

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Morphologie  
Institut für Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie)  
Komm. Direktor: Prof. Dr. Thomas Deller

**Effekt von Mycophenolat-Mofetil (CellCept®) auf die Zytokin-Sekretion und NO-  
Ausschüttung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Astrozytenkultur**

Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Melek Schnack, geb. Sayan  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2018

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem  
Referent: Prof. Dr. Joachim Steinbach  
Koreferentin: Prof. Dr. Ingeborg Hauser  
Datum der Disputation: Freitag, 23. April 2021

# Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	6
1.1	Pathophysiologie der ZNS Schädigung	6
1.1.1	Primär- und Sekundärschädigung	7
1.1.2	Ischämische ZNS Schädigung	8
1.1.3	Formen des Zelltodes	9
1.1.3.1	Nekrose	9
1.1.3.2	Apoptose	10
1.1.3.3	Autophagie	11
1.2	Zelltypen	11
1.2.1	Rolle der Neurone und ihre Funktion	12
1.2.2	Rolle der Astrozyten, ihre Funktion und ihre Immunantwort	13
1.2.3	Rolle der Mikroglia, ihre Funktion und ihre Reaktion	14
1.2.4	Rolle und Funktion der Oligodendrozyten	14
1.2.5	Blut-Hirn-Schranke und Immunprivileg	15
1.2.6	Astrozytäre Neurotoxizität	16
1.2.6.1	Astrozyten und Regeneration	18
1.2.6.2	Reaktive Gliose, Gliale Narbe	19
1.3	Zytokine und NO: Regulation und Funktion im geschädigten Nervengewebe	20
1.3.1	TNF- $\alpha$	21
1.3.2	Interleukin 1	21
1.3.3	Stickstoffmonoxid (NO)	22
1.3.4	andere Zytokine	23
1.3.4.1	IL-6	24
1.3.4.2	G-/GM-CSF	24
1.3.4.3	INF- $\gamma$	24
1.3.4.4	Reaktive Sauerstoffradikale	24
1.3.4.5	Komplementfaktoren	24
1.4	Purine	25
1.5	Immunsuppressive Therapien	26
1.5.1	Cyclosporin A	26
1.5.2	Glukokortikoid	27
1.5.3	Wirkmechanismus und Pharmakotherapie von	

	Mycophenolat-Mofetil	28
1.6	Zielsetzung der Arbeit	29
	1.6.1 Arbeitshypothese 1	29
	1.6.2 Arbeitshypothese 2	29
	1.6.3 Arbeitshypothese 3	29
2	Material und Methoden	30
2.1.1	Verwendete Substanzen, Lösungen und Antikörper	30
2.1.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3	Verwendete Geräte und Computerprogramme	32
2.1.4	Medien zur Präparation und Kultivierung von Einzelzell- kulturen	33
2.1.5	Verwendete Puffer und Stammlösung	33
2.2	Astrozytäre Einzelzellkulturen	34
2.3	Aufbau der Versuche	35
	2.3.1 Protokoll zur Darstellung der serumabhängigen Zellproliferation	35
	2.3.2 Protokoll zur Behandlung der Astrozytenkulturen mit CRF und Guanosin	36
	2.3.3 MMF-Protokoll	37
2.4	ELISA zur Messung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und NO	37
2.5	Färbung und Immunhistochemie	38
	2.5.1 Konventionelle Immunhistochemie mit BrdU	39
	2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	39
	2.5.3 GFAP-Färbung	40
	2.5.4 Mehrfachfärbungen und Fluoreszenzfärbung	40
2.6	Quantitative Morphometrie und statistische Analyse	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Abhängigkeit der astrozytären Proliferation vom Serumspiegel im Medium	41
3.2	Identifikation der Zelltypen aus der Zellkultur	42
3.3	Dosisabhängige von Mycophenolat-Mofetil	43
3.4	MMF reduziert den Proliferationsindex der isolierten Astrozytenkulturen	44
3.5	Wirkung von Guanosin und Corticotropin releasing factor	45
3.6	Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine und NO	

	aus den Astrozyten	45
4	Diskussion	47
4.1	Astrozytäre Proliferation	47
4.2	Wirkung von Mycophenolat-Mofetil	48
4.3	Zytokine und NO	49
5	Fazit	51
5.1	Zusammenfassung	51
5.2	Summary	52
6	Abbildungen	54
7	Literaturverzeichnis	63
8	Anhang	79
8.1	Schriftliche Eidesstattliche Erklärung	79
8.2	Danksagung	81

## **1 Einleitung**

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist ein komplexes, kompaktes Organ, das in graue und weiße Substanz untergliedert wird. Als zentrales Nervensystem wird das Gehirn und das Rückenmark bezeichnet, welches über das verlängerte Mark miteinander in Verbindung steht. Hier findet ein Informationsaustausch zur Aufrechterhaltung und Kommunikation mit der Peripherie des Körpers und der Umwelt statt. Die Vielfalt morphologischer Erscheinungen wird von Nervenzellen, Gliazellen, Blutgefäßen und Bindegewebelementen getragen.

Gerät das hochspezialisierte Netzwerk durch Schädigungen jeglicher Art aus dem Gleichgewicht, werden zahlreiche Mechanismen aktiviert, die dem Erhalt des Nervensystems und dessen weiterer Integrität dienen. Diese Mechanismen sind Gegenstand vieler aktueller experimenteller Arbeiten.

Die Neuroimmunologie versucht die vielseitige Wechselwirkungen zwischen Nerven- und Immunsystem zu beleuchten, um das Verständnis der Pathogenese von entzündlichen, infektiösen, ischämischen und traumatischen Erkrankungen des Nervensystems zu erweitern. Diese immunmodulatorischen Mechanismen beruhen unter anderem auf Botenstoffe einer heterogenen Gruppe von Polypeptiden, die Zytokine genannt werden. Zytokine werden sowohl von einwandernden Immunzellen als auch von residenten Zellen des Nervensystems (NS), wie Astrozyten und Mikroglia produziert und sezerniert. Zytokine haben eine zentrale Rolle in zahlreichen regulatorischen Funktionen, beeinflussen die Initiierung der zellulären NS-Verletzung und Zellreparatur und regen die Aktivierung, Proliferation und Migration von Immunzellen als Antwort auf ein inflammatorisches Geschehen an (Di Santo, 1997; Grell&Scheurich,1997; Benninghoff,16.Auflage 2004).

### **1.1 Pathophysiologie der ZNS Schädigung**

Die Pathophysiologie der ZNS Schädigung beschreibt einen Zustand, bei dem durch akut oder chronisch traumatische, ischämische, inflammatorische und andere Einflüsse die Integrität des zentralen Nervensystems gestört wird, so dass zelluläre degenerative Prozesse mit morphologischen und metabolischen Veränderungen eingeleitet werden. Es werden zwei Vorgänge unterschieden: Primär- und Sekundärschädigung. Die Schädigung zentralneurologischer Funktionen führt bei Betroffenen zu stark

invalidierenden Einschränkungen (sowohl motorisch und sensibel als auch psychisch), mit sozioökonomischen Folgen, weshalb die Entwicklung von pharmakologischen Therapiemöglichkeiten von großer Bedeutung ist (Benninghoff, 16. Auflage 2004; Mutschler Arzneimittelwirkung, 10. Auflage 2013)

### **1.1.1 Primär- und Sekundärschädigung**

Die **Primärschädigung** ist ein irreversibles Akutereignis mit Zelluntergang in der weißen und grauen Substanz des ZNS. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung von Gliazellen, wie Mikroglia und Astrozyten, gefolgt von einer stereotypischen Immunantwort und Kommunikation aller beteiligten Zellen über proinflammatorische Zytokinproduktion und –sekretion. Nervenzellen werden vermehrt glialen Neurotoxinen ausgesetzt, und die Neurodegeneration schreitet fort (M. Aschner et al., 1999; G. Raivich et al., 1999). Eine Verletzung des ZNS geht mit einer schnellen Immunantwort einher, wobei Mikroglia und Astrozyten nekrotische Zellen abräumen und De- sowie Regeneration stimulieren. Mikrogliale Zellen proliferieren, wandern ins geschädigte Areal ein und fördern die Sekretion von Botenstoffen der immunologischen und entzündlichen Reaktion. Astrozyten proliferieren ebenso, wobei sie ihr intermediär Filamentprotein, deren Hauptbestandteil das fibrilläre saure Gliaprotein „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) ist, hochregulieren und somit das Matrixmilieu mitbeeinflussen (Kozlova, 2003).

Astrocyten scheinen für die Reifung des ZNS entscheidend zu sein. Dabei bleiben sie regional ansässig und regulieren die spezifische neuronale Interaktion. Eine experimentell herbeigeführte Translokation der Astrocyten innerhalb des ZNS führt zum Verlust der neuronalen Integrität im Subgebiet (Tsai H.-H., Tenney A., Mumen A.T., Fancy S.P.J. et al., 2012).

Im Rahmen der Primärschädigung wird die Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke mit der Folge des Einbruchs des ZNS-Immunitätsprivilegs beeinträchtigt, so dass eine Homöostase nicht weiter aufrecht gehalten werden kann. Dies führt zur Migration von Leukozyten - wie Neutrophile, Lymphozyten und Makrophagen - in das geschädigte ZNS. Es werden Zellen des peripheren Immunsystems in das verletzte Gewebe rekrutiert (V.H. Perry et al., 1995; G. Raivich et al., 1999).

Die **Sekundärschädigung** beschreibt das Überschießen metabolischer und immunologischer Mechanismen nach einer Primärschädigung mit ausgedehnten neurodegenerativen Prozessen (Blight 1992; Marty et al., 1991; Heppner et al., 1998; Kreutzberg, 1996). Das apoptotische Gewebe enthält hohe Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und andere, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1), welche zu einer weiteren Verschärfung der Entzündungsreaktion führen (DusartSchwab, 1994; Dumont et al., 2001).

Bekanntermaßen stützt sich die Neurogenese, die frühe neuronale Entwicklung und die neuronale Differenzierung, auf gliale Interaktion. Gliazellen erhalten neuronale Homöostase, synaptische Plastizität und Reparaturvorgänge. Im Stadium der Schädigung sind selbst neurotrophe Faktoren durch die Mikrogliaaktivität beschrieben (Miwa et al., 1997). Astrocyten partizipieren somit in der Formation der Bluthirnschranke mit, modulieren die Expression und Polarisation von Transportern sowie fördern die Ausreifung spezialisierter Enzymsysteme (Wong A.D., Ye M., Levy A.F., Searson P.C., 2013).

### **1.1.2 Ischämische ZNS Schädigung**

Ein ischämischer Gehirnfarkt beruht auf einem gefäßverschlussbedingten lokalen Sauerstoffmangel und einer Perfusionsminderung, der mit Nekrose des betroffenen Kerngebietes einhergeht. Apoptose als auch Autophagie – nachfolgend erläutert – vollziehen sich in der vom Verschluss umgebenden Region, als Penumbra bezeichnet (A.Rami, 2008). Die zellulären Pathomechanismen, die in einer ischämischen Hirnschädigung beteiligt sind, sind komplex. Unterschiedliche Faktoren beeinflussen das endgültige Resultat des zellulären Verlustes. Aufschlussreich ist eine pharmakologische Behandlung mit einer relevanten Neuroprotektion und einer Möglichkeit der Verbesserung der Neuroregeneration und die Wiederaufnahme der funktionellen Wiedererlangung, neben einer intensivmedizinischen Therapie, wie die thrombolytische Behandlung. Dabei ist die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen immunsuppressiven Substanzen auf das morphologische und funktionelle Outcome mit Eindämmung der Sekundärschädigung Gegenstand diverser Studien: Cyclosporin A, FK506 (Tacrolimus) oder Steroide scheinen einen günstigen Einfluß auf das neuronale Überleben und die axonale Regeneration zu haben. Mycophenolat-



Mofetil führt zu einer signifikanten Reduktion der neuronalen Schädigung und erhält die Integrität von langstreckigen Myelinnetzwerken aufrecht (Ebrahimi F. et al, 2012; Dehghani F., Hischebeth G.T.R., Wirjatijasa F., Kohl A., Korf H.-W., 2003).

Die Penumbra erleidet aufgrund von Gefäßkollateralen eine weniger hochgradige Reduktion in ihrem Metabolismus. Das betroffene Areal hingegen erleidet einen Totalausfall an Energieressourcen, so dass es zu einem Einbruch der Ionenhomeostase mit Depolarisation von Zellmembranen kommt. Dies geht mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, der Ausschüttung von exzitotoxischen Aminosäuren, Azidose und Produktion von toxisch freien Radikalen einher (Siesjö 1992a,b). Dabei sind – trotz ihrer fundamental unterschiedlichen Aufgaben – Neurone als auch Astrozyten betroffen. Angenommen wird, dass diese Interaktion zwischen Astrozyten und Neuronen derartig verflochten ist, dass ein Funktionsverlust eines Zelltyps durch den Anderen im Sinne einer Regeneration kompensiert werden kann (M.F.Anderson et al.,2003;G.Stoll et al.,1998).

### **1.1.3 Formen des Zelltodes**

Der Zelltod führt zum Erlöschen des Stoffwechsels und der morphologischen Integrität einer Zelle. Man unterscheidet mehrere Formen des Zelltodes:

#### **1.1.3.1 Nekrose**

Unter Nekrose, welche durch eine Kernpyknose, Karyolyse, Karyorhexis (Zellkernschrumpfung, -auflösung und -zerfall) und eine Anschwellung der Zelle (Oncose) charakterisiert ist, versteht man eine irreversible Zerstörung der Plasmamembran, Denaturierung von Proteinen und der enzymatischen Auflösung von Zell- und Gewebeanteilen und die dadurch verbundene Freisetzung des Zytosolinhalts und der Zellorganellen in den interzellulären Raum als Folge einer Störung der mitochondrialen oxidativen Atmungskettenphosphorylierung, wobei es zum ATP-Verlust kommt. Daran gekoppelt kommt es zum Erliegen ATP-abhängiger Kationenpumpen. Es werden reaktive Sauerstoffintermediärprodukte gebildet. Aus einer Elektrolyt- und pH-Verschiebung schließlich resultiert eine Zell- und Organellschwellung und eine Auflösung der Zelle. Dieser Prozess beinhaltet eine inflammatorische Reaktion mit einhergehender Gewebeschädigung durch Aktivierung des Immunsystems. Man unterscheidet weiter sechs Nekrosetypen: Koagulations-,

fibrillogranuläre -, fibrinoide -, Kolliquations-, Fettgewebsnekrose und die Gangrän. Die Kolliquationsnekrose findet sich in proteinärmeren, lipidreicheren Gewebe, wie beispielsweise im Gehirn wieder (Benninghoff, 16. Auflage 2004; Pathologie Böcker/Denk/Heiz 5. Auflage, 2012).

Die passive Nekrose als ein definierter, unkontrollierter Zelltod mit den genannten charakteristischen Abläufen wird immerwährend kritisch hinterfragt. Gegenwärtig ist Rede von liganden-abhängiger (TNF-Zytokine), programmierter Nekrose mit Depletion von ATP oder Inhibition von Caspasen als RIPK3-abhängige Nekrose, entsprechend Nekroptosis. Die Rolle der Nekroptosis ist im frühkindlichen Hirnschaden untersucht. In verschiedenen Krankheitsmodellen sind RIP3-defiziente Tiere vor Erkrankungen geschützt, so z.B. im Rahmen der Ischämie/Reperfusionsschäden, im TNF-vermittelten Schock, im durch Cisplatin induzierten akuten Nierenversagen, bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, bei der nekrotisierenden Pankreatitis sowie im Sepsismodell. Die Unterbindung der Nekroptose könnte daher einen neuen neurotherapeutischen Ansatz darstellen (Thornton C., Hagberg H., 2017).

#### **1.1.3.2 Apoptose**

Die Apoptose hingegen, auch bezeichnet als programmierter Zelltod, bezeichnet einen streng geregelten physiologischen Vorgang, welcher durch eine kaspasengeführte (Proteasen und Nukleasen) Kaskade mit begleitenden morphologischen Veränderungen definiert ist. Diese umfassen die Schrumpfung der Zelle, die Kondensation des Chromatins, den Verlust der Zellmembranstabilität und die externe Ausstülpung der Zelle (Zeiose), bei der membranumschlossene Säckchen oder apoptotische Körperchen abgeschnürt werden (blebbing). Hier fehlt die entzündliche Reaktion der Umgebung. Apoptotische Zellteile werden durch Phagozytose eliminiert. Gleichzeitig ist die Apoptose ein physiologischer Prozess im Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination und findet sich im Rahmen der Embryonalentwicklung und Involutionenprozessen wieder. Der programmierte Zelltod kann durch eine Reihe von Nachweismethoden, wie die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Annexin V an Phosphatylserin an der Zelloberfläche, die Darstellung der durch Kaspasen gesplittene DNS mittels Einbau von markierten Nukleotiden (TUNEL-Reaktion), den Nachweis von aktivierten Kaspasen und den Nachweis der charakteristischen DNA-Fragmente

(Nukleosomen-Pattern) sichtbar gemacht werden (Benninghoff, 16. Auflage 2004; Pathologie Böcker/Denk/Heiz 5. Auflage, 2012).

### **1.1.3.3 Autophagie**

Die **Autophagie** wird als ein kaspaseunabhängiger mitochondrialer und anderer intracellulärer Zelltodprozess beschrieben. Angenommen wird, dass die Autophagie ein selbstauflösender Prozess auf viele intra- und extrazellulärer Stimuli unabhängig zum intakten Apoptosemechanismus ist, der ausgereifte Zellen betrifft (Arguello&Gogos, 2008). Möglicherweise fungiert sie als Trigger für eine Apoptose einerseits, andererseits ist Autophagie eine Form der erfolgreichen Zellreparatur durch Recycling von Proteinen und geschädigten Organellen, aber auch eine Suizidmethode der Zelle (A.Rami, 2008). Dabei scheinen Kalziumdysregulationen, Zeldepolarisationsstörungen und Phospholipidmetabolismen determinierend zu sein. Bei der Autophagie wird zytoplasmatischer Inhalt (löslich und auch Organelle) in spezielle Vakuolen, aus Doppelmembran bestehend, intrazellulär eingeschnürt. Durch weitere Fusionen entsteht ein Autophagosomen, welcher zum Autolysosomen heranreift. Erhöhte Aktivität der Autophagosomen befreit von angesammelten unnützen Proteinen (z.B.  $\alpha$ -Synuclein und Huntington-Proteine), welche zu neuronalen Erkrankungen führen können (Parkinson und Huntington). Weiterhin scheint eine Akkumulation von Autophagosomen mit Amyloid Precursor Proteinen (APP) zu Neurodegeneration mit Alzheimer-Demenz zu führen. Das absolute Fehlen von Autophagie führt in Mäusen zum Tod innerhalb der zwei Lebensmonate (Lee&Gao, 2008). An der Autophagie beteiligte Proteine sind mitunter das Beclin (Bcl-1) und das microtubal-associated protein (MAPs) light chain 1 (LC1), Proteinkinase TOR (target of rapamycin) und die Interaktion von Beclin (Bcl-1) mit Bcl-2. Die Prozesse der Autophagozytose werden in drei Gruppen unterteilt: Makro-, Mikroautophagozytose sowie die Chaperone-vermittelte Autophagie. Alle drei Formen sind an der proteolytischen Zerlegung von zytosolischen Komponenten im Lysosomen beteiligt. (A.Rami, 2007; D. Glick, S. Barth, K.F. Macleod, 2010).

## **1.2 Zelltypen**

Der von Virchow 1850 geprägte Begriff Neuroglia wurde ursprünglich als zellhaltiges Material bezeichnet, welches den Raum zwischen Nervenzellen ausfüllt und die

Nervenzellen von Blutgefäßen trennt. Zu den Hauptzelltypen der Neuroglia zählen die Oligodendrogliazellen, Mikrogliazellen und die Astrozyten. Sie machen 7-15% des Hirnvolumens aus. Astrozyten sind stabile Gewebselemente, wohingegen Mikrogliazellen unter ständigem Gestaltswechsel mobil sind. An den Oligodendrozyten beobachtet man Pulsation mit Kontraktion und Erweiterung des Zellkörpers. Neuroglia tragen zu zahlreichen Vorgängen wie Stütz-, Stoffwechsel-, Abwehr-, Speicher- und Hüll- beziehungsweise Isolierfunktion bei. Zwischen Neuronen und Gliazellen besteht eine vitale Interaktion, die das gegenseitige Differenzieren, die Zellentwicklung und das gemeinsame Funktionieren im Zellverband gewährleistet. Demzufolge führt eine Störung der glialen Zellfunktion und des glialen Metabolismus zu einer neuronalen Dysfunktion und umgekehrt (M.Aschner et al.,1999).

### **1.2.1 Rolle der Neurone und ihre Funktion**

Ein Neuron (als die Funktionseinheit des ZNS) besteht aus Perikaryon, Dendriten und einem Axon (Neurit). Das Perikaryon, von dem die Dendriten abgehen, enthält den Nukleus mit einem großen chromatinreichen Nukleolus. Die Dendriten vergrößern durch ihre starken Verzweigungen die Oberfläche der Zelle. Sie sind Ort des Erregungsempfanges. Das Axon leitet die Erregung weiter, wobei am Axonhügel die Erregung generiert und entlang des Axon weitergeleitet wird. Das Axon ist von einer lipidhaltigen Markscheide (Myelin) umhüllt, was in der Peripherie von der Schwann-Zelle und im ZNS von den Oligodendrozyten gebildet wird. Die Markscheide wird in regelmäßigen Abständen durch die Ranviersche Schürring unterbrochen, wo die saltatorische Erregungsleitung stattfindet. Die Axone geben Kollateralen ab und verzweigen schließlich in den Telodendron, um mit den Bouton terminale eine präsynaptische Membran zu bilden. Zusammen mit dem synaptischen Spalt und des nachgeschalteten Neurons bilden die Boutons Synapsen, an denen die Übertragung der Erregung von Neuron zu Neuron oder von Neuron zum Myozyt über exzitatorische und inhibitorische Neurotransmitter im Falle einer chemischen Synapse erfolgt. Man unterscheidet weiter elektrische (ausgeprägt bei niedrigen Wirbeltieren und Avertebraten) und interneuronale Synapse. Bedenkt man, dass höhere kortikale Funktionen ihren Ursprung in dieser strukturellen Vielfalt haben, sind die Bemühungen um dessen Erhalt von besonderem Interesse (Benninghoff,16.Auflage 2004).

### **1.2.2 Rolle der Astrozyten, ihre Funktion und ihre Immunantwort**

Astrozyten füllen den interneuronalen Raum aus und behalten im Gegensatz zu den Neuronen ihre Teilungsfähigkeit während des ganzen Lebens bei. Aufgrund ihres Reaktions- und Proliferationsvermögens sind sie fähig, sich schnell an Strukturveränderungen anzupassen, in durch Neuronentod entstandene, freiwerdende Räume einzuwachsen und Narbengewebe zu bilden. Astrozyten sind sternförmige Zellen mit großem, rundlichen, chromatinarmen Kern. Sie besitzen zahlreiche unterschiedlich lange Fortsätze, die sie in die Umgebung radiär ausbreiten. Man unterscheidet protoplasmatische und fibrilläre Astrozyten. Erstgenannte erscheinen hauptsächlich in der grauen Substanz und haben kürzere, verschieden stark verzweigte Fortsätze, wohingegen die fibrillären Astrozyten der weißen Substanz reich an Filamenten dünne, lange und weniger verzweigte Fortsätze aufweisen. Protoplasmatische Astrozyten grenzen Axone ab oder umschließen synapsenfreie Abschnitte von Perikaryen und Dendriten. An der Oberfläche des ZNS bilden dicht aneinanderangrenzende füßchenartige Ausläufer eine zusammenhängende Grenzmembran, die Membrana limitans gliae superficialis, die über eine Basalmembran an die Pia mater angrenzt. Die Membrana limitans gliae perivascularis bildet die Grenzmembran des Nervengewebes gegenüber den Blutgefäßen, welche durch Basalmembranen von Gefäßwand getrennt ist. Besondere Zellverbindungen, gap junctions und Desmosomen, befinden sich zwischen Astrozytenfortsätzen. Zytoplasmatischer Bestandteil der Astrozyten sind u.a. Gliofibrillen, bestehend aus elektronenmikroskopischen Intermediärfilamenten, deren Hauptbestandteil das saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) ist, was zur Markierung der Zellen genutzt wird.

Astrozyten kontrollieren die Homeostase des ZNS durch Beteiligung am Ionengleichgewicht. Aus Nervenzellen frei gewordene Kaliumionen und Kohlendioxid werden aufgenommen und ein konstanter interstitieller pH-Wert von ca. 7,3 aufrechterhalten. Die Entgiftungsfunktion und die Kommunikation im Zellverband erfolgen über ihre Zellverbindungen. Zusätzlich exprimieren Astrozyten Rezeptoren für verschiedene Neurotransmitter (GABA, Glutamat u.a.) und Neuromodulatoren und besitzen Botenstoffmoleküle. Weiter haben sie immunologische Bedeutung bei

Immunaktivität des ZNS, sobald die Blut-Hirn-Schranke geschädigt ist und Interaktionen mit Immunzellen erfolgen kann (Benninghoff, 16. Auflage 2004; Gaudet A.D., Fonken L.K., 2018).

### **1.2.3 Rolle der Mikroglia, ihre Funktion und ihre Reaktion**

Mikrogliazellen sind Bestandteile des monozytären phagozytischen Systems, bei dem nichtspezialisierte von spezialisierten, antigenpräsentierenden Zellen unterschieden werden. Mikrogliazellen sind an der Phagozytose von abgestorbenen Nervenzellen, Zelldetritus und Fremdmaterial beteiligt. Sie indizieren die Immunantwort im ZNS, modulieren die neuronale Zellfunktion und haben einen Antitumoreffekt. Mikrogliazellen besitzen einen ovalen oder stabförmigen Kern und kurze, stark verzweigte Fortsätze. Sie antworten auf jegliche pathologische Ereignisse, indem sie bei der Schädigung von Hirnparenchym phagozytotisch aktiv werden und Antigene an Zellen des Immunsystems präsentieren (APC) (Banati et al., 1993). Die Aktivierung ist dabei an morphologische Veränderungen gekoppelt, wie die Ausbildung von Oberflächenmolekülen (MHC-I und MHC-II-Moleküle) und der Verlust der typischen Ramifizierung. Bei Schädigung reagiert Mikroglia mit Zellproliferation, Chemotaxis und Phagozytose von neuronalem Trümmer wie Axone und synaptische Bestandteile. Diese Reaktionen werden durch NO, Glutamat und proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Sinne der Sekundärschädigung getriggert und erweitert (Boje et al., 1992; Piani et al., 1991; Blight 1992; Marty et al., 1991; Heppner et al., 1998; Kreutzberg, 1996). Mikrogliazellen sind aber auch in der Lage, wie in mehreren in vitro Studien gezeigt, neurotrophische Faktoren auszuschütten (Nagata et al., 1993; Miwa et al., 1997).

### **1.2.4 Rolle und Funktion der Oligodendrogliazellen**

Oligodendrogliazellen sind runde, chromatinreiche Zellen mit dünnen Fortsätzen. Als Begleiter der Neurone werden sie in der grauen Substanz Satellitenzellen, in der weißen Substanz interfazikuläre Glia bezeichnet. Sie bilden und erhalten die Markscheide, das Myelin. Ein Oligodendrozyt im ZNS umschließt im Gegensatz zur peripheren Zelle, der Schwannzelle, mehrere Axone. Das Myelin hat trophische, protektive sowie erregungsleitende Funktion. Bei Substanzverlust geht das entsprechende Axon

zugrunde. Hierbei sind Molekülen beteiligt, die auch zu einer Inhibition des Neuronenwachstums führen, wie bei mehreren inflammatorischen Erkrankungen des ZNS beschrieben (Prineas&McDonald,1997;Trapp et al.,1998). Beispiel einer solchen Entmarkungsreaktion ist die Multiple Sklerose, welche schubförmig auftritt. In den Anfangsstadien kommt es zu Defekten in der Blut-Hirn-Schranke, was zum Einwandern von hämatogenen Zellen, wie von Monozyten und T-Zellen, in das Hirnparenchym führt. Die Beteiligung der inflammatorischen Zellen des Immunsystems und deren Zytokine führen zu einer aktiven Gewebeerstörung der Myelinscheide, bei der ortsständige Astrozyten und Mikroglia involviert werden (Trapp et al.,1999).

In einer aktuellen Studie wird die Umwandlung einer Astroglia in ein Neuron oder Oligodendrozyt mittels des Transkriptionsfaktors Sox10 demonstriert (Mokhtarzadeh K.A., Satarian L., Javan M., Baharvand H.,2018).

### **1.2.5 Blut-Hirn-Schranke und Immunprivileg des ZNS**

Die Blut-Hirn-Schranke bezeichnet eine Barriere zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Blut, welche für organspezifische Stoffe, wie Nähr- und Botenstoffe, selektiv und kontrolliert durchlässig ist. Diese Barriere besteht aus drei Grundelementen: dem Kapillärendothel, welche über tight junctions miteinander in Kommunikation stehen, der Basalmembran und dem Membrana limitans gliae perivascularis als Zusammenschluss der Astrozytenfortsätze. Aufgrund dieser Struktur ist es lediglich lipophilen Substanzen möglich, die Blut-Hirn-Schranke ungehindert zu passieren. Für ausgewählte hydrophile Substanzen, wie Glucose als Hauptenergieträger und Aminosäuren, existieren spezielle Transportsysteme. Blutgase können die Barriere ebenfalls ungehindert übertreten. Die Blut-Hirn-Schranke ist im Bereich der zirkumventrikulären Organe unterbrochen. Zu den zirkumventrikulären Organen zählen das Infundibulum, Organum vasculosum laminae terminalis, Organum subfornicale, Corpus pineale, Organum subcommissurale und die Area postrema, die alle Areale um das Ventrikelsystem darstellen, wo sich die spezialisierte Zellen an der Kommunikation zwischen Liquor und Blut beteiligen (Wong A.D., Ye M., Levy A.F., Searson P.C., 2013).

Als **Immunprivileg** des zentralen Nervensystems wird die weitgehende immunologische Isolierung des Organs bezeichnet. Die Aufrechterhaltung der

Homöostase wird unter anderem durch die Blut-Hirn-Schranke gewährleistet. Die zellulären Bestandteile erhalten die physikalische, biochemische und immunologische Barriere des ZNS, welches das neuronale Zellmilieu mit der Signaltransduktion, dem Remodelling, der Angiogenese und der Neurogenese regelt, aufrecht (Wong A.D., Ye M., Levy A.F., Searson P.C., 2013). Störungen der Blut-Hirn-Schranke, wie bei immunpathologischen Ereignissen, führen zur erhöhten Durchlässigkeit für immunkompetente Zellen aus der Peripherie, welche in Interaktion mit hirnsässigen Zellen treten. In der Folge des Zusammenspiels von Astrozyten und Mikrogliazellen, wobei den Mikrogliazellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Sekundärschädigung zu kommt, resultieren unterschiedliche pathophysiologische Ereignisse, wie eine insuffiziente Perfusion mit Hämorrhagien, oxidativer Stress und Exzitotoxizität sowie die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (zelluläre und humorale Immunantwort), welche zu zellulären Funktionseinbußen führen (Stoll et al, 1998). Diese Entzündungsmuster stellen Angriffspunkte für Therapieansätze dar.

### **1.2.6 Astrozytäre Neurotoxizität**

Astrozyten sind die zahlreichsten Gliazellen im zentralen Nervensystem. Ihnen kommt bei der Bereitstellung von metabolischen Unterstützung für Neurone, Regulierung der Blut-Hirn-Schranke, Beteiligung an der Synapsenformation sowie die Sekretion von löslichen Faktoren eine große Bedeutung zu, welche die Differenzierung von Oligodendrocyten beeinflussen. Sie tragen ebenso bei der Pathophysiologie von Neuroinflammation, der Beteiligung an inflammatorischen Stimuli sowie der eigenen morphologischen Ausreifung mittels Genexpression bei. Hierbei können sie einen limitierenden oder verstärkenden Einfluss auf die Neurotoxizität haben. Bei der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und die Modulation von dem lokalinflammatorischen Milieu haben die Astrozyten einen bedeutenden regulatorischen Effekt (Galloway D.A. et al, 2017).

Die Reaktion der Astrozyten in einem pathologischen Prozess wird beispielhaft am Schlaganfall dargestellt. Innerhalb der ersten 30 Minuten der fokale zerebralen Ischämie ist hinsichtlich des Zelltodes ein ähnlich astrozytäres wie neuronales Verhalten zu beobachten, wobei Astrozyten der Ischämie gegenüber eine höhere Resistenz als Neurone aufweisen. Protektive Eigenschaften der Astrozyten gehen verloren. Dies führt



zu einer Reduktion des Energiemetabolismus, mithin zu einem Verlust der ionalen Homeostase, der Depolarisation der Zellmembran und damit die Vorprogrammierung des Zelltodes in einer prolongierte Ischämie. Aufgrund osmotischer Verschiebungen durch Einstrom von Natrium und das Freiwerden von Glutamat/Aspartat, Kaliumionen und Laktat sowie von freien Radikalen ist in der frühen Phase ein Anschwellen der Astrozyten zu beobachten. Resultate dieser Zellschwellung sind eine Verschiebung des Ionengleichgewichts mit Beeinträchtigung der Membranpotentiale und Erregungsleitung, Behinderung der Blut-Hirn-Schranke mit weiterer Drosselung der Perfusion sowie Beeinflussung der Inter- und Intraaktionen von Neuronen und Gliazellen mit Störung der synaptischen Integrität und Demyelinisierung. Alle einzelnen Mechanismen verstärken die Neurotoxizität. Hierbei spielen insbesondere die Glutamatverschiebung sowie  $Ca^{2+}$ -abhängige Kanäle eine Rolle: es kommt zur unkontrollierten Aktivierung von Enzymen und anderen diversen Reaktionsketten. Morphologische Veränderungen der gap junctions, Blut-Hirn-Schranke und proapoptische Substanzen und das Fehlen von ATP verursachen Zelltod (Ascher et al.,1999).

Ferner weisen Astrozyten Züge einer neuronalen Regeneration auf. Sie versorgen Neurone mit Energieträgern wie Laktat und Pyruvat, halten die extrazelluläre Umgebung aufrecht, sind an bidirektionalen Interaktionen zwischen Neuronen und Astrozyten durch Neurotransmitter, wie Noradrenalin, Acetylcholin und GABA über  $Ca^{2+}$ -abhängige Mechanismen u.a. beteiligt.

Zusätzlich wird das zelluläre Netzwerk von kleinen Poren, sogenannte gap junctions, deren Bestandteil das Konnexin bildet, aufrechterhalten. Gap junctions ermöglichen eine direkte elektrische und biochemische Kommunikation und tragen zur metabolischen Funktion der Astrozyten als Teil der Blut-Hirn-Schranke bei. Hierbei stehen freie Diffusion (Glutamat) vom Ort hoher Konzentration zum Ort niedriger Konzentration sowie Transportwege (Glucose) zur Verfügung. Astrocytzen scheinen eine entscheidende Rolle in der antioxidativen Verteidigung des Gehirns einzunehmen. Neurone werden vor oxidativem Stress über mitochondriale gutathion-verteidigende Mechanismen geschützt (M.F.Anderson & M.Nilson, 2003).

Diese komplexen Vorgänge dienen als Ansatz für pharmakologische Behandlungen im Sinne einer Neuroprotektion. Gegenwärtig stehen thrombolytische Therapien neben

Rehabilitationsmaßnahmen im Vordergrund. Ziel sind Bemühungen um regenerationsfördernde Substanzen zur funktionellen Wiedererlangung des zentralen Nervensystems.

Das um das primär betroffene Areal umliegende Gewebe (Penumbra) wird über Gefäßkollateralen versorgt, so dass betroffene Zellen in diesem Areal ihre Membranpotentiale sowie ihre Ionengradienten aufrechterhalten können. Sie verlieren jedoch ihre elektrische Erregbarkeit. Der Zellverlust kommt nicht durch Ischämie, sondern durch sekundäre Mechanismen im Rahmen der Ischämie zustande. Das Ausmaß der Ischämie kann durch Reperfusion des betroffenen Gefäßes entscheidend reduziert werden, wobei es innerhalb eines Zeitfensters von 3-6 Stunden erfolgen sollte (M.F.Anderson & M.Nilson, 2003) .

#### **1.2.6.1 Astrozyten und Regeneration**

Die einzelnen Mechanismen der astrozytären Neurotoxizität dienen als Basis für multiple Angriffspunkte pharmakologischer Interventionen zur Erhaltung der Zellintegrität des ZNS. Wie unter „Astrozytäre Neurotoxizität“ am Beispiel der fokalen zerebralen Ischämie beschrieben, nehmen Astrocyten bedingt durch den höchsten Gehalt an Antioxidanzien eine besondere Bedeutung in der antioxidativen Abwehr des Gehirns ein. Der Verlust oder die Inhibition der mitochondrialen Glutationensynthese resultiert in der Entstehung eines zerebralen Infarkts mit deutlicher Einbuße von motorischen oder sensorischen Funktionen, wobei eine spontan (durch Physiotherapie) assoziierte Regeneration und Plastizität im Gehirn beschrieben wird. Sie schütten Wachstumsfaktoren und andere Moleküle – wie basic fibroblast growth factor (bFGF) (Finklestein et al.,1988; Frautschy et al.,1991), transforming growth factor- $\beta$ 1 (Lindholm et al.,1992), pleiotrophen (Yen et al.,1998), ziliären neurotrophen Faktoren (CNTF) (Ip et al., 1993), nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor (Rudge et al.,1995) und Neurotrophin 4 (Condorelli et al.,1994) – aus, welche die Neuronen vor dem Zelltod bewahren und den neuronalen Wachstum sowie die neuronale Stammzellaktivität beeinflussen (M.F.Anderson&M.Nilson,2003; Lima R.R., Santana L.N.S. et al, 2016). Posttraumatisch werden all diese Faktoren vermehrt exprimiert und nehmen an zellulären Prozessen der Wundheilung teil. Eine erfolgreiche Regeneration der Neurone erfolgt durch partiellen Rückzug der Astrozytenfortsätze und allmähliche

Repopulation der neuronalen Oberfläche mit Synapsen. Entgegen früherer Annahmen, dass mit der Geburt die Neurogenese sistiert, ist nunmehr bekannt, dass junge Neurone aus multipotenten Stammzellen in der subventrikulären Zone und im Gyrus dentatus über Blockierung des NMDA-Rezeptors entstehen. Dennoch sind ein Großteil der neuentstehenden Zellen - so auch im Infarktareal - aus glialer Herkunft. Das Interesse liegt in der Möglichkeit Potentiale der neuronalen Zelllinie in der Phase der Regeneration aktivieren zu können (M.F.Anderson & M.Nilson, 2003).

Zugleich stellt die gliale Narbe ein Hindernis des axonalen Wachstums dar (Anderson&Nilson,2003).

#### **1.2.6.2 Reaktive Gliose, Gliale Narbe**

Die **reaktive Gliose** ist ein Sammelbegriff für verschiedene pathologische Prozesse und charakterisiert die Hypertrophie und Proliferation der Astrozyten und Mikroglia samt ihrer Fortsätze um eine betroffene Läsion im ZNS, was zur Bildung von Narbengewebe führt. Reaktive Astrozyten, migriert oder aus Stammzellen entstanden, insbesondere der hippocampalen Region, produzieren und sezernieren inflammatorische Zytokine, Chemokine als auch Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation, Neuro- und Synaptogenese in vitro fördern. Zusätzlich werden Intermediärfilament Nestin, GFAP und Vimentin, Zellen des Reifungsprozesses, hochreguliert, so dass bei der reaktiven Astroglie von einem neuronalen Remodelling, Regeneration und zelluläre Neuentstehung im betroffenen Areal sowie in der homologen kontralateralen Seite auszugehen ist (M.F.Anderson & M.Nilson, 2003). Die **gliale Narbe** hält die Homeostase aufrecht, schützt Zellen vor weiteren toxischen Einflüssen, bildet eine Barriere bei der Regeneration und Funktionswiedererlangung des ZNS. Längerfristig stellt der Prozess der Narbenbildung ein Hindernis der funktionellen Wiedererlangung der neuronalen Interaktion dar (M.F.Anderson & M.Nilson, 2003). Die Ausbildung der glialen Narbenbildung kann sich mit potentiell schädlichem Effekt auf das neuronale Überleben, das aktionale Wachstum oder die Restitution des zentralen Netzwerkes über das ursprüngliche Schädigungsgebiet hinaus erstrecken (Ebrahimi F. Et al, 2012).

Eine frühe Intervention in der Ausbildung der Narbenformation erschwert die Wiederherstellung der neuronalen Funktion (Sims N.R., 2017).

In einigen experimentellen Arbeiten werden Ansätze der posttraumatischen Neurogenese evaluiert. Die ursprüngliche Annahme, dass nach der Geburt die Neurogenese abgeschlossen ist und somit posttraumatisch, wie bei einem Hirninfarkt die neuronale Integrität durch die überlebenden Neurone reorganisiert wird, wird relativiert. Im Bereich der subventriculären Zone und der hippocampalen subgranular Zone des Gyrus dentatus können über multipotente Stammzellen, NMDA-gesteuerte, funktionstüchtige neue Neurone generiert werden (Jin K et al.,2001). Mittels Proliferationsmarker BrdU und neuronenspezifische Marker Hu, Neu N und MAP-2 sowie Calbindin wird versucht, der Nachweis einer Neurogenese aus ortständigen und migrierten Vorläuferzellen nicht ausschließlich auf der ipsilateral geschädigten Hirnseite zu erbringen. Bei einem zerebralen Insult scheint die gliale Zellgenese gegenüber der Neurogenese zu überwiegen. Ansätze, eine unidirektionale neuronale Zelllinie zu schaffen, ohne die Funktionalität des ZNS und die Zellintegrität zu stören, ist die Herausforderung (Jin K et al.,2001).

### **1.3 Zytokine und NO: Regulation und Funktion im geschädigten Nervengewebe**

Zytokine sind aus Proteinen, Peptiden und Glukoproteinen bestehende natürliche Botenstoffe, die mit Inflammation, Immunaktivität, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod assoziiert werden. Sie dienen der Kommunikation von Zellen untereinander. Vorwiegend werden sie in biologisch inaktiven Vorstufen produziert und durch ihre Enzyme aktiviert. Ihre Wirkungen werden als autokrin (Zytokin wirkt auf Zelle, von der es ausgeschüttet worden ist), parakrin (Wirkung auf nähere Umgebung) und endokrin (Zytokin wirkt per Diffusion auf entfernte Regionen im Körper) beschrieben. Jedes Zytokin hat spezifische Rezeptoren, die eine intrazelluläre Kaskade in Gang setzen und schließlich die Wirkung des Zytokins beeinflussen. In entzündlichen Erkrankungen, Traumen und akuten Stresssituationen werden verstärkt Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  ausgeschüttet, die synergistisch wirken können. Die genannten Zytokine entfalten überwiegend inflammatorische Effekte, können wiederum durch andere Mechanismen antiinflammatorische Wirkungen hervorrufen (Allan&Rothwek,2001). Astrocyten hypothalamischer oder anderortsansässiger Herkunft unterschiedlicher Reifungsphasen haben unterschiedliche

Verhalten der proinflammatorischen Zytokinsekretion (TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) (Santos CL, Souza D.O., 2018).

Fünf Hauptgruppen der Zytokine sind Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren (TNF) und Chemokine (Benninghoff, 16. Auflage 2004, Mutschler, 10. Auflage 2013).

Nachfolgend werden die Arbeit bestimmende Botenstoffe erläutert.

### **1.3.1 TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  ist ein 17 kD Polypeptid, welches im ZNS sowohl von Astrozyten als auch von Mikroglia produziert wird. Es liegt in inaktiver Vorstufe vor und wird durch Konvertasen aktiviert. Seine Wirkung wird über Rezeptoren vermittelt, diese sind an intrazelluläre Signalwege wie NF $\kappa$ B und mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK's) gebunden. TNF- $\alpha$  erhöht die Permeabilität der endothelialen Zellen, verstärkt die Expression der verschiedenen Adhäsionsmoleküle auf den glialen Zellen, dieses wiederum erlaubt die Adhäsion von Leukozyten (Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten) an den kapillären Oberflächen (Brett et al., 1989; Pober et al., 1986; Pohlman et al., 1986).

TNF- $\alpha$  regt diverse Zellen - Astrozyten mit inbegriffen – an, verschiedenste Zytokine über autokrine Wege zu sezernieren und ist auf diese Weise an der Modulation der Immunantwort beteiligt. Es entfaltet einen positiven Effekt auf das neuronale Überleben (Barger et al., 1995; Bruce et al., 1996; Cheng et al., 1994), wobei auch eine dosisabhängige neuronale Toxizität nachgewiesen werden konnte (Akassoglou et al., 1997; Chao and Hu, 1994; Westmoreland et al., 1996). Bekannt ist die Induktion des apoptotischen Zelltodes in Neuronen. In Astrozyten ruft es vermehrt entzündlich demyelinisierende Erkrankungen hervor. Eine Überexpression von TNF- $\alpha$  begünstigt eine Entwicklung von neuronalen Erkrankungen. Kombiniert mit IL-1 zeigt es neuroprotektive Verhaltensweisen (Allan & Rothwell, 2001).

### **1.3.2 Interleukin 1**

Es wird zwischen zwei eng verwandten Proteinen, das IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  unterschieden. Beide Proteine entfalten ihre Wirkung einerseits über einen löslichen Rezeptor und andererseits über eine spezifisch zellgebundene Rezeptorebene bei ähnlich biologischen

Eigenschaften. Produktionsstätten des IL-1 sind neben Gliazellen, Fibro-, Osteoblasten sowie u.a. Hepatozyten.

**IL-1 $\beta$**  ist ein 17 kD Polypeptid, welches als der wichtigste Mediator der inflammatorischen Antwort gehandelt wird. Es hat einen stimulatorischen Effekt auf das Wachstum der Astrozyten sowie einen entscheidenden Einfluss auf die astrozytäre Differenzierung und Ausreifung (Giulian and Lachman,1985). IL-1 $\beta$  ist hauptsächlich an Zell-Zell Interaktionen beteiligt. Es fördert die Astrogliose oder gliale Narbenbildung sowie die Neovaskularisation (Giulian et al.,1988). Weiter regt es Astrozyten während der intrazerebralen Immunantwort zur Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-6 und G/GM-CSF an, die über autokine sowie parakrine Mechanismen Einfluss auf gliale Zellen ausüben. Eine synergistische Wirkung der Neurotoxizität von IL-1 $\beta$  kann mit TNF- $\alpha$  erzielt werden (Chao et al.,1995). Zeichen einer Neurodegeneration im Rahmen von entzündlichen Prozessen ist der rasch ansteigende IL-1 Spiegel (Rothwell&Luheshi,2000; Hara et al.,1997; Griffi et al.,1989; Hofman et al,1986; McGuinness et al,1997), dessen Antagonisierung den Neuronentod im Tiermodell unter Ischämie reduziert (Relton & Rothwell,1992; Yamasaki et al.,1995). IL-1 induziert die Produktion von verschiedenen Wachstums- und trophischen Faktoren, die das Erhalten der Neurone fördern (DeKosky et al.,1994, Friedman et al.,1996). IL-1 stellt gleichzeitig ein äußerst potenter Aktivator von Astrozyten dar (Giulian et al.,1988, Albrecht et al.,2002). Es stimuliert andere inflammatorische Mediatoren, wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), Prostaglandine, NO, Matrixmetalloproteasen und Kollagenasen (Rothwell & Luheshi,2000) und vermittelt darüber seine neurodegenerative Wirkung. IL-1 induziert die Produktion und Sekretion von anderen Zytokinen wie u.a. TNF- $\alpha$  (Chung & Benveniste,1990) und verstärkt in autokrinen Sekretionsmechanismen durch positiven Feedback wiederum seine eigene Expression (Boutin et al.,2001).

### **1.3.3 Stickstoffmonoxid (NO)**

Im ZNS ist NO ein wichtiger physiologischer Botenstoff, der bei der neuronalen Entwicklung, synaptischen Plastizität, neuroendokrinen Sekretion, sensorischen Prozesse sowie zerebralen Durchblutung involviert ist (Garthwaite&Boulton,1995; Zhang&Snyder,1995). Diese Wirkungen werden scheinbar durch das Ausmaß der

cyclischen GMP Erhöhung beeinflusst. Nicht nur unter physiologischen Bedingungen, sondern auch in einer Reihe von pathologischen Vorgängen des Gehirns - Epilepsie, in der Abwehr von Erregern und bösartigen Zellen, Ischämie, Exzitotoxizität bis hin zum Zelltod – erfolgt die mikrogliale NO-Produktion durch die Aktivierung der induzierbaren Nitritoxidsynthase (iNOS) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Acarin et al.,2002; Di Iorio et al.,2002; Dawson & Snyder,1994; Förstermann&Kleinert,1995; Garthwaite,1991; Moncada et al.,1991; Moncada & Higgs,1993; Vincent,1994; Wallace et al.,1997). COX-1 ist in vielen Körperzellen vorzufinden, wohingegen COX-2 lediglich in inflammatorischen Zellen exprimiert wird. NO wird aus L-Arginin durch die NO-Synthase (NOS) synthetisiert. Bekannt sind drei NOS-Isoformen, die  $Ca^{2+}$ -abhängige konstitutive neuronale und endotheliale NOS und die  $Ca^{2+}$ -unabhängige NOS (Nathan,1992). Periphere Immunzellen wie Makrophagen, Neutrophile, Granulozyten, Hepatozyten, Endothelzellen, aber auch die im ZNS vorkommenden Mikro- und Astroglia exprimieren iNOS (Bandaletova et al.,1993; Nomura & Kitamura,1993). Die Induktion der iNOS 2 erfordert die de-novo Genexpression. Im Fall von infektiösen Geschehnissen fungieren bakterielle Endotoxine Lipopolysaccharide (LPS) alleine oder in Kombination mit verschiedenen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ ) als essentielle Induktoren (Boje & Arora,1992; Chao et al.,1992,1997; Chung & Benveniste, 1990; Galea et al.,1992; Lee et al.,1995; Lieberman et al.,1989; Merrill et al.,1993; Simmons&Murphy,1992; Skaper et al.,1995; Förstermann & Kleinert,1995; Morris & Billiar,1994;). Diese Zusammenhänge sind mehrfach in astrozytären, mikroglialen sowie oligodendrozytären Kulturen, in vivo Versuchen und postmortem am Gehirn bei Patienten mit MS und Alzheimer Erkrankung nachgewiesen (Lee et al.,1993; Murphy et al.,1993; Merrill et al.,1997; Bö et al.,1994; Wallace et al.,1997). Die Transkription der iNOS Gene wird über verschiedene Wege, den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der zahlreiche proinflammatorische und immunologische Gene reguliert, mit inbegriffen, kontrolliert (O'Neill & Kaltschmidt,1997; Mutschler 10-Auflage,2013).

#### **1.3.4 Sonstige Zytokine und Botenstoffe**

Andere Botenstoffe, welche in der vorliegenden Arbeit nicht Gegenstand der Untersuchung sind, sind:

#### **1.3.4.1 IL-6**

IL-6 ist ein 26 kD Polypeptid, das für die Induktion der terminalen Differenzierung der aktivierten B-Zellen in immunglobulinsezernierende Plasmazellen verantwortlich ist. Es entfaltet mitogene Effekte auf Astrozyten im Rahmen der reaktiven Gliose (Selmaj et al.,1990). Astrozyten wiederum antworten mit Sekretion von nerve growth factor (NGF) auf IL-6 Stimulation mit Induktion neuronaler Differenzierung (Frei et al.,1989).

#### **1.3.4.2 G-/GM-CSF**

Granulozyten / Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierende Faktoren können ebenfalls durch Astrozyten nach IL-1 Induktion sezerniert werden. Möglicherweise dienen sie als essentielles Element zur Rekrutierung und Aktivierung von hämatogenen Zellen ins ZNS. G-/GM-CSF erhöhen die Zahl der funktional reifen Makrophagen, so dass sie ihre Aktivität der Phagozytose, Zytotoxizität und antimikrobielle Wirkung steigern (Malpiero et al.,1990).

#### **1.3.4.3 Interferon- $\gamma$**

Das pleiotrope Zytokin 17 kD Polypeptid IFN- $\gamma$ , welches hauptsächlich durch aktivierte T-Zellen (CD<sup>4+</sup> und CD<sup>8+</sup>) produziert wird und nur bei gestörter Blut-Hirn-Schranke im ZNS vorzufinden ist, wird zugleich von Granulozyten und Fibroblasten gebildet. Es wirkt vordergründig antiviral und hat immunmodulatorische Effekte. Die lokale Bildung von IFN- $\gamma$  durch Astrozyten und Mikroglia ist bei neuronalen Autoimmunerkrankungen von Bedeutung (Fierz et al.,1990). IFN- $\gamma$  und IL-1 zusammen erhöhen die Expression von NOS in Astrozyten (Nathan, 1992), was zur Neurotoxizität beiträgt (Ascher,1998).

#### **1.3.4.4 Reaktive Sauerstoffradikale**

Sauerstoffradikale können von aktivierten Makrophagen freigesetzt werden und führen zur Lipidperoxidation, was in vitro zur Zerstörung von Myelin führt.

#### **1.3.4.5 Komplementfaktoren**

Die von den Gliazellen synthetisierten Komplementfaktoren, schwerpunktmäßig die terminal aktiven Komponenten wie C5b-C9, können in den Entzündungsprozess mit involviert sein und verstärken die antikörpervermittelte Demyelinisierung und Initiierung der Schübe bei dem chronischen Verlauf der Multiplen Sklerose. Dies geschieht über eine Aktivierung der Phospholipase A2 und der Freisetzung von Eicosanoiden, die den Entzündungsprozess weiter aktivieren (Pollard et al,1995).



## 1.4 Purine

Purine sind wichtige Bausteine der Nukleinsäuren. Nukleotide setzen sich aus je einer Base, einer Pentose und einem Phosphatrest zusammen. Sie sind Bestandteile der Ribonukleinsäure RNA bzw. Desoxyribonukleinsäure DNA, welche die Speicherform der genetischen Information ist. Die in den verschiedenen Nukleotiden vorkommenden Basen leiten sich formal von Purin bzw. Pyrimidin ab. Die häufigsten Pyrimidinbasen sind Cytosin, Thymin und Uracil. Zu den wichtigsten Purinbasen zählen Xanthin, Hypoxanthin, Inosin, Adenosin und Guanosin. Basen spielen nicht nur bei der Verschlüsselung des genetischen Codes eine entscheidende Rolle, sie sind auch physiologisch bei der Zellinteraktion beteiligt; unter pathophysiologischen Bedingungen führt z.B. Adenosin zu Apoptose der Astrozyten (Di Iorio et al., 2002).

Extrazelluläres Guanosin hat unterschiedliche trophische Effekte. Guanosin stimuliert die Proliferation der Astrozyten (Kim et al., 1991; Ciccarelli et al., 2000) und von anderen Zellen (Rathbone et al., 1992), fördert die Synthese und die Ausschüttung von glialen, astrozytären und mikroglialen, neurotrophischen und pleiotrophischen Faktoren wie NGF, S-100 $\beta$  und TGF- $\beta$  (Middlemiss et al., 1995; Ciccarelli et al., 1999b; Caciagli et al., 2000; Di Iorio et al., 2001), hat einen wahrscheinlich neuroprotektiven Effekt (Frizzo et al., 2001) und erhöht das Auswachsen der neuritischen Fortsätze von Neuronen und Neuronen ähnlichen Zellen (Gysbers&Rathbone, 1992; Rathbone&Juurlink, 1993).

Guanosin induziert ebenso den astrozytären Zelltod durch Akkumulation von extrazellulärem Adenosin, welches über die Adenosin-desaminase zu Inosin verstoffwechselt und schließlich apoptotisch wird. Über eine Inhibition diverser Mechanismen konnte die astrozytäre Apoptose reduziert werden (Di Iorio et al., 2002; Ciccarelli et al., 1999a).

Auch über extrakranielle Mechanismen (verabreicht intraperitoneal) scheint Guanosin seine neuroprotektive Wirkung via Astrozyten zu entfalten (Giuliani P. et al, 2015).

Nukleotide modulieren die Kontrolle über die Interaktion von Gliazellen und Neurone. Neuere nukleotidbasierte Antiepileptika, fokussiert auf die Rolle von Adenosin und Uridin, könnten in der Behandlung der Epilepsie entscheidend sein (Heja L. Et al, 2015).

## **1.5 Immunsuppressive Therapien**

Das Immunsystem ist zur Verteidigung des Organismus gegen potentiell schädliche körperfremde Stoffe und gegen entartete körpereigene Zellen dienlich. Hierzu existieren sich ergänzende Systeme, das spezifische und unspezifische humorale und zelluläre Immunsystem.

Immunsuppressiva sind Substanzen, die Immunreaktion zu unterdrücken vermögen. Das Ausschalten des Abwehrsystems ist bei der Organtransplantation sowie bei den Autoimmunerkrankungen von Bedeutung. Zu den Immunsuppressiva zählen: Cyclosporin A, Tacrolimus (FK 506) und Sirolimus, Glukokortikoide, Zytostatika sowie mono- und polyklonale Antikörper.

Bezugnehmend auf ischämische und traumatische ZNS Läsion wurden verschiedene immunsuppressive Substanzen in mehreren Studien auf ihre Wirkung, morphologische und funktionelle Resultate hin, untersucht (Mutschler 10.Auflage,2013).

### **1.5.1 Cyclosporin A**

Cyclosporin A (Sandimmun®; Dosis 2-6 mg/kg) ist ein vom Pilz Tolypoclamium gebildetes, hydrophobes polyzyklisches Peptid, welches aus 11 Aminosäuren besteht. Es wirkt auf die humorale und zelluläre Immunantwort, wobei die Freisetzung von IL-2 aus T-Helferzellen gehemmt wird. Die Ausreifung von T-Zellen zu zytotoxischen Zellen bleibt aus. Durch eine intrazelluläre Komplexbildung von Cyclosporin/Cyclophilin wird die  $Ca^{2+}$ -abhängige Protein-Phosphatase-Aktivität des Calcineurin-Calmodulin-Komplexes zur Abspaltung von nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NF-AT) gehemmt. Als Folge wird die IL-2-Synthese inhibiert, wohingegen die Phagozytoseaktivität der Zellen des retikuloendothelialen Systems nicht unterdrückt wird, mithin die bakterielle Abwehr unbeeinflusst bleibt. Nebenwirkungen sind dosisabhängig Nieren-, Leberschädigung, Kardiotoxizität, Hirsutismus, Gingivahyperplasie, Tremor und Ödeme (Mutschler 10.Auflage,2013).

Cyclosporin A reduziert - wie in verschiedenen Modellen (Spinalkanal, Cortex und bei cerebraler Ischämie) gezeigt - das Ausmaß des neuronalen Schadens. Mit der Reduktion der infiltrierenden Makrophagen oder mikroglialen Zellen kommt es zur Eingrenzung

des neuronalen Schadens (Wakita et al.,1995), einer Verbesserung der axonalen Aussprossung sowie Regeneration (Ebrahimi et al, 2012).

### **1.5.2 Glukokortikoid**

Die immunsuppressive Wirkung der Glukokortikoide, oftmals mit anderen Immunsuppressiva kombiniert, beruht auf Bindungen an definierten DNS-Stellen bestimmter Gene auf Transkriptionsebene der Zytokine (IL-1,2,6 u.a.) aufgrund der Lipophilie. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) durch Phosphorylierung aktiviert, reguliert viele proinflammatorische Zytokine. Glukokortikoide beeinflussen diesen Prozess auf verschiedene Weise. Die Inaktivierung des NF- $\kappa$ B sowie anderer Transkriptionsfaktoren im Zellkern zur sehr frühen Phase der Immunreaktion führt zum Ausbleiben der Expression proinflammatorischer Zytokine. Die zu Beginn der Therapie auftretende Lymphozytopenie beruht auf Umverteilung der Lymphozyten im Knochenmark (Mutschler 10.Auflage,2013).

Neben der immunsuppressiven (Hemmung der Zellproliferation) Wirkung ist eine gut beschriebene antiphlogistische bzw antiinflammatorische Wirkung durch eine Inhibition der Zytokin- sowie der Prostaglandinproduktion (NO) bekannt. Andererseits scheint eine chronische Glukokortikoidtherapie einen proinflammatorischen Effekt in Bezug auf die spezifische Immunantwort bei ZNS Läsionen zu haben. Die neuronale Regeneration wird eingedämmt, die gliale Narbenbildung begünstigt (Juryneec et al.,2003).

Das experimentell genutzte Dexamethason, das künstliche Glukortikoid, hemmt in Astrozytenkulturen die Zytokinexpression ohne Einfluss auf die Zellproliferation, wobei das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) zur Induktion einer Immunantwort in einer Astrozytenkultur als Modell einer Entzündungsreaktion des ZNS fungiert (Nicholson et al.,2002).

Ein Nutzen des Kortisons bei einem Schädel-Hirn-Trauma und einer Querschnittsymptomatik weist allerdings nur marginale Effekte auf das neuronale Überleben und eine hohe Rate an unerwünschten Nebenwirkungen auf (Dehghani F. et al, 2010).

### **1.5.3 Wirkmechanismus und Pharmakotherapie von Mycophenolat-Mofetil**

Das Zytostatikum Mycophenolat-Mofetil (MMF) ist in der Transplantationsmedizin unter dem Handelsnamen CellCept® bereits in Kombination mit Cyclosporin A und Glukokortikoiden in der klinischen Anwendung und für die Behandlung von Patienten nach Organtransplantationen zugelassen (Dosierung: 2-3g/d). MMF wird ebenso erfolgreich in der Behandlung chronischer autoimmunologischer Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses und Psoriasis vulgaris eingesetzt (Epinette et al.,1987; Baker&Fry,1992; Haufs et al.,1998). Ein anderer Anwendungsbereich betrifft die antivirale Kombinationstherapie, in der MMF mit Ribavirin bei Hepatitis C Anwendung findet (Neyts et al.,1998; Neyts& De Clercq,1999). MMF, ein semisynthetisches Derivat der Mycophenolsäure, kann aus dem *Penicillium glaucum* isoliert werden. Aus der inaktiven Vorstufe Mycophenolat-Mofetil wird durch Esterasen die immunsuppressiv wirksame Mycophenolsäure abgespalten, die selektiv die Wirkung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, einem wichtigen Enzym der De-novo-Purinsynthese, inhibiert. Hierbei wird der intrazelluläre ATP- und GTP-Pool depletiert und eine antiproliferative Wirkung erzielt. Die Zellproliferation und Antikörperbildung werden gehemmt (Allison&Eugui, 2000; Mele& Halloran,2000). Die inhibitorische Wirkung von MMF lässt sich durch das Purin Guanosin antagonisieren, was sich in der Analyse der Proliferationsrate und der Cytokinsekretion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  widerspiegelt. Die Nebenwirkungen sind vielfältig: Fieber, Ödeme, Störung der Hämatopoese (Anämie, Lymphopenie, Thrombopenie), Hypertonie und aufgrund der supprimierten Immunantwort Infektionen (Mutschler 10.Auflage,2013).

Mehrfach konnte MMF potente neuroprotektive Aktivität in exzitotoxisch geschädigten hippocampalen Schnitten (OHSCs) nachgewiesen werden. MMF inhibiert mikrogliale und astrozytäre Aktivität, reduziert die konsekutive Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren durch Inhibition von enzymatischer Aktivierung von iNO Synthase neben anderen Effekten. Des weiteren verbessert MMF den Erhaltung langstreckiger Myelinisierung *in vitro* und die axonale Regeneration (Ebrahimi et al, 2012; Dehghani F. et al, 2010).

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Gegenstand dieser Studie ist die Wirkung des immunsuppressiven Pharmakons Mycophenolat-Mofetil auf die Aktivität von Astrozyten in Einzelzellkultur zu untersuchen.

### **1.6.1 Arbeitshypothese 1**

Astrozyten verändern ihre Proliferationsrate abhängig von der Dosis der Serumzusammensetzung.

Die Überprüfung der These gelingt durch eine Versuchsreihe von Nährmedien mit unterschiedlichem Anteil von Serum. Zusätzlich wird die Proliferation unter dem Einfluss von wachstumsfördernden Substanzen wie Corticotropin releasing factor (CRF) im serumfreien Medium ermittelt. Mittels HE-Färbung erfolgt die Analyse.

### **1.6.2 Arbeitshypothese 2**

Mycophenolat-Mofetil inhibiert selektiv die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), welches ein essentielles Enzym der de-novo Biosynthese der Purinnukleotide ist. Die Depletion des intrazellulären Guanosins und die Inhibition der DNA Synthese führt zu einer Suppression der Lymphozytenproliferation und Antikörperbildung (Allison&Eugui,2000). Mycophenolat-Mofetil deaktiviert Astrozyten, führt nicht nur zur morphologischen Veränderungen und Reduktion der Proliferationsrate, sondern auch zu einem veränderten Sekretionsverhalten der Astrozyten von proinflammatorischen Zytokinen sowie NO.

Die Überprüfung der These wird durch quantitative Morphometrie ermittelt. Die Zellzahlen und die Proliferationsindices werden nach standardisierten Protokollen zur Behandlung der Astrozyten-Einzelzellkulturen mit Mofetil und Vergleichsreihen, wie Kontrollgruppen (CTL) und Negativgruppen (LPS), errechnet. Die aus den Überständen der Nährmedien einzelner Versuchsgruppen gewonnenen Materialien werden für Zytokin- (TNF- $\alpha$  und IL-1  $\beta$ ) und NO-Bestimmung genutzt.

### **1.6.3 Arbeitshypothese 3**

Guanosin antagonisiert die inhibitorische Wirkung von Mycophenolat-Mofetil.

Hierzu erfolgt die Überprüfung durch eine konzentrationsabhängige MMF-Versuchsreihe. Die Analyse bezieht sich auf die Proliferationsrate, die Morphologie sowie das Zytokinsekretionsmuster.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1.1 Verwendete Substanzen, Lösungen und Antikörper**

- Alexa Flour 546, Anti-Maus (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
- Alpha-Tcopherol (Vitamin E) (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- Anti-BrdU, Maus Anti-5-Bromo-2'-Desoxyuridi, monoklonal (DAKO, Hamburg, Deutschland)
- Anti-GFAP, Anti-Saures Gliafaser-Protein (anti-gliafibrillary acidic protein), Kaninchen Anti-Rind, polyklonal (DAKO, Hamburg, Deutschland)
- Anti-Maus IgG, Biotin konjugiert (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- BrdU, 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- BSA, Bovines Serum Albumin, Bovine Fraction V Powder (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- CRF, Corticotropin Releasing Factor (human, rat; Bachem, Best.-Nr:0557180)
- DAB, 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- Dako Fluoreszenz Eindeckmedium Dakomount (DAKO, Hamburg, Deutschland)
- Di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- DMEM, Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- Dnase, Desoxyribonuklease I 2.100 U/mg DW (Worthington Biochemicals, Bedford MA, USA)
- Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Eosin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland)
- ExtrAvidin Peroxidase (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- FKS, Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)

- Glutamin (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- Glyceringelatine, Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Griess Reagenz (Essigsäure 286 g/l, Sulfanilsäure 55g/l, 1-Naphtylamin 0,31 g/l; Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Guanosin (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- Hämatoxylin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- HBSS, Hanks balanced saline solution mit  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- HBSS, Hanks balanced saline solution ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- IB<sub>4</sub>, Isolectin B<sub>4</sub> (Griffonia Simplicifolia BS-I), Biotin-konjugiert (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland, Best.-Nr.:L2140)
- IB<sub>4</sub>-FITC konjugiert, Isolectin B<sub>4</sub> Fluorescein Griffonia Simplicifolia Lectin I (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland, Best.-Nr.:L2895)
- Kaliumnitrit (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- LPS, Lipopolysaccharide aus E.coli 026:B6, lyophilisiert (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- Methanol zur Analyse, ACS, ISO (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Mycophenolate-Mofetil (Hofmann La Roche, Mannheim, Deutschland)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- NHS, normales Pferdeserum (normal horse serum), hitzeinaktiviert (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- PBS, Dulbeccos, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- Penicillin-Streptomycin Lösung (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- Poly-L-Lysin (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)
- Quantikine M Murine, Rat IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  Immunoassay (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
- Salzsäure, HCL 25% (Merck, Darmstadt, Deutschland)

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (M121.1) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Triton X (Merck Darmstadt, Deuthscand)
- Trypsin (Hofman La Roche, Mannheim, Deutschland)
- Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) (Biochrom KG, Berlin, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

### **2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien**

- Deckgläser, Durchmesser 12 und 18 mm, Stärke 1 (Glasfabrik Karl Hecht, Sodenheim/Röhn, Deutschland)
- Multiwell-Zellkulturplatten 24-Loch (Falcon, Heidelberg, Darmstadt)
- Objektträger, „ELKA“, mit mit Mattstreifen an Schmalseite bekennt (Glasfabrik Karl Hecht, Sodenheim/Röhn, Deutschland)
- Pasteur-Pipette, Glas, kurze Form, 150 mm (Glasfabrik Karl Hecht, Sodenheim/Röhn, Deutschland)
- Petrischale, 35x10 mm, 8,7cm<sup>2</sup> und 94x1 mm, 58 cm<sup>2</sup> (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipette 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml steril, einzeln verpackt (Greiner Frickenhausen, Deutschland)
- Pipettenspitzen, Kristal E Typ, 20 µl, Eppendorf Typ, 200 µl und Eppendorf Typ 1000 µl (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Probenröhrchen, 15 ml und 50 ml, steril (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Stericup GP 150 ml (Millipore, Bedford MA, USA)
- Zellkultur-Flaschen, Schräghals 25 cm<sup>2</sup> mit 50 ml und 75 cm<sup>2</sup> mit 250 ml (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

### **2.1.3 Verwendete Geräte und Computerprogramme**

- Axiovert 5 Mikroskop mit dem System Zeiss KS400. 3.0 (Zeiss, Göttingen, Deutschland)
- ELISA microplate reader (ELISA Ceres 900, Bio-Tek Instruments, INC., USA)
- Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Göttingen, Deutschland)



- Standard 20 Zeiss Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland)
- Statistikprogramm: GraphPad, San Diago, USA

#### 2.1.4 Medien zur Präparation und Kultivierung von Einzellzellkulturen

- 100 ml Kulturmedium: der Grundlösung 88 ml, 95 ml bzw 98 ml DMEM mit 10%, 5% bzw 2% FKS wird zunächst 1% Glutamin beigemischt. Um Keimbeseidlungen zu verhindern wird eine Antibiotikabeimischung aus 100 U/ml Penicillin und 0.1mg/ml Streptomycin hinzugefügt.

#### 2.1.5 Verwendete Puffer und Stammlösungen

Es erfolgt das Ansetzen der Pufferlösungen jeweils in einem Liter Aqua destillata, wobei alle Pufferlösungen auf einen pH-Wert zwischen 7,35- 7,4 mittels HCL bzw. NaOH eingestellt werden:

- Phosphatpuffer (0,1M; 0,2M, 0,02M): für 0,1M 11,36 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 2,72 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , für 0,2M 22,72 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 5,44 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  bzw 2,27 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 0,054 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  für 0,02M Pufferlösung
- Phosphatpuffer (PBS) 0,02M+ Triton X: 2,27 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 0,054 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , abhängig vom pH-Wert HCL-Gabe
- Trispuffer (0,05M): 6,06 g Tris-Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), bedarfweise HCL
- Paraformaldehyd 4%: 40 g Paraformaldehyd mit 500ml Aqua destillat mit einem Magnetrührer auf 70°C erhitzen, zur pH-Einstellung wird 1-2 Tropfen 5N NaOH hinzugegeben, nach Abkühlen Beimischung von 500ml Posphatuffer 0,2M
- Alkohollösungen jeweils 1 Liter:
 

95% Ethanol		A.dest	
70%	737 ml	+	263 ml
80%	842 ml	+	158 ml
90%	947 ml	+	53 ml
- DAB-Stammlösung: 5 g DAB in 100 ml Aqua des. lösen, 100 µl dieser Stammlösung werden zur Immunhistochemie mit 10 ml Tris-Puffer und 5 µl  $\text{H}_2\text{O}_2$  vermischt

- Guanosin-Stammlösung (1M): 2,832 g Guanosin in 10 ml 0,02 M PBS-Puffer lösen. Für Versuche mit 100  $\mu$ M 1  $\mu$ l dieser Stammlösung auf 10 ml Kulturmedium verwenden.
- Mycophenolat-Mofetil aus 10 mg Pulversubstanz bei +4°C gelagert: 0,01 g MMF in 2 ml Methanol und 8 ml Kulturmedium gelöst macht eine Stocklösung von 500  $\mu$ g/ml
- CFR 0,5mg Pulversubstanz bei +4°C gelagert in 1 ml Aqua des. ergibt eine Stammlösung von 100  $\mu$ M

## 2.2 Astrozytäre Einzelzellkulturen

Isolierte Astrozyten wurden unter sterilen Bedingungen durch Dekapitation von neugeborenen maximal 2 Tage alten Wistar Ratten (p0-p2) nach einem Standardprotokoll (Giulian and Baker,1986) entnommen. Kurz nach der Dekapitation wurde das Kleinhirn entfernt, das Hirn von den Hirnhäuten befreit, und die zerebralen Hemisphären in einer  $\text{Ca}^{2+}$ /  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Hank's Lösung (HBSS w/o calcium; Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein,Germany), die Trypsin (4mg/ml; Boehringer, Mannheim,Germany) und DNase (0.5 mg/ml; Worthington,Bedford MA,USA) enthielten, dissoziiert. Nach einem Waschvorgang mit HBSS und DNase folgte eine Trituration mit einer Pipette, bis schließlich eine Zellsuspension entstand. Diese Zellsuspension wurde bei 4°C und 133g (Erdbeschleunigung) für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in einem Kulturmedium resuspendiert. Dem Nährmedium für die astrozytären Einzelzellen, was aus Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM,Gibco) bestand, wurden unterschiedliche Konzentrationen (1%, 2%, 5% und 10%) fötales Bovinserum (FBS,Gibco), 1% Glutamin (Boehringer, Mannheim,Germany), 100 U/ml Penicillin (Sigma, St. Louis,MO), 0,1mg/ml Streptomycin (Sigma) zugesetzt. Für einen Teil der Versuche enthielt das Medium kein Serumzusatz. Anschließend wurden die Zellen im resuspendiertem Medium auf eine mit Poly-L-Lysine-beschichtete 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche (Falcon, Lincoln Park, NJ) transferiert und bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Serumfreies Nährmedium wurde dadurch erhalten, dass dem DMEM 1mg/ml bovines Serumalbumin (Sigmaguder) (Ha et al., 2000) zugesetzt wurde. Diese Prozedur resultierte in einem konfluenten Wachstum eines Astrozytenrasens, auf der Mikroglia adhärirten. Das Wechseln des

Nährmediums erfolgte jeden 2. oder 3. Tag. Zum Lösen der Zelladhärenz wurden mit jedem Mediumwechsel die Kulturen ausschließlich durch wiederholtes Schwenken der Kulturflaschen von den Mikroglia befreit, das mikrogliareiche Medium verworfen und so eine nahezu reine Astrozytenkultur gewonnen. Aufgrund des Präparationsverfahrens sowie der Wahl der Kulturmedien war ein Wachstum von Neuronen oder Oligodendrozyten nicht möglich.

Für das Passagieren der Astrozyten wurden am 6. oder 9.Tag die Astrozyten mit PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Dulbecco's, Gibco) gewaschen, zur Dissoziation für 5 Minuten mit Trypsin/EDTA (Biotherm KG) in PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gelöst, inkubiert, in frischem Nährmedium resuspendiert und auf eine 24-Lochplatte (Falcon), dessen Coverslips mit Poly-L-Lysine beschichtet waren, übertragen. Am folgenden Tag setzten sich die Zellen ab, so dass die Behandlung entsprechend den Versuchen durchgeführt werden konnte. Die Zelldichte pro Coverslip betrug ca. 10-30.000 Zellen pro Coverslip.

### **2.3 Aufbau der Versuche**

Die Anzahl der Versuche pro Gruppen betrug mindestens 6 mit je 3 Feldern pro 24-Lochplatte. Am folgenden Tag der Passage, nachdem das Absetzen der Astrozyten sicher angenommen werden konnte, wurden die Versuche gestartet.

Jedes Experiment wurde für 48h kultiviert, und 16h vor Fixation wurden die Astrozyten mit dem Thymidinanalog 5`Bromo-2`-deoxyuridin (BrdU;1:25;Sigma), ein verlässlicher S-Phasenmarker, inkubiert, so dass die Proliferation der Astrozyten festgehalten wurde. Die Überstände der puren Astrozytenrasen wurden gesammelt, gepoolt, filtriert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum weiteren Nutzen zur Analyse auf Zytokine und NO eingefroren.

#### **2.3.1 Protokoll zur Darstellung der serumabhängigen Zellproliferation**

Um die Beziehung der Zellproliferation in Abhängigkeit zum Serumanteil im Nährmedium demonstrieren zu können, wurden Medien wie folgt angelegt: pro 100ml Medium wurden in 88ml DMEM 1% Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0.1mg/ml Streptomycin und die unterschiedlichen Serumkonzentrationen von 1%, 2%, 5% und 10% FKS gelöst.

Gruppe 1: Behandlung der Astrozyten mit 1% Kulturmedium

Gruppe 2: Behandlung mit 2% Kulturmedium

Gruppe 3: Behandlung mit 5% Kulturmedium

Gruppe 4: Behandlung mit 10% Kulturmedium

Gruppe 5: Behandlung der Astrozytenkulturen mit serumfreiem Medium

### **2.3.2 Protokoll zur Behandlung der Astrozytenkulturen mit CRF und Guanosin**

Während der Synthesephase in der Mitose erfolgt der Einbau von Basen in die DNA der Zellen. Daher bot es sich an, die endogene DNA Base, Thymidin, im Nährmedium gegen das Langzeitanalogon 5'-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) auszutauschen, um so das spezifische Anfärben der sich teilenden Zellen und ihrer Tochterzellen besser verfolgen zu können. Bekanntermaßen sind astrozytäre Proliferation bei einem ZNS Schaden durch Zytokine, NO und andere Mediatoren stimulierbar. Von besonderem Interesse in der vorliegenden Arbeit waren der Einfluss von Nährmedien mit unterschiedlichen Serumanteilen (serumfrei und 1-10%) auf die angereicherten Einzelzellen, der direkte Effekt beim Zufüttern von der Base Guanosin bei 10%, 1% Serumanteil im Medium, im serumfreien Medium sowie die Stimulation der Zellen mit dem Hormon Corticotropin Releasing Factor (CRF 10 $\mu$ M; Bachem). Hierzu wurde die wachstumsanregende Wirkung von CRF zunächst in Vorversuchen angetestet. Dabei wurden Konzentrationen von 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M genutzt. Die Letztere (10 $\mu$ M) erwies sich als geeignet. Weiter wurde das Zusammenspiel von MMF in unterschiedlichen Konzentrationen CRF und Guanosin untersucht.

A) Gruppe 1: Kontrollen mit 1%, 10% und serumfreiem Medium

Gruppe 2: Guanosin 100 $\mu$ M in 1%, 10 % und serumfreiem Nährmedium

Gruppe 3: CRF 10 $\mu$ M in 1% und serumfreier Astrozytenkultur

B) Gruppe 1: Kontrolle serumfreies Nährmedium

Gruppe 2: Guanosin 100 $\mu$ M in serumfreiem Medium

Gruppe 3: Guanosin 100 $\mu$ M + MMF (10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml und 0,1 $\mu$ g/ml) in serumfreiem Medium

Gruppe 4: CRF 10 $\mu$ M in serumfreiem Medium

Gruppe 5: CRF 10 $\mu$ M + MMF (10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml und 0,1 $\mu$ g/ml) in serumfreiem Nährmedium

### **2.3.3 MMF-Protokoll**

Die Mycophenolat-Mofetil (MMF) Reihen wurden hauptsächlich mit den Konzentrationen 10µg/ml, 1µg/ml und 0.1µg/ml in 1% und 10% serumhaltigem und serumfreiem Medium durchgeführt. Hierzu wurde die 500µg/ml Stocklösung aus 10mg Mofetil in 1ml Methanol und 9.5 ml Medium auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Zur Stimulation der Zellen als Positivkontrollen wurden 10ng/ml Lipopolysaccharid (LPS von Escherichia coli; Sigma) allein oder in Kombination mit MMF verwendet. Zusätzlich wurden einige Gruppen, um die MMF Wirkung zu antagonisieren, mit 100µM Guanodin (Sigma) kultiviert. Zum Vergleich wurden Gruppen ebenso allein mit Guanodin behandelt.

Gruppe 1: Negativ-Kontrolle jeweils mit 10%, 1% bzw. serumfreiem Nährmedium

Gruppe 2: Positiv-Kontrolle mit LPS 10ng/ml

Gruppe 3: Behandlung mit MMF 10µg/ml, 1µg/ml und 0.1µg/ml

Gruppe 4: Behandlung mit LPS 10ng/ml + MMF (10µg/ml, 1µg/ml und 0.1µg/ml)

Gruppe 5: Behandlung mit Guanodin 100µM jeweils mit 10%, 1% bzw. serumfreiem Medium

Gruppe 6: Behandlung mit Guanodin 100µM + MMF (10µg/ml, 1µg/ml und 0.1µg/ml)

Gruppe 7: Behandlung mit Guanodin 100µM + LPS 10ng/ml

Gruppe 8: Behandlung mit Guanodin 100µM + LPS 10ng/ml + MMF (10µg/ml, 1µg/ml und 0.1µg/ml)

### **2.4 ELISA zur Messung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und NO**

Die Konzentrationen des TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurden durch das Benutzen des Quantikine ELISA Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) den Instruktionen des Herstellers folgend ermittelt. Um die astrozytäre TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ - und NO-Sekretion zu erfassen, wurden die auf die 24-Lochplatte transferierten Zellen entweder mit Kontrollmedium oder zur Stimulation mit LPS (10µg/ml) allein oder in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen des MMF (10µg/ml, 1µg/ml, 0.1µg/ml) und/oder mit Guanodin 100µM und den in der Arbeit aufgeführten Versuchen/Stoffen für 48h behandelt. Die Überstände der behandelten Astrozytenkulturen wurden gesammelt, deren Gehalt auf obige Zytokine und NO bestimmt.

Die Quantifizierung der Menge des TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erfolgte mittels ELISA. Vereinfacht, es wurde in jedes Loch der Lochplatte, das speziell mit gereinigtem Antikörper gegen Ratten IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  beschichtet ist, 100 $\mu$ l der Standard-, der Kontroll- oder der Probenlösung für 2h aufgetragen. Danach wurden die Löcher mit Pufferlösung gewaschen und erneut für weitere 2h mit enzymgebundenen polyklonalen Antikörper, spezifisch gegen Ratten IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gerichtet, aufgefüllt. Nach der Inkubation mit stabilisierter Hydrogenperoxidase und Tetramethylbenzidin als Chromogene erhaltene Substratlösungen wurde die Enzymreaktion durch Hydrochloridsäure gestoppt. Die photometrisch optimale Absorption wurde bei 450 nm mit der automatischen Mikroplatte ELISA Reader (Ceres UV 900C, Bio-Tek Instruments, Inc., VT) gemessen und die Ergebnisse als Mittelwertkonzentrationen in pg/ml angegeben, wobei für jede experimentelle Gruppe jedes Zytokin nach LPS Stimulation auf 100% normalisiert wurde. Für die Mittelwerte wurden die einzelnen Experimente parallel auf weiteren 5 Lochplatten mit durchgeführt. Diese Prozedur auf dessen Mittelwerte die astrozytären Zytokinmessungen basierten, bestanden aus mindestens 3, überwiegend 5 Analysen.

Die Bestimmung der NO-Produktion geschah durch die Griess Reaktion. Dabei wurde 100 $\mu$ l des Überstandes in einem equimolaren Verhältnis (1:1, à 50 oder 100 $\mu$ l) mit Griess Reagenz (0.1n-Naphthylendiamide-N-Ethylendiamide Dihydrochloride, 1% Subflamilamid, und 2.5% phosphoric acid; Merck) gemischt und bei Zimmertemperatur für 10 min unter Lichtschutz inkubiert. Die Absorption wurde bei 540nm durch ein Microtiter Plattenreader (Ceres UV 900C, Bio-Tek Instruments, Inc., VT) ermittelt. Die Nitratkonzentrationen wurden an Hand einer NaNO<sub>2</sub> Standardkurve kalkuliert. Die NO Konzentrationen wurden in  $\mu$ g/ml angegeben. Die Zytokin- und NO-Ergebnisse wurden mit dem one-way ANOVA-, gefolgt von Dunnet's Test für multiple Vergleiche (Graph Pad, San Diego, CA) getestet. Ergebnisse mit einem  $p < 0.05$  wurden als signifikant angesehen.

## **2.5 Färbung und Immunhistochemie**

Die auf den Coverslips in der 24 Lochplatte kultivierten Astrozyten wurden zur Fixation für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (PFA) behandelt. Nach einem zweimaligen Spülvorgang mit Phosphatpuffer (0,1M) konnte mit der Immunhistochemie begonnen

werden. Falls eine Färbung am gleichen Tag nicht angestrebt wurde, war eine Aufbewahrung mittels 15µl Natriumazid pro ml Phosphatpuffer (0,1M) bei 4°C möglich.

### **2.5.1 Konventionelle Immunhistochemie mit BrdU**

Die Immunhistochemie zur Erkennung von inkorporiertem BrdU in Zellkernen startete zunächst durch Denaturierung der DNA für 1h mit 2N HCL bei Zimmertemperatur, dann für weitere 10 Minuten zum Löschen der endogenen Peroxidaseaktivität mit 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (3ml in 200ml) und schließlich wurden die Zellen mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS,Gibco) gewaschen. Um die Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die Astrozyten mit normalem Pferdeserum (NHS;1:20 in PBS/Triton;Gibco) für 30 min behandelt und mit Maus Anti-Bromodeoxyuridin (Anti-BrdU monoclonal;1:100;DAKO) verdünnt in PBS/Triton, welchem 1-5% BSA Puder (Sigma) zugesetzt wurde, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Prozedur dem Standard ABC Protokoll folgend weitergeführt: die Astrozyten wurden zwischen jedem Schritt mit PBS gewaschen und der 2.Antikörper Anti-mouse-IgG für 1h hinzugefügt. Die Zellen wurden sodann mit ExtraAvidin-Peroxidase (1:100 in PBS/Triton;Sigma) wieder für 1h behandelt und schließlich mit 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthaltener 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma) für 4-10 min inkubiert, so dass BrdU visualisiert wurde. Anschließend wurden die Präparate mit Tris-Puffer gespült und mit Entellan (Merck,Darmstadt,Germany) eingedeckelt.

### **2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Schließlich wurden die restlichen nicht-mitogen Astrozyten mit Hämalaun und Eosin gegengefärbt. Hierzu wurden die Präparate zur Darstellung der Zellkerne nach 4-8 minütiger Inkubation mit Hämalaun 2-3x mit Leitungswasser gewässert. Abschließend erfolgte eine 2-5 minütige Färbung mit Eosin und erneuter Spülung mit Leitungswasser. Die Coverslips wurden im letzten Schritt mit Entellan (Merck,Darmstadt,Germany) eingedeckelt, unter einem Zeiss Axiovert 35 (Zeiss,Göttingen, Germany) untersucht und ausgewertet. Die Hämatoxylin-Färbung war trocken zu lagern.

### **2.5.3 GFAP-Färbung**

Orientierend als Rezeptgrundlage diente hier das Vorgehen wie in der BrdU-Färbung. In Abweichung wurden die Astrozyten zunächst mit dem Antikörper rabbit Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP; verdünnt 1:500 in PBS/Triton;DAKO) über Nacht inkubiert und am Folgetag dem Standard ABC Protokoll entsprechend weiterbehandelt.

### **2.5.4 Mehrfachfärbungen und Fluoreszenzfärbungen**

Für die konventionelle Doppel- oder Trippelfärbung, wie für Kokulturrexperimente im Standard ABC Protokoll empfohlen, wurden die Astrozyten wie dargelegt mit dem Antikörper rabbit Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP; verdünnt 1:500 in PBS/Triton;DAKO) zur Darstellung der Astrozyten und mit Isolectin biotinylated Griffonia simplicifolia (IB<sub>4</sub>,1:50 in PBS/Triton;Gibco) zur Markierung der Mikroglia inkubiert. Ähnlich verhielt es sich mit der Doppelfärbung GFAP und BrdU.

Die Fluoreszenzfärbung wurde dadurch erhalten, dass nach der 30 minütigen NHS (1:20 in PBS/Triton,Gibco) Inkubation der Erstantikörper FITC-conjugated IB<sub>4</sub> (1:20 in PBS/Triton, Sigma,Deisenhofen,Germany) oder biotinylated anti-mouse IgG (1:100), gefolgt von Alexa Fluor 488-conjugated Streptavidin (Molecular Probes,Eugene,Oregon,USA), zur Illustrierung der Mikroglia Verwendung fand, wohingegen die Identifizierung der proliferierenden Astrozyten durch deren Kernanfärbung mittels rabbit anti-IgG (1:500) und Cy3- conjugated Streptavidin (1:500) erfolgte. Die Zuordnung der Kerne zu den Astrozyten geschah durch die Anfärbung des fibrillären sauren Gliaproteins (GFAP) mit Alexa Fluor 633 (1:200;donkey anti-goat IgG (H+L) conjugated;Dianova). Jede weitere Behandlung erfolgte nun unter Lichtschutz, wie im Standard ABC Protokoll beschrieben. Zum Schluss wurden auch hier die Coverslips mit DAKO-Fluorescent-Mounting-Medium eingedeckelt und bei 4°C unter Lichtprotektion bis zur weiteren Auswertung mit dem Zeiss Confocal laser scanning Mikroskop (LSM 510,Zeiss,Göttingen,Germany) gelagert.

### **2.6 Quantitative Morphometrie und statistische Analyse**

Die Menge der BrdU positiven astrozytären Zellen, was als Indikator für die Proliferation gilt, wurde mit Hilfe des Zeiss Axiovert 35 (Zeiss,Göttingen,Germany) analysiert, wobei die gefärbten Nuclei computergestützt gezählt wurden. Dabei wurden



prozentual die BrdU positiven Astrozytenkerne in Verhältnis zu der Gesamtzahl an Astrozytennuclei, durch die HE Färbung markiert, gesetzt, was als Proliferationsindex bezeichnet wurde. Von jedem Coverslip wurden fünf Areale (Mittelfeld ,3, 6, 9, und 12 Uhr) bei einer 200 fach Vergrößerung gezählt, um die mittleren Werte jeder Gruppe und Untergruppe zu ermitteln. Die Daten wurden als Mittelwerte ( $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes [S.E.M.]) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten erfasst. Für die Berechnung des Proliferationsindex erfolgte die Kalkulation in Prozent, dabei wurde die Proliferationsrate, markiert durch die BrdU Färbung, durch die absolute Zellzahl dividiert. Beim Vergleich der einzelnen Gruppen und Untergruppen mit der Kontrollgruppe wurde zur Ermittlung der statistischen Analysen der one-way ANOVA-, gefolgt von Dunnett's Test für multiple Vergleiche (Graph Pad, San Diego, CA), eingesetzt. Alle mit einem Sternchen (\*) markierten Resultate zeigen mit  $p < 0.05$  einen signifikanten Unterschied.

Mit Hilfe des Zeiss Confocal laser scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Göttingen, Germany) mit Multiband Modus wurden die Kulturen auf Reinheit untersucht und Bildaufnahmen durchgeführt. Die Detektion der BrdU-, GFAP- und IB<sub>4</sub> positiven Zellen erfolgte bei monochromatischem Licht 488 nm, 543 nm und 633nm (dichroic beam splitter FT UV/488/543/633): die BrdU positiven Kerne wurden mit einer Exzitation von 633 und einer Emission von LP 650 nm, GFAP markierte Astrozyten mit einer Exzitation von 543 nm und einen Emissionsbandpassfilter von BP 585-615 nm, und Mikrogliazellen mit einer Exzitation von 488 nm und einer Emission von 505-530 nm visualisiert.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Abhängigkeit der astrozytären Proliferation vom Serumspiegel im Medium**

Zunächst wird das Wachstum der sieben Tage lang inkubierten Astrozyten untersucht, welche stark vom Serumgehalt im Medium abhängt. Sodann wird der Proliferationsindex in Prozenten, BrdU markierte Kerne im Verhältnis zu HE positiven Zellen, errechnet. Denn nur der Vergleich der absoluten Zellzahl mit der Gesamtzellzahl kann als Hinweis für wirklichen, astrozytären Wachstum in den jeweiligen Versuchsgruppen gelten. Im Wachstumsverhalten der Astrozyten ist zu beachten, dass sich die gezeigten Darstellungen nicht auf den Proliferationsindex beziehen. Es ist keine

wesentliche Differenz im Proliferationsindex in den unterschiedlichen Kontrollgruppen bei unterschiedlichem Serumanteil im Medium zu verzeichnen (Abb.2).

Unterschiedliche Konzentrationen des fötalen Kälberserums (FKS) von 1%, 2%, 5% und 10% werden in das Nährmedium beigemischt und deren Auswirkung auf den astrozytären Wachstum beobachtet. Je höher der prozentuale Anteil des Serums im Medium, desto höher sind zwar die BrdU positiven Kerne der Astrozyten als Zeichen einer Proliferation (Abb.1), jedoch liegt keine signifikante Abweichung im Proliferationsindex vor. Serumfreies Medium ohne FKS, aber mit Zusatz von Albumin im Serum, was zur Aufrechterhaltung der Zellosmolalität dient, führt zu einem sehr niedrigen zellulären Wachstum. Zudem kann in der HE-Färbung keine Veränderung in der astrozytären Zytoarchitektur als Zeichen einer Apoptose, wie zum Beispiel die Karyohexis, gesehen werden. Allerdings zeigen die Zellen sehr rare astrozytentypische Fortsätze. Der Zellrasen ist weniger dicht, es sind keine wirren Verflechtungen der Astrozytenfortsätze zusehen. Zusätzlich sind die Astrozyten häufig abgerundet und scheinen keine interzelluläre Kommunikation einzugehen. Insgesamt wirken die Kulturen sehr fade und leblos. Da keine deutlichen Unterschiede im Wachstumsverhalten der Astrozyten zu sehen sind, liegt der Entschluss nahe, den Proliferationsindex der Zellen besonders im 1%, 10% und serumfreien Medium unter der Wirkung von Mycophenolat-Mofetil (MMF) zu untersuchen (Abb.3).

### **3.2 Identifikation der Zelltypen aus der Zellkultur**

Die Beobachtungen im Wachstumsverhalten der Astrozyten in Bezug auf die eindeutige Serumabgängigkeit legt den Gedanken nahe, die Reinheit der Kulturen zu untersuchen, um interzellulären Einfluss auf die Proliferation auszuschließen. Bekannt ist nämlich, dass Neurone, Mikroglia und Astrozyten wechselseitig ihr Wachstum, ihre Aktivität über Botenstoffe steuern. Nachfolgend erfolgt eine bildgebende Darstellung der Kultur durch eine klassische ABC-Färbung und eine Fluoreszenzfärbung. Astrozyten bestehen aus intermediär Filamentproteinen, deren Hauptbestandteil das fibrilläre saure Gliaprotein „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) ist. Daher wird die Markierung des GFAP zum Nachweis einer Astrozytenproliferation und IB<sub>4</sub> zur Markierung der Mikroglia herangezogen. Neurone werden nicht gefärbt, da sie in einer solchen Mischkultur und dieser Mediumzusammensetzung eine verminderte Überlebenszeit

aufweisen. Zudem lassen sich mikroskopisch keine Neurone nachweisen, so dass auf ihre additive Darstellung insgesamt verzichtet wird. Diese Auswertung ergibt eine zu 94.4 % reine astrozytäre Kultur. Das Verhalten der Astrozyten auf MMF kann somit weiter untersucht werden. Auf eine gesonderte graphische Darstellung wird bewusst verzichtet.

### **3.3 Dosisabhängige Effekte von Mycophenolat-Mofetil**

Anhand der Versuchsreihen ist zu beobachten, dass die Zahl der proliferierenden Zellen unter MMF, dosisabhängig 10µg/ml, 1µg/ml und 0.1µg/ml, konträr zum Wachstumsverhalten im Kontrollmedium unterdrückt werden. Die Behandlung mit 10µg/ml MMF führt - wie auch in anderen Studien beschrieben - zu einer maximalen Reduktion des Zellwachstums. Die Kulturen dagegen, die mit LPS alleine behandelt wurden, zeigen keinen Einfluss auf die Astrozytenproliferation. Auch in der Kombination von LPS mit MMF bleibt die absolute Zellzahl im Vergleich zu den jeweiligen MMF-Gruppen unverändert. Das Ausmaß der antiproliferativen Wirkung unter der Behandlung mit MMF lässt sich nicht durch den Zusatz von Corticotropin releasing factor 10µM (CRF) umkehren. Im Gegensatz dazu führt das zusätzliche Guanosin 100µM in den Medien zu einer erfolgreichen Antagonisierung des Effekts von MMF und weist eine direkte proliferative Wirkung unter dem MMF auf, was in einer signifikant erhöhten Messung der BrdU positiven Zellen resultiert (Abb.4). Diese konzentrationsabhängigen Wirkungen des Mycophenolat-Mofetils auf die Astrozytenkulturen in einfach und mehrfach Kombinationen mit Lipopolysaccharid, den tropischen Substanzen Corticotropin und Guanosin lassen sich ebenso im serumfreien, 1%, 2%, 5% und 10%-igem Medium beliebig reproduzieren. Auch hier liegen die Resultate von mindestens drei unabhängigen Versuchen vor. Allerdings besteht eine eindeutige antiproliferative Konzentrationsgrenze des MMF, die bei 10µg/ml liegt. Mit der niedrigen Konzentration von 0.1µg/ml zeigt sich in vergleichender Sicht zur Kontrollgruppe keine sichtbare Hemmung des Zellwachstums. Beginnend mit steigender MMF-Konzentration 1µg/ml ist eine Reduktion der BrdU positiven Astrozyten auszuzählen, die mit 10µg/ml ihr Maximum erreicht. Gut zu dokumentieren ist die antagonisierende MMF-Wirkung mit Guanosin 100µM.

### **3.4 MMF reduziert den Proliferationsindex der isolierten Astrozytenkulturen**

Die in den Kulturen isolierten Astrozyten haben eine typisch protoplasmatische oder fibrilläre Morphologie. Die Proliferation wird anhand des während der S-Phase inkorporierten BrdU's beurteilt und dadurch prozentual errechnet, dass die computergestützt ermittelten BrdU positiven Zellen durch die HE markierten Gesamtzellzahl dividiert und mit 100 multipliziert werden. Das Ergebnis wird als Proliferationsindex bezeichnet. Im Vergleich der Kulturen mit 1% und 10% Serum im Medium findet sich kein Unterschied im Zellverhalten bezüglich der Proliferation und der Zellreaktion auf MMF. Zwar ist ein leicht erhöhter BrdU Anteil in den Kulturen mit 10% Serum zu sehen. Der Index bleibt allerdings unbeeinflusst, so dass die These aufgestellt werden kann, dass der Serumanteil im Nährmedium keine bedeutende Wirkung auf das tatsächliche Wachstum hat. Lediglich im serumfreien Medium findet sich eine deutlich reduzierte Proliferation (Index 14.136%). In den Kontrollmedien beträgt der Proliferationsindex für 1% Serum 47.637%, für 10% Serumanteil liegt er bei 49.553%. Die Wachstumsstimulation der Astrozytenkulturen, die in serumfreien Nährmedien gezüchtet werden, kann durch CRF 10 $\mu$ M und 100 $\mu$ M Guanidin erfolgreich angeregt werden. Dabei kommt es zum Anstieg des Proliferationsindex von 14.288% auf 37.076% (CRF 10 $\mu$ M) und auf 40.469% in denen mit Guanidin 100 $\mu$ M behandelten Kulturen (Abb.4).

Unter der Behandlung mit verschiedenen Mycophenolat-Mofetil Konzentrationen (0.1 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml und schließlich 10 $\mu$ g/ml) kommt es zur signifikanten Reduktion der Proliferationsindex sowohl in den Kulturen mit 1% und 10% Serumgehalt. Bei der höchsten MMF-Konzentration mit 10 $\mu$ g/ml beträgt der Proliferationsindex für serumfrei behandelte Zellen lediglich 0.729%, 5.2413% in den mit 1% Serum kultivierten Astrozyten. Im 10% Serum liegt der Index bei 13.952%. Sobald die MMF-Konzentration weiter gesenkt wird, steigt in allen Kulturen entsprechend die Proliferationsindex an. In der Gruppe der 1 $\mu$ g/ml MMF mit 10%, 1% Serum sowie in serumfreien Gruppen liegt dieser jeweils bei 27.371%, 27.302% und 11.551% (Abb.3). Der Index in den MMF 0.1 $\mu$ g/ml Gruppen beträgt für die serumfrei kultivierten Astrozyten 19.913%, für 1% Serum liegt er bei 47,637% und für 10% Serumanteil bei 40,773%. Beim Vergleich in der MMF 0.1 $\mu$ g/ml-Gruppen mit den jeweiligen

Kontrollgruppen (CTL) zeigt sich somit kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten, wie aus den Indices zu entnehmen ist.

### **3.5 Wirkung von Guanosin und Corticotropin releasing factor**

Aufgrund der günstigen proliferativen Wirkung des Serums (nicht auf den Index bezogen) wurden Substanzen in der Erwartung einer antagonisierenden Wirkung des Mycophenolat-Mofetils analysiert. Zusätzlich bestand der Anspruch eines proliferierenden Stimulans, weshalb sich der folgende Versuch auf Kulturen bezieht, die serumfrei gezüchtet werden. Vorliegend wird die antagonistische Wirkung von Guanosin, welche durch die Depletion von Purinen zu erklären ist, demonstriert. Dabei hat alleine Guanosin einen deutlichen Effekt auf die Proliferationsrate der Astrozyten, ungeachtet der eindeutigen serumabhängigen Verhältnisse. Zudem wird eine weitere Substanz ausgetestet, dessen positive Wirkung auf Astrozyten in einer Arbeit (Ha BK, Bishop GA, King JS, Burry RW. Corticotropin Releasing Factor induces proliferation of cerebellar astrocytes. J Neurosci Res 62:789-798(2000)) beschrieben ist. Das Hinzufügen von Corticotropin releasing factor 10 $\mu$ M (CRF) als Stimulationsfaktor und vom Nucleotid Guanosin 100 $\mu$ M, das für jede Zellreplikation und Proliferation von Bedeutung ist, in Medien mit unterschiedlichem Zusatz von Serum, 1% oder 10%, oder sogar in serumfreien Kulturen, erweisen sich jeweils als positive trophische Substanzen. Allerdings erscheinen auch hier die serumfreien und 1%-igen Astrozytenkulturen insgesamt sehr leblos. Am Besten wirkt sich das 10% FKS im Nährmedium auf die Zellen aus. Hier liegt die Proliferationsrate höher als in den serumfreien und 1%-igen Kulturen mit deutlicher Zunahme der BrdU positiven Astrozyten. Besonders das supplementäre Guanosin im 10% FKS enthaltendem Medium steigert das astrozytäre Zellwachstum, welches signifikant höher liegt als in der Kontrollgruppe oder in den anderen Gruppen. Entgegen der Vermutung bleibt der proloerative Summationseffekt der tropischen Substanzen - CRF und Guanosin - im serumfreien Medium aus (Daten werden nicht gezeigt).

### **3.6 Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine und NO aus den Astrozyten**

Wie erwartet, zeigen die Überstände der puren Astrozytenkulturen in den Kontrollmedien (CTL) keine bzw. sehr geringe messbare Mengen an

proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und NO Sekretion. Die isolierte Behandlung der Astrozyten mit MMF in unterschiedlichen Konzentrationen 0.1 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml oder 10 $\mu$ g/ml führt zu keiner signifikanten Veränderung sowohl in der Zytokinsekretion als auch in der NO Ausschüttung beim Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb.5). Wohingegen die Stimulation mit LPS (10ng/ml) in einer signifikanten Zunahme der TNF- $\alpha$  (102.81 pg/ml) und NO (128.813 $\mu$ g/ml) Sekretion endet. Eine signifikante Induktion der IL-1 $\beta$  Sekretion erfolgt erstaunlicherweise nicht (96.875 pg/ml vs 84.375 pg/ml in der Kontrollgruppe,  $p > 0.05$ ). Dabei ergibt sich keine Diskrepanz zwischen den Astrozyten kultiviert in 1% oder 10% Serum. Beim Vergleich der LPS stimulierten Kulturen mit den in Kombination aus LPS und MMF (0.1 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml) behandelten Gruppen zeigt sich – entgegen den Kombinationsgruppen - eine signifikante Downregulation der TNF- $\alpha$  (Daten für 10% Serum 10 $\mu$ g/ml MMF mit 42.813 pg/ml). Auch die zusätzliche Behandlung mit Guanosin sowie zweifach Kombination von Guanosin und MMF liefert bei den TNF- $\alpha$  vergleichbare Messungen wie in den Kontrollgruppen. Die Wirkung von MMF auf die TNF- $\alpha$  Sekretion lässt sich nicht durch eine Guanosinkombination aufheben. Eine niedrige, kaum messbare TNF- $\alpha$  Sekretion ist bei den Zellen zu beobachten, die alleine mit Guanosin behandelt wurden. Ebenso ist an dem TNF- $\alpha$  Verhalten, der mit LPS stimulierten Astrozyten, unter der Kombination von Guanosin keine Veränderung zu sehen. Die Zytokine bleiben hochreguliert. Diese Ergebnisse differieren in keinem Fall mit den unterschiedlichen Kulturen bei verschiedenen Serumkonzentrationen (Abb.5.A, \*  $p < 0.05$ ).

Überraschenderweise verhält sich die IL-1 $\beta$  Sekretion nicht wie die TNF- $\alpha$  Ausschüttung. Hier fällt der Messbereich nach der alleinigen Stimulation der Astrozyten unter LPS niedriger aus (96.875 pg/ml vs CTL 84.375 pg/ml). Die simultane Behandlung der Zellen mit LPS und MMF führt zu einer deutlich messbaren Menge an IL-1 $\beta$  (MMF 0.1 $\mu$ g/ml mit 696.88 pg/ml, 1 $\mu$ g/ml mit 946.88 pg/ml, 10 $\mu$ g/ml mit 903.13 pg/ml). Auch hier besteht im Sekretionsverhalten bei unterschiedlichem Serumanteil des Nährmediums keine Diskrepanz. Die durch die Simultanbehandlung mit LPS und MMF erreichte Wirkung kann nicht durch Guanosin, im Gegensatz zur TNF- $\alpha$  Sekretion, beeinflusst werden. Die Menge an IL-1 $\beta$  im Vergleich zur Kontroll- und MMF-Gruppen liegt höher (Abb.5.B). Unter Guanosin scheint IL-1 $\beta$  keiner statistisch

bemerkenswerten Beeinflussung zu unterliegen. MMF führt zu einer merklichen Reduktion der glialen proliferativen Antwort, welche als Reaktion auf ein ZNS Schaden folgt. Dies ist eine Beobachtung, die in der vorliegenden Arbeit mit Einzelzellen zu finden ist. Die Annahme eines indirekten antiexzitotoxischen Effektes besteht, der den neuronalen Schaden eindämmt und das Überleben der Neurone ermöglicht (Dehghani et al.,2003).

Interessanterweise zeigen die Resultate zur NO Sekretion in jeder ELISA-Messung keine signifikante Detektion. In der Behandlung mit LPS ist eine NO-Ausschüttung zu erzielen (CTL 26,5 µg/ml, LPS 132.5 µg/ml, MMF 10µg/ml mit 114.5 µg/ml, Gua 43,5 µg/ml, LPS und Gua 125.5 µg/ml, MMF 10µg/ml und LPS und Gua 129.5 µg/ml). Jeglicher Zusatz in den Medien, wie Guanosin und Mycophenolat-Mofetil, zeigt keine Abweichung (Abb.5.C). Alle Guanosinversuche wurden in Nährmedien mit 10% Serum durchgeführt.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Astrozytäre Proliferation**

Durch das Schwenken der Kulturflaschen erhielten wir reine Astrozytenkulturen, deren Wachstum durch eine BrdU- und HE-Färbung festgehalten wurde. Die Identifikation der proliferierenden Astrozyten erfolgte mit einer doppelfluoreszenten Immunreaktion einer BrdU- und GFAP-Färbung. Mit der Fluoreszenzfärbung ließen sich keine Mikroglia markieren.

Eine eindeutige Serumabhängigkeit des astrozytären Wachstums konnte dargestellt werden, was jedoch im Proliferationsindex bei 1 und 10% igem Serum keine Signifikanz zeigte. Dennoch ist dieser in der Absolutzahl eindeutig. Unphysiologischerweise wird hier eine Manipulation des Milieus zur Anpassung bzw. Potenzierung der Proliferation der Astrozyten in Bezug auf eine ZNS-Läsion unterschiedlicher Genese künstlich herbeigeführt. In einer neurotoxischen Umgebung sind sehr wohl morphologische und elektrochemische Veränderungen der Astrozyten beschrieben, welche bei Traumata den Blutfluss und die Diffusion von Substanzen regulieren. Die Astrozyten sind im neurotoxischen Geschehen in ihrem Wachstumsverhalten verändert. Weiterhin werden immunchemische Prozesse auf zellulärer Ebene zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität eingeleitet. Zur funktionellen

Wiedererlangung des ZNS nach einem Trauma sind grundlegende Verständnisuntersuchungen ggf. im Zellverband anzustellen, welche die gliale Narbenbildung, primär als Reparaturmechanismus zu interpretieren, in ihrer Gesamtheit aufdeckt.

Zusätzlicher Stimulans der Proliferation neben dem Guanosinnucleotid, welches durch die MMF Wirkung ausfällt, ist das CRF als Polypeptid im ZNS (Hypothalamus), dessen Effekt im serumfreien Medium getestet wurde. CRF zeigt eine anti- sowie proinflammatorische Wirkung und ist im Falle einer Antagonisierung mit Neuroprotektion in ischämischen und exzitatorischen Hirnläsionen beschrieben (Sternberg et al.,1989;Strijbos et al.,1994). Die faden und leblosen Kulturen unter CRF scheinen möglicherweise dadurch begründet zu sein, dass CRF primär auf unreife Astrozyten in der frühen Entwicklungsphase oder auf Astrozyten zerebellärer Herkunft (Ha et al.,2000) beschränkt sein könnte.

#### **4.2 Wirkung von MMF**

Die gegenwärtige Forschungsarbeit stellt die dosisabhängige Beziehung der antiproliferativen Wirkung von MMF auf Astrozyten in Einzelkulturen dar, die sich als BrdU-positive Zellen identifizieren lassen. Die Ergebnisse weisen einen potenten, spezifischen und reversiblen IMPDH Inhibitor auf. Die potente antiproliferative Wirkung des MMF auf Astrozyten und die Antagonisierung diesen Effekts durch Guanosin legt die Hypothese nahe, dass Astrozyten eine IMPDH besitzen, durch deren Inhibition eine Erschöpfung des intrazellulären Guanosinnucleotid-Pools erfolgt. Die Reduktion der unter MMF Behandlung positiven BrdU- Zellen enthüllte einen dosisabhängigen Wachstum: je höher die MMF-Konzentration, desto effektiver die fehlende Guanosinmenge als Induktor einer Proliferation. Weiter ist bemerkenswert, dass keine Reduktion in der Proliferation unter der reinen LPS Behandlung oder in den Vergleichsgruppen zusehen war.

Die Wirkung von MMF findet sich an einem Modell für ein Zellverband, hippocampale Schnittkultur, wieder. Hier zeigt sich eine signifikante Reduktion der neuronalen Schädigung (NMDA assoziierte exzitotoxische Kaskaden), mutmaßlich durch Runterregulation proinflammatorischer Zytokine und NO Sekretion aus akkumulierten



Gliazellen. Auch ein direkter neuronaler Effekt sowie eine Myelinisierung sind nicht sicher ausgeschlossen (Dehghani F. et al, 2003).

Das Wissen über mikrobiologische Prozesse, einschließlich astrozytärer Reaktionen bei neurologischen Läsionen, wird eine solide Basis für die zukünftige klinische Behandlung in der Akuttherapie zur Neuroprotektion und Rehabilitation einnehmen. MMF scheint hier Potential zu haben.

#### **4.3 Zytokine und NO**

Seitdem bekannt ist, dass MMF eine wirksame immunsuppressive Potenz durch die Inhibition der DNA-Synthese aufweist, und angenommen wird, dass Astrozyten für die Induktion von neuronalen und mikroglialen Veränderungen in ihren morphologischen und physiologischen Eigenschaften verantwortlich sind, ist die Bedeutung von Zytokinen substanziell.

Dieser Einfluss wurde durch die ELISA- und Griess-Messung untersucht.

Der fundamentale Unterschied der Zytokinreihe mit TNF- $\alpha$  zu der IL-1 $\beta$  Sekretion, wo eine eindeutige Zunahme nach einer Stimulation mit MMF und LPS, nicht allerdings nach einer alleinigen MMF Behandlung, zu sehen ist, lässt den Rückschluss zu, dass bisher unerforschte intrazelluläre Signaltransduktionswege existieren, welche Astrozyten unter MMF empfindlich für LPS Stimulation machen. Es wurde bereits mehrfach aufgezeigt, dass diverse ZNS Verletzungen, wie die traumatische Schädigung und eine Ischämie, zu einer IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Induktion führen (Giulian&Lachman, 1985; Woodrooffe et al.,1991; Holmin et al.,1997; Bartholdi&Schwab,1997; Wang et al., 1997; Streit et al.,1998; Buttini et al.,1994; Minami et al.,1992; Yabuuchi et al.,1994; Zhai et al.,1997; Zhang et al.,1998; Orzyłowska et al., 1999; Xu et al.,1998; Tchéliingérian et al.,1994; Gong et al.,1998; Vezzani et al.,1999; Pearson et al.,1999). Eine Hochregulation dieser Zytokine konnte also nicht in einer in vitro Behandlung mit LPS etabliert werden (Van Dam et al.,1995;Righi et al.,1989;Chao et al.,1995), wahrscheinlich als regenerative Reaktion auf die Umformung in ein Narbengewebe (Merrill,1991).

Kontrovers werden weiterhin die Ansichten über die NO-Produktion diskutiert, beispielsweise der Nachweis von indirektem NO in Überständen aufgrund von vorhandenen Nitraten (Galea et al.,1992;Simmons&Murphy,1992;Park&Murphy

1994;Kong et al.,1996;Pahan et al.,1997;Chen et al.,1998;Garcia-Nogales et al.,1999;Suk et al.,2001), oder die alleinige Messbarkeit von NO durch die Behandlung von Astrozyten mit LPS (Boje&Arora,1992; Chao et al.,1992;Hewett et al.,1993;Yang et al.,1998). Die vorliegende Untersuchung präsentiert die Effekte des LPS auf Astrozyten, welche ebenfalls in einer erhöhten NO-Sekretion resultieren. Die Ergebnisse zu NO (jede Gruppe mit MMF und LPS simultan behandelt) zeigen keine Signifikanz verglichen mit den ausschließlich mit LPS stimulierten Gruppen. Diese Differenz in den Ergebnissen im Vergleich zu anderen Beobachtungen scheint darin begründet zu sein, dass die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit LPS und INF- $\gamma$  erfolgte (Miljkovic et al.,2002;Jonsson&Carlsten,2002;Mizuno et al.,2003; Hartlage-Rübsamen M,Lemke R,Schliebs R,1999). Beschrieben wurde, dass Astrozyten die LPS induzierte NO-Produktion durch mikrogliale Zellen erhöhen (Solà,Casal &Serratos,2002). In diesem Falle wäre von einer Kontamination der Astrozytenkulturen mit Mikroglia auszugehen. Durch wiederholte Doppelfärbungen jedoch nicht nachweisbar bleibt dieser Einfluss auf die Zytokin und NO-Sekretion ausgeschlossen. Auch in anderen Studien wurde beschrieben, dass verschiedene Faktoren wie IL- $\beta$  and TNF- $\alpha$  zu einer Induktion der iNOS unter LPS, alleine und in Kombination mit INF- $\gamma$ , führen (Boje&Arora,1992; Chao et al.,1992; Chung&Benveniste,1990; Galea et al.,1992; Lee et al.,1995; Lieberman et al.,1989; Merrill et al.,1993; Simmons&Murphy,1992; Skaper et al.,1995).

Guanosinnukleotide werden für die Synthese von Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), welcher als Cofaktor für die Bildung von Cyclohydrolase I abhängigem GTP essentiell ist, benötigt, um die iNOS gesteuerte L-Arginin-Oxidation anzukurbeln. GTP wiederum ist von der IMPDH-Aktivität abhängig (Gross&Levi,1992; Schmidt,Lohmann&Walter,1993; Auerbach&Nar,1997; MacMicking et al.,1997; Schoedon et al.,1993). Die Hypothese besteht, dass MMF nicht die Aktivierung der iNOS durch die Interferenz der BH<sub>4</sub>-Synthese beeinträchtigt (Miljkovic et al.,2002). Zudem scheint Guanosin trophische Effekte aufzuweisen.

Die Resultate ergeben, dass LPS-behandelte Astrozyten eine messbar erhöhte Menge an proinflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  produzieren. Diese bewirken zusätzlich eine neuronale Destruktion während der Sekundärschädigung und die Narbenformation durch Aktivierung und Induktion von mikroglialer Migration. Auch ist eine Beteiligung

an der neuronalen Regeneration und Limitation der Verletzungen dokumentiert (Amundson et al.,1992; Kimelberg et al.,1982; Kraig et al.,1986; Lascola&Kraig,1997; Dehghani F. et al,2010).

Die Behauptung, dass IL-1 $\beta$  aus sterbenden Zellen ausgeschüttet wird, konnte aufgrund fehlendem immunhistochemischem Nachweis von Apoptosezeichen nicht bestätigt werden (Hogquist et al.,1991), ohne dass explizit der Zelltod untersucht wurde.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass gliale immunkompetente Zellen eine entscheidende Rolle in der Sekundärschädigung innehaben, weswegen immunsuppressive Ansätze zum Schutz des geschädigten ZNS in Entwicklung sind. Aktuell findet Methylprednisolon Anwendung in der Therapie von Hirnschädigungen (Dehghani F. et al, 2003).

## **5 Fazit**

### **5.1 Zusammenfassung**

Der Wirkstoff MMF ist in der Transplantationsmedizin unter dem Handelsnamen CellCept® bereits in der klinischen Anwendung und für die Behandlung von Patienten nach Organtransplantationen zugelassen. Aus der inaktiven Vorstufe MMF wird durch Esterasen das immunsuppressiv wirksame Mycophenolat abgespalten. Die immunsuppressive Wirkung des MMF beruht darauf, dass die Substanz ein Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase ist, dadurch den intrazellulären ATP- und GTP-Pool in Leukozyten depletiert und somit eine antiproliferative Wirkung erzielt.

In dieser Studie wurden die Wirkungen von MMF auf Astrozyten untersucht, denn Astrozyten sind wichtige Gliazellen des ZNS mit vielfältigen Funktionen in der Wundheilung, darunter die Beteiligung an der neuronalen Differenzierung und am axonalen Wachstum sowie an der Regulation des Milieus. Astrozyten sind in der Narbenbildung während der akuten ZNS Läsion involviert, indem neurotoxische Substanzen wie NO und diverse inflammatorische Zytokine (hier TNF- $\alpha$ ) ausgeschüttet werden. Diese wiederum üben auf die mikrogliale Zellproliferation, Migration und Aktivität Einfluss aus.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen einen eindeutigen Effekt der astrozytären Zellzahl in der in vitro Kultivierung zu der in den Medien verwendeten Serumkonzentrationen (serumfreies Nährmedium, 1%, 2%, 5% und 10%-haltiges FKS-Medium) auf: Je höher

der Serumgehalt in den Nährmedien, desto höher die Zellzahl der Astrozyten. Die Zahl der in den serumfreien Medien kultivierten Astrozyten kann durch den supplementären Zusatz an CRF von 10µM und Guanosin von 100µM erhöht werden. Dosisabhängiges MMF führt zu einer Unterdrückung des astrozytären Wachstums, welches allein durch Guanosin zu antagonisieren ist.

Die BrdU markierten proliferierenden Astrozyten werden signifikant unter gleichzeitiger Behandlung von serumhaltigen Nährmedien (1% und 10%) und dosisabhängigem MMF (10µg/ml, 1µg/ml und 0,1µg/ml) reduziert, wohingegen LPS keine Wirkung auf die Proliferationsrate zeigt. Wie durch die ELISA-Messung bestimmt, enthält das mit LPS behandelte Nährmedium relevante Mengen an TNF-α und NO, nicht aber an IL-1β. Eine deutliche Reduktion des TNF-α findet sich in dem mit MMF allein behandeltem Nährmedium der Astrozyten abhängig von der Konzentration (10µg/ml, 1µg/ml und 0,1µg/ml). Die simultane Behandlung mit LPS und MMF zeigt in der Gruppe der mit LPS stimulierten Kulturen ein messbar signifikanten Abfall der TNF-α Menge. In den astrozytären Kulturen mit Guanosin wird der Effekt des MMF auf die TNF-α Sekretion bezogen aufgehoben. Daraus ist eine neuroprotektive und narbengewebe-modulierende Wirkung in der Mikroumgebung durch einen Einfluss auf die TNF-α Sekretion des immunsuppressiven MMF zu schlussfolgern. Zudem ist eine regulierende Wirkung der mikroglialen Zellen in Form einer Zellsuppression beschrieben (Hailer NP, Wirjatijana F, Roser N, Hirschebeth GT, Korf HW, Dehghani F, 2001).

## 5.2 Summary

Mycophenolate-Mofetil (MMF) clinically used as CellCept is inserted as immunosuppressive xenobiotic drug for preventing transplantate rejection. It is well known that MMF works selectively through inhibiting the IMPDH which is an essential enzyme in the de novo pathway for biosynthesis of guanosine Nucleotides.

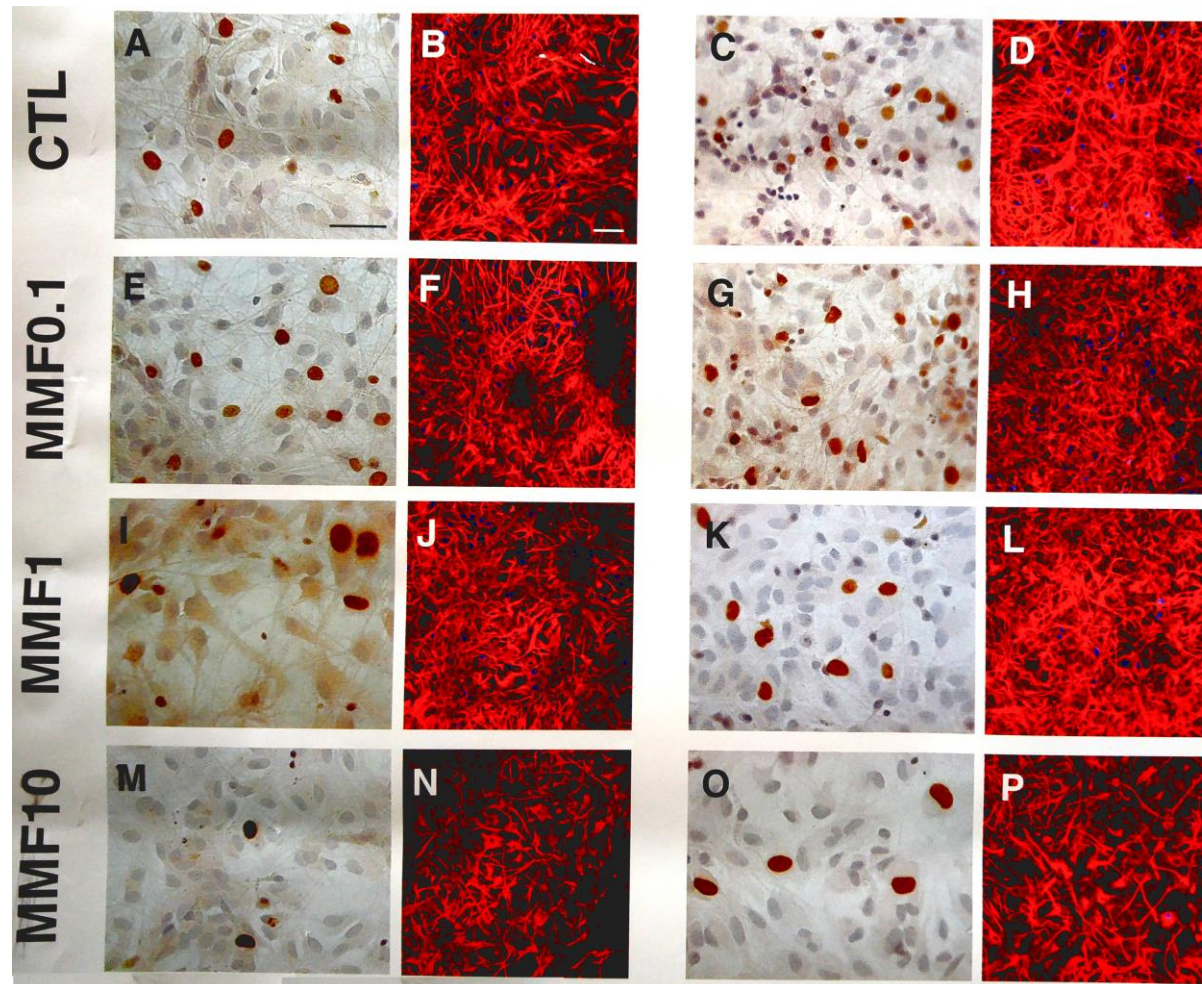
In this study, we investigated the effects of MMF on the astrocytes, because astrocytes are important glial cells of the CNS with various functions in the healthy tissue, such as being involved in the neuronal differentiation, axonal growth and regulation of the environmental composition. They also build up the scarred tissue during acute CNS lesions by releasing neurotoxic substances such as NO and different inflammatory

Zytokines, e.g. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , which even influence the microglial cell proliferation, migration and activity. Therefore, astrocytes are impressingly involved in the extent of the neuronal damage.

Our observations revealed an influence of astrocytic proliferation dependent on the concentration of the serum (10%, 5%, 2%, 1% and serum free medium) used for the in vitro cultivation: the more the serum part in the medium the more the extent of the cell proliferation. The proliferation of astrocytes cultured in serum free medium can be increased by Corticotropin Releasing Factor (CRF) 10 $\mu$ M and Guanosine application. Dose-dependent MMF led to a suppression of the astrocytic proliferation which is antagonisable with Guanosine only.

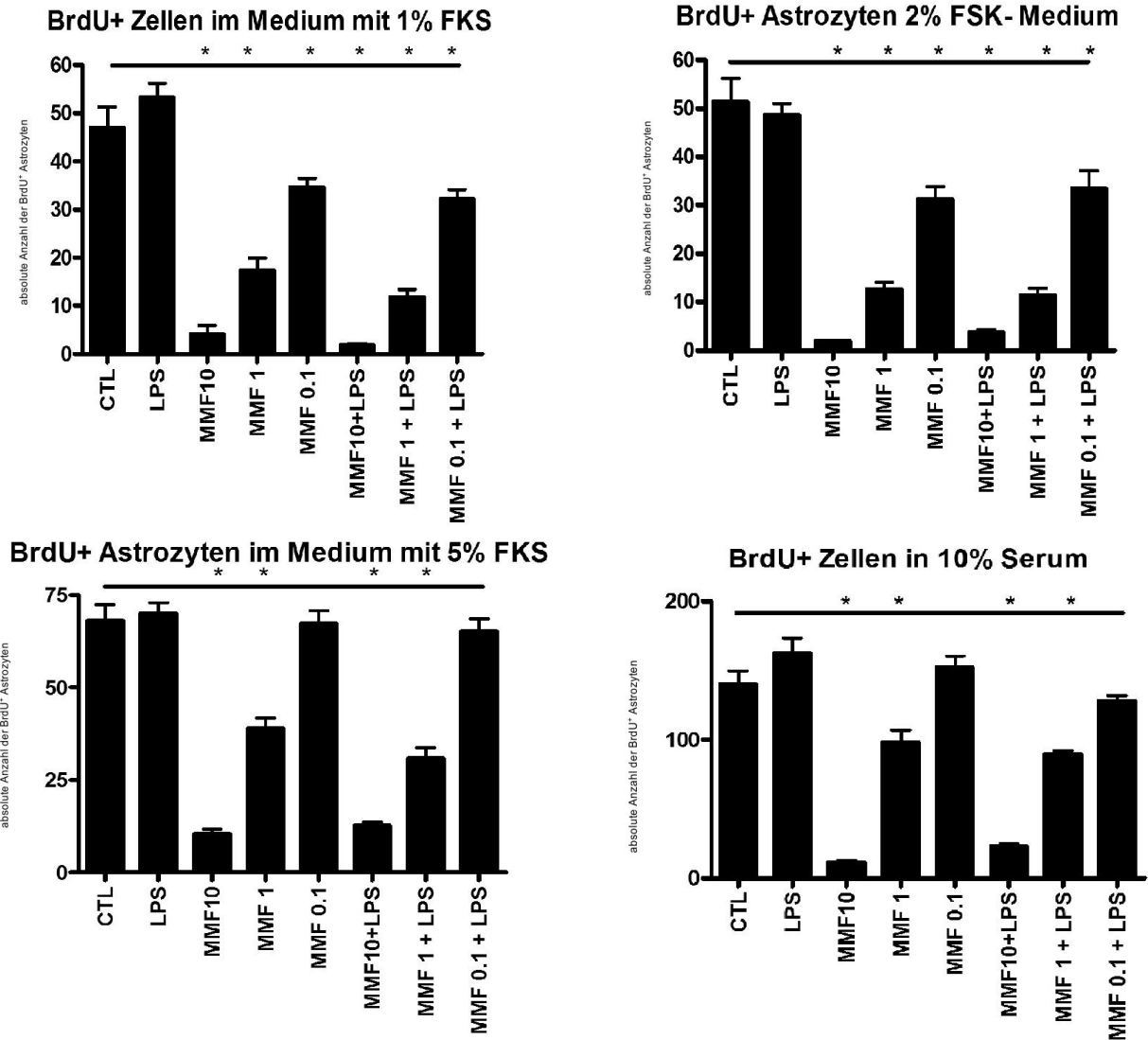
The number of the isolated proliferating astrocytes labeled by BrdU was significantly reduced after simultaneous treatment with serum (10% or 1%) and dose-dependent MMF (10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml and 0,1 $\mu$ g/ml) application, whereas LPS showed no effect on the proliferating rate. But, as measured by ELISA, with LPS conditioned medium contained relevant amounts of TNF- $\alpha$  and NO, but surprisingly not of IL-1 $\beta$ . There were a significant reduction of cytokine and NO amounts determined in the astrocytic conditioned medium treated only with MMF dependent of the concentration (10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml and 0,1 $\mu$ g/ml). Even the simultaneous treatment with LPS and MMF revealed compared to the LPS stimulated astrocytic group a measurable significant decrease of TNF- $\alpha$ . The treatment of the astrocytic cultures with guanosine lifted up the effects of MMF on TNF- $\alpha$  secretion. Therefore, we conclude, that the immunosuppressive drug MMF might have a neuroprotective and scar formation modulating effect through the antiproliferative potency on astrocytic cells and modulating character of the microenvironment by influencing the TNF- $\alpha$  secretion. Moreover, these regulatory effect on microglial cells are described as suppression (Hailer NP, Wirjatijana F, Roser N, Hirschebeth GT, Korf HW, Dehghani F, 2001).

Astrozykten Zellkultur markiert mit BrdU/HE oder BrdU/GFAP  
 1% Serum 10% Serum



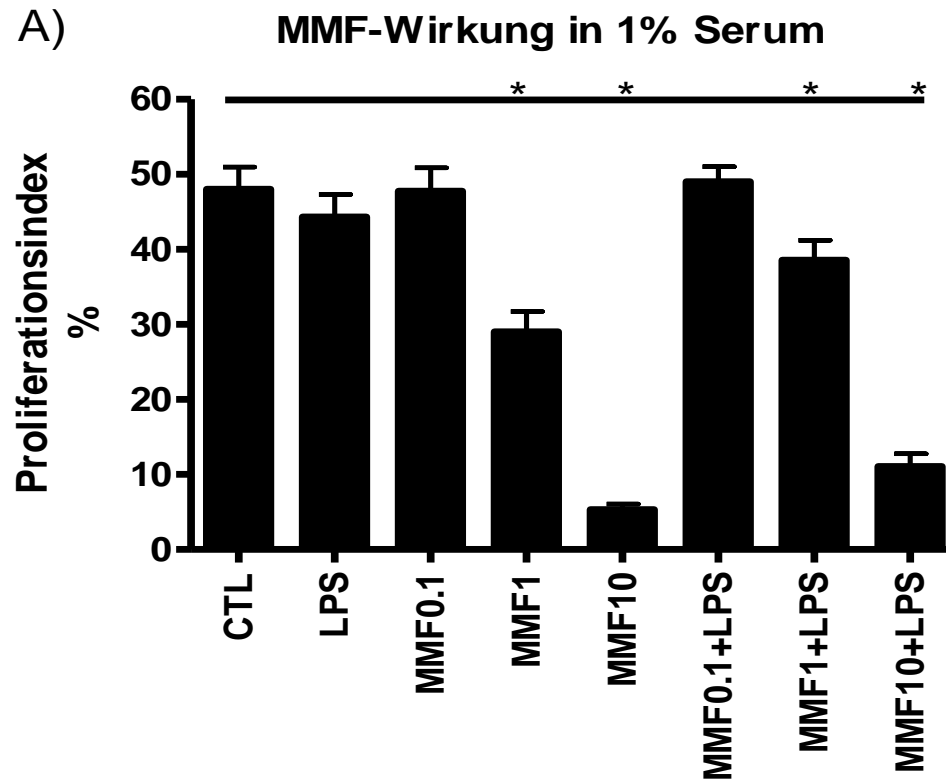
**Abbildung 1: Demonstration von BrdU<sup>+</sup>- positiven Zellen in Astrozytenzellkulturen.**

A-D: Die Astrozytenkontrollgruppen zeigen eine konzentrationsabhängige Proliferation an BrdU<sup>+</sup>-Nuclei unter 1% und 10% Serum.. E-P: Die Zahl an proliferierenden Zellen ist signifikant reduziert unter MMF dosisabhängiger Behandlung.



## Abbildung 2: Serumabhängige Proliferationsverhalten

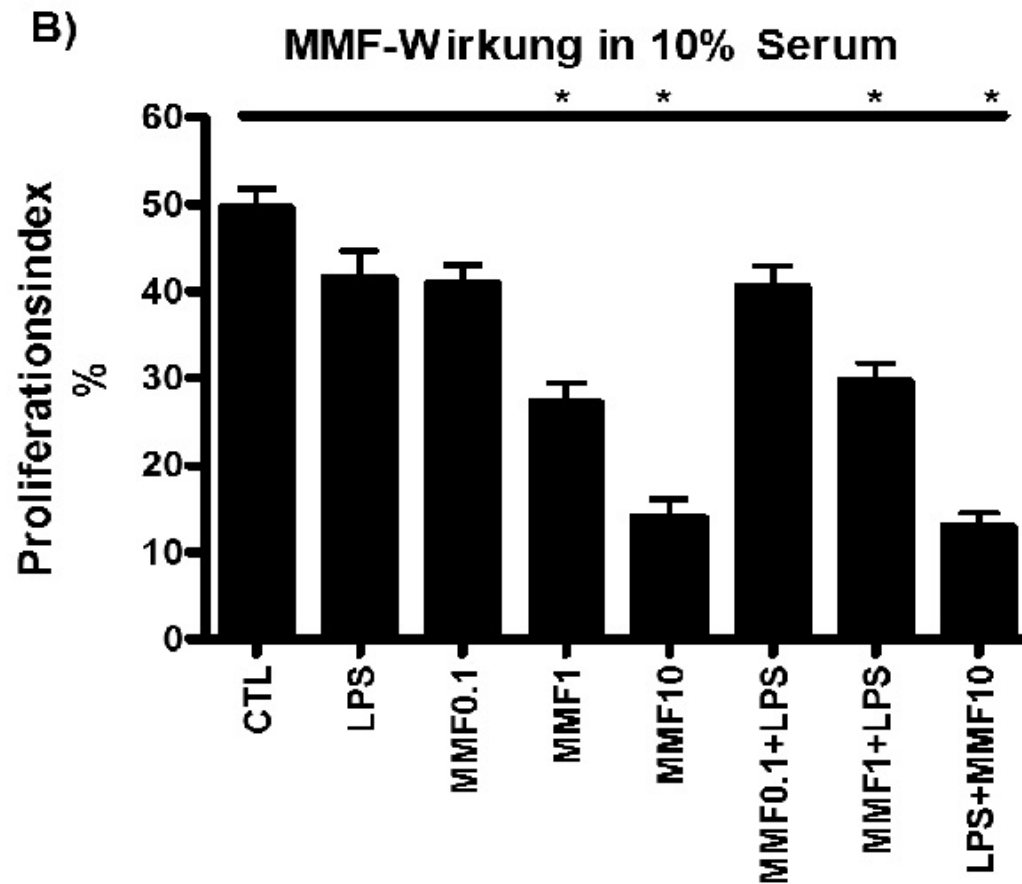
Das deutliche serumabhängige Proliferationsverhalten der astrozytären Einzellzellen lässt sich auch hier weiter verfolgen. Mit steigender Konzentration des fötalen Kälberserums im Nährmedium nehmen die mit BrdU markierbaren Zellkerne zu. Die Behandlung mit LPS zeigt im Vergleich zu den Kontrollgruppen kein signifikanten Verlauf. Auch ist die Mycophenolat-Mofetil Wirkung nicht durch den Serumanteil im Medium beeinflusst, so dass von einem eindeutigen Effekt des Immunsuppressivums auf die Astrozyten zu schließen ist. Je höher die MMF- Konzentration, desto niedriger die absolute Zahl der BrdU+ Zellen als Proliferationsmarker. N =3.



**Abbildung 3.A): Einfluß von konzentrationsabhängigem Mycophenolat-Mofetil.**

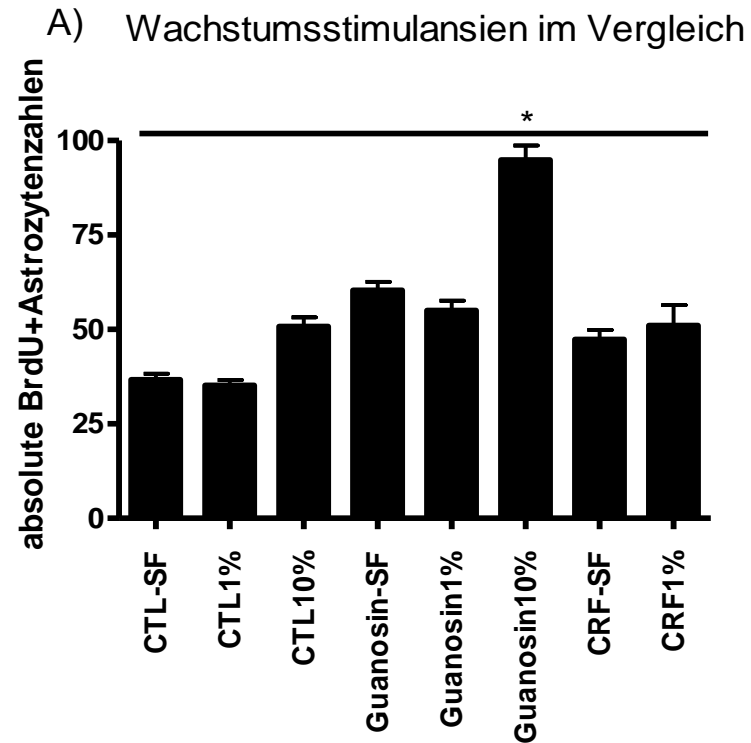
Es wird die Wirkung von unterschiedlichen Konzentration des Mycophenolat-Mofetil (0.1µg/ml, 1µg/ml und 10µg/ml) auf Astrozytenkulturen, die in 1% Serum enthaltenden Medien gezüchtet werden, dargestellt. Die Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) hat im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTL) keinen Einfluss auf den Proliferationsindex. Mit steigender MMF-Konzentration (10µg/ml) nimmt auch der Index, der selbst in Kombination mit LPS keinen Unterschied aufweist, deutlich von 47.637% auf 5.2413% ab, bis schließlich bei der niedrigsten MMF-Konzentration mit 0.1µg/ml keine hemmende Wirkung auf Astrozyten festzustellen ist (47.637%). N =3.





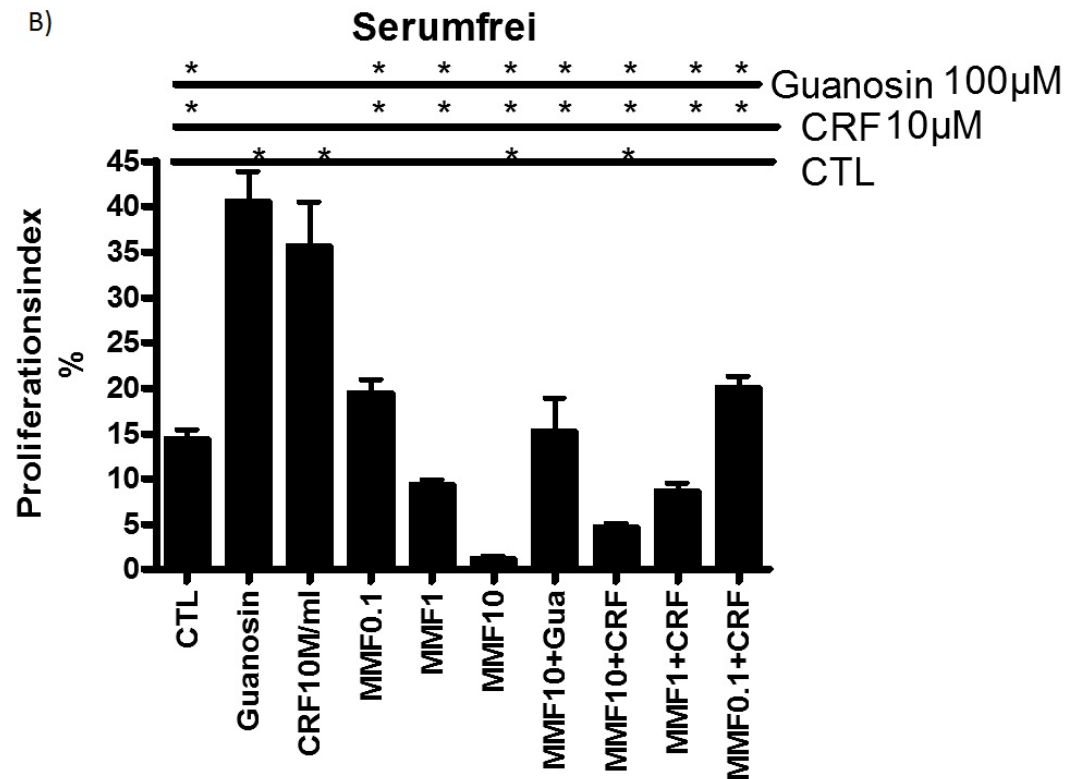
**Abbildung 3.B): Einfluß von konzentrationsabhängigem Mycophenolat-Mofetil.**

Es werden die Proliferationsindizes der Astrozytenkulturen, die in 10% Serum kultiviert werden, demonstriert. Auch hier ist eine deutlich serumunabhängige Wirkung des MMF zu beobachten. Dabei spiegelt sich der Konzentrationseinfluss wieder. Der Wachstumsindex wird bei der maximalen MMF-Konzentration mit 10µg/ml von 49.553% auf 13.952% reduziert. Mit der niedrigsten MMF-Konzentration von 0.1µg/ml lässt ebenso der Effekt erneut sichtbar nach (40.773%), erreicht allerdings nicht den CTL-Wert, wobei keine Signifikanz vorliegt. N =3.



**Abbildung 4.A): Effekte vom trophisch wirkendem CRF und Guanosin.**

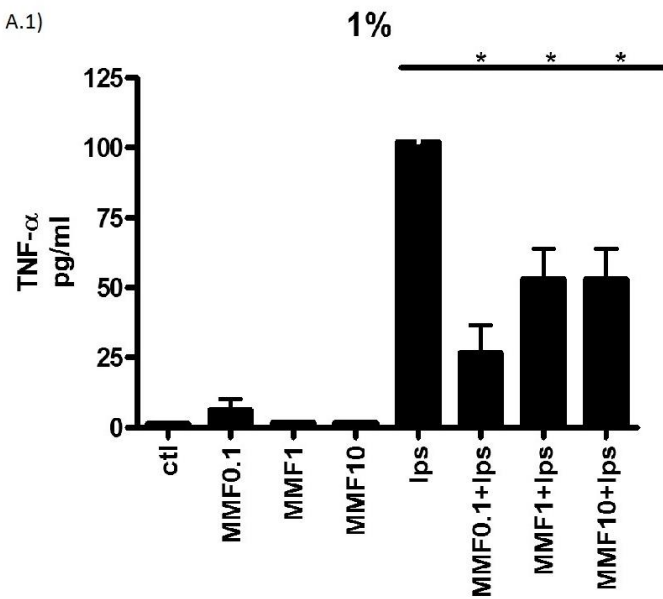
Es wird die optimale wachstumsanregende Wirkung von CRF zunächst in Vorversuchen ausgetestet. Dabei werden Konzentrationen von 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M genutzt. Die Letztere erweist sich als geeignet, um mit dem eigentlichen Versuch loszulegen, welche primär den Effekt von MMF aufheben und schließlich einen zusätzlichen Wachstumsschub für die Zellen liefern sollte, was sich erstaunlicherweise nicht bestätigte. Dargestellt sind die absoluten BrdU+Astrozytenzahlen in Abhängigkeit zu den Wachstumsstimulansien Serum in unterschiedlicher Konzentration, Corticotropin releasing factor und Guanosin. Es findet sich eine Signifikanz (\*) im Vergleich von serumfreien Kontrollgruppe zu den Gruppen mit hohem Serumanteil und in den Gruppen mit Zusätzen. N=3.



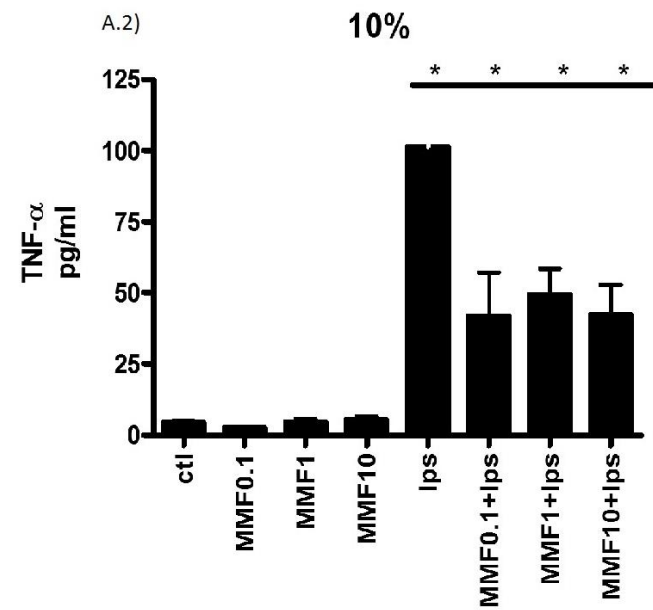
**Abbildung 4.B): Effekte vom trophisch wirkendem CRF und Guanosin.**

Es wird gezeigt der Proliferationsindex in Kombination des Stimulans mit unterschiedlichen MMF-Konzentrationen (10µg/ml 1.1%; 1mg/ml 9.1%; 0.1µg/ml 19.9%) jeweils auf die Kontroll- (CTL; 14.1%), CRF- (37.1%) und Guanosin-Gruppe (40.4%) bezogen. Eindeutig ist auch aus den mindestens 3 Mal durchgeführten Reproduktionen zu entnehmen, dass CRF 10µM keine antagonistische Wirkung auf MMF (10µg/ml 4.6%; 1µg/ml 8.6%; 0.1µg/ml 19.4%) aufweist, wohingegen unter Guanosin 100µM der Proliferationsindex um das 15fache gesteigert wird, nämlich unter MMF 10µg/ml von 1.1% auf 15.4%. N=3.

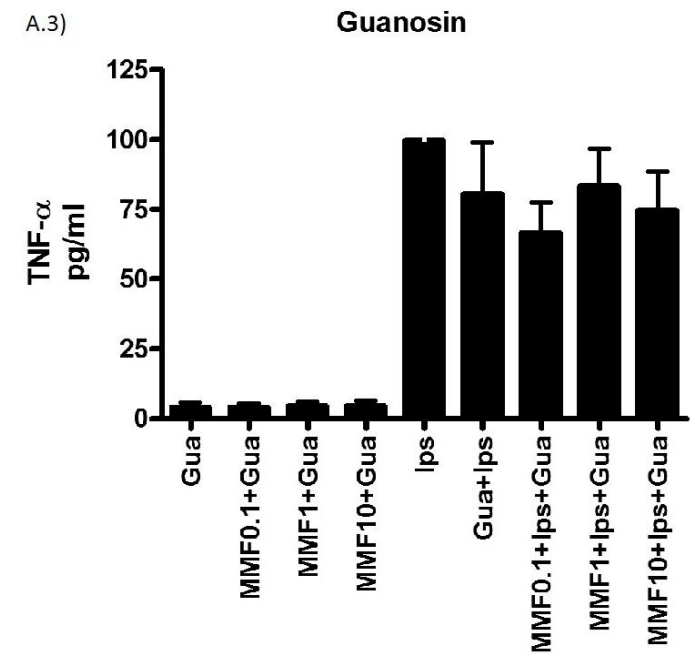
A.1)



A.2)

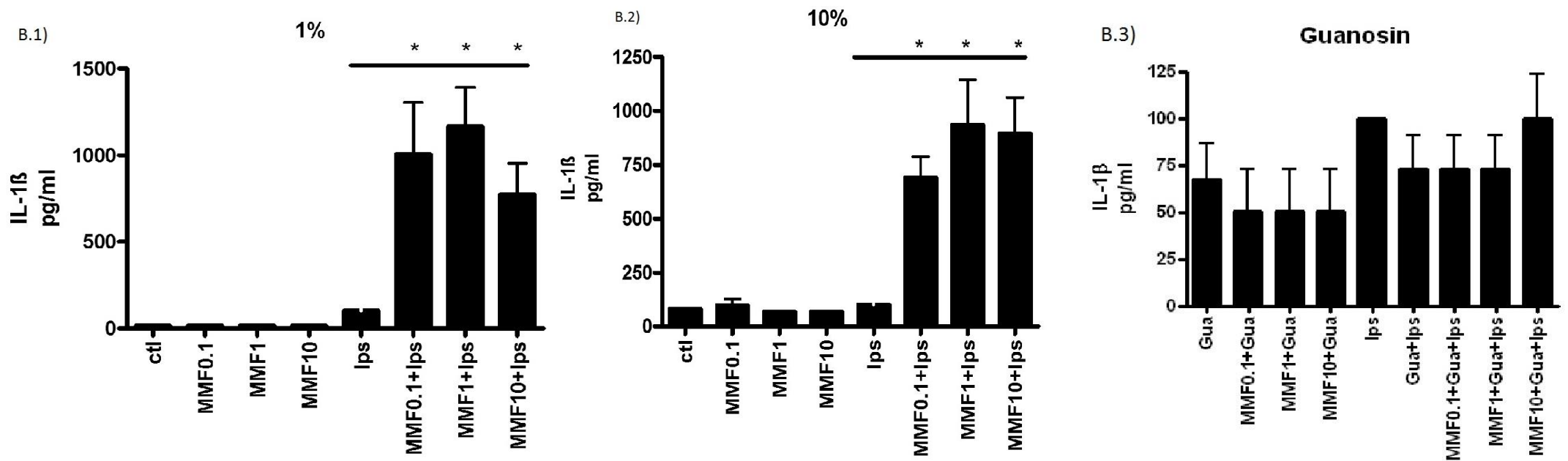


A.3)



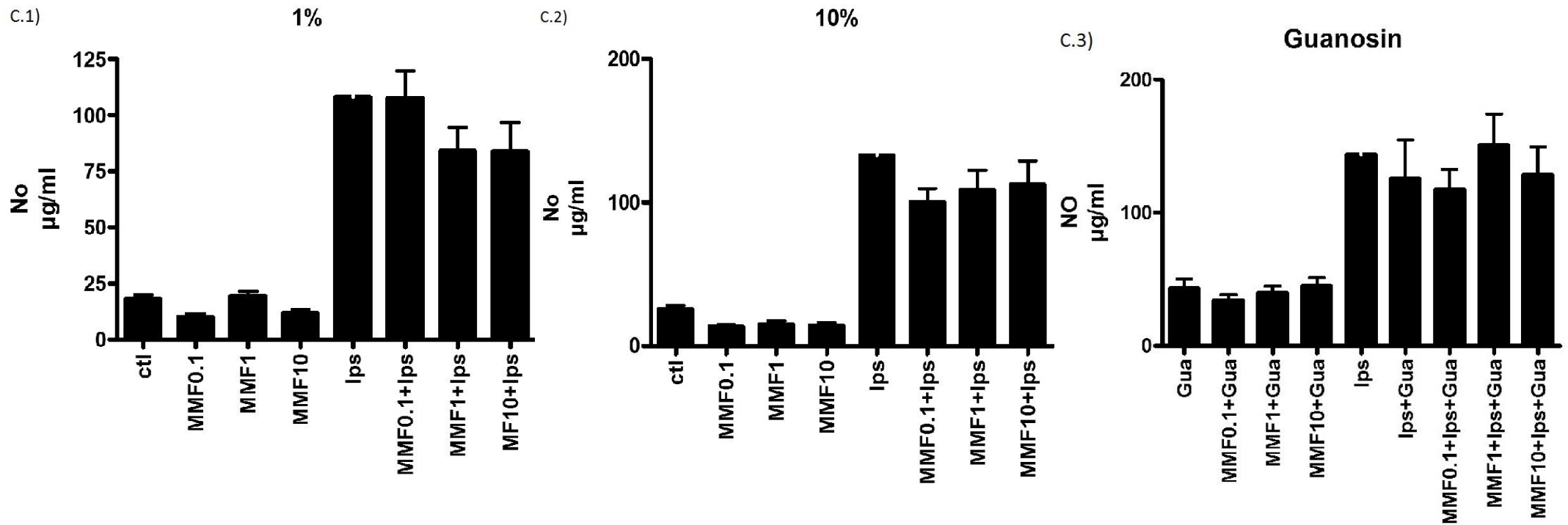
### Abbildung 5.A): Astrozytäre Cytokin- und NO-Ausschüttung

Es wird das Sekretionsverhalten der Astrozyten in Bezug auf TNF- $\alpha$  unter der Mycophenolat-Mofetil Wirkung (5.3125  $\mu\text{g/ml}$ ) und unter Stimulation der Zellen mit LPS (102.81  $\mu\text{g/ml}$ ) dargestellt. Eindeutig MMF konzentrationsabhängig ist eine Reduktion des im Überstand messbaren Cytokins nach LPS Behandlung zu sehen (MMF 10  $\mu\text{g/ml}$  mit 42.813  $\text{pg/ml}$ ), welches in der Dreifachkombination von MMF 10  $\mu\text{g/ml}$  +LPS 10  $\text{ng/ml}$  +Guanosin 100  $\mu\text{M}$  wieder zu antagonisieren ist (75.313  $\text{pg/ml}$ ). MMF10  $\mu\text{g/ml}$  allein scheint keinen Einfluss auf das Sekretionsverhalten zu haben (5.3125  $\text{pg/ml}$  vs 4.6875  $\text{pg/ml}$  in CTL). N=3.



**Abbildung 5.B): Astrozytäre Cytokin- und NO-Ausschüttung.**

Es wird das Sekretionsverhalten der Astrozyten in Bezug auf IL-1 $\beta$  gezeigt (CTL mit 84.375 pg/ml vs LPS 10ng/ml mit 96.875 pg/ml). Hier zeigt sich im Gegensatz zum TNF- $\alpha$  kein Effekt des MMF, d.h. die Menge an IL-1 $\beta$  unter LPS Stimulation herbeigeführt bleibt weiterhin hoch, MMF 10  $\mu$ g/ml führt zu keiner signifikanten Downregulation (65.625 pg/ml). So bleibt auch der Guanosineffekt aus (Gua 100 $\mu$ M mit 68.438 pg/ml). N=3. \*  $p < 0.05$ .



**Abbildung 5.C): Astrozytäre Cytokin- und NO-Ausschüttung.**

In der Abbildung sieht man die NO-Menge im Überstand der Astrozytenkulturen nach Behandlung in entsprechenden Gruppen (CTL 26.5 µg/ml vs LPS 10 ng/ml mit 132.5 µg/ml). Interessanterweise findet sich hier keine Signifikanz weder in der Mycophenolat-Mofetil- (MMF 10µg/ml mit 16.5 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle noch in der Guanosin-Behandlung (MMF 10µg/ml + Gua 100µM mit 44.5 µg/ml vs MMF 10µg/ml + Gua 100µM + LPS 10ng/ml mit 129.5 µg/ml) zu den Vergleichsgruppen CTL und LPS. Auch differieren die Daten aus den 1% und 10% Serumkulturen nicht. N=3.

## Literaturnachweis

1. Acarin L, González B, Castellano B. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci* 12:3505-3520(2000)
2. Acarin L, González B, Hidalgo J, Castro AJ, Castellano B. Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain. Astroglial response and metallothionein expression. *Neurosci* 92:827-839(1999c)
3. Albrecht PJ, Dahl PJ, Stoltzfus OK, Levenson R, Levison SW. Ciliary neurotrophic Factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of FGF-2, to increase motor neuron survival. *Exp Neurol* 173:46-62(2002)
4. Allison AC, Eugui EM. Inhibitors of de novo purine and pyrimidine synthesis as immunosuppressive drugs. *Transplantation Proc* 25:8-18(1993)
5. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47:85-118(2000)
6. M.F.Anderson, F.Blomstrand, C. Blomstrand, P.S. Eriksson, M. Nilsson. Astrocytes and stroke: Networking for survival? *Neurochemical Research*, Vol.28, No.2 pp 293-305 (2003)
7. Amundson RH, Goderie SK, Kimelberg HK. Uptake of [<sup>3</sup>H] serotonin and [<sup>3</sup>H] glutamate by primary astrocyte cultures. II.Differences in cultures prepared from different brain regions. *Glia*6,9-18(1992)
8. Aschner M, J.W. Allen, H.K. Kimelberg, R.M. LoPachin, W.J. Streit. Glial cells in neurotoxicity development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:151-73(1999)
9. Auerbach G, Nar H, The pathway from GTP to tetrahydrobiopterin: three-dimensional structures of GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *Biol Chem* 378:185-192(1997)
10. Baker BS & Fry L. The immunology of psoriasis. *Br J Dermatol* 126:1-9(1992)
11. Banati RB, Gehrman J, Wießner C, et al. Glial expression of the  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) in global ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*15,647-654(1995)
12. Banati RB, J Gehrman, P Schubert, GW Kreutzberg. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7,111-118(1993)

13. Bandaletova T, Brouet I, Bartsch H, Sugimura T, Esumi H, Ohshima H. Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with propionibacterium-acnes and Lipopolysaccharide. *APMIS* 101:330-336( 1993)
14. Bartholdi D, Schwab ME. Expression of proinflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridisation study. *Eur J Neurosci* 9:1422-1438(1997)
15. A Basu, J Kyle Krady, M O'Malley, SD Styren, ST DeKosky and SW Levison. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. *J Neurosci*, 22(14):6071-6082(2002)
16. Benninghoff Anatomie, 16.völlig neu bearbeitete Auflage, Band 2, Urban-Fischer-Verlag, ZNS pp: 231-242, Bluthirnschranke pp: 281-283, weiße Substanz pp: 455-531, Apoptose pp: 259 f., Astrozyten pp: 257-259 und 403 f., Neurone pp: 253 ff. und 304-308, 596 ff., (2004)
17. Blight A.R. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 9(Suppl.1), p83-91(1992)
18. Bö L, Dawson TM, Wesslingh S et al. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* 36, 778-786(1994)
19. Boje KM, Arora PK. Microglial- produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 587:250-256(1992)
20. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in ischemic brain damage. *J Neurosci* 21:5528-5534(2001)
21. Böcker, Denke, Heitz. Pathologie, 5. Auflage, Urban-Fischer-Verlag, Zelltod: pp 33-36, 255, (2012)
22. Caciagli F, Di Iorio P, Giuliani P, Middlemiss PJ, Rathbone MP. The neuroprotective activity of guanosine involves the production of trophic factors and the outflow of purines from astrocytes. *Drug Dev Res* 50:32(2000)
23. Ciccarelli R, Di Iorio P, Ballerini P, Ambrosini G, Giuliani P, Tiboni GM, Caciagli F. Effects exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate dissociated primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 39:556-566(1994)
24. Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P, D'Alimonate I, Ballerini P, Caciagli F, Rathbone MP. Rat cultured astrocytes release guanosine-based purines in basal



- conditions and after hypoxia/ hypoglycaemia. *Glia* 25:93-98(1999a)
25. Ciccarelli R, Di Iorio P, D'Alimonate I, Kleywegt S, Ballerini P, Rathbone MP, Poli A, Caciagli F. Guanosine and related drugs stimulate the production of neurotrophic factors from rat cultured astrocytes by involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Neurosci Soc Abstract (29<sup>th</sup> Annual Meeting)* 25:1013:407(1999b)
  26. Ciccarelli R, Di Iorio P, D'Alimonte I, Giuliani P, Florio T, Caciagli F, Middlemiss PJ, Rathbone MP. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia* 29:202-211(2000)
  27. Chao CC, Hu SX, Ehrlich L, Peterson PK. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: Involvement of nitric oxide and N-methyl-D-aspartate receptor. *Brain Behav Immunol* 9:355-365(1995a)
  28. Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Reterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149:2736-2741(1992)
  29. Chao CC, Lokensgard JR, Sheng WS, Hu S, Peterson PK. IL-1 induced iNOS expression in human astrocytes via NF- $\kappa$ B. *Neuroreport* 8:3163-3166(1997)
  30. Chem CC, Wang JK, Chen WC, Lin SB. Protein kinase C  $\eta$  mediates lipopolysaccharide-induced nitric-oxide synthase expression in primary astrocytes. *Biol Chem* 272:19424-19430(1998)
  31. Cheng B, Christakos S, Mattson MP. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12:139-153(1994)
  32. Chung IY, Benveniste EN. Tumor necrosis factor- $\alpha$  production by astrocytes. Induction by Lipopolysaccharide, IFN- $\gamma$  and IL- $\beta$ . *J Immunol* 144:2999-3007(1990)
  33. Condorelli DF, Dell'Albani P, Timmusk T, Belluardo N. Expression of neurotrophins and their receptors in primary astroglial cultures: induction by cyclic AMP-elevating agents. *J Neurochem* 63:509-516(1994)
  34. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14:5147-5159(1994)
  35. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci*

- USA 88:6368-6371(1991)
36. DeBock F, Dornand J, Rondouin G. Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *Neuroreport* 7:1125-1129(1996)
  37. Dehghani F., Sayan M., Conrad A., Evers J., Ghadban C., Korf H.-W. et al. *Neuropathology and App. Neurobiology*, Inhibition of microglial and astrocytic inflammatory responses by the immunosuppressant mycophenolate mofetil, 2010, 36. pp 598-611
  38. Dehghani F., Hirschebeth GTR, Wirjatijasa F, Kohl A, Korf HW and Hailer NP. The immunosuppressant mycophenolate mofetil attenuates neuronal damage after injury in hippocampal slice culture. *Euro. J. Neurosci.* Vol18,pp1061-1072(2003)
  39. DeKosky ST, Goss JR, Miller PD, Styren SD, Kochanek PM, Marion D. Upregulation of nerve growth factor following cortical trauma. *Exp Neurol* 130:173-177(1994)
  40. Deloncle R, Huguet F, Fernandez B, et al. Ultrastructural study of rat hippocampus after chronic administration of aluminium L-glutamate: an accumulation of the aging process. *Exp. Gerontol.*36,231-244(2001)
  41. P.H. Krammer. Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt* 97, Heft 25, 23.06.2000
  42. DeVries HE, Blom-Roosemalen MCM, Van Oosten M, De Boer AG, Van Berkel TJC, Breimer DD, Kuiper J. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 64:37-43(1996)
  43. Di Iorio P, Kleywegt S, Ciccarelli R, Traversa U, Andrew M, Crocker EC, Werstiuk ES, Rathbone MP. Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleotides in astrocytes. *Glia* 38:179-190(2002)
  44. Di Iorio P, Caciagli F, Giuliani P, Ballerini P, Ciccarelli R, Sperling O, Zoref-Shani E, Benowitz L, Traversa U, Bombi G, Florio T, Virgilio A, Andrew CM, Crocker CE, Werstiuk ES, Middlemiss PJ, Rathbone MP. Purine nucleotides protect injured neurons and stimulate neuronal regeneration by intracellular and membrane receptor-mediated mechanisms. *Drug Dev Res* 52:303-315(2001)
  45. Di Santo JP. Cytokines: shared receptors, distinct functions. *Curr Biol* 7:R424-R426(1997)
  46. Ebrahimi F. et al. Time dependent neuroprotection of mycophenolate mofetil: effects on temporal dynamics in glial proliferation, apoptosis and scar formation.

- Journal of Neuroinflammation 2012, 9:98.
47. Eugui EM, Alquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of Mycophenolic acid in vitro: role of deoxguanosine nucleotide depletion. *Scan J Immunol* 33:161-173(1991a)
  48. Epinnette WW, Colleen MP, Jones EL, Geist MC. Mycophenolic acid for psoriasis. A review of pharmacology, long-term efficacy, and safety. *J Am Acad Dermatol* 126:1-9(1992)
  49. Finklestein SP, Apostolides PJ, Caday, Prosser J, Philips MF, Klagsbrun M. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity at the site of focal brain wounds. *Brain Res* 460:253-259(1988)
  50. Förstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352:351-364(1995)
  51. Frautschy SA, Walicke PA, Baird A. Localization of basic fibroblast growth factor and its mRNA after CNS injury. *Brain Res* 553:291-299(1991)
  52. Friedman WJ, Thakur S, Seidman L, Rabson AB. Regulation of nerve growth factor mRNA by interleukin-1 in rat hippocampal astrocytes is mediated by NFκB. *J Biol Chem* 271:31115-31120 (1996)
  53. Frizzo MES, Lara DR, Dahm KCS, Prokopiuk AS, Swanson RA, Souza DO. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* 12:879-881(2001)
  54. Gadiant RA, Cron KC, Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 117:335-340(1990)
  55. Galea E, Feinstein DL, Reis DJ. Induction of calcium independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Pro Natl Acad Sci USA* 89:10945-10949(1992)
  56. Galea E, Reis DJ, Feinstein DL. Cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from rat astrocytes. *J Neurosci Res* 37:406-414(1994)
  57. Galloway D.A., Williams J.B., Moore C.S.. *Annals of clinical and translational neurology*, February 2017; 4(6): 381-391
  58. Garthwaite. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *TINS* 14:60-67(1991)
  59. Garthwaite J., Boulton C.L. Nitric oxide signalling in the central nervous

- system. *Annu. Rev. Physiol.* 57:683-706(1995)
60. Gaudet A.D., Fonken L.K.. Glial cells shape pathology and repair after spinal cord injury, July 2018, *Neurotherapeutics*, Volume 15, Issue 3, pp. 554-577
  61. Gracia-Nogales P, Almeida A, Fernández E, Medina JM, Bolaños J. Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultures rat astrocytes. *J Neurochem* 72:1750-1758(1999)
  62. Giulian D, Baker TJ. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci.* 6:2163-2178(1986)
  63. Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci* 8:2485-2490(1988)
  64. Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci* 8:709-714(1988)
  65. Giulian D, Lachman LB. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 228:497-499(1985)
  66. Giuliani P. et al. *Adv. Exp. Med. Biol.*, Guanosine protects glial cells against 6-hydroxydopamine toxicity, 2015: 837: 23-33
  67. Glick D., Barth S., Macleod K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathology*, may 2010: 221(1):3-12
  68. Grell M, Scheurich P. Tumor necrosis factor. In Leroith D, Bondy C (eds). *Growth factors and cytokines in health and disease*. Jai Press, Ltd, London, pp 669-726(1997)
  69. Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White III CL, Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7611-7615(1989)
  70. Gysbers JW, Rathbone MP. Guanosine enhances NHF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroreport* 3:997-1000(1992)
  71. Ha BK, Bishop GA, King JS, Burry RW. Corticotropin Releasing Factor induces proliferation of cerebellar astrocytes. *J Neurosci Res* 62:789-798(2000)
  72. Hailer NP, Wirjatijana F, Roser N, Hirschebeth GT, Korf HW, Dehghani F. Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci.* 14:315-326(2001)

73. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shinizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA. Inhibition of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2007-2027(1997)
74. Hartlage-Rübsamen M, Lemke R, Schliebs R. Interleukin-1 $\beta$ , inducible nitric oxide synthase, and nuclear factor- $\kappa$ B are induced in morphologically distinct microglia after rat hippocampal lipopolysaccharide/interferon- $\gamma$  injection. *J Neurosci Res* 57:388-398(1999)
75. Haufs MG, Beissert S, Grabbe S, Schutte B, Luger TA. Psoriasis vulgaris treated successfully with Mycophenolate Mofetil. *Br J Dermatol* 138:179-181(1998)
76. Heja L. et al. *Curr. Med. Chem.*, Effects of nucleosides on glia – neuron interactions open up new vistas in the development of more effective antiepileptic drugs, 2015: 22(12):1500-14
77. Heppner F.L., T. Skutella, N.P. Hailer, D.&R. Nitsch. Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 10:3284-3290(1998b)
78. Hewett SJ, Corbett JA, McDaniel ML, Choi DW. Interferon- $\gamma$  and interleukin-1 $\beta$  induce nitric oxide formation from primary mouse astrocytes. *Neurosci Lett* 164:229-232(1993)
79. Hofman FM, von Hanwehr RI, Dinarello CA, Mizel SB, Hinton D, Merrill JE. Immunoregulatory molecules and IL 2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J Immunol* 136:3239-3245(1986)
80. Hoqqvist KA, Unanue ER, Chaplin DD. Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. *J Immunol* 147:2181-2186(1991)
81. Hoqqvist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8485-8489(1991)
82. Hurwitz AA, Lyman WD, Berman JW. Tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta upregulate astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Neuroimmunol* 57:193-198(1995)
83. Ip NY, Wiegand SJ, Morse J, Rudge JS. Injury-induced regulation of CNTF mRNA in adult rat brain. *Eur J Neurosci* 5:25-33(1993)
84. Jin K, Minami M, Lan, JQ Mao et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 :4710-4715(2001)

85. Jonnsson CA, Carlsten H. Mycophenolic acid inhibits 5'-monophosphate dehydrogenase and suppresses production of proinflammatory cytokines, nitric oxide and LDH in macrophages. *Cell Immunol* 216:93-101(2002)
86. Jurynech MJ, Riley CP et al. TIGR is upregulated in the chronic scar in response to central nervous system injury and inhibits neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 23(1):69-80 (2003).
87. Kato H, Kogure K, Araki T et al. Astroglial and microglial reactions in gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res.*664,69-76(1994)
88. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257(1972)
89. Kim JK, Rathebone MP, Middlemiss PJ, Hughes DW, Smith RW. Purinergic stimulation of astroblast proliferation: guanosine and its nucleotides stimulate cell division in chick astroblasts. *J Neurosci Res.* 28:442-455(1991)
90. Kimelberg HK, Bourke RS, Steig PE, et al. Swelling of astroglia after injury to the central nervous system: mechanisms and consequences, in: *Head Injury: Basic and Clinical Aspects*. RG Grossman and PL Gildenberg (eds), Raven Press: New York, pps.31-34(1982)
91. Kraig RP, Pulsinelli WA and Plum F. Carbonic acid buffer changes during complete brain ischemia. *Am.J.Physiol.*250, R348-R357(1986)
92. Kreutzberg G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19,312-318(1996)
93. Kong LY, McMillian MK, Maronpot R, Hong JS. Protein tyrosine kinase inhibitors suppress the production of nitric oxide in mixed glia, microglia-enriched cultures. *Brain Res* 729:102-109(1996)
94. Lascola C and Kraig RP. Astroglial acid-base dynamics in hyperglycaemic and normoglycemic global ischemia. *Neurosci. Biobehav. Rev.*21, 143-150(1997)
95. Lee SC, Dickson DW, Brosnan CF. Interleukin-1, nitric oxide and reactive astrocytes. *Brain Behaviour Immun* 9:343-354(1995)
96. Lee SC, Dickson DW, Liu W, Brosnan CF. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. *J Neuroimmunol* 46:19-24(1993)
97. Lehrmann E, Kiefer R, Finsen B, Diemer NH, Zimmer J, Hartung HP. Cytokines in cerebral ischemia: Expression of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1) mRNA in the postischemic adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 131:114-123(1995)

98. Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with Lipopolysaccharide or neurotrophic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6348-6352(1989)
99. Lima R.R., Santana L.N.S., Fernandes R.M., Oliveira A.C.A., Fernandes L.M.P., Santos E.M.N. et al. Research article, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Neurodegeneration and Glial Response after Acute Striatal Stroke. July 2016, pp 15.
100. Lindholm D, Castren E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 117:395-400(1992)
101. Logan A, Berry M, González AM, Frautschy SA, Sporn MB, Baird A. Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in injured central nervous system of rat. *Eur J Neurosci* 6:355-363(1994)
102. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350(1997)
103. Marty S., I. Dusart, M. Peschanski. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS-I. Microglia/macrophages. *Neurosci* 45,529-539(1991)
104. McGuinness MC, Powers JM, Bias WB, Schmeckpeper BJ, Segal AH, Gowda VC, Wesselingh SL, Berger J, Griffin DE, Smith KD. Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 75:174-182(1997)
105. McCarthy KD, Prime J, Harmon T, Pollenz R. Receptor mediated phosphorylation of astroglial intermediate filament proteins in cultured astroglia. *J Neurochem* 44:723- 730(1985)
106. Mehler MF, Kessler JA. Hematopoietic and inflammatory cytokines in neuronal development. *Trends Neurosci* 20:357-365(1997)
107. Mele TS, Halloran PF. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology* 47:215-245(2000)
108. Merrill JE, Igarro LJ, Sherman MP,

- Melinek J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151:2132-2141(1993)
109. Merrill JE. Effects of interleucin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes. Microglia, oligodendrocytes and glial precursors in vitro. *Dev Neurosci* 13:130-137(1991)
110. Merrill JE, Murphy SP, Mitrovic B, Mackenziegramham A, Dopp JC, Ding MZ et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci.Res.*48,372-384(1997)
111. Middlemiss PJ, Gysbers JW, Rathbone MP. Extracellular guanosine and guanosine-5'-triphosphate increase NGF synthesis and release from cultured mouse neopallial astrocytes. *Brain Res* 677:152-156(1995)
112. Miljkovic D, Samardzic T, Cvetkovic I, Mostrarica Stojkovic M, Trajkovic V. Mycophenolic acid downregulates inducible nitric oxide synthase induction in astrocytes. *Glia* 39:247-255(2002)
113. Miller S, Romano C, Cotman CW. Growth factor upregulation of a phosphoinositide-coupled metabotropic glutamate receptor in cortical astrocytes. *J Neurosci* 15:6103- 6109(1995)
114. Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y, Kohsaka S. Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J Neurosci Res* 50:1023-29(1997)
115. Mokhtarzadeh K.A., Satarian L., Javan M., Baharvand H.. *Plos one biology*, September 2018, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203785>
116. Moncada S, Higgs A. Mechanism of diseases: the L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 329:2002-2012(1993)
117. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142(1991)
118. Morris SM, Billar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 266:E829-E839(1994)
119. Mutschler, Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxokologie, 10.



- Aufl., 2013, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Zytokine pp: 235-239, NO pp: 534 f., Immunsuppressiva pp: 940-946, Glukokortikoide pp: 399-404, MMF pp: 914-946
120. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064(1992)
  121. Nagata K, N. Takei, K. Nakajima K., H. Saito, S. Kohsaka. Microglia promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic brain. *J Neurosci. Res.* 34:357-63(1993)
  122. Neyts J, Andrei G, De Clerq E. The novel immunosuppressive agent Mycophenolate Mofetil markedly potentiates the antiherpes activities of acyclovir, ancyglovir and penciclovir in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 42:216-222(1998)
  123. Neyts J, De Clerq E. The immunosuppressive agent mycophenolate mofetil markedly potentiates the activity of lobucavir [1R(1alpha,2beta,3alpha)]-9-[2,3-bis(hydroxymethyl)cyclobutyl]guanine againts different herpes viruses. *Transplantation* 67 :760-764(1999)
  124. Nicholson TE, Renton KW. The role of cytokines in depression of CYP1A activity using cultured astrocytes as an in vitro model of inflammation in the central nervous system. *Drug Metab Dispos.* 30(1):42-6 (2002)
  125. Nomura Y, Kitamura Y. Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neurosci Res* 18 :103-107(1993)
  126. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-KappaB:a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *TINS* 20:252-258(1997)
  127. O  
 rzyłowska O, Oderfeld-Nowak B, Zaremba M, Januszewski S, Mossakowski M. Prolonged and concomitant induction of astroglial immunoreactivity of interleukin-1 beta and interleukin-6 in the rat hioopcampus after transient global ischemia. *Neurosci Lett* 263:72-76(1999)
  128. P  
 earson VL, Rothwell NJ, Toulmond S. Excitotoxic brain damage in the rat induces interleucin-1 beat protein in microglia and astrocytes: Correlation with the progression of cell death. *Glia* 25:311-323(1999)
  129. Park SK, Murphy S.  
 Duration of expression of inducible nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurosci Res* 39:405-

- 411(1994)
130. V.H. Perry, M.D. Bell, H.C. Brown, M.K. Matyszak. Inflammation in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5:636-641(1995)
131. Petit CK, Morgello S, Felix JC et al. The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10:850-859(1990)
132. Piani D., K. Frei, KQ. Do, M. Cuénod, A. Fontana. Murine brain macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci Lett.* 133:159-62(1991)
133. Pinkas-Kramarski R, Eilam R, Spiegler O, Lavi S, Liu N, Chang D, Wen D, Schwartz M, Yarden Y. Brain neurons and glial cells express Neu differentiation factor/herestatin: a survival factor for astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9387-9391(1994)
134. Prineas J.W., W.I. McDonald. Demyelinating disease. In: D.I. Graham, P.L. Lantos (Eds.), *Greenfield's Neuropathology*. Oxford Univ.Press., New York, pp 813-896(1997)
135. G. Raivich, M. Bohatschek, C.U.A. Kloss, A. Werner, L.L. Jones, G.W. Kreutzberg. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain research reviews* 30:77-105(1999)
136. Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gybers JW, Deforge S, Costello P, Del Maestro RF. Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide variety of cell types. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A:529-536(1992)
137. Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gybers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol.* 59:663-69(1999)
138. Reier PJ, Houle JD. The glial scar: its bearing on axon elongation and transplantation approaches to CNS repair. In: *Advances in neurology: functional recovery in neurological disease* ( Waxman SG; ed), pp 87-138. New York: Raven (1988)
139. Relton JK, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat.

- Brain Res Bull 29:243-246(1992)
140. Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. Trends Neurosci 23:618-625(2000)
141. Rudge JS, Morrissey D, Lindsay RM, Panikowskyi EM. Regulation of ciliary neurotrophic factor in cultured rat hippocampal astrocytes. Eur J Neurosci 6:248-229(1994)
142. Rudge JS, Pasnikowski EM, Holst P, Lindsay RM. Changes in neurotrophic factor expression and receptor activation following exposure of hippocampal neuron/astrocyte cocultures to kainic acid. J Neurosci 15:6856-6867(1995)
143. Saini KS, Walker NI. Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. Mol Cell Biochem 178:9-25(1998)
144. Santos CL, Souza D.O. et al. Metabolic Brain Disease, Leptin stimulates the release of proinflammatory cytokines in hypothalamic astrocyte cultures from adult and aged rats, September 2018, pp 1007
145. Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T. TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. Brain Res 583:296-299(1992)
146. Schobitz B, Dekloet ER, Hosboer F. Gene expression and function of interleukin1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain. Prog Neurobiol 44:397-432(1994)
147. Sensenbrenner M, Devilliers G, Bock E, Porte A. Biochemical and ultrastructural studies of cultured rat astroglial cells: effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on glial fibrillary acidic protein and glial filaments. Differentiation 17:51-61(1980)
148. Shrikant P, Chung IY, Ballestas ME, Benveniste EN. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma in astrocytes. J Neuroimmunol 51:209-220(1994)
149. Siesjö B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I. Pathophysiology J. Neurosurg. 77, 169-184 (1992a)
150. Siesjö B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II. Mechanisms of damage and treatment. J.

- Neurosurg. 77, 337-354 (1992b)
151. Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *Neurochem* 59:897-905(1992)
  152. Sims N.R. et al. *Neurochemistry Internationale*. Reactive astrogliosis in stroke: contributions of astrocytes to recovery of neurological function, July 2017, volume 107, pp 88-103.
  153. Skaper SD, Facci L, Leon A. Inflammatory mediator stimulation of astrocytes and meningeal fibroblasts induces neuronal degeneration via the nitridergic pathway. *J Neurochem* 64:266-276(1995)
  154. SM Allan & NJ Rothwell Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature*, review. Volume 2 (October 2001)
  155. Solà C, Casal C, Tusell JM, Serratosa J. Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. *Europ J Neurosci*, Vol 16, pp1275-1283(2002)
  156. Sparacio SM, Zhang Y, Vileck J, Benveniste EN. Cytokine regulation of interleukin-6 gene expression in astrocytes involves activation of an NF-kappa-B-like nuclear protein. *J Neuroimmunol* 39:231-242(1992)
  157. G. Stroll, S. Jander, M. Schroeter. Inflammation and glial response in ischemic brain lesions. *Neurobiology* Vol. 56, pp 149-171(1998)
  158. Struys-Ponsar C, Florence A, Gauthier A, et al. Ultrastructural changes in brain parenchyma during aging and in animal models of aging. *J. Neural. Transm.*44, 11-132(1994)
  159. Suk K, Lee J, Hur J, Kim YS, Lee MS, Cha SH, Kim SY, Kim H. Activation-induced cell death of rat astrocytes. *Brain Res* 900:342-347(2001)
  160. Szabó C. Physiological and pathological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res. Bull.*41,131-141(1996)
  161. Taku S, Lewén A, Nobuo N, Gasche Y and Pak H. Chan. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1

- subregion in rats. *Jour. of Neurotrauma* Vol.19,numb.1.85-98(2002)
162. Trapp B.D., L. Bö, S. Mörk, A. Chang. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J of Neuroimmunology* 98:49-56(1999)
163. Trapp B.D., J. Peterson, M.R. Ransohoff, R.M. Rudick, L. Bö, S. Mörk. Axonal transection in MS lesions. *N Engl. J Med.* 338,278-285(1998)
164. Tschenatlas der Anatomie von W. Kahle, 6.überarbeitete Auflage, p 16/38, Thieme-Verlag(1991)
165. Thornton C., Hagberg H. Et al. Review article *frontiers in cell. Neuroscience*, august 2017, 11:248
166. Tokita Y, Keino H, Matsui F, Aono S, Ishiguro H, Higashiyama S, Oohira A. Regulation of neuregulin expression in the injured rat brain and cultured astrocytes. *J Neurosci* 21:1257-1264(2001)
167. Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, et al. Regressive changes of astroglia in White matter lesions in cerebrovascular disease and Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol.(Berl.)*94,146-152(1997)
168. Tsai H.-H., Mojofsky A.V., Tenney A., Mumen A.T., Fancy S.P. et al. Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science*, june 2012: 337(6092): 358-362
169. Wallace MN, Geddes JG, Farquhar DA and Masson MR. Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to  $\beta$ -amyloid plaques. *Exp.Neurol.*144,266-272(1997)
170. Wong A.D., Ye M., Levy A.F., Searson P.C.. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroengineering* August 2013; 6: 7.
171. Vincent SR. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progr Neurobiol* 42:129-160(1994)
172. Yabuuchi K, Minami M, Katsumata S, Yamazaki A, Satoh M. An in situ hybridisation study on interleucin-1 beta mRNA induced by transient forebrain ischemia in the rat brain. *Mol Brain Res* 26:135-142(1994)
- 173.

- Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 26:676-681(1995)
174. Y  
ang L, Tanaka J, Zhang B, Sakanaka M, Maeda N. Astrocytes modulate nitric oxide production by microglial cells through secretion of serine and glycine. *Biochem Biophys Res Commun* 251:277-282(1998)
175. Yeh HJ, He YY, Xu J, Hsu CY, Deuel TF. Upregulation of pleiotrophin gene expression in developing microvasculature, macrophages and astrocytes after acute ischemic brain injury. *J Neurosci* 18:3669-3707(1998)
176. Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, et al. Teracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 95,15769-15774(1998)
177. Zhang J&Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*35,213-233(1995)
178. Löffler, Petrides *Biochemie/ Pathobiochemie* 6.Auflage Springer-Verlag 1998, Purin- und Pyrimidinbiosynthese S. 582-598
179. Mutschler *Arzneimittelwirkung* 8.Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001, Zytostatika S. 937
180. *Neuroimmunologie* Rieckmann & Hartung S.149-169

## **8 Anhang**

### **8.1 Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Effekt von Mycophenolat-Mofetil (CellCept®) auf die Zytokin-Sekretion und NO-Ausschüttung aus mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Astrozytenkultur**

in dem Institut für anatomische Neurologie unter Anleitung von Prof. Dr. med. F. Dehghani ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit bzw. Daten aus der Arbeit wurde in folgendem

Publikationsorgan veröffentlicht:

→ Posterpräsentation vom 04.04.2004 auf der 99. Versammlung der anatomischen Gesellschaft in Wien mit der Tafelnummer 154 mit den Titel „ Effects of mycophenolate mofetil on cytokine secretion and NO-release from lipopolysaccharide stimulated rat astrocytes“

→ Neuropathol. Appl. Neurobio2010 Dec;36(7): 598-611. doi.10.1111/j.1365-2990.2010.01104.x „, Inhibition of microglial and astrocytic inflammatory respons by the immunosppressant myophneolat mofetil“

Schmitt, den -----



## **8.2 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, als Doktorandin in einem renommierten Institut tätig gewesen zu sein und unlimitierten Zugang zu den bei dieser Arbeit erforderlichen Materialien und die erforderlichen technischen Ausstattung gehabt zu haben.

Herrn Prof. Dr. med. F. Dehghani möchte ich ebenfalls für seine damalige gute, freundschaftliche Betreuung in einer liebenswerten Gruppe während meiner gesamten Doktorarbeit danken. Er war mit seinem Engagement und seiner Kompetenz eine hilfreiche Stütze.

Meinem sozialen Umfeld, insbesondere meinen Eltern und Geschwistern bin ich für ihre unendliche Unterstützung, Geduld und Motivation während des Medizinstudiums und selbst danach zu tiefst verbunden. Weiter spreche ich meinen großen Dank an Marcel Adler und meinem Schwager Iwo Ilnicki für wiederholtes Korrekturlesen und Verbesserungsvorschläge aus.

Ich widme meine Doktorarbeit meiner Tochter Alina Asya Sylvie und meinem Mann Christian.