

Aus dem Zentrum für Neurologie und Psychiatrie  
der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

**Die Funktion des hyperpolarisations-aktivierten  
zyklisch Nukleotid-modifizierten (HCN-)  
Kationenkanals in primären Astrozyten  
unterschiedlichen Aktivierungszustandes *in vitro***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Helena Franziska Petereit  
aus Bergisch Gladbach Deutschland

promoviert am 31. Mai 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Dekan:                                   Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachterin:                    Professor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Rüger  
2. Gutachter:                        Universitätsprofessor Dr. med. D. Isbrandt

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:  
Frau Dr. med. Sabine Vay, Frau Prof. Dr. med. Dr. nat. med. Maria Adele Rüger

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. med. Sabine Vay von mir selbst ausgeführt und ausgewertet worden.

Die Tötung der Versuchstiere wurde von Frau Dr. med. Sabine Vay durchgeführt.

Zusätzlich erhielt ich eine finanzielle Unterstützung im Rahmen des „Köln Fortune Programms“ der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, 09.01.2023



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. Sabine Vay sowie meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Dr. nat. med. M. Adele Rüger, die mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke euch für eure ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit. Ihr habt mir professionell und persönlich sehr viel auf meinen Weg mitgegeben und hattet immer ein offenes Ohr für mich.

Ebenso bedanke ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor für ihren Rückhalt, für die ausgesprochen freundliche und wertschätzende Arbeitsatmosphäre sowie für eine intensive und erlebnisreiche gemeinsame Zeit. Ihr Alle habt mich stets mit hilfreichen Anregungen, produktiven Gesprächen und lieben Worten begleitet.

Des Weiteren gebührt mein Dank der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des „Köln Fortune Programms“.

Auch meinem Zweit-Gutachter Herrn Prof. Isbrandt möchte ich für seine engagierte Auseinandersetzung mit dieser Dissertation, seine Zuverlässigkeit und seine Begeisterung für die Thematik danken.

Meinen Eltern Sabine und Roland Petereit und meiner Großmutter U. Franziska Petereit danke ich aus tiefstem Herzen für ihre liebevolle Unterstützung während des Verfassens meiner Doktorarbeit und während meiner gesamten Studienzeit. Ihr wart und seid mein großer Rückhalt.

Meinem Lebensgefährten Maximilian Bieler möchte ich „Danke“ sagen für seine Geduld und seine Ermutigungen während des Erstellens dieser Dissertation. Mit deinem Vertrauen, deinem Mitgefühl und deiner Liebe warst und bist du für mich eine große emotionale Unterstützung.

Ich denke auch mit großem Dank an meinen lieben Freund Martin. Durch seine Erkrankung an einem Glioblastom hat er mir schmerzlich vor Augen geführt, wie wichtig unermüdliche medizinische Forschung ist. Danke, dass du immer an mich geglaubt hast. „Das Leben ist schön.“

Zusammenfassend danke ich allen Beteiligten, dass ihr mir die Möglichkeit gegeben habt diese Forschungserfahrung zu sammeln und mich sowohl fachlich als auch persönlich weiterzuentwickeln.

Vielen Dank!

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern Sabine und Roland Petereit.

Ohne euch hätte ich nie die Möglichkeit gehabt, das Studium der Humanmedizin zu absolvieren. Ich bin euch zutiefst dankbar für eure liebevolle Unterstützung und weiß

diese sehr zu schätzen!

Ich habe euch ganz doll lieb!

Eure Helena

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>10</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
2.1. Embryonale Entwicklung des Nervensystems	12
2.2. Das zentrale Nervensystem	12
2.2.1. Astrozyten	13
2.2.1.1. Charakterisierung	13
2.2.1.2. Funktionen	14
2.2.2. Neuroinflammation	15
2.2.2.1. Reaktive Astrozyten in der Neuroinflammation	16
2.2.3. Ionenkanäle der Astrozyten	17
2.3. Hyperpolarisations-aktivierter zyklisch Nukleotid-modifizierter Kationen (HCN-) Kanal	18
2.3.1. Aufbau, biophysikalische Eigenschaften und Regulation	18
2.3.2. Physiologische Bedeutung: Vorkommen und Funktion	20
2.3.2.1. Kardiales System	20
2.3.2.2. Nervensystem	20
2.3.3. HCN-Kanal assoziierte Erkrankungen	22
2.3.4. HCN-Kanal Blockade	23
2.3.3.1. ZD7288	23
2.3.3.2. Ivabradin	24
2.4. Ziele dieser Arbeit	25
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
3.1. Material	26
3.1.1. Zellen	26
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	26
3.1.3. Geräte und Zubehör	27
3.1.4. Selbsthergestellte Lösungen	28
3.1.5. Reagenzien und Puffer	28
3.1.6. Kits	30
3.1.7. Stimulantien	31

3.1.8. Primärantikörper	31
3.1.9. Sekundärantikörper	32
3.1.10. Software	32
3.1.11. Primer	33
<b>3.2. Methoden</b>	<b>34</b>
3.2.1. Primäre Astrozyten: Isolation und Kultivierung	34
3.2.2. Live/Dead Assay	35
3.2.3. Bromodeoxyuridin (BrdU) Proliferations Assay	36
3.2.4. Immunzytochemie	36
3.2.5. Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)	37
3.2.6. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)	38
3.2.7. Griess Assay	39
3.2.8. Boyden Chamber-Assay	40
3.2.9. Scratch-Test	40
3.2.10. Datenverarbeitung	41
3.2.11. Statistische Auswertung	41
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
4.1. Die Aktivierung von Astrozyten in einem proinflammatorischen Milieu	42
4.1.1. Folgen der Aktivierung auf grundlegende Zellfunktionen	43
4.1.2. Immunologische Veränderungen der Aktivierung von Astrozyten	46
4.2. Astrozyten exprimieren den HCN-Kanal auf mRNA und Proteinebene	49
4.2.1. Einfluss der Aktivierung von Astrozyten auf die HCN-Kanal Expression	50
4.2.2. Einfluss der HCN-Kanal Aktivität auf ruhende und reaktive Astrozyten: Morphologie und Aktivierungsmarker	51
4.2.3. Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf ruhende und reaktive Astrozyten: Überleben, Proliferation und Migration	54
4.2.4. Immunologische Auswirkungen der HCN-Kanal Blockade auf ruhende und reaktive Astrozyten	61
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>66</b>
5.1. Astrozyten wurden durch pro-inflammatorische Stimulation in einen reaktiven Phänotyp überführt	66
5.1.1. Die Aktivierung von Astrozyten führte zu einer hypertrophen Morphologie und einer Aktivierung des NF-κB Signalwegs	66
5.1.2. Einfluss der Aktivierung von Astrozyten auf Proliferation, Migration und Überleben	68

5.1.3. Reaktive Astrozyten spielen eine Rolle in der Immunkompetenz des zentralen Nervensystems	69
5.2. Ruhende und reaktive Astrozyten exprimieren den HCN-Kanal	70
5.2.1. Der HCN-Kanal als Ionenkanal der Astrozyten; Auswirkungen auf Morphologie und Aktivierungsmarker	71
5.2.2. Effekte der HCN-Kanal Blockade auf Überleben, Proliferation und Migration der Astrozyten	72
5.2.3. Der Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Immunkompetenz der Astrozyten	74
5.3. Einordnung der Ergebnisse in den klinischen Kontext der Neuroinflammation	75
5.4. Fazit und Ausblick	77
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>78</b>
<b>7. ANHANG</b>	<b>89</b>
7.1. Tabellenverzeichnis	89
7.2. Abbildungsverzeichnis	90
<b>8. VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN</b>	<b>91</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AUC	Area under the curve
BrdU	Bromdesoxyuridin
C1q	Komplementkomponente 1q
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium Ionen
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CC3	Komplementkomponente C3
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cl <sup>-</sup>	Chlorid Ionen
C-terminale Domäne	Carboxy-terminale Domäne
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
FBS	Fetales Kälber Serum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HCN-Kanal	Hyperpolarisations-aktivierter zyklisch Nukleotid-modifizierter Kationen Kanal
Hoechst 33342	2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochloride
ICC	Immunzytochemie
IL	Interleukin
IFN-γ	Interferon-γ
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium Ionen
Kir4.1	Kaliumionen Kanal 4.1 vom Einwärtsgleichrichter-Typ
Ki-67	(Ki – Kiel) 67
LPS	Lipopolysaccharide
L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanal	Hochspannungsregulierter Kalziumkanal
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
mRNA	Botenstoff-Ribonukleinsäure
Na <sup>+</sup>	Natrium Ionen
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NKCC1	Natrium – Kalium – 2 Chlorid – Kotransporter, Typ 1

NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionen Konzentration
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
RT-qPCR	Real-time quantitative Polymerase Kettenreaktion
S100	S100; Kalzium bindendes Protein
SNAT3	Sodium-dependent neutral amino acid transporter 3
Stat 3	Signal Transduktor und Aktivator der Transkription 3
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanal	Niedrigspannungsregulierter Kalziumkanal
ZD7288	N-Ethyl-1,6-dihydro-1,2-dimethyl-6-(methylimino)-N- phenyl-4-pyrimidinamine hydrochloride
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Zusammenfassung

Astrozyten sind die häufigsten Gliazellen des Gehirns. Sie regulieren die Homöostase und können auf Schäden des Zentralnervensystems sowie auf neuroinflammatorische Prozesse durch Proliferation, Hypertrophie und Veränderungen ihrer Ionenkanalexpression reagieren. Bisherige Studien konnten eine erhöhte Expression von hyperpolarisationsaktivierten zyklischen Nukleotid-modifizierten Kationen (HCN-) Kanälen in postischämischen Astrozyten nachweisen, deren Rolle in der Aktivierung von Astrozyten aber bislang unverstanden ist.<sup>1,2</sup>

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese war, dass die HCN-Kanalaktivität von Astrozyten durch deren Aktivierungszustand reguliert wird und auf grundlegende Funktionen, wie die Proliferation, die Migration und die Immunkompetenz der Astrozyten Einfluss nimmt. Ziel dieser Arbeit war es daher, in primärer Zellkultur aktivierte Astrozyten zu etablieren und charakterisieren sowie in diesem System die Rolle von HCN-Kanälen zu untersuchen.

Hierfür wurden Astrozyten aus der Ratte in primärer Zellkultur angezüchtet und mithilfe eines Zytokingemisches, bestehend aus TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ , in einen aktivierten Zustand überführt. Um die Rolle des HCN-Kanals auf Astrozyten zu untersuchen, wurde dieser mit Ivabradin oder ZD7288 in verschiedenen Konzentrationen pharmakologisch inhibiert. Es schlossen sich Untersuchungen zur Astrozytenmorphologie, ihres Proliferations- und Migrationspotentials sowie ihrer Immunkompetenz an.

Die Expression von HCN-Kanälen - überwiegend des HCN2-Kanals - wurde auf primären Astrozyten *in vitro* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen. Die Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokingemisch führte zu einer deutlichen Aktivierung der Astrozyten, charakterisiert durch eine hypertrophierte Morphologie sowie eine Verschiebung der NF- $\kappa$ B-Proteinexpression vom Zytoplasma in den Zellkern. Die IL-6-Genexpression stieg in aktivierten Astrozyten auf das 2,7-fache, die IL-1 $\beta$ -Genexpression auf das 7,7-fache ( $p < 0,05$ ), und die iNOS-Genexpression auf das 40,8-fache an ( $p < 0,05$ ). Obwohl sich das Expressionsniveau der HCN-Kanäle nach Aktivierung der Astrozyten nicht änderte, verringerten nur die aktivierten Astrozyten ihre Proliferationsrate nach Behandlung mit ZD7288 (21,8 %) oder Ivabradin (26,8 %) signifikant im Vergleich zur Kontrolle, gemessen mittels Ki-67 RT-qPCR ( $p < 0,01$ ). Auch die Migrationsrate aktivierter Astrozyten, gemessen mittels Scratch-Tests, wurde durch die HCN-Kanalblockade mit ZD7288 (10  $\mu$ M) sowie Ivabradin (30  $\mu$ M) 32 Stunden nach Versuchsbeginn signifikant gehemmt ( $p < 0,05$ ). Auf die Immunkompetenz der aktivierten Astrozyten hatte die Behandlung mit ZD7288 oder Ivabradin nur einen geringen Effekt: Ausschließlich die IL-10 Expression sank nach HCN-Kanalblockade in aktivierten

Astrozyten auf das 0,24 fache ( $p < 0,05$ ) ab. Interessanterweise gab es in ruhenden Astrozyten keine nachweisbaren Veränderungen durch die Blockade von HCN-Kanälen. Zusammenfassend beeinflusste die Blockade von HCN-Kanälen das Proliferations- und Migrationspotential aktivierter Astrozyten relevant, während sie die Immunkompetenz nur geringfügig veränderte. Ruhende Astrozyten wurden durch die HCN-Kanalblockade nicht beeinflusst. Die vorliegende Studie legt damit nahe, dass wesentliche Funktionen aktivierter Astrozyten über HCN-Kanäle vermittelt werden. Allerdings sind weitere Untersuchungen zur Rolle von astrozytären HCN-Kanälen im Rahmen von ZNS-Pathologien erforderlich, um Astrozyten in Zukunft modulieren zu können und so neue therapeutische Ansätze für neurologische Erkrankungen zu entwickeln.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Embryonale Entwicklung des Nervensystems**

Das humane Nervensystem entwickelt sich aus dem epithelialen Ektoderm, das in der dritten Schwangerschaftswoche aus dem Epiblasten der zweischichtigen Keimscheibe entsteht. Dabei stellt das nach der Neurulation gebildete Neuralrohr unter anderem den Ursprung des späteren zentralen Nervensystems dar, ist aber zusätzlich an der Entwicklung des peripheren Nervensystems, bspw. an der Axonbildung der Motoneurone, beteiligt. Der Großteil des peripheren Nervensystems wird hingegen von Zellen der Neuralleiste gebildet, die während der Neurulation aus dem Ektoderm abgeschieden werden. Die Unterscheidung zwischen zentralem und peripherem Nervensystem erfolgt rein topografisch und kann schon in diesem sehr frühen Entwicklungsstadium nachvollzogen werden. Auf zellulärer Ebene ist bekannt, dass sich Gliazellen aus einem gemeinsamen Vorläufer, dem Glioblasten entwickeln. Aus diesem entstehen die Astrozyten und Oligodendrozyten. Mikroglia, als Zellen des Immunsystems, gelten als die einzigen Gliazellen mesenchymalen Ursprungs.<sup>3</sup>

### **2.2. Das zentrale Nervensystem**

Das zentrale Nervensystem (ZNS) wird unterteilt in Rückenmark und Gehirn. Es übernimmt wesentliche körperliche Funktionen, wie die Steuerung der Motorik, Aufnahme und Verarbeitung sensibler Reize und die Regulation vegetativer Funktionen. Makroskopisch lässt es sich in eine graue Substanz, bestehend aus Perikarya der Neurone, und eine weiße Substanz, bestehend aus den Axonen der Neurone, unterteilen. Mikroskopisch betrachtet besteht es aus Neuronen und Gliazellen. Zu den bekanntesten Vertretern der zentralen Gliazellen gehören die Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Mikroglia. Die Bedeutung dieser Zellen wird besonders deutlich bei Betrachtung der Tatsache, dass Gliazellen in zehnmal höherer Anzahl im zentralen Nervensystem vorkommen als Neurone, wobei Astrozyten die am häufigsten vorkommenden Gliazellen sind.<sup>4</sup>

## 2.2.1. Astrozyten

### 2.2.1.1. Charakterisierung

Astrozyten sind nicht nur die häufigsten Gliazellen des zentralen Nervensystems, sondern auch die größten. Ihr Zellkern ist ca. 10 µm groß, weshalb sie der Gruppe der Makroglia zugeordnet werden.<sup>5</sup> Ihre typische morphologisch sternförmige Struktur ist durch einen zentralen Zellkern mit langen Fortsätzen gekennzeichnet, die ausschlaggebend für die Namensgebung sind. Anhand dieser Fortsätze werden verschiedene Formen der Astrozyten unterschieden, die in verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems vorkommen. Die fibrinösen Astrozyten besitzen lange, in der Maus bis zu 300 µm lange, schmale und wenig verzweigte Fortsätze, mit einem geringen Oberflächen-zu-Volumen Verhältnis von  $<5 \mu\text{m}^{-1}$  (in der Maus). Sie befinden sich bevorzugt in der weißen Substanz von Rückenmark und Gehirn. Ihre Zellkerne liegen häufig aneinandergereiht zwischen den Axonen der Neurone. Der protoplasmatische Astrozytentyp hingegen zeichnet sich durch breitere und kürzere, kleiner als 50 µm lange Fortsätze aus, die stärker verzweigt und reich an Glykogen und Zytoplasma sind. Er befindet sich hauptsächlich in der grauen Substanz des zentralen Nervensystems.<sup>6</sup>

Beide Astrozytenarten unterscheiden sich zusätzlich in ihrer Expression von glial fibrillary acidic protein (GFAP), das als Antigen zur Identifikation von Astrozyten zum Beispiel in immunhistochemischen Verfahren verwendet wird. Dabei handelt es sich um ein Intermediärfilament, das im Zytoplasma von einigen Zelltypen des Nervensystems, aber auch des enterischen Systems, vermehrt allerdings in Astrozyten exprimiert wird. Bei den fibrinösen Astrozyten ist im Vergleich zum protoplasmatischen Typ die Synthese des GFAPs deutlich erhöht.<sup>6</sup>

Neben dem GFAP sind weitere Strukturelemente der Astrozyten bekannt, die als Antigene bei der Identifikation der Zellen herangezogen werden. Dazu gehören unter anderem das Vimentin, als weiteres Intermediärfilament, die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), als Enzym der Infektabwehr, oder das S100β, ein Protein mit vielfältigen regulatorischen Funktionen.<sup>7, 8, 9</sup> Die Expression dieser Moleküle kann sich dabei abhängig vom Zustand der Zelle verändern. So wird zum Beispiel eine erhöhte GFAP Expression bei reaktiven – also aktivierten – Astrozyten beobachtet.<sup>6</sup>

### 2.2.1.2. Funktionen

Astrozyten besitzen vielfältige Funktionen im zentralen Nervensystem. Durch ihre Fortsätze erfüllen sie eine wichtige Stützfunktion für umliegende Zellen, sind strukturgebend für ein dreidimensionales Netzwerk und verleihen dem Gehirn seine Konsistenz. Nach einer Schädigung von Gehirngewebe steigt ihre Proliferation, wodurch eine Narbenbildung induziert wird. Darüber hinaus bilden sie mit ihren Fortsätzen die *membrana limitans gliae superficialis*, die Abgrenzung des ektodermalen Hirngewebes vom mesenchymalen Subarachnoidalraum. An den Stellen, an denen Blutgefäße ins Hirngewebe eindringen, ummanteln sie diese und bilden dadurch einen wichtigen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke. Mit ihren Endfüßen sind sie am Austausch zwischen Blut und Hirngewebe beteiligt und beeinflussen dadurch die Nährstoffversorgung der Neurone. Erst ihr enger Kontakt zu den Endothelien der Kapillaren bewirkt die Ausbildung der Tight junctions, die einen parazellulären Transport von Molekülen verhindern.<sup>10</sup>

Zusätzlich zu den strukturellen Funktionen sind Astrozyten an der Erhaltung der Homöostase des zentralen Nervensystems beteiligt. Diese Aufgabe erfüllen sie durch ihre Beteiligung an Transportvorgängen. Nach der Freisetzung von Kalium-Ionen durch Aktionspotentiale der Nervenzellen nehmen Astrozyten das Kalium durch verschiedene Kanäle, wie beispielsweise den Kalium- (Kir4.1) Kanal sowie den NKCC1 (Na-K-Cl-Kotransporter) wieder auf und beschleunigen die Hyperpolarisation, sodass ein erneutes Aktionspotential an der Nervenzelle ausgelöst werden kann.<sup>11, 12</sup> Auch an der Aufrechterhaltung des pH-Werts sind Astrozyten maßgeblich beteiligt. Der zugrunde liegende Signalmechanismus beinhaltet die aktivitätsabhängige Freisetzung von ATP, der die Bikarbonatsekretion durch Astrozyten und den erleichterten Bikarbonat-Transport nach außen fördert.<sup>13</sup>

Eine weitere Funktion der Astrozyten besteht in der Unterstützung neuronaler Funktionen sowohl auf struktureller als auch auf funktioneller Ebene. Strukturell gesehen trennen Astrozyten die Synapsen von ihrer Umgebung ab, sodass die Neurotransmitter ausschließlich in den synaptischen Spalt gelangen und auf die beabsichtigten Neurone wirken. Auf funktioneller Ebene sind Astrozyten am Transmitterabbau beteiligt. Sie können die Transmitter aufnehmen, abbauen und als inaktive Produkte sezernieren. Neurone können diese inaktiven Transmitterabbauprodukte wieder aufnehmen und erneut zu aktiven Neurotransmittern verstoffwechseln.<sup>10</sup> D-Serin, ein Ko-Agonist des glutamatergen NMDA-Rezeptors kann beispielsweise durch extrazelluläres ATP aus Astrozyten freigesetzt werden.<sup>14</sup> Dadurch können Astrozyten Einfluss auf synaptische Übertragungsprozesse nehmen und diese regulieren.

Eine weitere wichtige Funktion der Astrozyten besteht in der Kontrolle und Modulation der Synaptogenese. Es konnte festgestellt werden, dass Synapsen nur ausgebildet werden können, wenn Astrozyten aus derselben Hirnregion anwesend sind.<sup>15</sup> Weitere Untersuchungen bezüglich des zugrundeliegenden Mechanismus konnten zwei unterschiedliche Arten der Induktion aufdecken. Es konnte festgestellt werden, dass der physikalische Kontakt von Astrozyten zu Neuronen eine Steigerung der Anzahl und Funktion der ausgebildeten Synapsen bedingt.<sup>16</sup> Dieser Mechanismus scheint besonders in embryonalen Zellen von besonderer Bedeutung zu sein.<sup>6</sup> Als weiterer Mechanismus wurde die Sekretion synaptogener Faktoren beschrieben, die sich für die Entwicklung postnataler Synapsen als unerlässlich erwiesen hat. Einer dieser Faktoren ist das Thrombospondin. Es ist an der strukturellen Bildung der Synapsen beteiligt. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass durch die Zugabe von Thrombospondin zu Ganglienzellen die Anzahl der Synapsen auf das gleiche Ausmaß wie nach der Zugabe von Astrozyten anstieg. Daraus konnte geschlossen werden, dass Thrombospondin eines der von Astrozyten sekretierten Proteine der Synaptogenese ist. Dabei variiert die Menge der sekretierten Faktoren abhängig vom Entwicklungsstand des neuronalen Netzwerks sowie vom Aktivierungszustand der Astrozyten.<sup>17, 18</sup>

### **2.2.2. Neuroinflammation**

Schon seit längerem ist bekannt, dass entzündliche Prozesse an den meisten neurologischen Erkrankungen, wie einem ischämischen Schlaganfall, einem Trauma oder neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind und die Regeneration entscheidend beeinflussen.<sup>19, 20, 21, 22</sup> Aktuellen Studien zufolge konnte einerseits festgestellt werden, dass eine zu starke Inflammation im geschädigten Hirngewebe und den umliegenden Hirnarealen Reparaturvorgänge behindert, andererseits konnten ebenso positive Effekte der Entzündungsreaktion beobachtet werden.<sup>23</sup> So sendet das inflammatorische Milieu Signale aus, die Regenerationsprozesse initiieren indem sie zum Beispiel degeneratives Gewebe eliminieren.<sup>24</sup> Um die Regeneration zu fördern und eine weitere Schädigung des Gewebes zu vermeiden ist die Regulation der Entzündungsreaktion von entscheidender Bedeutung.<sup>25</sup> Einer dieser immunzellaktivierenden und regulatorisch wirkenden Zelltypen des zentralen Nervensystems ist der Astrozyt.<sup>26</sup>

### 2.2.2.1. Reaktive Astrozyten in der Neuroinflammation

Neuroinflammation führt zur Aktivierung von Astrozyten und zu komplexen Umbauvorgängen innerhalb der Zelle, die zu einem Übergang in reaktive Phänotypen führen.<sup>27</sup> Gemessen werden kann diese Aktivierung durch einen Anstieg der GFAP Expression. Neben der reinen Identifikation der Astrozyten wurde nach der Entdeckung der cDNA Sequenz für GFAP die Beschreibung der Expressionsstärke dieses Gens möglich und folglich auch das Aktivierungslevel bestimmbar.<sup>28</sup> So konnte festgestellt werden, dass Astrozyten auf eine große Anzahl von unterschiedlichen Schädigungen des Gehirns, wie beispielweise ein Trauma, einen Schlaganfall, oder neurodegenerative Erkrankungen reagieren.<sup>29, 30, 31</sup> GFAP wurde als Standard Protein zur Analyse der Aktivität von Astrozyten festgelegt, obwohl mittlerweile bekannt ist, dass auch andere Zellarten, insbesondere Progenitorzellen vermehrt GFAP exprimieren.<sup>32</sup> Neben dem GFAP sind inzwischen weitere Strukturen, wie das Vimentin bekannt dessen Genexpression während der Aktivierung von Astrozyten gesteigert wird und daher zusätzlich zum GFAP gemessen werden kann.<sup>33</sup>

Astrozyten sind immunkompetente Zellen. Bei Verletzungen des zentralen Nervensystems sind sie entscheidend an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Über die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen können sie Zellen des adaptiven Immunsystems aktivieren.<sup>34</sup> Seit einigen Jahren ist bekannt, dass es mehrere Aktivierungsformen von Astrozyten gibt. Ähnlich wie Makrophagen und Mikroglia können auch Astrozyten anhand von unterschiedlichen Genexpressionsprofilen in einen pro-(neuro-)inflammatorischen (A1-) und einen anti-inflammatorischen/ immunsuppressiven (A2-)Typ unterschieden werden. Gezeigt werden konnte dieser Mechanismus in tierexperimentellen Studien an Mäusen, in denen entweder eine intraperitoneale Injektion mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) zur Induktion einer generalisierten Inflammation im ZNS, oder ein Verschluss der mittleren zerebralen Arterie zur Induktion eines ischämischen Schlaganfalles durchgeführt wurde. Dabei führte die Stimulation mit LPS zu einer Ausbildung des A1-Phänotyps, die zerebrale Ischämie hingegen überwiegend zur Induktion des A2-Phänotyps.<sup>35</sup> Während der A1-Typ hauptsächlich die Inflammation verschärft und eine Verringerung der Synapsenbildung von Neuronen bewirkt, unterstützt der A2-Typ überwiegend reparative Funktionen im ZNS, indem er vermehrt neurotrophe Faktoren ausschüttet, die das Überleben und Wachstum von Neuronen fördern.<sup>33</sup> Der physiologische Ablauf der Überführung von Astrozyten in einen reaktiven Zustand sowie die Trigger Faktoren zur Induktion des A1- und A2-Typs sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Für den A1-Typ ist bereits bekannt, dass er von Mikroglia über proinflammatorische Zytokine, wie dem Interleukin-1alpha (IL-1 $\alpha$ ), dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und der Komplementkomponente 1q (C1q) induziert

werden kann.<sup>36</sup> Es ist allerdings anzunehmen, dass ähnlich wie in Mikroglia, ein kontinuierliches Spektrum der Aktivierungstypen existiert.<sup>37</sup>

*In vivo*-Studien an ZNS-Traumata konnten zeigen, dass der Verlust von reaktiven Astrozyten in der Frühphase nach Schädigung zu gesteigerten motorischen Defiziten, einer Narbendesorganisation, einer gesteigerten und persistierenden Inflammation, Schäden der Blut-Hirn-Schranke, einer Demyelinisierung und Zelluntergang von Neuronen führt.<sup>26</sup> Ein Verlust der reaktiven Astrozyten in der chronischen Phase hingegen bewirkt eine Verbesserung der Krankheitserscheinung und verringerte Leukozyteninfiltrate.<sup>38</sup> Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Aktivierungstyp der Astrozyten nicht nur vom Kontext der Inflammationsentstehung, sondern auch von der Zeit der Schädigung abhängig ist.<sup>26</sup>

### **2.2.3. Ionenkanäle der Astrozyten**

Wie bereits in Kapitel 2.2.1.2. beschrieben, sind Astrozyten an der Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts beteiligt. Sie können beispielsweise durch verschiedene spannungsabhängige und ligandenabhängige Ionenkanäle Kaliumionen aufnehmen, die durch neuronale Aktionspotentiale in den Extrazellularraum abgegeben wurden. Dadurch beeinflussen sie das Ruhemembranpotential aller Zellen des zentralen Nervensystems und nehmen Einfluss auf deren Funktionsfähigkeit. Neuronen ermöglichen sie eine schnelle Abfolge von Aktionspotentialen, indem sie die Repolarisation beschleunigen. Sie verfügen über ein ausgeprägtes Netz von Gap Junctions, das eine schnelle Verteilung der Ionen in benachbarte Areale ermöglicht und so einerseits das Absinken des Ruhemembranpotentials verhindert, andererseits die Kaliumionen Konzentration in weiter entfernten Arealen nur geringfügig ansteigen lässt. Astrozyten selbst sind nicht in der Lage Aktionspotentiale zu bilden, da ihre Leitfähigkeit für andere Ionen im Verhältnis zu ihrer Kaliumionenleitfähigkeit zu gering ist. Deshalb können sie keinen direkten Einfluss auf die Informationsweiterleitung nehmen.<sup>39</sup>

Neben Kaliumionenkanälen wie dem Kir4.1 oder dem NKCC1 (Na-K-Cl-Kotransporter) sowie Chlorid-Ionen Kanälen wie dem ClC-2 besitzen Astrozyten auch Ionenkanäle für den Transport von Calcium- und Natriumionen.<sup>40, 41</sup> Diese Ionen übernehmen hauptsächlich regulative Funktionen von molekularen Signalwegen.<sup>42</sup> In neusten Studien konnte beispielsweise durch Knockout des astrozytären CAV1.2-Calciumionen Kanals in Mäusen gezeigt werden, dass ein reduzierter Calcium-Ionen Einstrom in Astrozyten während einer Demyelinisierung des zentralen Nervensystems zu einer verminderten Inflammation des Gehirns sowie gesteigerter Remyelinisierung *in vivo* führt.<sup>43</sup> Insgesamt lässt sich festhalten, dass die meisten Funktionen der Astrozyten von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Ionen und ihrer Kanäle reguliert und aufrechterhalten

werden, sodass ein Verständnis dieser Kanäle als unerlässlich für ein besseres Verständnis astrozytärer Funktionen und damit auch zentralnervöser und pathologischer Prozesse erscheint.

## **2.3. Hyperpolarisations-aktivierter zyklisch Nukleotid-modifizierter Kationen (HCN-) Kanal**

### **2.3.1. Aufbau, biophysikalische Eigenschaften und Regulation**

Der HCN-Kanal ist ein spannungsabhängiger Kationenkanal aus der Familie der Porenschleifenkanäle, der Natriumionen und Kaliumionen in einem Verhältnis von 1:4 leitet.<sup>2</sup> Er besteht aus vier Proteinuntereinheiten (HCN1-4), die sich zu vier biophysikalisch unterschiedlichen Homotetrameren zusammenlagern und in der Mitte eine Pore für den Durchtritt der Ionen bilden. Jede dieser Untereinheiten enthält eine zytoplasmatische C-Domäne, an der eine Modulation durch cAMP-Bindung erfolgt und eine Transmembrandomäne, die den eigentlichen Kanal bildet.<sup>44</sup> Innerhalb der Transmembrandomäne liegt ein Spannungssensor, bestehend aus positiv geladenem Arginin oder Lysin. Bei Verschiebung dieser Aminosäuren in Richtung des Zellinneren, wie es bei der Hyperpolarisation aufgrund des übermäßigen Ausflusses positiv geladener Ionen, vor allem Kaliumionen, aus der Zelle in den Extrazellularraum stattfindet, erfolgt eine Öffnung des HCN-Kanals und damit, bedingt durch den Natrium- und Kaliumionen Einfluss, die erneute Einleitung einer Depolarisation. Dieser strukturelle Aufbau unterscheidet sich von den meisten anderen Ionenkanälen, die durch eine Depolarisation aktiviert werden und bedingt die besondere physiologische Bedeutung des HCN-Kanals.<sup>44</sup>

Innerhalb der Gruppe der HCN-Kanäle unterscheiden sich alle vier Kanaltypen hinsichtlich ihrer Spannungsabhängigkeit. Während die halbmaximale Aktivierung der HCN1-Kanäle bei -70 mV liegt, liegen diese Werte für den HCN2-Kanal bei -95 mV, den HCN3-Kanal bei -77 mV bis -95mV und den HCN4-Kanal bei -100 mV. Auch in der Aktivierungskinetik der vier Isoformen existieren Unterschiede. So öffnet sich der HCN1-Kanal spannungsabhängig mit einem Tau (Zeitkonstante bei der 63,2 % der Kanäle geöffnet sind) von 25-300 ms am schnellsten.<sup>44</sup>

Eine weitere Schlüsselfunktion besteht in der Modulation des HCN-Kanals durch direkte Bindung von cAMP an die cAMP-Binderegion der C-Domäne. Sie beschleunigt die HCN-Kanal-Öffnung und verschiebt die Öffnungswahrscheinlichkeit zu positiveren Potentialen, sodass bereits bei einer geringeren Hyperpolarisation die Leitfähigkeit des Ionenkanals ansteigt.<sup>45</sup> Der Effekt von cAMP unterscheidet sich bezüglich der

verschiedenen Subtypen und ist für den HCN2- und HCN4-Kanal am größten.<sup>44</sup> Die Untersuchung des HCN-Kanals in Seeigelsperma konnte zeigen, dass in Abwesenheit von cAMP eine spannungsabhängige Inaktivierung des Kanals erfolgt.<sup>46</sup> Es wurden zwei verschiedene Modi des HCN-Kanals entdeckt, die bei Änderung des Konformitätsstatus wechseln können. Im ersten Modus des Kanals erfolgt eine Öffnung bei starker Hyperpolarisation, während im zweiten Modus die Öffnung bereits bei zusätzlichen +50 mV erfolgt.<sup>47</sup> Dieses Verhalten konnte sowohl für den HCN1-Kanal als auch den HCN2-Kanal in abgeschwächter Form beobachtet werden.<sup>44</sup>

Die Regulation des HCN-Kanals erfolgt durch viele verschiedene Moleküle. Ein häufiger allosterischer Agonist ist das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), ein Membranlipid, das nach Bindung am allosterischen Zentrum die Spannungsgrenze zur Öffnung des Kanals um 20 mV in Richtung positiverer Potentiale verschiebt.<sup>44</sup> Ein weiterer sehr wichtiger Regulationsweg verläuft über die Konzentration von Protonen im Zytoplasma der Zellen und ist somit abhängig von pH-Wertänderungen, wie sie zum Beispiel nach Ischämien bedingt durch einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vorkommen. Es konnte festgestellt werden, dass eine Steigerung der intrazellulären Protonenkonzentration die Spannungsabhängigkeit des HCN-Kanals in Richtung negativerer Potentiale verschiebt und seine Öffnungsgeschwindigkeit senkt. Für den HCN2-Kanal konnte eine Struktur, bestehend aus protonierbaren Histidinresten, identifiziert werden, die dem Kanal seine pH-Wert Sensitivität verleiht.<sup>48</sup> Die Untersuchungen zeigten auch, dass ein intrazellulärer pH-Wert von 6,0 die Spannungsgrenze zur Öffnung des HCN2-Kanals um 10 mV in Richtung Hyperpolarisation verschieben konnte, während ein intrazellulärer pH-Wert von 9,0 diese um den gleichen Betrag in Richtung Depolarisation verschob. Die durch Azidose ausgelöste Inhibition des HCN-Kanals scheint besonders für pathophysiologische Prozesse von entscheidender Bedeutung zu sein.<sup>48</sup>

Neben den beiden genannten Regulationsmechanismen existieren noch einige weitere, wie eine Inhibition des HCN2-Kanals in Folge einer erhöhten intrazellulären Chloridionenkonzentration,<sup>49</sup> oder eine erhöhte Aktivierungskinetik durch Phosphorylierung des HCN2-Kanals, bedingt durch eine Thyrosinkinase.<sup>50</sup>

### **2.3.2. Physiologische Bedeutung: Vorkommen und Funktion**

Die Expression des HCN-Kanals ist für verschiedene Gewebearten bekannt. In besonders großen Mengen wird er im Nervensystem und in Herzzellen exprimiert.<sup>51</sup> Aber auch in den B-Zellen der Langerhans-Inseln, in der glatten Muskulatur der Pfortader, im enterischen Nervensystem sowie in Mikroglia konnten HCN-Kanal Transkripte nachgewiesen werden.<sup>52, 53, 54, 55</sup>

#### **2.3.2.1. Kardiales System**

Bekannt ist der HCN-Kanal in den sinuatrialen Zellen des Herzens, in denen er an der Auslösung des Schrittmacherpotentials und damit an der Regulation der Herzfrequenz beteiligt ist. Durch seine besondere Eigenschaft, sich während der Hyperpolarisation zu öffnen, erzeugt er durch den Einstrom von Kalium- und Natriumionen die frühe diastolische Spontandepolarisation, woraufhin sich die spannungsabhängigen T-Typ- und L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle öffnen.<sup>39</sup> Die Anhebung des Membranpotentials von -65 mV auf -45 mV, bedingt zu 80 % durch den HCN4-Kanal, reicht aus, um den Schwellenwert der T-Typ- und L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zu überschreiten und eine Erregung der Vorhöfe sowie des AV-Knotens auszulösen.<sup>51</sup> Neben der reinen Erzeugung der Erregung ist der HCN-Kanal auch entscheidend an der Regulation der Herzrate beteiligt. Durch die sympathische Freisetzung von cAMP über  $\beta$ -Adrenozeptoren verschiebt sich die Spannungsabhängigkeit des HCN-Kanals in Richtung positiverer Potentiale, sodass sich die Öffnungswahrscheinlichkeit zu einem früheren Zeitpunkt der Hyperpolarisation erhöht und die Herzrate ansteigt.<sup>56</sup>

#### **2.3.2.2. Nervensystem**

Die HCN-Kanal Genexpression in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems ist seit längerem bekannt und unterscheidet sich hinsichtlich der exprimierten Subtypen deutlich in der Lokalisation innerhalb des Nervensystems.<sup>57</sup> Ähnlich wie im kardialen System existieren auch im Nervensystem neben der Beteiligung an der Erzeugung von Depolarisationen weitere Funktionen des HCN-Kanals. Ein Beispiel ist die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials. Da der HCN-Kanal in Höhe des Ruhemembranpotentials geöffnet ist, erfolgt ein kontinuierlicher Einwärtsstrom von Kationen in die Neurone, wodurch sich die Spannung in Richtung positiverer Potentiale verschiebt.<sup>51</sup> Geringe Schwankungen im Membranpotential, bedingt durch andere Ionenflüsse, können durch Absenken des Membranwiderstands, infolge der HCN-Kanal Öffnung, vermindert und so das Membranpotential stabilisiert werden.<sup>58</sup>

Auch an speziellen neuronalen Funktionen scheint der HCN-Kanal in besonderer Weise beteiligt zu sein. So übernimmt der HCN1-Kanal in der Überführung dendritischer exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (EPSPs) in axonale Aktionspotentiale eine entscheidende Rolle.<sup>59</sup> Vor allem für die zeitliche Summation eintreffender EPSPs an den Soma der Neurone scheint er ebenfalls relevant zu sein. Seine Expressionsdichte steigt in den peripher gelegenen Dendriten an, sodass eine Deaktivierung des HCN-Kanals eine Hyperpolarisation der Membran verursacht und den Zerfall der EPSPs beschleunigt, wodurch diese insgesamt zeitlich verkürzt, aber auch schneller geleitet werden. Dadurch treffen periphere und zentrale EPSPs zeitgleich am Soma ein und die zeitliche Summation wird verstärkt.<sup>51</sup> An Funktionen, wie der Kontrolle des Arbeitsgedächtnisses, dem motorischen Lernen, der hippocampalen Langzeitpotenzierung und der Angstregulation konnte ebenfalls eine Beteiligung des HCN-Kanals nachgewiesen werden.<sup>60, 61, 62, 63</sup>

Neueste Studien zur Funktionalität des HCN-Kanals im Nervensystem deuten darauf hin, dass die HCN-Kanaluntereinheiten eine relevante Funktion in der embryonalen Entwicklung des Kortex spielen. In der Studie von Schlusche et al. konnte gezeigt werden, dass die Expression der HCN1- sowie HCN2-Kanal Untereinheiten während der embryonalen Entwicklung des Frontalhirns der Maus im zeitlichen Verlauf ansteigt, die der HCN3 sowie HCN4 Untereinheiten jedoch nach einem Höhepunkt am 15. Tag der embryonalen Entwicklung wieder abfällt. Ein Verlust der HCN-Kanal Funktion neuronaler Stammzellen, erzeugt durch pharmakologische Inhibition oder embryonale Ablation beeinträchtigte die Zellzyklusprogression von der G1 in die S-Phase und führte zu einer verminderten Proliferation mit dem Ergebnis der Entwicklung einer Mikrokephalie.<sup>64</sup>

Bisher wurden insbesondere die Schrittmacherfunktionen des HCN-Kanals für elektrisch leitende Zellen wie Neurone oder kardiale Sinusknotenzellen untersucht. Die Funktionen des HCN-Kanals auf anderen, nicht exzitatorischen Zelltypen, besonders im Nervensystem, sind erst vor Kurzem in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses gerückt. Eine aktuelle Studie von Vay et al. konnte zuletzt nicht nur die Expression des HCN-Kanals auf Mikroglia belegen, sondern auch mehrere Funktionen des Ionenkanals aufdecken. Dabei zeigte sich, dass der HCN-Kanal für die Entwicklung der Immunkompetenz von Mikroglia, wie der Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine unerlässlich ist. Zusätzlich war eine Blockade des HCN-Kanals mit einer gesteigerten Überlebensrate sowie einer verminderten Proliferation ruhender Mikroglia assoziiert.<sup>55</sup>

Rusnakova et al. waren die Ersten, die durch Genexpressionsanalysen einzelner Zellen HCN-Kanal Transkripte auf Astrozyten der Maus nachweisen konnten. Während in

ruhenden Astrozyten nur eine HCN2-Genexpression nachgewiesen werden konnte, stieg die Expression 14 Tage nach Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie für die HCN1-3 Kanäle an.<sup>1</sup> Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Studie von Pavel Honsa und Kollegen. In der RT-qPCR stieg die relative Expression der HCN1-4-Kanäle kortikaler Astrozyten der Maus 14 Tage nach Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie an. Honsa und seine Kollegen waren die Ersten, die mithilfe immunhistochemischer Färbungen von Astrozyten HCN1-3-Kanäle auf Proteinebene nachweisen konnten. Als weitere Methode nutzten sie die patch-clamp Technik, bei der sie elektrophysiologische Veränderungen der Astrozyten nach Ischämie, bedingt durch den HCN-Kanal, finden konnten. Post-ischämische Astrozyten zeigten eine signifikante Depolarisation ihrer Membran, und verglichen mit Astrozyten aus unverletzten Gehirnen, einen größeren hyperpolarisations-aktivierten Einwärtsstrom, der durch extrazelluläre Gabe von cAMP gesteigert und durch Blockade mit ZD7288 gesenkt werden konnte. Diese Ergebnisse legten nahe, dass der HCN-Kanal verstärkt auf reaktiven Astrozyten exprimiert und die elektrophysiologischen Eigenschaften nach Ischämie signifikant verändert werden.<sup>2</sup>

### **2.3.3. HCN-Kanal assoziierte Erkrankungen**

In den letzten Jahren ist die Analyse der Funktionen des HCN-Kanals immer weiter in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Insbesondere der Zusammenhang zwischen HCN-Kanal Mutationen und den resultierenden Krankheitserscheinungen wurden zuletzt intensiv erforscht. Beispielsweise wurden verschiedene Mutationen des HCN1-Kanals bei Patienten mit Epilepsie identifiziert. Die unterschiedlichen HCN1-Kanal Varianten bedingten die Ausbildung verschiedener Epilepsieformen. Der Schweregrad des resultierenden klinischen Phänotyps korrelierte mit dem Ausmaß der Beeinträchtigung der biophysikalischen Eigenschaften des HCN1-Kanals.<sup>65</sup>

Neben diesen monogenetischen Analysen wurden auch weitere Studien, wie eine quantitative Messung der HCN-Kanal Expression nach verschiedenen Interventionen durchgeführt. Dabei konnten mehrere Erkrankungen mit einer erhöhten oder verminderten HCN-Kanal Expression in Zusammenhang gebracht werden. Eine dieser Erkrankungen ist die Epilepsie. Anhand von Studien mit jungen Ratten konnte nach Auslösung epileptischer Anfälle durch induzierte Hyperthermie eine Veränderung der HCN-Kanal Subtyp-Zusammensetzung beobachtet werden. Während der HCN1-Kanal in hippocampalen Pyramidenzellen herunterreguliert wurde, stieg die Expression des HCN2-Kanals an, sodass sich das HCN1 zu HCN2 Verhältnis von 8:1 auf 4:1 verschob.<sup>66</sup> Erst anhand dieser Ergebnisse wurde die mögliche Bedeutung der verschiedenen

Subtyp-Zusammensetzungen und ihre Veränderungen für pathologische Prozesse erkannt.

Neben der Epilepsie spielt der HCN-Kanal auch in der Entstehung neuropathischer Schmerzen eine wichtige Rolle. Der neuropathische Schmerz entsteht in den Hinterstrangganglien oder Axonen von Neuronen und hat eine stark rhythmische Komponente.<sup>51</sup> Der HCN1-HCN3-Kanal konnte in diesen Ganglienzellen physiologischerweise nachgewiesen werden, wobei eine experimentelle Verletzung von Neuronen eine Steigerung des HCN-Kanal Ionenflusses bewirkte.<sup>67</sup> Weiterführende Experimente mit Blockade des HCN-Kanals durch Gabe von ZD7288 zeigten eine gesenkte spontane Entladungsfrequenz verletzter Nervenfasern.<sup>68</sup> Die Analysen auf Proteinebene stellten hingegen eine verringerte Expression der HCN-Kanäle heraus, obwohl ein gesteigerter Ionenfluss des Kanals nachgewiesen werden konnte.<sup>69</sup> Die genaue Ursache dieser Befunde konnte noch nicht geklärt werden.

Als dritter Aspekt konnte eine Beteiligung des HCN-Kanals in verschiedenen Erkrankungen des Herzens nachgewiesen werden. Eine vermehrte Expression des HCN-Kanals in ventrikulären Kardiomyozyten, die mit der Entstehung ektopter Erregungen, Arrhythmien und einem plötzlichen Herztod einhergingen, konnte identifiziert werden.<sup>70</sup> Außerdem wurde eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad einer kardialen Hypertrophie und dem HCN-Kanal Ionenfluss sowie der HCN-Kanal mRNA Expression entdeckt.<sup>71</sup>

Mittlerweile werden spezifische Substanzen, die den HCN-Kanal blockieren therapeutisch eingesetzt, um ektope Erregungen sowie Tachykardien zu vermeiden.

#### **2.3.4. HCN-Kanal Blockade**

##### **2.3.3.1. ZD7288**

Eine der bekanntesten Substanzen zur Blockade des HCN-Kanals ist das ZD7288, das ebenfalls unter dem Namen ICI D7288 zu finden ist. Es wurde 1993 erstmals an Herzen von Guinea Schweinen untersucht. Dabei fiel auf, dass die Herzrate nach ZD7288 Gabe um fast 50 % gesenkt werden konnte, ohne dass sich die linksventrikuläre Kontraktilität oder die Inotropie deutlich verschlechterten.<sup>72</sup> Erst weitere Analysen einzelner Zellen des Sinusknotens konnten belegen, dass ZD7288 tatsächlich den HCN-Kanal blockiert.<sup>73</sup> Diese Blockade erfolgt gebrauchts- und frequenzunabhängig, da ZD7288 in jedem Konformitätszustand an den HCN-Kanal binden kann.<sup>74</sup> Diese Bindung induziert eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des HCN-Kanals um 15 mV in Richtung negativerer Potentiale und senkt die Leitfähigkeit um maximal 52 %.<sup>73</sup> Untersuchungen

über den molekularen Mechanismus der Interaktion zwischen dem HCN-Kanal und ZD7288 legen nahe, dass die Wirkungen über intrazelluläre Aminosäuren des HCN-Kanals gesteuert werden.<sup>75</sup> Weitere Studien zur Selektivität von ZD7288 ergaben eine sehr geringe Blockade anderer Ionenkanäle. In einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ZD7288 wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle um 18 % gehemmt, während die Hemmung des HCN-Kanals bei 82 % lag. Die Hemmung der  $\text{K}^{+}$ -Kanäle fiel deutlich geringer aus.<sup>76</sup> Die hohe Wirksamkeit der Kanalblockade zeigte sich jedoch auch in neuronalen Zellen, sodass der therapeutische Einsatz einer ZD7288 Gabe bisher ausblieb.<sup>77</sup>

### **2.3.3.2. Ivabradin**

Ivabradin ist der einzige HCN-Kanal Inhibitor, der zu therapeutischen Zwecken zugelassen ist. Seine Indikation besteht in der Behandlung einer chronisch stabilen Angina pectoris sowie einer Herzinsuffizienz mit Betarezeptorenblocker-Intoleranz oder additiv bei Patienten mit Herzfrequenz  $\geq 75/\text{min}$ .<sup>78</sup> Die Gabe von Ivabradin führt zu einer Abflachung der frühen diastolischen Depolarisation und damit zur Senkung der Herzfrequenz, indem die maximale Leitfähigkeit des HCN-Kanals herabgesetzt wird, ohne seine Spannungsabhängigkeit zu beeinflussen.<sup>79</sup> Wie auch die anderen HCN-Kanal Blocker, bindet Ivabradin intrazellulär an den Kanal. Während es den HCN4-Kanal bevorzugt im geöffneten Zustand blockiert, bindet es an den HCN2-Kanal bevorzugt im Geschlossenen.<sup>80</sup> Mehr als vom Konformitätszustand scheint die Bindungsfähigkeit vom Ionenfluss durch den HCN-Kanal abzuhängen. So konkurriert Ivabradin mit den durchfließenden Ionen um den Durchtritt durch die Pore zur intrazellulären Wirkung am HCN-Kanal.<sup>81</sup>

Anders als die meisten kardioprotektiven Herzfrequenz senkenden Medikamente ist Ivabradin nicht mit den typischen Nebenwirkungen, wie einer verlängerten QT-Zeit oder Störungen der myokardialen Kontraktilität assoziiert.<sup>82</sup> Jedoch ist der genaue Einfluss auf das zentrale Nervensystem noch nicht geklärt. Beispielsweise wurde in der Vergangenheit von durch Ivabradin ausgelösten Sehstörungen berichtet.<sup>51</sup>

## 2.4. Ziele dieser Arbeit

Die Studien von Rusnakova und Honsa konnten eine erhöhte Expression des HCN-Kanals auf Astrozyten nach zerebraler Ischämie und damit im Rahmen der postischämischen Neuroinflammation zeigen.<sup>1, 2</sup> Die genaue Bedeutung und Funktion des HCN-Kanals auf Astrozyten sind bisher noch unklar. Auf dieser Basis formuliere ich die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen der Funktion des HCN-Kanals und einer Aktivierung der Astrozyten.

Ziel dieser Arbeit war daher zunächst, einen reaktiven/aktivierten Astrozyten in primärer Zellkultur zu etablieren und zu charakterisieren, und darauf aufbauend die Rolle von HCN-Kanälen in ruhenden und reaktiven Astrozyten *in vitro* zu untersuchen. Dafür wurden primäre Astrozyten mit proinflammatorischen Zytokinen stimuliert und der Einfluss der HCN-Kanalaktivität durch eine pharmakologische Blockade mit ZD7288 oder Ivabradin analysiert. Als zentrale Eigenschaften der Astrozyten wurden ihre Morphologie, ihr Überleben, ihre Proliferation sowie ihre Migration untersucht. Um Rückschlüsse auf die Art des Aktivierungstypen und dadurch auf mögliche Folgen für das umliegende Gewebe ziehen zu können, wurden spezielle immunologische Eigenschaften wie die Sezernierung von Zytokinen oder die Expression von Markerproteinen analysiert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Zellen

Zur Untersuchung der primären Astrozyten aus Ratten wurden diese aus den Kortizes ein bis drei Tage alter Wistar Ratten gewonnen und kultiviert (siehe Methoden 3.2).

##### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Unternehmen
4-Well Plates	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
24-Well Plates	VWR International (Radnor, USA)
96-Well Plates	Corning Incorporated (New York, USA)
Deckgläschen	VWR International (Radnor, USA)
Falcons (25 ml)	Sarstedt Ag & Co KG (Nürnberg, Deutschland)
Falcons (50 ml)	Sarstedt Ag & Co. KG (Nürnberg, Deutschland)
Flasks (250 ml)	Corning Incorporated (New York, USA)
Handschuhe	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & CO. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroreaktionsgefäß (2,0 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Objektträger	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Parafilm M	Biozym Scientific GmbH (Bemis, USA)
PCR-Platte	VWR International (Radnor, USA)
Pipettenspitzen (100 µl-1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen (20 µl-200 µl)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen (0.1 µl-20 µl)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien

### 3.1.3. Geräte und Zubehör

Geräte	Unternehmen
Brutschrank	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection Systems	BIO-RAD Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Fluoreszenz-Mikroskop BZ 9000	Keyence, Biorevo (Osaka, Japan)
FLUOstar Omega	BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland)
Kühlschrank (4 °C)	Bosch electronic (Stuttgart, Deutschland)
Licht-Mikroskop DM IL	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Hecht Glaswarenfabrik GmbH & Co. KG (Sondheim vor der Rhön, Deutschland)
Operationsbesteck	FST GmbH (Netphen, Deutschland)
Pipette (0,1 µl-2,5 µl)	Eppendorf Research® (Hamburg, Deutschland)
Pipette (1 µl-10 µl)	Eppendorf Research® (Hamburg, Deutschland)
Pipette (10 µl-100 µl)	Eppendorf Research® (Hamburg, Deutschland)
Pipette (100 µl-1000 µl)	Eppendorf Research® (Hamburg, Deutschland)
Pipette (2 µl-20 µl)	Eppendorf Research® (Hamburg, Deutschland)
Pipette (20 µl-200 µl)	Eppendorf Research® (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	IBS Integra Biosciences (Hudson, USA)
Schüttler 3015	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tiefkühler (-20 °C)	AEG (Frankfurt am Main, Deutschland)
Vortexmischer	IKA Werke GmbH & CO.KG (Staufen, Deutschland)
Wärmebad	P-D Industriegesellschaft mbH (Dresden, Deutschland)
Wärmeblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge (Megafuge 1.0RS)	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge (myFuge)	Benchmark Scientific, (Sayreville, USA)
Zentrifuge (Micro Star 17R)	VWR International (Radnor, USA)

Tab. 2: Geräte und Zubehör

### 3.1.4. Selbsthergestellte Lösungen

Hergestellte Lösung	Zusammensetzung	Konzentration	Unternehmen
<b>Zellkulturmedium</b>	Dubecco`s Modifier Eagle Medium (DMEM)	1x	Thermo Fisher Scientific, (Waltham,USA)
	L-Glutamin	200 mM	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
	Fetal Bovine Serum Standard (FBS)	10%	
	Penicillin Streptomycin	100 U/ml 100 µg/ml	
<b>Substrat Lösung</b>	Color Reagent A (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)	1:1	R&D Systems (Minneapolis, Canada)
<b>Waschpuffer für IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha ELISA</b>	Tween 20	0,05 %	Sigma Aldrich (St. Louis, United States)
	DPBS	1x	Thermo Fisher Scientific, (Waltham,USA)

Tab. 3: Selbsthergestellte Lösungen

### 3.1.5. Reagenzien und Puffer

Reagenzien und Puffer	End- Konzentrationen	Unternehmen
<b>Bisbenzimidin (Hoechst 33342)</b>	20 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<b>Dulbeccos´ s Phosphate buffered saline (DPBS) -CaCl<sub>2</sub>, -MgCl<sub>2</sub></b>	1x	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<b>Ethanol</b>	70 %	TH. Geyer GmbH & Co. KG (Warschau, Polen)
<b>Fluoromount-G</b>	100 %	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, USA)

<b>Isopropanol</b>	100 %	TH. Geyer GmbH & Co. KG (Warschau, Polen)
<b>Normal Goat Serum (NGS)</b>	3 % oder 10 %	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, USA)
<b>Paraformaldehyde (PFA)</b>	4 %	Electron Microscopy Sciences, (Hatfield, USA)
<b>Propidiumiodid</b>	7,5 µmol/l	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
<b>Reagent Diluent</b>	1x	R&D Systems (Minneapolis, Kanada)
<b>Salzsäure (HCL)</b>	2 mol/l	Carl ROTH <sup>R</sup> GmbH & Co. KG, (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Stop Solution</b>	2 mol/l	R&D Systems (Minneapolis, Kanada)
<b>Substrat Solution für IL-1 beta, IL-6 und TNF-alpha ELISA</b>	1x	R&D Systems (Minneapolis, Kanada)
<b>SYBR FAST</b>	1x	KAPA Biosystems (Cape Town, Südafrika)
<b>TritonX-100</b>	0,1 %	Sigma-Aldrich GmbH (ST. Louis, USA)
<b>Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung</b>	0,05 % Trypsin 0,025 % EDTA	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)

**Tab. 4:** Reagenzien und Puffer

### 3.1.6. Kits

<b>Kits</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Unternehmen</b>
<b>Boyden chamber migration assay</b>	Chrystal-violet solution Extractions solution	Cell Biolabs (San Diego, USA)
<b>GenUP™ Total RNA mini Kit</b>	Lysis R buffer DNA und RNA mini columns Collection und elution tubes Wash a und Wash b buffer	Biotechrabbit GmbH (Berlin, Deutschland)
<b>NO-Griess-Assay</b>	Griess reagent Nitrite quantification standard	Biotium (Fremont, USA)
<b>QuantiTect® Reverse Transcription Kit (200)</b>	gDNA wipeout Reverse Transkriptase (RT) RT buffer RT primer mix RNAse free water	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<b>Rat IL-1 beta/IL-12, DuoSet®ELISA</b>	Capture und detection antibody Standard Streptavidin-HRP	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, Kanada)
<b>Rat IL-6/TNF-alpha, DuoSet®ELISA</b>	Capture und detection antibody Standard Streptavidin-HRP	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, Kanada)
<b>Rat IL-10 Platinum ELISA</b>	Microwell Plate coated with monoclonal rat IL-10 antibody Biotin Conjugate anti-rat IL-10 monoclonal antibody Streptavidin-HRP Standard Sample Diluent Assay Buffer Concentrate Wash Buffer Concentrate Substrate Solution Stop Solution	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

**Tab. 5:** Kits

### 3.1.7. Stimulantien

Stimulantien	Konzentration	Unternehmen
5-Bromo-2'-deoxyuridine	10 mM	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
IFN- $\gamma$	10 ng/ml	Rat Interferon- $\gamma$ PeproTech GmbH (Rocky Hill, USA)
IL-1 $\beta$	5 ng/ml	Rat Interleukin-1 $\beta$ PeproTech GmbH (Rocky Hill, USA)
Ivabradin	10 oder 30 $\mu$ M	Ivabradin hydrochlorid Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
TNF- $\alpha$	10 ng/ml	Rat Tumornekrosefaktor- $\alpha$ PeproTech GmbH (Rocky Hill, USA)
ZD7288	10 oder 30 $\mu$ M	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Tab. 6: Stimulantien

### 3.1.8. Primärantikörper

Primärantikörper	Konzentration	Verdünnung	Unternehmen
Mouse anti-BrdU, monoclonal, Klon BU-33	1,5 mg/ml	1:500	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Mouse anti-GFAP	1 mg/ml	1:500	Millipore (Temecula, USA)
Rabbit anti-GFAP	1 mg/ml	1:300	Life technologies (Frederick, USA)
Mouse anti-HCN1	1 mg/ml	1:100	Neuromab (Davis, USA)
Rabbit anti-HCN2	1 mg/ml	1:100	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mouse anti-HCN3	1 mg/ml	1:100	Neuromab (Davis, USA)
Mouse anti-HCN4	1 mg/ml	1:100	Neuromab (Davis, USA)
Rabbit anti-NF $\kappa$ B	1 mg/ml	1:500	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

<b>Mouse anti-pNFkB</b>	1 mg/ml	1:500	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<b>Mouse anti-Vimentin</b>	1 mg/ml	1:300	Millipore (Temecula, USA)

**Tab. 7:** Primärantikörper

### 3.1.9. Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Unternehmen</b>
<b>Goat anti-mouse, IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488</b>	2 mg/ml	1:300	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<b>Goat anti-rabbit, IgG (H+L), Alexa Fluor™ 568</b>	2 mg/ml	1:300	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

**Tab. 8:** Sekundärantikörper

### 3.1.10. Software

<b>Software</b>	<b>Unternehmen</b>
<b>BZ-2 Analyser</b>	Keyence (Osaka, Japan)
<b>BZ-2 Viewer</b>	Keyence (Osaka, Japan)
<b>Adobe Fotoshop CS2</b>	Adobe (San Jose, USA)
<b>ImageJ</b>	Laboratory of Optical and Computational Instrumentation (Wisconsin, USA)
<b>Microsoft Office Excel und Power Point 365 ProPlus</b>	Microsoft (Redmond, USA)
<b>Omega Software</b>	BMG Labtech GmbH (Ortenberg, Deutschland)
<b>RT-qPCR Software</b>	BIO-RAD Laboratories Inc. (Hercules, USA)
<b>SPSS Statistik Version 24</b>	IBM (Armonk, USA)

**Tab. 9:** Software

### 3.1.11. Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Biologio (Nijmegen, Niederlande) produziert und vertrieben.

RNA	Sequenz vorwärts/rückwärts 5´-3´	Temperatur in °C Dauer in Sekunden
<b>CC3 rat</b>	ATC GAG GAT GGT TCA GGG GA/GCC TCT ACC ATG TCG CTA CC	95,0/60,0/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>GFAP rat</b>	TGC ATG TAC GGA GTA TCG CC/GGG GGA GGA AAG GAC AAC TG	95,0/60,0/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>HCN1 rat</b>	CAG AGC ACT TCG GAT CGT GA/GGA GCA GCA TCA TGC CAA TG	95,0/59,8/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>HCN2 rat</b>	ACC GGC ATT GTT ATT GAG GAC/CCT CGG AGT CGA TTC CCT TC	95,0/59,8/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>HCN3 rat</b>	GTG CAG TGG TTC GCA TCT TC/GGG AAG TCC TGC AGC ATA GG	95,0/59,8/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>HCN4 rat</b>	CGG TCA CCA TCA TCT AGC CC/TGC CAT AAA GGA TGG CCG TT	95,0/59,8/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>IL-1beta rat</b>	GAC TTC ACC ATG GAA CCC GT/GGA GAC TGC CCA TTC TCG AC	95,0/56,0/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>IL-6 rat</b>	CCC AAC TTC CAA TCT CCT/AGC ACA CTA GGT TTG CCG AG	95,0/57,3/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>IL-10 rat</b>	GAA AAA TTG AAC CAC CCG GCA/TTT CCA AGG AGT TGC TCC CG	95,0/56,0/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>iNOS rat</b>	GCT TGT CTC TGG GTC CTC TG/ CTC ACT GGG ACA GCA CAG AA	95,0/56,0/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>Ki67 rat</b>	TCT TGG CAC TCA CAG TCC AG/GCT GGA AGC AAG TGA AGT CC	95,0/58,0/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>RPL rat</b>	TCT CCG AA GCG GAT GAA CAC/CAA CAC CTT GAG GCG TTC CA	
<b>S100A10 rat</b>	CAC ACC TTG ATG CGT CCT CT/GGC AAC CGG ATG CAA ACA AT	95,0/56,0/72,0 0:15/0:15/0:45
<b>Vimentin rat</b>	GCA GCC TCT ATT CCT CGT CC/TAG TTG GCG AAG CGG TCA TT	95,0/60,0/72,0 0:15/0:15/0:45

Tab. 10: Primer

## **3.2. Methoden**

Alle Verfahren an Tieren wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Genehmigung des Tierschutzbeauftragten der Universität zu Köln durchgeführt. Zur Gewinnung der primären Zellen aus neugeborenen Ratten lag eine gültige Tierversuchsanzeige (§ 4.16.020) vor.

### **3.2.1. Primäre Astrozyten: Isolation und Kultivierung**

Die primären Astrozytenkulturen wurden aus den Kortizes von maximal drei Tage alten Rattenjungtieren angelegt. Zunächst wurden die Ratten enthauptet, das Gehirn durch Öffnung des Schädels entnommen, der Kortex durch Abtrennung der weißen Substanz und des Mittelhirns isoliert und die Meningen und Blutgefäße entfernt. Danach wurden die Kortizes zerschnitten und in 1 % Trypsin/EDTA Gemisch für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Beenden der enzymatischen Reaktion wurde das Zellkulturmedium (DMEM), angereichert mit zusätzlichen 10 % fetalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin, zu den Kortizes hinzugegeben. Die Kortizes wurden zweimal mit dem o.g. Zellkulturmedium gewaschen. Durch Auf- und Abpipettieren konnte eine homogene Zellsuspension erzeugt werden, die bei 1200 rpm für zwei Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet mit neuem Medium (DMEM mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin) angereichert und die Zellen in Zellkulturflaschen mit 12 ml Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank für 10 Tage inkubiert (ca. 3 Kortices pro Zellkulturflasche). Das Kulturmedium wurde nach drei Tagen gewechselt. Die lange Inkubationszeit von zehn Tagen ermöglichte das selektive Wachstum von Astrozyten und Mikroglia. Um die Mikroglia von dem adhären Astrozytenrasen auf dem Flaschenboden zu trennen, erfolgte das Schütteln der Zellkulturflaschen für jeweils eine Stunde bei 250 rpm und 37°C an den Tagen 10, 13 und 16 nach Anlage der Zellkultur. Dieses Prozedere ermöglichte das Ablösen der Mikroglia vom Astrozytenrasen, sodass durch Entfernung des Mediums die Mikroglia ebenfalls entnommen werden konnten. Am 16. Tag erfolgte, nach dem drittmaligen Entfernen der Mikroglia, das Ablösen der Astrozyten vom Flaschenboden. Dafür wurde die Zellkulturflasche für zehn Minuten mit 2 ml 0,5 % Trypsin/EDTA Gemisch bei 37°C inkubiert. Für die vollständige Ablösung der Astrozyten wurde die Zellkulturflasche abgeklopft und die Astrozyten in Zellkulturmedium aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension für 2 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und frisches Zellkulturmedium hinzugefügt. Die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer-

Zählkammer bestimmt und Astrozyten mit 50.000 Zellen/Well in einer 24 Well-Plate ausgesät.

24 Stunden nach Aussaat wurden die Astrozyten ohne einen Wechsel des Mediums unter sterilen Bedingungen stimuliert. Die Hälfte der Zellen wurde mit einem Zytokingemisch (im Folgenden: Zytokinmix), bestehend aus Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 5 ng/ml) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml), stimuliert. Das dadurch induzierte proinflammatorische Milieu diente zur Überführung der Astrozyten in einen reaktiven Phänotyp. Die andere Hälfte der Zellen blieb ohne diese Behandlung. Zur selektiven Blockade des HCN-Kanals wurde aus beiden Gruppen jeweils ein Drittel der Zellen zusätzlich mit ZD7288 (10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M) und ein Drittel mit Ivabradin (10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M) behandelt. Das dritte Drittel blieb ohne weitere Behandlung als Kontrollgruppe bestehen. Nur für die Durchführung des Migrations-Assays wurden die Zellen direkt nach Aussaat stimuliert.

Stimulation	Nativ	ZD7288 (10 $\mu$ M)	ZD7288 (30 $\mu$ M)	Ivabradin (10 $\mu$ M)	Ivabradin (30 $\mu$ M)
<b>Nativ</b>	geprüft	geprüft	geprüft	geprüft	geprüft
<b>Zytokinmix (TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>, IL-1<math>\beta</math>)</b>	geprüft	nicht geprüft	geprüft	nicht geprüft	geprüft

**Tab. 11:** Stimulationsbedingungen

Sämtliche Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellen aus mindestens zwei unterschiedlichen Zellisolationen verwendet wurden.

### 3.2.2. Live/Dead Assay

Die Zellen wurden auf 24-Well Plates (50.000 Zellen/Well) ausgesät und wie unter 3.2.1. beschrieben nach 24 Stunden mit dem Zytokinmix und den HCN-Kanal Blockern (ZD7288 oder Ivabradin) stimuliert. Um die Toxizität der Stimulation auf die Zellen zu untersuchen, wurden nach weiteren 24 Stunden alle Zellen mit Propidiumiodid (1:500) behandelt. Der fluoreszierende Farbstoff kann die perforierte Zellmembran von toten, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen und lagert sich an die intrazelluläre DNA und RNA. Zusätzlich wurden die gesamten Zellen mit fluoreszierendem Hoechst 33342 (1:500) gefärbt. Fünf Minuten nach Hinzugabe von

Propidiumiodid und Hoechst wurden von jedem Well zehn repräsentative Bilder im Fluoreszenz Mikroskop aufgenommen und sowohl die Hoechst positiven Zellen (blau) als auch die Propidiumiodid positiven Zellen (rot) manuell ausgezählt. Der Anteil toter Zellen wurde aus dem Quotienten der Propidiumiodid positiven Zellen zu den Hoechst positiven Zellen berechnet. Der Versuch wurde dreimal mit jeweils zwei Wells pro Kondition durchgeführt.

### **3.2.3. Bromodeoxyuridin (BrdU) Proliferations Assay**

Zur Bestimmung der Proliferation wurden die Zellen in 24-Well Plates (50.000 Zellen/Well), die mit Deckgläschen versehen wurden, ausgesät und nach 24 Stunden, wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben, stimuliert. Nach weiteren 18 Stunden erfolgte die Zugabe von 10 mM BrdU. Die Zellen wurden nach einer 6-stündigen Inkubationszeit mit 4 % -igem Paraformaldehyd fixiert und wie im Kapitel 3.2.4. beschrieben immunzytochemisch gefärbt. Die Proliferationsrate wurde aus dem Verhältnis von positiven Zellen zur Gesamtzellzahl berechnet. Der Versuch wurde dreimal mit jeweils zwei Wells pro Kondition durchgeführt.

### **3.2.4. Immunzytochemie**

Für alle immunzytochemischen Färbungen wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 Minuten fixiert und anschließend viermal mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten dann bis zu 3 Monate bei 4° C gelagert werden. Zur Vermeidung der Austrocknung von Zellen erfolgte die Zugabe von 1 ml PBS pro Well. Die Proliferationsrate wurde mittels eines BrdU-Assays bestimmt. Dazu wurden die Zellen, anders als beim Gebrauch der restlichen Antikörper, über 30 Minuten mit HCL (2 mol/l) inkubiert. Dies ermöglichte dem BrdU-Antikörper eine spezifische Bindung innerhalb des Zellkerns. Danach wurden alle Zellen, unabhängig von den ausgewählten Antikörpern, für zehn Minuten mit einem „Blocking Buffer“, bestehend aus 10 % Ziegenserum (normal goat serum, NGS) und 0,1 % Triton-X100 gelöst in PBS, inkubiert. Es folgte die Gabe des gewünschten Primärantikörpers in oben aufgelisteten Konzentrationen (Kapitel 3.1.8.) zusammen mit 3 % NGS gelöst in PBS. Die Inkubation fand über Nacht bei 4° C statt. Am nächsten Tag erfolgte eine 90-minütige Behandlung mit den entsprechenden fluoreszierenden Sekundärantikörpern (Goat anti-mouse, Goat anti-rabbit), die in 3 % -igem NGS gelöst wurden. Zur Darstellung der Gesamtzellzahl wurde zusätzlich Hoechst 33342 (1:500) für fünf Minuten zu den

Zellen pipettiert. Danach wurden die Wells viermal mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen in Fluoromount G auf Objektträgern eingedeckelt und über Nacht bei 4° C getrocknet. Zur quantitativen und qualitativen Analyse wurden mindestens zehn Bilder pro Kondition mit dem Fluoreszenz Mikroskop aufgenommen.

### **3.2.5. Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)**

Die RNA der verschiedenen Proben wurde 24 Stunden nach Stimulation der Zellen mit Hilfe des GeneUp total RNA mini Kits isoliert. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 400 µl LYSIS R Buffer pro Kondition inkubiert. Da jeweils vier Wells pro Kondition ausgesät wurden, wurde der LYSIS R Buffer von einem ins nächste Well der gleichen Kondition pipettiert, bis die Zellen lysiert waren. Dann wurde die Lösung in DNA mini Columns überführt und diese in Collection Tubes hineingestellt. Es erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 g. Zu dem entstandenen Filtrat wurde 400 µl des 70-prozentigen Ethanol hinzupipettiert, gemischt und in RNA mini Columns gefüllt. Diese wurden erneut auf Collection Tubes gesetzt und bei 10.000 g für zwei Minuten zentrifugiert. Für jeden weiteren Schritt wurden die RNA mini Columns behalten und die Collection Tubes ausgetauscht. Zunächst wurden 500 µl des Wash-a Buffers und nach einminütiger Zentrifugation bei 10.000 g, 700 µl des Wash-b Buffers zu den Proben in die RNA mini Columns hinzugefügt und erneut eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Um die RNA vom restlichen Ethanol zu befreien, erfolgte eine weitere zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 g. Zum Schluss wurden die RNA mini Columns mit 100 µl RNA-freiem Wasser befüllt, in 1,5 ml umfassende Mikroreaktionsgefäße gesetzt und bei 6.000 g für eine weitere Minute zentrifugiert. Das resultierende Filtrat enthielt die aufgereinigte RNA und wurde bei -20° C gelagert.

Zur Durchführung der RT-qPCR wurde zunächst der RNA-Gehalt jeder Probe (40 µl) photometrisch bei 230 nm gemessen. Danach wurde die RNA mithilfe des Qiagen's QuantiTect RT kits in c-DNA revers transkribiert. Dafür wurde jede Probe mit RNA-freiem Wasser verdünnt, sodass ein Gesamtvolumen von 12 µl entstand, von dem jede Probe den gleichen RNA-Gehalt aufwies. Zu den Proben wurden 2 µl gDNA wipeout hinzugefügt. Danach wurden sie für fünf Minuten auf 42 °C erhitzt. Nach Zugabe des Mastermixes, bestehend aus 1 µl reverse Transkriptase (RT), 4 µl RT Buffer und 1 µl RT Primermix pro Probe und Primer, erfolgte eine weitere Inkubation für zunächst 15 Minuten bei 42° C und darauffolgend für drei Minuten bei 95° C.

Zur Herstellung der Primerlösungen wurden die oben aufgelisteten Primer verwendet. Dabei wurden 1 µl Vorwärts-Primer, 1 µl Rückwärtsprimer, 7 µl RNA-freies Wasser und

10 µl SYBR FAST pro Anzahl gewünschter Wells gemischt. Von dieser Lösung wurden 19 µl gemeinsam mit 1 µl der Probe in die Wells der PCR-Platte pipettiert und die RT-qPCR Messung mithilfe des PCR-Geräts gestartet. Alle Proben wurden in Tripletts aufgetragen und jede Messung mit Proben aus drei verschiedenen Experimenten durchgeführt. Zur Auswertung und Darstellung wurde die  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Methode angewandt.<sup>83, 84</sup> Es wurde der Mittelwert aus den drei technischen Replikaten gebildet und der Mittelwert aller biologischen Replikate ausgewertet und dargestellt.

### **3.2.6. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)**

Der IL-10 Platinum ELISA wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als Vorbereitung wurde der Wash Buffer durch Zugabe von Reinstwasser (Milli Q®-gefiltertes Leitungswasser) und der Assay Buffer durch Zugabe von destilliertem Wasser zwanzigfach verdünnt. Danach wurde die vom Hersteller beschichtete Platte zweimal mit jeweils 400 µl des Wash Buffers gewaschen und eine Standardreihe durch Mischung des IL-10 Standards mit Sample Diluent in den Konzentrationen 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, pg/ml hergestellt. Je 100 µl dieser Lösung wurden in Doubletten auf die Platte aufgetragen. Weitere 100 µl des Sample Diluents dienten als Blank. In den restlichen Wells wurden je 50 µl der Probe mit 50 µl des Sample Diluents verdünnt. Zu allen Wells wurden weitere 50 µl des Biotin-Conjugates, das aus der 100fachen Verdünnung mit Assay Buffer hergestellt wurde, hinzugefügt. Die Platte wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach folgte ein dreimaliges Waschen aller Wells mit je 400 µl des Wash Buffers. In alle Wells wurden 100 µl des ebenfalls mit Assay Buffers 100fach verdünnten Streptavidin-HRPs pipettiert und erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte das dreimalige Waschen der Wells auf zuvor beschriebene Weise. Zum Schluss wurden 100 µl der Substrate Solution zu allen Wells hinzugefügt und die Platte für weitere zehn Minuten inkubiert, bis ein Farbumschlag in der Standardreihe zu dunkelblau sichtbar wurde. Durch die Zugabe von 100 µl Stop Solution wurde die Reaktion beendet und photometrisch die Absorption bei 450 nm und 620 nm gemessen. Zur Berechnung der IL-10 Konzentrationen wurden die Differenzen der Absorptionen aus den genannten Wellenlängen jeder Probe bestimmt und mit der Standardkurve verglichen. Jede Probe wurde in Doubletten aufgetragen und der Versuch dreimal durchgeführt.

Der IL-6 DuoSET ELISA wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde eine zehnfache Verdünnung des Reagent Diluents durch Zugabe von PBS hergestellt. Ebenfalls wurde eine Wash Buffer Lösung bestehend aus 0,05 % Tween20 in PBS hergestellt. Danach wurde der Capture Antibody durch Zugabe von PBS auf eine

Konzentration von 4 µg/ml verdünnt. Direkt im Anschluss wurde die 96-Well Plate mit jeweils 100 µl der Antikörperlösung beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die beschichteten Wells durch dreimaliges Waschen mit 400 µl des Wash Buffers von ungebundenen Primärantikörpern befreit. Durch die Zugabe von 300 µl des Reagent Diluents zu jedem Well und einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Wells geblockt und unspezifische Bindungen vermieden. Danach wurden alle Wells auf die zuvor beschriebene Weise mit 400 µl des Wash Buffers gewaschen. Es folgte die Herstellung der Standardreihe mit den Konzentrationen 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 pg/ml durch Mischung des Standards mit dem Reagent Diluent. Weitere 100 µl des Reagent Diluents dienten als Blank. In die verbliebenen Wells wurden 100 µl der Probe pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor erneut alle Wells gewaschen wurden. Danach wurden 100 µl des Detection Antibodies in der durch Verdünnung mit Reagent Diluent hergestellten Konzentrationen von 100 ng/ml in die Wells pipettiert und erneut für zwei Stunden inkubiert. Darauf folgend wurden die Wells dreimal gewaschen. Anschließend erfolgte eine 20minütige Inkubation mit 100 µl Streptavidin-HRP nach 40facher Verdünnung mit Reagent Diluent. Erneut erfolgte das Waschen aller Wells. Zum Schluss wurden zu allen Wells 100 µl Substrat Solution, einer 1:1 Mischung aus Color Reagent A und Color Reagent B, für 20 Minuten hinzugefügt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stop Solution beendet. Die Absorption der Proben wurde bei 450 nm und 570 nm photometrisch gemessen und die Differenz der Absorptionswerte berechnet. Durch den Vergleich mit der Standardkurve wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben bestimmt. Jede Probe wurde in Doubletten aufgetragen und der Versuch mit Proben aus drei verschiedenen Experimenten durchgeführt.

### **3.2.7. Griess Assay**

Zur Bestimmung der Stickstoffmonoxid (NO) Freisetzung aus Astrozyten wurde das Griess reagent Kit verwendet. Der Überstand der (un-)stimulierten Zellen wurde 24 Stunden nach Stimulation abgenommen und ggf. überbrückend bei -20 °C gelagert. Es wurde eine Standardreihe mit den Konzentrationen 0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µmol/l aus der Mischung von nitrite quantification standard und Medium (DMEM mit oben beschriebenen Zusätzen) hergestellt. In jedes Well der 96-Well Plate wurden 150 µl der (auf Eis aufgetauten) Probe oder des Standards, 130 µl des RNA-freien Wassers sowie 20 µl des Griess-reagents hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Sulfanilamid wird durch Reaktion mit Nitrit in saurer Lösung quantitativ in ein Diazoniumsalz umgewandelt. Das Diazoniumsalz wird dann an 1-

Naphtylethylendiamin gekoppelt, wobei ein Azofarbstoff gebildet wird, der basierend auf seiner Absorption bei 548 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Die Messung der optischen Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 548 nm im OMEGA-Gerät durchgeführt. Jede Probe wurde in Doubletten aufgetragen und der Versuch mit Proben aus drei verschiedenen Experimenten durchgeführt.

### **3.2.8. Boyden Chamber-Assay**

Der Migrations-Assay wurde mithilfe einer modifizierten Boydenkammer durchgeführt. Dafür wurden Astrozyten sofort nach Isolation in mit 1 % FBS versetztem Kulturmedium in der oberen Kammer ausgesät (10.000 Zellen/Well). In die untere Kammer wurden entweder 500 µl Kulturmedium mit 1 % FBS (negative Kontrolle), oder mit 10 % FBS gegeben. Danach erfolgte, auf die in 3.2.1. beschriebene Weise, die Stimulation der Zellen in der oberen Kammer. Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die oberen Kammern entnommen, mithilfe eines Wattestäbchens die innenliegenden Zellen entfernt und die Kammer in eine neue 24 Well-Plates gesetzt. Zwischen die beiden Kammern wurden zur Anfärbung der migrierten Zellen 400 µl der kristallvioletten Lösung pipettiert und für zehn Minuten inkubiert. Danach wurden die oberen Kammern erneut entnommen, in destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte eine zehnmünütige Inkubation dieser Kammern in 200 µl Extraktionslösung bei ständiger Bewegung auf dem Schüttler. Pro Well wurden zweimal 90 µl der Proben entnommen und in einer 96-Well Plate bei 560 nm Wellenlänge mit dem OMEGA-Gerät photometrisch gemessen.

### **3.2.9. Scratch-Test**

Zur Bestimmung der planaren Migration wurden die Astrozyten in 96 Well-Plates (20.000 Zellen pro Well) ausgesät und wie in Kapitel 3.2.1. beschrieben, nach 24 Stunden stimuliert. Mithilfe einer Pipette wurde ein „Scratch“ durch den Zellrasen gezogen und das gesamte Well mithilfe des Fluoreszenz Mikroskops BZ 9000 fotografiert. Aufnahmen wurden zu den Zeitpunkten 0 Std., 3 Std., 6 Std., 9 Std., 12 Std., 16 Std., 20 Std., 24 Std., 28 Std., 32 Std., 36 Std. und 48 Std. nach Durchführung des Scratches angefertigt. Zur Auswertung wurde der Flächeninhalt des Scratches manuell umrundet und durch die BZ-Analyser Software vermessen. Es wurde die prozentuale Abnahme des Flächeninhaltes jedes Wells bezogen auf den Zeitpunkt 0 Std. bestimmt sowie die Fläche unter der Kurve (Area under the curve=AUC) berechnet.

### **3.2.10. Datenverarbeitung**

Numerische Rohdaten wurden zunächst mit Microsoft Excel verarbeitet. Zu dieser Verarbeitung gehörte die Berechnung eines relativen Anteils für den Live/Dead-Assay, die BrdU Färbung sowie den Scratch-Test. Konzentrationen wurden für die durchgeführten IL-6 ELISAs, IL-10 ELISAs sowie die NO-Freisetzung im Griess-Assay bestimmt. Zur relativen Quantifizierung der RT-qPCR Daten wurden die Delta Delta CT Werte durch die Korrektur auf das Housekeeping Gen und die Kontrolle berechnet. Die Absorptionsmessung bei Durchführung der Boyden Chamber Methode wurde auf eine leere Probe korrigiert. Zur Auswertung wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler<sup>20</sup> aus den biologischen Replikaten der jeweils gleich behandelten Proben berechnet. Wenn es sinnvoll erschien, wurden die Daten auf die Kontrolle oder eine andere Kondition normalisiert. Alle Grafiken wurden mit Microsoft Excel erstellt und Fotos mit Adobe Photoshop bearbeitet. Die finalen Abbildungen wurden mit Microsoft PowerPoint angefertigt.

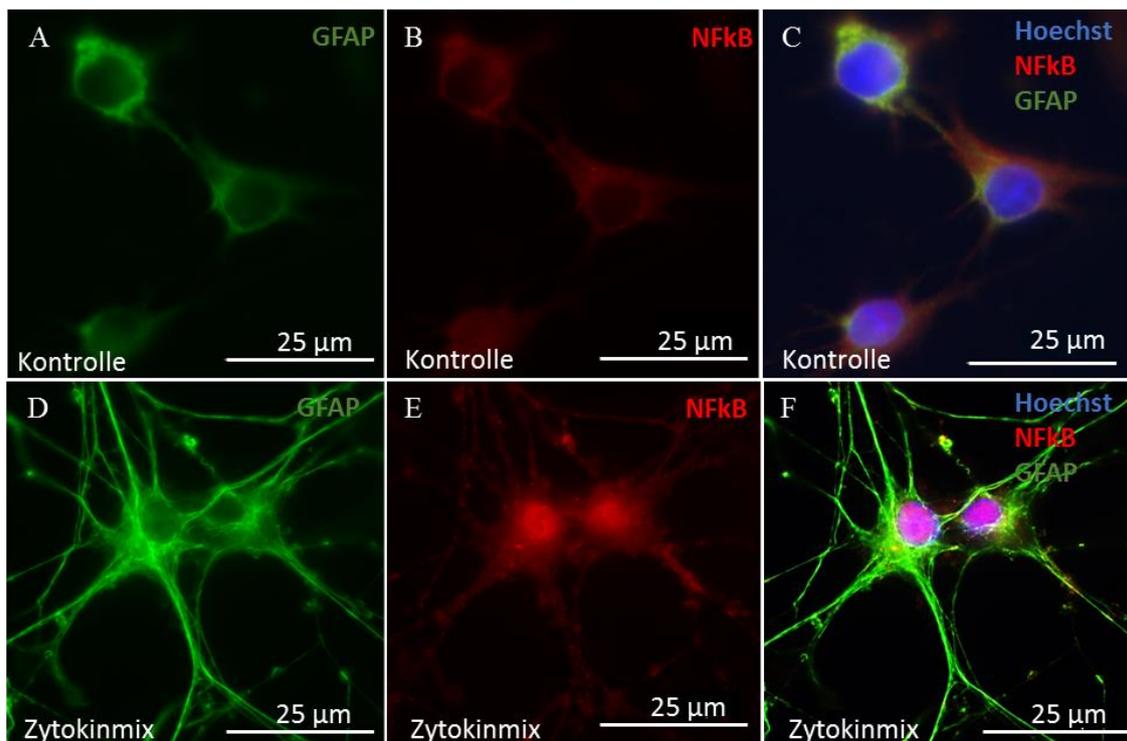
### **3.2.11. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistic (Version 24) durchgeführt. Zunächst wurde der Kolmogorov-Smirnov oder der Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung angewandt. Bei positivem Resultat ( $>0.05$ ) erfolgte die Untersuchung auf Varianzhomogenität mithilfe des Levene Tests mit anschließender Durchführung des T-Tests bei Vergleich zweier Konditionen oder einer one-way independent ANOVA bei Vergleich mehrerer Konditionen. Zur paarweisen Untersuchung der Signifikanz schloss sich der ANOVA entweder der Tukey-honest Test für varianzhomogene Variablen oder der Games- Howell Test für Variablen ungleicher Verteilung an. Für nicht normalverteilte Variablen wurde zum Vergleich zweier Konditionen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben, zum Vergleich mehrerer Konditionen der Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Das Signifikanzlevel wurde auf  $p=0,05$  (\*) festgelegt. Ab einem  $p=0,01$  (\*\*) wurde von einem hoch signifikanten, ab  $p=0,001$  (\*\*\*) von einem höchst signifikanten Ergebnis ausgegangen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Die Aktivierung von Astrozyten in einem proinflammatorischen Milieu

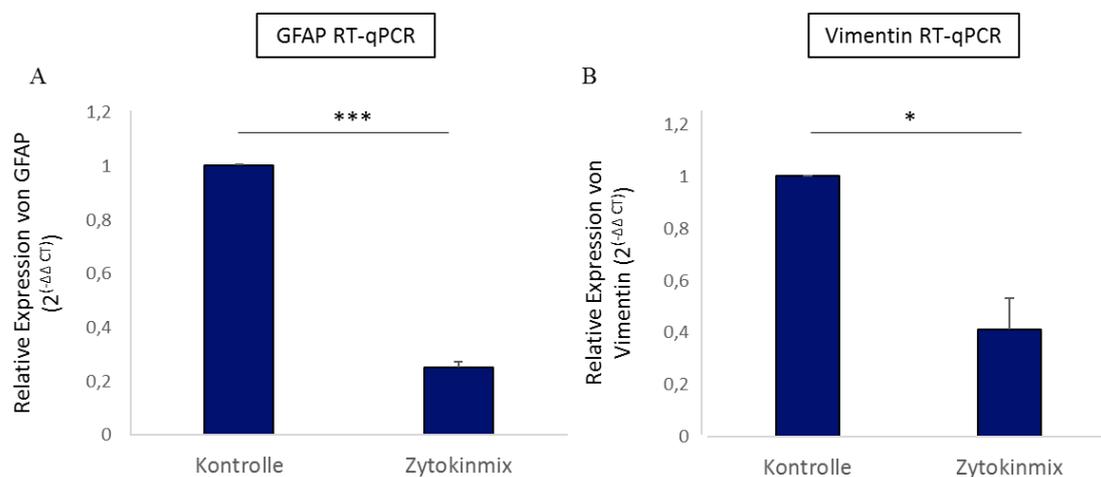
Um den Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf ruhenden Astrozyten im Vergleich zu reaktiven Astrozyten zu untersuchen, musste zunächst eine Methode der Aktivierung etabliert werden. Hierfür wurden die Astrozyten mit einem Zytokinmix, bestehend aus IL-1 $\beta$  (5 ng/ml), IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), über einen Zeitraum von 24 Stunden stimuliert. Zur Charakterisierung dieser Aktivierungsmethode wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen qualitativ begutachtet. Dabei fiel auf, dass die stimulierten Astrozyten deutlich zahlreichere, längere und schlankere Zytoplasmafortsätze ausbildeten als die unstimulierten Astrozyten der Kontrollgruppe (Abb. 1: A, D). Die NF-kB-Färbung der Zellen zeigte eine Verschiebung der Lokalisation des Transkriptionsfaktors nach erfolgter Zytokinstimulation: Während sich in der Kontrollgruppe NF-kB vorwiegend im Zytoplasma befand (Abb. 1: B, C), wechselte seine Lokalisation nach Stimulation in den Nukleus (Abb. 1: E, F).



**Abb. 1: Morphologische Darstellung reaktiver Astrozyten**

Dargestellt sind repräsentative Bilder von Astrozyten nach Stimulation mit einem Zytokinmix (D-F) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (A-C). Die ICC Bilder entsprechen Färbungen gegen GFAP (grün) und NF-kB (rot). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau). Die Bilder C und F zeigen die Überlagerung der einzelnen Kanäle an. Die Maßstabsbalken entsprechen 25  $\mu\text{m}$ .

Als weitere Methode zur Überprüfung der erfolgreichen Überführung der Astrozyten in einen reaktiven Zustand wurden die Genexpressionen von GFAP und Vimentin gemessen. Die Genexpression von GFAP fiel 24 Stunden nach Stimulation mit dem Zytokinmix um 74,8 % auf ein höchst signifikantes Niveau ab ( $p < 0,001$ ) (Abb. 2: A). Auch die Expression von Vimentin als weiterer, häufig verwendeter Marker der Astrozytenaktivität zeigte eine signifikante Reduktion um 58,9 % unter das Expressionslevel der Kontrolle ( $p = 0,016$ ) (Abb. 2: B).

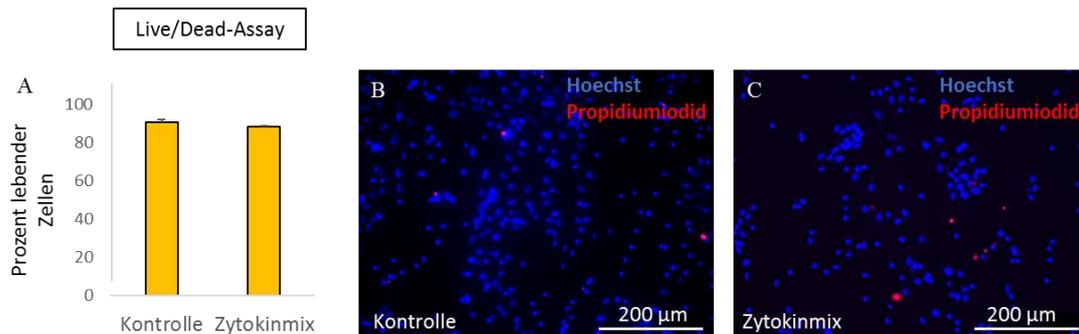


**Abb. 2: Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die Expression der Aktivierungsmarker GFAP und Vimentin**

Die Abbildung zeigt die Veränderung der Expression von GFAP (A) sowie Vimentin (B) gemessen in der RT-qPCR nach Stimulation mit dem Zytokinmix (bestehend aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=3). Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zu den unstimulierten Astrozyten an (\*:  $p < .05$ ; \*\*:  $p < .01$ ; \*\*\*:  $p < .001$ ).

#### 4.1.1. Folgen der Aktivierung auf grundlegende Zellfunktionen

Zur Charakterisierung der Aktivierungsmethode wurden die Auswirkungen der Zytokinstimulation auf grundlegende Zellfunktionen, wie das Überleben, die Proliferation und die Migration untersucht. Zunächst wurde das Überleben mithilfe eines Live/Dead-Assays analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Überlebensrate der reaktiven Astrozyten (88,1 %) nicht signifikant von derjenigen der unbehandelten Kontrollgruppe (90,6 %) abwich (Abb. 3).

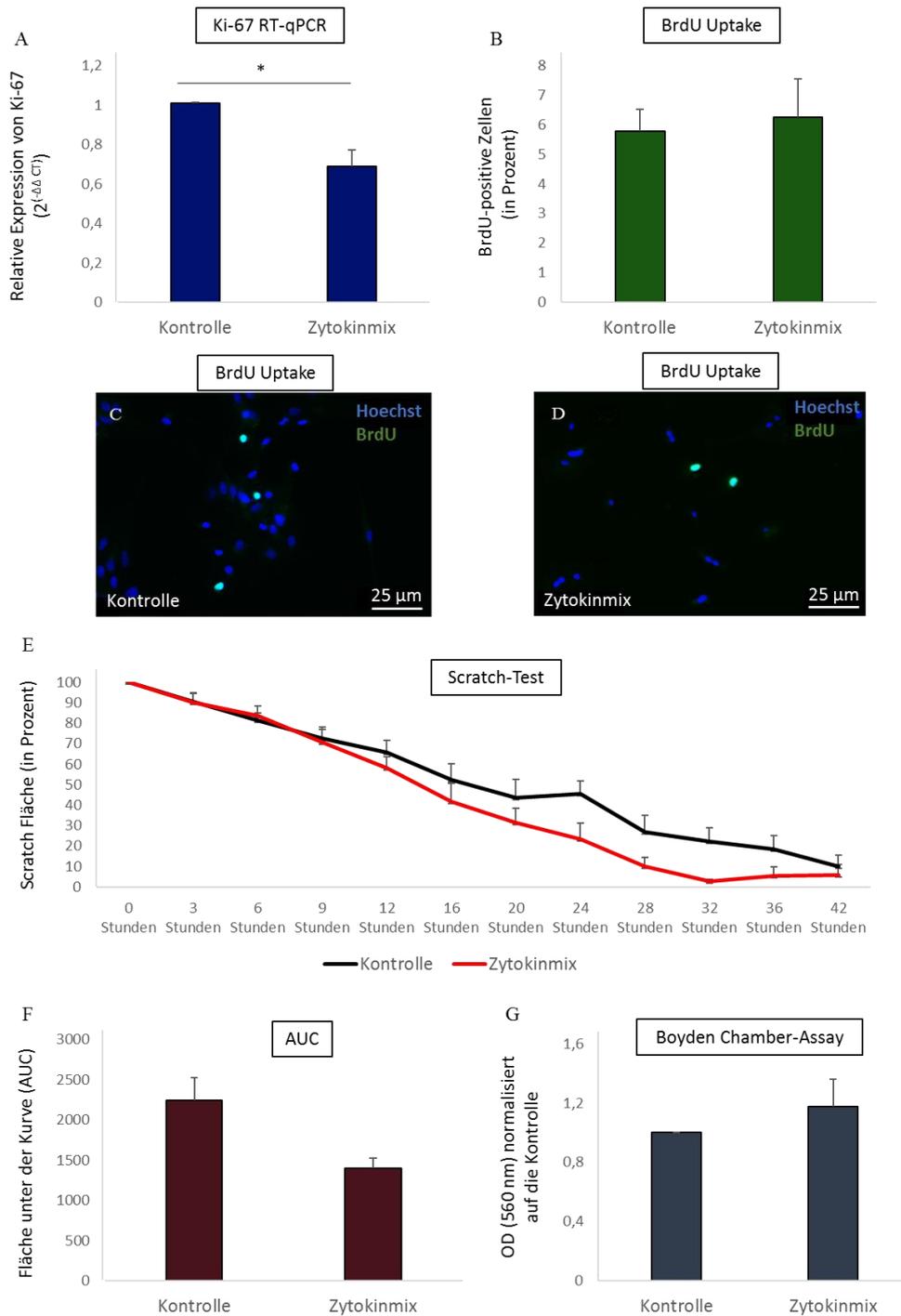


### Abb. 3 Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die Überlebensrate

Dargestellt ist das relative Überleben der Astrozyten abhängig von der vorherigen Stimulation (A). Zusätzlich sind repräsentative Bilder der Kontrollgruppe (B) sowie mit dem Zytokinmix stimulierten Astrozyten (C) gezeigt. Anfärbt sind Zellkerne (blau) und Propidiumiodid positive, tote Zellen (rot). Die Maßstabsbalken entsprechen 200 μm (n=3).

Die Analyse der Proliferation offenbarte eine signifikante Abnahme der Ki-67 Genexpression nach Aktivierung der Astrozyten mithilfe des Zytokinmixes (Abb. 4: A). Im Vergleich zur Kontrollgruppe betrug die Abnahme 31 % ( $p=0.016$ ). Als weitere Methode zur Bestimmung der Proliferation wurde die BrdU Inkorporation nach sechsstündiger Inkubation und anschließender Färbung bestimmt (Abb. 4: B). Die Proliferationsrate der reaktiven Astrozyten betrug in dieser Methode 6,3 %, während die der Kontrollgruppe bei 5,8 % lag. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant.

Zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit wurde auf zwei unterschiedliche Methoden zurückgegriffen, den Scratch-Test und den Boyden Chamber-Assay. Im Scratch-Test wurde eine Migrationszunahme nach Aktivierung der Astrozyten sichtbar. Diese Tendenz war ab einem Zeitpunkt von neun Stunden nach Versuchsbeginn über den gesamten restlichen Beobachtungszeitraum beider Konditionen nachweisbar. Der Anteil der Scratch Fläche reaktiver Astrozyten blieb kontinuierlich unter dem der Kontrollgruppe (Abb. 4: F). Die beschleunigte Migration der reaktiven Astrozyten zeigte sich auch in der „Area under the curve“ (AUC). Die AUC der Kontrollgruppe betrug 2239,4, die der Zytokinen stimulierten Astrozyten 1397,5 (Abb. 4: F). Allerdings lag zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz vor (Abb. 4: E). In der Trans-Well Migration des Boyden Chamber-Assays konnte kein Effekt nach Aktivierung der Astrozyten beobachtet werden (Abb. 4: G).



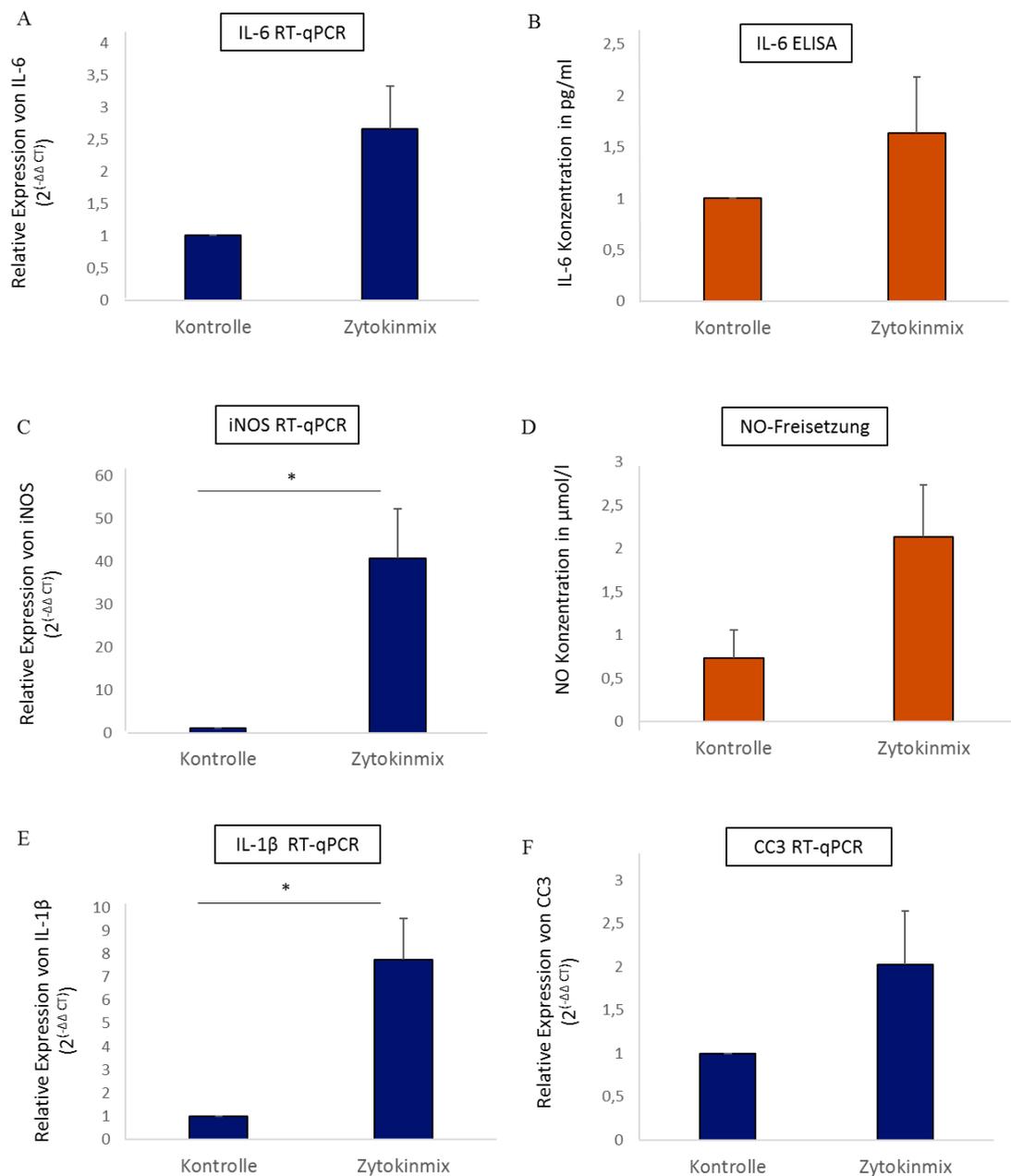
**Abb. 4: Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die Proliferation und Migration**

Es erfolgte die Analyse der Ki-67 Genexpression (A) mittels RT-qPCR sowie die Messung der relativen Proliferationsrate mittels quantitativer Analyse der BrdU-positiven Astrozyten (B). Dargestellt sind repräsentative Bilder dieser Färbungen mit Anti-BrdU (grün) sowie Hoechst (blau) gefärbten Astrozyten, sowohl der Kontrollgruppe (C) als auch der mit Zytokinen (bestehend aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) stimulierten Zellen (D). Die Maßstabsbalken entsprechen 25  $\mu$ m. Zur Untersuchung der Migration wurde ein Scratch-Test (E, F) sowie ein Boyden Chamber-Assay (G) durchgeführt. In Grafik E ist der zeitliche Verlauf des Migrationsprozesses im Scratch-Test abhängig von der Zytokinstimulation dargestellt. Dazu gehörig zeigt Grafik F die Fläche unter der Kurve. Grafik G zeigt die Veränderung der Absorption im Boyden Chamber-Assay nach Normalisierung aller Werte auf die Kontrolle (10 % FBS). Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zu den unstimulierten Astrozyten an (\*:  $p < .05$ ; \*\*:  $p < .01$ ; \*\*\*:  $p < .001$ ,  $n=3$ ).

#### **4.1.2. Immunologische Veränderungen der Aktivierung von Astrozyten**

Neben der Untersuchung des Einflusses der Astrozytenaktivierung auf grundlegende Zellfunktionen wurden in dieser Arbeit immunologische Veränderungen der Astrozyten abhängig von der Aktivierungsmethode charakterisiert. Dabei zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe die Tendenz der Expressionssteigerung immunologisch bedeutsamer Genabschnitte nach Aktivierung der Astrozyten. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt für die als pro-inflammatorisch geltenden Proteine (Abb. 5). So stieg die IL-6 Genexpression auf einen 2,7-fachen Wert (Abb. 5: A), die IL-1 $\beta$  Genexpression auf einen 7,7-fachen Wert (Abb. 5: E,  $p < 0.05$ ) und die iNOS Genexpression auf einen 40,8-fachen Wert (Abb. 5: C,  $p < 0.05$ ) der Kontrollgruppe an. Einen ähnlichen, allerdings nicht signifikanten Effekt zeigten die IL-6 Proteinexpression, gemessen im ELISA (Abb. 5: B) und die NO-Freisetzung, gemessen im Griess-Assay (Abb. 5: D). Sie stiegen nach erfolgter Aktivierung ebenfalls an.

Die Genexpression des A1-Markerproteins CC3 stieg nach Aktivierung im pro-inflammatorischen Milieu auf den doppelten Wert der Kontrollgruppe (Abb. 5: F). Dieser Anstieg blieb ohne statistische Signifikanz.

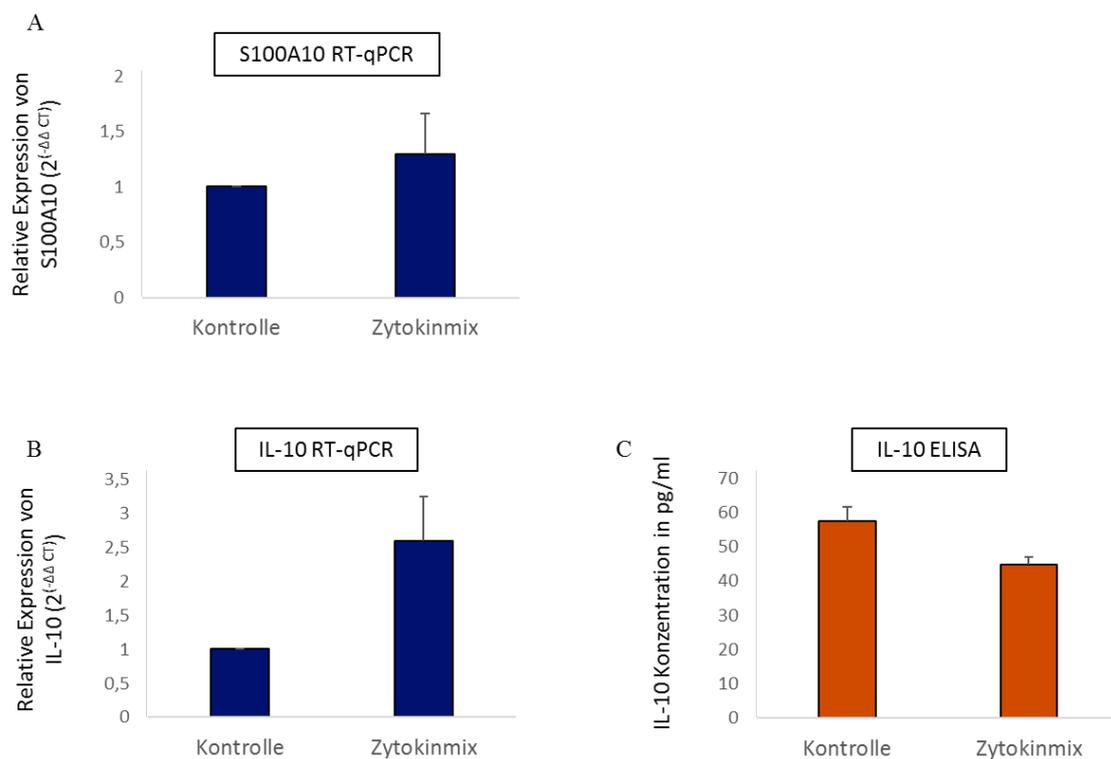


**Abb. 5: Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die pro-inflammatorische Zytokin- und Marker-Expression**

Die Stimulation erfolgte mit dem Zytokinmix, bestehend aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Die Analysen der Genexpression (blau) wurden mithilfe der RT-qPCR durchgeführt und auf die Kontrollgruppe normalisiert. Die Proteinexpression (orange) wurde entweder durch Verwendung des ELISAs (B) oder des Griess-Assays (D) bestimmt. A und B zeigen die IL-6-, C die iNOS Expression, D die NO-Freisetzung und E die IL-1 $\beta$  Expression. F entspricht der Expression des A1-Markers CC3. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zu den unstimulierten Astrozyten an (\*: p<.05; \*\*: p<.01; \*\*\*: p<.001, n=3).

Neben den mit Pro-Inflammation assoziierten Proteinen wurden auch mit Anti-Inflammation assoziierte Proteine in die Analysen einbezogen. Zunächst zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der Genexpression des A2 Markers S100A10 um das 1,3-fache der unbehandelten Kontrolle (A. 6: A).

Als anti-inflammatorisches Zytokin stieg, nach Aktivierung der Astrozyten, die IL-10 Genexpression um das 2,6-fache an (Abb. 6: B). Dies war jedoch weder statistisch signifikant, noch war der Anstieg gefolgt von einer Steigerung der Expression auf Proteinebene (Abb. 6: C).

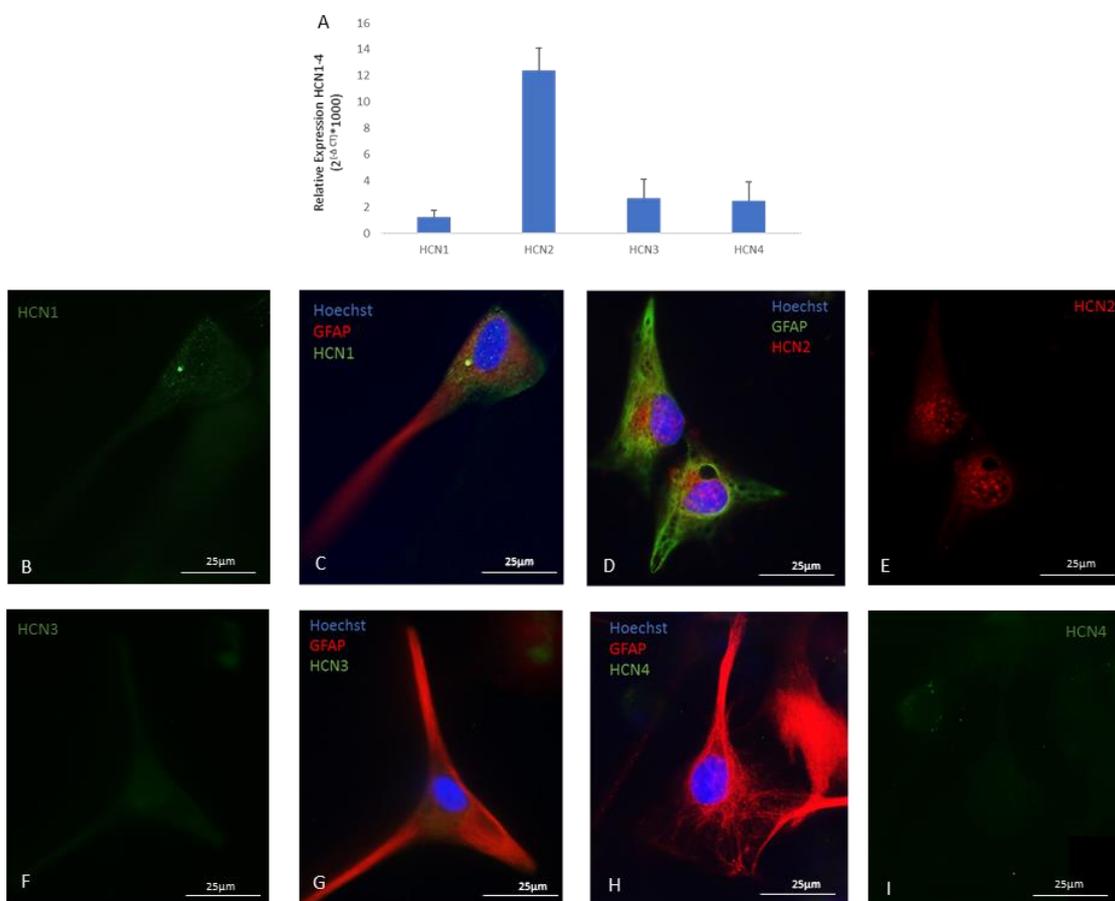


**Abb. 6: Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die anti-inflammatorische Zytokin- und Marker-Expression**

Die Stimulation erfolgte mit dem Zytokinmix, bestehend aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Die Analysen der Genexpression (blau) wurden mithilfe der RT-qPCR durchgeführt und auf die Kontrollgruppe normalisiert. Die Proteinexpression (orange) wurde durch Verwendung von ELISAs (C) bestimmt. A zeigt die Genexpression des A2-Markers S100A10, B die des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. C stellt die Proteinexpression von IL-10 dar (n=3).

## 4.2. Astrozyten exprimieren den HCN-Kanal auf mRNA und Proteinebene

Als Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Funktion des HCN-Kanals in ruhenden und reaktiven Astrozyten untersucht werden. Dafür wurde zunächst die Expression der HCN-Kanal Subtypen auf mRNA- sowie auf Proteinebene in ruhenden primären Astrozyten analysiert. Die RT-qPCRs der verschiedenen HCN-Kanal Subtypen zeigten, dass alle vier HCN-Kanal-Typen auf mRNA-Ebene exprimiert wurden (Abb. 7: A). Eine im Vergleich zu den anderen Subtypen höhere Expression war für den HCN2-Kanal nachweisbar (Abb. 7: A). Auch in den immunzytochemischen Färbungen konnte die Präsenz der HCN1- und HCN2-Kanal Subtypen dargestellt werden, wohingegen HCN3 und HCN4 zumindest mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie nicht sicher nachweisbar waren (Abb. 7: B - I).

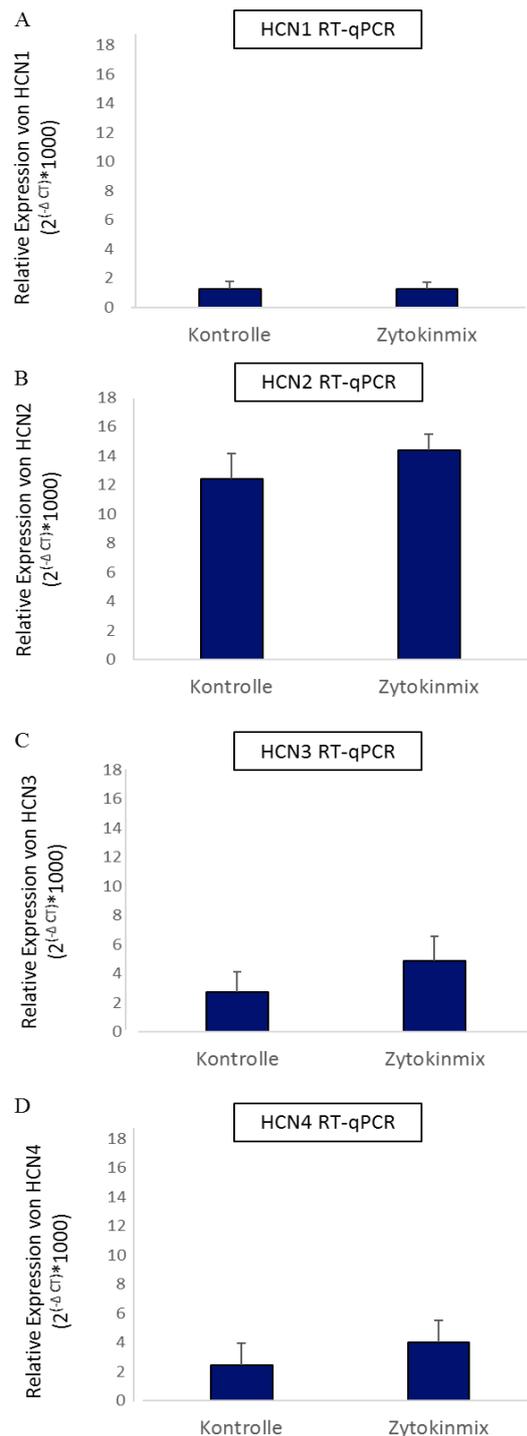


**Abb. 7: Untersuchung der HCN1-4-Kanal Subtypen Expression in primären Astrozyten**

Die RT-qPCR Ergebnisse der Subtypenanalyse sind in A dargestellt (n=5). Zur Korrektur der Ergebnisse diente RPL als Haushaltsgen, die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. ICC Färbungen von GFAP (rot in C, G, H und grün in D) und von HCN1 (grün in B, C), HCN2 (rot in D, E), HCN3 (grün in F, G) und HCN4 (grün in H, I) wurden von einer repräsentativen Probe dargestellt. Hoechst 33342 färbte alle Zellkerne blau (C, D, G, H). Die Maßstabsbalken entsprechen 25 µm.

#### 4.2.1. Einfluss der Aktivierung von Astrozyten auf die HCN-Kanal Expression

Zur Bestimmung des Einflusses der Aktivierung von Astrozyten auf die HCN-Kanal Expression wurde die Genexpression der vier HCN-Kanal Subtypen abhängig vom Aktivierungszustand auf mRNA-Ebene analysiert. Dafür wurden 24 Stunden nach Stimulation mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  (5 ng/ml), IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) RT-qPCRs durchgeführt. Es zeigte sich für keine dieser vier Subtypen eine signifikante Veränderung der Expressionsrate (Abb. 8).



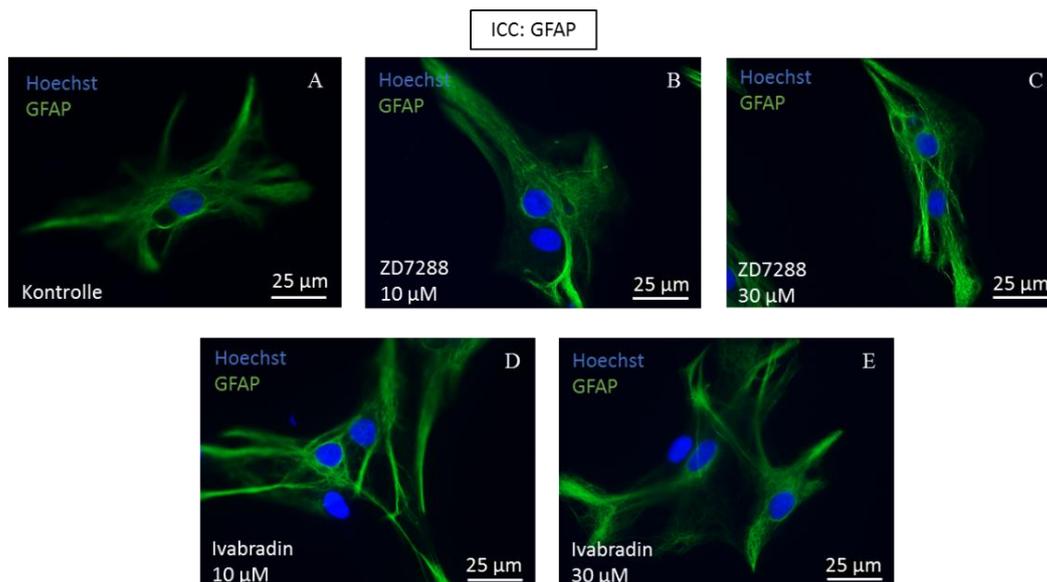
**Abb. 8: Einfluss der Astrozyten Aktivierung auf die HCN-Kanal Expression**

Vergleich der Expression des HCN1-Kanal (A), HCN2-Kanal (B), HCN3-Kanal (C), und HCN4-Kanal (D) Subtyps abhängig vom Aktivierungszustand (Aktivierung mithilfe des Zytokinmix, bestehend aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) der Astrozyten. Gemessen in der RT-qPCR (n=5).

#### 4.2.2. Einfluss der HCN-Kanal Aktivität auf ruhende und reaktive Astrozyten: Morphologie und Aktivierungsmarker

Nach Erbringung des Nachweises, dass sowohl unsere ruhenden als auch die reaktiven primären Astrozyten den HCN-Kanal exprimierten, stellte sich die Frage nach seiner Funktion auf diesen Zellen. Dafür wurde der HCN-Kanal auf einigen Astrozyten durch ZD7288 oder Ivabradin in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  oder 30  $\mu\text{M}$  inhibiert. Es resultierten acht Konditionen. Die unstimulierte Kontrollgruppe, die ruhenden Astrozyten nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  oder 30  $\mu\text{M}$  ZD7288 oder Ivabradin, die reaktiven Astrozyten nach Stimulation mit dem Zytokinmix sowie die reaktiven Astrozyten nach HCN-Kanal Blockade durch ZD7288 oder Ivabradin in der Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  (Tab. 11). In der Auswertung wurde der Effekt der HCN-Kanal Blockade mit den jeweiligen Astrozyten des gleichen Aktivierungszustands (Ausgangszustand) verglichen.

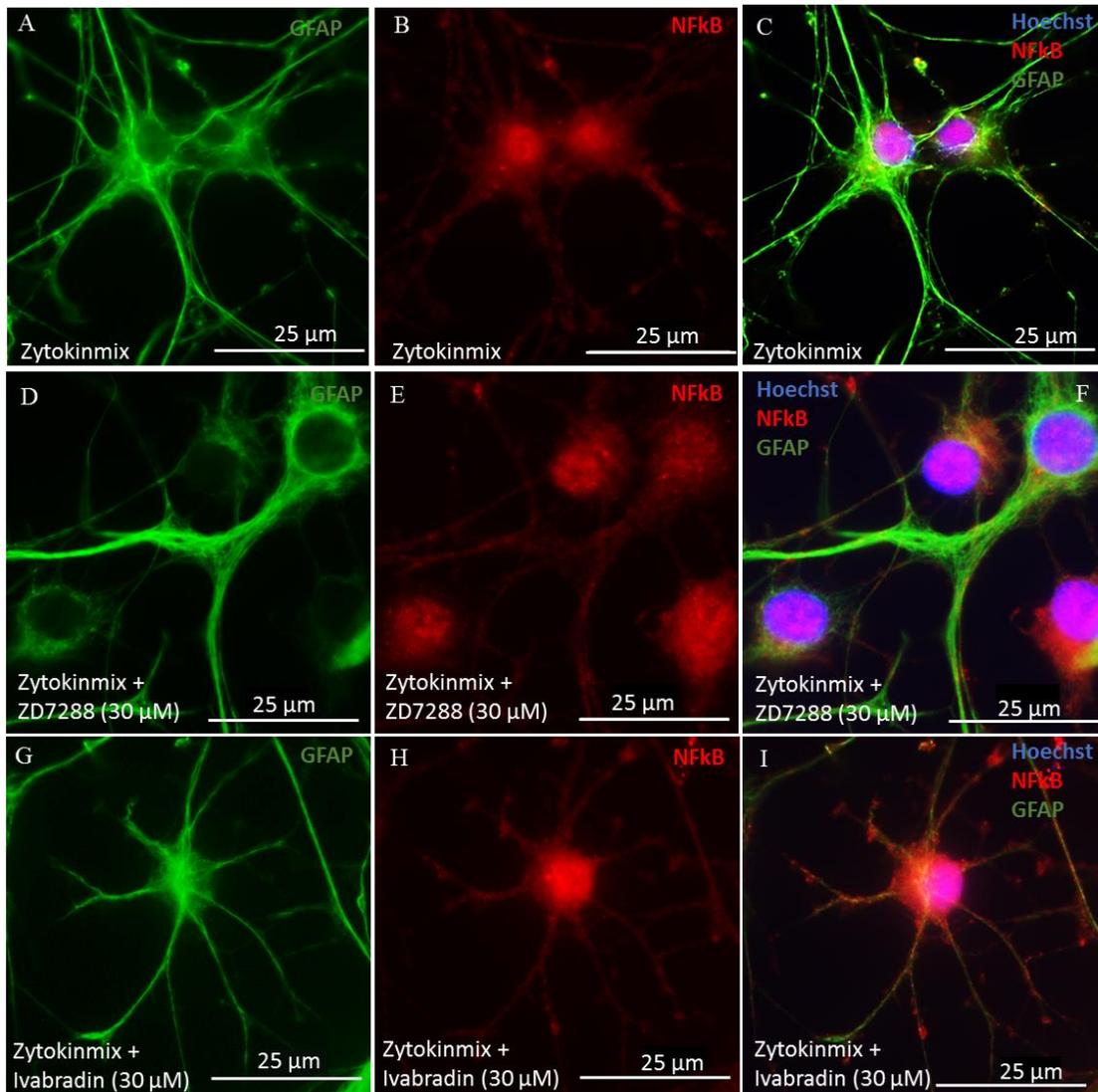
Zunächst wurde die Morphologie der HCN-Kanal blockierten Astrozyten qualitativ untersucht. Dabei zeigten sowohl ruhende Astrozyten der unstimulierten Kontrollgruppe als auch der HCN-Kanal blockierten Konditionen zahlreiche voluminöse Zellfortsätze sowie die Tendenz zum Wachstum in Zellverbänden (Abb. 9). Morphologisch konnte kein qualitativer Unterschied nach HCN-Kanal Blockade festgestellt werden.



**Abb. 9: Darstellung des Einflusses der HCN-Kanalaktivität auf die Morphologie ruhender Astrozyten**

A-E zeigen repräsentative Bilder der immunzytochemischen Färbungen von GFAP (grün). Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 blau angefärbt. A entspricht der unbehandelten Kontrolle, B und C den HCN-Kanal blockierten Konditionen nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  bzw. 30  $\mu\text{M}$  ZD7288, Bilder D und E nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  bzw. 30  $\mu\text{M}$  Ivabradin. Die Maßstabsbalken entsprechen 25  $\mu\text{m}$ .

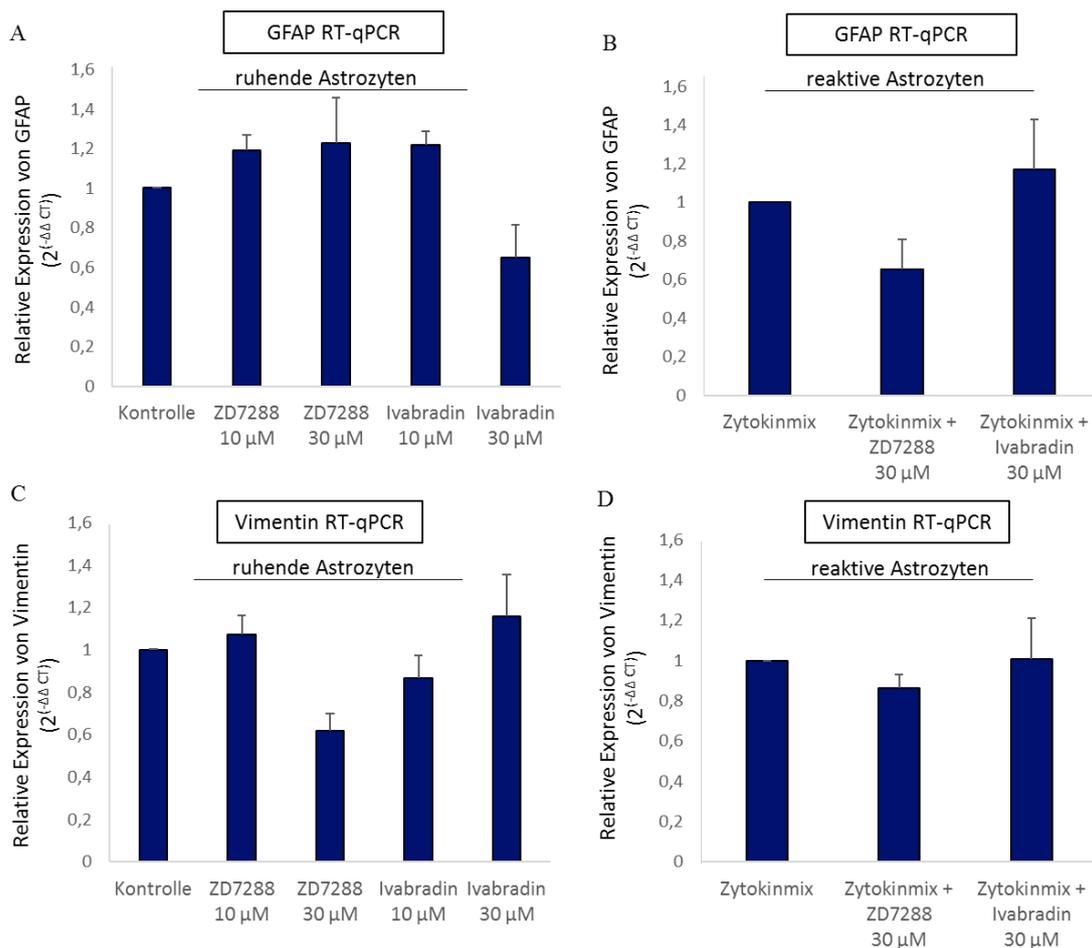
In der morphologischen Analyse nach Kostimulation (Zytokinstimulation und HCN-Kanal Blockade) zeigte sich eine Ausbildung zahlreicher langer, schlanker Zytoplasmafortsätze sowie eine nukleäre NF-kB Lokalisation (Abb. 10), die bereits im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle den Effekten einer erfolgreichen Aktivierung der Astrozyten zugeordnet werden konnte (Abb. 1). Die zusätzliche HCN-Kanal Blockade mit ZD7288 oder Ivabradin zeigte keinen weiteren qualitativen Effekt auf die Morphologie (Abb. 10).



**Abb. 10: Darstellung des Einflusses der HCN-Kanalaktivität auf die Morphologie reaktiver Astrozyten**

Repräsentative immunzytochemische Färbungen gegen GFAP (grün) und NF-kB (rot). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau). Die Bilder C, F und I zeigen die Überlagerung aller drei Färbungen der jeweiligen Kondition. Zytokin stimulierte Astrozyten entsprechen den Bildern A-C, eine zusätzliche Behandlung mit ZD7288 (30  $\mu$ M) den Bildern D-F, eine zusätzliche Behandlung mit Ivabradin (30  $\mu$ M) den Bildern G-I. Die Maßstabsbalken entsprechen 25  $\mu$ m.

In die weitere Charakterisierung der HCN-Kanal blockierten Astrozyten wurden die Expressionen der Aktivierungsmarker GFAP und Vimentin auf ruhenden und reaktiven Astrozyten einbezogen. Dabei zeigte die Expression von GFAP auf ruhenden (Abb. 11: A) wie auch auf reaktiven (Abb. 11: B) Astrozyten keine signifikante Veränderung nach Behandlung mit ZD7288 oder Ivabradin. Auch die Ergebnisse der RT-qPCRs der Vimentin Expression blieben sowohl auf ruhenden (Abb. 11: C) als auch auf reaktiven Astrozyten (Abb. 11: D) auf einem ähnlichen Niveau wie die der Astrozyten ohne HCN-Kanal Blockade im gleichen Aktivierungszustand.

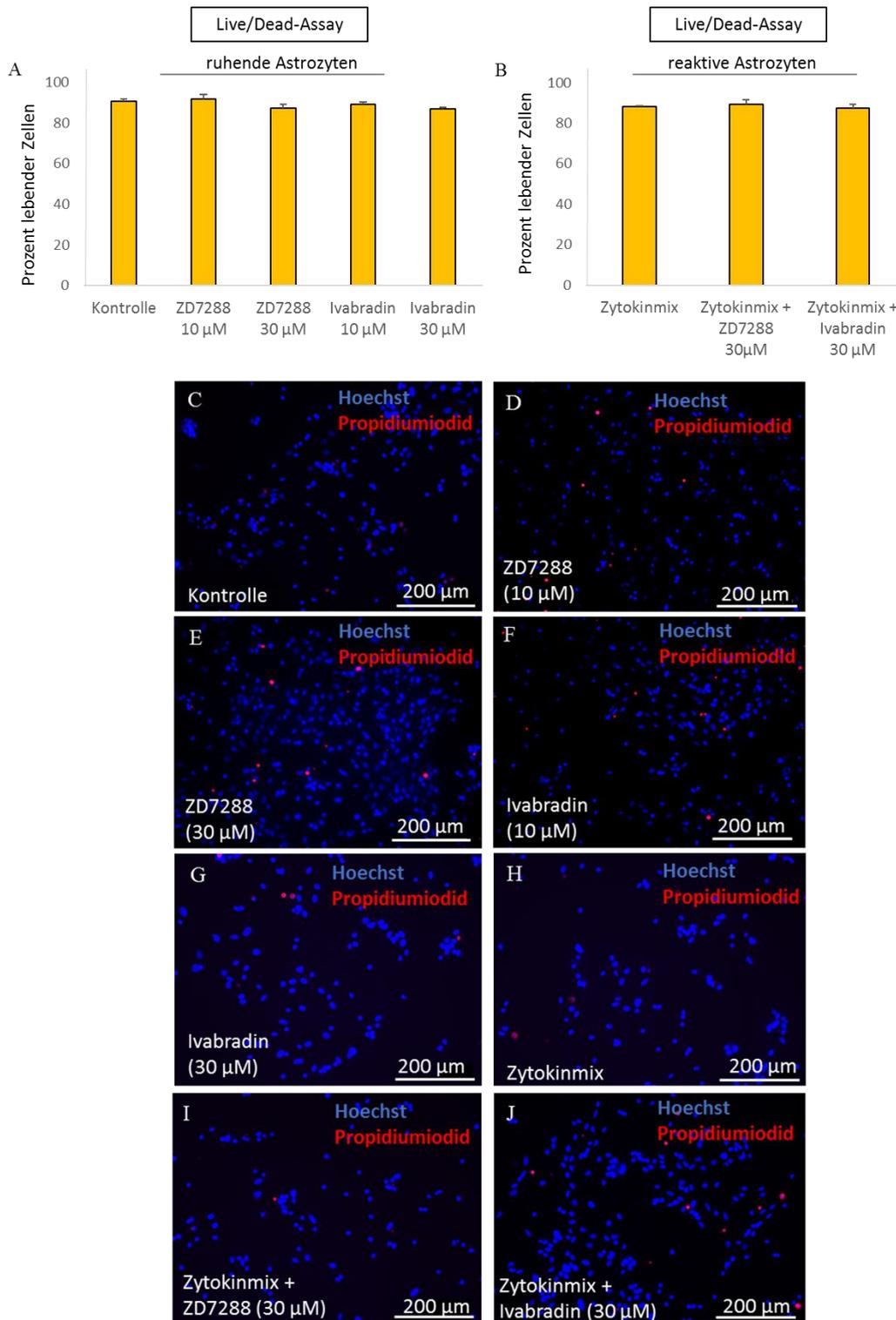


**Abb. 11: Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Expression der Aktivierungsmarker GFAP und Vimentin**

Gemessen wurde die Genexpression von GFAP (A, B) sowie Vimentin (C, D) in der RT-qPCR ruhender (A, C) oder reaktiver (B, D) Astrozyten nach Behandlung mit ZD7288 (10 μM, 30 μM) oder Ivabradin (10 μM, 30 μM) (n=3).

#### **4.2.3. Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf ruhende und reaktive Astrozyten: Überleben, Proliferation und Migration**

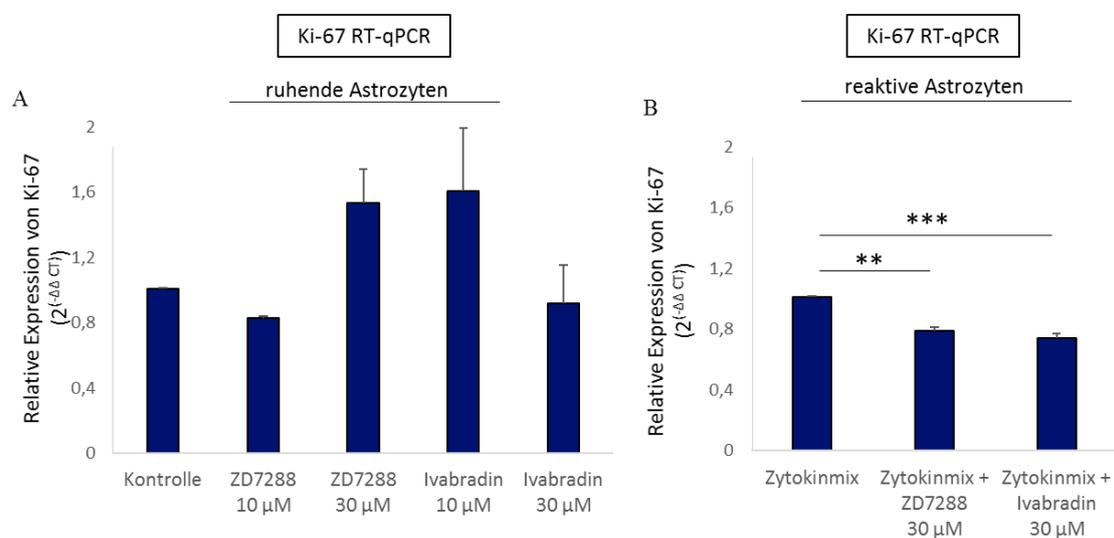
Zur genaueren Analyse grundlegender Zellfunktionsveränderungen ruhender oder reaktiver Astrozyten nach HCN-Kanal Blockade wurde zunächst das Überleben untersucht. Dafür wurde ein Live/Dead-Assay aller Konditionen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten keine Veränderungen der Überlebensraten ruhender Astrozyten nach HCN-Kanal Blockade verglichen zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 12: A). Unabhängig von den Konzentrationen der HCN-Kanal Blocker lag die Überlebensrate aller Konditionen zwischen maximal 91,8 % (ZD7288 10  $\mu$ M) und minimal 86,9 % (Ivabradin 30  $\mu$ M). Auch bei Betrachtung reaktiver Astrozyten zeigte sich keine Veränderung der Überlebensrate nach Stimulation mit ZD7288 (30  $\mu$ M) oder Ivabradin (30  $\mu$ M, Abb. 12: B). Die Überlebensraten lagen zwischen 87,3 % (Zytokinmix + Ivabradin (30  $\mu$ M)) und 89,3 % (Zytokinmix + ZD7288 (30  $\mu$ M)).



**Abb. 12: Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf das Überleben primärer Astrozyten**

Das relative Überleben nach HCN-Kanal Blockade ruhender Astrozyten ist in A, das reaktiver Astrozyten in B dargestellt. C-J zeigen repräsentative Bilder der zugehörigen Färbungen. Tote Zellen sind mit Propidiumiodid rot, die Zellkerne mit Hoechst blau angefärbt. Eine unbehandelte Kondition diente als Kontrolle (C). Die HCN-Kanal Blockade ruhender Astrozyten ist nach Behandlung mit ZD7288 in den Konzentrationen 10  $\mu$ M (D) oder 30  $\mu$ M (E) sowie 10  $\mu$ M (F) oder 30  $\mu$ M (G) Ivabradin dargestellt. H zeigt ein Bild nach Aktivierung durch Zytokinstimulation, I eins nach zusätzlicher Blockade des HCN-Kanals durch ZD7288 (30  $\mu$ M) sowie J eins nach zusätzlicher Blockade des HCN-Kanals durch Ivabradin (30  $\mu$ M). Die Maßstabsbalken entsprechen 200  $\mu$ m (n=3).

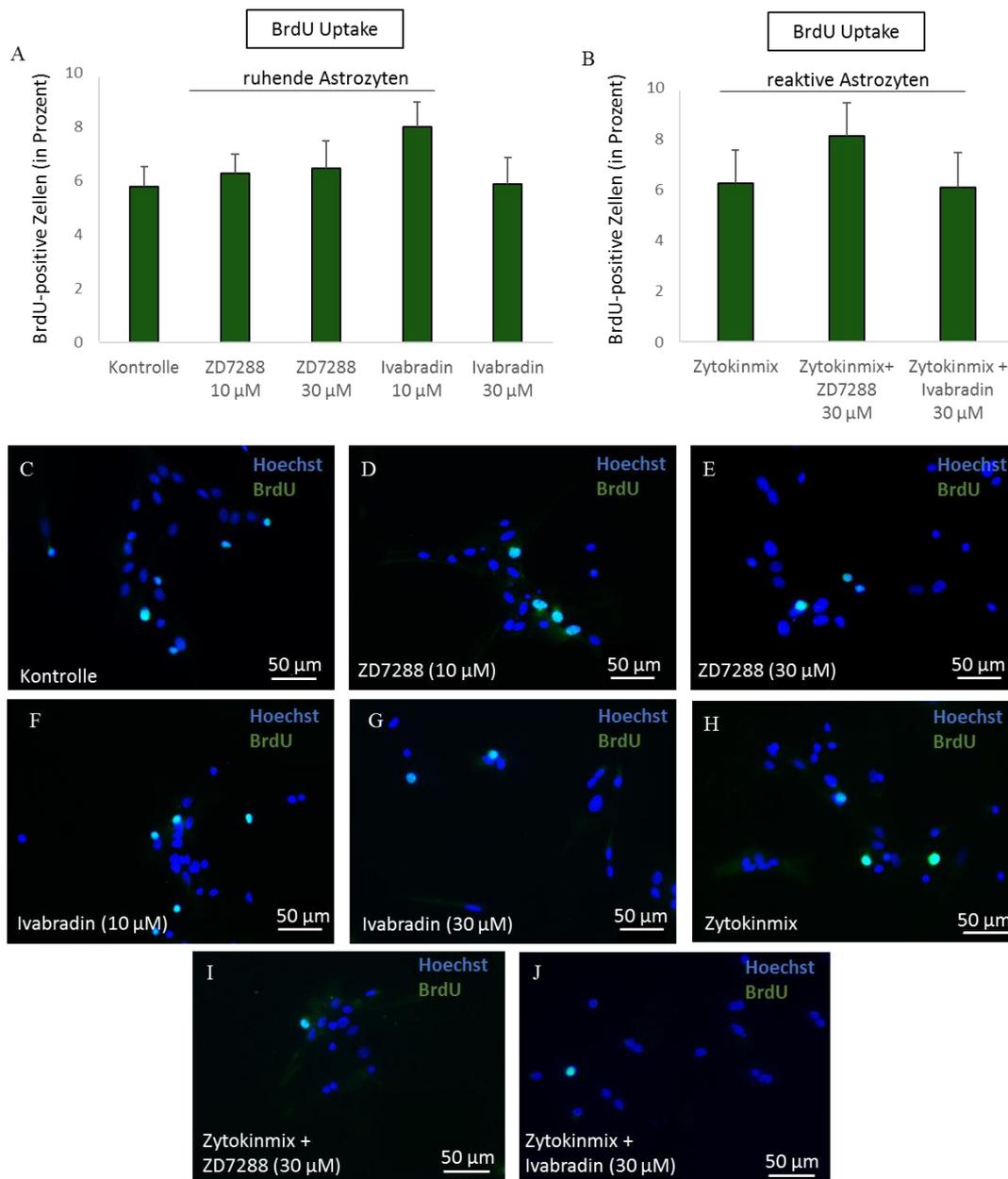
Als zentrale Funktion aller Zellen wurde die Proliferation von Astrozyten unterschiedlicher Aktivierungszustände abhängig von der HCN-Kanal Aktivität mithilfe zweier unterschiedlicher Methoden untersucht. Zunächst wurde die relative Proliferation durch die quantitative Analyse des Proliferationsmarkers Ki-67 auf ruhenden (Abb. 13: A) und reaktiven (Abb. 13: B) Astrozyten mittels RT-qPCR bestimmt. Dabei zeigten ruhende Astrozyten keine von der HCN-Kanal Aktivität abhängige Expressionsveränderung (Abb. 13: A). Reaktive Astrozyten hingegen reagierten auf die HCN-Kanal Blockade mit einer deutlichen Reduktion der Ki-67 Genexpression. Im Vergleich zu ausschließlich aktivierten Zellen konnte nach Behandlung mit ZD7288 (30  $\mu$ M) eine Abnahme auf 78,2 % und nach Behandlung mit Ivabradin (30  $\mu$ M) eine Abnahme auf 73,2 % des Ausgangswertes beobachtet werden. Für beide Konditionen wurde ein statistisch hochsignifikantes (ZD7288,  $p=0.004$ ) oder höchstsignifikantes (Ivabradin,  $p=0.001$ ) Niveau der Reduktion erreicht.



**Abb. 13: Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Proliferation primärer Astrozyten, gemessen mittels Ki-67 RT-qPCRs**

A zeigt die Analyse der Ki-67 Genexpression ruhender, B reaktiver Astrozyten gemessen mithilfe der RT-qPCR. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zu den jeweils unbehandelten Astrozyten des gleichen Aktivierungszustands an (\*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ; \*\*\*:  $p<0.001$ ,  $n=3$ ).

Als zweite Methode der Proliferationsmessung wurde die Inkorporation von BrdU bestimmt. Der Anteil an BrdU-positiven Zellen war weder auf ruhenden (Abb. 14: A) noch auf reaktiven (Abb. 14: B) Astrozyten von der HCN-Kanal Blockade abhängig. Die Proliferationsrate zeigte lediglich leichte Schwankungen zwischen 5,8 % (unstimulierte Kontrolle) und 8,1 % (Zytokinmix + ZD7288 (30  $\mu$ M)).

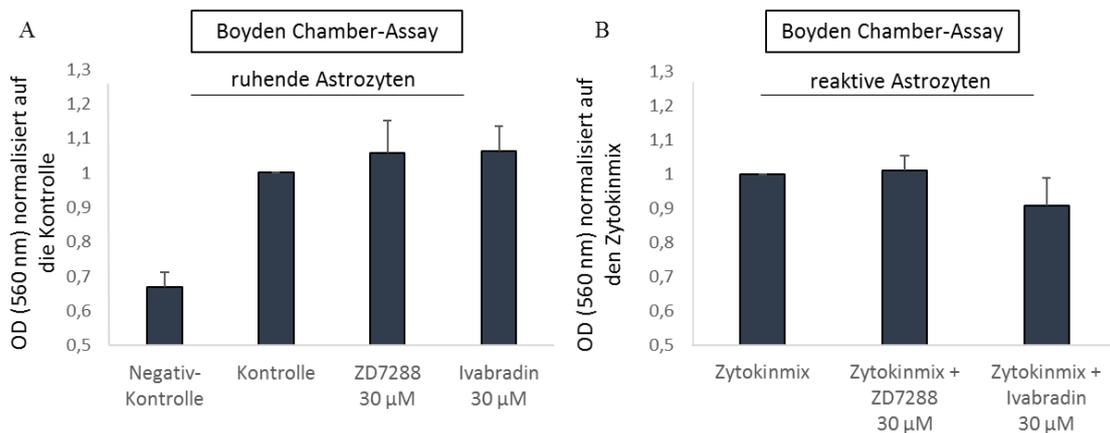


**Abb. 14: Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Proliferation primärer Astrozyten, gemessen mittels BrdU Inkorporation**

Die Proliferationsrate wurde durch Färbung von inkorporiertem BrdU ruhender (A) sowie reaktiver (B) Astrozyten bestimmt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst blau und proliferierende Zellen mit BrdU grün angefärbt. Repräsentative Bilder zeigen die Kontrolle (C), die HCN-Kanal Blockade ruhender Astrozyten mit ZD7288 in den Konzentrationen 10  $\mu$ M (D), 30  $\mu$ M (E) sowie Ivabradin 10  $\mu$ M (F) und 30  $\mu$ M (G). Reaktive Astrozyten sind in H, eine zusätzliche HCN-Kanal Blockade mit ZD7288 (30  $\mu$ M) in I oder mit Ivabradin (30  $\mu$ M) in J dargestellt. Die Maßstabsbalken entsprechen 50  $\mu$ m (n=3).

Zur weiteren Analyse grundlegender Zellfunktionsveränderungen nach HCN-Kanal Blockade wurde die Migrationsfähigkeit der Astrozyten untersucht. Auch für diese Funktionsanalyse wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet.

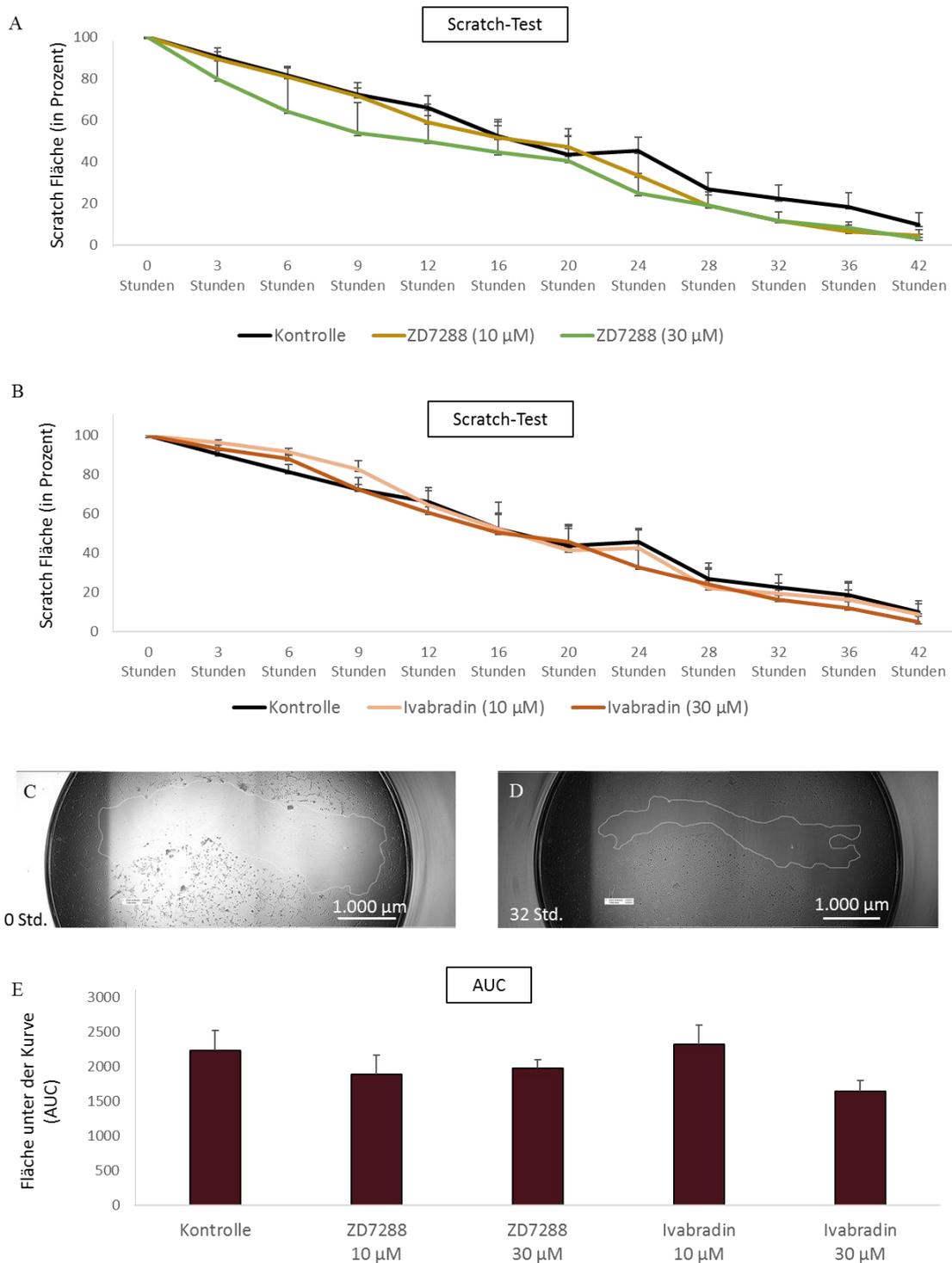
Zunächst wurde der Boyden Chamber Assay zur Messung der Transmigration durch eine Filtermembran durchgeführt. In der Negativkontrolle, in der die untere Kammer mit 1 % FBS gefüllt wurde, zeigte sich der erwartete Abfall der Migrationsrate als Validitätskriterium dieser Methode (Abb. 15: A). Die HCN-Kanal Blockade offenbarte keinen Effekt auf die Migration ruhender (Abb. 15: A) sowie reaktiver (Abb. 15: B) Astrozyten.



**Abb. 15: Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Migration primärer Astrozyten, gemessen mittels Boyden Chamber-Assays**

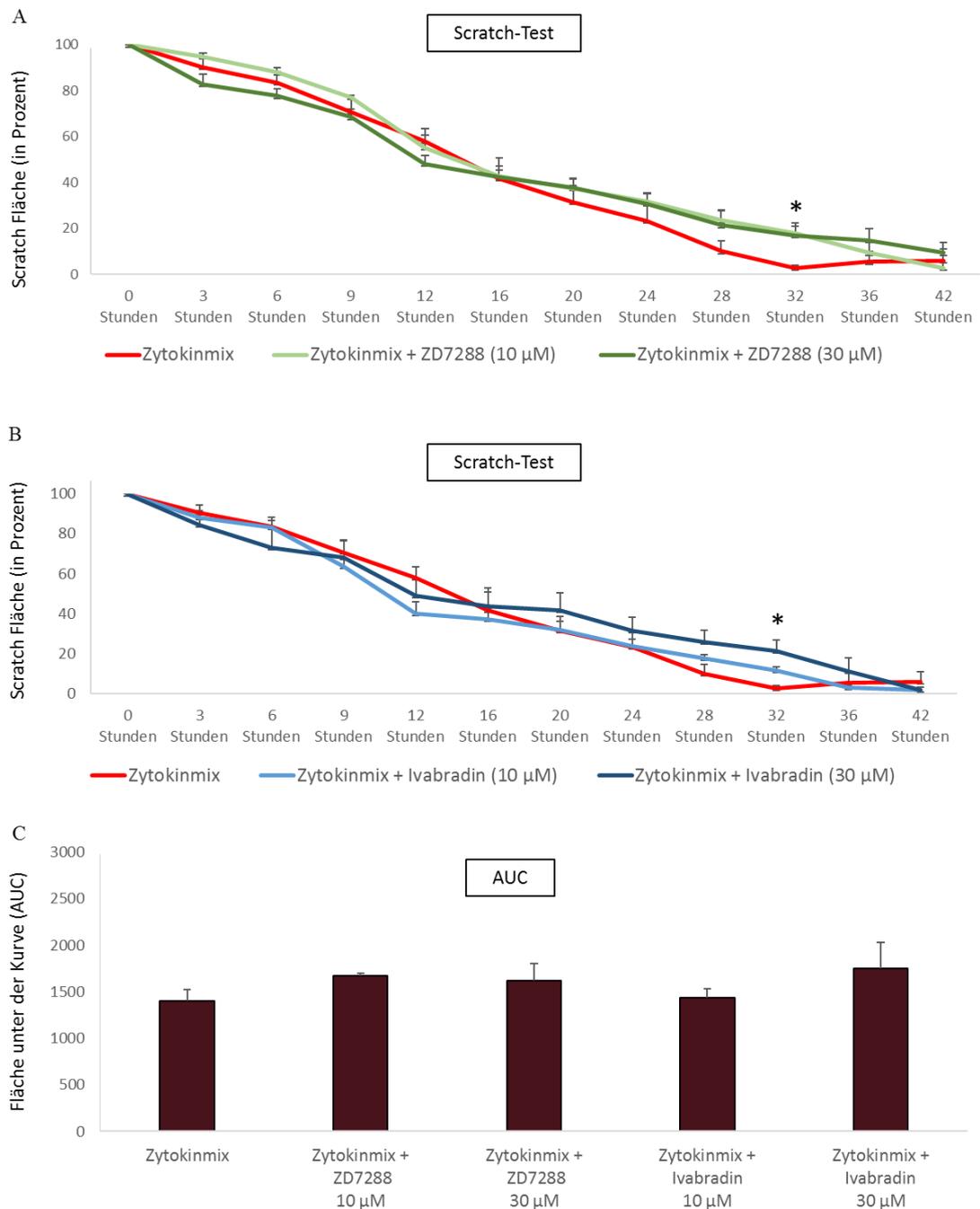
Der Boyden Chamber-Assay zeigt die Veränderung der Absorption nach Normalisierung aller Werte auf die Kontrolle (A, 10 % FBS) oder den Zytokinmix (B). Dargestellt ist die Migration ruhender Astrozyten (A) sowie reaktiver Astrozyten (B) nach HCN-Kanal Blockade durch ZD7288 (30 µM) oder Ivabradin (30 µM) (n=3).

Als weitere Methode zur Migrationsbestimmung wurden Scratch-Tests durchgeführt. Dabei wurde der zeitliche Verlauf der planaren Migration ruhender (Abb. 16) sowie reaktiver (Abb. 17) Astrozyten regelmäßig gemessen und in Prozent der verbliebenen Scratch Fläche angegeben. Zusätzlich wurde die AUC für jede Kondition berechnet (Abb. 16: E, Abb. 17: C). Es fiel auf, dass die HCN-Kanal Blockade auf die Migration ruhender Astrozyten keinen Effekt zeigte (Abb. 16), wohingegen eine signifikante Abnahme der Migration reaktiver Astrozyten der Konditionen Zytokinmix + ZD7288 (10 µM) sowie Zytokinmix + Ivabradin (30 µM) 32 Stunden nach Versuchsbeginn nachweisbar war (Abb. 17, p=.038 bzw. p=.043). Diese Abnahme spiegelte sich auch in der AUC wider. Sie lag in der reaktiven Kontrollgruppe mit einem Wert von 1397,5 unter den Werten aller HCN-Kanal blockierten Konditionen (Abb. 17: C). Allerdings war dieses Ergebnis ohne statistische Signifikanz.



**Abb. 16: Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Migration ruhender Astrozyten, gemessen mittels Scratch Tests**

Die Grafiken A und B zeigen den zeitlichen Verlauf der Abnahme des Flächeninhalts nach Durchführung eines Scratches und Behandlung mit ZD7288 (A: 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M) oder Ivabradin (B: 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M). C und D zeigen repräsentative Bilder der Auswertung zu den Zeitpunkten null Stunden (C) sowie 32 Stunden (D) nach Versuchsbeginn. Die Maßstabsbalken entsprechen 1.000  $\mu$ m. Die Fläche unter den Kurven als Maß der Migrationsfähigkeit ist in Grafik E zusammenfassend für alle vorherigen Konditionen dargestellt (n=3).

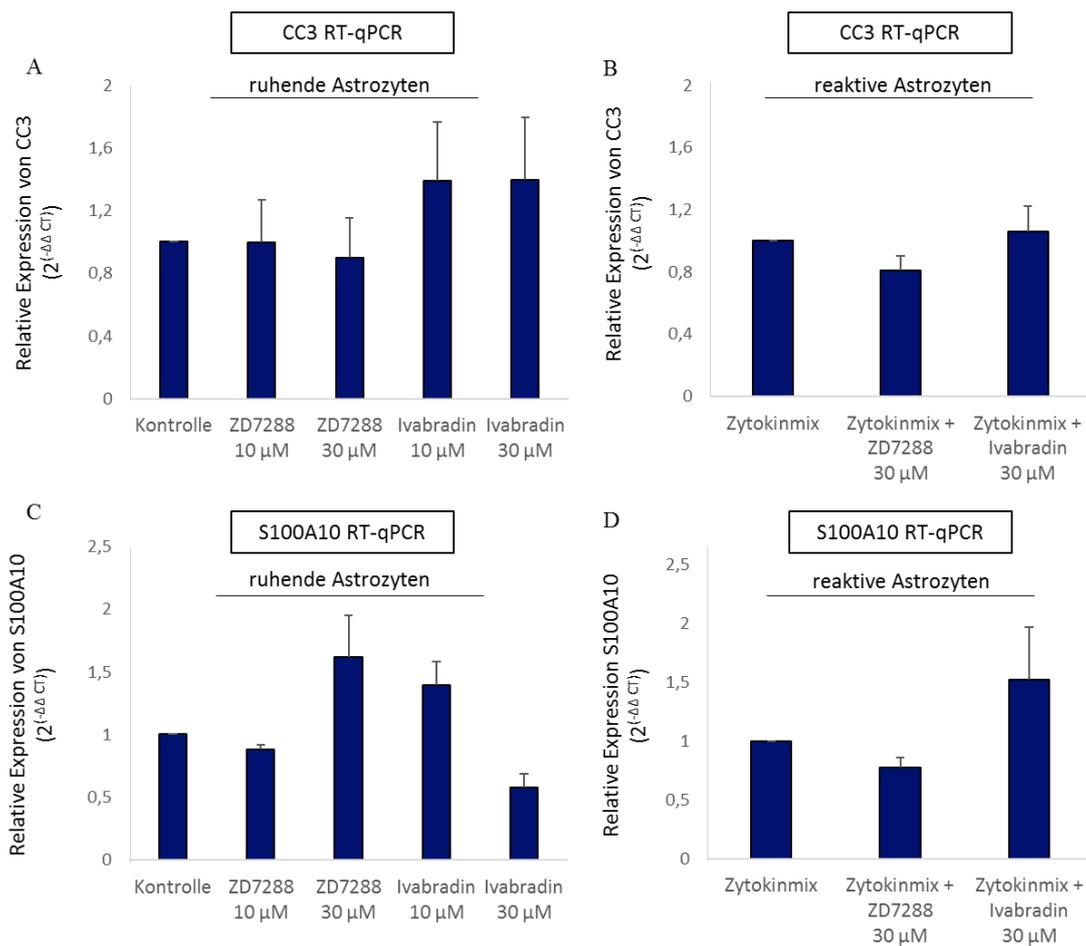


**Abb. 17: Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Migration reaktiver Astrozyten, gemessen mittels Scratch Tests**

Zur Untersuchung der Migration wurde ein Scratch-Test durchgeführt. Die Grafiken A und B entsprechen dem zeitlichen Verlauf der Abnahme der Scratch Fläche nach Behandlung mit ZD7288 (A: 10 µM und 30 µM) oder Ivabradin (B: 10 µM und 30 µM). Die Fläche unter den Kurven als Maß der Migrationsfähigkeit ist in Grafik C zusammenfassend für alle vorherigen Konditionen dargestellt (n=3). Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zu den reaktiven Astrozyten nach Stimulation mit dem Zytokinmix an (\*: p<.05; \*\*: p<.01; \*\*\*: p<.001).

#### 4.2.4. Immunologische Auswirkungen der HCN-Kanal Blockade auf ruhende und reaktive Astrozyten

Zur Klassifikation der Polarisation von Astrozyten nach Behandlung mit ZD7288 oder Ivabradin wurden die Expressionen eines A1-Markers (der Komplementkomponente C3, CC3) (Abb. 18: A, B) sowie eines A2-Markers (S100A10) (Abb. 18: C, D) in der RT-qPCR gemessen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Expressionslevel ruhender (Abb. 18: A, C) oder reaktiver (Abb. 18: B, D) Astrozyten nach Blockade des HCN-Kanals.

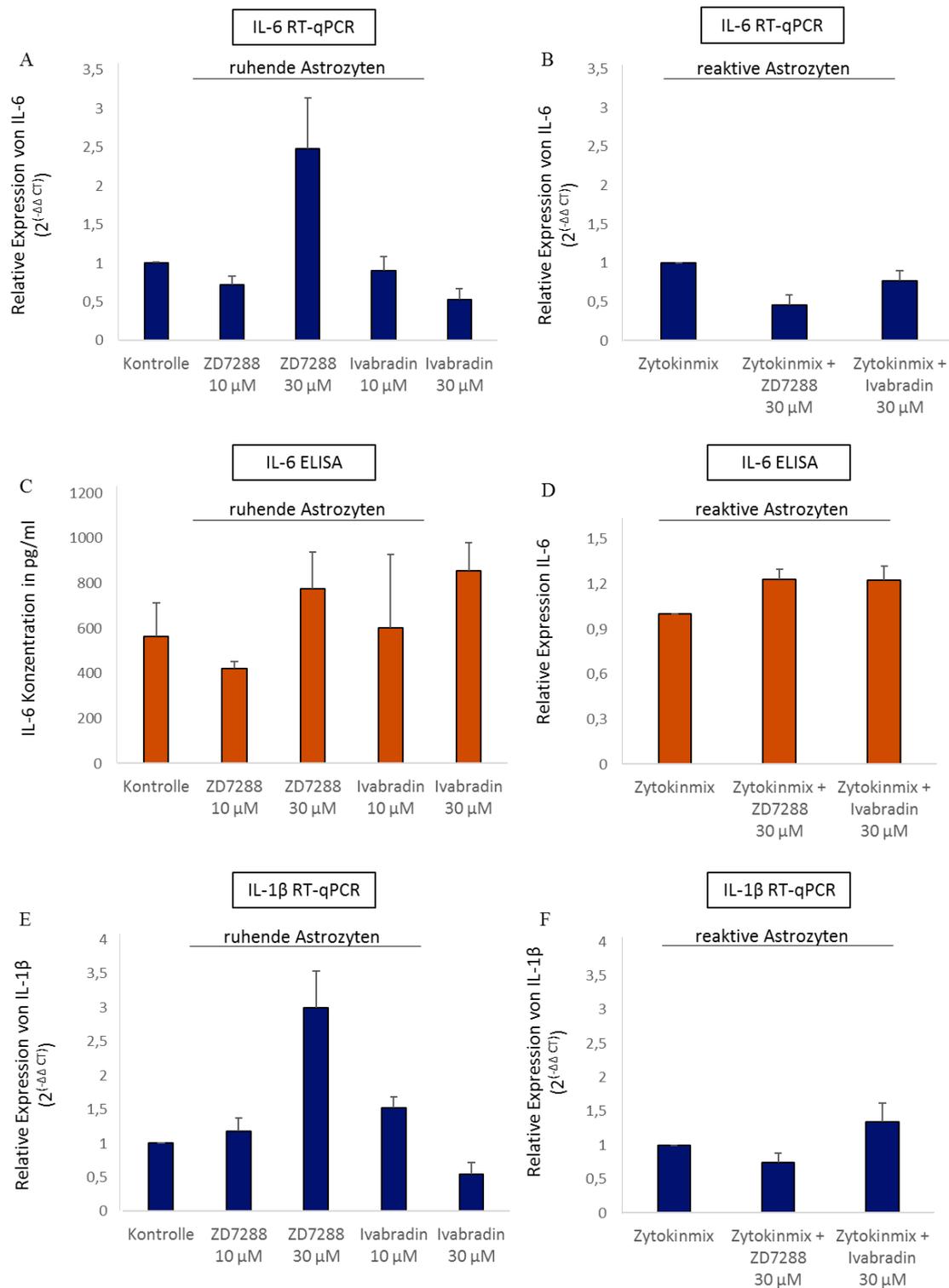


**Abb. 18: Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Expression immunologischer Marker primärer Astrozyten**

Expressionslevel des A1-Markers CC3 ruhender (A) und reaktiver (B) sowie des A2-Markers S100A10 ruhender (C) und reaktiver (D) Astrozyten gemessen mittels RT-qPCR nach Behandlung mit ZD7288 (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) oder Ivabradin (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) (n=3).

Zur genaueren Beurteilung der immunologischen Auswirkungen der HCN-Kanal-Blockade erfolgte die Analyse der Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine und Botenstoffe. Als pro-inflammatorisch wirkende Zytokine wurden die IL-6 Gen- und Proteinexpressionen, die IL-1 $\beta$ - sowie die iNOS Genexpressionen bestimmt. Zusätzlich wurde ein Griess-Assay zur Analyse der freigesetzten NO-Konzentration durchgeführt. Als anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin wurde die IL-10 Expression sowohl in der RT-qPCR als auch im ELISA gemessen. Dabei wurden sowohl ruhende als auch reaktive Astrozyten nach Behandlung mit ZD7288 (10  $\mu$ M oder 30  $\mu$ M) oder Ivabradin (10  $\mu$ M oder 30  $\mu$ M) mit unbehandelten Astrozyten gleichen Aktivierungszustands verglichen.

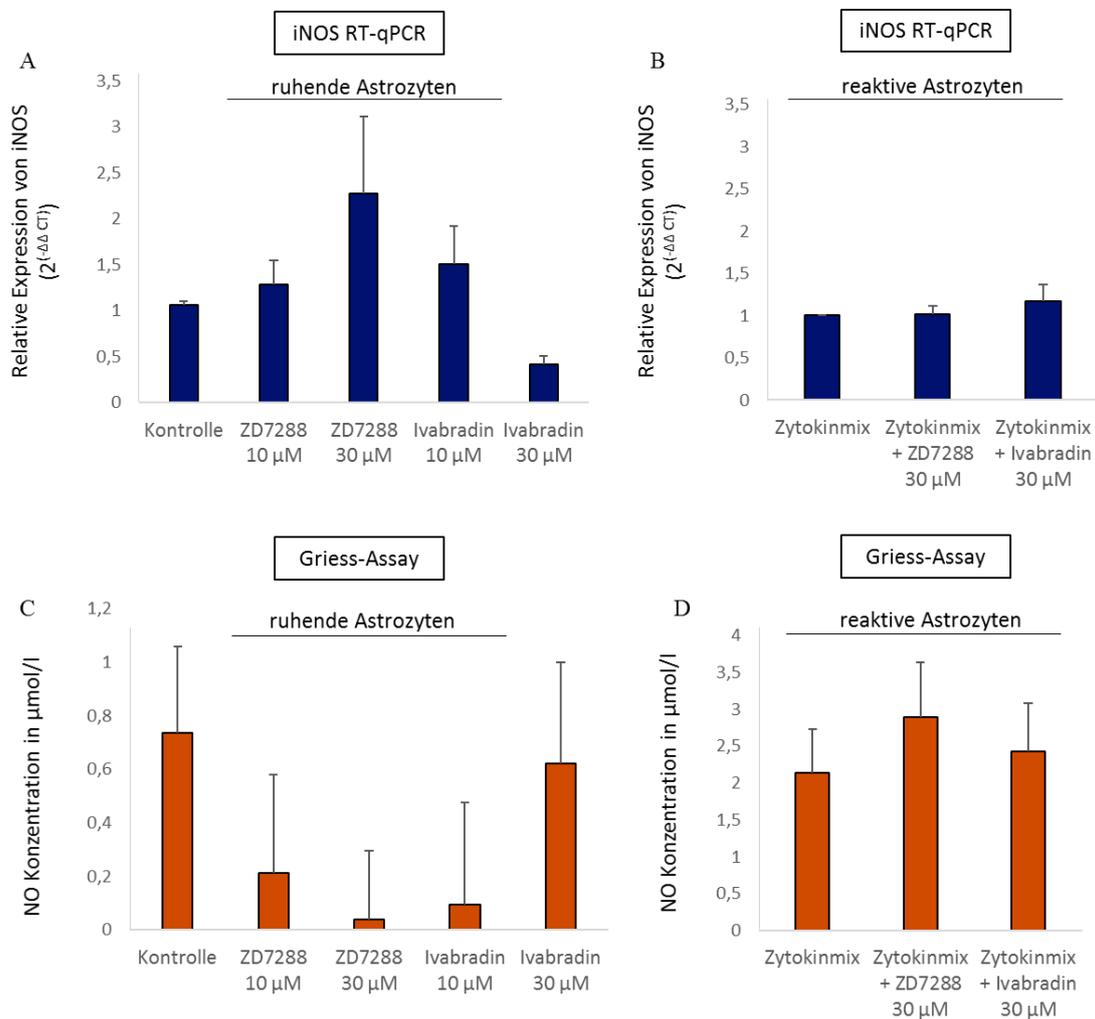
Die IL-6 Gen- (Abb. 19: A) sowie Proteinexpression (Abb. 19: B) zeigten weder auf ruhenden (Abb. 19: A, C) noch auf reaktiven (Abb. 19: B, D) Astrozyten einen von der HCN-Kanal Aktivität abhängigen Effekt. Auch die Genexpression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  blieb von der HCN-Kanal Blockade ruhender (Abb. 19: E) und reaktiver (Abb. 19: F) Astrozyten unbeeinflusst.



**Abb. 19: Darstellung der immunologischen Auswirkungen der HCN-Kanal Blockade auf proinflammatorische Signalwege – IL-6 und IL-1 $\beta$  Expression**

Die Ergebnisse der RT-qPCRs sind in blau (A, B, E, F), die der ELISAs (C, D) in orange dargestellt. Die IL-6 Gen- (A, B) sowie Proteinexpression (C, D) und die IL-1 $\beta$  Genexpression (E, F) repräsentieren proinflammatorische Signalwege (n=3) ruhender (A, C, E) sowie reaktiver (B, D, F) Astrozyten nach Blockade des HCN-Kanals (n=3).

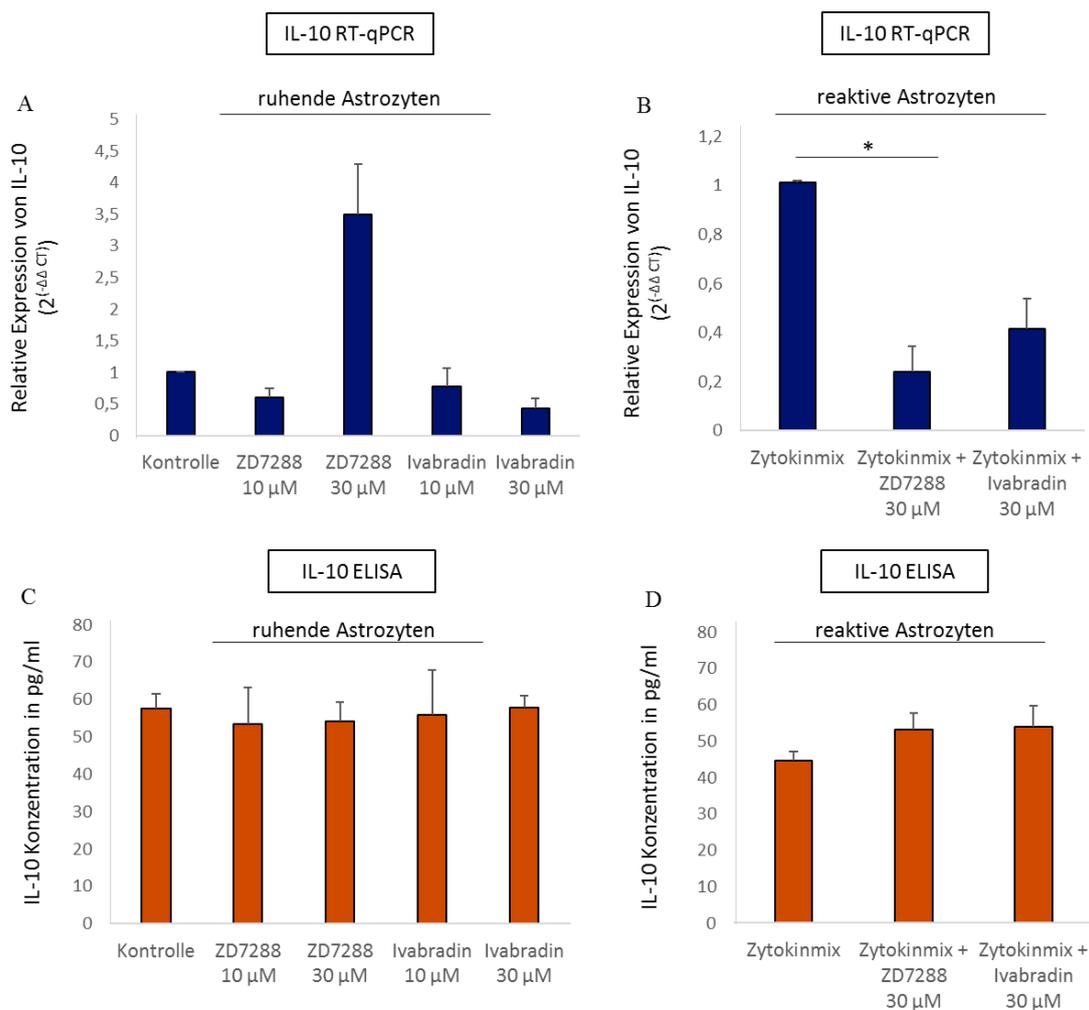
Als weitere pro-inflammatorische Marker wurden die zytoplasmatische iNOS Expression mittels RT-qPCR (Abb. 20: A, B) und die NO-Freisetzung mittels Griess-Assay (Abb. 20: C, D) nach Behandlung mit ZD7288 (10  $\mu$ M oder 30  $\mu$ M) oder Ivabradin (10  $\mu$ M oder 30  $\mu$ M) analysiert. Jedoch zeigte keine Kondition eine Veränderung der Expressionen nach Blockade der HCN-Kanal Aktivität (Abb. 20).



**Abb. 20: Darstellung der immunologischen Auswirkungen der HCN-Kanal Blockade auf pro-inflammatorische Signalwege – iNOS Expression und NO-Freisetzung**

Die Ergebnisse der RT-qPCRs sind in blau (A, B), die des Griess-Assays in orange (C, D) dargestellt. Die iNOS Genexpression (A, B) sowie die NO-Freisetzung (C, D) repräsentieren proinflammatorische Signalwege (n=3) ruhender (A, C) sowie reaktiver (B, D) Astrozyten nach Blockade des HCN-Kanals (n=3).

Neben den genannten pro-inflammatorischen Zytokinen wurde auch das anti-inflammatorisch wirkende IL-10 untersucht. Die IL-10 Expression wurde in der RT-qPCR (Abb. 21: A, B) wie auch im ELISA (Abb. 21, C, D) quantifiziert. Im Vergleich zu reaktiven Astrozyten ohne HCN-Kanal Blockade lag eine signifikante Reduktion der IL-10 Genexpression nach Behandlung reaktiver Astrozyten mit ZD7288 (30  $\mu$ M) vor (Abb. 21: B). Alle anderen Konditionen (ruhende und reaktive Astrozyten) zeigten mit Ausnahme ruhender Astrozyten nach Behandlung mit ZD7288 (30  $\mu$ M) ebenfalls eine Reduktion der IL-10 Genexpression. Diese Reduktionen waren jedoch nicht signifikant. Die IL-10 Proteinexpression blieb von der HCN-Kanal Blockade unbeeinflusst (Abb. 21: C, D).



**Abb. 21: Darstellung der immunologischen Auswirkungen der HCN-Kanal Aktivität reaktiver Astrozyten auf anti-inflammatorische Signalwege – IL-10 Expression**

Die Ergebnisse der RT-qPCRs sind in blau (A, B), die der ELISAs in orange (C, D) dargestellt. Die IL-10 Gen- (A, B) sowie Proteinexpression (C, D) repräsentieren anti-inflammatorische Signalwege ruhender (A, C) sowie reaktiver (B, D) Astrozyten nach Blockade des HCN-Kanals. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Astrozyten des gleichen Aktivierungszustands an (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ,  $n=3$ ).

## 5. Diskussion

### 5.1. Astrozyten wurden durch pro-inflammatorische Stimulation in einen reaktiven Phänotyp überführt

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Aktivierung von Astrozyten durch Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) *in vitro* erzeugt werden kann (vgl. Kap. 4.1.). Sowohl die Zytokine der angeborenen Immunität, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , als auch IFN- $\gamma$  als Zytokin der adaptiven Immunität spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Neuroinflammation.<sup>85, 86, 87</sup> Es ist bereits bekannt, dass aktivierte Mikroglia über TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und C1q den Aktivierungszustand von Astrozyten beeinflussen können.<sup>36</sup> In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus Zytokinen gewählt, die bekanntermaßen unter neuroinflammatorischen Bedingungen, wie einer zerebralen Ischämie, verstärkt exprimiert werden und bereits in anderen Studien angewandt wurden.<sup>88, 89</sup>

#### 5.1.1. Die Aktivierung von Astrozyten führte zu einer hypertrophen Morphologie und einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs

Die Stimulation der Astrozyten mit dem Zytokinmix führte morphologisch gesehen zu einer Hypertrophie der Astrozyten, charakterisiert durch die Zunahme langer, schlanker Zytoplasmafortsätze (vgl. Abb. 1). Bereits in anderen Studien konnte dieses zelluläre Erscheinungsbild reaktiven Astrozyten zugeordnet werden. So zeigt sich eine hyperfilamentäre Struktur der Astrozyten bei diversen, vorwiegend degenerativen Prozessen des ZNS die mit Narbenbildung einhergehen.<sup>90</sup>

Neben den morphologischen Veränderungen der Astrozyten fand sich nach Stimulation mit dem Zytokinmix eine Verschiebung von NF- $\kappa$ B aus dem Zytoplasma in den Nucleus (vgl. Abb. 1). Als Transkriptionsfaktor bewirkt NF- $\kappa$ B dort eine Genexpressionsveränderung immunologisch relevanter Genabschnitte. Über verschiedene Signaltransduktionsmoleküle des NF- $\kappa$ B-Signalwegs werden zelluläre Funktionen wie das Überleben, die Proliferation oder die Zytokinexpression insbesondere proinflammatorischer Signalwege reguliert. Es ist bereits bekannt, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  von aktivierten Gliazellen im Rückenmark freigesetzt werden können und ihre Wirkung zumindest teilweise durch Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs ausüben.<sup>91</sup> Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in dieser Arbeit konnte als erfolgreiche Überführung der Astrozyten in einen reaktiven Zustand interpretiert werden. Interessant im Hinblick auf die veränderte Aktivität der Astrozyten wären Studien über die zugrundeliegenden Signalkaskaden. Für die in dieser

Arbeit genutzten Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ist bereits bekannt, dass sie den NF- $\kappa$ B Signalweg aktivieren können.<sup>92</sup> Dieser wiederum konnte in reaktiven Astrozyten mit der Ausbildung eines A1-Phänotyps assoziiert werden.<sup>93</sup> In Astrozyten, in denen NF $\kappa$ B-aktiviert ist, überwiegen destruktive Funktionen, die die Neurodegeneration in einer Vielzahl von Krankheiten fördern.<sup>33</sup> So ergaben Studien zur NF $\kappa$ B-Aktivierung von Astrozyten in der Alzheimer Erkrankung<sup>94</sup> sowie in der Huntington Erkrankung,<sup>95</sup> dass die Aktivierung dieses Signalwegs eine wichtige Rolle in der Entstehung chronischer Inflammationen und dem Fortschreiten dieser Erkrankungen spielt. Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit resultierender Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, erklärt die vorwiegende A1 Polarisation der reaktiven Astrozyten in dieser Arbeit, auf die in Kapitel 5.1.3. näher eingegangen wird. IFN- $\gamma$  als drittes verwendetes Zytokin zur Stimulation der Astrozyten wird hauptsächlich von Natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten sezerniert. Es steigert die MHC-Dichte Antigen-präsentierender Zellen und wirkt aktivierend auf die Makrophagenaktivität.<sup>96</sup> Seine Rolle auf Astrozyten ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass adulte menschliche Astrozyten die in vitro mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurden eine starke Neurotoxizität ausübten. Vermittelt wurde dieser Effekt über den Janus-Kinase Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription 3 (STAT 3), der intrazellulär phosphoryliert wurde.<sup>97</sup>

In der Literatur wird seit vielen Jahren GFAP zur Identifikation und eine gesteigerte GFAP Expression als Marker zur Bestimmung der Aktivität von Astrozyten verwendet.<sup>98</sup> Auf den ersten Blick überraschend zeigte sich in dieser Arbeit eine Abnahme der GFAP und Vimentin Genexpression nach Stimulation mit dem Zytokinmix (vgl. Abb. 2). Jedoch stimmen diese Ergebnisse mit anderen Studien überein. Falsig et al. beispielsweise konnten nach Stimulation von Astrozyten mit einem Zytokinmix eine anfängliche Abnahme der GFAP Expression auf mRNA Ebene gefolgt von einer um 24 Stunden verzögert ansteigenden Expression von GFAP auf Proteinebene nachweisen.<sup>88</sup> Auch in der Arbeit von Liddelow et al. wurde nach Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) in die Ventrikel von Mäusen über die Aktivierung von Mikroglia ein reaktiver Astrozyt erzeugt der, ähnlich wie in dieser Arbeit, eine unveränderte oder reduzierte GFAP Expression zeigte.<sup>36</sup> Zusätzlich ist bekannt, dass eine Subpopulation GFAP-negativer Astrozyten existiert, die auch nach verletzungsbedingter Gliose GFAP nicht hochregulieren.<sup>99</sup> Wie bereits Liddelow et al. feststellte, konnten andere Astrozytengene, die spezifischer für bestimmte Arten reaktiver Astrozyten sind und die stärker exprimiert werden als GFAP, in Zukunft nützlich sein, um eine sicherere Beurteilung der erzeugten Effekte zu erlauben.<sup>33</sup>

### 5.1.2. Einfluss der Aktivierung von Astrozyten auf Proliferation, Migration und Überleben

Die Analyse der Überlebensrate, gemessen im Live-Dead-Assay, offenbarte keine zytotoxischen Auswirkungen der Zytokinstimulation auf die Astrozyten, sodass eine Verfälschung von Effekten aufgrund eines erhöhten Zellsterbens nicht zu vermuten war (vgl. Abb. 3).

Die Proliferation, gemessen mittels Ki-67 Genexpression, zeigte nach Zytokinstimulation der Astrozyten eine signifikante Abnahme um 31 % ( $p=0.016$ ). Die BrdU Inkorporation blieb hingegen mit ca. 6 % proliferierender Zellen konstant (vgl. Abb. 4). Ein Grund dafür könnte in der unterschiedlichen Funktion von Ki-67 gegenüber BrdU liegen, worauf in Kapitel 5.2.2. noch genauer eingegangen wird. Es ist bereits bekannt, dass die Proliferationsfähigkeit von Astrozyten im Rahmen der Neuroinflammation begrenzt ist.<sup>33</sup> Abhängig von der Schädigungsursache liegt sie zwischen 10 % nach Zufügen einer Stichwunde, 7 % in einem Model der amyotrophen Lateralsklerose und 0 % - 3 % im Mausmodel der Alzheimer Erkrankung.<sup>100, 101, 102</sup> Es konnte beobachtet werden, dass nach einem Trauma eine deutliche Proliferation von Astrozyten auftritt, wenn die reaktive Reaktion eine Narbenbildung um die Verletzung herum induziert.<sup>103</sup> Bisherige Analysen legen daher nahe, dass in einigen Fällen die phänotypischen Veränderungen und nicht die Proliferation die gliale Reaktion auf Schädigungen kennzeichnet.<sup>104</sup>

Neben der Betrachtung der Proliferation wurden auch Veränderungen der Migration von reaktiven Astrozyten untersucht. Die Migration von Astrozyten als regeneratorsche Antwort auf Schädigungen des ZNS ist essenziell zur Narbenbildung und daher in inflammatorischen Prozessen von besonderer Bedeutung.<sup>105</sup> In dieser Arbeit zeigte sich eine Tendenz zur Migrationszunahme nach Aktivierung der Astrozyten (vgl. Abb. 4). Insbesondere im Scratch-Test zeigte sich ab einem Zeitpunkt von neun Stunden nach Beobachtungsbeginn eine Zunahme der Migration reaktiver Astrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt spiegelte sich auch in der AUC wider, die in der Kontrollgruppe mit 2239,4 deutlich höher ausfiel als in der reaktiven Kondition (1397,5). Dieser Effekt zeigte keine Signifikanz, obgleich er stetig über den gesamten Zeitraum zu beobachten war (vgl. Abb. 4) und als Ausdruck des Versuchs einer im Rahmen der Neuroinflammation bedingten Reorganisation gewertet werden könnte. Detaillierte Mechanismen in der Astrozytenmigration wurden bisher nicht umfassend untersucht und sind weitgehend unbekannt.

### **5.1.3. Reaktive Astrozyten spielen eine Rolle in der Immunkompetenz des zentralen Nervensystems**

Die Stimulation der Astrozyten mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  führte zu einer Veränderung des immunologischen Profils der reaktiven Astrozyten. Sowohl die Zytokinexpression als auch die Expression der A1- und A2-Marker zeigten eine Zunahme nach Aktivierung der Astrozyten. Wie in der Studie von Zamanian et al. beschrieben, existieren verschiedene Typen reaktiver Astrozyten, die sich abhängig von der Schädigung ausbilden. Während eine Ischämie hauptsächlich zur Ausbildung anti-inflammatorischer A2 Astrozyten führt, die neurotrophe Faktoren sezernieren und die Erholung und Reparatur im ZNS fördern, induzieren andere Mechanismen, etwa die LPS-Stimulation, den pro-inflammatorischen A1 Typ, der die Expression vieler Komponenten der Komplementkaskade fördert und zytotoxische Effekte auf Neurone ausübt.<sup>35, 33, 106</sup> Das in dieser Arbeit genutzte pro-inflammatorische Milieu der Astrozyten führte zur charakteristischen Ausprägung des A1-Phänotyps. Es zeigte sich eine deutlich veränderte Morphologie (vgl. Abb. 1) sowie eine gesteigerte Expression pro-inflammatorischer Zytokine (vgl. Abb. 5). Zusätzlich wurde die Tendenz der Genexpressionssteigerung des A1-Markers CC3 sichtbar (vgl. Abb. 5). Darüber hinaus induzierte das proinflammatorische Milieu eine nicht signifikante Steigerung A2 typischer Expressionen (vgl. Abb. 6), sodass von einem Mischtypen mit hauptsächlich proinflammatorischer Rolle ausgegangen werden muss. Erklärt werden kann die vorwiegende A1 Polarisation durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit resultierender Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Bisher ist nicht bekannt, wie viele verschiedene Formen reaktiver Astrozyten existieren, oder ob ähnlich wie in Mikroglia von einem kontinuierlichen Spektrum unterschiedlicher Typen ausgegangen werden muss.<sup>24</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass eine Kategorisierung in ausschließlich zwei Kategorien nicht sinnvoll erscheint.

Die gestiegene Immunkompetenz reaktiver Astrozyten spiegelte sich insbesondere in der Genexpression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  sowie in der iNOS Genexpression wider, die nach Stimulation auf ein signifikantes Niveau anstiegen ( $p < .05$ ) (vgl. Abb. 5). Die signifikante Zunahme der iNOS Expression korrelierte mit einer, wenn auch nicht signifikanten, Zunahme der NO Freisetzung im Griess-Assay. Untersuchungen im Themenfeld der Multiplen Sklerose konnten zeigen, dass IFN- $\gamma$ , welches in dieser Arbeit zur Stimulation verwendet wurde, die Expression von iNOS in Mikroglia und Makrophagen induziert und infolgedessen destruktive Effekte auf das ZNS ausübt. Neben diesen destruktiven Funktionen konnten allerdings auch immunregulatorische Funktionen von iNOS, wie die Suppression der IL-1 $\beta$  oder IL-12

Produktion nachgewiesen werden.<sup>107</sup> Im Gegensatz dazu, zeigte sich in dieser Arbeit eine signifikante Genexpressionssteigerung, sowohl von iNOS als auch von IL-1 $\beta$ . Dieser parallele Anstieg zeigte sich bereits in anderen Studien und könnte durch synergistische Effekte in der Pro-inflammation entstehen.<sup>108</sup> Diese Arbeit lässt vermuten, dass anders als bisher angenommen, die INF- $\gamma$  Stimulation nicht nur in Mikroglia und Makrophagen, sondern auch in Astrozyten zu einer vermehrten iNOS Expression führt.<sup>107</sup>

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nicht nur Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen oder Mikroglia, sondern auch Astrozyten auf ein pro-inflammatorisches Milieu mit beispielsweise einer Steigerung der Zytokinexpression reagieren. Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung der Immunkompetenz von Astrozyten in neuroinflammatorischen Prozessen und unterstreichen die Komplexität der Wechselwirkungen zwischen dem adaptiven und zelleigenen Immunsystem sowie den Einfluss des umgebenden Milieus.

## **5.2. Ruhende und reaktive Astrozyten exprimieren den HCN-Kanal**

Dies ist die erste Arbeit, die den Effekt der HCN-Kanal Blockade auf das Überleben, die Proliferation, die Migration, die Marker Expressionen sowie die Immunkompetenz der Astrozyten untersucht. Zunächst wurden die Expressionsraten der HCN1-4 Kanal Subtypen sowohl ruhender als auch reaktiver Astrozyten quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass ruhende Astrozyten alle vier HCN-Kanal Subtypen, jedoch in besonders hohem Ausmaß den HCN2-Kanal Subtyp exprimieren (vgl. Abb. 7). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Studie von Rusnakova et al., die in 20 Tage alten Mäusen ebenfalls eine HCN2-Kanal Genexpression ruhender Astrozyten in der Einzelzellgenanalyse nachweisen konnte.<sup>1</sup> In der vorliegenden Arbeit gelang darüber hinaus erstmals der Nachweis einer Proteinexpression des HCN1- und HCN2-Kanals ruhender Astrozyten, dargestellt mittels immunzytochemischer Färbungen (vgl. Abb. 7).

Anders als in den Studien von Rusnakova et al. und Honsa et al., führte eine Aktivierung der Astrozyten zu keiner Veränderung des HCN-Kanal Subtypen Expressionsprofils (vgl. Abb. 8). Die Ursache für diese Unterscheidung könnte im Versuchsaufbau gelegen haben. Während in dieser Arbeit eine Aktivierung durch Stimulation mit einem Zytokinmix *in vitro* induziert wurde, nutzten Rusnakova et al. und Honsa et al. ein *in vivo* Mausmodell.<sup>1,2</sup> Die unterschiedlichen Ergebnisse der *in vivo* und *in vitro* durchgeführten Experimente könnten durch indirekte Effekte wie die interzelluläre Kommunikation bedingt sein. Zusätzlich unterschieden sich die zugefügten Schädigungen maßgeblich

voneinander. Sowohl Rusnakova et al. als auch Honsa et al. induzierten eine fokal zerebrale Ischämie, die im Gegensatz zu der in dieser Arbeit genutzten proinflammatorischen Stimulation einen direkten strukturellen Schaden und damit möglicherweise ein anderes astrozytäres Verhalten erzeugte.<sup>1,2</sup>

### **5.2.1. Der HCN-Kanal als Ionenkanal der Astrozyten; Auswirkungen auf Morphologie und Aktivierungsmarker**

Die Menge der exprimierten HCN-Kanäle auf ruhenden und reaktiven Astrozyten unterschied sich nicht voneinander (vgl. Abb. 8). Daher sollten die Effekte einer Aktivitätsänderung des HCN-Kanals abhängig vom Aktivierungszustand der Astrozyten untersucht werden. Dazu wurde die HCN-Kanal Aktivität mit ZD7288, einem aktivitäts- und frequenzunabhängigen HCN-Kanal Blocker, oder mit Ivabradin, einem aktivitätsabhängigen HCN-Kanal Blocker, gehemmt. Morphologisch erschienen die ruhenden Astrozyten nach HCN-Kanal Blockade unverändert. Sie zeigten voluminöse Zellfortsätze sowie die Tendenz zum Wachstum in Zellverbänden (vgl. Abb. 9). Reaktive Astrozyten nach HCN-Kanal Blockade sahen morphologisch wie reaktive Astrozyten ohne Behandlung mit ZD7288 oder Ivabradin aus. Sie zeigten zahlreiche, lange und schlanke Zytoplasmafortsätze sowie eine nukleäre NFκB Lokalisation als typische Kriterien reaktiver Astrozyten (vgl. Abb. 10). Des Weiteren veränderte sich die Expression der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin durch die Blockade des HCN-Kanals weder auf ruhenden noch auf reaktiven Astrozyten (vgl. Abb. 11), woraus geschlussfolgert werden konnte, dass die HCN-Kanal Aktivität die Reaktivität der Astrozyten nicht beeinflusste. Aus früheren Studien ist bekannt, dass Ionenkanäle auf Astrozyten insbesondere für die Regulation der Kaliumionen Leitfähigkeit von Bedeutung sind. Die Kaliumionenleitfähigkeit ist für Astrozyten besonders relevant, da sie verglichen mit Neuronen ein deutlich hyperpolarisiertes Ruhemembranpotential aufweisen und somit elektrisch schwer erregbar sind.<sup>109</sup> Insbesondere der Kaliumionenkanal Kir4.1 wurde als bedeutsamer Ionenkanal der Astrozyten zur Regulation der Kaliumionen Homöostase, der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotential, der Regulierung des Astrozytenvolumens sowie der Glutamat Aufnahme identifiziert.<sup>110, 111, 112, 113</sup> Inzwischen ist eine wachsende Anzahl nicht Kaliumionen selektiver Ionenkanäle auf Astrozyten bekannt, die größtenteils an der Astrozyten-Neuronen Kommunikation beteiligt sind.<sup>114</sup> Daneben regulieren Schwankungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen, insbesondere Konzentrationsänderungen der Calcium- und Natriumionen, molekulare Kaskaden, die die Genexpressionen, die Energieproduktion und homöostatische Funktionen der Astrozyten beeinflussen.<sup>115</sup> Bezogen auf den HCN-

Kanal ließ sich hypothetisieren, dass er, als einziger hyperpolarisations-aktivierter Ionenkanal für Astrozyten von besonderer Bedeutung für die Genexpressionsregulation sein könnte. Zur Analyse dieser Hypothese untersuchten wir verschiedene Zellfunktionen sowie die Veränderung in der Immunkompetenz.

### **5.2.2. Effekte der HCN-Kanal Blockade auf Überleben, Proliferation und Migration der Astrozyten**

Zunächst wurden die Überlebensraten der mit ZD7288 oder Ivabradin behandelten Astrozyten ermittelt. Diese blieben unabhängig vom Aktivierungszustand der Astrozyten auf einem konstant hohen Niveau von minimal 86,9 % (vgl. Abb. 12), sodass ein relevanter zytotoxischer Effekt der HCN-Kanal Blockade ausgeschlossen werden konnte.

Als weitere Funktion wurde die Proliferation nach HCN-Kanal Blockade untersucht. Die Proliferation von Astrozyten ist eine elementare Funktion in der Regeneration nach Neuroinflammation. Sie ist Voraussetzung zur Bildung einer Narbe um nekrotische Bereiche wie sie nach Infektionen oder Verletzungen vorkommen.<sup>33</sup> Einerseits schützen Astrozyten durch die Bildung einer Narbe das gesunde Gewebe vor den freigesetzten zytotoxischen Mediatoren der zerstörten Zellen.<sup>116</sup> Andererseits verhindert diese erhöhte astrozytäre Aktivität die Neubildung neuronaler Axone und wirkt damit destruktiv auf die Rekonstruktion neuronaler Schaltkreise.<sup>117</sup> Die Proliferation ruhender Astrozyten nach Behandlung mit ZD7288 oder Ivabradin veränderte weder die Ki-67 Genexpression (vgl. Abb. 13) noch die BrdU Inkorporation (vgl. Abb. 14). Jedoch zeigte die Proliferation reaktiver Astrozyten eine Abhängigkeit von der HCN-Kanalaktivität. Die Ki-67 Genexpression sank nach Behandlung mit höheren Dosen von ZD7288 bzw. Ivabradin auf ein hoch- ( $p=.004$ ) bzw. höchst- ( $p=.001$ ) signifikantes Level ab (vgl. Abb. 18). Diese Ergebnisse waren in der Analyse der BrdU Inkorporation nicht sichtbar. Ein Grund dafür könnte sein, dass Ki-67 ein zelleigenes Protein ist, welches ausschließlich in der aktiven Phase des Zellzyklus (G1, S, G2, Mitose), nicht jedoch in ruhenden Zellen (G0) synthetisiert wird. Es wird routinemäßig als Proliferationsmarker in der klinischen Diagnostik vieler Tumorentitäten bestimmt.<sup>118</sup> BrdU hingegen ist ein künstlich synthetisiertes Nukleosid Analogon des Thymidins. Es kann während der S-Phase des Zellzyklus anstelle des Desoxythymidintriphosphats in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Aus diesem Grund fließen nur bereits erfolgte DNA-Neusynthesen in die Auswertung ein. Eine steigende Proliferationsaktivität wird demzufolge zeitlich verzögert zur Ki-67 Genexpression registriert. Auch die Sensitivität ist geringer, da

ausschließlich Zellaktivitäten in der S-Phase, nicht aber in der G1, G2 oder Mitose Phase erfasst werden. Eine Reduktion der Proliferation reaktiver Astrozyten nach Ionenkanalblockade konnte bereits in der Studie von Cheli et al. gezeigt werden. Diese Arbeitsgruppe untersuchte spannungsabhängige L-Typ Calciumionenkanäle auf primären Astrozyten *in vitro*. Sie konnten eine Reduktion der Proliferation von mit LPS aktivierten Astrozyten nach pharmakologischer Blockade der Calciumionenkanäle sowie nach Behandlung mit small interfering RNA (siRNA) nachweisen.<sup>119</sup> Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass die HCN-Kanal Blockade zu einer verringerten Proliferation reaktiver Astrozyten führt und unterstreicht die Bedeutung der Ionenkanäle auf reaktiven Astrozyten im neuroinflammatorischen Milieu.

Neben einer Reduktion der Proliferation zeigte die Studie von Cheli et al. auch Effekte auf die Migration. Nach Blockade der spannungsabhängigen L-Typ Calciumionenkanäle reaktiver Astrozyten sank die Migration im Scratch-Test im Vergleich zu ruhenden Astrozyten signifikant ab.<sup>119</sup> Ein ähnliches Ergebnis konnte auch in dieser Arbeit nach pharmakologischer Blockade des HCN-Kanals auf Astrozyten gezeigt werden. Während ruhende Astrozyten sowohl im Boyden Chamber-Assay als auch im Scratch Test keine Migrationsveränderung nach Blockade des HCN-Kanals mit ZD7288 oder Ivabradin zeigten (vgl. Abb. 15, 16), reagierten reaktive Astrozyten der Konditionen ZD7288 (10  $\mu$ M,  $p=.038$ ) und Ivabradin (30  $\mu$ M,  $p=.043$ ) auf die HCN-Kanal Blockade mit einer signifikanten Abnahme der Migration im Scratch Test 32 Stunden nach Versuchsbeginn (vgl. Abb. 17). Die Migrationsabnahme spiegelte sich auch in den Werten der AUC wider. Sie lag für die reaktive Kontrollgruppe (AUC=1567,8) unter denen der mit ZD7288 (10  $\mu$ M, AUC=1789,9; 30  $\mu$ M, AUC=1703,2) oder Ivabradin (30  $\mu$ M, AUC=1713,5) behandelten Astrozyten. Im Boyden Chamber Assay konnte keine Veränderung der Migration nachgewiesen werden. Die Unterschiede in den Ergebnissen zwischen dem Scratch Test und dem Boyden Chamber-Assay konnten bereits im Vergleich ruhender zu reaktiven Astrozyten beobachtet werden (vgl. Kap. 5.1.2.). Im Scratch wurde die planare Migration zu verschiedenen Zeitpunkten nach HCN-Kanal Blockade bis maximal 42 Stunden nach Behandlung der Astrozyten gemessen. Dabei fiel die verminderte Migration ab einem Zeitpunkt von 16 Stunden auf. Die Transwell Migration des Boyden Chamber-Assays umfasste einen Zeitraum von 24 Stunden zwischen HCN-Kanal Blockade und Auswertung der Ergebnisse. Dadurch hatten die Astrozyten weniger Zeit zur Migration als im Scratch Test. Vermutet werden kann, dass die Sensitivität des Scratch-Tests im Vergleich zum Boyden Chamber-Assay aufgrund des längeren Zeitintervalls erhöht war. Die Studie von Vay et al. konnte in der Vergangenheit bereits zeigen, dass die Blockade von HCN-Kanälen auf Mikroglia nicht nur das Membranpotential reguliert, sondern auch mit einem langsamen und anhaltenden

Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in primärer Mikroglia verbunden ist. Die intrazelluläre Calciumkonzentration spielt eine bedeutende Rolle bei den Mikrogliafunktionen, einschließlich der Migration.<sup>55</sup> Aufgrund des in diesen Studien nachgewiesenen Einflusses der HCN-Kanal Blockade auf die Migration der Astrozyten erscheint die Möglichkeit der Regulation der Migration durch Veränderung der intrazellulären Calciumionenkonzentration der Astrozyten naheliegend. Zukünftige Studien sollten diesen Regulationsmechanismus durch Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration genauer analysieren.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass der HCN-Kanal auf reaktiven Astrozyten eine grundlegende Rolle für Proliferation und Migration spielt und eine Hemmung des HCN-Kanals einen wirksamen Weg zur Modulation dieser Funktionen in der Neuroinflammation darstellt.

### **5.2.3. Der Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Immunkompetenz der Astrozyten**

Die Behandlung der Astrozyten mit den HCN-Kanal blockierenden Substanzen ZD7288 oder Ivabradin veränderte die Immunkompetenz ruhender Astrozyten nicht. Weder die Expressionen des A1 Markers CC3 noch die des A2 Markers S100A10 zeigten eine Veränderung nach Hemmung der HCN-Kanal Aktivität (vgl. Abb. 18). Auch die Expressionen der pro- (IL-6, iNOS, IL-1 $\beta$ ) und antiinflammatorischen (IL-10) Zytokine ruhender Astrozyten blieben von der HCN-Kanal Blockade unbeeinflusst (vgl. Abb. 19-21). Ähnlich verhielt es sich nach Hemmung der HCN-Kanal Aktivität reaktiver Astrozyten. Sowohl die Expressionen der Markerproteine CC3 und S100A10 (vgl. Abb. 18) als auch der proinflammatorischen Zytokine (vgl. Abb. 19, 20) veränderten sich nach Hemmung der HCN-Kanal Aktivität nicht. Lediglich die IL-10 Genexpression der Kondition ZD7288 (30  $\mu$ M) sank signifikant ab ( $p=.018$ , vgl. Abb. 21). Diese Ergebnisse waren insofern besonders interessant, als frühere Studien in primären Mikroglia der Ratte eine deutliche Veränderung der Immunkompetenz nach HCN-Kanal Blockade zeigen konnten. In der Studie von Vay et al. wurden Mikroglia mit dem proinflammatorisch wirkenden LPS stimuliert. Zusätzlich wurde in einigen Mikroglia die HCN-Kanal Aktivität mit ZD7288 geblockt. Im Vergleich zur ausschließlichen Stimulation mit LPS resultierte nach zusätzlicher HCN-Kanal Blockade eine mehr als 50 %igen Expressionsabnahme des proinflammatorischen Markers iNOS auf RNA und Proteinebene. Diese Ergebnisse legten nahe, dass ein funktioneller HCN-Kanal für die Aktivierung und Polarisation von primären Mikroglia in vitro erforderlich ist.<sup>55</sup>

Interessanterweise führte die HCN-Kanal Blockade der Astrozyten weder im ruhenden noch im reaktiven Zustand zu einer deutlichen Expressionsänderung immunologisch relevanter Mediatoren. Ebenso resultierte weder die Behandlung mit ZD7288 noch mit Ivabradin in einer Veränderung des Aktivierungstyps (A1 oder A2). Da die Astrozyten trotz HCN-Kanal Blockade in der Lage blieben pro- sowie anti-inflammatorische Mediatoren zu exprimieren könnte dies als Fähigkeit bewertet werden ihre Immunkompetenz unabhängig von nachfolgenden Signalen aufrechtzuerhalten. Nichtsdestotrotz blieb die Abweichung der Ergebnisse zwischen dem Verhalten von Mikroglia und Astrozyten bemerkenswert, sodass eine einfache Übertragung der Funktionalitäten und möglicherweise auch der Aktivierungstypen zwischen verschiedenen Gliazellen kritisch hinterfragt werden sollte. Insbesondere im Vergleich von Mikroglia mit anderen Gliazellen können aufgrund der unterschiedlichen embryonalen Herkunft nur vorsichtige Rückschlüsse gezogen werden. Mikroglia als einzige Gliazellen mesenchymalen Ursprungs entwickeln sich anders als Astrozyten nicht aus einem Glioblasten. Ähnlichkeiten der Zellfunktionalität von Astrozyten sind daher eher mit Oligodendrozyten, einer ebenfalls aus dem Glioblasten abstammenden Gliazelle zu erwarten.<sup>3</sup> Genauere Analysen bezüglich der HCN-Kanal Expression auf Oligodendrozyten wären zur Prüfung dieser Hypothese durchzuführen.

### **5.3. Einordnung der Ergebnisse in den klinischen Kontext der Neuroinflammation**

Astrozyten sind immunkompetente Zellen, die neben der zelleigenen, angeborenen Immunität, die adaptive Immunität beeinflussen. Sie reagieren auf verschiedene Inflammationsursachen mit einer Ausschüttung regulatorischer Zytokine. Diese Moleküle können Astrozyten-Lymphozyten-Wechselwirkungen erleichtern und letztendlich die Rekrutierung von Immunzellen in das ZNS unterstützen.<sup>120</sup> Wie in dieser Arbeit dargestellt werden konnte, sind Astrozyten Bestandteil eines komplexen Netzwerks zur Regulation der Neuroinflammation. Neben ihrer Rolle in der Zell-Zell Kommunikation sind sie entscheidend an strukturellen Veränderungen in neuroinflammatorischen Prozessen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass das inflammatorische Milieu allein, ohne Interaktionen zu anderen Zelltypen ausreichend für die Induktion einer fibrillären Gliose ist. Zusätzlich resultierte die Aktivierung der Astrozyten in einer verminderten Proliferation sowie der Tendenz zur Migrationszunahme. Im klinischen Kontext der Neuroinflammation deutete die Aktivierung der Astrozyten mit deutlich veränderter Morphologie ohne Proliferationszunahme darauf hin, dass tatsächlich die phänotypischen Veränderungen und nicht die gesteigerte Proliferation, die gliale

Reaktion auf Schädigungen kennzeichnet. Nach einer ZNS-Verletzung kann die Bildung von Narbengewebe das axonale Wachstum hemmen und eine große Barriere für die Regeneration des neuronalen Netzwerks darstellen. Zunehmend deuten jedoch Studien auf eine vorteilhafte Rolle für das Narbengewebe als Teil des endogenen lokalen Immunregulations- und Reparaturprozesses hin. Immer häufiger werden diese gegensätzlichen Effekte der astrozytären Narbenbildung als ein Ausdruck der Bedeutung des richtigen Timings regulatorischer Prozesse gewertet. Dementsprechend sind narbenmodulierende Behandlungen zu einem führenden therapeutischen Ziel beispielsweise im Bereich der Rückenmarksverletzungen geworden.<sup>103, 116</sup> Diese Studie konnte eine Methode der Astrozyten Modulation durch eine Zytokin Stimulation *in vitro* erzeugen und die Effekte dieser Modulation auf verschiedene astrozytäre Funktionen darlegen. Denkbar wäre daher der Einfluss einer Immuntherapie auf die Narbenbildung und Regeneration des neuronalen Netzwerks. Dieser Einfluss sollte in zukünftigen Studien weiter erforscht und damit ein möglicher therapeutischer Einsatz von Immuntherapien bei neurologischen Erkrankungen wie Rückenmarksverletzungen untersucht werden.

Nichtsdestotrotz sollte bei der Einordnung dieser Studie berücksichtigt werden, dass es sich um ein *in vitro* Modell handelt welches das komplexe Zusammenwirken eines gesamten Organismus nicht widerspiegeln kann. Darüber hinaus könnte zukünftig mittels Patch-clamp Technik eine Analyse des HCN-Kanal Ionenflusses ergänzt werden. Dies würde eine objektive Aussage über die Stärke der HCN-Kanal Blockade mittels ZD7288 oder Ivabradin erlauben und eine Einordnung der resultierenden Ergebnisse erleichtern. Zur Untersuchung der klinischen Auswirkungen der HCN-Kanal Blockade käme zusätzlich die Nutzung HCN2 defizienter Mäuse in Betracht. Mittlerweile wurden bereits mehrere Mutationen, die zu einem vollständigen Verlust der HCN2-Kanal Expression führen in Mausmodellen etabliert.<sup>121</sup>

## 5.4. Fazit und Ausblick

Letztlich konnte die Fragestellung der Arbeit: „Die Funktion des hyperpolarisations-aktivierten zyklisch Nukleotid-modifizierten (HCN-) Kationenkanals in primären Astrozyten unterschiedlichen Aktivierungszustandes *in vitro*“ damit beantwortet werden, dass sich ein Einfluss des HCN-Kanals auf verschiedene zelluläre Funktionen reaktiver, nicht aber ruhender Astrozyten zeigte. Reaktive Astrozyten verminderten ihre Proliferation und Migration sowie die IL-10 Genexpression nach HCN-Kanal Blockade signifikant. Auf die Morphologie, das Überleben sowie die Ausbildung eines A1 oder A2 Phänotyps hatte die HCN-Kanal Blockade keinen Effekt. Die Astrozyten blieben trotz eines stark pro-inflammatorischen Milieus immunkompetent, indem sie sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine und Mediatoren sezernierten. Zukünftige Studien könnten den Einfluss der HCN-Kanal Blockade reaktiver Astrozyten auf andere Funktionen, wie die Homöostase, die pH-Wert Regulation oder die Stabilisierung des Membranpotentials untersuchen. Da sich Funktionsänderungen der Astrozyten nach HCN-Kanal Blockade lediglich im reaktiven Zustand zeigten, könnte der HCN-Kanal weiterhin ein wichtiges Target für die Regulation astrozytärer Funktionen im inflammatorischen Milieu sein. Eine HCN-Kanal Blockade könnte einen wirksamen Weg zur Verminderung der Proliferation und Migration reaktiver Astrozyten darstellen. Insbesondere in der chronischen Phase der Neuroinflammation wäre aufgrund der überwiegend destruktiven Funktionen reaktiver Astrozyten und einer verbesserten Krankheitserscheinung bei Verlust dieser, eine therapeutische Maßnahme zur Verminderung der Proliferation und Migration ausschließlich reaktiver Astrozyten erstrebenswert.<sup>38</sup>

## 6. Literaturverzeichnis

1. Rusnakova V, Honsa P, Dzamba D, Stahlberg A, Kubista M, Anderova M. Heterogeneity of astrocytes: from development to injury - single cell gene expression. *PLoS One* 2013; **8**(8): e69734.
2. Honsa P, Pivonkova H, Harantova L, et al. Increased expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in reactive astrocytes following ischemia. *Glia* 2014; **62**(12): 2004-21.
3. Keith MV. Embryologie: Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik. München: Elsevier; 2007.
4. Garzorz N. Neuroanatomie BASICS. München: Elsevier; 2009.
5. Huggenberger SM, N.; Schröder, H.; Cozzi, B.; Granato, A.; Merighi, A. Neuroanatomie des Menschen. Rom: Springer; 2017.
6. Kettenmann HR, B. R. Neuroglia. New York: Oxford University Press; 2013.
7. Zhang X, Wang D, Pan H, Sun B. Enhanced Expression of Markers for Astrocytes in the Brain of a Line of GFAP-TK Transgenic Mice. *Front Neurosci* 2017; **11**: 212.
8. Ramachandran RA, Lupfer C, Zaki H. The Inflammasome: Regulation of Nitric Oxide and Antimicrobial Host Defence. *Adv Microb Physiol* 2018; **72**: 65-115.
9. Di Sante G, Amadio S, Sampaolese B, et al. The S100B Inhibitor Pentamidine Ameliorates Clinical Score and Neuropathology of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Mouse Model. *Cells* 2020; **9**(3).
10. Kahle WF, M. Taschenatlas Anatomie / Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane. Stuttgart: Thieme; 2013.
11. Kinboshi M, Ikeda A, Ohno Y. Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis. *Front Neurol* 2020; **11**: 626658.
12. Javdani F, Hegedus K, Miranda CO, Hegyi Z, Hollo K, Antal M. Differential expression of Na(+)/K(+)/Cl(-) cotransporter 1 in neurons and glial cells within the superficial spinal dorsal horn of rodents. *Sci Rep* 2020; **10**(1): 11715.
13. Theparambil SM, Hosford PS, Ruminot I, et al. Astrocytes regulate brain extracellular pH via a neuronal activity-dependent bicarbonate shuttle. *Nat Commun* 2020; **11**(1): 5073.

14. Pan HC, Chou YC, Sun SH. P2X7 R-mediated Ca<sup>2+</sup> -independent d-serine release via pannexin-1 of the P2X7 R-pannexin-1 complex in astrocytes. *Glia* 2015; **63**(5): 877-93.
15. Rouget M, Araud D, Seite R, Prochiantz A, Autillo-Touati A. Astrocyte-regulated synaptogenesis: an in vitro ultrastructural study. *Neurosci Lett* 1993; **150**(1): 85-8.
16. Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A. PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron* 2004; **41**(3): 405-15.
17. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 2005; **120**(3): 421-33.
18. Lin YH, Liang HY, Xu K, et al. Dissociation of nNOS from PSD-95 promotes functional recovery after cerebral ischaemia in mice through reducing excessive tonic GABA release from reactive astrocytes. *J Pathol* 2018; **244**(2): 176-88.
19. Manwani B, Liu F, Scranton V, Hammond MD, Sansing LH, McCullough LD. Differential effects of aging and sex on stroke induced inflammation across the lifespan. *Exp Neurol* 2013; **249**: 120-31.
20. Hellewell S, Semple BD, Morganti-Kossmann MC. Therapies negating neuroinflammation after brain trauma. *Brain Res* 2016; **1640**(Pt A): 36-56.
21. Minghetti L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 2005; **18**(3): 315-21.
22. Schroeter M, Jander S, Huitinga I, Witte OW, Stoll G. Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke* 1997; **28**(2): 382-6.
23. Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol* 2008; **29**(8): 357-65.
24. Vay SU, Flitsch LJ, Rabenstein M, et al. The plasticity of primary microglia and their multifaceted effects on endogenous neural stem cells in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation* 2018; **15**(1): 226.
25. Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M. Brain regeneration in physiology and pathology: the immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. *Physiol Rev* 2011; **91**(4): 1281-304.

26. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol* 2016; **37**(9): 608-20.
27. Karpuk N, Burkovetskaya M, Kielian T. Neuroinflammation alters voltage-dependent conductance in striatal astrocytes. *J Neurophysiol* 2012; **108**(1): 112-23.
28. Lewis SA, Balcarek JM, Krek V, Shelanski M, Cowan NJ. Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**(9): 2743-6.
29. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999; **23**(2): 297-308.
30. Gao Q, Li Y, Chopp M. Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult. *Neuroscience* 2005; **136**(1): 123-34.
31. Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 2015; **9**: 278.
32. Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, et al. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 2003; **37**(5): 751-64.
33. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 2017; **46**(6): 957-67.
34. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 2007; **28**(3): 138-45.
35. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 2012; **32**(18): 6391-410.
36. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 2017; **541**(7638): 481-7.
37. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014; **6**: 13.
38. Mayo L, Trauger SA, Blain M, et al. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med* 2014; **20**(10): 1147-56.
39. Speckmann E-JH, J.; Köhling, R. *Physiologie*. München: Elsevier; 2013.

40. Formaggio F, Fazzina M, Estevez R, Caprini M, Ferroni S. Dynamic expression of homeostatic ion channels in differentiated cortical astrocytes in vitro. *Pflugers Arch* 2022; **474**(2): 243-60.
41. Noor ZN, Deitmer JW, Theparambil SM. Cytosolic sodium regulation in mouse cortical astrocytes and its dependence on potassium and bicarbonate. *J Cell Physiol* 2018; **234**(1): 89-99.
42. Parpura VV, A. Pathological potential of Neuroglia. New York: Springer; 2014.
43. Zamora NN, Cheli VT, Santiago Gonzalez DA, Wan R, Paez PM. Deletion of Voltage-Gated Calcium Channels in Astrocytes during Demyelination Reduces Brain Inflammation and Promotes Myelin Regeneration in Mice. *J Neurosci* 2020; **40**(17): 3332-47.
44. Wahl-Schott C, Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**(3): 470-94.
45. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 1991; **351**(6322): 145-7.
46. Gauss R, Seifert R, Kaupp UB. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 1998; **393**(6685): 583-7.
47. Elinder F, Mannikko R, Pandey S, Larsson HP. Mode shifts in the voltage gating of the mouse and human HCN2 and HCN4 channels. *J Physiol* 2006; **575**(Pt 2): 417-31.
48. Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M. A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J Biol Chem* 2001; **276**(9): 6313-9.
49. Mistrik P, Pfeifer A, Biel M. The enhancement of HCN channel instantaneous current facilitated by slow deactivation is regulated by intracellular chloride concentration. *Pflugers Arch* 2006; **452**(6): 718-27.
50. Zong X, Eckert C, Yuan H, et al. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J Biol Chem* 2005; **280**(40): 34224-32.
51. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 2009; **89**(3): 847-85.
52. El-Kholy W, MacDonald PE, Fox JM, et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 2007; **21**(3): 753-64.

53. Greenwood IA, Prestwich SA. Characteristics of hyperpolarization-activated cation currents in portal vein smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**(4): C744-53.
54. Xiao J, Nguyen TV, Ngui K, et al. Molecular and functional analysis of hyperpolarisation-activated nucleotide-gated (HCN) channels in the enteric nervous system. *Neuroscience* 2004; **129**(3): 603-14.
55. Vay SU, Flitsch LJ, Rabenstein M, et al. The impact of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) and voltage-gated potassium KCNQ/Kv7 channels on primary microglia function. *J Neuroinflammation* 2020; **17**(1): 100.
56. Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 1979; **280**(5719): 235-6.
57. Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 1999; **380**(7-8): 975-80.
58. Nolan MF, Dudman JT, Dodson PD, Santoro B. HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the entorhinal cortex. *J Neurosci* 2007; **27**(46): 12440-51.
59. Lorincz A, Notomi T, Tamas G, Shigemoto R, Nusser Z. Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci* 2002; **5**(11): 1185-93.
60. Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, et al. Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 2007; **129**(2): 397-410.
61. Nolan MF, Malleret G, Lee KH, et al. The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* 2003; **115**(5): 551-64.
62. Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, et al. A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* 2004; **119**(5): 719-32.
63. Gunther A, Luczak V, Gruteser N, Abel T, Baumann A. HCN4 knockdown in dorsal hippocampus promotes anxiety-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* 2019; **18**(2): e12550.

64. Schlusche AK, Vay SU, Kleinenkuhnen N, et al. Developmental HCN channelopathy results in decreased neural progenitor proliferation and microcephaly in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; **118**(35).
65. Marini C, Porro A, Rastetter A, et al. HCN1 mutation spectrum: from neonatal epileptic encephalopathy to benign generalized epilepsy and beyond. *Brain* 2018; **141**(11): 3160-78.
66. Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci* 2002; **22**(11): 4591-9.
67. Yao H, Donnelly DF, Ma C, LaMotte RH. Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current after chronic compression of the dorsal root ganglion. *J Neurosci* 2003; **23**(6): 2069-74.
68. Lee DH, Chang L, Sorkin LS, Chaplan SR. Hyperpolarization-activated, cation-nonspecific, cyclic nucleotide-modulated channel blockade alleviates mechanical allodynia and suppresses ectopic discharge in spinal nerve ligated rats. *J Pain* 2005; **6**(7): 417-24.
69. Chaplan SR, Guo HQ, Lee DH, et al. Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J Neurosci* 2003; **23**(4): 1169-78.
70. Hoppe UC, Jansen E, Sudkamp M, Beuckelmann DJ. Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts. *Circulation* 1998; **97**(1): 55-65.
71. Fernandez-Velasco M, Goren N, Benito G, Blanco-Rivero J, Bosca L, Delgado C. Regional distribution of hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA expression in ventricular cells from control and hypertrophied rat hearts. *J Physiol* 2003; **553**(Pt 2): 395-405.
72. Marshall PW, Rouse W, Briggs I, Hargreaves RB, Mills SD, McLoughlin BJ. ICI D7288, a novel sinoatrial node modulator. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; **21**(6): 902-6.
73. BoSmith RE, Briggs I, Sturgess NC. Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I<sub>f</sub>) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 1993; **110**(1): 343-9.

74. Gasparini S, DiFrancesco D. Action of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Arch* 1997; **435**(1): 99-106.
75. Shin KS, Rothberg BS, Yellen G. Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J Gen Physiol* 2001; **117**(2): 91-101.
76. Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther* 2005; **107**(1): 59-79.
77. Harris NC, Constanti A. Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. *J Neurophysiol* 1995; **74**(6): 2366-78.
78. Sulfi S, Timmis AD. Ivabradine -- the first selective sinus node I(f) channel inhibitor in the treatment of stable angina. *Int J Clin Pract* 2006; **60**(2): 222-8.
79. Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 1996; **118**(4): 1051-7.
80. Bucchi A, Tognati A, Milanesi R, Baruscotti M, DiFrancesco D. Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels. *J Physiol* 2006; **572**(Pt 2): 335-46.
81. Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. Current-dependent block of rabbit sinoatrial node I(f) channels by ivabradine. *J Gen Physiol* 2002; **120**(1): 1-13.
82. Colin P, Ghaleh B, Monnet X, Hittinger L, Berdeaux A. Effect of graded heart rate reduction with ivabradine on myocardial oxygen consumption and diastolic time in exercising dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **308**(1): 236-40.
83. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods* 2001; **25**(4): 402-8.
84. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>T</sub> method. *Nat Protoc* 2008; **3**(6): 1101-8.
85. Kirkley KS, Popichak KA, Afzali MF, Legare ME, Tjalkens RB. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *J Neuroinflammation* 2017; **14**(1): 99.

86. Xu E, Liu J, Liu H, Wang X, Xiong H. Inflammasome Activation by Methamphetamine Potentiates Lipopolysaccharide Stimulation of IL-1 $\beta$  Production in Microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 2018; **13**(2): 237-53.
87. Zhang J. Yin and yang interplay of IFN- $\gamma$  in inflammation and autoimmune disease. *J Clin Invest* 2007; **117**(4): 871-3.
88. Falsig J, Porzgen P, Lund S, Schratzenholz A, Leist M. The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem* 2006; **96**(3): 893-907.
89. Neal ML, Boyle AM, Budge KM, Safadi FF, Richardson JR. The glycoprotein GPNMB attenuates astrocyte inflammatory responses through the CD44 receptor. *J Neuroinflammation* 2018; **15**(1): 73.
90. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999; **49**(6): 377-91.
91. Ledebor A, Gamanos M, Lai W, et al. Involvement of spinal cord nuclear factor kappaB activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation. *Eur J Neurosci* 2005; **22**(8): 1977-86.
92. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 621-63.
93. Lian H, Yang L, Cole A, et al. NF $\kappa$ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron* 2015; **85**(1): 101-15.
94. Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, Sanz-Anquela JM, Arevalo-Serrano J, Gonzalo-Ruiz A. Oligomers of beta-amyloid protein (A $\beta$ 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1 $\beta$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ , and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol* 2012; **236**(2): 215-27.
95. Hsiao HY, Chen YC, Chen HM, Tu PH, Chern Y. A critical role of astrocyte-mediated nuclear factor-kappaB-dependent inflammation in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2013; **22**(9): 1826-42.
96. Strompen ODS, M.; Cömert, L. A. Immunologie. Berlin: Lehmanns Media GmbH; 2019.

97. Hashioka S, McGeer EG, Miyaoka T, Wake R, Horiguchi J, McGeer PL. Interferon-gamma-induced neurotoxicity of human astrocytes. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2015; **14**(2): 251-6.
98. Shigetomi E, Saito K, Sano F, Koizumi S. Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(4).
99. Walz W, Lang MK. Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1998; **257**(3): 127-30.
100. Simon C, Gotz M, Dimou L. Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 2011; **59**(6): 869-81.
101. Lepore AC, Dejea C, Carmen J, et al. Selective ablation of proliferating astrocytes does not affect disease outcome in either acute or chronic models of motor neuron degeneration. *Exp Neurol* 2008; **211**(2): 423-32.
102. Kamphuis W, Orre M, Kooijman L, Dahmen M, Hol EM. Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 2012; **60**(4): 615-29.
103. Anderson MA, Burda JE, Ren Y, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 2016; **532**(7598): 195-200.
104. Serrano-Pozo A, Gomez-Isla T, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT. A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *Am J Pathol* 2013; **182**(6): 2332-44.
105. Wei H, Xu L, Li C, et al. SSeCKS promoted lipopolysaccharide-sensitized astrocytes migration via increasing beta-1,4-galactosyltransferase-I activity. *Neurochem Res* 2019; **44**(4): 839-48.
106. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci* 2015; **16**(5): 249-63.
107. Sonar SA, Lal G. The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol* 2019; **10**: 710.
108. Vay SU, Olschewski DN, Petereit H, et al. Osteopontin regulates proliferation, migration, and survival of astrocytes depending on their activation phenotype. *J Neurosci Res* 2021.

109. Kuffler SW. Neuroglial cells: physiological properties and a potassium mediated effect of neuronal activity on the glial membrane potential. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1967; **168**(1010): 1-21.
110. Seifert G, Huttmann K, Binder DK, et al. Analysis of astroglial K<sup>+</sup> channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. *J Neurosci* 2009; **29**(23): 7474-88.
111. Olsen ML, Higashimori H, Campbell SL, Hablitz JJ, Sontheimer H. Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia* 2006; **53**(5): 516-28.
112. Dibaj P, Kaiser M, Hirrlinger J, Kirchhoff F, Neusch C. Kir4.1 channels regulate swelling of astroglial processes in experimental spinal cord edema. *J Neurochem* 2007; **103**(6): 2620-8.
113. Djukic B, Casper KB, Philpot BD, Chin LS, McCarthy KD. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci* 2007; **27**(42): 11354-65.
114. Olsen ML, Khakh BS, Skatchkov SN, Zhou M, Lee CJ, Rouach N. New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling. *J Neurosci* 2015; **35**(41): 13827-35.
115. Verkhratsky A, Reyes RC, Parpura V. TRP channels coordinate ion signalling in astroglia. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2014; **166**: 1-22.
116. Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci* 2009; **10**(3): 235-41.
117. Menet V, Prieto M, Privat A, Gimenez y Ribotta M. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(15): 8999-9004.
118. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; **182**(3): 311-22.
119. Cheli VT, Santiago Gonzalez DA, Smith J, Spreuer V, Murphy GG, Paez PM. L-type voltage-operated calcium channels contribute to astrocyte activation In vitro. *Glia* 2016; **64**(8): 1396-415.
120. Liddelow S, Hoyer D. Astrocytes: Adhesion Molecules and Immunomodulation. *Curr Drug Targets* 2016; **17**(16): 1871-81.

121. Fisher DW, Luu P, Agarwal N, Kurz JE, Chetkovich DM. Loss of HCN2 leads to delayed gastrointestinal motility and reduced energy intake in mice. *PLoS One* 2018; **13**(2): e0193012.

## 7. Anhang

### 7.1. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Name</b>	<b>Seite</b>
<b>Tab. 1</b>	Verbrauchsmaterialien	26
<b>Tab. 2</b>	Geräte und Zubehör	27
<b>Tab. 3</b>	Selbsthergestellte Lösungen	28
<b>Tab. 4</b>	Reagenzien und Puffer	28
<b>Tab. 5</b>	Kits	30
<b>Tab. 6</b>	Stimulantien	31
<b>Tab. 7</b>	Primärantikörper	31
<b>Tab. 8</b>	Sekundärantikörper	32
<b>Tab. 9</b>	Software	32
<b>Tab. 10</b>	Primer	33
<b>Tab. 11</b>	Stimulationsbedingungen	35

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Name	Seite
<b>Abb. 1</b>	Morphologische Darstellung reaktiver Astrozyten	42
<b>Abb. 2</b>	Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die Expression der Aktivierungsmarker GFAP und Vimentin	43
<b>Abb. 3</b>	Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die Überlebensrate	44
<b>Abb. 4</b>	Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die Proliferation und Migration	45
<b>Abb. 5</b>	Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die proinflammatorischen Zytokin- und Markerexpressionen	47
<b>Abb. 6</b>	Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die antiinflammatorischen Zytokin- und Markerexpressionen	48
<b>Abb. 7</b>	Untersuchung der HCN1-4-Kanal Subtypen Expression in primären Astrozyten	49
<b>Abb. 8</b>	Einfluss der Astrozytenaktivierung auf die HCN-Kanal Expression	50
<b>Abb. 9</b>	Darstellung des Einflusses der HCN-Kanalaktivität auf die Morphologie ruhender Astrozyten	51
<b>Abb. 10</b>	Darstellung des Einflusses der HCN-Kanalaktivität auf die Morphologie reaktiver Astrozyten	52
<b>Abb. 11</b>	Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Expression der Aktivierungsmarker GFAP und Vimentin	53
<b>Abb. 12</b>	Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf das Überleben primärer Astrozyten	55
<b>Abb. 13</b>	Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Proliferation primärer Astrozyten, gemessen mittels Ki-67 RT-qPCRs	56
<b>Abb. 14</b>	Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Proliferation primärer Astrozyten, gemessen mittels BrdU Inkorporation	57
<b>Abb. 15</b>	Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Migration primärer Astrozyten, gemessen mittels Boyden Chamber-Assays	58
<b>Abb. 16</b>	Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Migration ruhender Astrozyten, gemessen mittels Scratch-Tests	59
<b>Abb. 17</b>	Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Migration reaktiver Astrozyten, gemessen mittels Scratch-Tests	60
<b>Abb. 18</b>	Einfluss der HCN-Kanal Blockade auf die Expression immunologischer Marker primärer Astrozyten	61
<b>Abb. 19</b>	Darstellung der immunologischen Auswirkungen der HCN-Kanal Blockade auf proinflammatorische Signalwege – IL-6 und IL-1 $\beta$ Expression	63
<b>Abb. 20</b>	Darstellung der immunologischen Auswirkungen der HCN-Kanal Blockade auf proinflammatorische Signalwege – iNOS Expression und NO-Freisetzung	64
<b>Abb. 21</b>	Darstellung der immunologischen Auswirkungen der HCN-Kanal Blockade auf antiinflammatorische Signalwege – IL-10 Expression	65

## 8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Bereits veröffentlichte Teilergebnisse dieser Dissertation finden sich in PubMed:

**Vay SU, Olschewski DN, Petereit H, et al. Osteopontin regulates proliferation, migration, and survival of astrocytes depending on their activation phenotype. J Neurosci Res 2021.**

Folgende Ergebnisse dieser bereits veröffentlichten Studie entspringen meiner Forschungsarbeit: Zur Untersuchung des Einflusses von Osteopontin auf Astrozyten unterschiedlichen Aktivierungszustandes musste zunächst eine Methode zur Aktivierung von Astrozyten etabliert werden. Diese Methode etablierte ich, indem ich Astrozyten mit dem Zytokingemisch, bestehend aus TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ , stimulierte. Hierunter zeigte sich, wie in dieser Dissertation beschrieben, eine deutliche Aktivierung der primären Astrozyten. Daraufhin charakterisierte ich den Einfluss der Aktivierung durch Untersuchung der Proliferation, Migration, des Überlebens, der GFAP-, Vimentin- und NFkB-Expression sowie der Immunkompetenz. Zur Untersuchung der Immunkompetenz analysierte ich die Expressionen mehrerer Zytokine, sowohl auf Gen- wie auch auf Proteinebene. Dabei wurden alle Ergebnisse reaktiver Astrozyten mit denen ruhender Astrozyten verglichen. In der bereits veröffentlichten Studie sind diese Ergebnisse unter Punkt 3.1: „Proinflammatorische Zytokine beeinflussen die Funktion, den Phänotyp und das Expressionsmuster primärer Astrozyten in vitro“ beschrieben. Im Endeffekt erbrachte die Etablierung dieser Aktivierungsmethode mit Charakterisierung der zuvor genannten Funktionsänderungen die Grundlage zur Untersuchung des Einflusses von Osteopontin auf Astrozyten unterschiedlichen Aktivierungszustandes.

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse zur Funktion des hyperpolarisations-aktivierten zyklisch Nukleotid-modifizierten (HCN-) Kationenkanals in primären Astrozyten unterschiedlichen Aktivierungszustandes *in vitro* befinden sich zurzeit im Vorbereitungsprozess der Veröffentlichung.

**Vay SU\*, Petereit H\*, Narzazadeh N, Olschewski DN, Fink GR, Schroeter M, Rueger MA. \*contributing equally. "Role of HCN-channels in reaktive astrocytes".**

Eine Posterpräsentation der Ergebnisse dieser Arbeit erfolgte bereits 11/2020 auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie.

**"The function of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in resting and reactive astrocytes in vitro" \*Petereit HF1, \*Vay SU1, Groß E, Boenert J, Rabenstein M, Blaschke S, Fink GR1, Schroeter M1, Rueger MA1**

1 Department of Neurology, Faculty of Medicine and University Hospital, University of Cologne, Kerpener Strasse 62, 50924, Cologne, Germany

\*both authors contributed equally to this work and are financial supported through Cologne fortune scholarship