4 | Beurteilung | 87 |
| 3.4 | Aussichten für die Zukunft der Endothelforschung im Gehirn | 87 |
| 4. | Zusammenfassung | 90 |
| 5. | Literaturverzeichnis | 93 |
| 6. | Rohdaten | 117 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| Abb. | = Abbildung |
| ACTH | = adrenocorticotropes Hormon = Corticotropin |
| ADH | = antidiuretisches Hormon = Vasopressin |
| ANP | = atriales natriuretisches Peptid |
| bFGF | = basic fibroblast growth factor |
| Bluo-Gal | = 5-bromo-3-indoyl- β -D-galactopyranosid |
| CRF | = Corticotropin releasing factor |
| DAB | = 3,3 Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid |
| DAG | = 1,2-Diacylglycerol |
| DNA | = Desoxyribonukleinsäure |
| DOCA | = Desoxykortikosteronacetat |
| ECE | = Endothelin-converting-enzyme |
| EDCF | = endothelium-derived constricting factor = Endothelin |
| EDRF | = endothelium-derived relaxing factor = NO |
| EGF | = epidermal growth factor |
| eNaC | = epithelialer Natriumkanal |
| eNOS | = endotheliale NO-Synthase |
| ET | = Endothelin |
| ET-1 | = Endothelin-1 |
| ET-2 | = Endothelin-2 |
| ET-3 | = Endothelin-3 |
| ET _A R | = Endothelin-A-Rezeptor |
| ET _B R | = Endothelin-B-Rezeptor |
| ETR | = Endothelinrezeptor |
| FSH | = Follikel-stimulierendes Hormon |
| GABA | = Gammaaminobuttersäure |
| GFAP | = saures Gliafaserprotein = glial fibrillary acidic protein |
| GFR | = glomeruläre Filtrationsrate |
| GH | = Wachstumshormon |
| GMCSF | = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| HE | = Hämatoxylin-Eosin |
| IGF-1 | = insulin-like growth factor-1 |
| IL | = Interleukin |
| IP ₃ | = 1,4,5-Inositol-triphosphat |
| kD | = Kilo-Dalton |
| LacZ-Gen | = β -Glaktosidasegen |
| LDL | = low density lipoprotein |
| LH | = luteotropes Hormon |
| L-Name | = L-Nitroarginin-methyl-ester (= NO-Synthase-Antagonist) |
| LPS | = Lipopolysaccharide |
| MCSF | = macrophage colony-stimulating factor |
| MMP | = Matrix-Metalloproteinase |
| mRNA | = messenger-Ribonukleinsäure |
| NGF | = Nervenwachstumsfaktor |
| NO | = Stickstoffmonoxid |

| | |
|--------------|--|
| PAF | = platelet activating factor |
| PBS | = Phosphate buffered saline (=Phosphat gepufferte isotone NaCl-Lösung) |
| PDGF | = platelet derived growth factor |
| PET | = Positronen-Emissions-Tomographie |
| PKC | = Proteinkinase C |
| RNA | = Ribonukleinsäure |
| RT-PCR | = Reverse Transcriptase-Polymerasekettenreaktion |
| SAB | = Subarachnoidalblutung |
| SHR | = spontan hypertensive Ratten |
| Tab. | = Tabelle |
| TBS | = Tris-HCl-Pufferlösung |
| TGF- β | = transforming growth factor- β |
| TNF α | = Tumornekrosefaktor- α |
| TSH | = Thyreotropin |
| ZNS | = zentrales Nervensystem |

Sinn und Ziel dieser Arbeit

Endothelin ist ein potenter Vasokonstriktor und Gegenspieler von NO (Boulanger et Luscher 1990). In vivo zugeführtes Endothelin-1 führt nach einer initialen kurzen Vasodilatation zu einem länger anhaltenden Blutdruckanstieg (Yanagisawa et al. 1988), und die Gabe des gemischten Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan führt bei der essentiellen Hypertonie des Menschen zu einer Blutdrucksenkung (Krum et al. 1998). Um die Rolle von Endothelin bei der Ätiologie der essentiellen Hypertonie zu untersuchen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen einer Aktivierung des Endothelinsystems und einer Hypertension jedoch bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Suzuki et al. 1990, Kohno et al. 1990, Larivière et al. 1993, Kurihara et al. 1994, Liefeldt 1999, Berthiaume et al. 2000).

Die Rolle von Endothelin im zentralen Nervensystem ist noch nicht ausreichend geklärt. Es wird vermutet, dass es nicht nur zur Regulation der Gefäßweite im Gehirn von Bedeutung ist, sondern auch als Neurotransmitter fungiert (Lee et al. 1990). Es scheint in Bereichen der kardiovaskulären Kontrolle, der neuroendokrinen Regulation sowie bei Mechanismen, die im Zusammenhang mit der Verhaltenskontrolle stehen, eine wichtige Rolle zu spielen (Van den Buuse et Webber 2000).

Die Arbeitsgruppe von Hocher et al. untersuchte die Auswirkungen eines erhöhten Endothelinspiegels anhand von human-endothelin-1-transgenen Mäusen vom NMRI-Stamm. Auch bei diesen Tieren konnte keine Blutdruckerhöhung festgestellt werden, sie entwickelten aber altersabhängig Nierenzysten, Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose (Hocher et al. 1997b). Durch die Verwendung eines Northern Blots konnte die Expression des Endothelintransgens außer in der Niere auch im Gehirn und in der Lunge der transgenen Mäuse nachgewiesen werden. In der Lunge fand man ebenfalls eine Fibrose und chronisch inflammatorische Veränderungen (Hocher et al. 2000a). Mit der sensitiveren RT-PCR unter Verwendung von human-spezifischen Endothelin-1-Primern fand man eine geringere Genexpression auch im Herz, in der Leber, in der Speicheldrüse, in der Milz und im Hoden. Bei der Ermittlung der Organengewichte konnte zusätzlich eine signifikante Erniedrigung sowohl der absoluten als auch der auf das Körpergewicht bezogenen relativen Gehirngewichte nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit ist es zunächst, mit Hilfe einer Markierung des Endothelin-1-Transgens mit LacZ die Lokalisation der Expression des Transgens im Gehirn zu ermitteln, um damit Rückschlüsse auf die physiologischen Orte der Endothelin-1-Expression im ZNS ziehen zu können. Des Weiteren sollen die Auswirkungen einer Überexpression von Endothelin-1 im Gehirn untersucht werden. Hierzu wurden die in Paraffin eingebetteten Mäusegehirne zunächst geschnitten und anschließend gefärbt, wobei mit speziellen Methoden zur Darstellung der Glia eine mögliche ZNS-Schädigung untersucht und ggf. nachgewiesen werden sollte.