

# Expression synaptischer Proteine in Astrocyten *in vitro* und *in situ*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Alexander Wilhelm  
aus Pforzheim

Frankfurt am Main, 2002

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe -  
Universität als Dissertation angenommen.

Dekan : Prof. Dr. B. Streit

Gutachter : Prof. Dr. H. Zimmermann  
Prof. Dr. W. Volkandt

Datum der Disputation : .....

# Inhalt

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Einleitung</b> .....   | <b>5</b>  |
| Die Gliazelle als aktiver Partner des Neurons .....   | 5         |
| Neuronen können aus glialen Zellen hervorgehen .....  | 6         |
| Astrocyten exprimieren Rezeptoren für Neurotransmitter .....  | 7         |
| Astrocyten synthetisieren Signalsubstanzen und setzen diese frei .....  | 7         |
| Astrocyten bilden Kontakte zu benachbarten Zellen aus.....  | 8         |
| Calcium-vermittelte Signaltransduktion in Astrocyten.....   | 9         |
| Signalübertragung zwischen Neuronen und glialen Zellen.....   | 10        |
| Modulation von synaptischer Transmission durch Astrocyten und<br>Modulation von Astrocyten .....                                      | 10        |
| Spontane Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen in Astrocyten können Neuronen erregen.   | 11        |
| Kultivierte Astrocyten exprimieren synaptische Proteine, die mit ATP-<br>speichernden vesikulären Kompartimenten assoziiert sind..... | 12        |
| Proteine des synaptischen SNARE-Komplexes sind an der regulierten<br>Freisetzung von Signalsubstanzen aus Astrocyten beteiligt.....   | 13        |
| Ein dualer vesikulärer Freisetzungsmechanismus .....  | 14        |
| Fragestellung .....   | 15        |
| <br>  |           |
| <b>Material und Methoden</b> .....  | <b>16</b> |
| Transgene Tiere.....  | 16        |
| Zellkultur .....  | 16        |
| Kulturmedium .....  | 16        |
| Primärkultur muriner glialer Zellen.....  | 17        |
| Vorbereitungen.....   | 17        |
| Poly-D-Lysin Beschichtung von Deckgläschen .....  | 17        |
| Anlegen der Kultur.....   | 18        |
| Zytospin.....   | 19        |
| Kultivierung und Passagierung von U373MG Astrocytomazellen .....  | 19        |
| Immunocytoologie.....   | 20        |
| Fixierung von Zellkulturpräparaten.....   | 20        |
| Antikörperbehandlung .....  | 20        |
| Immunhistologie.....  | 21        |
| Perfusionsfixierung und Gefriermikrotomschnitte.....  | 21        |
| Antikörperbehandlung .....  | 21        |
| Mikroskopie.....  | 22        |
| Bildbearbeitung.....  | 22        |
| Primärantikörper .....  | 22        |
| Sekundärantikörper.....   | 25        |
| Secretogranin II-Freisetzungsexperimente mit U373MG Astrocytoma-<br>Zellen .....  | 25        |
| Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)...  | 26        |
| Puffer und Lösungen.....  | 26        |
| Krebs-Ringer-Puffer .....   | 26        |

|   |           |
|---|-----------|
| Tris gepufferte Salzlösung (TBS) .....  | 26        |
| Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS).....   | 27        |
| Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) .....  | 27        |
| Probenaufbereitung.....   | 27        |
| Verwendete Lösungen .....   | 27        |
| Trichloracetatfällung.....  | 27        |
| Polyacrylamidgele .....   | 28        |
| Elektrophoresepuffer.....   | 28        |
| Polyacrylamidgele und Elektrophorese .....  | 28        |
| Proteinnachweis mittels Western-Blotting .....  | 30        |
| Versuchsdurchführung .....  | 31        |
| Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Detektionssystem .....   | 32        |
| Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz.....   | 33        |
| <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>34</b> |
| U373MG Astrocytoma-Zellen setzen Secretogranin II frei.....   | 34        |
| Analyse der Proteinexpression in kultivierten Astrocyten der P <sub>GFAP</sub> EGFP-<br>Maus .....                    | 35        |
| Kultivierte Astrocyten aus dem murinen ZNS exprimieren synaptische<br>Proteine.....                                   | 35        |
| Kulturdauerabhängigkeit der Proteinexpression.....  | 36        |
| Zytospin, postnataler Tag 11:   |           |
| SNAP 23 .....   | 38        |
| SNAP 25 .....   | 39        |
| Synaptophysin.....  | 40        |
| SV 2 .....  | 41        |
| MAP 2 .....   | 42        |
| VAMP 2.....   | 43        |
| Zytospin, postnataler Tag 16:   |           |
| SNAP 23 .....   | 44        |
| SNAP 25 .....   | 45        |
| Synaptophysin.....  | 46        |
| SV 2 .....  | 47        |
| MAP 2 .....   | 48        |
| VAMP 2.....   | 49        |
| Postnataler Tag 11: 0,5 DIV, 1 DIV, 8 DIV .....   | 50        |
| Altersabhängigkeit der Poteinexpression: P1-P16, 2 DIV .....  | 52        |
| Postnataler Tag 1 .....   | 53        |
| Postnataler Tag 2 .....   | 54        |
| Postnataler Tag 3 .....   | 55        |
| Postnataler Tag 7 .....   | 56        |
| Postnataler Tag 11 .....  | 57        |
| Postnataler Tag 16 .....  | 58        |
| Expression synaptischer und organellärer Proteine <i>in situ</i> ? .....  | 59        |
| Übersicht zu den Immunreaktionen der verwendeten Antikörper in<br>Astrocyten <i>in vitro</i> und <i>in situ</i> ..... | 61        |

|   |               |
|---|---------------|
| <b>Diskussion .....</b>   | <b>65</b>     |
| Secretogranin II-Freisetzung aus U373MG Astrocytomazellen.....                                      | 65            |
| GFP-positive Zellen der P <sub>GFAP</sub> EGFP-Maus .....   | 66            |
| Synaptische Proteine in primären Astrocyten der P <sub>GFAP</sub> EGFP-Maus ....                    | 67            |
| Synaptische Proteine in primären Astrocyten: Kulturdauerabhängigkeit<br>der Proteinexpression ..... | 67            |
| Synaptische Proteine in primären Astrocyten: 2 Tage <i>in vitro</i> .....                           | 70            |
| Expression synaptischer und organellärer Proteine <i>in situ</i> ?.....                             | 71            |
| <br><b>Zusammenfassung.....</b>   | <br><b>73</b> |
| <br><b>Literatur .....</b>  | <br><b>75</b> |
| <br><b>Lebenslauf .....</b>   | <br><b>82</b> |

# Einleitung

## Die Gliazelle als aktiver Partner des Neurons

Glia, griechisch für Leim, nannte Rudolf Virchow im Jahre 1846 den Zelltypus, der seiner Betrachtungsweise nach dem zentralen Nervensystem die strukturelle Integrität gibt (Virchow, 1846). Seither wurde der Gliazelle kaum mehr als eine passive, dem Neuron untergeordnete Rolle zugesprochen. Im Gegensatz zu den intensiven Anstrengungen, die unternommen wurden, um die Funktionsweise von Neuronen zu verstehen, blieben gliale Zellen bis in jüngste Zeit weitestgehend unbeachtet.

Welche Rolle den Gliazellen im Hinblick auf strukturelle, metabolische und trophische Unterstützung von Neuronen zukommt, ist mittlerweile gut untersucht (zusammengefasst in Kettenmann H. und Ransom B.R., 1995). Die Idee, dass Glia eine aktive, eng mit Neuronen interagierende und diese beeinflussende Rolle im zentralen Nervensystem einnehmen können, beginnt sich erst jetzt durchzusetzen.

Das mammale zentrale Nervensystem (ZNS) besteht aus etwa zehnmal mehr glialen Zellen als Neuronen. Nach Phänotyp und unterschiedlicher Funktion können gliale Zellen in Oligodendrocyten (auch: Oligodendroglia) Microglia und Astrocyten (auch: Astroglia) eingeteilt werden. Die Astrocyten stellen dabei die überwiegende Mehrheit der glialen Zellen. Oligodendroglia sind in ihrer Funktion mit den myelinisierenden Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems vergleichbar. Microglia können im ZNS in Macrophagen-ähnlicher Weise agieren. Astrocyten erfüllen Aufgaben der Homöostase, wie die Regulierung des extrazellulären pH-Wertes und der Ionenkomposition und die Aufnahme und den Abbau von Neurotransmittern, der Entgiftung des Interstitiums, der Ernährung von Neuronen und sie dienen wandernden Zellen zur Orientierung. Sie bilden Kontakte untereinander aus und kommunizieren miteinander und mit benachbarten Zellen, wie Microglia (Bezzi et al., 2001), endothelialen Zellen (Braet et al., 2001), Zellen der

Hirnhaut (Grafstein et al., 2000) und mit Neuronen, für die sie aktive Partner in der Signalübertragung sind. Infolge ihrer engen räumlichen Beziehung zu synaptischen Kontakten kommt es zu einer gegenseitigen Kommunikation mit Neuronen, in der Astrocyten direkt auf Botenstoffe reagieren, die in die Synapse freigesetzt werden (Verkhratsky und Kettenmann, 1996; Deitmer et al., 1998; Araque et al., 1999; Vesce et al., 1999). Eine Einflussnahme auf Neuronen ist sogar ohne synaptische Aktivität möglich (Parri et al., 2001; zusammengefasst in: Araque et al., 1999 a, 1999 b, 2001; Vesce et al., 1999; Carmignoto, 2000; Bezzi und Volterra, 2001; Reiser und Zimmermann, 2001; Volkhardt, 2002). Welchen Einfluss die aktive Rolle der glialen Zellen im ZNS auf unser Verständnis der Gehirnfunktionen haben wird, ist noch nicht abzusehen. Im medizinischen Bereich wird es in Zukunft bei bisher als rein neuronal betrachteten und behandelten Krankheiten möglicherweise Therapieansätze geben, die auf gliale Zellen abzielen, welche beispielsweise an der Entstehung von chronischem Schmerz maßgeblich beteiligt sind (Watkins et al., 2001).

### **Neuronen können aus glialen Zellen hervorgehen**

Neben der aktiven Rolle, die den Glia nach neuesten Untersuchungen zukommt, zeichnet sich mittlerweile ab, dass gliale Zellen im sich entwickelnden zentralen Nervensystem als Stammzellen für Neuronen fungieren können. Radiale Glia des cerebralen Cortex bringen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* Neuronen hervor (Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2001; Miata et al., 2001; Tamamaki et al., 2001). Mittlerweile kann das neurogene Potential solcher Zellen mit der Expression des Transkriptionsfaktors Pax6 in Verbindung gebracht werden (Heins et al., 2002). Im adulten mammalen ZNS sind Astrocyten der subventrikulären Zone neuronale Stammzellen (Doetsch et al., 1999). Die Betrachtungsweise der Entstehung der Zelldiversität im mammalen cerebralen Cortex wurde mittlerweile im Bezug auf die Stammzellen revidiert. Die frühere scharfe Trennung in neuronale und gliale Vorläufer wurde aufgehoben, nachdem

gezeigt war, dass sich radiale Glia asymmetrisch teilen und sowohl Astrocyten, als auch Neuronen hervorbringen können (zusammengefasst in Parnavelas und Nadarajah, 2001).

### **Astrocyten exprimieren Rezeptoren für Neurotransmitter**

Astrocyten exprimieren Neurotransmitterrezeptoren, die in ihrer Gesamtheit den Besatz benachbarter Synapsen reflektieren und zur Kommunikation zwischen Astrocyten und Neuronen dienen (Teichberg, 1991; Porter und McCarthy, 1996). Astrocyten können Rezeptoren für alle klassischen Neurotransmitter exprimieren. Darunter sind Rezeptoren für biogene Amine, Purine, Aminosäuren und ein breites Spektrum an Peptiden und Cytokinen. Abhängig von der Region des ZNS können sich Astrocyten in ihrem Rezeptorbesatz unterscheiden (Hösli und Hösli, 1993). In elektrophysiologischen und biochemischen Studien konnte gezeigt werden, dass Rezeptoren für verschiedene Neurotransmitter auf einer Zelle gleichzeitig vorkommen können. Dies gilt unter anderem für Rezeptoren für Noradrenalin, Dopamin und Serotonin oder Acetylcholin, Noradrenalin und Angiotensin II, Neuropeptid Y und Bradykinin (Hösli und Hösli, 2000). Für Astrocyten *in situ* konnte unter anderem die funktionelle Expression des NMDA-Rezeptors gezeigt werden (Schipke et al., 2001).

### **Astrocyten synthetisieren Signalsubstanzen und setzen diese frei**

Eine große Zahl von peptidischen und nicht-peptidischen Signalsubstanzen wird von Astrocyten synthetisiert und freigesetzt. Aus älteren Befunden wurde geschlossen, dass die Freisetzung niedermolekularer Botenstoffe, wie Glutamat, Aspartat oder Taurin ausschließlich auf unabhängig von Calcium arbeitende, in der Plasmamembran lokalisierte Transporter zurückzuführen sei (Szatkowski et al., 1990; Martin, 1992). Substanzen wie Glutamat, Glycin, L-Homocystein, L-Serin, Arginin, ATP, GABA, NAD<sup>+</sup>, verschiedene Neuropeptide und Wachstumsfaktoren, Eicosanoide und NO werden von



Astrocyten synthetisiert und freigesetzt (Levi und Patrizio, 1992; Janigro et al., 1996; Do et al., 1997; Queiroz et al., 1999; Vega-Agapito et al., 1999; Hide et al., 2000; Verleysdonk und Hamprecht, 2000; Verderio et al., 2001). An der Freisetzung von Glutamat aus kultivierten neocorticalen Astrocyten der Ratte ist ein vom Glutamat-Transporter unabhängiger, Calcium-abhängiger Mechanismus beteiligt (Jeftinija et al., 1996). Eine mögliche physiologische Rolle für die Glutamat-abhängige ATP-Freisetzung aus Astrocyten (Queiroz et al., 1999) zeichnet sich ab, nachdem aktuelle Untersuchungen an hippocampalen Neuronenkulturen eine neuroprotektive Wirkung von ATP an der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors bei excitotoxischen NMDA-Konzentrationen andeuten (Ortinou et al., zur Publikation eingereicht). Des weiteren wurde gezeigt, dass D-Serin, welches als endogener Ligand neuromodulatorisch an der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors wirkt, in Ausläufern von Astrocyten vorkommt, im Rattengehirn mit der Lokalisation von NMDA-Rezeptoren zur Deckung kommt und Glutamat-abhängig freigesetzt wird (Schell et al., 1995, 1997; Mothet et al., 2000). Somit könnten Astrocyten eine NMDA-vermittelte postsynaptische Antwort beeinflussen, indem sie auf den Stimulus präsynaptisch freigesetzten Glutamats hin D-Serin freisetzen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Astrocyten neben der homotypischen Kommunikation zu einer bidirektionalen Kommunikation mit Neuronen fähig sind, indem sie auf synaptisch freigesetzte Botenstoffe reagieren und mit ihrerseits freigesetzten Substanzen Neuronen beeinflussen.

### **Astrocyten bilden Kontakte zu benachbarten Zellen aus**

Astrocyten sind wichtige funktionelle Partner von Neuronen und anderen glialen Zellen, wie Microglia und Oligodendrocyten. Über ihre weitläufigen Fortsätze stehen Astrocyten in vielfältigem Kontakt zu anderen Astrocyten, zu Neuronen, Microglia, Oligodendrocyten und Zellen des Epithels und Ependyms. Ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Astrocyten viele synaptische Kontakte eng umschließen, was sie für eine

Kommunikation mit Neuronen in diesem Bereich perfekt positioniert erscheinen lässt (Araque et al., 1999 b). Astrocyten sind über *gap junctions* sowohl mit anderen Astrocyten als auch mit Neuronen verbunden (Dermietzel und Spray, 1993; Alvarez-Maubecin et al., 2000).

### **Calcium-vermittelte Signaltransduktion in Astrocyten**

Astrocyten sind über die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) erregbar und können diese an benachbarte Astrocyten weitergeben. Dieser Mechanismus bildet einen langsamen und über weite Distanz reichenden Signalübertragungsweg zwischen Astrocyten. Nicht nur *gap junctions* können zur Ausbreitung von Calcium-Wellen beitragen. Neuere Befunde legen nahe, dass eine extrazelluläre Signalübertragung für die Ausbreitung von Calcium-Wellen in Frage kommt. Das Hervorrufen einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in Astrocyten kann die Freisetzung von Botenstoffen wie Glutamat und ATP induzieren (Guthrie et al., 1999; Innocenti et al., 2000). Eines der Schlüsselmoleküle für die extrazelluläre Signalübertragung ist ATP, welches nach seiner Freisetzung aus aktivierten Astrocyten auf Purin-Rezeptoren (P2-Rezeptoren) in parakriner Weise wirkt. Die Aktivierung astroglialer P2-Rezeptoren führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration (Bernstein et al., 1998; Fam et al., 2000). Eine Calcium-Welle kann sich auch auf Astrocyten ausbreiten, die nicht in direktem Kontakt zueinander stehen. P2-Rezeptor-Antagonisten unterbinden diese Signalübertragung (Guthrie et al., 1999). Kultivierte Astrocyten aus einer Connexin 43 *knock-out* Maus zeigen immer noch eine ATP-vermittelte interzelluläre Kommunikation über Calcium-Wellen (Scemes et al., 2000).

## **Signalübertragung zwischen Neuronen und glialen Zellen**

Astrocyten antworten direkt auf synaptisch freigesetzte Botenstoffe und kommunizieren mittels Signalsubstanzen bidirektional mit Neuronen (Deitmer et al., 1998; Grosche et al., 1999; Vesce et al., 1999; Araque et al., 2001). Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer unidirektionalen Signalübertragung von glialen Zellen auf Neuronen. So konnte an Glia-freien Neuronenkulturen mittels konditionierten Mediums aus glialen Kulturen gezeigt werden, dass Astrocyten lösliche Substanzen freisetzen, welche die Synapsenanzahl pro Neuron und die synaptische Effizienz erhöhen (Nägler et al., 2001). Auf eine Reihe von neuronalen Botenstoffen, darunter Glutamat, Noradrenalin und Bradykinin, reagieren Astrocyten mit einer Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels. Dabei kann es sich um eine Oszillation des Calcium-Spiegels oder eine lang anhaltende Erhöhung der Konzentration handeln (Chen et al., 1997; Araque et al., 1999 b). Eine solche Erregung kann in Form von Calcium-Wellen an benachbarte Astrocyten weitergegeben werden (Haydon, 2001). In elektrophysiologischen Untersuchungen an hippocampalen Schnitten des Rattengehirns konnte eine glutamaterge synaptische Übertragung von Neuronen auf Oligodendrocyten-Vorläuferzellen beobachtet werden. Der synaptische Charakter dieser Signalübertragung ergibt sich aus deren Geschwindigkeit und wird durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gestützt, in welchen gezeigt wurde, dass Vesikel-gefüllte Axonendigungen auf Ausläufern von Oligodendrocyten-Vorläuferzellen terminieren (Bergles et al., 2000).

## **Modulation von synaptischer Transmission durch Astrocyten und Modulation von Astrocyten**

Neuronale Aktivität kann direkt gliale Calcium-Wellen auslösen (Dani et al., 1992), welche ihrerseits Calcium-Ströme und elektrische Aktivität in Neuronen verursachen können (Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994; Pasti et al., 1997). Weiterhin wurde beobachtet, dass eine erhöhte Calcium-

Konzentration in Astrocyten Transmissionsprozesse benachbarter Synapsen moduliert. Untersuchungen an Kokulturen von hippocampalen Astrocyten und Neuronen ergaben, dass die Stimulation von Astrocyten durch die Aktivierung metabotroper Glutamat-Rezeptoren eine Minderung durch Aktionspotentiale hervorgerufener exzitatorischer und inhibitorischer Ströme zur Folge hat (Araque et al., 1998 a). Auf einem NMDA-Rezeptor-vermittelten Weg konnte die Frequenz von synaptischen Miniaturströmen erhöht werden (Araque et al., 1998 b). Daraus erwächst die Möglichkeit, dass Astrocyten synaptische Transmission modulieren können und in eine bidirektionale Kommunikation mit Neuronen treten. Die Art der Interaktion könnte je nach Typ und Lokalisation der Astroglia variieren. Die Freisetzung von NO aktiviert Calcium-Ströme in den Ausläufern von Bergmann-Gliazellen. Diese Ströme sind auf kleine Kompartimente der Ausläufer von Bergmann-Gliazellen beschränkt, die vermutlich Module repräsentieren, die nur mit wenigen Synapsen interagieren (Grosche et al., 1999). Darüber hinaus konnte eine Glutamat-vermittelte Langzeit-Potenzierung (LTP) der astroglialen Antwort beobachtet werden. Wiederholte Stimulation mit Glutamat oder aufeinanderfolgende Stimulationen von Schaffer-Kollateralen ergaben eine anhaltende Erhöhung der Frequenz der  $[Ca^{2+}]_i$  in kultivierten Astrocyten und in Astrocyten in akuten hippocampalen Schnitten (Pasti et al., 1995, 1997). Somit erscheinen nicht mehr nur Nervenzellen als langzeitpotenzierbare Zellen des ZNS, vielmehr können neurotransmittervermittelte Prozesse auch für Astrocyten in LTP resultieren.

### **Spontane Calcium-Oszillationen in Astrocyten können Neuronen erregen**

Kürzlich wurden langsame, wiederkehrende Calcium-Ströme in Astrocyten beobachtet, die sich als Wellen in benachbarten Astrocyten ausbreiten (Parri et al., 2001). Ohne vorangegangene neuronale Aktivität werden Neuronen durch solche Calcium-Oszillationen Glutamat-abhängig aktiviert. Somit könnten im Säuger-ZNS spontane astrogliale Calcium-Oszillationen ein

Auslöser für neuronale Aktivität durch NMDA-Rezeptor vermittelte Erregung sein. Weiterhin können Astrocyten  $\text{NAD}^+$  freisetzen und auf extrazelluläres  $\text{NAD}^+$  oder zyklische ADP-Ribose mit Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reagieren. Dies weist neben dem ATP-vermittelten Weg auf einen weiteren parakrinen, ADP-Ribose-vermittelten Signalübertragungsweg von Astrocyten zu Neuronen hin (Verderio et al., 2001), welcher über die durch ADP-Ribose verursachte, erhöhte Freisetzung der Neuromodulatoren Glutamat und GABA aus Astrocyten wirkt.

### **Kultivierte Astrocyten exprimieren synaptische Proteine, die mit ATP-speichernden vesikulären Kompartimenten assoziiert sind**

Die Calcium-Abhängigkeit der Glutamat-Freisetzung aus Astrocyten in Zellkultur und *in situ* (Parpura et al., 1994; Bezzi et al., 1998) deutet auf Exocytose als möglichen Mechanismus hin. Darüber hinaus verursacht  $\alpha$ -Latrotoxin, eine Komponente des Giftes der Schwarzen Witwe, von der bekannt ist, dass sie direkt auf die Transmitterfreisetzung wirkt, eine massive Freisetzung von Glutamat aus kultivierten Astrocyten (Parpura et al., 1995 b). Die synaptische Freisetzung von Neurotransmittern aus Nervenzellen ist an eine Gruppe spezieller Proteine auf den Membranen synaptischer Vesikel und der Präsynapse gebunden (Hanson et al., 1997; Geppert und Südhof, 1998). Verwandte Proteine sind an der intrazellulären Membranfusion beteiligt. Neuere Befunde zeigen, dass Proteine, die bis dato als spezifisch für synaptische Transmitterfreisetzung erachtet wurden, möglicherweise auch in nicht neuronalen Zellen exocytotische Membranfusionsprozesse vermitteln. In kultivierten Astrocyten konnten solche Proteine gefunden werden. Darunter sind VAMP2 (Synaptobrevin II) und Syntaxin 1 aber auch das ubiquitäre Cellubrevin (Parpura et al., 1995 a; Jęftinija et al., 1997). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte in kultivierten Astrocyten eine Reihe von Proteinen gefunden werden, die typischerweise mit synaptischen Vesikeln assoziiert oder an der synaptischen Transmission beteiligt sind. Hierzu gehören die synaptischen Vesikelproteine VAMP2,

Synaptotagmin 1, Synaptophysin, rab3 und Synapsin 1 und die Plasmamembranproteine SNAP-25 und Syntaxin 1 aber auch die ubiquitären SNARE-Proteine Cellubrevin und SNAP-23 (Parpura et al., 1995 a; Hepp et al., 1999; Maienschein et al., 1999; Volkmandt et al., 2002; Wilhelm et al., 2001). Erwähnenswert ist, dass das Auftreten einzelner synaptischer Proteine in kultivierten Astrocyten kulturdauerabhängig ist (Maienschein et al., 1999). Subzelluläre Fraktionierungen zeigten, dass diese Proteine mit ATP-speichernden Vesikeln assoziiert zu sein scheinen, und fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten die Lokalisation synaptischer Proteine auf vesikulären Organellen (Maienschein et al., 1999).

### **Proteine des synaptischen SNARE-Komplexes sind an der regulierten Freisetzung von Signalsubstanzen aus Astrocyten beteiligt.**

Die rezeptorvermittelte Freisetzung von Glutamat aus Astrocyten ist an eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration gekoppelt und unabhängig von Glutamat-Transportern (Parpura et al., 1994; Bezzi et al., 1998). Sie kann durch clostridiale Neurotoxine, die die synaptische Transmission blockieren, unterbunden werden. Astrocyten nehmen clostridiale Neurotoxine endocytotisch auf (Verderio et al., 1999). Die Praeinkubation kultivierter Astrocyten mit Botulinum Neurotoxin A (schneidet SNAP-25) und Botulinum Neurotoxin C<sub>1</sub> (schneidet Syntaxin 1) verringert die durch Bradykinin hervorgerufene Glutamat-Freisetzung (Jeftinija et al., 1997). Botulinum Neurotoxin B (schneidet VAMP2) inhibiert eine durch Astrocyten induzierte Glutamat-Antwort in kokultivierten Neuronen (Araque et al., 2000). Diese Beobachtungen legen nahe, dass kultivierte Astrocyten über eine proteinäre Freisetzungsmaschinerie verfügen, wie sie von Neuronen zur regulierten Exocytose verwendet wird.

### **Ein dualer vesikulärer Freisetzungsmechanismus**

In kultivierten Astrocyten konnten sowohl elektronendichte, als auch elektronenlichte Vesikel gefunden werden (Calegari et al., 1999; Maienschein et al., 1999). Dies deutet auf die Möglichkeit eines dualen Freisetzungsmechanismus mittels zweier unterschiedlicher Klassen von Vesikeln hin. Secretogranin II (SgII), ein modulatorisches Neuropeptid, das in sekretorischen Granula gespeichert wird, wird von Astrocyten synthetisiert und Calcium-abhängig freigesetzt (Fischer-Colbrie et al., 1993; Calegari et al., 1999). Dieser Befund legt nahe, dass Astrocyten, ähnlich den Neuronen, über einen dualen sekretorischen Mechanismus für niedermolekulare Substanzen wie Glutamat und für Inhaltsstoffe sekretorischer Granula wie Secretogranin II verfügen könnten.

## Fragestellung

Kultivierte hippocampale Astrocyten, nicht aber Astrocyten anderer Hirnregionen, exprimieren das neuromodulatorische Peptid Secretogranin II, speichern es in elektronendichten Granula und setzen es Calcium-abhängig frei (Calegari et al., 1999). Ob diese Eigenschaft auf eine Zelllinie astroglialen Ursprungs zutrifft und diese im Hinblick auf die regulierte Freisetzung möglicherweise als Modellsystem für kultivierte hippocampale Astrocyten geeignet wäre, sollen Secretogranin II-Freisetzungsversuche an der humanen, malignen U373MG Astrocytoma-Zelllinie zeigen.

Mit der Verfügbarkeit einer transgenen Maus, die unter der Kontrolle des GFAP-Promotors EGFP exprimiert (Nolte et al., 2001), ist eine leichte Detektion astroglialer Zellen *in vitro* und *in situ* möglich. Mit Hilfe dieser Maus besteht erstmals die Möglichkeit, die Frage nach der Expression synaptischer Proteine in der Maus *in vitro* und *in situ* zu untersuchen. Dabei ist ein wichtiger Aspekt, inwieweit die zuvor in kultivierten Astrocyten aus den Neopallia neonataler Ratten gezeigte Expression und organelläre Lokalisation synaptischer Proteine (Maienschein et al., 1999) auch in kultivierten Astrocyten der Maus zu finden ist und ob diese Expression ebenso einer Kulturdauerabhängigkeit folgt.

Untersuchungen der Expression synaptischer Proteine in Astrocyten der Ratte beschränkten sich auf Zellen, die aus den Neopallia neonataler Tiere gewonnen worden waren (Maienschein et al., 1999). Analysen astroglialer Primärkulturen aus den Gehirnen unterschiedlich alter  $P_{GFAP}EGFP$ -Mäuse müssen die in diesem Zusammenhang bisher offene Frage nach möglichen postnatalen, entwicklungsabhängigen Veränderungen in der Fähigkeit kultivierter astroglialer Zellen, synaptische Proteine zu exprimieren, beantworten.

Welche Relevanz Untersuchungen an kultivierten Zellen haben, wird die Analyse von Gehirnschnitten der  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus in Bezug auf die Expression und organelläre Lokalisation organellärer und synaptischer Proteine *in situ* beantworten.



# Material und Methoden

## Transgene Tiere

Die verwendeten transgenen Mäuse stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Helmut Kettenmann, Max-Delbrück-Centrum, Berlin. Es handelt sich dabei um Mäuse vom FVB-Stamm, die unter der Kontrolle des Promotors für das für Astrocyten typische Intermediärfilamentprotein GFAP (saures gliales Filamentprotein), Grün Fluoreszierendes Protein (hier die mutierte Form EGFP, *enhanced GFP*) exprimieren (Nolte et al., 2001). Im weiteren Verlauf werden diese Tiere als P<sub>GFAP</sub>EGFP-Mäuse bezeichnet. Die Tiere wurden gemäß den veterinärmedizinischen Vorschriften gehalten und zu Versuchszwecken getötet.

## Zellkultur

### Kulturmedium

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) wurde als steriles Flüssigmedium von der Firma GIBCO BRL bezogen. Darin enthalten ist 4 mM stabiles N-alanyl-L-Glutamin (Fa. Gibco BRL).

Supplemente:

9,1% (50 ml zu 500 ml) durch Erhitzen inaktiviertes fötales Kälberserum (Fa. Gibco/BRL)

90,1 U/ml Penicillin und 90,1 µg/ml Streptomycin (Fa. Sigma), sterilfiltriert.

## **Primärkultur muriner glialer Zellen**

### **Vorbereitungen**

Alle Arbeitsschritte werden unter aseptischen Bedingungen in einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Die in der Sterilbank verwendeten Materialien, einschließlich des Stereomikroskops (Stemi SV6, Fa. Zeiss), werden mit 70% Ethanol gereinigt. Alle verwendeten Lösungen werden sterilfiltriert, sofern sie nicht vom Hersteller steril geliefert werden. Größere Flüssigkeitsmengen ( $\geq 500$  ml) werden mit einem Glockenfilter (Media Kap-2, Porengröße  $0,2 \mu\text{m}$  Fa. Integra Bioscience) mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Fa. Millipore, Eschborn) sterilfiltriert. Kleinere Mengen ( $< 500$  ml) werden mit Spritzen und Einmal-Filterhaltern (Porengröße  $0,2 \mu\text{m}$ ; Fa. Schleicher und Schüll) filtriert. Das Präparationsbesteck (zwei Skalpelle, zwei Pinzetten mit gebogener Spitze, eine feine und eine grobe Schere) werden 3 Stunden bei  $180^\circ\text{C}$  gebacken. Die als Sieb verwendete Nylongaze mit einer Maschenweite von  $50 \mu\text{m}$  (Fa. Sefar AG, Schweiz) wird zur Sterilisation eine Stunde mit UV Licht (UV-Strahler: Fa. Heraeus) bestrahlt.

### **Poly-D-Lysin Beschichtung von Deckgläschen**

Mehrere Deckgläschen ( $\varnothing 10$  mm; Fa. Fischer) werden in Aluminiumfolie eingeschlagen und 3 h bei  $180^\circ\text{C}$  gebacken. Die sterilisierten Deckgläschen werden in einer sterilen Arbeitsbank mit Hilfe von gebogenen Pinzetten auf Parafilm gelegt und für 20 min mit jeweils ca.  $4 \mu\text{g}$  Poly-D-Lysin (PDL, Fa. Sigma) in  $100 \mu\text{l}$  MilliQ (Millipore, Eschborn) Wasser überschichtet. Überschüssiges PDL wird abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit MilliQ Wasser werden die getrockneten Deckgläschen in die Vertiefungen einer 24-well Platte gelegt und trocken gelagert. Alternativ dazu können die Deckgläschen direkt nach Absaugen des PDL einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und in die Vertiefungen einer 24-well Platte gelegt

werden. Die Vertiefungen können dann mit 1 ml Kulturmedium gefüllt und zum Ausplattieren von Zellen verwendet werden.

### **Anlegen der Kultur**

Vor dem Dekapitieren der Maus wird diese mit 70% Ethanol desinfiziert. Der Kopf wird abgetrennt und vom Hinterhauptloch ausgehend wird mit einer feinen Schere die Schädeldecke nach rostral aufgeschnitten. Das gesamte Gehirn wird mit Hilfe eines kleinen Spatels entnommen und in eine sterile Petrischale ( $\varnothing$  5 cm) mit HBSS (*Hank's buffered saline solution with  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$* ; Gibco, BRL) gelegt. Die Hirnhäute werden mit gebogenen Pinzetten unter dem Stereomikroskop entfernt. Das Gewebe wird mit gekreuzten Skalpellens mit bauchiger Klinge fein ( $< 1 \text{ mm}^3$ ) zerkleinert. Die Gewebestücke werden mit einer 5 ml Pipette aufgenommen und in ein 50 ml Röhrrchen überführt. Mit einem Clostridiopeptidase-Cocktail (100  $\mu\text{g/ml}$  Collagenase A, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, siehe unten) wird eine enzymatische Dissoziation für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad vorgenommen.

Es erfolgt eine Trituration der Zellsuspension. Bei dieser mechanischen Dissoziationsprozedur wird die Suspension mit einer Pipette etwa 15-20 mal aufgesaugt und wieder kräftig ausgestoßen. Dabei wird darauf geachtet, dass zusammen mit der Zellsuspension keine Luft eingesaugt wird, um eine Vermischung mit Sauerstoff zu verhindern. Diese Prozedur wird zunächst mit einer 5 ml Pipette, und dann nochmals mit einer 1 ml Pipette durchgeführt, da deren Spitzen kleinere Auslassöffnungen besitzen.

Die Zellsuspension wird nun durch das sterile Nylonnetz in ein weiteres 50 ml Röhrrchen pipettiert. Bei diesem Siebschritt sollen verbliebene Blutgefäße, Hirnhautreste und Zellaggregate zurückgehalten werden. Das erhaltene Filtrat wird dreimal zentrifugiert (jeweils 200  $g_{av}$ , 5 Minuten; Fa. Hermle ZK 380). Der Überstand wird abgesaugt und der Bodensatz wird in 10 ml Medium resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation werden die Zellen in 12-15 ml Kulturmedium aufgenommen. Je 1 ml der Suspension wird in eine

Vertiefung einer 24-well Platte pipettiert, in der sich ein mit Poly-D-Lysin beschichtetes Deckgläschen befindet.

Collagenase A: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
Best. Nr. 103578; Lot#: 85761526  
eingesetzte Aktivität pro ml Zellsuspension:  
Collagenase: 0,022 U  
Clostripain: 0,39 U  
Proteasen: 2,66 U  
Trypsin: 0,028 U

### **Zytospin**

Die Zytospin-Methode wird zur Analyse akut isolierter Zellen verwendet. Nach der Präparation des murinen Gehirns werden die gewonnenen Zellen in geeigneter Verdünnung (ca.  $2 \times 10^4$  -  $5 \times 10^4$  Zellen/ml und Schacht) mit Hilfe von Zytospin Zentrifugeneinsätzen (Fa. Hermle, Gosheim) auf Poly-Lysin (D oder L)-beschichtete Objektträger zentrifugiert. Bei Verwendung einer Zentrifuge mit 30 cm Durchmesser werden die Zellen zunächst für 5 min bei 1600 rpm und nach Dekantieren des Überstandes für 3 min bei 3200 rpm zentrifugiert. Anschließend folgt die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd, wie unten beschrieben.

### **Kultivierung und Passagierung von U373MG Astrocytomazellen**

U373MG Astrocytomazellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Falk Fahrenholz, Mainz) werden in 15-20 ml Kulturmedium auf 15 cm Zellkulturschalen (Fa. Iwaki) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchtigkeit gehalten (Steri-Cult 200 Incubator, Fa. Forma Scientific). Bei ca. 80%-iger Konfluenz erfolgt die Passagierung. Dazu werden die Zellen zweimal mit PBS (37°C) gewaschen, um das serumhaltige Medium zu entfernen, und 2 min mit 2 ml/Platte Trypsin/EDTA (Gibco, BRL) inkubiert.

Durch Klopfen werden die Zellen von der Platte gelöst. Nach der Zugabe von 4 ml Kulturmedium werden je 2 ml der Zellsuspension pro Platte auf neue oder die gebrauchten Platten verteilt.

## Immuncytologie

### Fixierung von Zellkulturpräparaten

Alle Präparate werden durch zehnmünütige Inkubation in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Zum Stoppen der Fixierung und zur Permeabilisierung der Zellen als Vorbereitung für die Antikörperbehandlung (siehe unten) wird einmal kurz mit PBS und anschließend für 10-15 min mit 0,01-0,05% Triton X-100/PBS gewaschen.

### Antikörperbehandlung

Das Blockieren unspezifischer Bindungen wird durch die 15-minütige Vorinkubation der Präparate mit 5% bovinem Serumalbumin (BSA) und die Anwesenheit von 1% BSA in den Antikörperlösungen gewährleistet. Alle Antikörperlösungen enthalten 0,01-0,05% Triton X-100 und 1% BSA. Die Primärantikörperinkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 20 bis 60 Minuten oder bei 4°C über Nacht. Nach dem Waschen mit PBS (dreimal kurz, einmal für 5 min) erfolgt die Sekundärantikörperinkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit PBS (wie oben) werden die Präparate in *anti fading*-Lösung eingebettet und mit Deckglaslack abgedichtet.

***anti fading*-Lösung** : 6 g Glycerol (Fa. Roth), 2,4 g Mowiol 4-88 (Fa. Hoechst) und 6 ml destilliertes Wasser werden vor Licht geschützt für 2 Stunden bei RT gerührt. Dann werden 12 ml 0,2 M Tris Puffer (2,42 g Tris/100ml Wasser, pH 8,5 mit HCl eingestellt) zugegeben und für 1-2

Stunden bei 50°C gerührt. Die Lösung wird portioniert und bei –20°C aufbewahrt. Vor der Verwendung werden 2,5% DABCO (1,4 Diazabicyclo-[2,2,2]-Octan, Fa. Fluka) zugegeben.

## **Immunhistologie**

### **Perfusionsfixierung und Gefriermikrotomschnitte**

Für immunhistologische Untersuchungen werden P<sub>GFAP</sub>EGFP-Mäuse verschiedenen Alters mit Chloroform betäubt und durch intracardiale Perfusion mit zunächst 0,5 mg/ml Heparin in 0,1 M Phosphatpuffer und anschließend 100 ml 2% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert (durchgeführt von Dr. Norbert Braun). Darauf folgend werden die Gehirne freipräpariert und für 2 Stunden bei 4°C immersionsfixiert (Fixativ wie oben) inkubiert. Paraformaldehyd wird durch anschließende Inkubation in 30% Saccharose in PBS über Nacht bei 4°C verdrängt. Von den Gehirnen werden Gefrierschnitte transversal im Bereich des Hippocampus in einer Dicke von ca 10-14 µm angefertigt und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgebracht (durchgeführt von Klaus Hammer).

### **Antikörperbehandlung**

Die Schnitte auf den Objektträgern werden mit Hilfe eines Fettstiftes umrandet. Zur Permeabilisierung werden die Präparate für 30 Minuten in 0,5% Triton X-100/PBS inkubiert. Unspezifische Antikörperbindungen werden mittels 5% BSA/PBS (20 Minuten) blockiert. Alle Antikörperlösungen enthalten 0,1% Triton X-100 und 1% BSA. Die Primärantikörperinkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 3 Stunden. Nach dem Waschen mit PBS (dreimal kurz, einmal für 5 min) erfolgt die Sekundärantikörperinkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit PBS (wie

oben) werden die Präparate in *anti fading*-Lösung (siehe oben) eingebettet und mit Deckglaslack abgedichtet.

## Mikroskopie

Zur optischen Auswertung der Präparate wird ein Zeiss Fotomikroskop III mit Epifluoreszenzeinrichtung (Filtersätze: Fluoreszein 487909; Cy3 487914) oder ein laserunterstütztes confocales Leica TCS4D Mikroskop verwendet.

## Bildbearbeitung

Zur Bildbearbeitung werden die Funktionen Tonwertkorrektur und Helligkeit/Kontrast in Adobe Photoshop 5 verwendet. Bildüberlagerungen bei Doppelfluoreszenz werden ebenfalls in Photoshop 5 erstellt. Hierzu werden Einzelbilder in indizierter Farbe je nach verwendetem Fluorochrom in grüne bzw. rote RGB-Kanäle umgewandelt und in die jeweiligen Kanäle eines RGB-Bildes eingefügt.

## Primärantikörper

### **Anti-SNAP-23** (Verd. 1:50)

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das synthetische Peptid DRIDIANARAKKLIDS des ubiquitären SNAP-25 homologen SNARE-Proteins SNAP-23 (**s**ynaptosomal-assoziertes **P**rotein von 23 kDa). Cat# 111202. Fa. Synaptic Systems.

### **Anti-SNAP-25** (Verd. 1:100)

Monoklonaler Antikörper gegen SNAP-25 (**s**ynaptosomal-assoziertes **P**rotein von 25 kDa) *clone* SMI 81. Isotyp Maus IgG1. Fa. Biotrend.

SNAP-25 interagiert mit den synaptischen Proteinen Syntaxin und VAMP2 und ist ein Bestandteil des Docking Komplexes synaptischer Vesikel. (Chapman et al., 1994; Südhof, 1995).

**Anti-Synaptophysin** (Verd. 1:100)

Monoklonaler Antikörper *mouse anti-synaptophysin clone 7.2*. Fa. Synaptic Systems. Synaptophysin wird mit der Biogenese (Thiele et al., 2000) und Endocytose (Daly et al., 2000) synaptischer Vesikel in Zusammenhang gebracht.

**Anti-SV2** (Verd. 1:100)

Monoklonaler Antikörper. *clone* CKK 10H4. Zur Verfügung gestellt von Dr. R. B. Kelly (San Francisco).

SV2 (synaptisches Vesikelprotein 2) ist Bestandteil synaptischer Vesikel und ein Marker neuroendokriner Zellen (Portela-Gomes et al., 2000). Aufgrund der Membrantopologie von SV2 wird eine Transporterfunktion angenommen (Feany et al., 1992). Diskutiert wird eine Funktion als Transporter für Vesikelinhaltsstoffe wie Calcium, Chlorid, ATP oder andere Nukleotide (Bajjalieh et al., 1994).

**Anti-MAP2** (Verd. 1:100)

Monoklonaler Antikörper *mouse anti-MAP2 IgG1 clone* HM-2 gegen das Mikrotubuli-assoziierte-Protein 2, das zur Markierung der Somata und dendritischer Ausläufer in Neuronen verwendet werden kann. Fa. Sigma.

**Anti-Cellubrevin** (Verd. 1:50)

Affinitätsaufgereinigtes polyklonales Antiserum aus Kaninchen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. McMahon (Cambridge; UK; McMahon et al., 1993).

**Anti-VAMP2** (Verd. 1:100)

Monoklonaler Antikörper *mouse-anti-VAMP2* spezifisch für VAMP2. Der Antikörper zeigt keine Kreuzreaktivität mit VAMP1 oder Cellubrevin. IgG1 Isotyp *clone* 69.1. Der Antikörper ist gegen das N-terminale Peptid von VAMP2 aus der Ratte gerichtet. Cat# 104201. Fa. Synaptic Systems.



**Anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)** (Verd. 1:100)

Monoklonaler Antikörper *mouse anti-GFAP clone G-A5* IgG1 Isotyp gegen das saure gliale Filamentprotein, das als Astrocyten-Marker dient. Fa. Sigma.

**Anti-Nestin** (Verd. 1:100)

Monoklonaler Antikörper *mouse anti-Nestin IgG1 clone 401* gegen das entwicklungsabhängig exprimierte Intermediärfilamentprotein Nestin. MAB353, Fa. Chemicon. Lot# 21010281.

**Anti-LAMP1** (Verd. 1:50)

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das lysosomal assoziierte Membranprotein 1. Fa.

**Anti-SCAMP** (Verd. 1:50)

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das synthetische Peptid SDFDSNPFADPDLN entsprechend den Aminosäuren 2-15 des integralen Membranproteins sekretorischer und Transport-Vesikel. Erkennt SCAMP1 (37 kDa). Cat# 121002, Lot# 121002/1. Fa. Synaptic Systems.

**Anti-vATPase** (Verd. 1:50)

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen die größte (116 kDa, synthetisches Peptid FSFEHIREGKFDE, 826-838) der über zehn Untereinheiten der vakuolären Protonenpumpe auf synaptischen Vesikeln und *coated vesicles*. Cat# 109002. Fa. Synaptic Systems.

## **Sekundärantikörper**

### **Anti-Kaninchen IgG Indocarbocyanin(Cy3<sup>TM</sup>)-Konjugat**

Das *goat anti-rabbit* Serum wurde in der Ziege entwickelt. Fa. Dianova.  
(Verd. 1:500)

### **Anti-Maus IgG Indocarbocyanin(Cy3<sup>TM</sup>)-Konjugat**

Das Antiserum wurde in der Ziege entwickelt. Fa. Sigma.  
(Verd. 1:500)

## **Secretogranin II-Freisetzungsexperimente mit U373MG**

### **Astrocytoma-Zellen**

24 h vor dem Versuch werden ca. 125000 U373MG Astrocytoma-Zellen pro Vertiefung einer 24-well Platte in jeweils 1 ml Medium bei den wie oben (S. 19) beschriebenen Bedingungen kultiviert. Zu Versuchsbeginn werden die Zellen mit geringst möglicher mechanischer Agitation aus dem Inkubator entnommen. Die Stimulation erfolgt durch Zugabe von je 10 µl Stimulans-Lösung. Die eingesetzten Endkonzentrationen betragen 5 µM Calcimycin (A23187), 1 µM Bradykinin bzw. 10 µM ATP. Zur Kontrolle werden 10 µl Lösungsmittel (Ringer-Lösung) ohne Stimulans zugegeben. Nach ein- bzw. zehnminütiger Inkubation wird ein Milliliter des Kulturüberstandes entnommen und zur Westernblotanalyse aufbereitet.

## **Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Bei dieser Methode (Laemmli, 1970) wandern die Proteine durch ein stark vernetztes Polyacrylamid-Gel, welches kurz vor dem Gebrauch durch Polymerisation von Monomeren hergestellt wird. Die Proteine befinden sich in einem Probenpuffer, welcher das negativ geladene Detergens Natriumdodecylsulfat enthält. Dieses Detergens bindet an hydrophobe Regionen der Proteinmoleküle, wodurch diese sich zu einer gestreckten Polypeptidkette entfalten. Weiterhin wird eine reduzierende Substanz (Dithiothreitol) zu den Proben gegeben, die alle Disulfidbrücken im Protein spaltet. Um die reduzierten Gruppen zu alkylieren und somit eine erneute Brückenbildung zu verhindern, wird Jodoacetamid bei der Probenaufbereitung eingesetzt.

Die in SDS gelösten Proteine besitzen durch die gebundenen Detergensmoleküle eine negative Ladung. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt nach der Ladung des SDS-Protein-Komplexes, die proportional zur Masse des Proteins ist. Die Maschen des aus Monomeren aufgebauten Polyacrylamidgels wirken wie ein Sieb, so dass größere Proteine langsamer zur Anode wandern als kleine Proteine. Man erhält auf diese Weise eine Reihe von Proteinbanden, die gemäß ihrer molekularen Masse angeordnet sind.

### **Puffer und Lösungen**

#### **Krebs-Ringer-Puffer**

130 mM NaCl; 4,75 mM KCl; 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,2 mM  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ ; 11 mM Glucose; 25 mM HEPES, pH 7,4

#### **Tris gepufferte Salzlösung (TBS)**

150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH, 8,0

### **Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)**

10 mM Phosphat-Puffer, 150 mM NaCl, 2,5 mM KCl; pH 7,4 mit NaOH eingestellt.

### **Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)**

5 mg DAB in 100 ml PBS und 100 µl Hydrogenperoxid.

### **Probenaufbereitung**

#### **Verwendete Lösungen**

Einfacher SDS-haltiger Probenpuffer (SPP)

1% w/v Glycerin; 2% w/v SDS; 0,0012% w/v Bromphenolblau; 15,4 mg

Dithiothreitol (DTT) /ml SP in 80 mM Tris/HCl pH 6,8

10% TCA (Trichloressigsäure)

Aceton/HCl Mischung (200:1; -20°C)

185 mg JAA (Jodoacetamid) /ml Probenpuffer)

### **Trichloracetatfällung**

Die Proteine werden bei dieser Methode in den Proben denaturiert und aufkonzentriert. Zu 1 ml Probe (gegebenenfalls wird mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt) werden 10 µl Desoxycholat (DOC 0,15%) gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präzipitation erfolgt über Nacht bei 4°C mit 10% TCA. Danach werden die Proben mit 12500 g<sub>av</sub> für 45 Minuten (Tischkühlzentrifuge; Fa. Sigma) zentrifugiert. Der Bodensatz wird mit 1 ml Aceton/HCl Mischung (200 : 1; -20°C) gewaschen, nochmals mit 12500 g<sub>av</sub> für 45 Minuten zentrifugiert und in SP Puffer aufgenommen. Bei großem Probenvolumen wird 5-fach konzentrierter SP Puffer zugegeben, um die Proteinmenge in den Proben nicht zu stark zu verdünnen. Die Proben

werden mit Ultraschall homogenisiert (Sonifyer 250, Fa. Branson, USA) und für 10 Minuten bei 100°C gekocht. Nach dem Abkühlen wird  $\frac{1}{4}$  des Probenvolumens JAA (Jodoacetamid) in SP Puffer (185 mg JAA /ml Probenpuffer) zugegeben.

### **Polyacrylamidgele**

#### **Elektrophoresepuffer**

0,1 M Glycin; 0,1 M Tris/HCl pH 8,9; 0,1% SDS

#### **Polyacrylamidgele und Elektrophorese**

Es werden Mini-Polyacrylamid-Flachbettgele (8,5 cm x 8 cm) verwendet. Die Gele bestehen aus einem Sammelgel (Acrylamidkonzentration: 5%) und aus einem Trenngel (Acrylamidkonzentration: 10, 15 oder 20%).

#### **Sammelgel (5% Acrylamid)**

|                        |            |
|------------------------|------------|
| 30% Acrylamid          | 1,67 ml    |
| 1% Bisacrylamid        | 1,3 ml     |
| 0,25 M Tris/HCl pH 6,8 | 5 ml       |
| Aqua demin.            | 1,95 ml    |
| Entgasen der Lösungen  |            |
| 10% APS                | 50 $\mu$ l |
| TEMED                  | 10 $\mu$ l |
|                        |            |

**Trenngele (10%, 15% oder 20% Acrylamid)**

|                              | <b>10%</b> | <b>15%</b> | <b>20%</b> |
|------------------------------|------------|------------|------------|
| <b>30% Acrylamid</b>         | 10 ml      | 15 ml      | 20 ml      |
| <b>1% Bisacrylamid</b>       | 3,9 ml     | 2,6 ml     | 2 ml       |
| <b>1 M Tris/HCl pH 6,8</b>   | 11,2 ml    | 11,2 ml    | 7,8 ml     |
| <b>Aqua demin.</b>           | 4,3 ml     | 1 ml       | -          |
| <b>Entgasen der Lösungen</b> |            |            |            |
| <b>20% SDS</b>               | 150 µl     | 150 µl     | 150 µl     |
| <b>TEMED</b>                 | 30 µl      | 30 µl      | 30 µl      |
| <b>10% APS</b>               | 150 µl     | 150 µl     | 150 µl     |

Die Gele werden durch Polymerisation von Monomeren (Acrylamid) und aus einem Quervernetzer (N,N'-Methylenbisacrylamid) hergestellt. Die Reaktion wird von Ammoniumpersulfat (APS) katalysiert und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) dient dabei als Starter. Man pipettiert die fertige Trenngellösung zügig zwischen zwei mit Klammern zusammengehaltene und seitlich abgedichtete Glasplatten. Die Lösung wird mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wird das Isopropanol dekantiert und das noch flüssige Sammelgel als oberste Schicht aufgetragen. Die Probestaschen (10 oder 20 Vertiefungen) werden durch das Einschieben eines Kunststoffkamms in das noch flüssige Sammelgel ausgespart.

Nach dem Einspannen der Flachbettgele in Minigelkammern (Fa. Biometra, Göttingen) werden die beiden Pufferreservoirs mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Das Gel leitet den Strom von der oberen in die untere Kammer. Mit Hilfe einer Hamilton-Mikroliterspritze erfolgt das Beladen der Probestaschen. Es wird ein Gleichstrom (Spannungsquellen: Consort E443 bzw. 431, Fa. Bachofer; P21, Fa. Biometra, 2301 Macrodrive, LKB, Schweden) nach folgendem Protokoll angelegt:

| Stromstärke | Dauer  | Ablauf   |
|-------------|--------|--|
| 5 mA        | 5 min  | Die Proteine wandern an das untere Ende der Probentasche         |
| 15 mA       | 15 min | Die Proteine sammeln sich an der Sammelgel/Trenngel Grenzschicht |
| 25 mA       | 1 h    | Die Lauffront der Probe erreicht das Ende des Trenngels          |

Um das Molekulargewicht der Proteinbänder bestimmen zu können, werden zusätzlich zu den Proben Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Es handelt sich hierbei um Gemische aus Proteinen mit bekannten Molekularmassen:

*Rainbow coloured protein molecular weight markers* (Rainbow low). Ein Marker mit niedriger Molekulargewichtsspanne (2,35-46 kDa). Fa. Amersham Life Science.

*Prestained molecular weight standard mixture* (Standard Blau, 36-198 kDa). Fa. Sigma.

### **Proteinnachweis mittels Western-Blotting**

Die im Gel durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine können nach der Methode von Towbin et al. (1979) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Man hat dann die Möglichkeit ein spezifisches Protein durch eine Antikörperreaktion zu identifizieren. Diese Methode des Proteinnachweises wird auch Western-Blotting genannt.

## **Verwendete Lösungen**

### **Transferpuffer**

192 mM Glycin, 1 mM EDTA, 0,5% SDS (w/v), 20% Methanol, 25 mM Tris/HCl, pH 8,3

### **Puffer I:**

TBS (*Tris-buffered saline*: 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4) + 3% (w/v) Magermilchpulver (MMP)

### **Puffer II:**

TBS + 3% MMP + 0,05% Nonidet P 40 (NP40)

### **Puffer III:**

TBS + 0,1% Tween 20

## **Antikörperlösung**

Die Antikörper werden in TBS, mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin in geeigneten Konzentrationen angesetzt.

## **Versuchsdurchführung**

Die Nitrozellulosemembran (Cellulosenitrat BA85; 0,45 µm; Fa. Schleicher und Schüll) und die Filterpapiere (Fa. Whatman 3) werden mit Transferpuffer getränkt. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wird auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Auf beide Seiten werden jeweils drei Lagen des Filterpapiers aufgelegt. Dieser Stapel wird dann in eine Transferkammer (Biometra Semi-dry und Trans-Blot SD, Fa. Bio-Rad) gelegt. Nach dem



Anlegen einer Stromstärke von 150 mA/Gel für 45 Minuten wandern die Proteine in Richtung Anode aus dem Gel heraus. Sie werden von der Membran gebunden.

Nach dem Proteintransfer wird die Nitrozellulose für 60 Minuten mit dem Blockpuffer inkubiert. Hierbei werden unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt werden. Die Membran wird dann für zweimal 10 Minuten mit TBS gewaschen, um überschüssige Proteine zu entfernen.

Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C jeweils unter Schütteln. Ungebundene Antikörper werden in mehreren Waschschritten entfernt: 1x 10 Minuten Puffer I, 2x 10 Minuten Puffer II, 2x 5 Minuten Puffer I.

Mit dem Sekundärantikörper an dem das Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert ist, wird anschließend für eine Stunde inkubiert. Handelt es sich um einen monoklonalen Primärantikörper aus der Maus, wird als Zweitantikörper Anti-Maus-Peroxidase-Konjugat eingesetzt. Ist der Primärantikörper polyklonal aus dem Kaninchen, wird Anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat verwendet. Um unspezifisch gebundene Antikörper auszuwaschen, erfolgen wieder mehrere Waschschriffe (1 x 10 Minuten TBS; 2 x 10 Minuten Puffer III und 2 x 5 Minuten TBS).

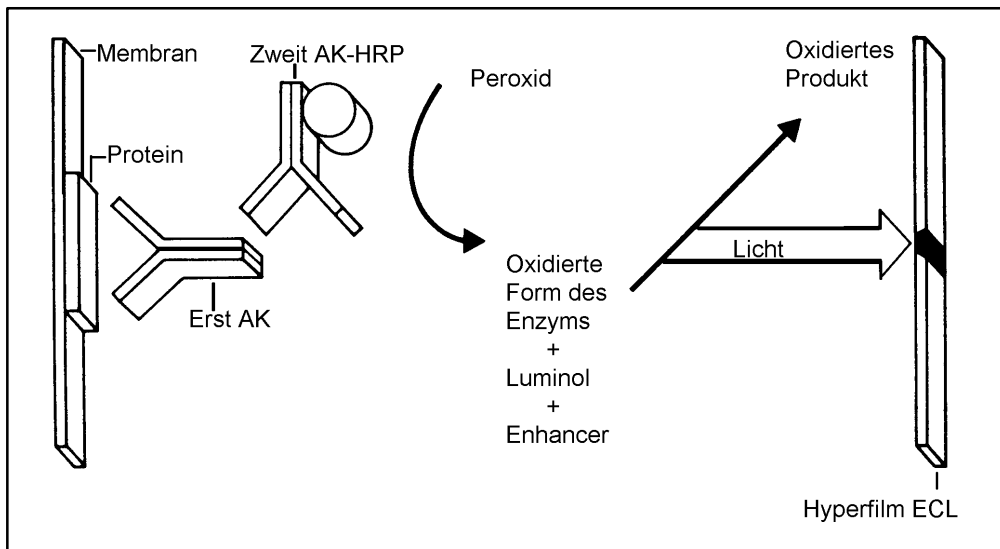
### **Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Detektionssystem**

Das ECL-System (Fa. Amersham) ist eine Licht emittierende nicht-radioaktive Methode, um immobilisierte Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern zu detektieren.

Der eingesetzte Zweitantikörper, der spezifisch an den Erstantikörper bindet, ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Das zugegebene Luminol wird durch HRP unter Mitwirkung von Wasserstoffperoxid oxidiert und geht dabei in einen energetisch angeregten Zustand über. Dabei wird Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm emittiert.

Wird ein Röntgenfilm (ECL-Hyperfilm Fa. Amersham) diesem Licht ausgesetzt, zeigt sich eine Schwärzung des Films an dieser Stelle.

## Immunodetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz



AK = Antikörper; HRP = Horseradish peroxidase;  
 Modifiziert nach „ECL Western blotting protocols“,  
 Amersham Life Science

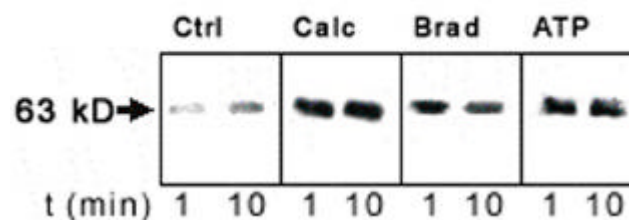
Auf die feuchte Nitrozellulose werden 3 ml ECL-Lösung (2) und 3 ml ECL-Lösung (1) gegeben (ECL-Reagenzienkit, Fa. Amersham). Nach einer Minute Inkubationszeit wird die Nitrozellulose in Cellophanfolie eingeschlagen und zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Autoradiographiekassette (Kodak x-omatic, Fa. Kodak) gelegt. Die Expositionsdauer reicht von wenigen Sekunden bis zu 30 Minuten und ist von der Signalstärke abhängig. Die Entwicklungszeit des Films beträgt 90 Sekunden in Kodak D19 Entwicklerlösung. Nach kurzem Wässern wird der Film fixiert (3 Minuten in Kodak-Unifix Fixierer).

Zur Dokumentation werden die Blots mit einem Flachbettscanner (Scan Jet 3c, Fa. Hewlett Packard) mit einer Auflösung von 600 dpi eingelesen.

## Ergebnisse

### U373MG Astrocytoma-Zellen setzen Secretogranin II frei

Um zu untersuchen, ob die humane maligne Astrocytomazelllinie U373MG Secretogranin II (Sg II), einen Bestandteil sekretorischer Granula, stimulusabhängig freisetzt, wurden nach der Applikation von Ringerlösung (Kontrolle), 5  $\mu$ M Calcimycin (A23187, Calcium-Ionophor), 1  $\mu$ M Bradykinin (Agonist von mGluRs) und 10  $\mu$ M ATP (P2-Rezeptor-Agonist) Westernblotanalysen des Überstandes unter Verwendung des Sg II-Antikörpers durchgeführt. Die Substanzen wurden in Krebs-Ringerlösung angesetzt und für eine bzw. zehn Minuten appliziert, bevor je ein Milliliter des Überstandes zur Westernblotanalyse aufbereitet wurde. Unter Kontrollbedingungen ist im Westernblot eine geringe Immunreaktion für Sg II zu erkennen. Nach der Zugabe von Calcimycin, Bradykinin und ATP ist diese deutlich erhöht. Der stärkste Effekt kann nach der Stimulation mit 5  $\mu$ M Calcimycin beobachtet werden. Die Stärke der Immunreaktion für SG II nach der Stimulation mit 10  $\mu$ M ATP liegt zwischen denen von Calcimycin und Bradykinin. Ein quantitativer Unterschied in der Antikörperreaktion nach einer bzw. zehn Minuten Stimulation ist nicht zu erkennen.



**Abb 1:** U373MG-Zellen wurden 1 bzw. 10 min mit Krebsringer (Kontrolle, Ctrl), 5  $\mu$ M Calcimycin (A23187, Calc), 1  $\mu$ M Bradykinin (Brad) oder 10  $\mu$ M ATP inkubiert. Die Überstände wurden gesammelt und mittels Westernblot analysiert.

## **Analyse der Proteinexpression in kultivierten Astrocyten der $P_{GFAP}$ EGFP-Maus**

Im Rahmen der Analyse der Proteinexpression in kultivierten Astrocyten der  $P_{GFAP}$ EGFP-Maus wurden in immunocytoologischen Untersuchungen Antikörper gegen die Proteine SNAP-23, Cellubrevin, MAP2, GFAP, Nestin und LAMP1 verwendet (hierzu Abbildungen 14 bis 20, Seiten 50-58 und Abb. 22, Seite 64).

Für alle erwähnten Antikörper konnten in den analysierten Kulturen Immunreaktionen in EGFP-positiven Zellen gefunden werden. Ein Teil der EGFP-positiven Zellen war MAP2-positiv. Einige EGFP-positive Zellen zeigten für GFAP keine Immunreaktion. MAP2- und GFAP-positive Zellen wiesen eine Markierung filamentöser Strukturen auf (Seite 53 Abb. 15 E für MAP2 und G für GFAP). Die Antikörper gegen Cellubrevin, SNAP-23, Nestin und LAMP1 markierten meist kleine punktuelle Strukturen in Soma und Fortsätzen. Die Immunreaktion des Nestin-Antikörpers war in keinem Fall filamentös (Abb. 15 bis 20, Seiten 53-58, A für SNAP-23, F für Cellubrevin, H für Nestin und J für LAMP1).

### **Kultivierte Astrocyten aus dem murinen ZNS exprimieren synaptische Proteine**

Um zu prüfen, ob neben kultivierten Astrocyten aus der Ratte auch kultivierte Astrocyten aus der  $P_{GFAP}$ EGFP-Maus synaptische Proteine exprimieren, wurden immunocytoologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen die synaptischen Proteine Synaptophysin, VAMP2, SV2 und SNAP-25 durchgeführt (hierzu Abbildungen 14 bis 20, Seiten 50-58 und Abb. 22, Seite 64).

Kultivierte Astrocyten der  $P_{GFAP}$ EGFP-Maus wiesen positive Immunreaktionen für Synaptophysin, VAMP2, SV2 und SNAP-25 auf. Während fast alle EGFP-exprimierenden Zellen SNAP-25- und VAMP2-

positiv waren, zeigte nur ein Teil der Zellen eine Immunreaktion für Synaptophysin und SV2. Die markierten Strukturen in den SNAP-25- und VAMP2-positiven Zellen waren meist fein punktuell im Soma und in den Zellausläufern verteilt. VAMP2 war zum Teil auf größeren organellären Strukturen zu finden (siehe Seiten 50/51 Abb. 14 H,Q,Y für VAMP2 und D für SNAP25). Die Synaptophysin- und SV2-positiven Zellen wiesen eine Markierung größerer punktueller Strukturen auf, deren Lokalisation sich hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, auf das Soma beschränkte (Seiten 50/51 Abb. 14 F, O, W für SV2 und Seite 56 Abb. 18 C für Synaptophysin).

### **Kulturdauerabhängigkeit der Proteinexpression**

Um die Frage zu beantworten, welchen Verlauf die Proteinexpression in primären Astrocyten aus der  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus mit fortschreitender Kultivierungsdauer nimmt, wurden Zellen isoliert und für 0 Stunden (Zytospin, unmittelbar postpräparative Fixierung, Präparation an P11 und P16), 12 Stunden (0,5 DIV, P11), einen Tag (1 DIV, P11) und acht Tage (8 DIV, P11) kultiviert und anschließend immunocytoologisch analysiert. Für die Untersuchungen wurden Antikörper gegen SNAP-23, SNAP-25, SV2, VAMP2, Cellubrevin und GFAP verwendet (bei Zytospin zusätzlich Synaptophysin und MAP2), wobei Cellubrevin nicht unten abgebildet wird (Zusammenfassung siehe Tabelle Abb. 22, Seite 64).

Besonderes Augenmerk wurde auf die Analyse akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter EGFP-positiver Zellen gelegt. Die Präparationen wurden mit Tieren der Altersstufe P 11 und P 16 durchgeführt, um etwaige entwicklungsbedingte Unterschiede detektieren zu können.

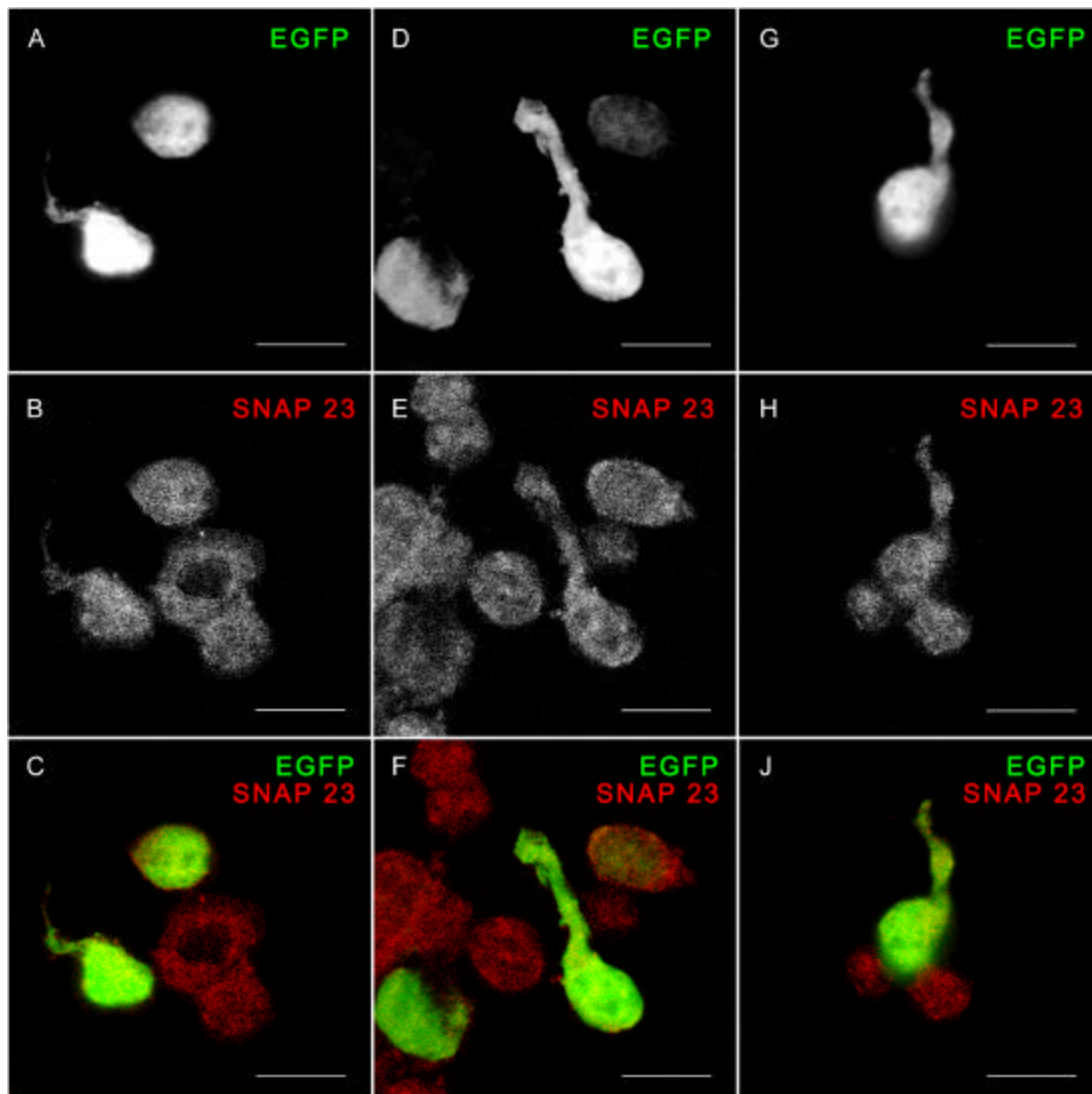
Akut isolierte Astrocyten der  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus wiesen Immunreaktionen für SNAP-23, SNAP-25, Synaptophysin, MAP2 und VAMP2 auf. Eine Immunreaktion für SV2 konnte nicht festgestellt werden. Auffällige Unterschiede zwischen den Präparaten von elf und sechzehn Tage alten Mäusen waren nicht zu sehen. Lediglich im Falle von SNAP-23 zeigten alle

GFP-positiven Zellen eine Immunreaktion. SNAP-25, VAMP2 und MAP2 waren in einem Großteil der Zellen zu finden, wohingegen Synaptophysin nur in sehr wenigen GFP-positiven Zellen detektierbar war (Abb. 2-13, Seiten 38-49).

Zwölf Stunden, einen Tag und acht Tage kultivierte Astrocyten der P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus wiesen im Gegensatz zu den unmittelbar nach der Präparation fixierten Zellen eine deutliche Immunreaktion für SV2 auf (Seiten 50/51 Abb. 14 F, O, W). Eine Veränderung der Immunreaktivität für SNAP-23, Cellubrevin und VAMP2 wurde nicht festgestellt (Seiten 50/51 Abb. 14 B, K, S für SNAP-23, H, Q, Y für VAMP2, Cellubrevin ist nicht abgebildet). Eine Veränderung der Immunreaktivität konnte für SNAP-25 festgestellt werden. Nach acht Tagen in Kultur konnte SNAP-25 nur noch sehr schwach bis nicht mehr detektiert werden (Seiten 50/51 Abb. 14 U, siehe Ausschnitt mit verstärktem Kontrast).

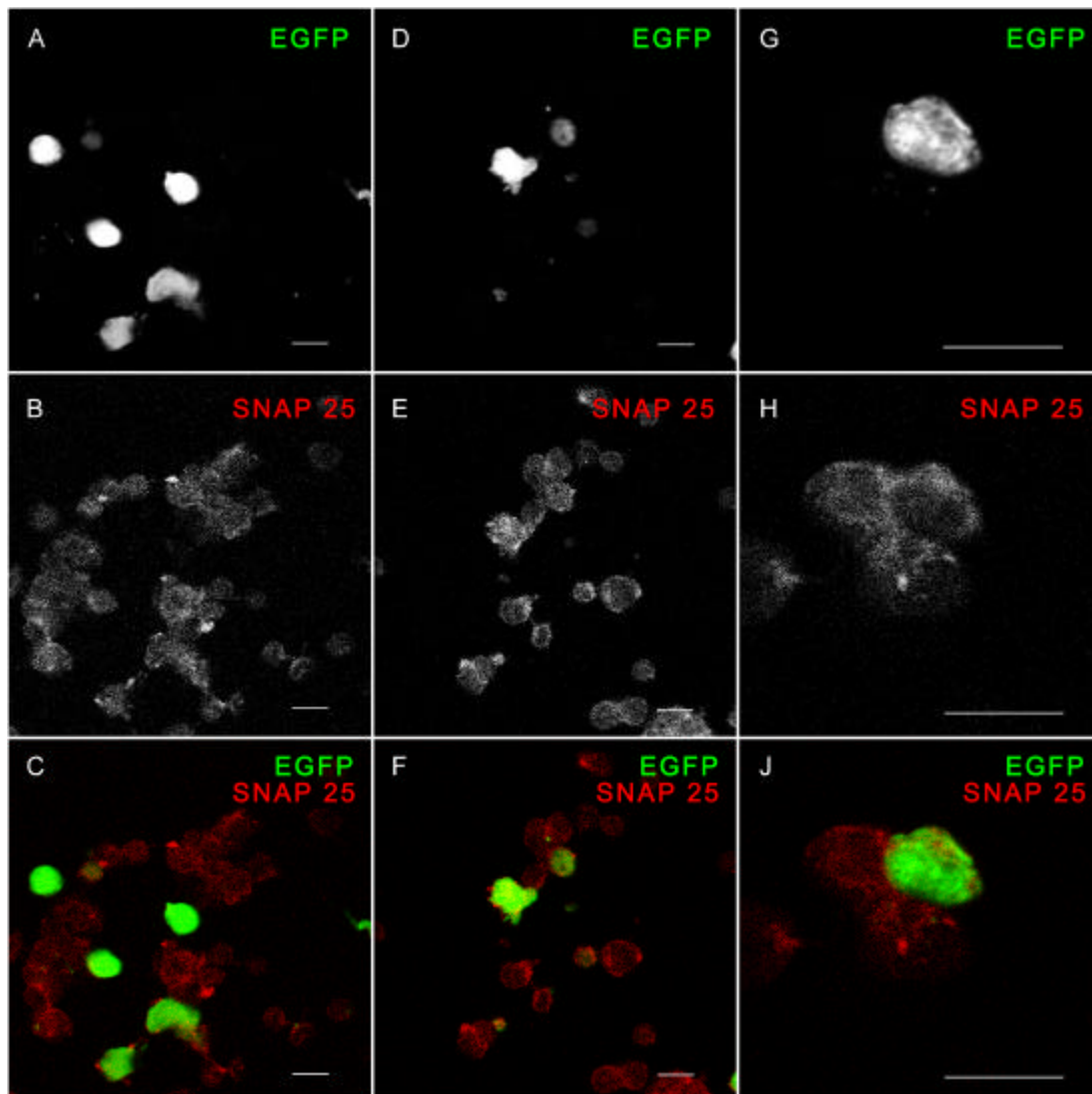
Abgesehen von anti-MAP2 markierten alle verwendeten Antikörper punktuelle Strukturen von heterogener Größe, wobei die Immunreaktionen für SNAP-23 und SNAP-25 vermehrt kleinere, die für SV2 und VAMP2 vermehrt größere punktuelle Strukturen sichtbar machten. In der Analyse der Zellen, die direkt nach der Präparation fixiert worden waren, konnte bezüglich der Antikörperreaktion gegen VAMP2 eine vorwiegende Markierung kleiner punktueller Strukturen gefunden werden (Abb. 7 Seite 43).

## Zytospin postnataler Tag 11: SNAP 23



**Abb. 2:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 11 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit polyklonalem SNAP-23-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für SNAP-23. Alle GFP-positiven Zellen zeigen SNAP-23-Immunreaktivität. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

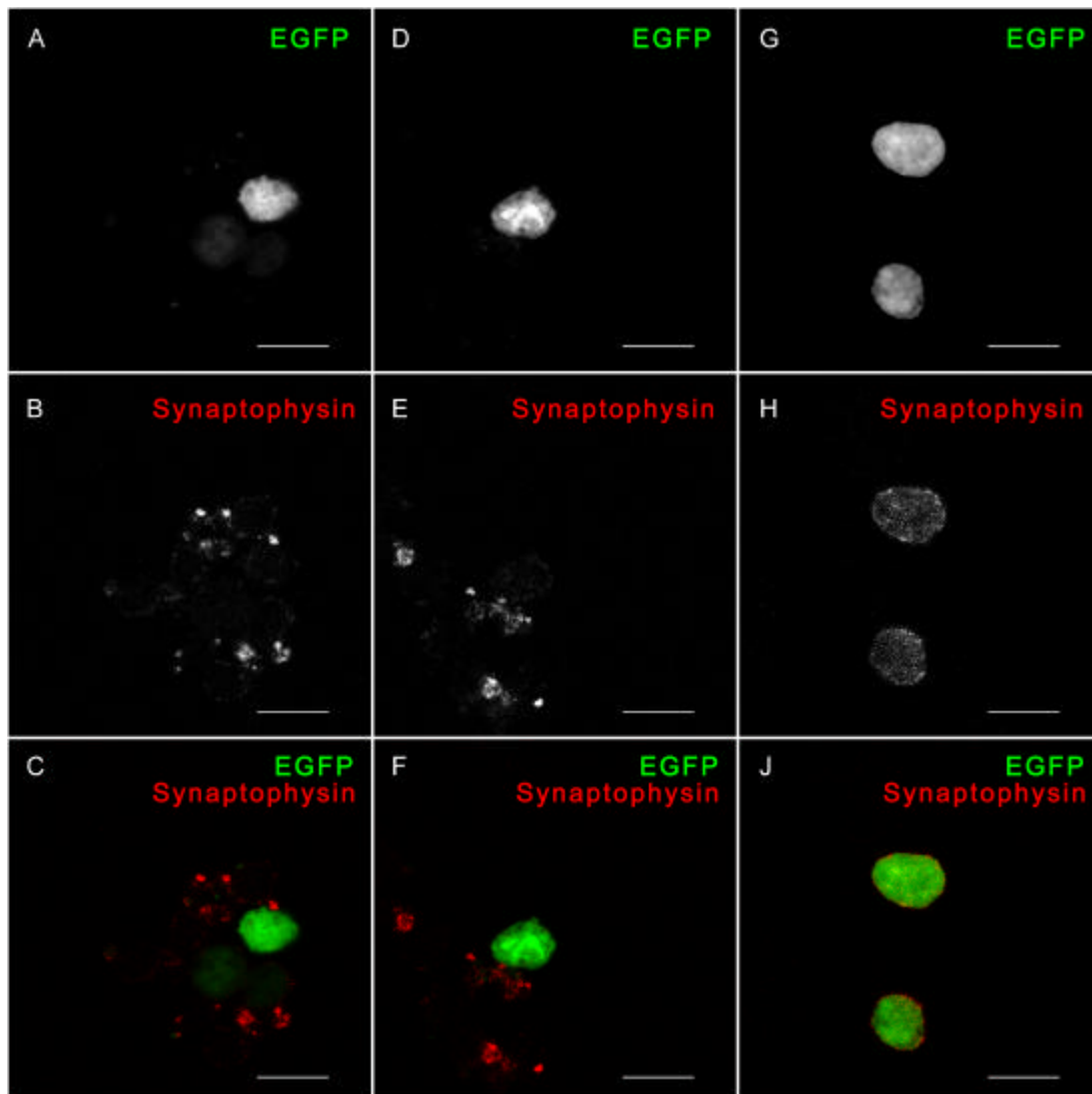
## Zytospin postnataler Tag 11: SNAP 25



**Abb. 3:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 11 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem SNAP-25-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für SNAP-25. Alle GFP-positiven Zellen zeigen SNAP-25-Immunreaktivität. Die Markierung ist teilweise schwach. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

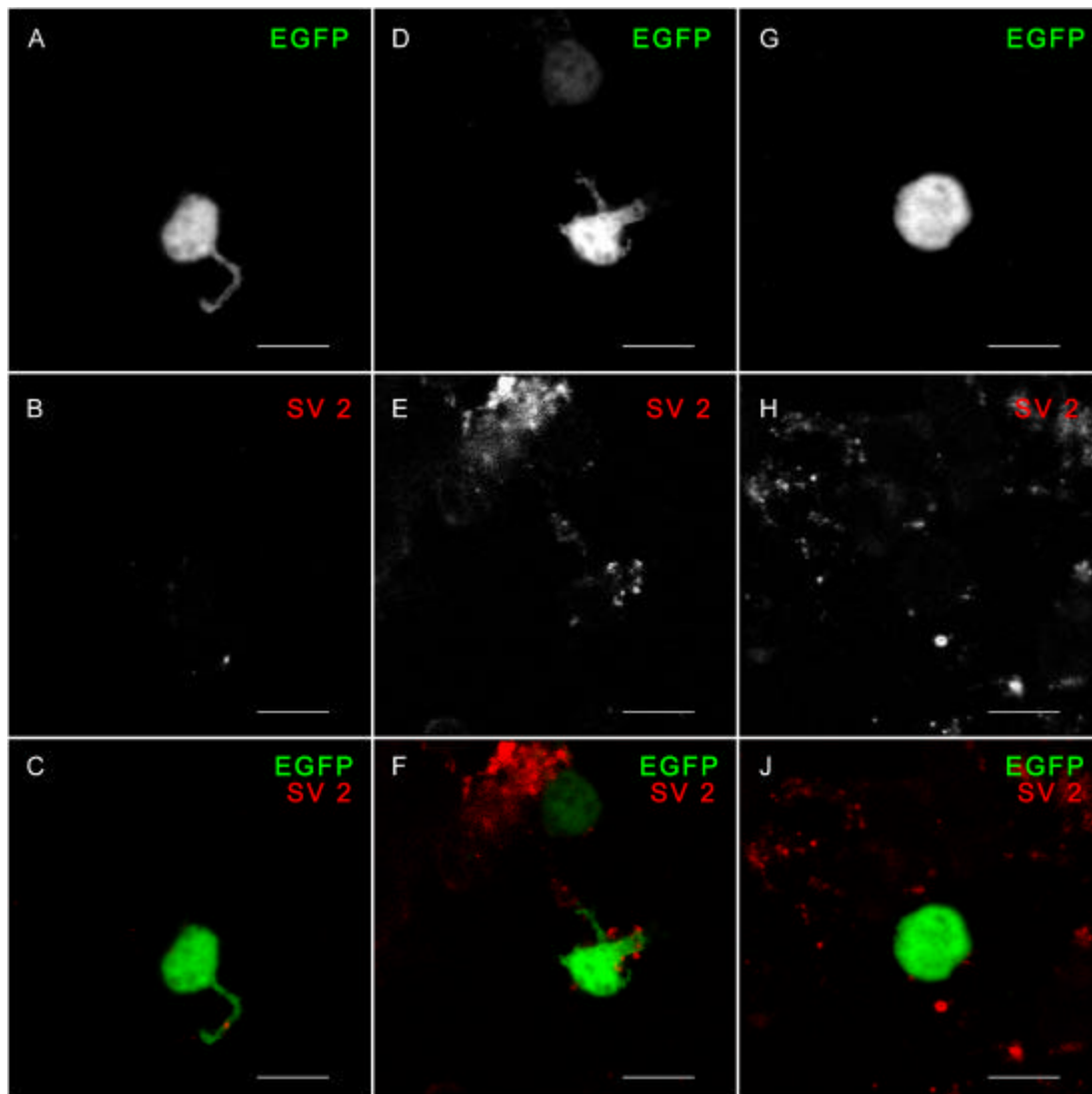


## Zytospin postnataler Tag 11: Synaptophysin



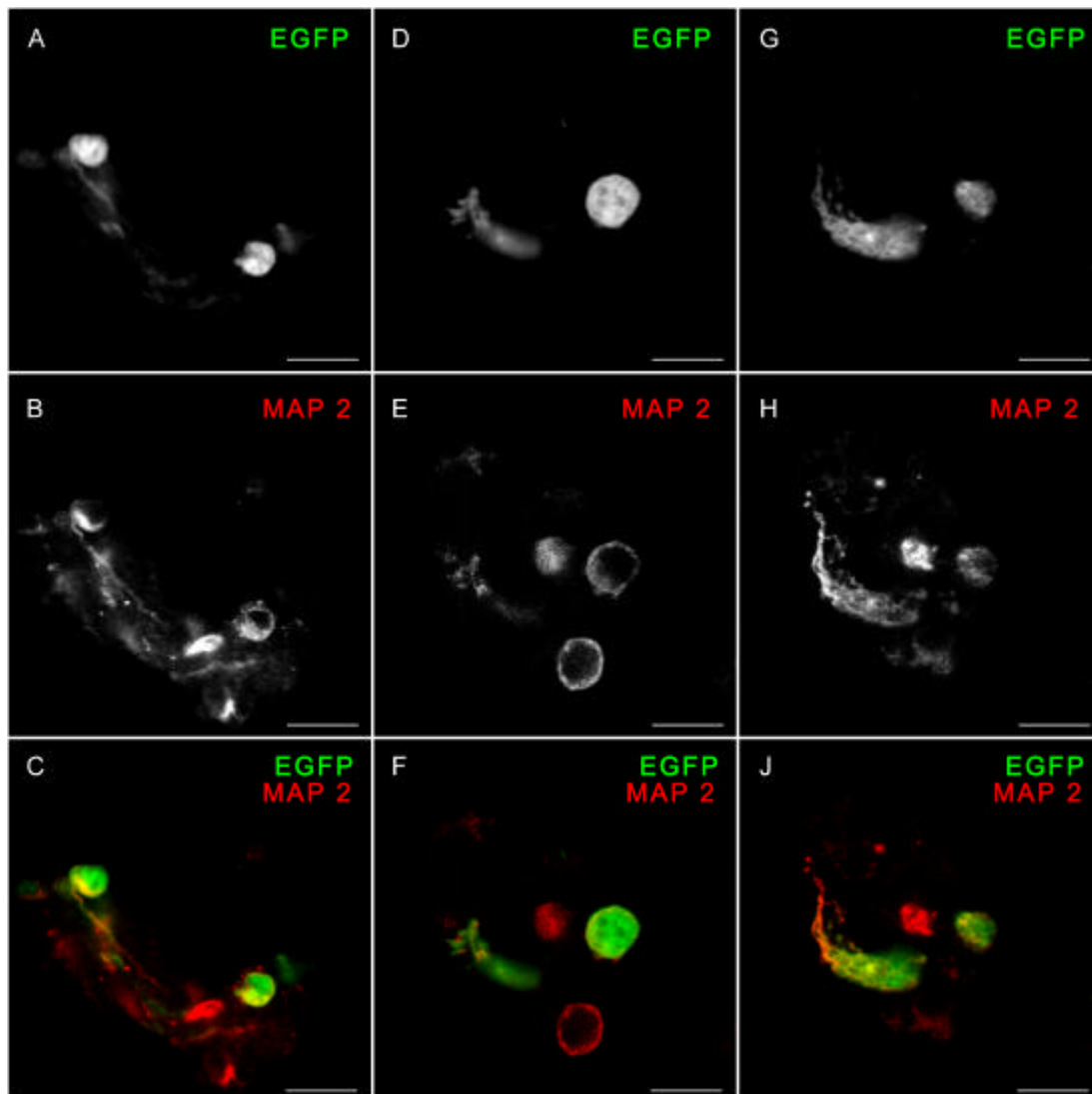
**Abb. 4:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 11 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem Synaptophysin-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für Synaptophysin. In seltenen Fällen zeigen GFP-positive Zellen Synaptophysin-Immunreaktivität. Die Markierung ist dann schwach. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

## Zytospin postnataler Tag 11: SV 2



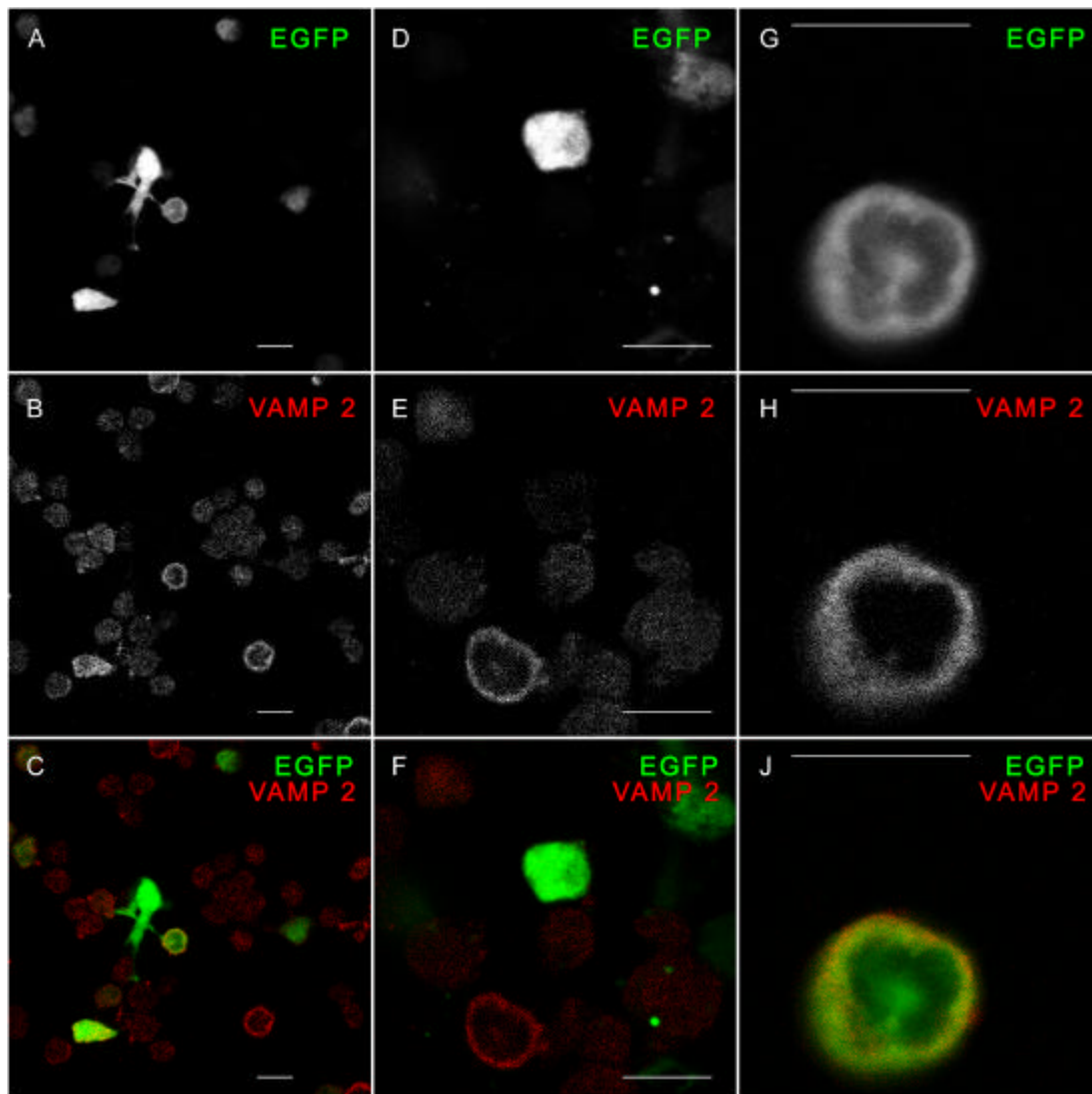
**Abb. 5:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 11 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem SV2-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für SV2. In seltenen Fällen zeigen GFP-positive Zellen SV2-Immunreaktivität in großen organellären Strukturen (siehe B). **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

## Zytospin postnataler Tag 11: MAP 2



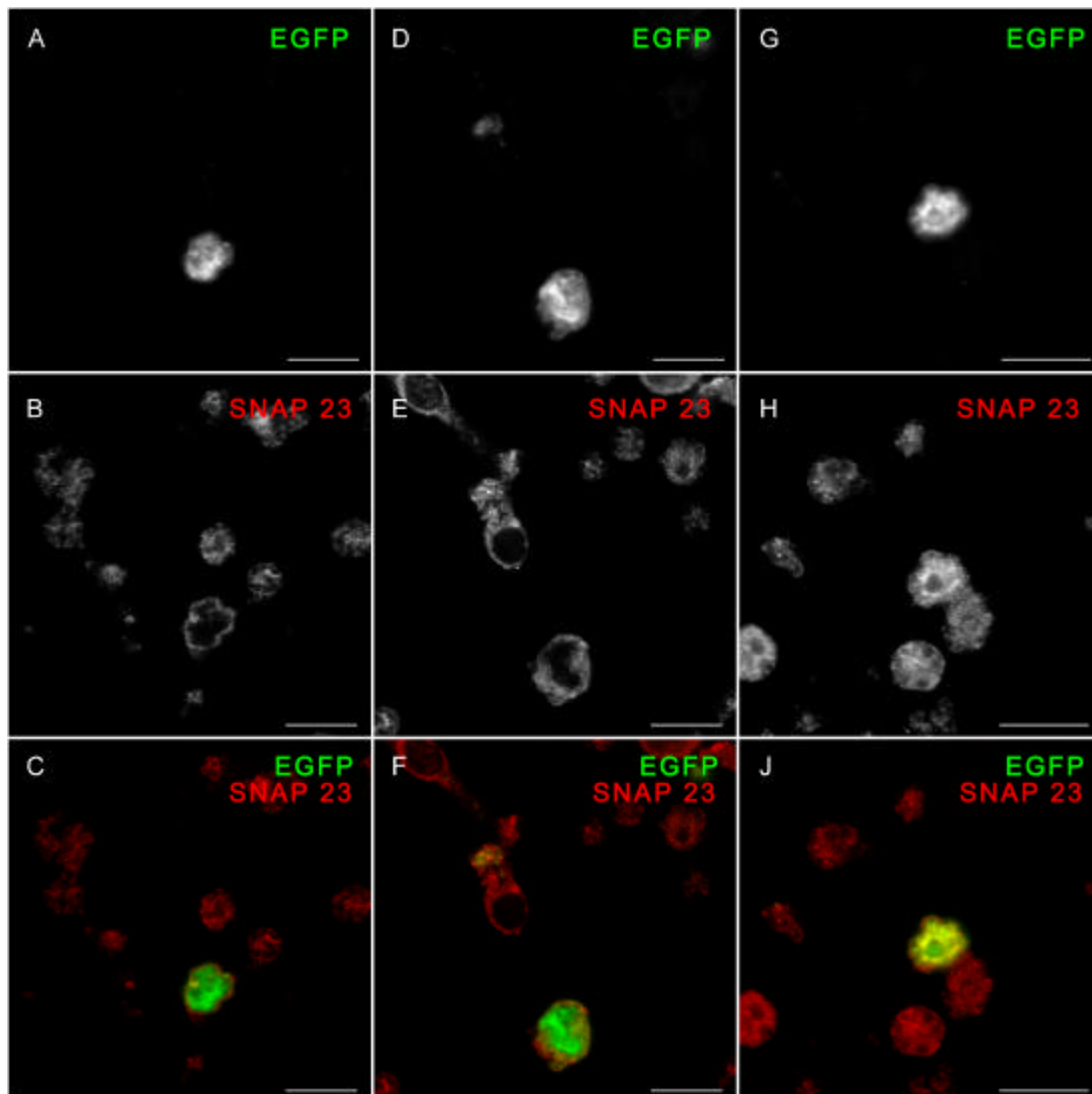
**Abb. 6:** Verschiedene Ebenen einer confocalen Laserscan-Aufnahme akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 11 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem MAP2-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für MAP2. Erkennbar sind perinukleäre Lokalisation und filamentöse Strukturen. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

## Zytospin postnataler Tag 11: VAMP 2



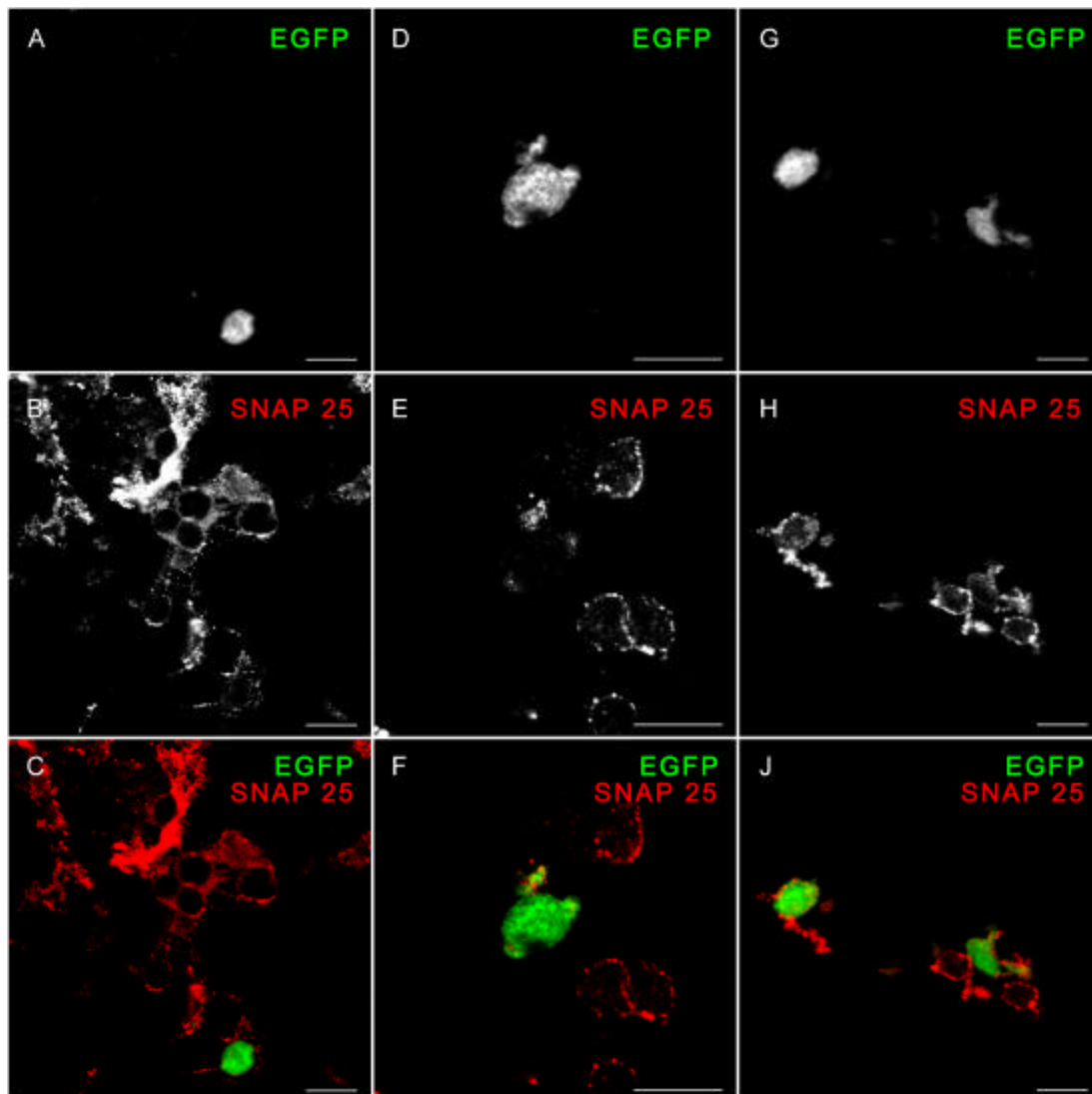
**Abb. 7:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 11 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem VAMP2-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für VAMP2. Die Zellen sind zum Teil schwach perinukleär punktuell markiert. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

## Zytospin postnataler Tag 16: SNAP 23



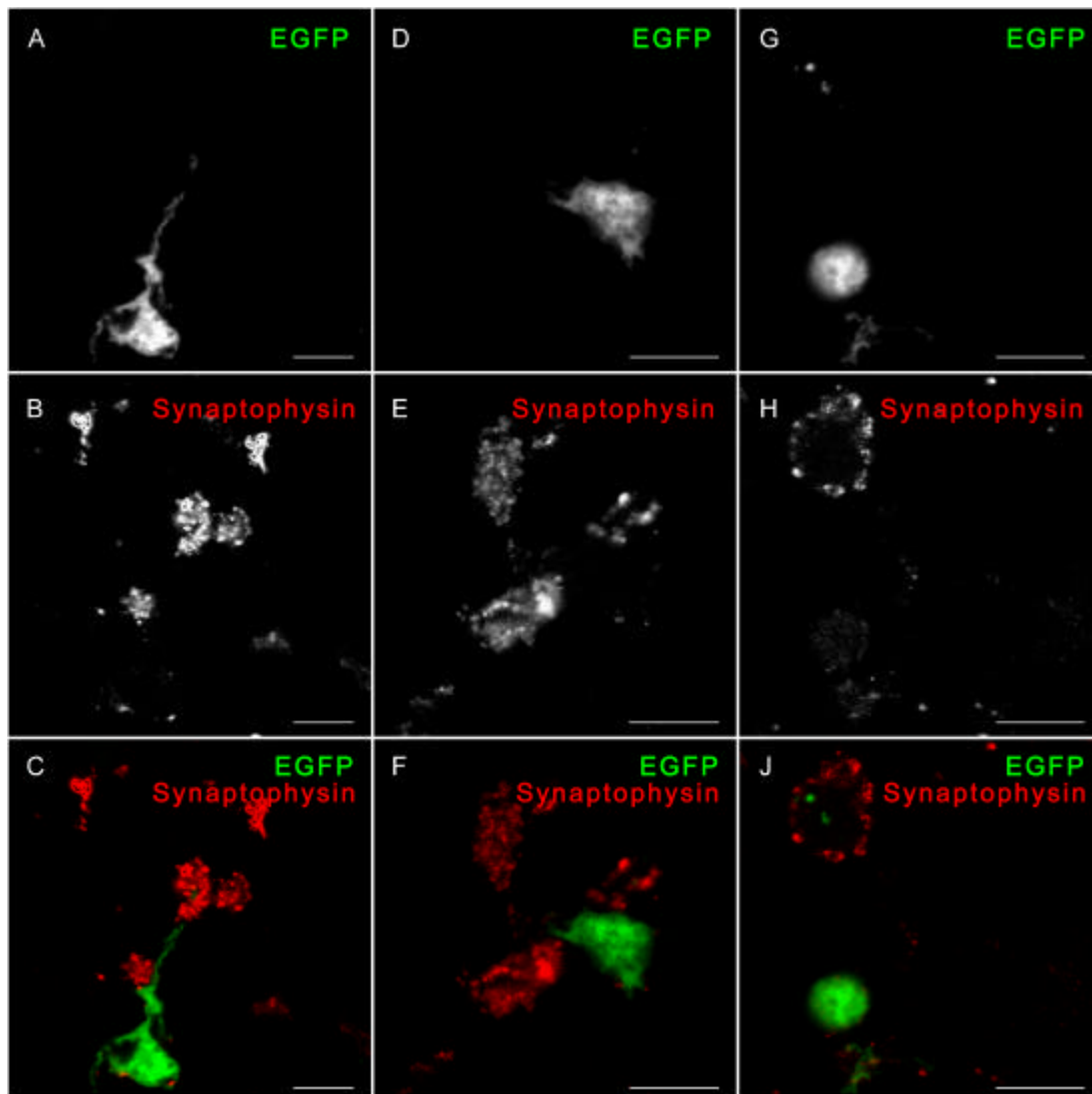
**Abb. 8:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 16 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit polyklonalem SNAP-23-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für SNAP-23. Alle GFP-positiven Zellen zeigen SNAP-23-Immunreaktivität. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

## Zytospin postnataler Tag 16: SNAP 25



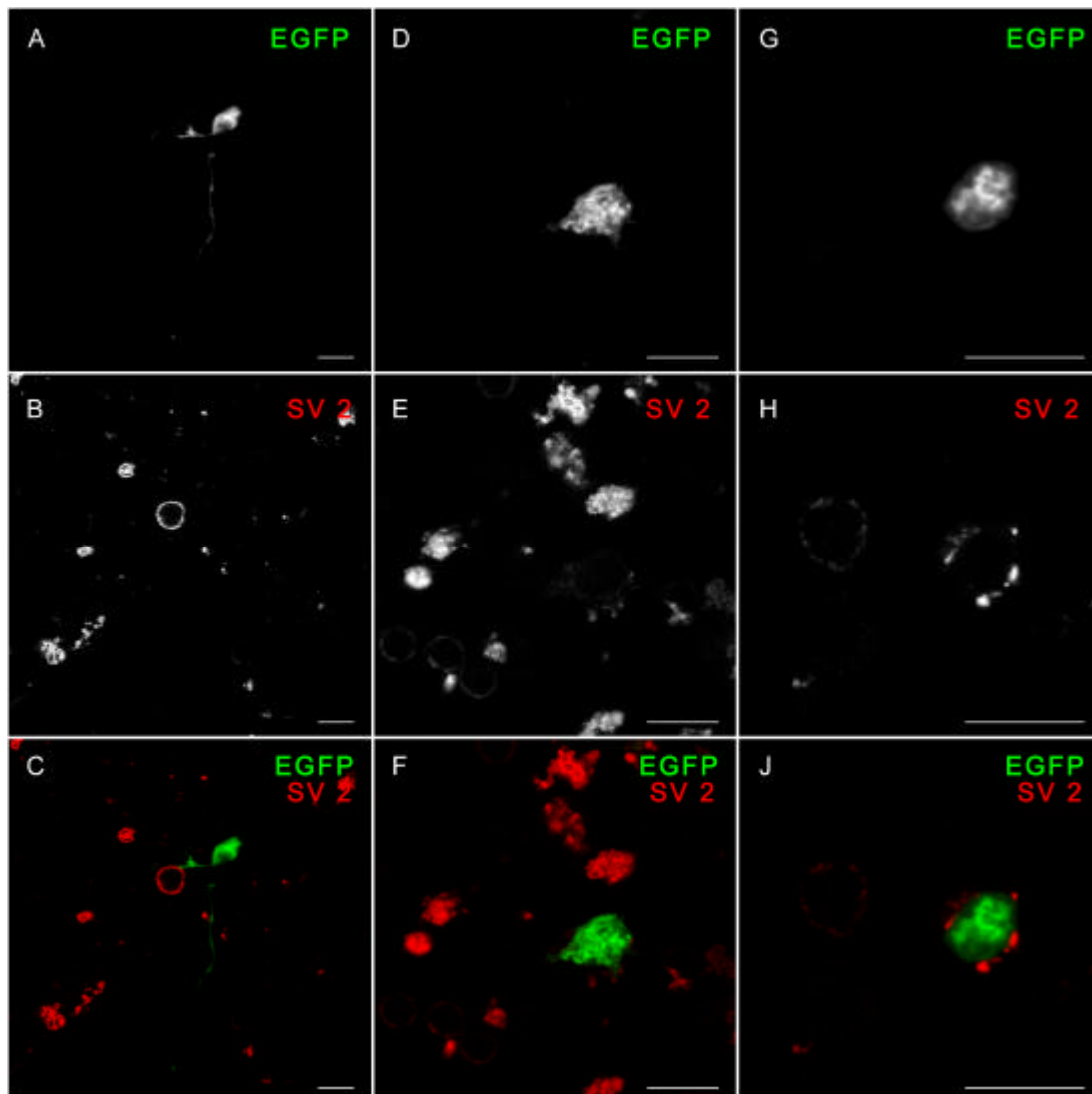
**Abb. 9:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 16 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem SNAP-25-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für SNAP-25. GFP-positive Zellen zeigen kaum erkennbare SNAP-25-Immunreaktivität. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

## Zytospin postnataler Tag 16: Synaptophysin



**Abb. 10:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 16 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem Synaptophysin-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für Synaptophysin. GFP-positive Zellen zeigen kaum erkennbare Synaptophysin-Immunreaktivität. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ .

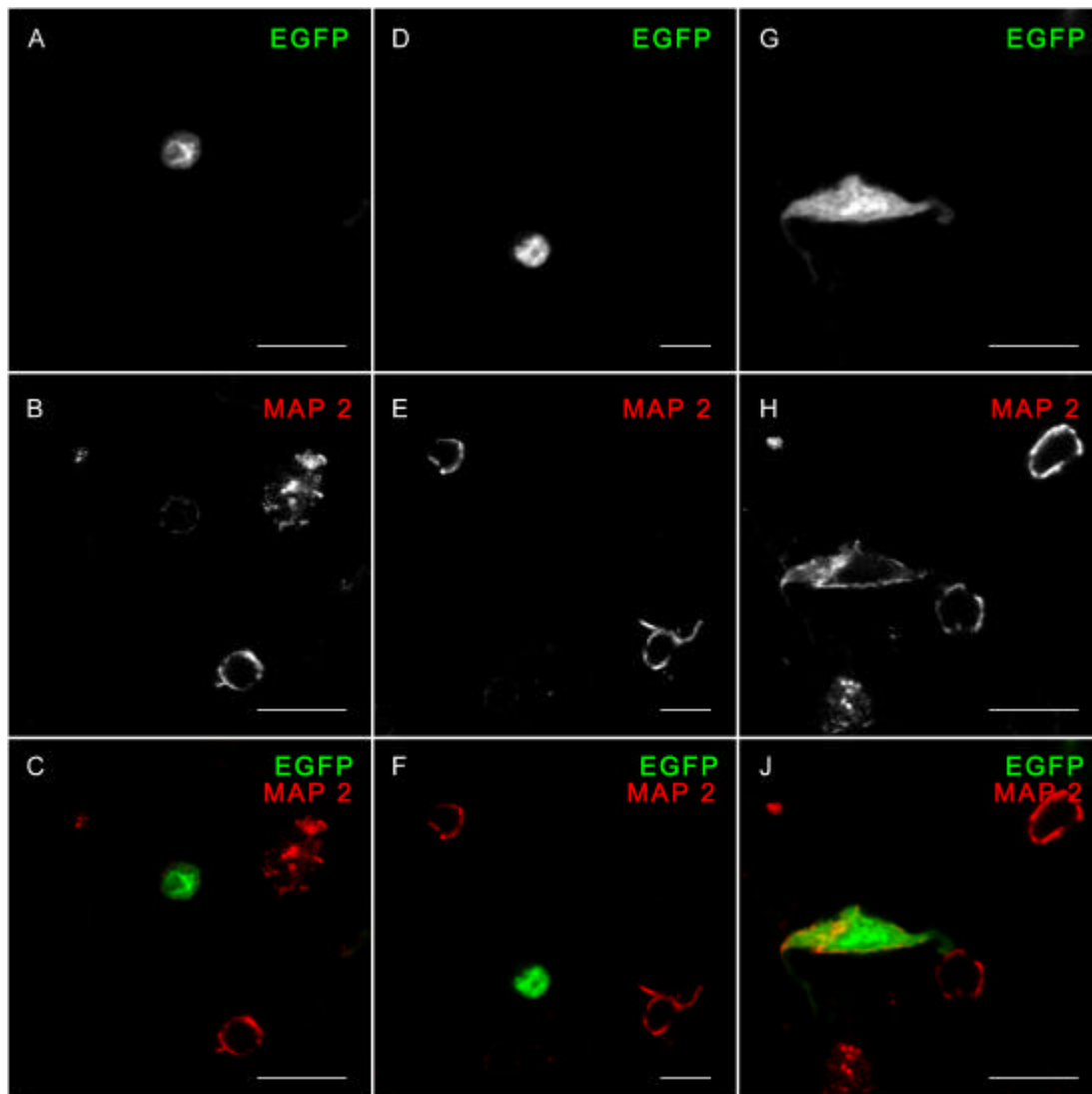
## Zytospin postnataler Tag 16: SV 2



**Abb. 11:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 16 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem SV2-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für SV2. GFP-positive Zellen sind nie eindeutig SV2-positiv. Die SV2-Immunoreaktivität liegt ausserhalb der GFP-positiven Zellen (Siehe J) **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu m$ .

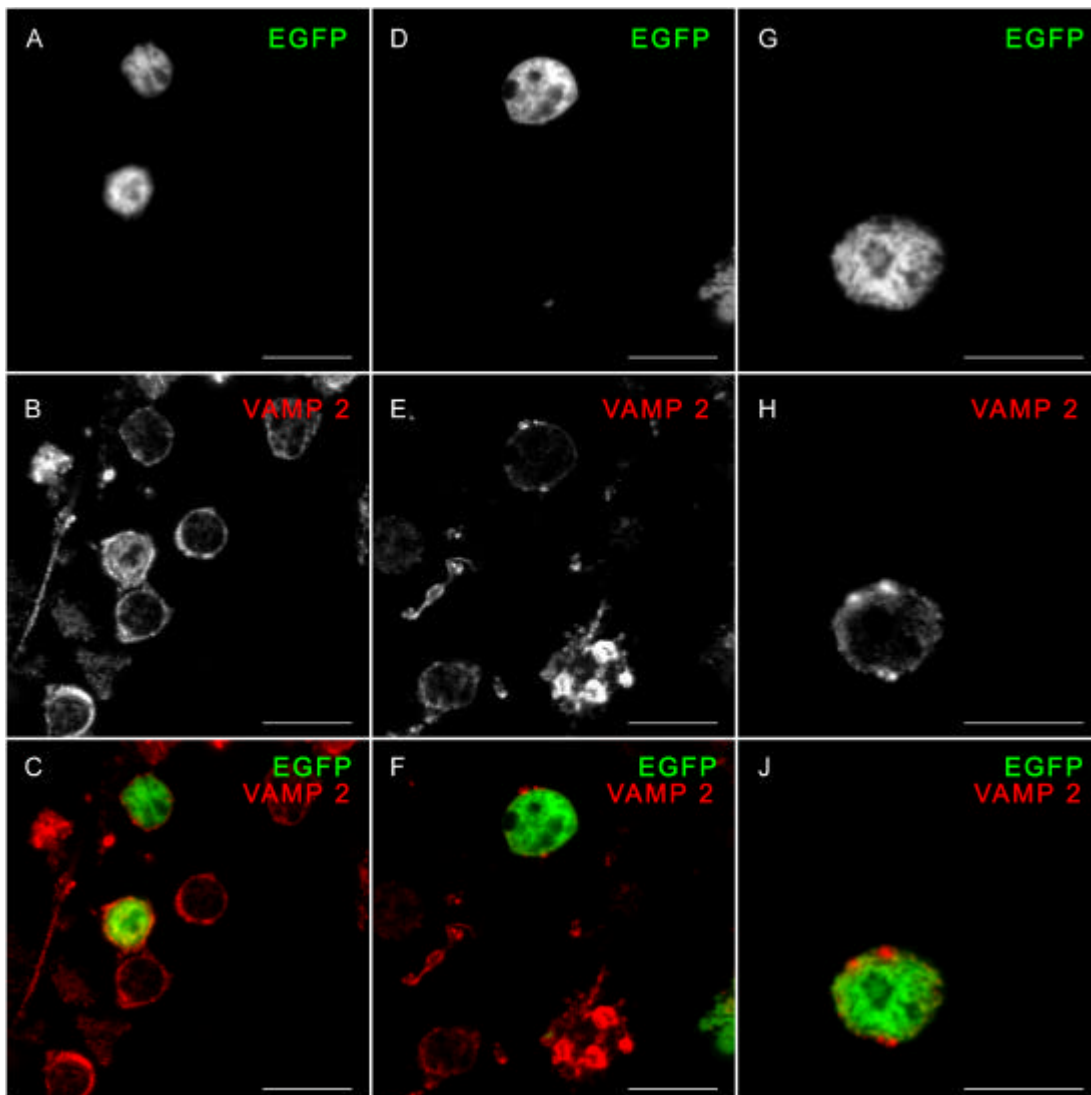


## Zytospin postnataler Tag 16: MAP 2



**Abb. 12:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 16 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem MAP2-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für MAP2. Erkennbar sind perinukleäre Lokalisation und filamentöse Strukturen in einem Teil der GFP-positiven Zellen. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

## Zytospin postnataler Tag 16: VAMP 2



**Abb. 13:** Confocale Laserscan-Aufnahmen akut isolierter und unmittelbar postpräparativ fixierter Zellen aus dem Gehirn einer 16 Tage alten  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. Immunreaktivität nach der Behandlung mit monoklonalem VAMP2-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. **A, D und G:** GFP-Fluoreszenz. **B, E und H:** indirekte Immunfluoreszenz für VAMP2. Die Zellen sind zum Teil schwach perinukleär punktuell markiert. Einige GFP-positive Zellen weisen eine Markierung großer organellärer Strukturen auf. **C, F und J:** Überlagerungen. Alle Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

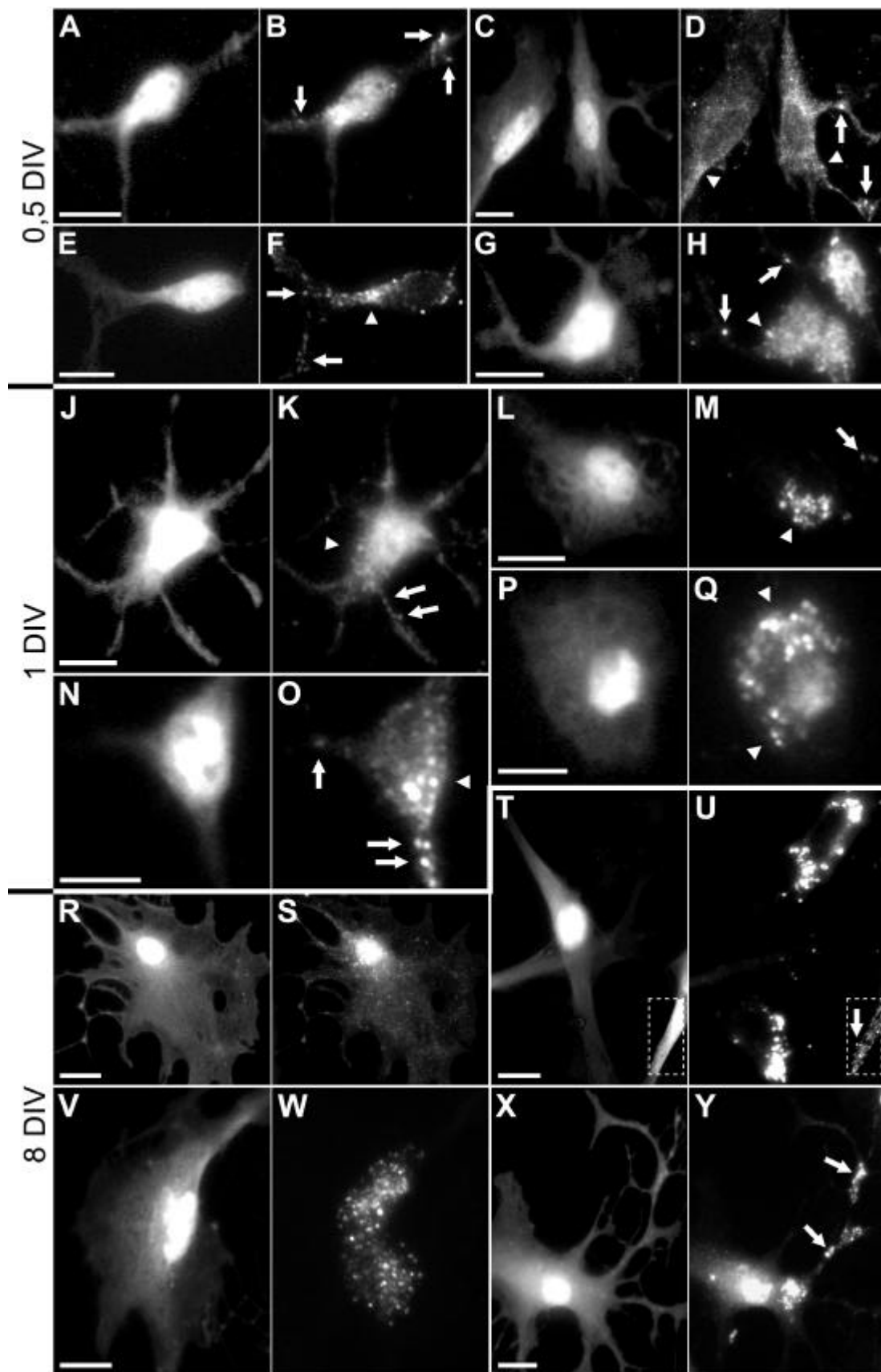
**Postnataler Tag 11: 0,5 DIV, 1 DIV, 8 DIV**

folgende Seite:

**Abb 14:** Synaptische Proteine in Astrocyten der P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus. Die Zellen wurden aus dem Gehirn elf Tage alter Tiere präpariert und nach 12 Stunden (0,5 DIV), einem Tag (1 DIV) und acht Tagen (8 DIV) fixiert und analysiert. Pfeile deuten auf organelläre Lokalisation in Ausläufern oder Zellperiferie. Pfeilköpfe deuten auf organelläre somatische Lokalisation.

**A-H:** 0,5 DIV. **J-Q:** 1 DIV. **R-Y:** 8 DIV. **A,C,E,G,J,L,N,P,R,T,V,X:** GFP. Die GFP-Fluoreszenz ist diffus über die Zellen verteilt und akkumuliert im Kern.

**B, K, S:** SNAP-23. Die Immunmarkierung für SNAP-23 findet sich in allen Zellen sowohl somatisch, als auch in der Periferie und in Zellausläufern. Sie zeigt vesikuläre und große granuläre Strukturen. **D, M, U:** SNAP-25. Bei 0,5 DIV (**D**) entspricht die Lokalisation der SNAP-25 Immunreaktivität der Verteilung von SNAP-23. Bei 1 DIV (**M**) tritt gehäuft somatische Lokalisation oder die Markierung großer granulärer Strukturen auf. Nach 8 DIV (**U**) liegt die SNAP-25 Immunreaktivität in GFP-positiven Zellen an der Nachweisgrenze (gestrichelter Kasten in **T** und **U**: selektiv erhöhter Kontrast).. **F, O, W:** SV2. Nach 0,5 und 1 DIV ist die SV2-Immunreaktivität in GFP-positiven Zellen im Soma und in Ausläufern zu finden (**F, O**). Nach 8 DIV beschränkt sich diese hauptsächlich auf große granuläre Strukturen im Soma (**W**). **H, Q, Y:** VAMP2. Zu allen analysierten Kulturzeitpunkten kann die VAMP2- Immunreaktivität im Soma und in Ausläufern GFP-positiver Zellen detektiert werden; deutlich markiert sind große granuläre aber auch kleinere, vesikuläre Strukturen.

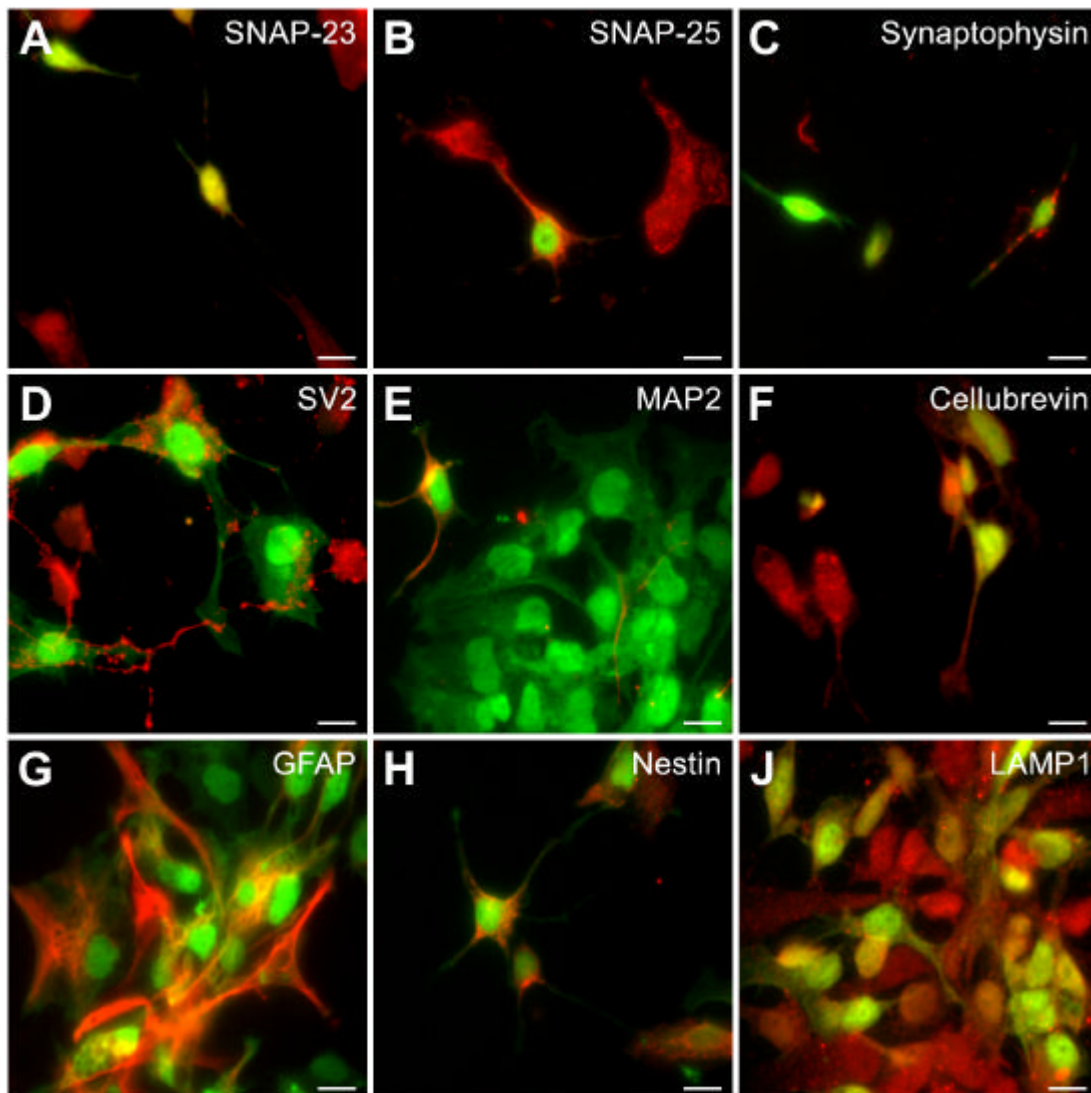


## Altersabhängigkeit der Proteinexpression: P1-P16, 2 DIV

Vorangegangene Experimente hatten die Expression synaptischer Proteine in kultivierten Astrocyten aus Neopallia neonataler Ratten gezeigt (Maienschein et al., 1999). Dabei blieb die Frage offen, ob die beobachtete Expression möglicherweise eine exklusive Eigenschaft von Vorläuferzellen ist, die im neonatalen ZNS, im Gegensatz zu differenzierten Astrocyten, zahlreich vorhanden sind. Um dies zu untersuchen, wurden für SNAP-25, Synaptophysin, SV2, MAP2, SNAP-23, Cellubrevin, GFAP, Nestin und LAMP1 nach zwei Tagen in Kultur immuncytologische Analysen an Primärkulturen von Astrocyten der P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus, die aus den Gehirnen unterschiedlich alter Tiere gewonnen worden waren, durchgeführt (hierzu: **P1**: Abb. 15, S. 53; **P2**: Abb. 16 S. 54; **P3**: Abb. 17 S. 55; **P7**: Abb. 18 S. 56; **P11**: Abb. 19 S. 57; **P16**: Abb. 20 S. 58 und Tabelle: Abb 22 S. 64).

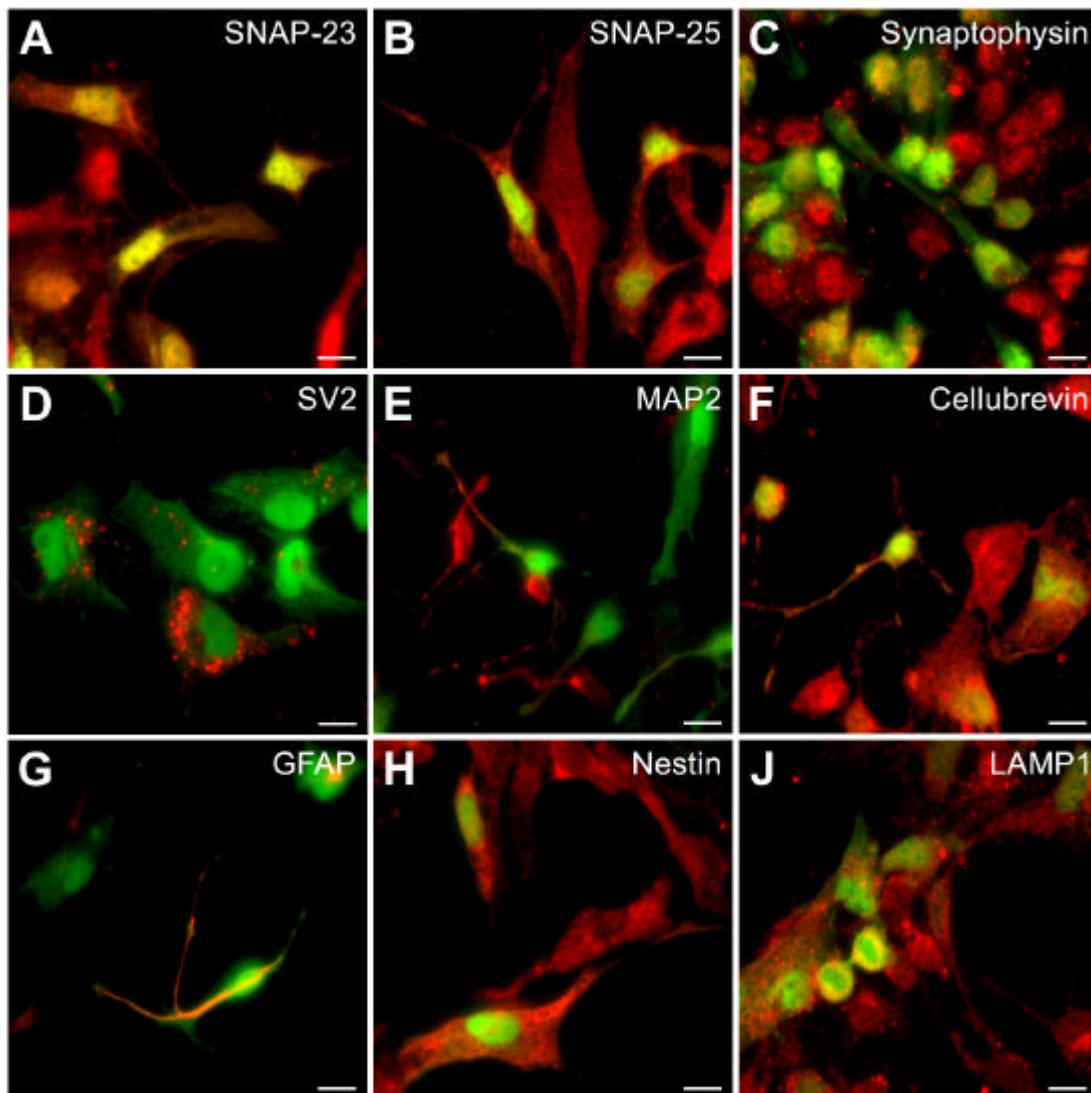
Zwei Tage kultivierte Astrocyten aller analysierten Altersstufen (P1-P16) wiesen vergleichbare Immunreaktionen nach der Behandlung mit Antikörpern gegen SNAP-25, Synaptophysin, SV2, MAP2, SNAP-23, Cellubrevin, GFAP, Nestin und LAMP1 auf. Während alle EGFP-positiven Zellen Immunmarkierungen für SNAP-25, SNAP-23, Cellubrevin, Nestin und LAMP1 zeigten, war jeweils nur in einem Teil der EGFP-positiven Zellen eine Antikörperreaktion für Synaptophysin, SV2, MAP2 und GFAP detektierbar, wobei MAP2 die geringste Anzahl an Zellen markierte. Alle Antikörper, ausgenommen anti-GFAP und anti-MAP2, markierten punktuelle Strukturen in den Somata und den Ausläufern EGFP-positiver Zellen. Die GFAP- und MAP2-Immunreaktionen markierten filamentöse Strukturen, wobei anti-MAP2 gelegentlich auch punktuelle Strukturen sichtbar machte. Nach der Behandlung mit dem Antikörper gegen Nestin waren in keinem Fall filamentöse Strukturen erkennbar.

## Postnataler Tag 1



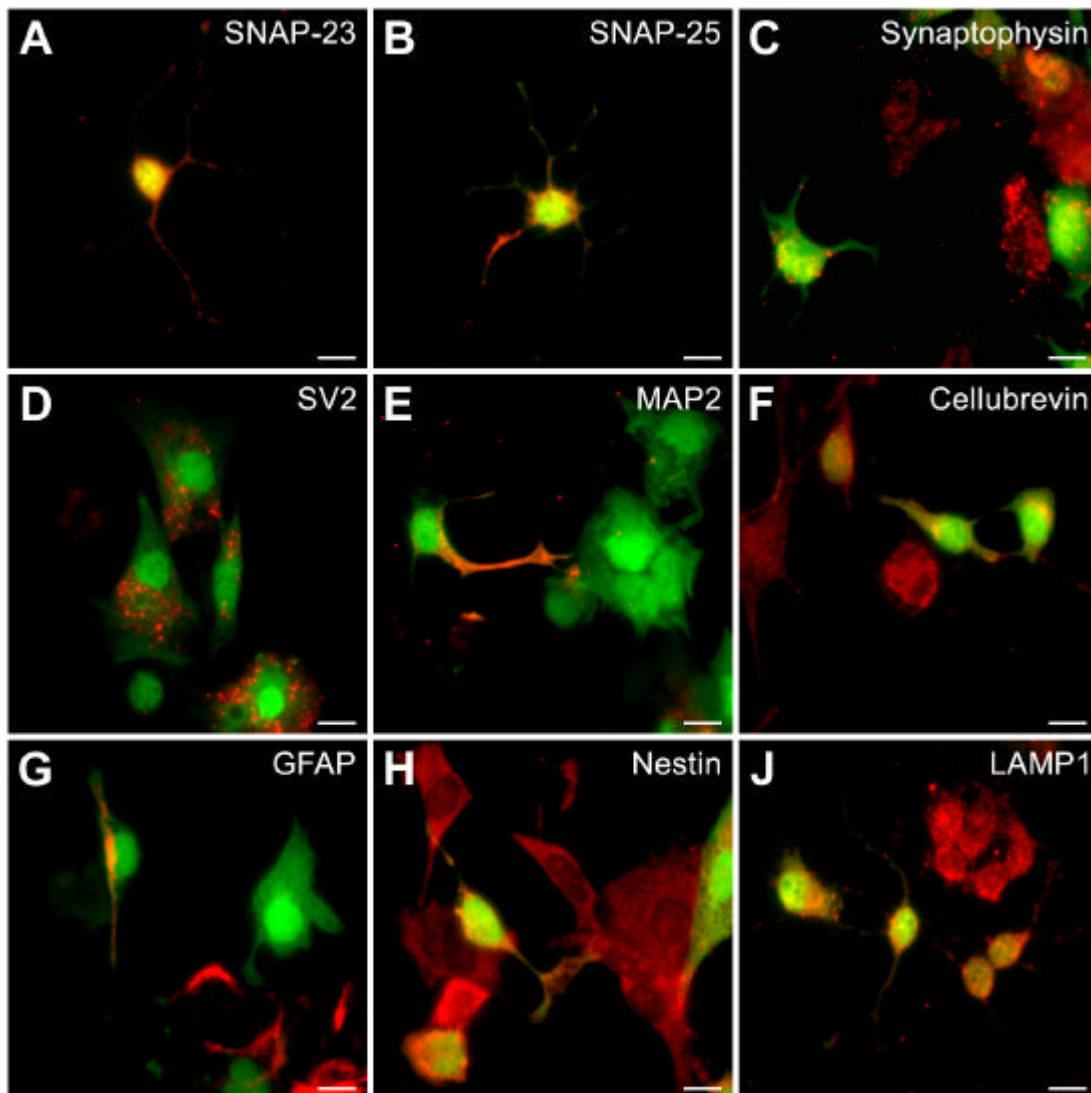
**Abb. 15:** GFP-Fluoreszenz- und indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen nach zweitägiger Kultivierung primärer Astrocyten aus einer einen Tag alten (P1)  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. **A:** SNAP-23. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-23-positiv **B:** SNAP-25. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-25-positiv **C:** Synaptophysin ist in einem Teil der GFP-positiven Zellen detektierbar. **D:** SV2. Ein Teil der GFP-positiven Zellen weist die Markierung großer organellärer Strukturen auf. **E:** MAP2. Wenige GFP-positive Zellen sind MAP2-positiv. **F:** Cellubrevin. Alle GFP-positiven Zellen sind Cellubrevin-positiv **G:** GFAP-Markierung findet sich nicht in allen GFP-positiven Zellen. **H:** Nestin. Alle GFP-positiven Zellen sind Nestin-positiv **J:** LAMP1. Alle GFP-positiven Zellen sind LAMP1-positiv.

## Postnataler Tag 2



**Abb. 16:** GFP-Fluoreszenz- und indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen nach zweitägiger Kultivierung primärer Astrocyten aus einer zwei Tage alten (P2)  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. **A:** SNAP-23. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-23-positiv **B:** SNAP-25. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-25-positiv **C:** Synaptophysin erscheint in allen GFP-positiven Zellen detektierbar. **D:** SV2. Ein Teil der GFP-positiven Zellen weist die Markierung großer organellärer Strukturen auf. **E:** MAP2. Wenige GFP-positive Zellen sind MAP2-positiv. **F:** Cellubrevin. Alle GFP-positiven Zellen sind Cellubrevin-positiv **G:** GFAP-Markierung findet sich nicht in allen GFP-positiven Zellen. **H:** Nestin. Alle GFP-positiven Zellen sind Nestin-positiv **J:** LAMP1. Alle GFP-positiven Zellen sind LAMP1-positiv.

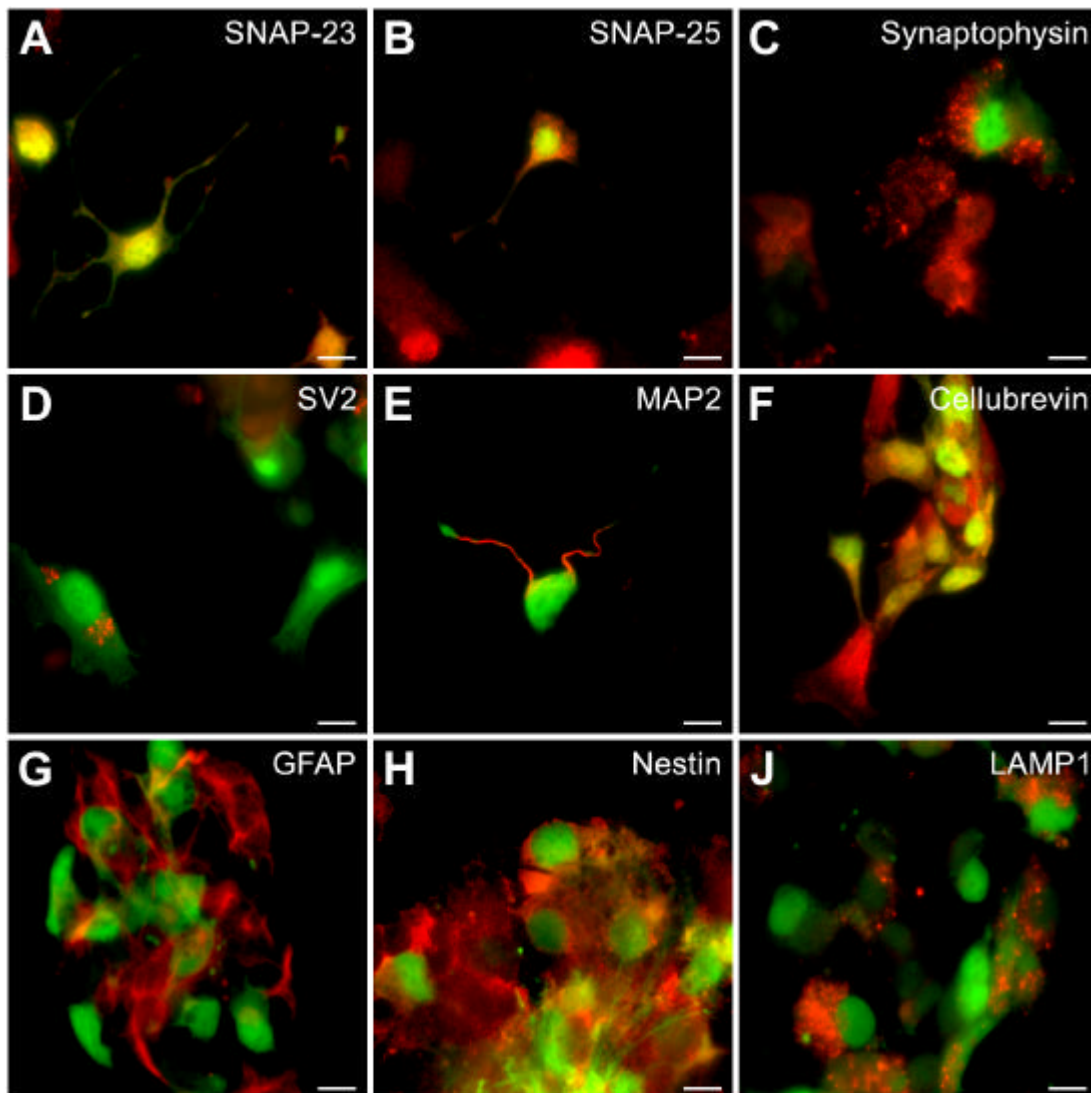
## Postnataler Tag 3



**Abb. 17:** GFP-Fluoreszenz- und indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen nach zweitägiger Kultivierung primärer Astrocyten aus einer drei Tage alten (P3)  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. **A:** SNAP-23. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-23-positiv **B:** SNAP-25. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-25-positiv **C:** Synaptophysin ist in einem Teil der GFP-positiven Zellen detektierbar. **D:** SV2. Ein Teil der GFP-positiven Zellen weist die Markierung großer organellärer Strukturen auf. **E:** MAP2. Wenige GFP-positive Zellen sind MAP2-positiv. **F:** Cellubrevin. Alle GFP-positiven Zellen sind Cellubrevin-positiv **G:** GFAP-Markierung findet sich nicht in allen GFP-positiven Zellen. **H:** Nestin. Alle GFP-positiven Zellen sind Nestin-positiv **J:** LAMP1. Alle GFP-positiven Zellen sind LAMP1-positiv.

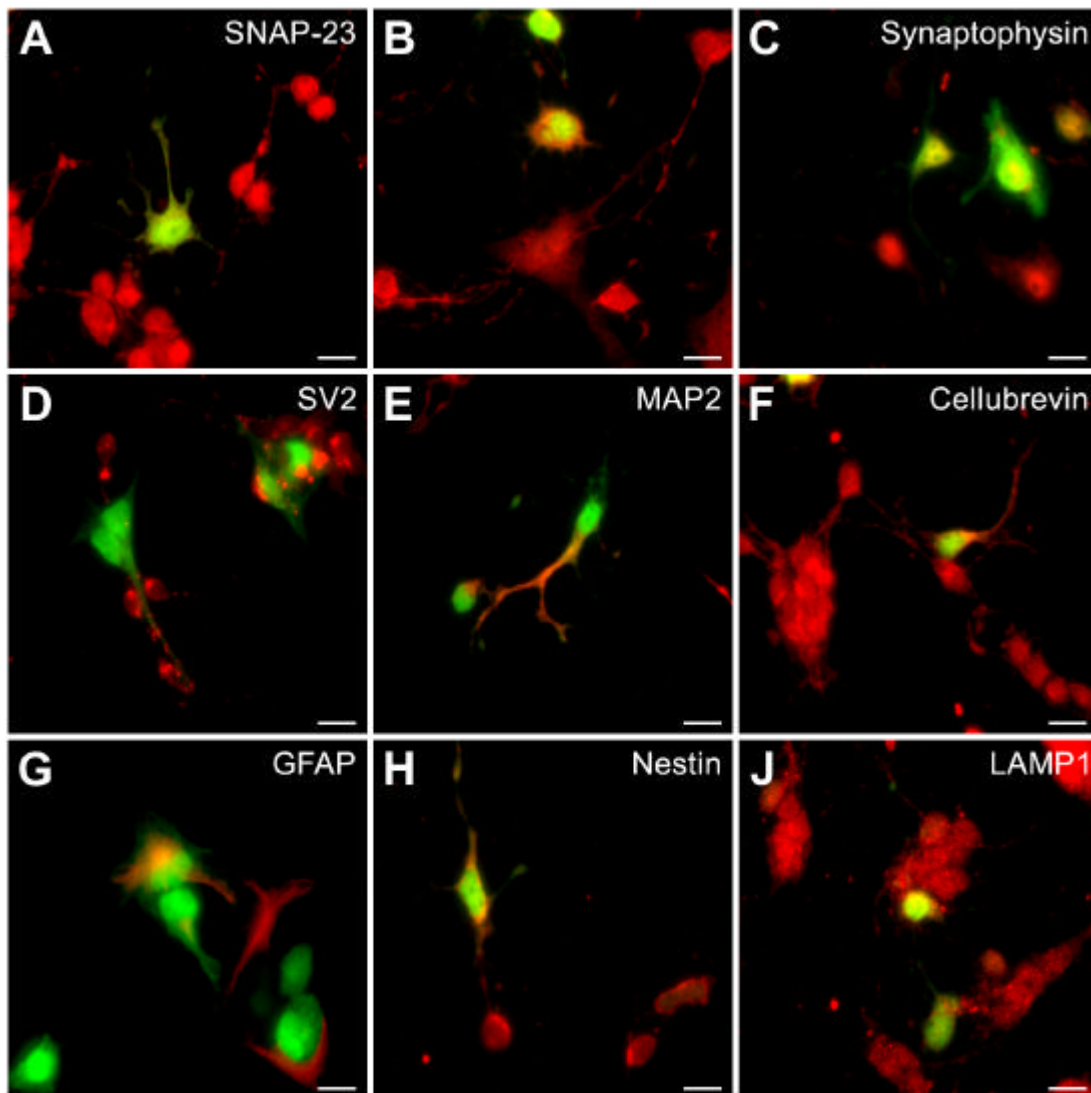


## Postnataler Tag 7



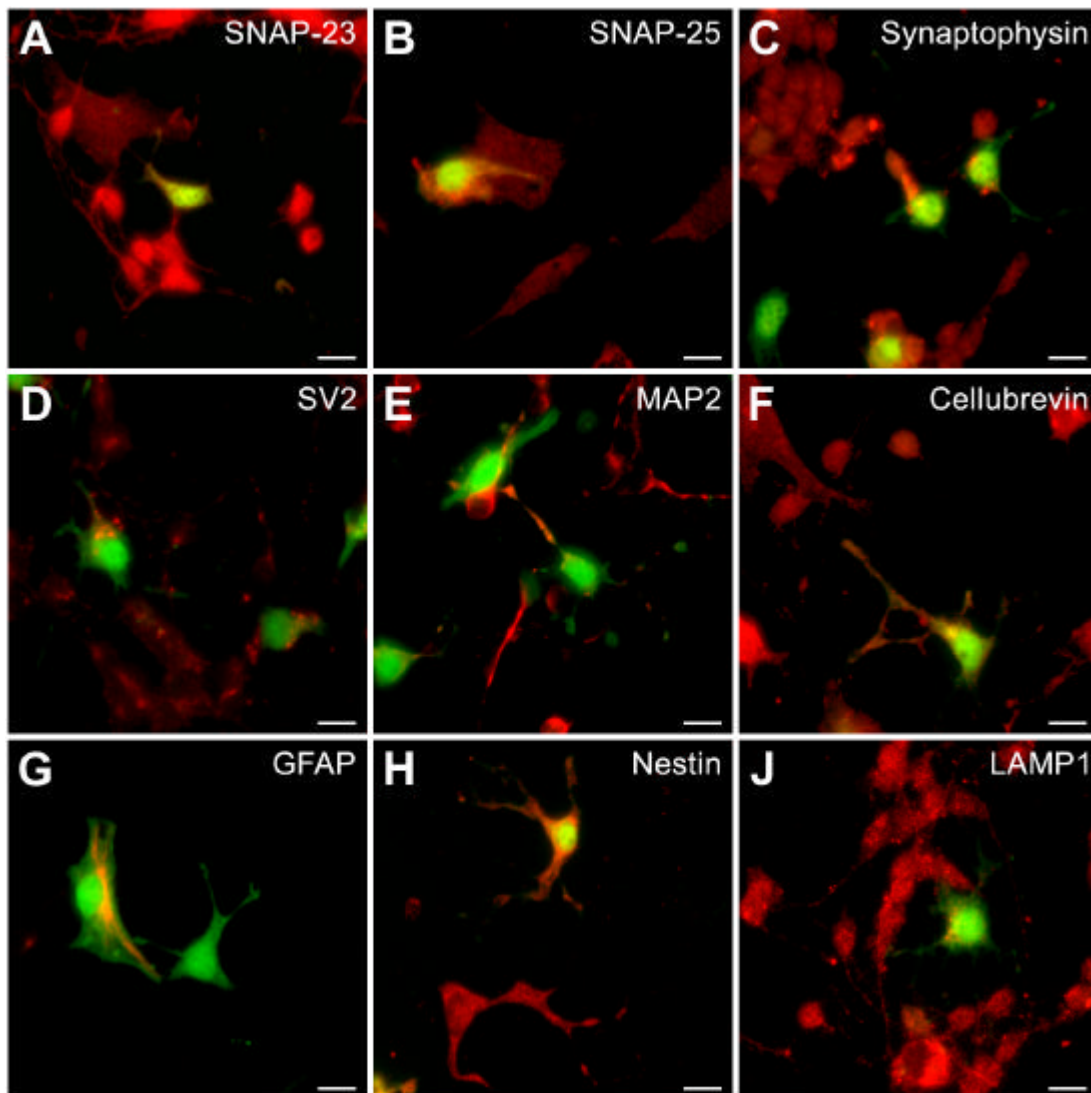
**Abb. 18:** GFP-Fluoreszenz- und indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen nach zweitägiger Kultivierung primärer Astrocyten aus einer sieben Tage alten (P7)  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. **A:** SNAP-23. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-23-positiv **B:** SNAP-25. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-25-positiv **C:** Synaptophysin erscheint in allen GFP-positiven Zellen detektierbar. **D:** SV2. Ein Teil der GFP-positiven Zellen weist die Markierung großer organellärer Strukturen auf. **E:** MAP2. Wenige GFP-positive Zellen sind MAP2-positiv. **F:** Cellubrevin. Alle GFP-positiven Zellen sind Cellubrevin-positiv **G:** GFAP-Markierung findet sich nicht in allen GFP-positiven Zellen. **H:** Nestin. Alle GFP-positiven Zellen sind Nestin-positiv **J:** LAMP1. Alle GFP-positiven Zellen sind LAMP1-positiv.

## Postnataler Tag 11



**Abb. 19:** GFP-Fluoreszenz- und indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen nach zweitägiger Kultivierung primärer Astrocyten aus einer elf Tage alten (P11)  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. **A:** SNAP-23. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-23-positiv **B:** SNAP-25. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-25-positiv **C:** Synaptophysin ist in einem Teil der GFP-positiven Zellen detektierbar. **D:** SV2. Ein Teil der GFP-positiven Zellen weist die Markierung großer organellärer Strukturen auf. **E:** MAP2. Wenige GFP-positive Zellen sind MAP2-positiv. **F:** Cellubrevin. Alle GFP-positiven Zellen sind Cellubrevin-positiv **G:** GFAP-Markierung findet sich nicht in allen GFP-positiven Zellen. **H:** Nestin. Alle GFP-positiven Zellen sind Nestin-positiv **J:** LAMP1. Alle GFP-positiven Zellen sind LAMP1-positiv.

## Postnataler Tag 16



**Abb. 20:** GFP-Fluoreszenz- und indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen nach zweitägiger Kultivierung primärer Astrocyten aus einer sechzehn Tage alten (P16)  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus. **A:** SNAP-23. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-23-positiv **B:** SNAP-25. Alle GFP-positiven Zellen sind SNAP-25-positiv **C:** Synaptophysin ist in einem Teil der GFP-positiven Zellen detektierbar. **D:** SV2. Ein Teil der GFP-positiven Zellen weist die Markierung großer organeller Strukturen auf. **E:** MAP2. Wenige GFP-positive Zellen sind MAP2-positiv. **F:** Cellubrevin. Alle GFP-positiven Zellen sind Cellubrevin-positiv **G:** GFAP-Markierung findet sich nicht in allen GFP-positiven Zellen. **H:** Nestin. Alle GFP-positiven Zellen sind Nestin-positiv **J:** LAMP1. Alle GFP-positiven Zellen sind LAMP1-positiv.

## Expression synaptischer und organellärer Proteine *in situ*?

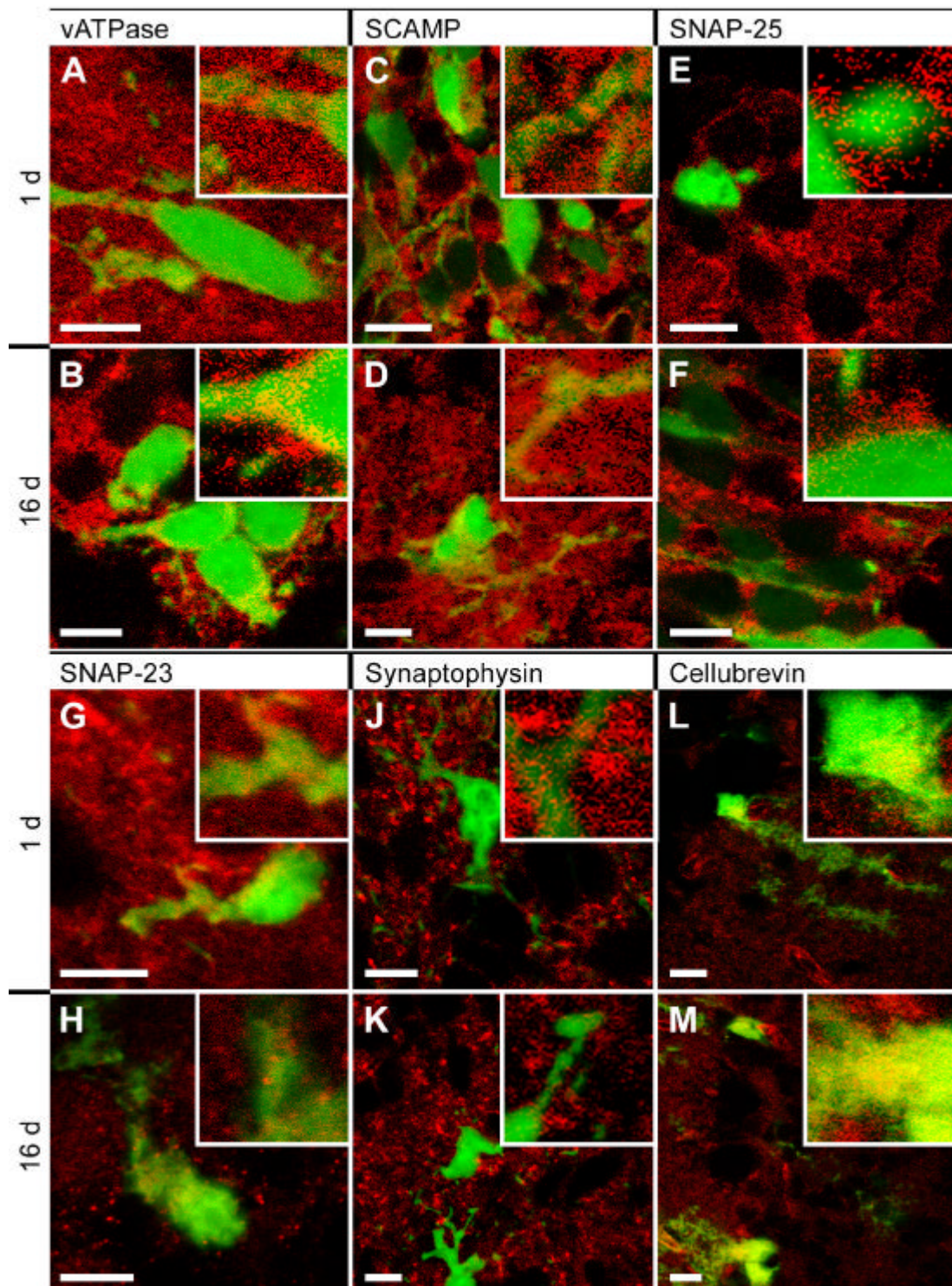
Zur Beantwortung der Frage nach dem Vorhandensein organellärer Strukturen und synaptischer Proteine in Astrocyten der  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus *in situ* wurden nach Perfusionsfixierung transversale Gehirnschnitte von einem Tag (P1), elf Tage (P11) und sechzehn Tage (P16) alten transgenen Mäusen im Bereich des Hippocampus angefertigt und mit Hilfe verschiedener Antikörper analysiert. Zur Verwendung kamen Antikörper gegen SNAP-23, SNAP-25, Synaptophysin, SV2, MAP2, Cellubrevin, Nestin, SCAMP und vATPase. SCAMP (secretory carrier membrane protein) und vATPase (vesikuläre, protonenpumpende ATPase) gelten als Marker für sekretorische Organellen. Unten abgebildet sind vATPase, SCAMP, SNAP-25, SNAP-23, Synaptophysin und Cellubrevin an Schitten der Gehirne von einem bzw. sechzehn Tage alten Versuchstieren. Eine Auswertung aller angefertigten Präparate ist in tabellarischer Form am Ende des Kapitels dargestellt (Abb. 22 S. 64).

folgende Seite:

**Abb 21:** Aufnahmen der GFP- und indirekten Immunfluoreszenz von transversalen Gehirnschnitten im Bereich des Hippocampus 1 Tag (A, C, E und G, J, L) bzw. 16 Tage (B, D, F und H, K, M) alter, perfusionsfixierter  $P_{GFAP}EGFP$ -Mäuse, aufgenommen mit einem confocalen Laserscan-Mikroskop. Die Balken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ . In den rechten oberen Ecken befinden sich digitale Ausschnittsvergrößerungen.

**A, B:** vATPase. Alle GFP-positiven Zellen weisen eine punktuelle somatische Lokalisation und eine Markierung der Zellausläufer auf. **C, D:** SCAMP. Neben punktueller somatischer Verteilung ist SCAMP in Ausläufern GFP-positiver Zellen detektierbar. **E, F:** SNAP-25 ist in GFP-positiven Zellen geringfügig detektierbar. **G, H:** SNAP-23 ist fein punktuell im Soma und in Zellfortsätzen lokalisiert. **J, K:** Synaptophysin ist vereinzelt schwach in GFP-positiven Zellen zu finden. **L, M:** Cellubrevin ist punktuell im Soma und in Fortsätzen GFP-positiver Zellen lokalisiert.





## **Übersicht zu den Immunreaktionen der verwendeten Antikörper in Astrocyten *in vitro* und *in situ***

### **SNAP-23**

In allen Altersstufen (analysiert wurden P1 bis P16) und zu allen Kulturzeitpunkten, bei akuter Isolierung von glialen Zellen und im Gehirnschnitt ist SNAP-23 in allen GFP-positiven Zellen detektierbar. Die Markierung ist fein punktuell und über die gesamte Zelle verteilt (z.B. Abb. 14, K, S. 50/51).

### **SNAP-25**

In akut isolierten GFP-positiven Zellen und im Gehirnschnitt ist SNAP-25 nur geringfügig, punktuell detektierbar. Bei der Kultivierung glialer Zellen ist SNAP-25 zu frühen Zeitpunkten (0,5-1 DIV) nachweisbar. Nach acht Tagen ist keine Immunreaktion für SNAP-25 mehr erkennbar. Die Markierung spart Zellkerne aus und erscheint punktuell und über die gesamte Zelle verteilt (z.B. Abb. 16, B, S. 54).

### **Synaptophysin**

In akut isolierten GFP-positiven Zellen und im Gehirnschnitt ist Synaptophysin in wenigen Zellen nachweisbar, jedoch erscheint gelegentlich eine punktuelle Markierung in Somata und Zellausläufern (z.B. Abb. 21, J, S. 59/60).

### **SV2**

In akut isolierten GFP-positiven Zellen und im Gehirnschnitt ist SV2, das integrale Membranprotein synaptischer Vesikel und der Marker neuroendokriner Zellen, nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). In allen analysierten Zellkulturen ist die Immunreaktion für SV2 in grob punktueller perinukleärer Verteilung sichtbar (z.B. Abb. 14, O, S. 50/51; Abb. 17, D, S. 55). Sie ist nicht mit den feineren, punktuellen Strukturen vergleichbar, die

bei der Anwendung des Antikörpers gegen das lysosomal assoziierte Membranprotein LAMP1 sichtbar werden.

### **MAP2**

In akut isolierten GFP-positiven Zellen kann MAP2 als filamentöse Struktur in Zellausläufern detektiert werden. In Gehirnschnitten konnte keine Markierung in GFP-positiven Zellen gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Ein Teil der kultivierten glialen Zellen der P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus aller analysierten Altersstufen (P1 bis P16) weisen eine Immunreaktion für MAP2 in filamentösen Strukturen auf.

### **Cellubrevin**

In allen Altersstufen (analysiert wurden P1 bis P16), zu allen Kulturzeitpunkten und im Gehirnschnitt ist Cellubrevin in allen GFP-positiven Zellen detektierbar. Die Markierung erscheint fein punktuell und über die gesamte Zelle, verstärkt perinukleär, verteilt (Abb. 16, F, S. 54; Abb. 21, A, G, S. 59/60).

### **VAMP2**

In den im Hinblick auf die VAMP2-Expression untersuchten isolierten glialen Zellen (Kulturdauerabhängigkeit der Expression) konnte eine Immunreaktion für das Protein in großen punktuellen Strukturen festgestellt werden (z.B. Abb. 14, Q, S. 50/51). In akut isolierten Zellen erscheint auch eine fein punktuelle Markierung (Abb. 7, Seite 43). Bei der Anwendung des VAMP2-Antikörpers am Gehirnschnitt ergaben sich keine verwertbaren Ergebnisse.

### **GFAP**

In Kultur zeigten nicht alle GFP-positiven Zellen eine Immunreaktion für GFAP (z.B. Abb. 17, G, S. 55). Detektierbare Immunreaktionen für GFAP sind filamentös in Zellfortsätzen und im Soma lokalisiert (z.B. Abb. 16, G, S. 54).

**Nestin**

Eine Immunreaktion nach Applikation des Nestin-Antikörpers war in allen untersuchten Präparaten erkennbar. In keinem Fall konnte eine filamentöse Markierung detektiert werden. Die Anwendung des Antikörpers an Gehirnschnitten ergab unter anderem eine deutliche Markierung von Purkinje-Zellen und spiegelte das Markierungsmuster einer Nissl-Färbung wider (Daten nicht gezeigt).

**LAMP1**

Antikörper gegen das lysosomal assoziierte Membranprotein LAMP1 wurden in den Versuchen zur Untersuchung der Altersabhängigkeit der Proteinexpression angewendet. Alle GFP-positiven Zellen waren im Soma und in Zellfortsätzen fein punktuell markiert. Der Antikörper gegen LAMP1 markiert deutlich kleinere Strukturen als der Antikörper gegen SV2 (z.B. Abb. 16 D, J, S. 54)

**SCAMP und vATPase**

Antikörper gegen das membranständige Transportprotein sekretorischer Vesikel und die vesikuläre protonenpumpende ATPase wurden an Gehirnschnitten der  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus verwendet. Beide Antikörper markierten *in situ* organelläre Strukturen in Somata und Ausläufern der Zellen, wobei die Zellkerne ausgespart blieben (siehe Abb 21, B, H, F, M, S. 59/60).



Die folgende Tabelle rekapituliert die Ergebnisse der GFP- und Immunfluoreszenzanalysen.

|                                   |       |       | SNAP-23 | SNAP-25 | Synaptophysin | SV2   | MAP2 | Cellubrevin | VAMP2 | GFAP |     |   |
|-----------------------------------|-------|-------|---------|---------|---------------|-------|------|-------------|-------|------|-----|---|
| Kulturdauer-<br>abhängig-<br>keit | 0 DIV | P11   | +       | +       | + -           | -     | ++ - |             | +     |      |     |   |
|                                   |       | P16   | +       | + - -   | -             | -     | + -  |             | ++ -  |      |     |   |
|                                   | 0,5   | P11   | +       | +       |               | +     |      | +           | +     |      |     |   |
|                                   |       | 1 DIV | P7      | +       | +             |       | +    |             | +     | +    | + - |   |
|                                   | P11   |       | +       | +       |               | +     |      | +           | +     |      |     |   |
|                                   | 8 DIV | P7    | +       | +       |               | +     |      | +           | +     | + -  |     |   |
| P11                               |       | +     | -       |         | +             |       | +    | +           |       |      |     |   |
| P16                               |       | +     | -       |         | +             |       | +    | +           |       |      |     |   |
| Alters-<br>abhängigkeit<br>2 DIV  | P1    | +     | +       | + -     | + -           | + - - | +    |             | + -   | +    | +   |   |
|                                   | P2    | +     | +       | +       | + -           | + - - | +    |             | + -   | +    | +   |   |
|                                   | P3    | +     | +       | + -     | +             | + - - | +    |             | + -   | +    | +   |   |
|                                   | P7    | +     | +       | +       | + -           | + -   | +    |             | + -   | +    | +   |   |
|                                   | P11   | +     | +       | + -     | + -           | + -   | +    |             | + -   | +    | +   |   |
|                                   | P16   | +     | +       | + -     | + -           | + -   | +    |             | + -   | +    | +   |   |
| Gehirnschnitt                     | P1    | +     | + -     | + - -   | -             | -     | +    |             | +     |      | +   | + |
|                                   | P11   | +     | -       | + -     | -             | -     | +    |             | +     |      | +   | + |
|                                   | P16   | +     | + - -   | -       | -             | -     | +    |             | +     |      | +   | + |

**Abb 22:** Tabelle zur Proteinexpression in Astrocyten der P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus. +: alle Zellen sind positiv. -: alle Zellen sind negativ. ++: die meisten Zellen sind positiv. + -: die meisten Zellen sind negativ. +-: positive und negative Zellen sind in etwa gleich häufig. Eine detaillierte Quantifizierung wurde nicht vorgenommen.

## Diskussion

### Secretogranin II-Freisetzung aus U373MG Astrocytomazellen

Im Bezug auf Primärkulturen astroglialer Zellen ist die Expression und Calcium-abhängige Freisetzung von granulär lokalisiertem Secretogranin II ein exklusives Merkmal hippocampaler Astrocyten (Calegari et al., 1999). Ebenso wie in kultivierten glialen Zellen, lassen sich in der humanen malignen Gliomazelllinie U373MG Granula und weniger dichte Organellen unterscheiden (Volkandt et al., 2001). U373MG-Zellen exprimieren unter anderem Secretogranin II (SgII) und VAMP2. Die SgII-Immunreaktivität ist auf granulären Strukturen zu finden (Volkandt et al., 2001).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Calcium-abhängige Freisetzung von Sg II aus U373MG Astrocytoma-Zellen nach der Stimulation durch Bradykinin, ATP oder Calcimycin (A23187); Substanzen, die in kultivierten Astrocyten zur Sekretion verschiedener Stoffe führen. So wird aus kultivierten hippocampalen Astrocyten nach der Stimulation mit einem Calcium-Ionophor oder Bradykinin Sg II freigesetzt (Calegari et al., 1999) und ebenfalls Calcium-abhängig und nach der Stimulation mit ATP, Glutamat aus cerebralen Astrocyten (Jeremic et al., 2001). Aufgrund der Lokalisation der Immunreaktion für Sg II auf granulären Strukturen und der Expression synaptischer SNARE-Proteine in diesem Zelltyp (Volkandt et al., 2000) ist der Mechanismus der Freisetzung wahrscheinlich regulierte, Calcium-abhängige Exocytose. Nach wie vor kann die Beteiligung anderer SNARE-Proteine an der regulierten Freisetzung, wie sie aufgrund von Untersuchungen an anderen Zellsystemen möglich erscheint, nicht ausgeschlossen werden. So ist VAMP8 in Mastzellen mit Serotonin-enhaltenden Granula kolokalisiert und *in vivo* mit Syntaxin 4 und SNAP-23 assoziiert (Paumet et al., 2000). Weiterhin ist für Syntaxin 4 und SNAP-23 eine Beteiligung an der Exocytose von Lysosomen beschrieben (Chen et al., 2000). Die Calcium-Abhängigkeit lysosomaler Exocytose in Fibroblasten und

epithelialen Zellen konnte zuvor bereits gezeigt werden (Rodríguez et al., 1997). Da die Sg II-Expression und -Freisetzung bei astroglialen Zellen lediglich in Astrocytenkulturen des Hippocampus zu finden ist (Calegari et al., 1999), erscheint eine Verwendung der leicht handhabbaren U373MG-Zelllinie als Modellsystem für hippocampale Astrocyten möglich.

### **GFP-positive Zellen der P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus**

In der transgenen P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus wird das mutierte grün fluoreszierende Protein EGFP (*enhanced GFP*) unter der Kontrolle des Promotors für das gliale saure Filamentprotein GFAP, welches der klassische Marker für Astrocyten ist, exprimiert (Nolte et al., 2001). Demzufolge werden hier alle GFP-positiven Zellen als Astrocyten oder astrogliale Zellen bezeichnet, ungeachtet der Tatsache, dass ein Teil der GFP-positiven Zellen *in vitro* zum Zeitpunkt der Analyse keine Immunreaktivität für GFAP zeigten. Dieses Phänomen könnte Zellen betreffen, bei denen nach Beginn der durch den gleichen Promotor regulierten Expression von EGFP und GFAP zunächst das lösliche, stark fluoreszierende *enhanced GFP* und erst später, möglicherweise verzögert durch posttranslationale Modifikationen, das Intermediärfilamentprotein GFAP detektierbar ist.

Unter Kulturbedingungen sind zwei verschiedene Typen von Astrocyten zu finden. Zu frühen Kulturzeitpunkten überwiegen filamentöse Astrocyten, die mit fortschreitender Kultivierung von protoplasmatischen Astrocyten verdrängt werden. Bei der Betrachtung von durch Zentrifugation unmittelbar postpräparativ auf Objektträger aufgebrachten Zellen (Zytospin) herrscht erwartungsgemäß, methodenbedingt ein kugelförmiger Phänotyp vor, der keine Zelltypenidentifikation zulässt. Im intakten Gehirn fällt besonders eine starke Markierung von Zellen des Cerebellums ins Auge. Es handelt sich hierbei um Bergmann Gliazellen, deren kleine Somata in der Purkinjzellschicht liegen und deren Ausläufer orthogonal durch die Molekularschicht hindurch bis zur Hirnhaut verlaufen. Im restlichen Gehirn

überwiegt ein Phänotyp mit verzweigten Ausläufern, die sternförmig vom Soma ausgehen können. Es handelt sich hierbei um Astrocyten.

### **Synaptische Proteine in primären Astrocyten der P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus**

Die Expression und organelläre Lokalisation synaptischer Proteine in kultivierten Astrocyten, die aus neonatalen Ratten gewonnen worden waren, ist gezeigt (Maienschein et al. 1999). Die vorliegende Arbeit legt dar, dass synaptische Proteine auch in kultivierten Astrocyten der Maus exprimiert werden und scheinbar organellär lokalisiert sind. So können Synaptophysin, VAMP2 und SV2, welche als typische Konstituenten synaptischer Vesikel gelten, und SNAP-25, welches zusammen mit VAMP2 und Syntaxin 1 Bestandteil des synaptischen SNARE-Komplexes ist (Jahn und Hanson, 1998), auf punktuellen Strukturen detektiert werden.

### **Synaptische Proteine in primären Astrocyten: Kulturdauerabhängigkeit der Proteinexpression**

Kultivierte gliale Zellen aus Gehirnen transgener P<sub>GFAP</sub>EGFP-Mäuse exprimieren synaptische Proteine. Hier wird dies exemplarisch anhand der Expression von SNAP-25, SV2 und VAMP2 gezeigt. Die Befunde decken sich mit den Erkenntnissen über die Expression synaptischer Proteine in kultivierten Astrocyten aus Rattengehirn (Maienschein et al., 1999). Nach 12 Stunden, 24 Stunden und acht Tagen in Kultur sind neben den erwarteten ubiquitär exprimierten SNARE-Proteinen Cellubrevin und SNAP-23 (Parpura et al., 1995; Hepp et al., 1999) auch Proteine der neuronalen Transmitterfreisetzungsmaschinerie zu finden. Hierzu zählen SNAP-25 und VAMP-2, wobei SNAP-25 nach acht Tagen in Kultur bei am postnatalen Tag 7 präparierten Tieren detektiert werden kann, nicht aber bei Tieren, die im Alter von 11 bzw. 16 Tagen präpariert worden waren. Außerdem weisen gliale Zellen der P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus zu diesen Kulturzeitpunkten eine Immunreaktivität für das synaptische Vesikelprotein SV2 auf. Die markierten

Strukturen sind stets punktuell und somit höchstwahrscheinlich organellärer Natur. Die astroglialen Zellen in der Zytopspin-Analyse weisen keine Immunreaktivität für SV2 auf. Nur wenige Zellen der an P16 präparierten Tiere sind im Gegensatz zu den an P11 präparierten Tieren SNAP-25-positiv. Bei der Immunmarkierung für SV2, die bereits nach 12 Stunden *in vitro* auftritt, nicht aber bei sofortiger postpräparativer Fixierung der Zellen, kann es sich zum einen um eine Expression dieses Proteins handeln, die durch eine regulierte Reorganisation des proteinären Besatzes der Zellen aufgrund einer präparationsbedingten Aktivierung zustandekommt, zum anderen ist durch die vorliegenden Ergebnisse nicht auszuschließen, dass die markierten Strukturen durch Phagozytose zerstörter Neuronen bedingt sind. Verschiedene Ergebnisse widersprechen allerdings letzterem Argument. Zum einen wäre zu erwarten, dass die Markierung vermeintlich phagosomaler Strukturen mit fortschreitender Kulturdauer und dem vollständigen Rückgang des neuronalen Anteils an der Kultur abnimmt und schließlich verschwindet. In dieses Bild würde sich der Rückgang der SNAP-25-Markierung fügen. Dem widerspräche allerdings das gleichzeitige Persistieren der SV2-Markierung, die parallel zur SNAP-25-Markierung abnehmen müsste, handelte es sich bei allen in glialen Zellen gefundenen neuronalen Proteinen tatsächlich um phagozytierte neuronale Zelltrümmer (siehe hierzu Tabelle S. 64). Zum anderen können in allen Primärkulturen astroglialer Zellen aus der P<sub>GFAP</sub>EGFP-Maus GFP-positive Zellen gefunden werden, die den typischen neuronalen Dendritenmarker MAP2 in filamentösen und nicht etwa, wie bei Phagozytose zu erwarten wäre, in organellären Strukturen tragen (z.B. Abb. 18 E S. 56). Ausserdem ist bekannt, dass verschiedene synaptische Proteine in kultivierten Astrocyten in immunocytoologischen Untersuchungen nicht vollständig kolokalisiert und damit höchstwahrscheinlich nicht lysosomal lokalisiert sind (Maienschein et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass in Bezug auf die Proteinexpression bisher weitgehend unbeachtete Gemeinsamkeiten zwischen Neuronen und Glia bestehen, deren Bedeutung noch weiterer, eingehender Untersuchungen bedarf.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass es nach dem Eingriff der Präparation zu einer Aktivierung der glialen Zellen kommt, im Verlauf dessen die Proteinexpression reorganisiert wird. Das bereits zuvor auch an Primärkulturen aus Rattengehirn gezeigte Abnehmen der Immunreaktivität für SNAP-25 (Maienschein et al., 1999) könnte den Übergang der aktivierten Zellen in einen ruhenden Zustand widerspiegeln. Möglicherweise zeigt sich bei der Kultivierung eine vorübergehende Redifferenzierung glialer Zellen in gliale und neuronale Vorläuferzellen. Nachdem bekannt ist, dass Astrocyten mit Neuronen in einen bidirektionalen Kommunikationsprozess eintreten können (Verkhatsky und Kettenmann, 1996; Deitmer et al., 1998; Araque et al., 1999; Vesce et al., 1999.), in welchem es zu einer glialen Freisetzung von in Neuronen typischerweise vesikulär gespeicherten Signalsubstanzen wie Glutamat kommen kann, haben die hier gezeigten Ergebnisse Implikationen hinsichtlich des Mechanismus der Freisetzung. Der Nachweis der Expression der SNARE-Proteine SNAP-25 und VAMP2 in dieser Arbeit und Befunde anderer Gruppen zur SNARE-Protein- und Calcium-Abhängigkeit glialer Freisetzung (Jeftinija et al., 1997; Araque et al., 2000) lassen die Vermutung zu, dass Astrocyten wie Neuronen einen regulierten exocytotischen Mechanismus zur Freisetzung von Signalsubstanzen verwenden und nicht hauptsächlich umgekehrte Transporterprozesse, wie früher angenommen wurde (Szatkowski et al., 1990; Martin, 1992). Naheliegender erscheint eine Kombination aus beiden Freisetzungsmechanismen, nachdem an Kleinhirnschnitten der Ratte gezeigt werden konnte, dass über spezifische Transporter sowohl die Aufnahme als auch die Freisetzung von Taurin möglich ist (Barakat et al., 2002), dem im Falle einer Ischämie eine neuroprotektive Rolle zukommen soll.

### **Synaptische Proteine in primären Astrocyten: 2 Tage *in vitro***

Nachdem bisher lediglich Daten aus Astrocyten-Kulturen neonataler Ratten vorlagen mit Hilfe derer nicht auszuschließen war, dass die untersuchten Zellen hauptsächlich Vorläuferzellen oder undifferenzierte Astrocyten waren, war die Frage, die den Untersuchungen zur Expression synaptischer Proteine in zwei Tage geführten glialen Primärkulturen aus den Gehirnen unterschiedlich alter  $P_{GFAP}EGFP$ -Mäuse (P1, P2, P3, P7, P11, P16) zugrundelag, ob sich das proteinäre Repertoire kultivierter glialer Zellen bei unterschiedlichem Alter der Versuchstiere unterscheidet.

Die Tabelle am Ende des Ergebnisteils (Seite 59) lässt keine Unterschiede im Hinblick auf eine altersabhängige Expression der untersuchten Proteine SNAP-25, SNAP-23, Synaptophysin, SV2, MAP2, Cellubrevin, GFAP und LAMP1 erkennen. Abgesehen von GFAP und MAP2 markieren alle verwendeten Antikörper durchgehend punktuelle und somit höchstwahrscheinlich organelläre Strukturen. Hervorzuheben ist der Vergleich zwischen den Mustern der Immunreaktivitäten nach der Behandlung der Zellen mit Antikörpern gegen SV2 bzw. LAMP1. SV2 zeigt eine grob punktuelle perinukleäre Verteilung, wohingegen das lysosomal assoziierte Membranprotein LAMP1 scheinbar im gesamten Soma auf kleineren organellären Kompartimenten lokalisiert ist (siehe z.B. Abb. 15, D, J, Seite 53). Dieser Befund widerspricht der Hypothese, es könne sich bei den in kultivierten glialen Zellen gefundenen positiven Immunreaktionen nach der Behandlung mit Antikörpern gegen synaptische Proteine um phagozytierte Trümmer bei der Präparation zerstörter Neuronen in lysosomalen Kompartimenten handeln.

Die Tatsache, dass das Muster der Immunreaktivitäten in glialen Zellen unterschiedlich alter Versuchstiere nach zwei Tagen in Kultur stets vergleichbar ist, legt nahe, dass die Aktivierbarkeit der Glia im Bezug auf die Reorganisation des proteinären Repertoirs innerhalb des untersuchten Zeitfensters vom postnatalen Tag 1 bis zum postnatalen Tag 16 nicht stark variiert. Dies könnte bedeuten, dass das Reaktionsvermögen glialer Zellen

auf eine etwaige Verletzung des Gehirns bereits embryonal voll etabliert wird und somit postnatal sofort zur Verfügung steht.

In vorangegangenen Untersuchungen zur Expression synaptischer Proteine in Astrocyten wurden ausschliesslich Tiere am postnatalen Tag 1 zur Gewinnung astroglialer Primärkulturen verwendet (Maienschein et al., 1999), wodurch nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei den analysierten Zellen um nicht ausdifferenzierte Glia oder Vorläuferzellen handelte, die vermehrt in frühen Entwicklungsstadien auftreten. Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf einen allgemeinen Mechanismus der Aktivierbarkeit der Expression synaptischer Proteine in Astrocyten bei allen untersuchten Altersstadien hin und lassen es als unwahrscheinlich erscheinen, dass diese Proteinexpression vom Entwicklungsstand des zentralen Nervensystems abhängt.

### **Expression synaptischer und organellärer Proteine *in situ*?**

Die überwiegende Mehrheit der Erkenntnisse über gliale Zellen entstammt Untersuchungen, die an Primärkulturen oder Zelllinien vorgenommen wurden. Inwieweit die Befunde zur Expression synaptischer Proteine in Astrocyten *in vitro* auf das intakte zentrale Nervensystem übertragen werden können, lässt sich unter anderem durch immunhistologische Untersuchungen von Gefrierschnitten des Gehirns transgener P<sub>GFAP</sub>EGFP-Mäuse, wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, beantworten. Die zu erwartende positive Immunreaktion bei Anwendung von Antikörpern gegen die ubiquitären SNARE-Proteine Cellubrevin und SNAP-23 (Parpura et al., 1995; Hepp et al., 1999) ist in GFP-positiven Zellen der Gehirnschnitte transgener P<sub>GFAP</sub>EGFP-Mäuse detektierbar. Im Gegensatz zu den Analysen kultivierter glialer Zellen kann in GFP-positiven Zellen *in situ* in keinem Fall eine Expression von SV2 oder MAP2 festgestellt werden. Dieser Befund fügt sich in die Hypothese einer aktivierungsbedingten Reorganisation des proteinären Repertoires kultivierter glialer Zellen ein, da ein Vorhandensein aktivierter Glia im gesunden Gehirn im Gegensatz zur Zellkultur nicht zu erwarten ist. Eine



methodische Limitierung zeigt möglicherweise das Ergebnis der Zytospinanalyse direkt postpräparativ fixierter Zellen in Bezug auf MAP2. Hier kommt es zu einer positiven Immunreaktion, die *in situ* nicht nachvollzogen werden kann (siehe Tabelle S. 64). Hierfür könnte die Tatsache verantwortlich sein, dass die Population glialer Zellen heterogen ist und lokale Unterschiede innerhalb des ZNS nicht auszuschliessen, sondern eher wahrscheinlich sind. Bei allen Kultivierungsexperimenten wurde das gesamte Gehirn der Versuchstiere verwendet, wohingegen die Betrachtung der Gehirnschnitte jeweils nur einen Blick auf einen begrenzten Ausschnitt, im vorliegenden Fall auf den Bereich um den Hippocampus, zulässt. Hier könnten ausführliche Kartierungen des ZNS in Bezug auf die Expression synaptischer Proteine in glialen Zellen wertvolle Informationen liefern.

Die vesikuläre protonenpumpende ATPase ist Bestandteil endo- und lysosomaler Kompartimente aber auch sekretorischer Organellen (Finbow und Harrison, 1997). Das membranständige sekretorische Transporterprotein SCAMP 37 gilt als Marker für Systeme des Zellmembran-Recyclings (Brand und Castle, 1993). Die positiven Immunreaktionen nach der Applikation von Antikörpern gegen vATPase und SCAMP in GFP-positiven Zellen im Gehirnschnitt zeigen, dass mit der verwendeten Methode der Immunhistologie in Verbindung mit confocaler Laserscan-Mikroskopie organelläre Strukturen in Astrocyten *in situ* nachgewiesen werden können.

Die Bewertungen der Analysen für SNAP-25 und Synaptophysin in der Tabelle auf S. 64 lässt die Expression dieser Proteine *in situ* möglich erscheinen, die Markierungen befinden sich allerdings an der Nachweisgrenze.

Die Tatsache, dass die markierten Strukturen nicht nur im Soma, sondern auch in Ausläufern der Zellen gefunden werden, widerspricht der möglichen Annahme, dass lediglich Bestandteile des Golgi-Apparates und damit hauptsächlich des internen Vesikelverkehrs sichtbar gemacht werden. Vielmehr untermauert dies die Annahme, dass Astrocyten über die mechanistischen Voraussetzungen für eine regulierte Exocytose verfügen, wie sie von Neuronen bekannt ist.

Ein sichtbarer Unterschied in der Expression der untersuchten Proteine in GFP-positiven Zellen beim Versuchstieralter P1, P11 und P16 besteht nicht. Dieser Befund zeigt, wie zuvor schon die Analyse der Daten für kultivierte astrogliale Zellen zwei Tage *in vitro*, dass die diesbezügliche Differenzierung der Zellen pränatal abgeschlossen ist und im untersuchten Zeitfenster keiner Variation unterliegt.

## Zusammenfassung

Im Hauptteil der Dissertation wird die Expression und Lokalisation organellärer und synaptischer Proteine in Astrocyten der transgenen  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus, die unter der Kontrolle des GFAP-Promotors EGFP exprimiert, analysiert. Zum einen wird ein grundlegender Vergleich der Expression synaptischer Proteine in kultivierten Astrocyten der Ratte und der  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus angestellt, zum anderen werden Kulturdauer- und Altersabhängigkeit der Expression untersucht. Des Weiteren wird die Expression organellärer und synaptischer Proteine in Astrocyten der  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus *in situ* überprüft.

Die immunocytoologischen Untersuchungen zeigten zum einen die Expression und organelläre Lokalisation der synaptischen Proteine SNAP-25, SV2, VAMP2 und Synaptophysin in Astrocyten der transgenen  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus, zum anderen einen kulturdauerabhängigen Rückgang der Expression von SNAP-25, wie er für kultivierte Astrocyten aus Neopallia der Ratte beschrieben ist. Des Weiteren wird festgestellt, dass die Expression organellärer und synaptischer Proteine in kultivierten Astrocyten der  $P_{GFAP}EGFP$ -Maus keine Eigenschaft undifferenzierter Astrocyten oder Vorläuferzellen ist. Eine vergleichbare Expression solcher Proteine findet sich in astroglialen Primärkulturen, die aus den Gehirnen unterschiedlich alter Tiere gewonnen worden waren. In der vorliegenden Arbeit gelingt

erstmalig der Nachweis der Expression und organellären Lokalisation verschiedener organellärer und synaptischer Proteine (SNAP-23, SNAP-25, Synaptophysin, Cellubrevin, SCAMP, vATPase) in Astrocyten *in situ*. Dieser Befund birgt weitreichende Implikationen bezüglich der in der glialen Signalübertragung und bidirektionalen Kommunikation mit Neuronen verwendeten zellulären Mechanismen in sich. Aufgrund des proteinären Repertoires erscheint es möglich, dass Astrocyten *in situ* eine mit Neuronen vergleichbare molekulare Maschinerie zur regulierten exocytotischen Freisetzung besitzen.

Ein weiterer Teil der Arbeit stellt die Expression und Calcium-abhängige Freisetzung des modulatorischen Neuropeptids Secretogranin II aus U373MG Astrocytoma-Zellen dar. Dieser Zelltyp wird als mögliches Modellsystem für kultivierte hippocampale Astrocyten vorgeschlagen.

## Literatur

- Alvarez-Maubecin, V., García-Hernández, F., Willima, J., Van Bockstaele, E., 2000. Functional coupling between neurons and glia. *J. Neurosci.* 20, 4091-4098.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., Haydon, P. G., 1998a. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2129-2142.
- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., Haydon, P. G., 1998b. Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18, 6822-6829.
- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., Haydon, P. G., 1999a. Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77, 699-706.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., Haydon, P. G., 1999b. Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208-215.
- Araque, A., Li, N. Z., Doyle, R.T., Haydon, P. G., 2000. SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 666-673.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P., 2001. Dynamic signalling between astrocytes and neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 795-813.
- Bajjalieh, S.M., Frantz, G.D., Weimann, J.M., McConnell, S.K., Scheller, R.H. 1994. Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J. Neurosci.* 14, 5223-5235.
- Barakat, L., Wang, D., Bordey, A. 2002. Carrier-mediated uptake and release of taurine from Bergmann glia in rat cerebellar slices. *J Physiol* 541, 753-767.
- Bergles, D.E., Roberts, J.D.B., Somogyi, P., Jahr, C.E. 2000. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405, 187-191.
- Bernstein, M., Behnisch, T., Balschun, D., Reymann, K. G., Reiser, G., 1998. Pharmacological characterisation of metabotropic glutamatergic and purinergic receptors linked to Ca<sup>2+</sup> signalling in hippocampal astrocytes. *Neuropharmacology* 37, 169-178.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., Volterra, A., 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281-285.
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A. Bagezza, G., Kollias, G., Meldolesi, J., Volterra, A., 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF $\alpha$ : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nature Neurosci.* 4, 702-703.
- Bezzi, P., Volterra, A., 2001. A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 387-394.
- Braet, K., Paeleire, K., D'Herde, K., Sanderson, M.J., Leybaert, L., 2001. Astrocyte-endothelial cell calcium signals conveyed by two signalling pathways: *Eur. J. Neurosci.* 13, 79-91.

- Brand, S.H., Castle, J.D. 1993. SCAMP 37, a new marker within the general cell surface recycling system. *EMBO Journal* 12, 3753-3761.
- Calegari, F., Coco, S., Taverna, E., Bassetti, M., Verderio, C., Corradi, N., Matteoli, M., 1999. A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 22539-22547.
- Carmignoto, G., 2000. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. *Prog. Neurobiol.* 62, 561-581.
- Chapman, E.R., An, S., Barton, N., Jahn, R. 1994. SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils. *J. Biol. Chem.* 269, 27427-27432.
- Chen, D., Lemons, P.P., Schraw, T., Whiteheart, S.W. 1997. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood* 96, 1782-1788.
- Chen, J., Backus, K.H., Deitmer, J.W., 1997. Intracellular calcium transients and potassium current oscillations evoked by glutamate in cultured rat astrocytes. *J. Neurosci.* 17, 7278-7287.
- Daly, C., Sugimori, M., Moreira, J.E., Ziff, E.B., Llinas, R. 2000. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97, 6120-6125.
- Dani, J. W., Chernjavsky, A., Smith, S. J., 1992. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8, 429-440.
- Deitmer, J. W., Verkhratsky, A. J., Lohr, C., 1998. Calcium signalling in glial cells. *Cell. Calcium* 24, 405-416.
- Dermietzel, R., Spray, D. C., 1993. Gap junctions in the brain: Where, what type, how many and why? *Trends Neurosci.* 16, 186-192.
- Do, K. Q., Benz, B., Sorg, O., Pellerin, L., Magistretti, P. J., 1997. Beta-adrenergic stimulation promotes homocysteic acid release from astrocyte cultures: Evidence for a role of astrocytes in the modulation of synaptic transmission. *J. Neurochem.* 68, 2386-2394.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neuronal stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Fam, S. R., Gallagher, C. J., Salter, M. W., 2000. P2Y<sub>1</sub> purinoceptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 2800-2808.
- Feany, M.B., Lee, S., Edwards, R.H., Buckley, K.M. 1992. The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* 70, 861-867.
- Finbow, M.E., Harrison, M.A. 1997. The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: A universal proton pump of eucaryotes. *Biochem. J.* 324, 697-712.
- Fischer-Colbrie, R., Kirchmair, R., Schobert, A., Olenik, C., Meyer, D. K., Winkler, H., 1993. *J. Neurochem.* 60, 2312-2314.
- Geppert, M., Südhof, T. C., 1998. RAB3 and synaptotagmin: The yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 75-95.

- Grafstein, B., Liu, S., Cotrina, M. L., Goldman, S. A., Nedergaard, M., 2000. Menigeal cells can communicate with astrocytes by calcium signaling. *Ann. Neurol.* 47, 18-25.
- Grosche, J., Matyash, V., Möller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., Kettenmann, H., 1999. Microdomains for neuron-glia interaction: Parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature Neurosci.* 2, 139-143
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V. L., Charles, A. C., Kater, S. B., 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci.* 19, 520-528.
- Hanson, P. I., Heuser, J. E., Jahn, R., 1997. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 310-315.
- Haydon, P. G., 2001: GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 63, 795-813.
- Heins, N, Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K.L., Hack, M.A., Chapouton, P., Barde, Y.A., Götz, M. 2002. Glial cells generate neurons: the roll of the transcription factor Pax6. *Nature neuroscience* 5, 308-315.
- Hepp, R., Perraut, M., Chasserot-Golaz, S., Galli, T., Aunis, D., Langley, K., Grant, N. J., 1999. Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *Glia* 27, 181-187.
- Hide, I., Tanaka, M., Inoue, A., Nakajima, K., Kohsaka, S., Inoue, K., Nakata, Y., 2000. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J. Neurochem.* 75, 965-972.
- Hösli, E., Hösli, L., 1993. Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 40, 477-506.
- Hösli, E., Hösli, L., 2000. Colocalization of neurotransmitter receptors on astrocytes in explant cultures of rat CNS. *Neurochem. Int.* 36, 301-311.
- Innocenti, B., Parpura, V., Haydon, P.G., 2000. Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 1800-1808.
- Jahn, R., Hanson, P.I. 1998. Membrane fusion- SNAREs line up in new environment. *Nature* 393, 14-15.
- Janigro D., Wender R., Ransom G., Tinklepaugh D. L., Winn, H.R., 1996. Adenosine-induced release of nitric oxide from cortical astrocytes. *Neuroreport* 7, 1640-1644.
- Jeftinija, S. D., Jeftinija, K. V., Stefanovic, G., Liu, F. 1996. Neuroligand-Evoked Calcium-Dependent Release of Excitatory Amino Acids from Cultured Astrocytes. *J. Neurochem.* 66, 676-684.
- Jeftinija, S. D., Jeftinija, K. V., Stefanovic, G. 1997. Cultured astrocytes express proteins involved in vesicular glutamate release. *Brain Res.* 750, 41-47.
- Jeremic, A., Jeftinija, K., Stevanovic, J., Glavaski, A., Jeftinija, S., 2001. ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 77, 664-675.
- Kettenmann H. and Ransom B.R. 1995. *Neuroglia*, Oxford University Press, New York.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Levi, G., Patrizio, M. 1992. Astrocyte heterogeneity: endogenous aminoacid levels and release evoked by non-N-methyl-D-aspartate receptor agonists and by potassium induced swelling in type-I and type-II astrocytes. *J. Neurochem.* 58, 1943-1952.
- Maienschein, V., Marxen, M., Volkandt, W., Zimmermann, H., 1999. A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia* 26, 233-244.
- Malatesta, P., Hartfuss, E., Götz, M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127, 5253-5263.
- Martin, D. L., 1992. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5, 81-94.
- Martinez-Arca, S., Alberts, P., Galli, T. 2000. Clostridial neurotoxin-insensitive vesicular SNAREs in exocytosis and endocytosis. *Biology of the cell* 92, 449-453.
- McMahon, H.T., Ushkaryov, Y.A., Edelman, L., Link, E., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R., Südhof, T.C. 1993. Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putativ synaptic vesicle fusion protein. *Nature* 364, 346-349.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., Ogawa, M. 2001. Asymmetric inheritance of radial glial fibres by cortical neurons. *Neuron* 31, 727-741.
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O. Jr., Linden D. J., Ferris C. D., Rogawski, M. A., Snyder, S. H., 2000. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4926-4931.
- Nägler, K., Mauch, D.H., Pfrieger, F.W. 2001. Glia-derived signals induce synapse formation in neurons of the rat central nervous system. *533.3*, 665-679.
- Nedergaard, M., 1994. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263, 1768-1771.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissmann, T.A., Dammerman, R.S., Kriegstein, A.R. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714-720.
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., Kettenmann, H. 2001. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living tissue. *Glia* 33, 72-86
- Ortinou, S., Laube, B and Zimmermann, H. 2002. Inhibition of NMDA-Receptors by ATP Rescues Cultured Hippocampal Neurons from NMDA-mediated Neurotoxicity. *J Neurosci.* Submitted.
- Parnavales, J.G., Nadarajah, B. 2001. Radial Glial Cells: Are They Really Glia?. *Neuron* 31, 881-884.
- Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., Haydon, P. G., 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744-747.
- Parpura, V., Fang, Y., Basarsky, T., Jahn, R., Haydon, P. G., 1995a. Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Lett.* 377, 489-492.

- Parpura, V., Liu, F., Brethorst, S., Jeftinija, K., Jeftinija, S., Haydon, P. G., 1995b. Alpha-latrotoxin stimulates glutamate release from cortical astrocytes in cell culture. *FEBS Lett.* 360, 266-270.
- Parri, H. R., Gould, T. M., Grunell, V., 2001. Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nature Neurosci.* 4, 803-812.
- Pasti, L., Pozzan, T., Carmignoto, G., 1995. Long-lasting changes of calcium oscillations in astrocytes: a new form of glutamate-mediated plasticity. *J. Biol. Chem.* 270, 15203-15210.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., Carmignoto, G., 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: A highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 17, 7817-7830.
- Paumet, F., LeMao, J., Martin, S., Galli, T., David, T., Blank, U., Roa, M. 2000. Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *J. Immunology* 164, 5850-5857.
- Portela-Gomes, G.M., Lukinius, A., Grimelius, L. 2000. Synaptic Vesicle Protein 2, A New Neuroendocrine Cell Marker. *Am. J. Path.* 157, 1299-1309.
- Porter, J. T., McCarthy, K. D., 1996. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.* 51, 439-455.
- Queiroz, G., Meyer, D. K., Meyer, A., Starke, K., von Kügelgen, I., 1999. A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. *Neuroscience* 91, 1171-1181.
- Reiser, G., Zimmermann, H., 2001. Astrocytic signaling in the nervous system. In: Elsner, N., Kreuzberg, (Eds.) *Neuroscience at the turn of the century*. Thieme, Stuttgart, New York, pp. 626-631.
- Rodriguez, A., Webster, P., Ortego, J., Andrews, N.W. 1997. Lysosomes Behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated Exocytic Vesicles in Fibroblasts and Epithelial Cells. *JCB*, 137, 93-104.
- Scemes, E., Suadicani, S.O., Spray, D.C., 2000. Intercellular communication in spinal cord astrocytes: Fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. *J. Neurosci.* 20, 1435-1445
- Schell, M. J., Molliver, M. E., Snyder, S. H., 1995. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3948-3952.
- Schell, M. J., Brady Jr., R. O., Molliver, M. E., Snyder, S. H., 1997. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localization in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J. Neurosci.* 17, 1604-1615.
- Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., Kirchhoff, F. 2001. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J.* 15, 1270-1272.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., Alvarez-Buyllia; A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 7153-7160.
- Südhof, T.C. 1995. The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653.



- Szatkowski, M., Barbour, B., Attwell, D. 1990. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348; 443-447
- Tamamaki, N.; Nakamura, K.; Okamoto, K.; Kaneko, T. 2001. Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci Res*, 41, 51-60.
- Teichberg, V.I. 1991. Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *Faseb J.* 5, 3086-3091.
- Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F., Huttner, W.B. 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell. Biol.* 2, 42-49.
- Vega-Agapito, V., Almeida, A., Heales, S.J.R., Medina, J.M., Bolanos, J.P., 1999. Peroxynitrite anion stimulates arginine release from cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 73, 1446-1452.
- Verderio, C., Coco, S., Rosetto, O., Montecucco, C., Matteoli, M., 1999. Internalization and proteolytic action of botulinum toxins in CNS neurons and astrocytes. *J. Neurochem.* 73, 372-379.
- Verderio, C., Bruzzone, S., Zocchi, E., Fedele, E., Schenk, U., De Flora, A., Matteoli, M., 2001. Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 78, 646-657.
- Verkhatsky, A., Kettenmann, H., 1996. Calcium signaling in glial cells. *Trends Neurosci.* 19, 346-352.
- Verleysdonk, S., Hamprecht, B., 2000. Synthesis and release of L-serine by rat astroglia-rich primary cultures. *Glia* 30, 19-26.
- Vesce, S., Bezzi, P., Volterra, A. 1999. The active role of astrocytes in synaptic transmission. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 991-1000.
- Volkandt, W., Wilhelm, A., Obermüller, E., Steinmann, A., Zhang, L., Zimmermann, H. 2000. Expression and subcellular localization of SNARE proteins in astrocytoma cells. *Biol. Chem.* 381, Suppl., p. S98.
- Volkandt, W., Wilhelm, A., Zhang, L., Küster, F., Zimmermann, H. 2001. Synaptic proteins in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 78, Suppl. 1, p24, AP10-12.
- Volkandt, W., Küster, F., Wilhelm, A., Obermüller, E., Steinmann, A., Zhang, L., Zimmermann H. 2002. Expression and allocation of proteins of the exo-endocytotic machinery in U373 glioma cells: similarities to long term cultured astrocytes. *Cell. Molec. Neurobiol.* 22, 153-169.
- Volkandt, W. 2002. Vesicular release mechanisms in astrocytic signalling. *Neurochem. Int.* 41, 301-306.
- Virchow, R., 1846. Über das granuliertes Ansehen der Wandungen der Gehirnvventrikel. *Allg. Z. Psychiatrie, Psych. Med.* 3, 242-250.
- Watkins, L., Milligan, E.D., Maier, S.F. 2001. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends in Neurosciences* 24, 450-455.

Wilhelm, A., Maienschein, V., Obermüller, E., Volkandt, W., Zimmermann, H. 2001. SNARE proteins in cultured astrocytes. In: Göttingen Neurobiology Report 2001 (N. Elsner and G.W. Kreutzberg, eds.). Thieme, Stuttgart, New York, 903.

Yang, B., Gonzales, L.Jr., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R.J., Scheller, R.H. 1999. SNARE Interactions Are Not Selective. JBC 274, 5649-5653.

# Lebenslauf

Name: Alexander Wilhelm  
Geburtsdatum: 04.12.1971  
Geburtsort: Pforzheim  
Adresse: Eleonore-Sterling-Str. 53  
60433 Frankfurt am Main

## Schulbildung

1978-1982 Grundschole in Pforzheim  
1982-1991 Kepler-Gymnasium in Pforzheim  
Juni 1991 Allgemeine Hochschulreife

## Studium

1993-1998 Studium der Biologie an der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main  
Oktober 1995 Diplomvorprüfung  
Februar 1998 Diplomprüfung (HF: Zoologie, NF: Mikrobiologie, Organische Chemie)  
April - September 1998 Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Zimmermann, AK Neurochemie des Zoologischen Institutes der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main mit dem Thema: "Molekularbiologische Markierung eines Vesikelproteins mittels Fremdepitop".  
seit Dez. 1998 Promotion bei Prof. Dr. W. Volkmandt im AK Neurochemie des Zoologischen Institutes der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main über das Thema: "Synaptische Proteine in Astrocyten".  
Okt. 1998 - Sep. 2000 Lehrbeauftragter der Fakultät der Humanmedizin der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main (Propädeutik Biologie für Mediziner).  
Dez. 1998 - Dez. 2000 angestellt als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des SFB 474.  
seit Jan. 2001 Stipendiat des Graduiertenkollegs "Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen" an der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main.