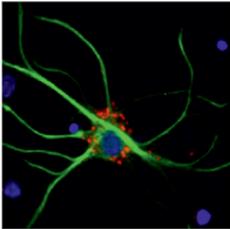


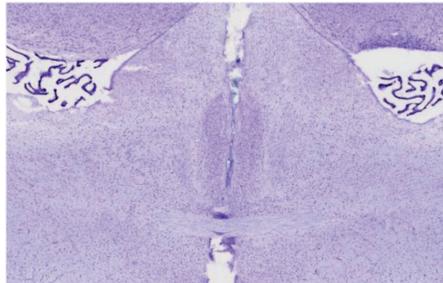
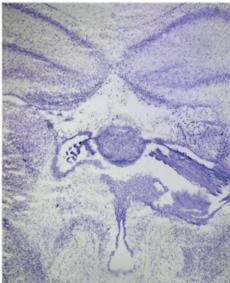
**NIKLAS GRABBE**

---

Zelluläre Charakterisierung des Renin-Angiotensin  
Systems sowie des Glutamatsystems im  
hypothalamischen Subfornikal- und  
Subseptalorgan



INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades  
eines **Dr. med. vet.** beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für  
Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

**Zelluläre Charakterisierung des Renin-Angiotensin  
Systems sowie des Glutamatsystems im  
hypothalamischen Subfornikal- und Subseptalorgan**

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Niklas Grabbe**

Tierarzt aus Rinkerode (Westfalen)

Gießen 2019

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Prof. Dr. Sabine Wenisch

Tag der Disputation: 02.07.2019

**„Jede gute Geschichte hat es verdient ausgeschmückt zu werden!“**

(J.R.R. Tolkien – The Hobbit – 1937)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
1.1	Das <i>Organum subfornicale</i> .....	9
1.1.1	Zirkumventrikuläre Organe ohne endotheliale Blut-Hirn Schranke .....	9
1.1.2	Neuroanatomie und –histologie des Subfornikalorgans (Säugetier) und Subseptalorgans (Vogel): Neurone, Gliazellen und Kapillarisation.....	12
1.1.3	Afferente und efferente Konnektivitäten des Subfornikalorgans bzw. Subseptalorgans .....	19
1.2	Physiologische Bedeutung des SFOs / SSOs als Zielstruktur für zirkulierende Botenstoffe oder Ionen .....	21
1.2.1	Interaktion mit Botenstoffen des Immunsystems .....	21
1.2.2	Interaktion mit Botenstoffen des Energiehaushalts.....	22
1.2.3	Interaktion mit Elektrolyten des systemischen extrazellulären Flüssigkeitsraumes.....	22
1.2.4	Interaktion mit Hormonen für Kreislauf- und Volumenregulation.....	25
1.3	Das SFO- / SSO-intrinsische Renin-Angiotensin System .....	31
1.3.1	Gewebsspezifische Renin-Angiotensin Systeme des Säugetiers und Vogels .....	31
1.3.2	Hinweise auf ein Gehirn-, respektive Hypothalamus-, respektive SFO- / SSO-intrinsisches Renin-Angiotensin System .....	32
1.4	Afferente und intrinsische Innervation des SFOs: Wichtige Transmittersysteme .....	43
1.4.1	Das cholinerge Transmittersystem .....	43
1.4.2	Das noradrenerge Transmitter-System.....	45
1.4.3	Das glutamaterge Transmittersystem: ionotrope und metabotrope Rezeptorsysteme .....	46
1.5	Fragestellungen und Ziele der Promotionsarbeit .....	58
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>61</b>
2.1	Allgemeine Materialien .....	61
2.2	Versuchstiere .....	63

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.1	Ratten.....	63
2.2.2	Eintagsküken.....	64
2.3	Etablierung neuro-glialer Primärkulturen des rattenspezifischen SFOs und des vogelspezifischen SSOs .....	64
2.3.1	Lösungen für die Zellkulturpräparation .....	66
	Neurobasal-A / B27 Medium.....	66
	Gey's Balanced Salt Solution (GBSS).....	67
	Hank's Balanced Salt Solution (HBSS).....	67
	Dispase I-HBSS Gebrauchslösung.....	67
2.3.2	Etablierung einer neuro-glialen Primärzellkultur zirkumventrikulärer Organe	67
	67	
2.3.2.1	Neuro-gliale Primärzellkultur des <i>Organum subfornicale</i> (Ratte) .....	68
2.3.2.2	Neuro-gliale Primärzellkultur des Hypothalamus sowie des <i>Organum subseptale</i> des Huhns .....	68
2.3.2.3	Vorbereitung der Zellkulturkammern .....	69
2.3.2.4	Präparation des <i>Organum subfornicale</i> früh postnataler Ratten .....	70
2.3.2.5	Etablierung einer neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Küken .....	71
2.3.2.6	Präparation des <i>Organum subseptale</i> von Eintagsküken .....	73
2.4	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Fura-2 AM Ratio-Imaging Technik.....	74
2.4.1	Lösungen für Ratio-Imaging Messungen .....	76
	Calciummesspuffer.....	76
2.4.2	Grundlagen der Calcium-Ratio-Imaging Technik .....	77
2.4.3	Messstand für die Calcium-Imaging Versuche .....	80
2.4.4	Vorbereitung der Versuchsdurchführung .....	81
2.4.5	Versuchsdurchführung .....	82
2.4.6	Messprotokolle für die Calcium-Ratio-Imaging Versuche .....	83
2.4.6.1	Datenevaluierung und Statistik.....	96
2.5	Immunzytochemie / Immunhistochemie.....	98
2.5.1	Lösungen für Immunzytochemie.....	99
	Inkubationspuffer für immunzytochemische Untersuchungen.....	99
	Waschpuffer für immunzytochemische Untersuchungen.....	99
	Phosphatpuffer (PB).....	99

# Inhaltsverzeichnis

---

	Paraformaldehydlösung (PFA 4 %) .....	100
2.5.2	Grundlagen der Methode.....	100
2.5.3	Verwendete Antikörper / -seren.....	102
2.5.4	Immunzytochemische Charakterisierung der SFO- respektive SSO- Primärzellkultur.....	105
2.5.5	Nachweis SFO- und SSO-intrinsischer Neurone in Gehirnschnitten neo- nataler Ratten und Eintagsküken.....	108
2.5.5.1	Auswertung der immunzyto- und -histochemischen Untersuchungen, sowie der Kresylviolett- und Klüver-Barrera-Färbungen .....	112
2.6	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	113
2.6.1	Allgemeine Grundlagen.....	115
2.6.2	Extraktion der RNA aus kultivierten SFO-Zellen.....	118
2.6.3	Reverse Transkription .....	120
2.6.4	Durchführung der quantitativen <i>real-time</i> PCR.....	121
2.6.4.1	Ermittlung der optimalen endogenen Kontrolle mit Hilfe des Primer Design "Reference Gene Kits".....	122
2.6.4.2	Auswertung der quantitativen <i>real-time</i> PCR.....	122
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>124</b>
3.1	Charakterisierung der neuro-glialen Primärzellkultur des <i>Organum subfornicale</i> neonataler Ratten.....	124
3.1.1	Immunzytochemische Charakterisierung der neuro-glialen Zelltypen in der SFO-spezifischen Primärzellkultur.....	125
3.1.2	Immunzytochemischer Nachweis wichtiger Neurotransmittersysteme in der Primärzellkultur des <i>Organum subfornicale</i> .....	128
3.2	Funktionelle Charakterisierung eines lokalen Renin-Angiotensin Systems im <i>Organum subfornicale</i> der Ratte.....	134
3.2.1	Einsatz der Fura-2 Ratio-Imaging Technik zur Charakterisierung wichtiger Komponenten des lokalen RAS im Subfornikalorgan der Ratte.....	135
3.2.1.1	Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Inhibitoren der verschiedenen RAS Schlüsselenzyme .....	135
3.2.1.2	Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensinogen und dem Renin-spezifischen Inhibitor Aliskiren.....	137

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.1.3	Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensinogen und dem Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitor Chymostatin.....	139
3.2.1.4	Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensin I und dem ACE-spezifischen Inhibitor Captopril .....	142
3.2.1.5	Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensin (1-12) und dem Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitor Chymostatin.....	144
3.2.1.6	Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit ANG (1-12) und dem ACE-spezifischen Inhibitor Captopril .....	146
3.2.1.7	Neurotransmitter <i>coding</i> Angiotensin II responsiver Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur .....	149
3.2.2	Immunzytochemischer Nachweis verschiedener Komponenten eines SFO-intrinsischen RAS .....	150
3.2.2.1	Immunzytochemischer Nachweis der zellulären Expression von Aogen in der SFO-spezifischen Primärzellkultur.....	151
3.2.2.2	Immunzytochemischer Nachweis von zellulärem ANG II in der SFO-spezifischen Primärzellkultur .....	154
3.2.2.3	Immunzytochemischer Nachweis der zellulären Expression von <i>angiotensin-converting enzyme</i> in der SFO-spezifischen Primärzellkultur .....	157
3.2.2.4	Immunzytochemischer Nachweis von ANG (1-12) in der SFO-spezifischen Primärzellkultur.....	160
3.2.2.5	Immunzytochemischer Nachweis der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 nach ANG II Stimulation .....	161
3.2.3	Quantitative <i>real-time</i> PCR für Komponenten des SFO-intrinsischen RAS	163
3.3	Charakterisierung funktionell exprimierter Glutamatrezeptoren im <i>Organum subfornicale</i> der Ratte .....	164
3.3.1	Funktionelle Charakterisierung glutamaterger Rezeptoren in der SFO-spezifischen Primärzellkultur mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik .....	165
3.3.1.1	Verschiedene Superfusionsstimulationen der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat als Grundlage pharmakologischer Untersuchungen .....	165

## Inhaltsverzeichnis

---

3.3.1.2	Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Anwesenheit spezifischer Antagonisten und Agonisten für die metabotropen Glutamatrezeptoren 1 und 5 .....	173
3.3.1.3	Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat zur Charakterisierung ionotroper Glutamatrezeptoren (NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoren).....	186
3.3.1.4	Modulation Glutamat induzierter intrazellulärer Calciumsignale durch das Neuropeptid Phoenixin in der SFO-spezifischen Primärzellkultur .....	193
3.3.1.5	Neurotransmitter <i>coding</i> Glutamat responsiver Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur .....	196
3.3.2	Immunzytochemischer Nachweis verschiedener exzitatorischer metabotroper Glutamatrezeptoren.....	197
3.3.2.1	Immunzytochemischer Nachweis von mGluR1 in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur.....	198
3.3.2.2	Immunzytochemischer Nachweis von mGluR5 in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur.....	200
3.3.3	Quantitative <i>real-time</i> PCR für mGluR1 und mGluR5.....	202
3.4	Etablierung sowie funktionelle und immunzytochemische Charakterisierung von Primärzellkulturen des Hypothalamus und <i>Organum subseptale</i> des Huhnes .....	203
3.4.1	Immunzytochemische und funktionelle Charakterisierung einer neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Küken .....	204
3.4.1.1	Immunzytochemische Charakterisierung der neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Hühnerküken .....	204
3.4.1.2	Einsatz der Fura-2 Ratio-Imaging Technik zum Vitalitätsnachweis von Neuronen und Astrozyten in der neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Hühnerküken.....	206
3.4.2	Immunzytochemische und funktionelle Charakterisierung einer Primärzellkultur des <i>Organum subseptale</i> .....	208
3.4.2.1	Immunzytochemische Charakterisierung der neuro-glialen Primärzellkultur des <i>Organum subseptale</i> früh postnataler Hühnerküken.....	209
3.4.2.2	Dosis-Wirkungs-Beziehung für ANG II Rezeptoren hinsichtlich intrazellulärer Calciumsignale.....	210
3.4.2.3	Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit Inhibitoren für ACE und den vogelspezifischen ANG II Rezeptor .....	212

# Inhaltsverzeichnis

---

3.4.2.4	Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensin I und dem <i>angiotensin-converting enzyme</i> spezifischen Inhibitor Captopril .....	214
3.4.2.5	Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit aviärem Angiotensin II und dem spezifischen Angiotensin-Rezeptor Antagonisten [Sar <sup>1</sup> ,Ile <sup>8</sup> ]ANG II .....	216
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>219</b>
4.1	Das intrinsische Renin-Angiotensin System (RAS) im Subfornikal- und Subseptalorgan des Säugetiers bzw. Vogels .....	219
4.1.1	SFO-intrinsische Komponenten des RAS .....	220
4.1.2	Angiotensin (1-12) im Subfornikalorgan des Säugetiers .....	229
4.1.3	Angiotensin II bedingte nukleäre Translokation proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren in Zellen des SFOs .....	231
4.1.4	Die <i>de novo</i> Etablierung vogelspezifischer Primärzellkulturen .....	233
4.1.5	SSO-intrinsische Komponenten des RAS .....	235
4.2	Glutamatrezeptoren im Subfornikalorgan des Säugetiers .....	238
4.2.1	Das glutamaterge System des <i>Organum subfornicale</i> .....	238
4.2.2	Die Expression metabotroper und ionotroper Glutamatrezeptoren im SFO der Ratte .....	242
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>251</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>255</b>
<b>7.</b>	<b>VERZEICHNISSE .....</b>	<b>258</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	258
7.2	Literaturverzeichnis .....	262
<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>307</b>
8.1	Publikationen .....	307
8.1.1	Originalarbeiten in Fachzeitschriften .....	307
8.1.2	Wissenschaftliche Konferenz- und Fachbeiträge .....	307

## Inhaltsverzeichnis

---

8.2	Danksagung .....	308
8.3	Erklärung zur Doktorarbeit.....	310

## 1. Einleitung

### 1.1 Das *Organum subfornicale*

#### 1.1.1 Zirkumventrikuläre Organe ohne endotheliale Blut-Hirn Schranke

Das Blutgefäßsystem des zentralen Nervensystems (ZNS) zeichnet sich durch Kapillaren mit einem kontinuierlichen Endothel, basierend auf *tight junctions* (TJ) mit hohem elektrischen Widerstand und einer intakten Basalmembran aus, wodurch die sogenannte Blut-Hirn Schranke (BHS) gebildet wird. Die Dichtigkeit der TJs beruht auf der Expression spezifischer Adhäsionsproteine (Claudine, Occludine) [1, 2] und wird durch bis *dato* unbekannte Faktoren induziert, die von den Astrozytenfortsätzen, welche die Basalmembran der Kapillaren umgeben, freigesetzt werden [3]. Hydrophile Moleküle (z.B. Glukose, Aminosäuren) und Elektrolyte (Na<sup>+</sup>) können somit nur kontrolliert aus dem Blut in das Gehirn und *vice versa* aus dem Gehirn in das Blut (Stoffwechselendprodukte) übertreten [4].

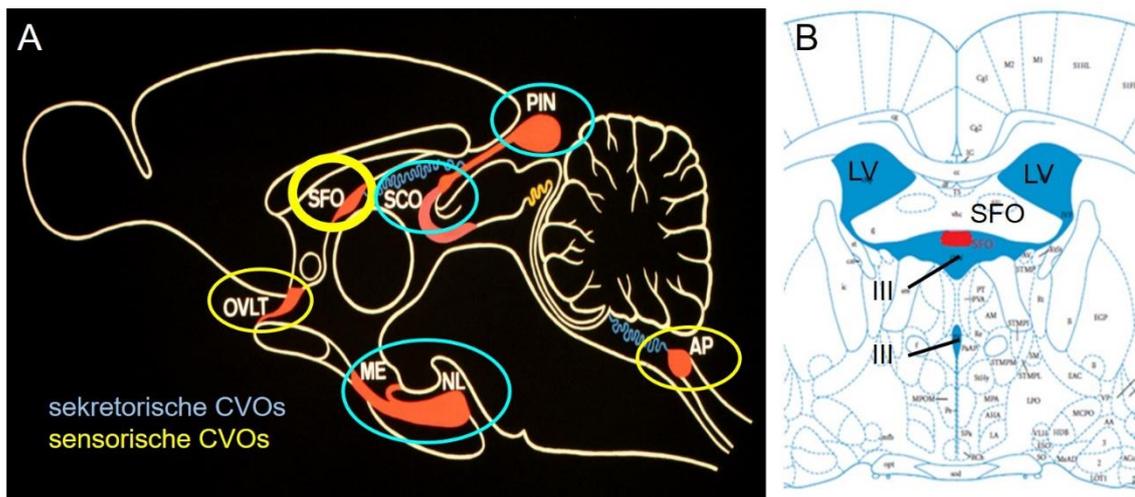
Auf der Ebene des *Diencephalon* (Zwischenhirn) und der *Medulla oblongata* aller Vertebraten finden sich jedoch kleinvolumige Gehirnstrukturen, deren Kapillaren vorrangig vom fenestrierten Typ und daher durchlässig für kleine, im Blutplasma zirkulierende hydrophile Moleküle sowie Elektrolyte sind [5–9] (*Abb. EIN 1*). Sie werden aufgrund ihrer Nähe zum dritten bzw. vierten Ventrikel des Gehirns, welche mit Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) gefüllt sind, als zirkumventrikuläre Organe (CVOs) bezeichnet (*Abb. EIN 1*). CVOs werden aufgrund ihrer Lage, Vaskularisierung, der Fenestrierung ihres Endothels, dem Vorhandensein neurosekretorischer Synapsen und ihrer Fähigkeit, im Blut zirkulierende Substanzen „wahrzunehmen“ (oder nicht), in die Gruppen der sekretorischen und der sensorischen CVOs eingeteilt [9–17] (*Abb. EIN 1*). In der Literatur gibt es widersprüchliche Aussagen darüber, wie viele CVOs es insgesamt gibt, wobei lediglich bei den sekretorischen CVOs unterschiedliche Aussagen getroffen werden [5, 18–22]. Zu letzteren werden bei Säugetieren zumeist das *Corpus pineale* (PIN), die *Eminentia mediana* (ME), die Neurohypophyse (NH), das *Organum subcommissurale* (SCO) sowie das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OvLT) gezählt [10, 12], wobei die ME und NH aufgrund ihrer anatomischen Lage manchmal fälschlicherweise zusammen als ein CVO bezeichnet werden (*Abb. EIN 1*). Zu den sensorischen CVOs gehören das *Organum subfornicale* (SFO), das schon erwähnte OvLT und die *Area postrema* (AP) (*Abb. EIN 1*) [6,

10–12, 20, 23]. Als weiteres CVO wird oft der *Plexus choroideus* (ChP) genannt, obwohl dieser kein neuro-gliales Gewebe darstellt. Aus diesem Grund kann der ChP auch keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden [9, 10, 23]; er übernimmt aber wesentliche Aufgaben bei der Bildung von CSF und wird pathophysiologisch mit Migräne, Hydrozephalus sowie Prozessen der Neurodegeneration in Verbindung gebracht [3, 24–26].

Sensorische CVOs (SFO, OvLT, AP) enthalten zahlreiche kleinzellige Neurone und übernehmen aufgrund ihrer fenestrierten Endothelien eine wichtige Rolle bei der afferenten Übertragung von molekularen Signalen aus dem Blutplasma in das Gehirnparenchym [7, 9, 10, 27]. Durch ihre multiplen afferenten, efferenten und reziproken Verschaltungen (*Kap. EIN 1.1.3*) mit Neuronen hypothalamischer, medullärer, limbischer und corticaler Gehirnstrukturen innerhalb der BHS erfolgt eine komplexe neuronale Weiterverarbeitung der perzipierten Informationen aus dem systemischen Organismus [10, 20]. Sensorische CVOs übernehmen dabei vorrangig Aufgaben im Rahmen der Regulation der Homöostase zur Aufrechterhaltung von Salz- und Wasserhaushalt, Blutdruck, Körperkerntemperatur, Energiehaushalt, Futteraufnahme, Wachstum, Fortpflanzung, Laktation, Schlaf, Atmung sowie Schmerz- und Immunmodulation [7, 8, 23, 27–35]. Sensorische CVOs sind in der Wand des dritten und vierten Hirnventrikels lokalisiert, ragen in diese hinein [11, 19] und enthalten neben Neuronen alle bekannten Gliazelltypen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Tanyzyten, Mikrogliazellen), wobei den Tanyzyten als radiären Gliazellen eine bedeutende Aufgabe in der Entwicklung neuronalen Gewebes zukommt [12, 36–39]. Sensorische CVOs sind gegenüber den Liquorräumen durch Ependymzellen abgegrenzt [20]. *Tight junctions* zwischen den Tanyzyten und Ependymzellen bilden im Bereich der sCVOs eine Gehirn-Liquor-Schranke [20]. Diese Schranke fehlt im gesamten anderen Ventrikelbereich [20].

Das SFO bildet die dorsale Komponente der *Lamina terminalis* (LT) im Bereich des anterioren Hypothalamus zwischen den beiden *Foramina Monroi* im Dach des dritten Hirnventrikels und somit am Übergang der lateralen zum dritten Hirnventrikel [40] (*Abb. EIN 1*). Es ist dorsal an der hippocampalen Kommissur fixiert, besteht aus einer peripheren und zentralen Zone und ist hochgradig vaskularisiert [11, 41]. Eine detaillierte Beschreibung der Neuroanatomie und –histologie des SFOs ist *Kap. EIN 1.1.2* zu entnehmen.

Das OvLT bildet die ventrale Komponente der LT und reicht je nach Tierspezies vom *Chiasma opticum* bis in die Nähe der *Commissura anterior* (Abb. EIN 1). Außerdem grenzt es an die mit CSF gefüllte präoptische Zisterne, ist lateral durch die präoptische Region (POA), anteroventral durch den *Nucleus periventricularis* und dorsal durch den *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) begrenzt [11, 17, 20, 42–47] (Abb. EIN 1). Letzterer repräsentiert die mediale Komponente der LT, befindet sich jedoch innerhalb der BHS. Das OvLT besteht aus drei Untereinheiten, einer rostromedialen stark vaskularisierten Zone (Kapillarnetz), einer dorsalen Kappe und dem lateralen und posterioren Gewebe [20, 48–50]. Die arterielle Blutversorgung des OvLTs entstammt zweier kleiner präoptischer Arterien, welche von der *Arteria anterior communicans* abzweigen [20, 51]. Diese segmentieren sich im OvLT zu einem oberflächlichen und tiefen Kapillarplexus mit zahlreichen Schleifen [11, 17, 20, 51]. Die venöse Drainage des OvLTs verläuft über vier bis acht kleine Venen, die ventral in einen prä-chiasmatischen *Sinus* münden [20].



**Abb. EIN 1: Lokalisation zirkumventrikulärer Organe des Säugerhirns im Sagittalschnitt, sowie des SFOs im Coronalchnitt**

Darstellung der sekretorischen zirkumventrikulären Organe (CVOs), *Corpus pineale* (PIN), *Organum subcommissurale* (SCO), *Eminentia mediana* (ME) und Neurohypophyse (NL) in blau, und der sensorischen CVOs *Organum subfornicale* (SFO), *Organum vasculosum laminae terminalis* (OvLT) und *Area postrema* (AP) in gelb in einem schematischen Sagittalschnitt des Säugerhirns (A), sowie des SFOs in einem Coronalchnitt des Säugerhirns (B), mit seiner Lokalisation im dorsalen dritten Ventrikel (III). Ebenfalls dargestellt sind die lateralen Ventrikel (LV).

Die AP ist das am caudalsten gelegene CVO (Abb. EIN 1). Sie liegt an der Grenze zwischen *Medulla oblongata* und dem Rückenmark, am Boden des vierten Hirnventrikels und überlappt den posterioren Anteil des *Nucleus tractus solitarius* (NTS), wobei sie durch das *Funiculum seperans* vom NTS getrennt ist [20, 42, 52–63]. Die

AP lässt sich in vier Untereinheiten einteilen, eine dorsale periventrikuläre Mantelzone, eine zentrale Zone, eine ventrale Verbindungszone und eine laterale Zone [20, 55, 57]. Ihre arterielle Blutzufuhr erhält die AP aus den *Arteriae cerebellaris anterior* und *inferior*, welche lateral in die AP eintreten und sich in ein dichtes Kapillarnetz aufzweigen, wobei einige dieser Kapillaren mit dem ChP des vierten Ventrikels verbunden sind [11, 20, 51, 53, 64, 65].

### **1.1.2 Neuroanatomie und –histologie des Subfornikalorgans (Säugetier) und Subseptalorgans (Vogel): Neurone, Gliazellen und Kapillarisation**

Das *Organum subfornicale* der Säugetiere wurde in älterer Literatur bereits als heterogenes CVO beschrieben, und in einen dorsalen und ventralen Strang sowie einen Körper unterteilt [20, 40]. Demnach ist der dorsale Anteil mit der *Tela choroidea*, der ventrale Strang mit dem MnPO und rostrale Anteile mit dem *Nucleus triangularis* verbunden [40]. In aktueller Literatur wird das SFO in vier Zonen eingeteilt, eine rostrale sowie je eine Übergangs-, zentrale und caudale Zone, wobei die letzten drei jeweils aus einer dorsalen, ventromedialen und lateralen Unterzone bestehen [20, 66–69]. Die ventromedialen Anteile werden als das „Innere“ oder die Kernregion (*core*), die dorsalen und lateralen Anteile als Schalenregion (*anulus*) bezeichnet [20] (*Abb. EIN 2*). Efferente neuronale Projektionen in andere hypothalamische Kerngebiete (*Nucleus paraventricularis* (PVN), *Nucleus supraopticus* (SON), MnPO, OvLT, *Nucleus arcuatus* (ARC)) konnten dabei vor allem aus der Schalenregion nachgewiesen werden, während Neurone der *core* Region efferent zu anderen Kerngebieten projizieren [20, 66, 70–74].

Das SFO erhält seine arterielle Blutzufuhr ventral durch die *Arteria praeoptica* sowie dorsal und caudal durch die Arterie, welche auch den *Plexus choroideus* versorgt [20, 51]. Diese *Arteria subfornicalis* zweigt von der *Arteria cerebralis anterior* ab und verläuft am *Splenium* des *Corpus callosum*, um dann rostral durch arachnoidales Gewebe zurück zum SFO zu gelangen [20, 75]. Innerhalb des SFOs zweigen sich die Arteriolen zu einem dichten Kapillarnetz mit subependymalen Schleifen auf [20, 51, 69, 75, 76]. Der venöse Abfluss aus dem SFO erfolgt über septale Venolen, welche lateral und rostral im SFO verlaufen und in die *Vena cerebri magna* einmünden [20]. Die *core* Region (ventromediale Anteile) weist den größten Grad an Kapillarisation auf, wobei hier sowohl fenestrierte als auch nicht-fenestrierte Kapillaren zu finden sind [13, 20, 41, 51, 68]. Kapillaren werden je nach Dichtigkeit der TJs und

Zustand der Basalmembran in Typ I bis Typ III eingeteilt [20, 69]. Kapillaren vom Typ I zeigen ein kontinuierliches Endothel, keine Fenestrierung sowie eine durchgängige Basalmembran und sind im SFO vor allem in der Übergangszone nachweisbar [69]. Kapillaren vom Typ II weisen ebenfalls keine Fenestrierung und keine perivaskulären Räume auf und sind im gesamten SFO zu detektieren; sie stellen den ausschließlichen Kapillartyp in der rostralen Region dar [69]. Kapillaren vom Typ III besitzen ein fenestriertes Endothel, große perivaskuläre Räume und sind vor allem in der zentralen und caudalen Region des SFOs lokalisiert [69]. In diesen Bereichen ist die BHS des SFOs am durchlässigsten für im Blut zirkulierende Substanzen. Daraus resultiert, dass das medio-caudale SFO mit dem haemalen Milieu verbunden ist [6, 20]. Im SFO sind neben Neuronen auch Neurogliazellen (Astrozyten, Tanyzyten, Ependymozyten (EZ) und Oligodendrozyten) sowie Mikrogliazellen zu finden [77]. Bei der Ratte sind differenzierte Neurone bis zum 17. Tag der Fetalentwicklung (E17) nicht im SFO nachweisbar [77]. Ab dem 19. Tag der Fetalentwicklung sind bereits viele Zellen mit typischen neuronalen Zellorganellen wie raues endoplasmatisches *Reticulum* (rER), Golgi-Apparat, Mikrotubuli und Vesikel nachzuweisen, wohingegen die ersten Synapsen erst am 20. Tag der Fetalentwicklung (E20) zu erkennen sind [77]. Die zahlreichen bi- und tripolaren, kleinzelligen Neurone leiten Informationen aus dem Blut an übergeordnete Hirnstrukturen weiter.

Die Neurogliazellen betreffend sind im SFO der Ratte ab dem 21. Tag der Fetalentwicklung protoplasmatische Astrozyten und ab dem 7. Tag postnatal (P7) fibröse Astrozyten zu finden [77]. Astrozyten übernehmen eine Reihe wichtiger Funktionen innerhalb des ZNS. Sie sind an der Synapsenbildung und adulten Neurogenese beteiligt [1]. Des Weiteren sind sie maßgeblich an der Bildung der BHS beteiligt, indem sie mit ihren Fortsätzen die Kapillaren umschließen und durch bis *dato* unbekannte Faktoren die Permeabilität der Kapillaren beeinflussen [1]. Die Astrozytenbarriere bildet *ergo* eine extraendotheliale Diffusionsbarriere zum Schutz der SFO-spezifischen Neurone vor neurotoxischen Substanzen aus dem Blut [1, 78, 79]. Oligodendrozyten bilden, analog zu den Schwannschen Zellen in der Peripherie, Myelinscheiden um die Axone von Neuronen aus [80]. Diese dienen der Isolierung der Axone und somit der Möglichkeit der schnellen, saltatorischen Erregungsleitung. Zudem haben Oligodendrozyten Stütz- und Ernährungsfunktionen für die Neurone [80]. Tanyzyten sind hoch spezialisierte EZs, die eine Barriere zwischen dem Parenchym des SFOs und der CSF bilden, zahlreiche TJs untereinander besitzen, und somit den

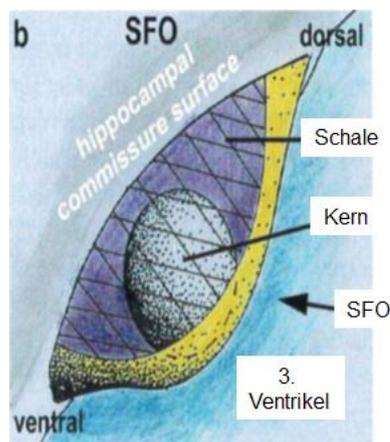
Übertritt von Substanzen aus dem Parenchym in den *Liquor cerebrospinalis* und *vice versa* kontrollieren [79, 81]. Zudem bilden sie lange Fortsätze, die nahezu das gesamte Parenchym des SFOs durchziehen und teilweise bis an die Neurone und fenestrierten Kapillaren heran reichen [81]. Wie im OvLT [82] so sind auch zahlreiche Neurone im SFO in ein dichtes Netzwerk aus Tanyzytenfortsätzen eingebettet [81]. *High molecular weight* Substanzen, also Substanzen (meist Proteine) mit einem hohen molekularen Gewicht (z.B. Immunglobuline, Albumin, Fibrin, Plasmin), können diese Barriere aus Tanyzyten nicht überwinden und somit die Neurone des SFOs nicht nachhaltig beeinflussen [78, 79, 83]. Die Ependymzellen zeigen zunächst wenige kurze Mikrovilli und Zilien, ab dem 30. Tag postnatal werden sie jedoch länger und dichter [77].

Mikrogliazellen sind Zellen des Immunsystems. Sie erlauben eine unmittelbare Immunantwort auf schädliche Noxen im Gehirn und sind stragisch günstig in unmittelbarer Umgebung der Kapillaren lokalisiert [1]. Im rattenspezifischen SFO sind ab dem 19. Tag der Fetalentwicklung Mikrogliazellen nachweisbar [77]. Insgesamt lassen sich ab dem 30. Tag postnatal alle zellulären Bestandteile in der Häufigkeit wie beim adulten Tier identifizieren [77].

Über die Embryonalentwicklung des SFOs ist sehr wenig bekannt [84]. Vermutlich gehen Vorläufer des SFOs aus der Dachplatte des Neuralrohrs, angrenzend an die *Eminentia thalami*, hervor [85]. Außerdem wurde das Gen *Pax2*, welches für die Zellen der *Eminentia thalami* kodiert, auch im SFO adulter Ratten gefunden, was für eine Verknüpfung der *Eminentia thalami* und des SFOs in der Embryonalentwicklung spricht [85, 86].

Das SFO als sensorisches zirkumventrikuläres Organ übernimmt eine Reihe von Aufgaben in der Regulation des Kreislaufsystems, des Salz- und Wasserhaushaltes, der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushaltes sowie in der zentralen Immunantwort auf systemisch entzündliche Prozesse. Die Expression spezifischer membranständiger Rezeptorproteine und Ionenkanäle in Neuronen und Gliazellen des SFOs für zirkulierende Botenstoffe (Hormone, Zytokine) und Ionen unterstreicht diese Funktion [20]. Die Bedeutung des SFOs für die zentrale Regulation des Kreislaufsystems und des Salz- bzw. Wasserhaushaltes wurde z.B. durch den Expressionsnachweis der Rezeptoren für Angiotensin II (ATR) [20, 48–50, 87–91], atriales natriuretisches Peptid [20, 92] oder Vasopressin [93] nachgewiesen. Die Isoionie

bzw. Isotonie der extrazellulären Körperflüssigkeit betreffend, ist die Expression des  $\text{Na}_x$ -Rezeptors [94, 95], des Kationentransporters 3 [96] und eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Rezeptors, der auf minimale Abweichungen der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reagiert [97], zu erwähnen. Die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushaltes durch das SFO konnte durch den Nachweis von Rezeptoren für humoral kodierte Hormone wie Glucagon-ähnliches Peptid [98], Neuropeptid  $\text{YY}_1$  [8, 99], Leptin [8, 100], Ghrelin [8, 101], Apelin [8], Adiponectin [8], Endocannabinoide [8], Insulin [8], Amylin und Calcitonin [35, 102, 103] deutlich gemacht werden. Die Regulation der Immunantwort auf systemisch entzündliche Prozesse durch das SFO wurde durch den Nachweis der Expression von *toll-like receptor 4* (TLR4), welcher *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) wie Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien erkennt und so die Aktivierung des angeborenen Immunsystems moduliert [104], eines CD14 Rezeptors für LPS [105], der Prostaglandin Rezeptoren EP2-4 [106] und Rezeptoren für Interleukin  $1\beta$  und Interleukin 6 [107] hervorgehoben. Eine mögliche Beteiligung an der zentralen Regulation der Fortpflanzung konnte durch den Nachweis des Östrogenrezeptors  $\text{ER}\alpha$  [108] und von Rezeptoren für das Trächtigkeitshormon Relaxin [109] identifiziert werden. Zudem sind weitere Rezeptoren für Neurotransmitter wie Serotonin [20], Galanin [110], Somatostatin [111], Glutamat (GLUT) [20],  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) [20] und Stickstoffmonoxid (NO) [20] auf Neuronen und Gliazellen im SFO nachgewiesen worden.



**Abb. EIN 2: Der Aufbau des *Organum subfornicale***

Dargestellt ist der Aufbau des SFOs mit einem ventromedialen Kern (*core*) sowie der dorsalen und lateralen Schale (*anulus*).

Aus McKinley et al. 2003

Das *Organum subseptale* (SSO) im Gehirn von Vögeln stellt das Pendant zum SFO der Säugetiere dar und wurde auch lange als SFO bezeichnet. Erst nachdem man herausgefunden hatte, dass das Großhirn von Vögeln keinen *Fornix* (wichtigster Faserzug des limbischen Systems) aufweist, wurde es aufgrund der neuro-anatomischen Nähe zum *Septum* in „SSO“ umbenannt [5]. Insgesamt wurden im Gehirn von Vögeln je nach Definition neun bzw. zehn CVOs charakterisiert [5]. Dazu zählen neben den beim Säugetier bekannten CVOs (OvLT, SCO, PIN, AP, ME, NH) (Abb. EIN 1) das SSO, das *Organum septale laterale* (LSO), das *Organum paraventriculare* (PVO) und das *Organum subtrochleare* (STO) (Abb. EIN 3) [5]. Da in der hier vorliegenden Arbeit mit dem SSO gearbeitet wurde, wird dieses im Folgenden detailliert beschrieben. Das SSO liegt am Dach des dritten Hirnventrikels und ragt in diesen hinein. Es beginnt dorsal und auf der Mittellinie der *Commissura anterior* (Ca) und zieht von dort bis zum ventralen Anteil des *Nucleus commissurae hippocampale* (NHpC). Diese Strukturen liegen demnach so dicht beieinander, dass es fast unmöglich ist, sie getrennt zu betrachten [112]. Im Folgenden wird aus diesem Grunde neben dem SSO auch der NHpC genauer beleuchtet. Im posterioren Anteil liegt das SSO auf einer großen Fläche des NHpC, im caudalen Bereich reicht es bis zum Übergang der beiden Lateralventrikel in den dritten Hirnventrikel, den *Foramina interventriculares* (= *Foramina Monroi*) [112–114].

Das SSO wird durch einen zentralen Blutsinus in zwei Hälften geteilt, welche ventral durch eine dünne Ependymschicht verbunden sind [115]. Es wird in einen Strang und einen Körper unterteilt, wobei der Körper aus einem rostralen und caudalen Anteil besteht und von dem *Liquor cerebrospinalis* zugewandten EZs, hier v.a. Tanyzyten, bedeckt ist [21, 115, 116]. Des Weiteren kann das SSO in eine Ependym-, eine Intermediär- und eine Basalschicht unterteilt werden [117]. Das Ependym verläuft dabei kontinuierlich, wobei die Ependymzellen / Tanyzyten apikal viele Mikrovilli und einzelne kurze Zilien aufweisen [21, 116]. Außerdem sind die Tanyzyten der einzige Zelltyp im SSO, welcher Kontakt zu den großen perivaskulären Räumen besitzt [115]. Die Tanyzyten sind mittels TJs und *Zonulae adhaerentes* miteinander verbunden und bilden so eine undurchlässige Barriere zwischen dem Parenchym des SSOs und der CSF der Ventrikel [115]. Die Oberfläche des SSOs ist sehr gleichmäßig; somit sind kaum supraependymale Strukturen zu finden [21]. Im Bereich der Strangregion hat jede EZ eine große apikale Oberfläche und nur selten sind Zilien bzw. Mikrovilli zu finden [116]. Im rostralen Anteil des Körpers besitzt jede EZ ein

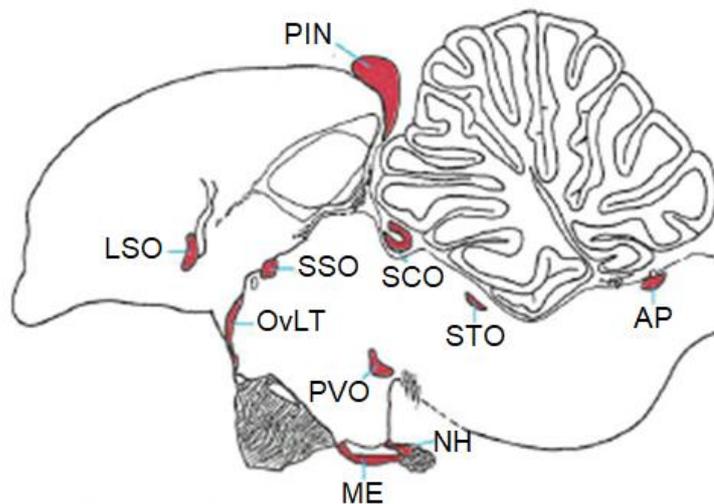
einzelnes kurzes Zilium und viele Mikrovilli, wohingegen sowohl die Anzahl an Zilien als auch an Mikrovilli im caudalen Anteil abnehmen [116]. Zusätzlich zeichnet sich der Körper des SSOs durch pinozytische Invaginationen einzelner Zellen und CSF-kontaktierende Axone auf seiner Oberfläche aus [116]. Die Intermediärschicht ist vor allem durch Neurone und Gliazellen sowie deren Fortsätze (Axone, Dendriten und Gliazellfortsätze) charakterisiert [117].

Das SSO des Vogels ist analog zum SFO der Säugetiere durch eine lecke BHS gekennzeichnet [118, 119]. Proteine, die typischerweise in Bereichen mit intakter BHS gefunden werden, sind im SSO nicht nachweisbar [118]. Zudem zeigt der Einsatz von *evans blue* bei der Ente nach systemischer Applikation in die Blutbahn, dass die BHS im SSO nicht überall gleich dicht bzw. leck ist [117, 119]. Im Blut zirkulierende Substanzen können demnach Neurone des SSOs vor allem im Bereich des zentralen Blutsinus, welcher der Ca entstammt, erreichen [119]. Außerdem kommt es zu einer Anreicherung des Albumin-gebundenen Farbstoffs *evans blue* in Arealen, die eine intakte BHS aufweisen. Ursache dafür ist die Aufnahme des Albumin-Farbstoff Komplexes im Bereich neuronaler Synapsen in Zonen des SSOs außerhalb der BHS, der retrograde axonale Transport des Komplexes und schließlich dessen Anreicherung in Perikaryen von Nervenzellen in Zonen des SSOs mit dichter BHS [119]. In caudalen Bereichen des SSOs ist die BHS stark ausgeprägt, wohingegen in distalen und dorsalen Arealen eine deutlich lecke BHS vorliegt [119]. Zudem ist das gesamte SSO von Fortsätzen glialer Zellen durchzogen, welche eine Schicht um die Blutgefäße bilden [115].

Neben Neuronen sind im SSO auch Astrozyten, Oligodendrozyten, Tanyzyten, Mikrogliazellen und ein weiterer, bisher nicht näher identifizierter Zelltyp zu finden [115]. Die Neurone, primär bilateral des Blutsinus gelegen, sind durch Polyribosomen, rER, große Golgi Apparate, Mitochondrien, Lysosomen und viele Vesikel gekennzeichnet [115]. Weiterhin wurden im SSO *gonadotropin-releasing hormone* und Neuropeptid Y positive Neurone detektiert [112, 120, 121]. Andere Arbeitsgruppen konnten die Existenz von *corticotropin-releasing hormone* (CRH), Vasotocin- und *brain-derived-neurotrophic factor* immunopositiven Neuronen für den NHpC nachweisen [122]. Des Weiteren wurden im SSO und im gesamten NHpC zahlreiche Neurone identifiziert, die immunopositiv für neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) sind, also dasjenige Enzym, welches den Gasotransmitter Stickstoffmonoxid

(NO) aus Arginin freisetzt [123]. Eine neuronale Kolo-kalisation von nNOS mit Vasotocin bzw. Aromatase konnte weder für das SSO noch für den NHpC nachgewiesen werden [124, 125].

Als sensorisch zirkumventrikulärem Organ werden dem SSO analog zum SFO der Säugetiere vor allem Funktionen im Rahmen der zentralen Kontrolle des Kreislaufsystems und des Salz- und Wasserhaushaltes zugeschrieben. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten die Expression spezifischer Rezeptoren in Neuronen und Gliazellen des SSOs nachweisen, welche zur Detektion im Blut zirkulierender Hormone im Rahmen der Kreislaufregulation dienen. So wurde die Expression des Vasotocin-1a Rezeptors (V1aR) [113, 126], zum Teil auch als Vasotocin-4 Rezeptor (VT4R) beschrieben [126], des Angiotensin-1 Rezeptors (AT<sub>1</sub>R) [113, 127], des Wasserkanals Aquaporin-4 (AQP4) [114], funktionell wirksamer Serotoninrezeptoren [128] und des *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) Rezeptors [113] für Neurone und Astrozyten des SSOs gezeigt. Die Expression dieser Rezeptoren unterstreicht die Rolle, die das SSO beim Vogel für die Homöostase wichtiger neuroendokriner und vegetativer Regelsysteme einzunehmen scheint.



**Abb. EIN 3: Lokalisation zirkumventrikulärer Organe des Vogelgehirns im Sagittalschnitt**

Dargestellt sind die zirkumventrikulären Organe (CVOs) des Vogelgehirns. Das *Organum septale laterale* (LSO), *Corpus pineale* (PIN), *Organum subseptale* (SSO), *Organum subcommissurale* (SCO), *Organum vasculosum laminae terminalis* (OvLT), *Organum subtrochleare* (STO), *Organum paraventriculare* (PVO), die *Area postrema* (AP), *Eminentia mediana* (ME) und Neurohypophyse (NH) in einem Sagittalschnitt des Vogelgehirns.

Modifiziert nach Kuenzel 1982

### 1.1.3 Afferente und efferente Konnektivitäten des Subfornikalorgans bzw. Subseptalorgans

Mit Hilfe zahlreicher neuroanatomischer Studien wurden für das *Organum subfornicale* mannigfaltige efferente und afferente Konnektivitäten im zentralen Nervensystem (ZNS) detektiert [20]. Dabei wurde die Methode des retro- bzw. anterograden *neuronal tracing* eingesetzt, bei welchem mit Hilfe stereotaktisch in bestimmte neurogliale Kerngebiete injizierter Substanzen die Konnektivität des jeweiligen Kerngebietes festgestellt werden kann [129]. Retrograde *tracer* sind unter anderem Meerrettichperoxidase, Cholera-toxin-B oder das Bartha-Virus [129]. Nach iontophoretischer Injektion werden diese Substanzen von der Synapse in den Zellkörper eines Neurons transportiert, wobei das Bartha-Virus Neurone überspringen, und somit mehrere Stufen einer Verbindung anzeigen kann [129]. Anterograd transportierte Substanzen sind z.B. radioaktiv markierte Aminosäuren oder Phaseolus-Lektin [129]. Sie werden nach Injektion vom Zellkörper zu den Synapsen transportiert [129]. Es wurden unter anderem efferente und afferente Verbindungen zwischen SFO und OvLT [20, 130], PVN [131, 132], MnPO [132, 133] sowie dem SON [132, 134] identifiziert.

Efferente axonale Projektionen vom SFO zum MnPO wurden vielfach beschrieben [20, 71, 72, 135–137] und für diese axonalen Projektionen wurde Angiotensin II (ANG II) als Neurotransmitter für die monosynaptische Verbindung charakterisiert [136]. Darüber hinaus wurden SON, PVN, *Nucleus circularis*, die präoptische Region (POA) und der laterale Hypothalamus (LH) als Zielgebiete efferenter Projektionen des SFOs beschrieben [20, 72]. Exzitatorische und inhibitorische efferente Fasern vom SFO zum PVN wurden ebenfalls nachgewiesen [20, 137–143]. Auch hier scheint ANG II als Neurotransmitter eine wichtige Rolle zu spielen [138]. Dabei ist diese efferente Konnektivität regionsspezifisch: das periphere SFO sendet efferente Fasern zum magnozellulären PVN, wohingegen zentrale SFO-Neurone axonal zum parvozellulären PVN projizieren [139]. Zudem scheint es durch Bildung von Axonkollateralen eine simultane efferente Projektion vom SFO zu MnPO und PVN zu geben [20, 137]. Weiterhin wurde gezeigt, dass das SFO über efferente Verbindungen zum SON mit ANG II als Neurotransmitter verfügt, und somit zur gesteigerten Sekretion von Vasopressin durch SON-intrinsische Neurone führt [20, 144–148]. Diese Konnektivität scheint zum einen direkt, zum anderen aber auch indirekt über synaptische Verschaltung im MnPO zu erfolgen [20, 146]. Neben diesen wichtigen effe-

renten Verbindungen des SFOs zu MnPO, OvLT, SON und PVN wurden zudem efferente Verbindungen vom SFO in die POA [20, 74, 135], zum NTS [132], zum medialen Septum [149, 150], zum *Nucleus* Edinger-Westphal [151], zu Zellen des anteroventralen dritten Ventrikels (AV3V) [135, 152], zum präfrontalen Kortex, zur *Substantia innominata*, *Zona incerta*, LH, *Nucleus striae terminalis* (BNTS), *Nucleus supra-rachiasmaticus* (SCN) [153], *Nuclei raphes* (NR) sowie zu periventrikulären Bereichen beschrieben [20, 74].

Afferente neuronale Verbindungen zum SFO wurden vor allem aus dem NTS nachgewiesen, welcher Informationen von peripheren Barorezeptoren u.a. direkt monosynaptisch zum SFO leitet [20, 141, 154–158]. Diese afferenten Axone und Synapsen der NTS-intrinsischen Neurone nutzen vorrangig Noradrenalin als Neurotransmitter [155]. Zudem scheint der *Nucleus parabrachialis* (PBN) am Übergang vom *Mesencephalon* zur POA als Relaisstation an der Weiterleitung der Barorezeptorinformation zum SFO beteiligt zu sein [159]. Eine weitere afferente Innervationsbahn zum SFO wurde aus dem MnPO detektiert [20, 160], wobei die Axone dieser Neurone kollaterale Verbindungen zum SON aufgewiesen haben [20]. Auch der ARC des posterioren Hypothalamus übermittelt Informationen an das SFO, wobei eine glutamaterge Stimulation des ARC ebenso wie eine Veränderung der NaCl oder ANG II Konzentration im Blut eine ARC-vermittelte Aktivierung von SFO-Neuronen zur Folge hatte [20, 140, 161, 162]. In der Literatur wurde zudem eine axonale Projektion aus dem PVN zum SFO beschrieben [160, 163, 164]. Von anderen Autoren wurde diese Verbindung jedoch kontrovers diskutiert [20]. Neben diesen wichtigen afferenten Konnektivitäten des SFOs erhält dieses auch Informationen aus anderen Strukturen des ZNS. Dabei wurden der SON [165], das OvLT [20], der *Nucleus triangularis* [166], die NR [20, 70], der caudale gigantozelluläre *Nucleus* der *Medulla* [20, 167], der LH [20, 168] und dorsochiasmatische Bereiche [169] beschrieben. Außerdem wurden Afferenzen aus dem Bereich des BNTS, *Nucleus periventricularis*, *Zona incerta*, *Nucleus reuniens*, *Nucleus tegmentalis*, *Substantia grisea periaquaeductalis* und der *Locus coeruleus* diskutiert [20].

Über die afferenten und efferenten Konnektivitäten des vogelspezifischen SSOs ist bislang wenig bekannt. Nachgewiesen werden konnten Faserverbindungen zwischen dem SSO und den Kerngebieten des PVN sowie SON [127, 170–172]. PVN und SON projizieren demnach axonal zum SSO [170], wobei neben vasotocinergen

auch cholinerge und serotinerge Fasern beschrieben wurden [115]. Andere Arbeitsgruppen haben nachgewiesen, dass eine Konnektivität zwischen dem SSO und dem magnozellular PVN (mPVN) besteht [127]. Vor allem Neurone, welche in der Nähe des zentralen Blutsinus liegen, projizieren demnach zum mPVN bzw. erhalten afferente Innervationsbahnen vom mPVN [127].

## **1.2 Physiologische Bedeutung des SFOs / SSOs als Zielstruktur für zirkulierende Botenstoffe oder Ionen**

### **1.2.1 Interaktion mit Botenstoffen des Immunsystems**

Dem *Organum subfornicale* der Säugetiere kommt möglicherweise eine wichtige Rolle im Rahmen der Manifestation zentral induzierter Krankheitssymptome zu, ausgelöst durch systemische oder lokale inflammatorische Prozesse [104, 107, 173]. Dabei führen bakterielle / virale Infektionen sowie Entzündungsvorgänge unterschiedlichster Genese einerseits zur Freisetzung mikrobieller Substanzen, sogenannter PAMPs, und bedingen andererseits eine Aktivierung des monozytären Immunzell-Systems mit Bildung proinflammatorischer Zytokine. Beide inflammatorischen Signale, also PAMPs und / oder Zytokine, können dabei im Bereich der sCVOs die lecke BHS überqueren und an neuro-gliale Rezeptoren z.B. des SFOs binden [174, 175]. So können bakterielle, zirkulierende PAMPs wie Lipopolysaccharid (LPS) eine direkte Aktivierung von SFO-Zellen über ihre Bindung an TLRs der Subtypen 2 und 4, sowie CD-14 Rezeptoren auslösen [104, 176–179]. Weiterhin wurde die Expression von Rezeptoren für bestimmte im Blut zirkulierende proinflammatorische Zytokine inklusive deren Rezeptoren für Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (IL1-R1) [179–184], IL-6 (IL-6R mit gp130) [104, 173, 185–187] und *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) (TNFR1, Subtyp p55) [104, 179, 188–190] nachgewiesen. Die Aktivierung der Zytokinrezeptoren IL-1R1, IL-6R und TNFR1 in Zellen des SFOs bewirkt dabei jeweils eine nukleäre Translokation bestimmter Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor interleukin-6* (NF-IL6) [191, 192], *nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells* (NF $\kappa$ B) [173, 184] und *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) [173, 185, 193–197]. Die intrinsische Expression der Zytokine IL-1 $\beta$  [198–203], IL-6 [176, 179, 186] und TNF $\alpha$  [104, 176, 203, 204] nach systemischer Applikation von LPS bei Ratten und Mäusen konnte im SFO ebenso nachgewiesen werden. Nachgeschaltete neuronale Projektionen vom SFO zu übergeordneten hypo-

thalamischen und medullären Kerngebieten wie dem PVN, NTS oder der POA aktivieren dabei u.a. die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse (HHN-Achse) und bewirken die Induktion von Fieber, Adipsie, Anorexie, verminderter Lokomotion und Lethargie (= *sickness behavior*) [104, 199, 205].

### **1.2.2 Interaktion mit Botenstoffen des Energiehaushalts**

Forschungsergebnisse der vergangenen Jahre haben deutlich gemacht, dass das SFO auch bei der zentralen Regulation des Energiehaushaltes (EH) durch die Erfassung im Blut zirkulierender Stoffwechselmetaboliten und Signalmoleküle mit Bedeutung für den EH eine Rolle spielt [206]. So führte eine elektrische Stimulation des SFOs bei gesättigten Ratten zu einer deutlichen Erhöhung der Futteraufnahme [8, 206, 207]. Neben den in *Kap. EIN 1.1.2* genannten Rezeptorproteinen für Signalmoleküle des EHs konnten im SFO auch Adiponektinrezeptoren (AdipoR1 und 2) und Rezeptorproteine für weitere Signalmoleküle (Endokannabinoide, *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) u.a.) nachgewiesen werden [8, 206, 208, 209]. Ein weiterer Hinweis für eine Funktion des SFOs in der Regulation des EHs war der Nachweis von Neuronen, welche direkt auf zirkulierende Glukose reagierten [8, 210]. Es wurde postuliert, dass die Aktivierung bestimmter Rezeptorproteine für GLP-1, Amylin oder CCK<sub>2</sub> in SFO-spezifischen Neuronen letztendlich zur Auslösung eines zentral medierten Sättigungsgefühls führt [211–213]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass das SFO die durch Adiponektine vermittelten Informationen an übergeordnete Zentren (u.a. PVN, ARC) zur Regulation des Energiehaushaltes weiterleitet [208].

### **1.2.3 Interaktion mit Elektrolyten des systemischen extrazellulären Flüssigkeitsraumes**

Aufgrund der speziellen Beschaffenheit und Lage des SFOs mit seiner lecken Blut-Hirn Schranke ist dieses in der *Lamina terminalis* gelegene Kerngebiet befähigt, die Osmolalität und ionale Zusammensetzung im Plasma des perfundierenden Blutstroms zu erfassen [214]. Eine Erhöhung der Natriumkonzentration ( $[Na^+]$ ) bzw. der Osmolalität in der Extrazellulärflüssigkeit (EZF) ( $\geq 1 - 2 \%$ ) des Organismus bewirkt dabei eine auf der Aktivierung vorrangig SFO-intrinsischer Zellen beruhende gesteigerte Trinkwasseraufnahme und neurohypophysäre Freisetzung von antidiuretischem Hormon (ADH) mit nachfolgender renaler Antidiurese [215, 216].

Die Bedeutung sensorischer CVOs, vor allem des SFOs, wurde dabei in zahlreichen Läsionsversuchen nachgewiesen. Frühe Studien, in welchen Läsionen im Bereich des SFOs beim Schaf, Hund und der Ratte durchgeführt wurden, wiesen auf die sensorische Bedeutung des SFOs für die hypothalamische Kontrolle des Salz- und Wasserhaushaltes hin [20, 214, 217–219]. Dehydratation, NaCl-Beladung oder Hypovolämie im intakten Tier bewirkten eine Aktivierung zahlreicher SFO-intrinsischer Neurone, welches sich durch die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors *Fos* nachweisen ließ [96, 220–222]. Nachfolgend konnte mittels retrogradem *tracing* demonstriert werden, dass die aktivierten Nervenzellen des SFOs die perzipierten Informationen axonal zum PVN respektive MnPO als übergeordnete hypothalamische Regler des Salz- und Wasserhaushaltes transferierten [223, 224]. Eine hypertone Aktivierung von SFO-intrinsischen Neuronen bewirkte zudem eine vermehrte ADH-Freisetzung durch monosynaptische Verschaltungen dieser Neurone zu magnozellulären SON- bzw. PVN-Neuronen [214, 215, 225, 226]. Des Weiteren konnte mit Hilfe elektrophysiologischer *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen die ausgeprägte Osmo- und Natriumsensitivität SFO-intrinsischer Neurone auf Einzelzellniveau bestätigt werden [214, 215, 220, 227–232].

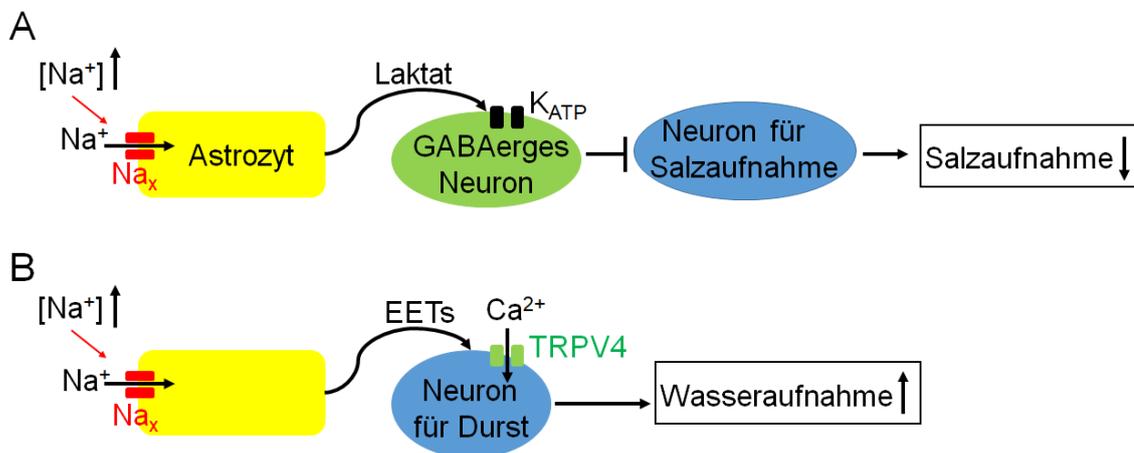
Das SFO betreffend werden vor allem zwei sensorische zelluläre Mechanismen zur Perzeption und Transduktion des hypertonen Stimulus in der Fachliteratur diskutiert. Im Parenchym des SFOs wurden einerseits sogenannte *transient receptor potential vanilloid* (TRPV) Kanäle, welche permeabel für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> sind, detektiert. TRPV-Kanäle repräsentieren ionotrope Rezeptoren, die durch eine Vielzahl von Stimuli, unter anderem Veränderungen der Osmolalität der EZF, aktiviert werden können. Von diesen Rezeptoren wurden für Neurone des SFOs die Varianten TRPV1, TRPV4 sowie eine N-terminal verkürzte Splice-Variante des TRPV1 ( $\Delta$ N-TRPV1) identifiziert und für die Osmo- bzw. Natriumsensitivität SFO-intrinsischer Zellen verantwortlich gemacht [215, 227, 233–237]. Durch Hypertonizität (z.B. durch Dehydratation) der EZF kommt es zum Flüssigkeitsverlust durch membrandurchspannende Aquaporine und dadurch bedingt zum Schrumpfen der sensorischen Zellen im SFO, welches durch Veränderungen des intrazellulären mikrotubulären Netzwerkes bedingt ist [232, 236–239]. Diese Reduktion des Zellvolumens ist das auslösende Signal für die Aktivierung der TRPV Kanäle, welche sich durch Veränderungen im Zytoskelett der Neurone öffnen und einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom bewirken [232, 236]. Der Ca<sup>2+</sup>-

Einstrom in osmosensitive Neurone des SFOs bewirkt eine Depolarisation derselben. Die nachfolgende neuronale Aktivierung übergeordneter hypothalamischer Kerngebiete führte dann zur gesteigerten Wasseraufnahme und ADH-Freisetzung [232, 233, 236]. Es wird angenommen, dass TRPV1 Kanäle Veränderungen der Osmolalität in den hypertonen und TRPV4 Kanäle in den hypotonen Bereich detektieren [215, 233]. Der  $\Delta N$ -TRPV1 Rezeptor scheint in der Lage zu sein, neben Veränderungen der Osmolalität auch Veränderungen der Körperkerntemperatur zu messen [237]. Auch Komplexbildungen zwischen Aquaporin-4 und dem TRPV4 Kanal wurden beschrieben [240].

Die Expression eines atypischen, teilweise spannungsabhängigen Natriumkanals ( $Na_x$ -Kanal) vor allem in Astrozyten und Ependymzellen, aber auch teilweise in Neuronen [95, 241, 242] des SFOs, stellt einen zweiten zellulären Mechanismus für die Perzeption der extrazellulären Natriumkonzentration dar [95, 216, 236, 242–248]. Der  $Na_x$ -Kanal wurde vor allem in den Fortsätzen von Astrozyten und Ependymzellen, welche GABAerge Neurone des sensorischen SFOs umgeben, gefunden [242, 245]. Bei einer Erhöhung der extrazellulären  $Na^+$ -Konzentration kommt es zur Öffnung des  $Na_x$ -Kanals und damit verbunden zum Einstrom von  $Na^+$  in die SFO-spezifischen Gliazellen (*Abb. EIN 4*) [245–247]. Die Sensitivität des  $Na_x$ -Kanals alleine scheint jedoch nicht hoch genug zu sein, um eine Änderung der extrazellulären  $[Na^+]$  zu messen, welche nur knapp unter- oder oberhalb physiologischer Werte (135 – 145 mM / L) liegt [245–247]. Es wird vermutet, dass zum einen zirkulierendes, zum anderen SFO-intrinsisches Endothelin-3 (ET-3) an der erforderlichen Erhöhung der Sensitivität des  $Na_x$ -Kanals beteiligt ist [245–247, 249]. ET-3 bindet dabei an seinen Rezeptor (Endothelinrezeptor B), welcher im SFO mannigfaltig exprimiert wird [250], und steigert so die Sensitivität des  $Na_x$ -Kanals für Natrium. Die Carboxylgruppe des  $Na_x$ -Kanals ist an die Natrium-Kalium ATPase ( $Na^+K^+$ -ATPase) gekoppelt. Bei Aktivierung des  $Na_x$ -Kanals kommt es neben dem Einstrom von  $Na^+$  auch zum vermehrten Einstrom von Glukose in die Zelle und somit zur Stimulation der anaeroben Glykolyse [245, 251]. Dadurch werden vermehrt Laktat und Epoxyeicosatriensäure (EET) gebildet und mittels eines Monocarboxylat-Transporters 4 (MCT-4) an die Neurone abgegeben (*Abb. EIN 4*) [245, 252]. Laktat dient den Neuronen als Nährstoff für die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP). Gesteigerte ATP Spiegel innerhalb der Neurone bewirken eine Inaktivierung des ATP-sensitiven Kaliumkanals ( $K_{ATP}$ ) und dadurch die Depolarisation GABAerger Neurone [245, 251], die daraufhin

Neurone hemmen, welche die Salzaufnahme regulieren (Abb. EIN 4 A) [245–247]. EET bewirkt nach Abgabe an die Neurone die Öffnung von TRPV4 Kanälen und somit einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Neurone, welche daraufhin depolarisieren und letztlich eine forcierte Trinkwasseraufnahme bewirken (Abb. EIN 4 B) [245, 246, 253].

Neben diesen beiden wichtigen molekularen Mechanismen der Osmo- und Natriumsensitivität werden noch andere Rezeptoren im Bereich des SFOs bzw. des gesamten ZNS als wichtige Messfühler zur Regulation des Salz- und Wasserhaushalts diskutiert. Dazu gehören z.B. andere nicht-selektive Kationen-Kanäle (NALCN) [254] und epitheliale Natriumkanäle (ENaCs), welche in Astrozyten und Neuronen des SFOs detektiert wurden, und deren Aktivierung zu einer nukleären Translokation von Fos führte [222, 255].



**Abb. EIN 4: Mechanismus der Na<sup>+</sup>-Detektion und Kontrolle von Salz- und Wasseraufnahme**

(A) Na<sub>x</sub>-Kanäle auf Astrozyten / Ependymzellen detektieren eine Hypernatriämie. Infolge dessen kommt es, durch Öffnung der Na<sub>x</sub>- Kanäle, zum Einstrom von Na<sup>+</sup> und zur Aktivierung der anaeroben Glykolyse, welche zur Bildung von Laktat führt. Laktat wird an GABAerge Neurone abgegeben und dient dort zu Bildung von ATP. Erhöhte ATP Spiegel innerhalb dieser Neurone führen zu einer Inaktivierung ATP-sensitiver Kaliumkanäle (K<sub>ATP</sub>) und somit zur Depolarisation der GABAergen Neurone, welche daraufhin zentral die Salzaufnahme hemmen.

(B) Hypernatriämie führt außerdem zur Bildung von Epoxyeicosatriensäure (EETs) in Astrozyten / Ependymzellen. Die Abgabe von EETs an Durst-regulierende Neurone bewirkt die Öffnung von TRPV4-Kanälen und einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in selbige. Dadurch kommt es zur Depolarisation der Neurone und zur gesteigerten Trinkwasseraufnahme.

#### 1.2.4 Interaktion mit Hormonen für Kreislauf- und Volumenregulation

Änderungen der extrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration gehen oft einher mit Veränderungen des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens (EZFV). Neurone und / oder Gliazellen des *Organum subfornicale* sind in der Lage, neben der Konzentration zirkulierender Elektrolyte (Kap. EIN 1.2.3) auch Konzentrationen an Hormonen für die Kreislauf-

und Volumenregulation im Blutplasma zu detektieren [20]. Kommt es im Gesamtorganismus zu einer extrazellulären Hypovolämie, Hyponatriämie oder Hypotension des arteriellen Blutdrucks, so wird das Renin-Angiotensin System (RAS) aktiviert, welches als endokriner Regulationsmechanismus zur Konstanterhaltung, Adaptation oder Normalisierung des Plasmavolumens, der Plasmaosmolarität und des Blutdrucks dient [256] (*Abb. EIN 5*). Zur Aktivierung des RAS werden Hyponatriämie und sinkender Blutdruck u.a. von Pressorsensoren im Bereich der *Vasa afferentia* der Nierenglomerula sowie Natriumsensoren im Bereich der jeweiligen *Maculae densae* in der Niere gemessen [257, 258]. Daraufhin kommt es zur vermehrten Bildung der Aspartyl-Protease Renin aus Prorenin [259] in modifizierten glatten Muskelzellen, sogenannten granulierten Endotheloidzellen, der *Vasa afferentia* der juxtaglomerulären Apparate der Niere [257, 258] (*Abb. EIN 5*). Renin besteht aus zwei Polypeptidketten, welche mittels einer Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [260] und besitzt seine höchste Aktivität, anders als andere Aspartyl-Proteasen, bei neutralem pH-Wert. Renin bewirkt im Blut die N-terminale Abspaltung des Dekapeptids Angiotensin I (ANG I) vom in der Leber durch Abspaltung von 24 Aminosäuren aus Proangiotensinogen gebildeten, gespeicherten und kontinuierlich an die Blutbahn abgegebenen  $\alpha$ 2-Globulin Angiotensinogen (Aogen) [256–258, 261] (*Abb. EIN 5*).

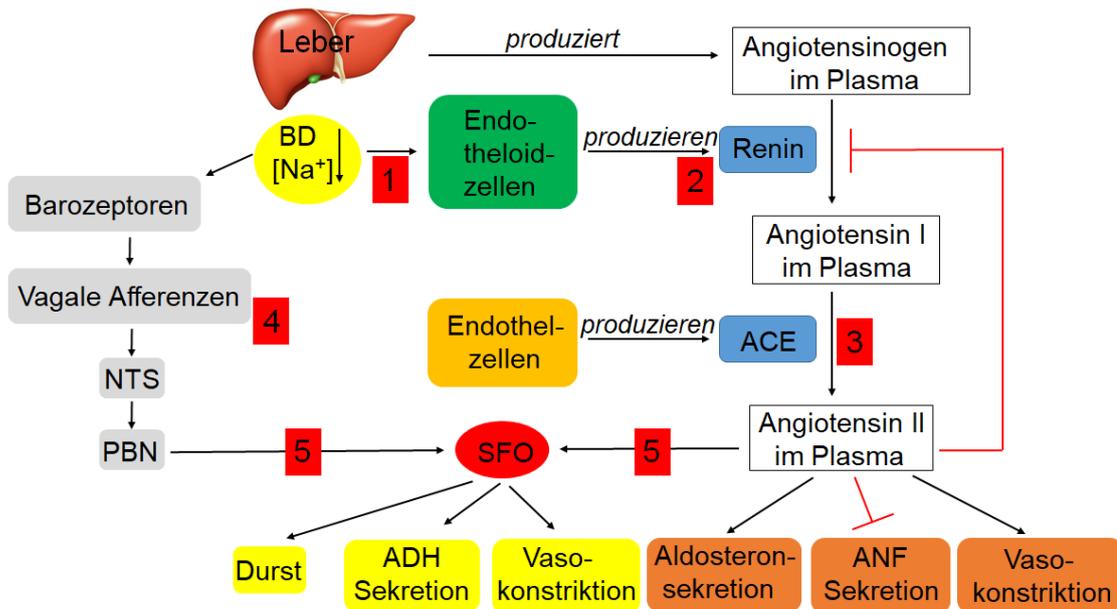
Vorrangig endothelial lokalisiertes *angiotensin-converting enzyme* (ACE) [262], eine Dipeptidyl-Peptidase, spaltet von ANG I das Dipeptid Histidyl-Leucin ab und bildet so in der Blutbahn das Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) als physiologisch aktive hormonale Komponente des RAS [256–258] (*Abb. EIN 5*). Bei der ACE werden die Subtypen 1 und 2 unterschieden [263], wobei ACE1 das klassische Enzym mit zwei katalytischen Regionen, am Carboxyl- und am Aminoende, darstellt. ACE2 hingegen besitzt nur eine katalytisch aktive Region und trägt nicht zur ANG II Bildung, sondern zur Bildung von Angiotensin (1-7), bei [263]. Das gebildete ANG II hat eine Halbwertszeit von lediglich drei Minuten und wird durch die Aminopeptidasen A und N zu Angiotensin III und IV umgewandelt [256, 264]. Peripher zirkulierendes ANG II hemmt zum einen direkt die Reninfreisetzung in der Niere, zum anderen fördert es die Freisetzung von Vasopressin (AVP=ADH), welches seinerseits wiederum die Renin-Ausschüttung hemmt. Außerdem kommt es durch steigendes Plasmavolumen zur Bildung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) in den Vorhöfen des Herzens, welches ebenfalls die Renin-Freisetzung hemmt.

Im Blut zirkulierendes ANG II bindet an die Angiotensin-Rezeptoren 1 und 2 (AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R), wobei die meisten physiologischen Eigenschaften des ANG II durch AT<sub>1</sub>R vermittelt werden [265, 266]. Bei der Ratte wird AT<sub>1</sub>R zudem in die Subtypen A und B (AT<sub>1A</sub>R und AT<sub>1B</sub>R) unterteilt [265, 267]. AT<sub>1</sub>R wurde im adulten Organismus in vielen Organen wie Herz, Gefäßen, Niere, Lunge, Leber, Plazenta, Blase, Gastro-Intestinal-Trakt und Gehirn nachgewiesen, wohingegen AT<sub>2</sub>R vor allem in fetalem Gewebe, und in Geweben adulter Tiere lediglich in wenigen Organen wie etwa dem Gehirn detektiert wurde [265]. Beim AT<sub>1</sub>R handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, welcher bei Bindung von ANG II eine Phospholipase C (PLC) aktiviert, die wiederum eine Phosphatidylhydrolyse und somit die Bildung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) bewirkt [257, 258]. Das IP<sub>3</sub> führt dabei durch intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus dem ER zur Vasokonstriktion sowie zur Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde (NNR). DAG hat eine direkte vasokonstriktorische Wirkung. Zudem kann die Bindung von ANG II an den AT<sub>1</sub>R eine Tyrosinkinase aktivieren mit anschließender Induktion der RAS-/RAF-/MAPK- (*mitogen activated protein kinase*) Kaskade sowie die nukleäre Translokation von MAPK [268]. Neben den beiden detailliert untersuchten Rezeptoren AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R wurde auch ein Angiotensin-Rezeptor 4 (AT<sub>4</sub>R) nachgewiesen, welcher allerdings keinen G-Protein gekoppelten Rezeptor darstellt und mit Vasodilatation in Verbindung gebracht wird [269].

Zellen der sensorischen CVOs sind durch ihre lecke endotheliale BHS in der Lage, die Konzentration an zirkulierendem ANG II direkt zu messen, welches bei extrazellulärer Hypovolämie oder Hyponatriämie, sowie Hypotension des arteriellen Blutdrucks vermehrt gebildet wird [20, 270, 271]. Im Gehirn wurde für die Detektion von zirkulierendem ANG II vor allem der AT<sub>1A</sub>R nachgewiesen [272], und Ablations- sowie Mikroapplikationsstudien *in vivo*, elektrophysiologische Untersuchungen und Radiozeptor-Assays *in vitro* zeigten, dass zirkulierendes ANG II dabei in erster Linie mit Zellen des SFOs und OvLTs interagiert [20, 273–276]. Diese Interaktion bewirkte eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors *Fos* in Neuronen des SFOs [277] und somit eine Aktivierung dieser Neurone. Dadurch kam es zu einer Verstärkung neuronaler Signalwege, welche die Wasser- und Salzaufnahme sowie den Blutdruck regulieren [278–281]. Rezeptoren für ANG II wurden im SFO in erster Linie in der ventromedialen Kernregion sowie abgeschwächt im Bereich des *anulus* identifiziert [50, 88, 282].

Neben der hormonal durch ANG II afferent über die Blutbahn übertragenen Informationen erhält das SFO auch Informationen über Hypovolämie, Hyponatriämie und Hypotension mittels afferenter Nervenbahnen (*Kap. EIN 4.2*). Volumensensoren im Bereich der *Vena cava*, der Vorhöfe des Herzens und der Leber, sowie Pressorsensoren des Aortenbogens und der *Bifurcatio* der *Arteria carotis* vermitteln dabei Informationen zum Status des Blutdrucks bzw. intravasalen Volumens mittels vagaler Afferenzen an den NTS [224, 283–286] (*Abb. EIN 5*). Diese neuronalen Signale werden weiterhin über den PBN [159] mittels noradrenerger Afferenzen disynaptisch an das SFO übermittelt [20, 141, 154, 157, 158, 287] (*Abb. EIN 5*). Sowohl die hormonelle (zirkulierendes ANG II) als auch die afferente neuronale (*Nervus vagus*) Übertragung von Informationen bei Hypovolämie führen zentralnervös zu einer vermehrten Sekretion von ADH, einer Aktivierung des  $\alpha$ 1-adrenergen (Vasokonstriktion) sowie  $\beta$ 1-adrenergen (Freisetzung von Renin) Sympathikus mit folgerichtiger Erhöhung des arteriellen Druckes [257, 258]. Die neuronale Verschaltung von aktivierten SFO-Neuronen aus den lateralen und ventralen Anteilen (Schale) zu Neuronen des MnPO, PVN, SON und medullären Kerngebieten induziert letztlich die ADH-Sekretion, das Durstempfinden und die Regulation des Blutdrucks [217, 230, 282, 288, 289]. Aktivierte Neurone im ventromedialen Kern des SFOs mit Projektionen zum *Nucleus striae terminalis* (BNTS) sind hingegen an vermehrter Salzaufnahme zum Ausgleich einer Hyponatriämie beteiligt [290].

Es lässt sich somit konstatieren, dass zum einen die durch zirkulierendes ANG II vermittelte Aktivierung von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren im SFO und zum anderen die afferente Innervation des SFOs über den NTS zu (1) einer gesteigerten ADH-Sekretion aus der Neurohypophyse mit anschließender Flüssigkeitsretention in der Niere, (2) einer  $\alpha$ 1-adrenergen Sympathikusaktivierung mit folgerichtiger Vasokonstriktion und (3) dem Auslösen von Durstempfinden und damit letztendlich einer Rekonstitution des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und des Kreislaufsystems führen.



**Abb. EIN 5: Das Renin-Angiotensin System und seine Interaktion mit dem SFO**

Dargestellt sind das Renin-Angiotensin System (RAS) und seine Interaktion mit dem SFO als sensorisches zirkumventrikuläres Organ. Die Leber produziert, speichert und sezerniert Angiotensinogen (Aogen) in die Blutbahn. Im Falle einer Hypovolämie, Hyponatriämie bzw. eines Blutdruck (BD)-Abfalls (1) werden granulierte Endotheloidzellen in der Niere zur Produktion von Renin angeregt, welches von Aogen das Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) abspaltet (2). ANG I wird durch das endothelial lokalisierte *angiotensin-converting enzyme* (ACE) in physiologisch aktives Angiotensin II (ANG II) umgewandelt (3). Im Blut zirkulierendes ANG II bewirkt eine vermehrte Aldosteronsekretion und Vasokonstriktion, zudem vermindert es die Sekretion von atrialem natriuretischem Faktor (ANF) und trägt so zur Steigerung des Blutdrucks bei. Hypovolämie wird außerdem durch Barorezeptoren detektiert und die Informationen mittels vagaler Afferenzen über den *Nucleus tractus solitarius* (NTS) und *Nucleus parabrachialis* (PBN) (4) an das SFO übermittelt (5). Zirkulierendes ANG II bindet an  $AT_1$ -Rezeptoren im SFO (5), und sowohl hormonale als auch vagal afferente Signale bewirken eine SFO-medierte Sekretion von antidiuretischem Hormon (ADH), Vasokonstriktion und Steigerung des Durstempfindens.

Hinsichtlich des peripheren, zirkulierenden RAS bei Vögeln ließ sich granulär gespeichertes Renin analog zum Säugetier ebenfalls im Bereich der afferenten Arteriolen der renalen Glomerula nachweisen [291]. Mittels Radioimmunoassay konnte eine ANG I bildende Aktivität, also Renin oder ein Renin-ähnliches Enzym, im Plasma detektiert werden, wobei dessen Biosynthese von der Aktivität der Barorezeptoren, der extrazellulären NaCl Konzentration und humoralen Faktoren abhängig war [291, 292]. Des Weiteren wurde die Klonierung der cDNAs für vogelspezifisches Renin, Aogen und ACE aus embryonalem Nierengewebe beschrieben [293]. Auch die biochemische Aktivität eines ACE-ähnlichen Enzyms, welches sich allerdings von dem der Säugetiere unterscheidet, konnte für Lunge, Gefäßsystem und Gehirn des Huhnes nachgewiesen werden [294–297]. Weiterhin unterscheidet sich die Aminosäurezusammensetzung des ANG I bei Vögeln signifikant von derjenigen der Säugetiere

insofern, als in Position 1 Aspartat (Asp) durch Asparagin (Asn), in Position 5 Isoleucin (Ile) durch Valin (Val) und in Position 9 Histidin (His) durch Serin (Ser) ersetzt wird [291, 298–301].

Ein vogelspezifischer ANG II Rezeptor (cATR) wurde bereits am 14. Tag der Embryonalentwicklung mittels PCR in der Urniere, der Allantois, dem Herzen und dem Branchialbogen des Huhns nachgewiesen [302]. Auch bei adulten Hühnern war die Expression des cATRs in Niere, Nebenniere, Gefäßendothel und *Adventitia* der *Aorta* nachweisbar, wobei Inhibitoren der AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R des Säugetiers die durch ANG II ausgelösten physiologischen Effekte wie Trinkwasseraufnahme und Natrium Retention nicht zu hemmen vermochten [297, 303, 304]. Vergleichbar zur Situation beim Säugetier (Ratte) führte auch eine Aktivierung des cATR beim Huhn zu einer IP<sub>3</sub>-medierten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation, wobei auch Signalwege ohne die Mobilisation von Ca<sup>2+</sup> beschrieben wurden [291].

Im Unterschied zu Säugetieren stellte neben einer Hypovolämie (Dehydratation, Blutverlust) der EZF auch deren Hyper- (und nicht Hypo-) natriämie einen wichtigen Stimulus zur Aktivierung des aviären RAS dar [291, 305–309]. Erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem ANG II führten bei Vögeln (Taube, Ente, Wachtel, Huhn) jedoch nicht zu einer gesteigerten ADH-Sekretion aus der Neurohypophyse wie bei Säugetieren, induzierte aber andererseits die adrenale Aldosteronfreisetzung sowie ein erhöhtes Durstgefühl mit nachfolgender Trinkwasseraufnahme [291, 305, 310–315]. Zudem reduzierte zirkulierendes ANG II bei an Salzwasser adaptierten Enten, welche - wie marine Vogelspezies - mit supraorbitalen Salzdrüsen ausgestattet sind, die Ausscheidung eines hypertonen, NaCl-reichen glandulären Sekrets [311, 316]. Die Bedeutung von zirkulierendem ANG II für die periphere Vasokonstriktion wird bei Vögeln hingegen kontrovers diskutiert. So hatte eine systemische Applikation von ANG II bei Huhn und Ente nahezu keine, bei der Taube eine hypertone und bei Wachteln eine biphasische Blutdruckantwort zur Folge [291, 297, 304, 305, 310, 311, 317]. Zirkulierendes ANG II agiert dabei zentral vor allem über das dem SFO des Säugetiers analoge *Organum subseptale* (SSO) und nicht dem OvLT [119, 318]. Dies wurde durch eine Vielzahl an Mikroapplikations- und Ablationsstudien *in vivo*, sowie elektrophysiologischen Untersuchungen *in vitro* nachgewiesen [309, 319–323]. Innerhalb des SSOs konnte mittels Rezeptorautoradiographie die Bindung von radioaktivem, vogelspezifischem ANG II an seine membranständigen Rezeptorproteine dargestellt werden [324–326]. Final führt die Bindung von zirkulierendem ANG

II an Rezeptoren im Bereich des SSOs zu einem gesteigerten Durstgefühl, zur Sympathikusaktivierung und zur Hemmung der supraorbitalen Salzdrüsen (Salzwasser adaptierte bzw. marine Vögel) [327–330].

### 1.3 Das SFO- / SSO-intrinsische Renin-Angiotensin System

#### 1.3.1 Gewebsspezifische Renin-Angiotensin Systeme des Säugetiers und Vogels

Neben dem zirkulierenden Renin-Angiotensin System (*Kap. EIN 1.2.4*) existieren lokale gewebsspezifische RAS. Viele Organe und Gewebe wie z.B. Niere, Herz, Nebenniere, Fettgewebe, Knochenmark, Leber, Pankreas, Zwischenwirbelscheiben, Retina, Nebenhoden, Gefäßwand und sogar intrazelluläre Organellen weisen zumindest Teilkomponenten eines auto- / parakrinen RAS auf [291, 331–335]. Besonders detailliert charakterisiert wurden lokale RAS für Niere, Herz, Nebenniere und Fettgewebe.

In der Niere wurde lokal gebildetes Aogen in Zellen des proximalen Tubulus detektiert, während zirkulierendes Aogen aus der Leber die Hauptquelle für die Bildung von ANG I durch auf der Bürstensaummembran bzw. intrazellulär lokalisiertes Renin von Zellen des proximalen Tubulus zu sein scheint [331, 336–339]. ANG I wird durch auf Endothelzellen lokalisiertes ACE zu aktivem ANG II konvertiert, welches durch Epithelzellen der Nierentubuli in das Lumen der Nephrone abgegeben wird [331, 336] und an AT<sub>1</sub>R in der luminalen Zellmembran bindet [331]. Das lokale RAS der Niere ist von Bedeutung für die Regulation der Nierendurchblutung, der glomerulären Filtration sowie der tubulären Na<sup>+</sup>-Resorption [331, 336].

Im Herz wurde Aogen in Kardiomyozyten (KMZ) und Fibroblasten detektiert, wobei v.a. durch zellulär aufgenommenes, zirkulierendes Renin das Dekapeptid ANG I abgespalten wird. Renin ist jedoch auch lokal in KMZs nachweisbar [331, 340]. Die ANG II Bildung mittels in Endothelzellen und Fibroblasten detektierter (Immunzytochemie) ACE aus ANG I erfolgt extrazellulär im Interstitium oder auf Zelloberflächen [331, 340–342]. Des Weiteren kann ANG II auch direkt durch Cathepsine, Chymasen oder Tonin aus Aogen gebildet werden [331]. AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R wurden ebenfalls in KMZs detektiert und die Aktivierung dieser Rezeptoren durch lokal gebildetes ANG II zeigte einen positiv inotropen und hypertrophen Effekt auf die KMZs [331]. Sowohl

für Niere als auch Herz wurden neben dem gewebsspezifischen RAS auch Komponenten eines intrazellulären RAS in Mitochondrien, dem Zellkern und im Zytoplasma beschrieben [331, 336, 343–346].

In der Nebenniere konnte Aogen in Fibroblasten und zytoplasmatischen Vesikeln der adrenocorticalen Zellen nachgewiesen werden [331]. Ein Renin-ähnliches Enzym in der Nebennierenrinde spaltet ANG I vom Aogen ab, welches dann durch die ACE aus NNR und Nebennierenmark (NNM) zu ANG II umgewandelt wird und seine Wirkung am AT<sub>1</sub>R im NNM oder am AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R in der NNR entfaltet [331]. In Adipozyten des Fettgewebes konnten neben lokalem Aogen und ANG II, welches vermutlich durch Chymasen und Cathepsine gebildet wird, auch alle anderen Komponenten des RAS identifiziert werden [336, 347]. Das lokale RAS übernimmt hier wichtige auto- / parakrine Funktionen in der Lipogenese, Lipolyse oder Adipogenese und trägt somit zu Fettleibigkeits-bedingter Hypertension bei [336, 347, 348]. Weiterhin wurden RAS mitunter detailliert in hämatopoetischen Organen wie dem Knochenmark, aber auch in Leber, Pankreas, Retina, Zwischenwirbelscheiben, Nebenhoden und Gefäßwänden beschrieben [331, 336, 340, 349–351].

Den Vogel betreffend konnten gewebsspezifische Komponenten eines RAS zum einen im Dottersack, zum anderen im Herzen von Hühnerembryonen nachgewiesen werden [293, 352]. Im Dottersack wurde ein enzymatisch aktives ACE im Endoderm mit Kontakt zu sogenannten Blutinseln im Mesoderm demonstriert [293]. Auch Aogen, Renin und ANG II spezifische Rezeptoren wurden in unmittelbarer Nähe dieser Blutinseln detektiert und es wird vermutet, dass das hier vorhandene gewebsspezifische RAS die embryonale Erythropoese moduliert [293]. Für das Herz von Hühnerembryonen erfolgte ein Nachweis von Aogen und Renin in den beiden Vorhöfen [352].

### **1.3.2 Hinweise auf ein Gehirn-, respektive Hypothalamus-, respektive SFO- / SSO-intrinsisches Renin-Angiotensin System**

Neben den in *Kap. EIN 1.3.1* erwähnten intrinsischen RAS peripherer Organe gibt es in der Fachliteratur auch zahlreiche Hinweise auf ein Gehirn-intrinsisches RAS [353–361], welches im Folgenden detailliert dargestellt wird. Alle Komponenten des klassischen RAS (Renin, Aogen, ACE, ANG I und II sowie Angiotensin-Rezeptoren) wurden für das Gehirn-intrinsische RAS des Säugetiers nachgewiesen [353–355, 357–362]. Neuro-gliale Strukturen mit besonderer Bedeutung für die Homöostase

der Extrazellulärflüssigkeit und des Kreislaufsystems, welche die Achse SFO → MnPO → PVN / SON → *Medulla oblongata* (Kap. EIN 1.1.3) bilden, standen und stehen dabei im Vordergrund [20, 361, 363]. Sensorische zirkumventrikuläre Organe (sCVOs) wie das SFO dienen dabei vor allem wegen der Durchlässigkeit ihrer BHS (Kap. EIN 1.1.2) als Bindeglied zwischen dem zirkulierenden und zentralen RAS [357, 358]. Zentral, meist intraventrikulär, appliziertes ANG II führte zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks, zu gesteigerter Trinkwasseraufnahme und forcierter ADH-Freisetzung aus der Neurohypophyse [357, 364–368]. Das intracerebroventrikuläre (i.c.v.) ANG II aktiviert vermutlich Neurone im Bereich des MnPO aufgrund der lecken ependymalen Barriere zwischen Gehirnparenchym und *Liquor cerebrospinalis*. Der MnPO der *Lamina terminalis* leitet die perzipierte Information mittels ebenfalls angiotensinergener Neurone an den parvo- und teilweise auch den magnozellulären PVN und SON weiter. Die aktivierten magnozellulären Neurone beider Kerngebiete veranlassen infolgedessen eine gesteigerte ADH-Sekretion, wohingegen die parvozellulären Neurone des PVN mono- oder disynaptisch eine neuronale Aktivierung der rostro-ventrolateralen Medulla (RVLM) induzieren, welche daraufhin einen gesteigerten Sympathikustonus mit nachfolgender peripherer Vasokonstriktion auslöst [357, 368]. Die zentrale Aktivierung des Sympathikus hat weiterhin Auswirkungen auf die Niere (Renin-Sekretion, Na<sup>+</sup>-Exkretion) und die orale Salzaufnahme („Salzhunger“). Zentrale Effekte im Bereich des Hypothalamus umfassen außerdem Auswirkungen auf den Na<sup>+</sup>-Appetit, die Körpertemperatur und Mechanismen der Durstausrösung [357]. Zudem wird das Gehirn-intrinsische RAS auch als auto- / parakrines System beschrieben, in welchem alle Komponenten eines RAS vorhanden sind, die durch verschiedene Zelltypen produziert bzw. freigesetzt werden. Die Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen [359].

Aogen wird in Strukturen des Hypothalamus, Thalamus und limbischen Systems, des *Mesencephalon*, der *Medulla oblongata* und des *Cerebellum* exprimiert [335, 353, 362, 369–376]. Den wichtigsten Zelltyp für die Biosynthese und Freisetzung von Aogen in den Extrazellulärraum der jeweiligen Gehirnregion scheinen dabei die Astrozyten darzustellen [335, 353, 355, 357, 359, 365, 374, 376–384]. Die astrozytäre Biosynthese des Aogens wurde vor allem bei der Ratte mittels *in situ* Hybridisierung auf mRNA-Ebene festgestellt. Bei Mäusen hingegen, welche ein Transgen für hu-

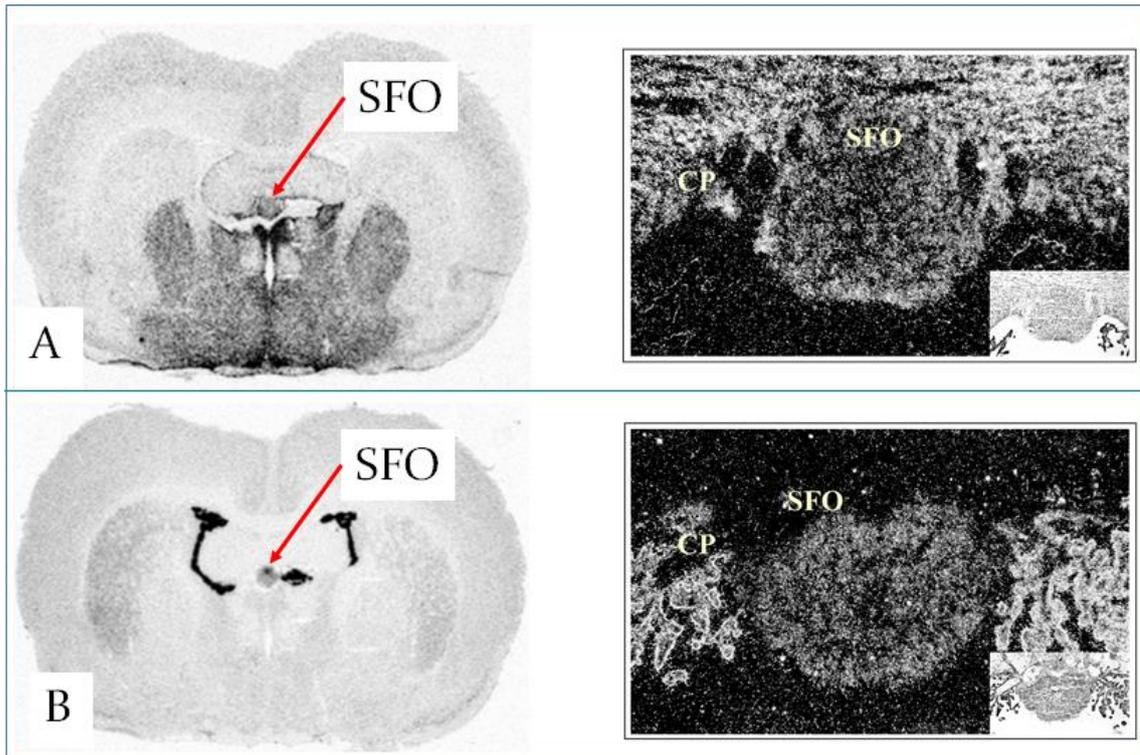
manes Aogen trugen, konnte humanspezifische Aogen mRNA auch in einigen Neuronen des SFOs, bzw. als Protein in Neuronen des SONs nachgewiesen werden [369, 375–377, 381, 384]. Die genetische Ablation des Aogen-Gens bei Mäusen verminderte den durch zentrale Renin-Applikation ausgelösten Druckanstieg im arteriellen Gefäßsystem und lieferte somit eine funktionelle Expression von Gehirn-intrinsischem Aogen [385].

Die CVOs und andere hypothalamische Kerngebiete mit partiell leerer BHS betreffend konnte Aogen vor allem in SFO, AP, OvLT und ARC detektiert werden [362, 372, 373, 376, 386, 387], wobei *in situ* Hybridisierung der Aogen mRNA zeigte, dass das antero-laterale SFO des Rattengehirns die Struktur mit der höchsten Expressionsdichte repräsentiert [362, 386, 388] (*Abb. EIN 6*), welche zudem unter Bedingungen einer reduzierten EZF oder Erhöhung seiner Osmolalität nochmals hochreguliert wurde [372, 386]. Für das SFO konnte ein Nachweis von Aogen in Astrozyten bereits zwischen dem 16. und 18. Tag der Fetalentwicklung erbracht werden [363], wobei Aogen und das Enzym Renin in benachbarten Zellen nachweisbar waren [387]. Des Weiteren wurden innerhalb des SFOs Zellen mit Aogen immunoreaktiven Granula festgestellt, welche Aogen in die CSF freisetzen [389].

Ein Nachweis von Renin, vor allem von Renin-spezifischer mRNA, konnte für das Gesamtgehirn der Ratte in Amygdala, *Cortex*, Thalamus, Hypothalamus, Pinealorgan, *Medulla oblongata*, *Cerebellum* und auch den CVOs gezeigt werden [353, 356, 359, 370, 371, 381, 390–395]. Renin oder Renin-ähnliche enzymatische Aktivität scheint dabei im anterioren Hypothalamus, dem Pinealorgan und der *Medulla oblongata* am höchsten zu sein [356, 371, 393]. Eine i.c.v. Injektion des Renin-spezifischen Inhibitors Aliskiren reduzierte die durch injiziertes Renin induzierte Erhöhung der ANG II Konzentration in der CSF bei Ratten und untermauert so die Expression eines Gehirn-intrinsischen Renins [396, 397]. Die Expression von Renin im Gehirn ist allgemein sehr gering, konnte jedoch mit Hilfe seiner transgenen Expression bei Mäusen [398] in Neuronen und Astrozyten unterschiedlicher Gehirnregionen lokalisiert werden [353, 355, 359, 365, 370, 371, 390, 391, 393–395]. Außerdem ließ sich bei transgenen Mäusen eine Gehirn-spezifische Isoform der humanen Renin mRNA nachweisen, bei welcher das erste Exon verändert wurde [356, 395, 399–403]. Dieses Gehirn-intrinsische Renin ist gegebenenfalls an der ANG II Bildung in Mitochondrien beteiligt [404]; es gibt jedoch noch keinen Beweis dafür, dass es eine ANG I bildende Aktivität besitzt [399, 404]. *In puncto* CVOs konnte Renin in Neuronen und

glialen Zellen des SFOs nachgewiesen werden, wobei die neuronale Expression stärker ausgeprägt war [381, 393]. Zudem konnte durch den Einsatz einer doppelt transgenen Mauslinie die Expression von Renin und dem Renin-Substrat Aogen in benachbarten Zellen des murinen SFOs detektiert werden, wobei hier der jeweilige Zelltyp nicht identifiziert wurde [387]. Aufgrund der sehr geringen Menge an detektierbarem Renin im Gehirn wird seine intrinsische Expression kontrovers diskutiert. Andere Signalwege wie die Interaktion von Prorenin mit seinem Rezeptor (PRR), deren Expression in Neuronen und Astrozyten des Gehirns und SFOs erwiesen ist, werden in der Literatur beschrieben [359, 380, 399, 405–408].

Gehirn-intrinsisches angiotensin-converting enzyme konnte mittels Enzymtests, auf mRNA-Ebene, immunhistochemisch oder durch die Bindung eines radioaktiv markierten Inhibitors ([<sup>125</sup>J]351A) detektiert werden (*Abb. EIN 6*). Es muss dabei zwischen den beiden Subtypen der ACE1 und ACE2 unterschieden werden, wobei lediglich ACE1 für die Bildung von ANG II aus ANG I verantwortlich ist. Innerhalb der BHS wird ACE1 sehr stark im *Plexus choroideus* und der ependymalen Auskleidung der Hirnventrikel, schwächer in PVN, SON, RVLM, MnPO, *Nucleus accumbens*, *Globus pallidus*, *Substantia nigra*, *Amygdala* und dem *Cerebellum* exprimiert [355, 357–359, 365, 380, 392, 409–416]. Dabei wurde die Expression von ACE1 sowohl in Neuronen als auch in nicht-neuronalen Zellen beschrieben, wobei der gliale Zelltyp nicht charakterisiert wurde [359, 380, 413]. Hinsichtlich der CVOs konnte ACE1 in SFO, OvLT und AP, also allen drei sensorischen CVOs, sowie der ME nachgewiesen werden, wobei das SFO die weitaus höchste Expressionsdichte aufwies [357, 410, 412–416] (*Abb. EIN 6*). Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen deuteten auf eine Lokalisation der ACE1 in basalen und apikalen Membranen der Ependymzellen, der luminalen Membran kapillärer Endothelzellen sowie in astroglialen und axonalen / dendritischen Zellmembransegmenten von Neuronen hin [355, 413]. ACE1 ist demnach strategisch so lokalisiert, dass es mit ANG II Präkursormolekülen in Kontakt kommen kann [413]. Trinkwasserentzug sowie eine Steigerung der Na<sup>+</sup>-Konzentration in der CSF bewirkten eine signifikante Hochregulierung der Bindungsdichte für [<sup>125</sup>J]351A im Bereich von SFO, OvLT, MnPO und PVN adulter Ratten und somit eine gesteigerte ACE1 Aktivität in diesen Regionen [409, 417, 418].



**Abb. EIN 6: Nachweis von Angiotensinogen und *angiotensin-converting enzyme* im SFO der Ratte**

*In situ* Hybridisierung von Angiotensinogen (Aogen)- (A) und *angiotensin-converting enzyme* (ACE) (B) spezifischer mRNA in coronalen Gehirnschnittpräparaten des rattenspezifischen SFOs, wobei links eine Übersichts- und rechts eine Detailaufnahme gezeigt wird.

Aus Barth et al. 1999

Tierphysiologische (SFO-Mikroapplikation) und elektrophysiologische Studien in coronalen Gehirnschnittpräparaten der Ratte zeigten eine Aktivierung von SFO-intrinsischen Neuronen sowohl durch äquimolares ANG I als auch ANG II, wobei die ANG I induzierten Antworten durch den ACE1-Inhibitor Captopril unterdrückt werden konnten [419–421]. Dies weist auf das Vorhandensein einer enzymatischen ACE1 Aktivität im SFO hin. Neben dem klassischen ACE1 konnte in vielen Gehirnregionen wie dem SFO, OvLT, NTS, PVN, der AP sowie ME auch ACE2 primär in Neuronen nachgewiesen werden [422–426]. ACE2 wandelt ANG I in ANG (1-9) sowie ANG (1-7) um und hat vor allem vasodilatatorische, antifibrotische und antiproliferative Effekte [427]. Die Rolle von ACE2 im Gehirn-intrinschen RAS ist bis *dato* nicht ausreichend geklärt [425].

Neben den beiden Enzymen des klassischen RAS (Renin, ACE) gibt es zahlreiche Hinweise für andere Proteasen (Chymasen, Cathepsine, Tonin, Kallikrein, Elastase-2, *tissue plasminogen activator* (t-PA)), die eine direkte Konversion von Aogen zu

ANG II im Plasma oder in Geweben ermöglichen [340, 353, 358, 428–431]. Diese Enzyme können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zur Gruppe der „Trypsin-ähnlichen ANG II generierenden Enzyme“ gehören Trypsin, Kallikrein und t-PA, welche keine physiologische Relevanz im ZNS besitzen [432–434]. Tonin hingegen ist in der Lage Aogen zu ANG II zu konvertieren [434–437]. Zur Gruppe der „Chymotrypsin-ähnlichen ANG II generierenden Enzyme“ gehören zum einen die Chymasen, welche ANG I zu ANG II konvertiert und die Cathepsine D und G, wobei vor allem Cathepsin G wichtig für die Konversion von Aogen und ANG I zu ANG II ist [434]. Hinsichtlich der Renin und ACE unabhängigen Bildung von ANG II in bestimmten Regionen des Gehirns (v.a. Hypothalamus und *Medulla oblongata*), liegen experimentelle Daten für Chymasen [438, 439], Cathepsin G [365], Tonin [440, 441] und Kallikrein [428] vor. Chymasen, hier die  $\alpha$ -Chymase [442], bewirkte bei der Ratte eine 75 % potentere Konversion von ANG I zu ANG II als ACE im Gehirn [439, 443–446]. Zudem sind Chymasen an der enzymatischen Umwandlung des erst kürzlich entdeckten Angiotensin Präkursorpeptids Angiotensin (1-12) (ANG (1-12)) zu ANG II im Gehirn (RVLM, PVN) beteiligt [438, 447–449]. Cathepsin G ist im Gehirn u.a. für die direkte Konversion von Aogen zu ANG II zuständig; darauf deuten auch die sehr niedrigen ANG I Konzentrationen im Parenchym bestimmter Gehirnregionen hin [354, 355, 365, 436, 450, 451]. Die i.c.v. Applikation von Tonin führte bei der Ratte zu einer Zunahme der Trinkwasseraufnahme und des arteriellen Blutdrucks. Beide Antworten konnten durch einen ANG II Rezeptor spezifischen Antagonisten vollständig unterdrückt werden, durch einen ACE-spezifischen Inhibitor hingegen nicht. Dies deutete auf eine direkte proteolytische Konversion von Aogen zu funktionellem ANG II durch Tonin hin, welches in den entsprechenden Studien vermutlich lokal von Astrozyten gebildet wurde [354, 355, 358, 365, 380, 428, 436, 440, 441, 451].

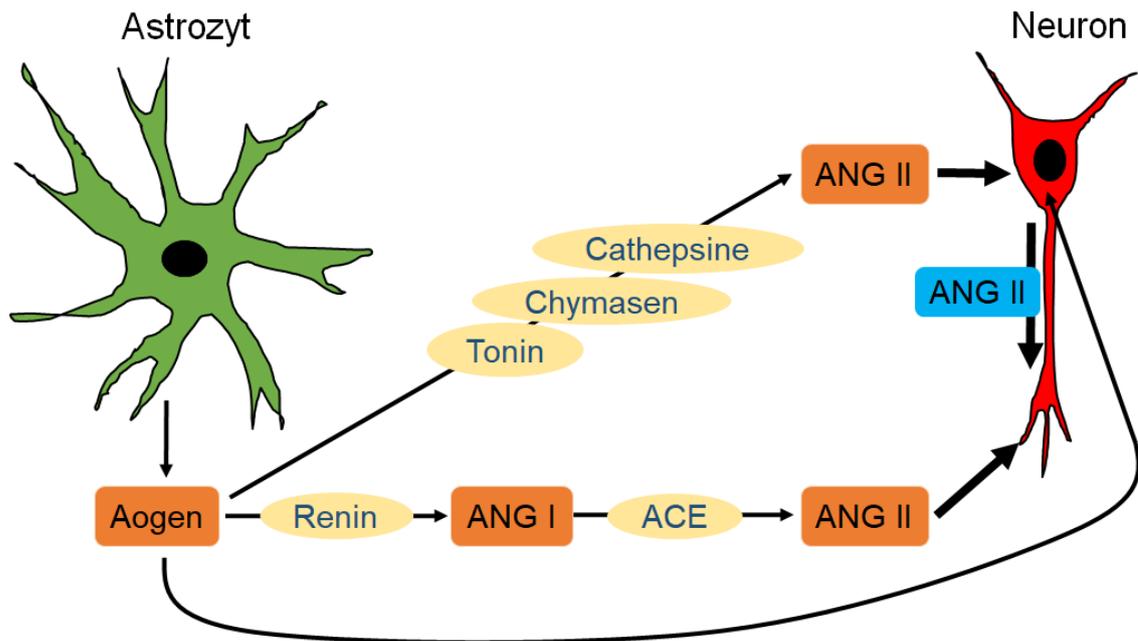
Auch im Rahmen lokaler RAS anderer Gewebe wie dem Herzen oder Fettgewebe konnte eine Aktivität von Chymasen festgestellt werden, welche ANG (1-12) zu ANG II konvertieren [452–456]. ANG (1-12) konnte neben Aogen als mögliches Substrat für die ANG II Bildung in der Blutzirkulation sowie zahlreichen Geweben wie Gehirn, Herz und Nieren nachgewiesen werden [359, 449, 457]. Dabei erwies sich die durch Massenspektrometrie bei der Ratte detektierte Konzentration an ANG (1-12) im Myokard des Herzens, in den proximalen und distalen Tubuli der Nieren und in unterschiedlichen Gehirnregionen als deutlich höher als diejenige für ANG I oder ANG II

[449, 453, 458, 459]. Die Konversion von ANG (1-12) zu biologisch aktivem ANG II erfolgte dabei in verschiedenen Geweben durch unterschiedliche Enzyme. So führte nach exogener ANG (1-12) Infusion in die Blutbahn der Ratte eine Hemmung der ACE-, nicht jedoch der Chymasen- oder Renin-spezifischen Aktivität zu einer ausgeprägten Suppression der ANG II Bildung; in der Blutbahn scheint also primär ACE für die Konversion von ANG (1-12) zu ANG II verantwortlich zu sein [460, 461]. Bezüglich gewebstintrinsischer RAS in Herz und Nieren scheinen Chymasen respektive Neprilysin das jeweils vorherrschende Enzym für die Generierung von ANG II aus ANG (1-12) zu sein. So bewirkte der Einsatz des Chymasen-spezifischen Inhibitors Chymostatin eine deutliche Suppression der durch ANG (1-12) ausgelösten Depolarisation von Kardiomyozyten [453, 455, 459, 461, 462].

Das Gehirn betreffend konnte eine ANG (1-12) spezifische Immunreaktivität für Zellen (vorrangig Neurone) des PVN, NTS und der RVLM gezeigt werden [438, 447, 458]. Zudem bewirkten Mikroinjektionen von ANG (1-12) in den Bereich von RVLM, NTS, PVN oder ARC des Rattengehirns eine Erhöhung des arteriellen Drucks, der Herzfrequenz und der renalen bzw. splanchnischen Sympathikusaktivität [438, 447, 458, 463, 464]. Eine Mikroapplikation von ANG (1-12) in die caudo-ventrolaterale Medulla (CVLM) hingegen hatte eine Senkung des arteriellen Drucks, der Herzfrequenz und der Sympathikusaktivität zur Folge, welche vermutlich über GABA-Rezeptoren in der RVLM vermittelt wurden [465]. In jedem Fall beruhten die durch die Mikroinjektion von ANG (1-12) ausgelösten, zentralnervösen Wirkungen sowohl auf einer ACE- als auch einer Chymasen-spezifischen Enzymaktivität [438, 447, 449, 458, 464, 465].

Nachweise für die Gehirn-intrinsische Bildung von ANG I, ANG II und weiterer kurz-kettiger Fragmente des Angiotensins in Hypothalamus und anderen Gehirnregionen wurden auf indirekte Weise unter Nutzung transgener Tiere, aber auch Primärantikörper gegen ANG II erbracht [20, 270, 353, 357, 421, 466–470]. ANG II immunoreaktive Zellen und Fasern konnten mittels ANG II spezifischer Antiseren / -körper in mehreren hypothalamischen und medullären Kerngebieten wie SFO, OvLT, PVN, SON, SCN, ME, medialer präoptischer bzw. lateraler hypothalamischer Region, MnPO, NTS, BNTS, *Zona incerta* oder *Amygdala* meist colchiziniertes Ratten nachgewiesen werden [353, 466, 467, 469, 471]. Als exprimierender Zelltyp konnten in den meisten Fällen Neurone identifiziert werden, in Einzelfällen zeigten jedoch auch Astrozyten eine ANG II spezifische Immunreaktivität [353, 359, 365, 413, 472–474].

In den Neuronen konnte ANG II positive Immunoreaktivität im Bereich der Perikaryen und Dendriten sowie synaptischen Vesikeln lokalisiert werden [413]. Das SFO betreffend konnten zahlreiche angiotensinerge Neurone im Bereich des *anulus* (Schale) nachgewiesen werden, was auf eine *de novo* Synthese von ANG II innerhalb dieses CVOs oder eine Aufnahme aus der Blutbahn hindeuten könnte [368, 385, 420, 421, 470, 475–477]. Zudem zeigten ANG I und ANG II immunoreaktive Zellen des SFOs exozytotisch verschmelzende Vakuolen und Vesikel in Richtung der Gehirnvtrikel, was auf eine mögliche Freisetzung beider Peptide durch das SFO in die CSF hinweisen könnte [389]. Zentral lokalisierte ANG II haltige Fasern im SFO scheinen unter anderem von der *Zona incerta*, den Raphekernen und dem lateralen Hypothalamus (LH) zu kommen, während efferente ANG II immunopositive Fasern vor allem zum MnPO, parvozellulären PVN, SON, OvLT, BNTS und zu den Raphekernen der *Medulla oblongata* projizieren [70, 476, 478–480]. Die ANG II Bildung erfolgt wie bereits beschrieben mittels klassischer Renin- und ACE-abhängiger enzymatischer Generierung oder alternativ mittels anderer Proteasen wie Cathepsinen, Chymasen und Tonin [355, 365]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass ANG II entweder extrazellulär nach vorheriger Freisetzung von Aogen, Renin und / oder ACE generiert und im Anschluss durch Rezeptor-Internalisierung in Neurone aufgenommen wird oder intrazellulär nach neuronaler Aufnahme von Aogen oder ANG I gebildet wird [355, 358, 365] (*Abb. EIN 7*). Intrazellulär konnte ANG II in neuronalen Vesikeln in der Nähe Aogen-haltiger Vesikel nachgewiesen werden [358, 376, 467]. Durch intrazelluläre Produktion von Renin und ACE kann ANG II generiert, mittels anterograden Transports zum Axonende transportiert und dort als Neurotransmitter synaptisch freigesetzt werden [358, 400, 403] (*Abb. EIN 7*). Weitere Fragmente des ANG II wie z.B. Angiotensin III und IV, welche durch die Aminopeptidasen A und N generiert werden, sowie ANG (1-7) konnten in Gehirnzellen lokalisiert werden, wobei deren Bedeutung bis *dato* nur unzureichend geklärt ist [357, 358, 466].



**Abb. EIN 7: Zelluläre und molekulare Komponenten des Gehirn-intrinsischen RAS: Ein Modellsystem**

Dargestellt sind ein mögliches Gehirn-intrinsisches Renin-Angiotensin System (RAS) sowie seine zellulären und molekularen Komponenten. Angiotensinogen (Aogen) wird vorrangig von Astrozyten gebildet und freigesetzt. Extrazellulär kommt es durch Renin zur enzymatischen Spaltung des Aogens und Bildung von Angiotensin I (ANG I), welches durch *angiotensin-converting enzyme* (ACE) zu Angiotensin II (ANG II) umgewandelt wird. Die Bildung von ANG II kann auch Renin- und ACE-unabhängig über Cathepsine, Chymasen und Toinin ablaufen. Extrazelluläres ANG II bindet an membranständige, metabotrope ANG II Rezeptoren von Neuronen und wird durch Rezeptor-Internalisierung aufgenommen oder führt unmittelbar zu Effekten an den Neuronen. Auch eine intrazelluläre Bildung von ANG II wird diskutiert. Dabei wird Aogen durch die Neurone aufgenommen und mittels intrazellulär gebildetem Renin und ACE zu ANG II konvertiert, welches dann anterograd zum Axonende transportiert und dort als Neurotransmitter freigesetzt wird.

ANG II bindet sowohl als zirkulierendes Hormon als auch als aktives Neuropeptid eines Gehirn-intrinsischen RAS an transmembrane, G-Protein gekoppelte Rezeptorproteine seiner Zielzellen [365, 380, 481–483]. Dabei lassen sich zwei Subtypen, Angiotensin-Rezeptor 1 und 2 (AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R) (Kap. EIN 1.2.4), unterscheiden, wobei der AT<sub>1</sub>R bei der Ratte aufgrund unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung bei identischer Funktion noch in die Subtypen A und B (AT<sub>1A</sub>R und AT<sub>1B</sub>R) unterteilt wird [481, 483]. AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R haben dabei teilweise gegensätzliche Funktionen. So führte die Bindung von ANG II an den zentralnervösen AT<sub>1</sub>R zu peripherer Vasokonstriktion, Sympathikusaktivierung und neurohypophysärer ADH-Freisetzung, wohingegen die Bindung von ANG II an AT<sub>2</sub>R eine periphere Vasodilatation durch die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) induzierte [481, 483].

Das ZNS betreffend werden sowohl AT<sub>1</sub>R als auch AT<sub>2</sub>R exprimiert [353, 357, 359, 365, 380]. In den sensorischen CVOs (SFO, OvLT, AP) sowie im Hypothalamus (MnPO, PVN, ChP, SON, ME, POA) jedoch wird ab dem 19. bzw. 21. (SFO) Tag der Fetalentwicklung ausschließlich der AT<sub>1A</sub>R exprimiert [87, 88, 353, 359, 361, 364, 466, 484]. Eine experimentelle Erhöhung der Na<sup>+</sup>-Konzentration in der CSF bewirkte in SFO, OvLT, MnPO und PVN der Ratte eine verstärkte Expression des AT<sub>1A</sub>R [417, 418]. Das SFO der Ratte betreffend konnte der AT<sub>1A</sub>R erst ab dem 21. Tag der Fetalentwicklung eindeutig identifiziert werden, stellte sich dann aber als wesentlicher Rezeptor für alle ANG II vermittelten physiologischen zellulären Wirkungen dar. So wird der AT<sub>1</sub>R hauptsächlich in der ventro-medialen Kernregion und der dorsalen Schale nach extrazellulärer Dehydratation der Tiere durch Trinkwasserentzug verstärkt exprimiert [87, 88, 364, 386, 421, 466, 480, 484–487]. Mittels *in situ* Hybridisierung für AT<sub>1A</sub>R mRNA und elektrophysiologische Studien konnte die Expression dieses Rezeptors primär in Neuronen verschiedener Gehirnregionen der Ratte inklusive des SFOs identifiziert werden [87, 88, 358, 383, 386, 405, 488–490]. Andererseits zeigten Experimente in der neuro-glialen Primärzellkultur des SFOs bzw. OvLTs zusätzlich eine pharmakologisch verifizierte Expression funktioneller AT<sub>1A</sub>R in Astrozyten [368, 420, 489–491].

Bei Bindung von ANG II an den AT<sub>1A</sub>R vermittelt dieser seine intrazelluläre Signaltransduktion unter anderem über ein G<sub>q/11</sub> Protein, welches die membranständige Phospholipase C (PLC) aktiviert, die ihrerseits die Bildung von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) durch Hydrolyse von Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat katalysiert. IP<sub>3</sub> führt durch Bindung an seinen Rezeptor am rauen endoplasmatischen *Reticulum* zur intrazellulären Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> [368, 481, 492–497]. Sowohl Ca<sup>2+</sup> als auch DAG aktivieren die Proteinkinase C (PKC), welche im Anschluss eine Vielzahl von Kaskaden wie die *mitogen activated protein kinase* (MAPK), Tyrosinkinasen und Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert [481, 492, 497, 498]. Zusätzlich kann es auch G-Protein unabhängig zur Aktivierung des MAPK Signalwegs mit anschließender nukleärer Translokation des Signals kommen, wobei die Aktivierung hier vermutlich auf einem β-Arrestin Signalweg beruht [481, 492, 493, 497–501]. Ein weiterer wichtiger Signalweg, welcher durch die Bindung von ANG II am AT<sub>1A</sub>R aktiviert wird, ist die nukleäre Translokation der Transkriptionsfaktoren *c-Fos*, *FosB*, *c-Jun*, *JunB* und *Krox-24* in Gehirnregionen wie dem SFO, OvLT, MnPO,

PVN und SON, was auf eine Aktivierung neuronaler Zellen in diesen Gebieten hinweist [277, 421, 502, 503]. Auch intrazelluläre Signalwege mittels PLC und  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung werden für das SFO beschrieben [504]. ANG II ist zudem in der Lage, durch Bindung an seinen metabotropen Rezeptor eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) in Astrozyten des rattenspezifischen *Cerebellum* auszulösen [505–507]. Zudem bewirkte ANG II in einer immortalisierten Zelllinie des neuroendokrinen Hypothalamus, vermittelt durch Bindung an den  $AT_{1A}R$ , eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und Aktivierung einer *non-receptor tyrosine kinase* [495, 499]. Des Weiteren führte die Interaktion von ANG II mit seinem Rezeptor  $AT_{1A}$  im SFO der Ratte zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und somit zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [492, 499, 508]. Dem  $AT_{1A}R$  wurde außerdem eine Beteiligung an neuroinflammatorischen Prozessen im Hippocampus zugesprochen [491, 508, 509].

Auch den Vogel betreffend gibt es erste Hinweise auf ein Gehirn- respektive SSO-intrinsisches RAS, welches mehr oder weniger unabhängig vom systemischen RAS fungiert und vermutlich in Analogie zum SFO-intrinsischen RAS der Säugetiere auto-/ parakrine Wirkungen entfaltet [291, 307, 510, 510]. ANG II immunoreaktive Fasern, Zellen und Varikositäten konnten dabei im gesamten Hypothalamus sowie im PVN und SON nachgewiesen werden [309]. Auch in der CSF war ANG II detektierbar, welches vermutlich Gehirn-intrinsisch gebildet worden war, im *Liquor* jedoch eine um 50 % geringere Konzentration als im Plasma aufwies [307, 309]. Intracraniale (i.c.) bzw. i.c.v. Injektionen bzw. Perfusionen von vogelspezifischem ANG II bewirkten bei Taube, Ente, Wachtel oder Huhn eine deutlich gesteigerte Trinkwasseraufnahme und renale Antidiurese (AVT-bedingt), wobei sich die i.c.v. Injektion in die Ventrikel als am sensitivsten herausstellte [291, 310, 313–315, 330, 511, 512]. Bei an Salzwasser adaptierten Vögeln mariner Habitats (Ente) inhibierte in hypothalamische *Nuclei* injiziertes ANG II die NaCl-Exkretion durch supraorbitale Salzdrüsen [513]. Vogelspezifische Rezeptorproteine für ANG II (cATR) konnten in zirkumventrikulären Organen wie SSO, OvLT und ME oder Gehirnregionen wie PVN, SON, POA, ChP, AV3V, NTS und *Amygdala* identifiziert werden, wobei ihre Expression bereits ab dem 20. Tag der Fetalentwicklung zu detektieren war und bis zum 14. Tag postnatal heraufreguliert wurde [309, 311, 323, 325, 326, 514]. Dehydratation hingegen führte, anders als beim Säugetier, nicht zu einer Hochregulation von cATR [325]. Die Adaptation von Enten an Salzwasser hatte andererseits eine gesteigerte Expression des

cATRs zur Folge [309, 324, 515] Für das Gehirn-intrinsische RAS des Vogels scheinen besonders die POA und das SSO von gesteigerter Bedeutung zu sein. Die POA leitet dabei über ANG II perzipierte Informationen bezüglich des Status der EZF mittels catecholaminerger Fasern an das SSO weiter, welches im Anschluss Mechanismen zur Erhaltung der Homöostase einleitet [309, 514, 516]. Die Expression von  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren sowie Tyrosinhydroxylase positiver Immunoreaktivität in SSO-Zellen untermauern diese catecholaminerge Modulation [309, 311]. ANG II spielt also auch bei Vögeln als Gehirn-intrinsischer Neuromodulator eine wichtige Rolle bei der Modulation der Homöostase in bestimmten Gehirnregionen wie dem SSO, obwohl der Nachweis vieler RAS-Komponenten (Aogen, Renin, ACE, ANG I) für das Gehirn und insbesondere für das SSO bisher nicht eindeutig erbracht werden konnte [309].

## **1.4 Afferente und intrinsische Innervation des SFOs: Wichtige Transmittersysteme**

### **1.4.1 Das cholinerge Transmittersystem**

Acetylcholin (ACh) wird als wichtiger Neurotransmitter im *Organum subfornicale* beschrieben und ist somit von Bedeutung für die Regulation des Trinkverhaltens sowie die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes im tierischen / menschlichen Organismus. ACh ist ein biogenes Amin und als Neurotransmitter sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem an der Regulation wichtiger physiologischer Vorgänge beteiligt. ACh wird wie alle klassischen Neurotransmitter vorrangig im Bereich des Perikaryons durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) aus Cholin und Acetyl-CoA gebildet, axonal transportiert, vesikulär in den Synapsen gespeichert und mittels Exozytose bei Eintreffen eines Aktionspotentials aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt freigesetzt. Der Neurotransmitter entfaltet an der postsynaptischen Membran seine Wirkung über Bindung an sogenannte Cholinozeptoren, die in die Subgruppen der ionotrop nicotineren (nAChR) und metabotrop muskarineren (mAChR) Rezeptoren unterteilt werden, je nachdem, ob in der Pharmakologie der 1950er bis 1963er Jahre das Pilzgift Muskarin oder Nikotin als entsprechender Rezeptoragonist eingesetzt wurde [517]. Nicotinerge Rezeptoren stellen aus fünf Untereinheiten bestehende, transmembranale Kationenkanäle dar, welche in n1- („Muskeltyp“) und n2-nAChRs („Neuronentyp“) eingeteilt werden. Dabei sind n1-AChRs postsynaptisch an der motorischen Endplatte, n2-AChRs prä-

und postsynaptisch an Neuronen nachgewiesen [518, 519]. Muskarinerge ACh-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die über *second messenger* Kaskaden Ionenkanäle in nachgeschalteten Zellen in ihrer Offenwahrscheinlichkeit modulieren. Sie werden eingeteilt in  $m_1$ - bis  $m_5$ -mAChRs, wobei  $m_1$ -,  $m_3$ - und  $m_5$ -mAChRs mittels Bildung von  $IP_3$  und DAG ihre Wirkung entfalten. Rezeptoren der Subtypen  $m_2$  und  $m_4$  hingegen sind meist in Schrittmacherzellen des Herzens zu finden und die jeweilige  $\alpha$ -Untereinheit des zugehörigen G-Proteins bewirkt eine Hemmung der Adenylatcyclase (AC), die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit hingegen die Öffnung eines Kaliumkanals.

Für die im Bereich der *Lamina terminalis* (LT) gelegenen Kerngebiete (SFO, MnPO, OvLT) gibt es zahlreiche Hinweise für ein funktionales cholinerges Transmittersystem. In SFO-spezifischen Neuronen konnte mittels Immunzyto- und -histochemie das Enzym ChAT eindeutig identifiziert werden, was auf das Vorkommen SFO-intrinsischer cholinergischer Nervenzellen hinweist [520, 521]. Sowohl in elektrophysiologischen Untersuchungen als auch mittels Calcium-Imaging Versuchen wurden SFO-spezifische Neurone der Ratte durch die Interaktion von ACh und nAChRs sowie mAChRs aktiviert [522, 523]. ACh übernimmt im SFO eine wichtige Rolle für die zentralnervöse Homöostase der extrazellulären Körperflüssigkeit. So wurden im Rahmen einer Hypovolämie cholinerge Signalwege vom medialen *Septum* und dem diagonalen Band von Broca zum SFO aktiviert [520, 524]. Diese cholinerge Afferenz wird im Wesentlichen über muskarinerge ACh-Rezeptoren des Subtyps  $m_3$  übermittelt [520, 525]. Im Gegensatz dazu schildern andere Autoren eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration in Neuronen des SFOs durch die Aktivierung muskarinerges  $m_1$ -ACh-Rezeptoren [523]. In jedem Fall spielen mAChRs eine wichtige Rolle im Rahmen der Modulation prä- und postsynaptischer Mechanismen in Neuronen des rattenspezifischen SFOs mit Bedeutung für die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes [477, 526, 527]. Die Beteiligung von nAChRs konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden [526]. So löste anderen Autoren zufolge eine Injektion von ACh in das SFO wacher Ratten eine Steigerung des Trinkverhaltens durch eine Aktivierung von nAChRs aus [521, 528]. Dabei führte eine Injektion von Nicotin als Agonist für nAChRs zu einer transienten Steigerung des Trinkverhaltens [528]. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass Neurone des rattenspezifischen SFOs spezifisch über nAChRs mit der Zusammensetzung  $3\alpha_4$  und  $2\beta_2$  als Untereinheiten aktiviert

werden und so zu einer gesteigerten Flüssigkeitsaufnahme führten [529]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Neurotransmitter ACh eine wichtige Rolle im für die Kontrolle und Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes wichtigen SFO übernimmt.

#### 1.4.2 Das noradrenerge Transmitter-System

Noradrenalin (NA) ist ein zur Gruppe der Katecholamine gehöriger Neurotransmitter, der einerseits den postganglionären Botenstoff des peripheren Sympathikus repräsentiert und andererseits als Signalüberträger in mehreren Hirngebieten des ZNS fungiert [530]. Die wichtigsten noradrenergen, neuro-glialen Strukturen finden sich in der *Pons* sowie der *Medulla oblongata*, wobei der *Loculus coeruleus* das wichtigste Kerngebiet darstellt. In deren Neuronen wird NA aus Tyrosin durch sequentielle Hydroxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen gebildet. Den limitierenden enzymatischen Schritt stellt dabei die Hydroxylierung von Dopamin zu NA durch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase dar. Seine zelluläre Wirkung entfaltet NA durch Bindung an Adrenozeptoren, die in die Gruppen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren unterteilt werden [531, 532]. Adrenozeptoren sind G-Protein gekoppelte metabotrope Rezeptoren, die je nach Struktur, Verteilung und gebildetem *second messenger* Signalweg in fünf unterschiedliche Subtypen eingeteilt werden. Die Aktivierung von  $\alpha_1$ -Rezeptoren hat die intrazelluläre Bildung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) zur Folge, wohingegen die Stimulation von  $\alpha_2$ -Rezeptoren die Hemmung der membranständigen Adenylatcyclase bewirkt. Beta<sub>1</sub>- und  $\beta_2$ -Rezeptoren vermitteln ihre Wirkung durch Aktivierung der Adenylatcyclase und somit vermehrten Bildung von cAMP. Die lediglich im braunen Fettgewebe nachgewiesenen  $\beta_3$ - /  $\beta_4$ -Rezeptoren bewirken ebenfalls eine Erhöhung des cAMP Spiegels.

Eine Beteiligung des noradrenergen Transmittersystems am durch das SFO und weitere Hirngebiete regulierten Trinkverhalten wird in der Literatur detailliert beschrieben [284, 533–540]. Zum einen konnten Vorstufen des Noradrenalins wie L-Dopa, aber auch Noradrenalin selbst mittels Immunhistochemie und elektronenmikroskopischen Studien im SFO des Affen und der Maus nachgewiesen werden [541, 542]. Häufiger wird jedoch eine noradrenerge Innervation des SFOs beschrieben [283, 287, 536, 543–546]. Dabei scheint die afferente neuronale Verbindung zwischen dem NTS der *Medulla oblongata* und dem SFO eine wichtige Rolle bei der

Modulation des Trinkverhaltens zu spielen [287, 543–546]. Der NTS erhält Informationen von Barorezeptoren des Aortenbogens und der *Glomera carotica* über den hydrostatischen Druck größerer Arterien, welche Neurone des NTS dann mittels noradrenerger Efferenzen an das SFO weiterleitet [287, 545, 546]. Dabei scheint der *Nucleus parabrachialis lateralis* (PBN) der dorso-lateralen *Pons* die Funktion einer Relaisstation zu spielen, da er afferente Informationen aus dem NTS erhält und diese nach Filterung monosynaptisch an das SFO weiterleitet [543]. Innerhalb des SFOs wurden verschiedene Adrenozeptoren nachgewiesen und eine physiologische Bedeutung von  $\alpha$ -Adrenozeptoren im SFO, dem OvLT und anderen hypothalamischen Kerngebieten (MnPO) wurde von vielen Autoren beschrieben [283, 287, 547, 548]. Mittels PCR, Immunzytochemie und Rezeptorautoradiographie konnte die funktionelle Expression von  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren im SFO und MnPO demonstriert werden [547–549]. Dabei induzierten  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren postsynaptisch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in SFO-spezifischen Neuronen von Hirnschnitten der Ratte, wohingegen eine Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren präsynaptisch eine Inhibition der Freisetzung von GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) und somit eine zusätzliche Verstärkung der  $\alpha_1$ -spezifischen Wirkung zur Folge hatte [547, 548]. Auch eine Beteiligung von  $\beta$ -Adrenozeptoren an der postsynaptischen Aktivierung SFO-spezifischer Neurone in Hirnschnitten der Ratte konnte nachgewiesen werden [283, 533–535], wobei deren Antagonisierung zu verminderter Wasseraufnahme führte [533, 534]. Innerhalb des SFOs wirkt Noradrenalin dementsprechend sowohl über  $\alpha$ - als auch über  $\beta$ -Adrenozeptoren.

### **1.4.3 Das glutamaterge Transmittersystem: ionotrope und metabotrope Rezeptorsysteme**

Der Neurotransmitter Glutamat (GLUT) stellt den bedeutendsten exzitatorischen Botenstoff im ZNS von Säugetieren und anderen Vertebraten dar, wobei die neuronale Transmission sowohl klassisch post- als auch regulatorisch präsynaptisch erfolgen kann [550, 551]. Glutamat ist dabei die einzige Aminosäure, welche im Gehirn oxidiert, (trans-)aminiert und decarboxyliert wird. Die Bildung von Glutamat aus astrozytärem  $\alpha$ -Ketoglutarat und *vice versa* wird mittels Transaminierung durch das Enzym Aspartat-Aminotransferase (AAT) im Zytosol katalysiert [552]. Für die Degradation von Glutamat hingegen wurde lange Zeit das Enzym Glutamat-Dehydrogenase verantwortlich gemacht [552]. Neueste Studien deuten allerdings darauf hin, dass für die Degradation von Glutamat, welche primär in Mitochondrien vonstatten geht,

ebenfalls die AAT verantwortlich ist [552]. Weiterhin kann Glutamat durch die Glutamat-Decarboxylase (GAD) zum wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des ZNS,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), umgewandelt werden [551].

Die Identifikation glutamaterger Neurone im ZNS erfolgt in der Regel durch den immunologischen Nachweis vesikulärer Glutamatttransporter (vGLUT1-3), welche im Bereich der Synapse Glutamat aus dem Zytosol in Vesikel einschleusen und letztlich durch dessen Freisetzung an der präsynaptischen Membran zur Signalübertragung beitragen [553, 554] (*Abb. EIN 8*). Vesikuläre Glutamatttransporter weisen eine niedrige Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$  auf und transportieren kein Aspartat. Dabei wird vGLUT1 vor allem von Neuronen im cerebralen *Cortex* und Hippocampus exprimiert, wohingegen im Hirnstamm primär vGLUT2 exprimiert wird [553]. In neuroendokrinen Kerngebieten des Hypothalamus der Ratte mit Bedeutung für die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes (PVN, SON und ARC) bzw. der Körperkerntemperatur (POA) findet sich in den Nervenendigungen eine starke Expression des vGLUT2 [555]. Im Bereich der *Eminentia mediana* weisen die meisten der Thyreotropin- und *corticotropin-releasing* Hormon produzierenden Neurone eine Expression von vGLUT2 auf [556]. Die Expression von vGLUT2 wurde weiterhin in Synapsen von Neuronen zirkumventrikulärer Organe wie dem OvLT und dem hypothalamischen Kerngebiet des MnPO detektiert [557]. Im ZNS sind zudem Astrozyten in der Lage, neuronal freigesetztes Glutamat aus dem Extrazellulärraum aufzunehmen, in Glutamin (GLN) umzuwandeln und dieses den Neuronen zur Bildung von Glutamat zur Verfügung zu stellen [552] (*Abb. EIN 8*). Dies stellt einen kontinuierlichen Wiederverwertungsprozess (Glutamat-Glutamin Zyklus) zwischen Neuronen und Astrozyten dar [551]. Die Aufnahme von Glutamat in Astrozyten des ZNS erfolgt dabei über eine andere Klasse membranständiger Glutamatttransporter, die *excitatory amino acid transporter* (EAATs) (*Abb. EIN 8*). Bisher wurden fünf unterschiedliche EAATs erfolgreich kloniert: EAAT1 bis EAAT5 [551]. Dabei sind EAAT1 (GLAST) und EAAT2 (GLT1) die beiden wichtigsten, im ZNS exprimierten, membranständigen astroglialen *uptake* Transporter für freies extrazelluläres Glutamat [551, 558–560], wobei EAAT1 / GLAST ausschließlich in der Zellmembran von Astrozyten, EAAT2 / GLT1 in der Zellmembran von Astrozyten und Neuronen gefunden wurde [560]. Dieser Zyklus der Aufnahme und damit Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellulärraum durch Astrozyten des ZNS trägt wesentlich dazu bei, die glutamaterge neuronale Exzitation

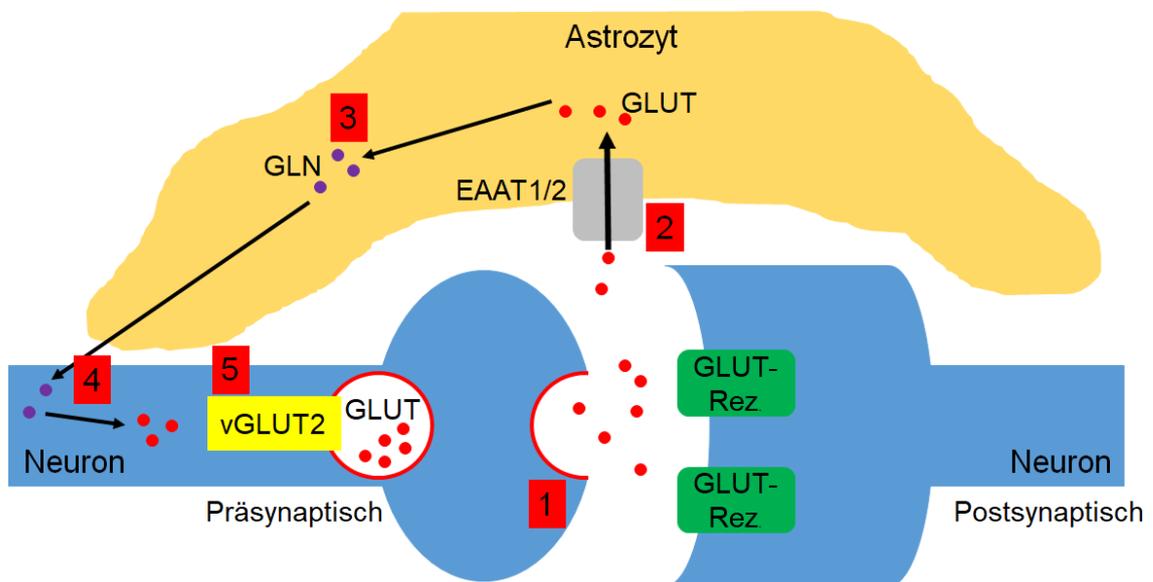
zu beenden, bevor Glutamat-induzierte Neurotoxizitäten auftreten können [551, 560].

Neurotoxische Eigenschaften von Glutamat wurden bereits früh für Neurone der Retina festgestellt und beschrieben [561, 562]. Auch Neurone der sensorischen CVOs sind wegen ihrer durchlässigen BHS besonders empfindlich gegenüber zirkulierendem Glutamat [563–565]. Nach subkutaner (s.c.) Applikation von Monosodium-Glutamat (MSG) bei neonatalen Ratten mit nicht manifestierter BHS kam es zu deutlichen Läsionen im Bereich der CVOs und anderen Kerngebieten des Hypothalamus wie dem ARC mit leerer BHS. Dabei waren in absteigender Reihenfolge der ARC, das SFO, die präoptische Region (POA) und die AP betroffen [561, 563, 566]. Die Neurodegeneration in diesen Bereichen des Gehirns hat eine Reihe von Funktionsstörungen zur Folge. Mit MSG behandelte Ratten tranken nach i.v. Applikation von ANG II, welches normalerweise Durst und gesteigerte Trinkwasseraufnahme auslöst, signifikant weniger. Dies deutet auf Läsionen in den CVOs hin, die letztlich für das Trinkverhalten wichtig sind (SFO, OvLT) [567]. Zudem führte die Behandlung neonataler Ratten mit MSG zu einer verminderten Fähigkeit, den Blutdruck zu regulieren und zu einer chronisch vermehrten Freisetzung von Vasopressin aus der Neurohypophyse in die Blutbahn. Dadurch zeigte sich das neurohypophysale Vasopressin als deutlich erniedrigt, was auf einer Verminderung des dopaminergen Inputs aus dem ARC beruhte [568–570]. Zusätzlich zeigten neonatal mit MSG behandelte Ratten eine geringere Futteraufnahme, was auf Läsionen im Bereich der AP hinweist [571].

Generell kommt es lediglich bei sehr stark erhöhten Plasmawerten für Glutamat zu Neurodegenerationen [563–565]. Die Formen entstehender Neuronenschäden sind divers und umfassen Kernpyknosen, Karyorrhesis, Verminderung des Zytoplasmas, geschwollene Organellen und zytoplasmatische Blasen [563, 566, 572, 573]. Als Gründe für die neurodegenerativen Eigenschaften von Glutamat wurden zum einen eine gesteigerte Lipidperoxidation und erhöhte Katalaseaktivität in den CVOs [574], eine Verminderung der Glutamat-Dehydrogenase Aktivität [575] und die erhöhte Expression ionotroper Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ beschrieben [572], welche zu einer Dauerdepolarisation der Neurone führten. Andere Autoren machten den hohen Natriumgehalt des MSGs für die Neurotoxizität verantwortlich [563, 573]. Der konstatierte Zelluntergang wurde dabei in drei Phasen eingeteilt: Während der ersten Phase kommt es zu neuronalen Ödemen und zum Zelltod, in der zweiten Phase

werden Phagozyten aktiviert und in der dritten Phase proliferieren die astrozytären Fortsätze [563, 573]. In allen drei sensorischen CVOs kam es dadurch zu einem Untergang von etwa 40 % der ANG II sensitiven Neurone [576] und spezifisch im SFO zu einem Untergang von etwa 35 % der nitrergen Neurone, wodurch sich sogar eine makroskopische Volumenabnahme des SFOs ausbildete [570].

In der AP zeigten katecholaminerge Neurone eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber den neurotoxischen Eigenschaften von Glutamat [577]. So demonstrierten Calretinin-positive Neurone eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Glutamat als Calretinin-negative Neurone [578].

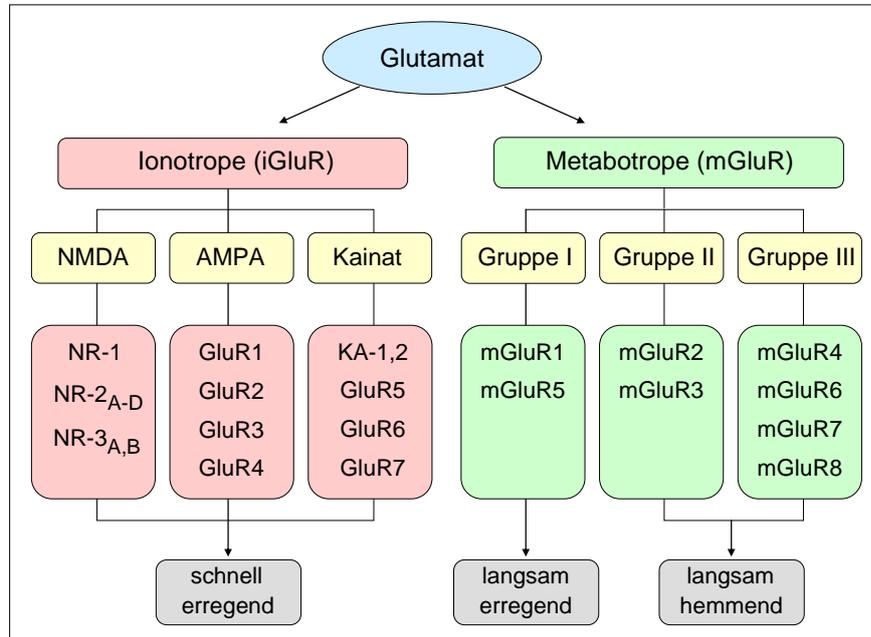


**Abb. EIN 8: Schema einer Synapse zur Veranschaulichung des Glutamat-Glutamin Zyklus**

Glutamat (GLUT) wird mittels Exozytose an der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt abgegeben (1) und entfaltet seine exzitatorische Wirkung an der postsynaptischen Membran über verschiedene Glutamatrezeptoren. Überschüssiges GLUT wird mit Hilfe exzitatorischer Aminosäuretransporter (EAAT1/2) in Astrozyten aufgenommen (2). In den Astrozyten wird GLUT zu Glutamin (GLN) umgewandelt (3), welches dann wieder an präsynaptische Neurone abgegeben wird (4). Im präsynaptischen Neuron verpackt ein vesikulärer Glutamattransporter (vGLUT2) GLUT wiederum in Vesikel (5), welche anschließend zur Exozytose bereitstehen.

Im ZNS werden verschiedene Typen von Rezeptorproteinen für Glutamat exprimiert und zahlreiche dieser Glutamatrezeptoren sind bereits in frühembryonalem Nervengewebe des Hypothalamus funktionell nachweisbar [579]. Die Expression membranständiger Glutamatrezeptoren ist dabei nicht auf Nervenzellen beschränkt, sondern konnte auch für Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen) nachgewiesen werden [551, 558, 579]. Glutamatrezeptoren werden dabei analog zu den

Cholinozeptoren (*Kap. EIN 1.4.1*) in die Familien ionotroper ligandengesteuerter Ionenkanäle und metabotroper, G-Protein gekoppelter Rezeptoren mit nachgeschalteter intrazellulärer Signaltransduktion eingeteilt [580] (*Abb. EIN 9*).



**Abb. EIN 9: Proteinfamilien der membranständigen ionotropen und metabotropen Rezeptoren für Glutamat**

Dargestellt sind die Proteinfamilien der Glutamatrezeptoren, die ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs) und die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) mit ihren jeweiligen Subtypen und ihrer generalisierten Wirkung an der postsynaptischen Membran.

Die ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluRs) werden seit den späten 1980er Jahren in drei verschiedene Gruppen unterteilt, abhängig von den Struktur-Aktivitätsbeziehungen neu entdeckter Agonisten wie N-Methyl-D-Aspartat (NMDA-Rezeptoren),  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxalolpopyrrolidonsäure (AMPA-Rezeptoren) und 2-Carboxy-3-Carboxymethyl-4-Isopropenylpyrrolidin (Kainatrezeptoren) [580] (*Abb. EIN 9*). Jede dieser Gruppen beinhaltet wiederum eine Vielzahl unterschiedlicher Untereinheiten [580] (*Abb. EIN 9*). Die metabotropen Glutamatrezeptoren werden in die Gruppen I, II und III eingeteilt, wobei sich auch hier jede Gruppe aus verschiedenen Rezeptorsubtypen zusammensetzt [580] (*Abb. EIN 9*). Sowohl iono- als auch metabotrope Glutamatrezeptoren sind für die postsynaptische Aktivierung (teilweise auch Hemmung) nachgeschalteter Neurone verantwortlich (*Abb. EIN 9*), dienen aber auch der auto- und / oder parakrinen präsynaptischen Modulation von Neuronen und Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikrogliazellen) [550, 551].

Die ionotropen Glutamatrezeptoren werden je nach Agonistbindung in die Gruppe der NMDA-, AMPA- oder Kainatrezeptoren eingeteilt (*Abb. EIN 9*). Dabei handelt es sich jeweils um heterotetramere Ionenkanäle [551, 580] (*Abb. EIN 10*), deren Untereinheiten einen extrazellulären N- sowie intrazellulären C-Terminus und jeweils vier Transmembrandomänen aufweisen (*Abb. EIN 10*). Alle drei Gruppen ionotroper Glutamatrezeptoren wurden bis *dato* auf Neuronen und Gliazellen des ZNS nachgewiesen [551, 558, 581–583].

Die NMDA-Rezeptoren setzen sich aus acht funktionellen Splice-Varianten (NR-1<sub>A,B</sub>, NR-2<sub>A-D</sub> und NR-3<sub>A,B</sub>) (*Abb. EIN 9*) zusammen [580]. NMDA-Rezeptoren sind zudem permeabel für  $\text{Ca}^{2+} \geq \text{Na}^+ \geq \text{K}^+$ , haben also von allen iGluRs die größte Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  [551, 558]. Darüber hinaus benötigen NMDA-Rezeptoren für ihre Aktivierung eine Depolarisation der neuronalen Zellmembran zur „Beseitigung“ eines internen Magnesiumsions und sind daher eingeschränkt auch spannungsabhängig [551] (*Abb. EIN 10*). NMDA-Rezeptoren zeigen zudem keine Desensibilisierungssphänomene [558].

AMPA-Rezeptoren setzen sich aus jeweils vier Untereinheiten (GluR1-4) zusammen (*Abb. EIN 9*) und bilden dementsprechend Homo- bzw. Heterotetramere, wobei meistens Dimere von Dimeren (z.B. 2 GluR2 und 2 GluR4) vorkommen. Jede Untereinheit weist drei Membrandurchgänge sowie eine kanalbildende Schleife auf, GluR2 spielt dabei eine wichtige Rolle für die Permeabilität des Kanals für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Nur AMPA-Rezeptoren, die keine GluR2 Untereinheit enthalten, sind dementsprechend permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$  [580]. In Hippocampus und *Amygdala* gibt es eine große Population an AMPA-Rezeptoren ohne GluR2 ( $\text{Ca}^{2+}$ -permeabel), wohingegen pyramidale Zellen AMPA-Rezeptoren mit GluR2 Untereinheit besitzen ( $\text{Ca}^{2+}$ -impermeabel) [580]. AMPA-, wie auch Kainatrezeptoren sind grundsätzlich permeabel für  $\text{Na}^+ \geq \text{K}^+ \geq \text{Ca}^{2+}$  [551, 558]. Außerdem zeigen AMPA-Rezeptoren eine sehr rasche Desensibilisierung [558].

Zur Familie der Kainatrezeptoren gehören zwei Gruppen für die Untereinheiten GluR5-7 und KA-1 bzw. -2 (*Abb. EIN 9*). Funktionelle Kainatrezeptoren können dabei nur entstehen, wenn entweder KA-1 oder -2 Untereinheiten einen heteromeren Verband mit Mitgliedern der GluR5-7 Gruppe bilden oder wenn sich Homotetramere der GluR5-7 Gruppe formieren [580]. In Abwesenheit von GluR5-7 werden KA-1 und -2 nicht auf der Zelloberfläche exprimiert, sondern verbleiben im endoplasmatischen

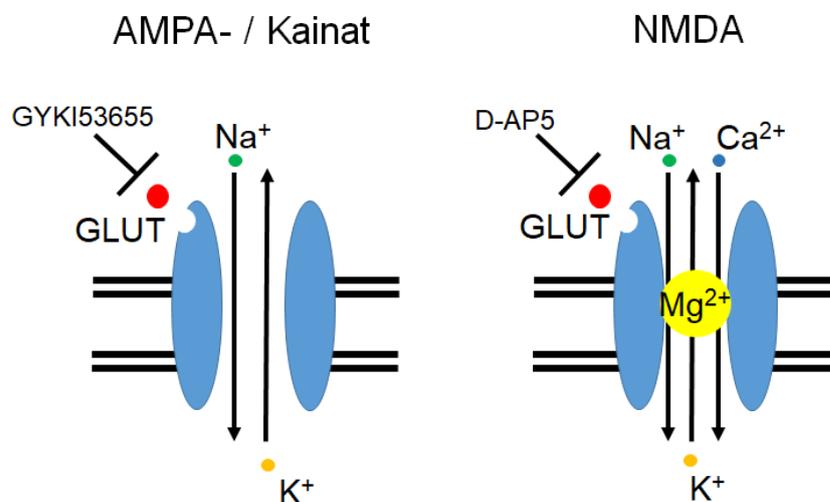
*Reticulum* [580]. Kainatrezeptoren zeigen eine deutlich langsamere Desensibilisierung als AMPA-Rezeptoren [558].

Mittels *in situ* Hybridisierung, Immunhisto- und -zytochemie konnte die Verteilung ionotroper Glutamatrezeptoren im Hypothalamus und extra-hypothalamischen Kerngebieten der Ratte gezeigt werden [582]. Im PVN wurden funktionelle Hinweise für die Expression von NMDA- sowie nicht-NMDA- (also AMPA- und / oder Kainat-) Rezeptoren gefunden, welche für die Regulation des Blutdrucks und die Sympathikusaktivierung von Bedeutung sind [559, 584, 585]. So konnte vor allem mRNA für die NMDA-Rezeptor Splice-Varianten NR-1 und NR-2<sub>B</sub> sowie die Kainatrezeptoruntereinheiten KA-2 und GluR5 nachgewiesen werden [582, 583, 586]. Zudem konnte mittels Mikroapplikationsversuchen *in vivo* gezeigt werden, dass NMDA-Rezeptoren im PVN wichtig für das Trinkverhalten von Ratten sind [587]. Auch für Zellen des SON wurde die Expression von NMDA- und nicht-NMDA-Rezeptoren beschrieben [584, 588]. Für die Region des SON wurden die NMDA-Rezeptor Splice-Varianten NR-1, NR-2<sub>B</sub> und NR-2<sub>D</sub> [582, 586, 589] sowie die Kainatrezeptoruntereinheit KA-2 detektiert [582]. Im Bereich dieser beiden neuroendokrinen Kerngebiete des Hypothalamus mit Bedeutung für die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes sind folgerichtig sowohl NMDA- (NR-1, NR-2<sub>B</sub> und NR-2<sub>D</sub> Splice-Varianten) als auch AMPA- / Kainatrezeptoren an der vermehrten Freisetzung von Vasopressin oder Oxytocin, und für den PVN geltend zudem an der Modulierung der Sympathikusaktivität beteiligt [559, 585, 589, 590]. Den *Nucleus suprachiasmaticus* betreffend, konnten transiente intrazelluläre Calciumsignale durch Agonisten für NMDA- und Kainatrezeptoren in Neuronen ausgelöst werden [591]. In diesem für die Aufrechterhaltung der circadianen Rythmik wichtigen Kerngebiet wurden vor allem die NMDA-Rezeptor Splice-Varianten NR-1 und NR-2<sub>C</sub>, die AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR1 und GluR4 sowie die Kainatrezeptoruntereinheiten GluR5 und GluR6 nachgewiesen [582, 586].

Im für die Kontrolle des Energiehaushaltes und der Reproduktion wichtigen ARC wurden Effekte von Glutamat, induziert über iGluRs, gezeigt [584]. Dabei konnte zum einen die Expression der NMDA-Rezeptor Splice-Varianten NR-1 und NR-2<sub>D</sub>, vor allem aber die Expression der Kainatrezeptoruntereinheiten GluR5-7 primär auf Neuronen, aber auch auf Gliazellen, demonstriert werden [581–583, 586, 592]. Die AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR1 und GluR2 wurden ebenso identifiziert [586].

Zudem konnte im ARC während einer peripheren Inflammation eine erhöhte Expression von NMDA-Rezeptoren (NR-1) festgestellt werden [593].

Im für die Auslösung des Brechreizes und damit die Entfernung potentiell toxischer Stoffe aus dem Organismus wichtigen zirkumventrikulären Organ AP verursachte eine Mikroapplikation von NMDA- und Kainatrezeptoragonisten bei der Ratte eine Erhöhung des Blutdruckes und eine Tachykardie [594]. Dabei scheint in der AP die glutamaterge Wirkung hauptsächlich über NMDA-Rezeptor Splice-Varianten vermittelt zu werden [595]. Für den für die Thermo- und Körperflüssigkeits-Regulation wichtigen MnPO der *Lamina terminalis* konnte die mRNA Expression für die NMDA-Rezeptor Splice-Varianten NR-2<sub>A</sub> sowie die Kainatrezeptoruntereinheit KA-2 gezeigt werden [582]. Im Bereich der *Eminentia mediana* und der POA wurden ebenfalls ionotrope Glutamatrezeptoren detektiert [554, 596]. So kam es durch Aktivierung von AMPA-Rezeptoren in der POA zu einer regulierten Zunahme der Körperkern- und Gehirntemperatur, wobei NMDA-Rezeptoren lediglich eine Erhöhung der Gehirntemperatur induzierten [596].



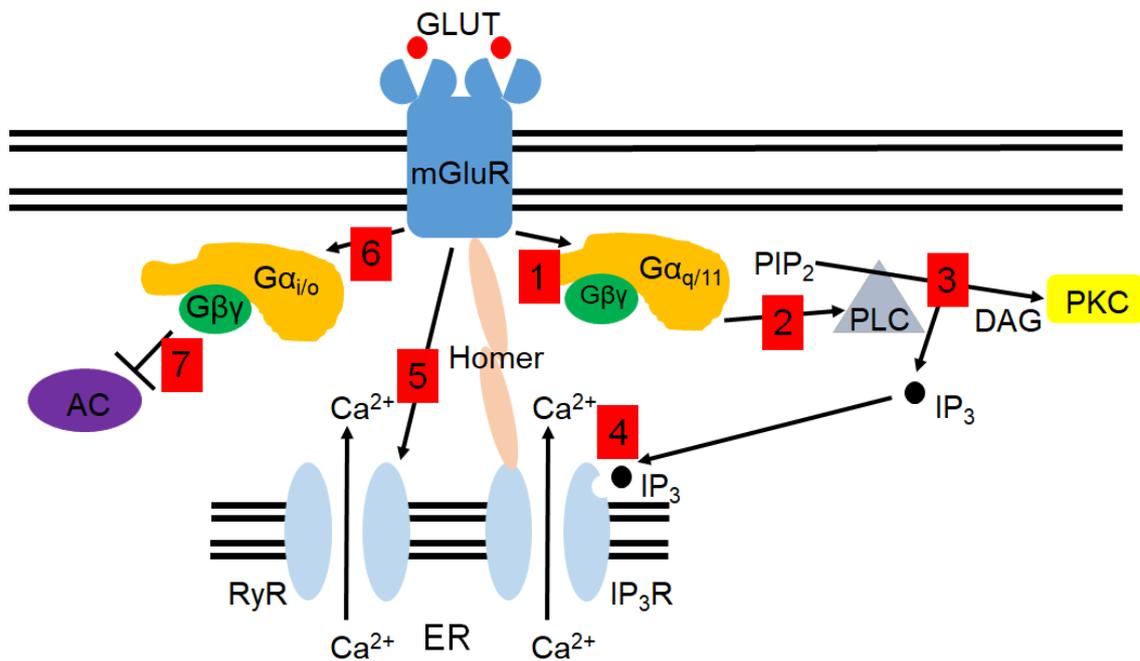
**Abb. EIN 10: Funktion ionotroper Glutamatrezeptoren**

Dargestellt sind ionotrope Glutamatrezeptoren (AMPA- / Kainatrezeptoren und NMDA-Rezeptoren). Nach Bindung des Liganden Glutamat (GLUT) öffnet sich der Ionenkanal und wird im Fall von AMPA- / Kainatrezeptoren permeabel für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und eingeschränkt Ca<sup>2+</sup>. Im Fall der NMDA-Rezeptoren wird durch eine Depolarisation der neuronalen Zellmembran zunächst das Magnesiumion (Mg<sup>2+</sup>) entfernt und der Ionenkanal wird vor allem permeabel für Ca<sup>2+</sup> aber auch für Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>. GYKI53655 und D-AP5 repräsentieren die in dieser Arbeit verwendeten Antagonisten der beiden Rezeptorgruppen.

Die acht bis *dato* bekannten metabotropen, G-Protein gekoppelten Glutamatrezeptoren werden aufgrund ihrer Struktur und der nach Ligandenbindung induzierten intrazellulären Signaltransduktion in drei Gruppen eingeteilt: Die exzitatorisch wirkende Gruppe I sowie die beiden inhibitorisch wirkenden Gruppen II und III [580, 597, 598] (*Abb. EIN 9*). Jede der Gruppen setzt sich dabei aus unterschiedlichen Subtypen der sieben Transmembranhelix-Rezeptoren zusammen. Zur Gruppe I gehören demnach die Rezeptorproteine mGluR1 und mGluR5, zur Gruppe II die Rezeptorsubtypen mGluR2 und mGluR3 sowie zur Gruppe III die Rezeptorsubtypen mGluR4, mGluR6, mGluR7 und mGluR8 (jeder Rezeptorsubtyp hat mehrere Splice-Varianten), wobei mit Ausnahme des mGluR6 (Retina) alle Rezeptorsubtypen im ZNS und peripheren Nervensystem (PNS; nozizeptives System) exprimiert werden [580, 597, 598]. Die Funktion metabotroper Glutamatrezeptoren umfasst dabei einerseits die synaptische Übertragung durch langsame postsynaptische Erregung (Gruppe I); andererseits sind sie präsynaptisch an regulatorischen Prozessen zur neuronalen Erregbarkeit, synaptischen Übertragung und neuronalen Plastizität beteiligt (Gruppen I bis III) [580]. Dabei finden sich Rezeptoren der Gruppe I bereits früh postnatal vor allem postsynaptisch in somatodendritischen Bereichen, wohingegen die Rezeptoren der Gruppen II und III primär präsynaptisch in axonalen Bereichen und Axonendingungen detektiert wurden [580, 599].

Metabotrope Glutamatrezeptoren gehören zur *G-protein coupled receptor* Familie (GPCR) wie auch GABA<sub>B</sub>-, Pheromon- und Ca<sup>2+</sup>-messende Rezeptoren sowie die meisten Rezeptoren für hydrophile Hormone. Sie sind ausnahmslos mit einem membran-assoziierten heterotrimeren G-Protein aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit gekoppelt [580, 598] (*Abb. EIN 11*). Extrazellulär weisen mGluRs einen doppelt gelappten N-Terminus auf, welcher als Venusfliegenfalle fungiert und Glutamat bindet [580, 598] (*Abb. EIN 11*). Dieser N-Terminus ist über eine Cystein-reiche Region mit der transmembranösen heptahelikalen GPCR-Domäne verbunden und vermittelt die Aktivierung des G-Proteins [580]. Ein intrazellulärer C-Terminus reguliert die Aktivität des Rezeptors durch Interaktionen mit Calmodulin und Strukturproteinen wie z.B. Homer-Proteinen [580] (*Abb. EIN 11*). Die beiden Vertreter der Gruppe I (mGluR1 und mGluR5) agieren nach Bindung von Glutamat vorrangig exzitatorisch postsynaptisch und aktivieren über G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>-Proteine die PLC [580, 598] (*Abb. EIN 11*). Dadurch kommt es zur Hydrolyse von Membran-intrinsischen Phospholipiden wie PiP<sub>2</sub> und somit zur Bildung von IP<sub>3</sub> und DAG. IP<sub>3</sub> bewirkt eine Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus

intrazellulären Speicherorganellen (endoplasmatisches *Reticulum*) und eine Aktivierung der PKC [598, 600, 601] (Abb. EIN 11). Zur Mobilierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER kommt es dabei durch die Aktivierung von  $\text{IP}_3$ - und Ryanodinrezeptoren auf der Oberfläche des ERs [600] (Abb. EIN 11).  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung und PKC-Aktivierung können auch über alternative Signalwege vermittelt werden. So kann mGluR1 direkt eine Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bewirken [600]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in manchen Neuronen auch der ERK- (*extracellular receptor kinase*) bzw. MAPK- (*mitogen activated protein kinase*) Signalweg aktiviert wird [598, 600].



**Abb. EIN 11: Intrazelluläre Signaltransduktion metabotroper Glutamatrezeptoren**

Dargestellt ist ein metabotroper Glutamatrezeptor. Nach Bindung des Liganden Glutamat (GLUT) wird bei mGluRs der Gruppe I ein intrazelluläres G-Protein aktiviert (1). Die  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert eine Phospholipase C (PLC) (2), welche dann Phosphoinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu  $\text{IP}_3$  und DAG hydrolysiert (3). Diacylglycerol (DAG) aktiviert die Proteinkinase C (PKC).  $\text{IP}_3$  bindet an seinen  $\text{IP}_3$ -Rezeptor am endoplasmatischen *Reticulum* (ER) und bewirkt die Öffnung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals (4). Zudem aktiviert der mGluR-Rezeptor (Gruppe I) einen Ryanodinrezeptor (RyR), welcher ebenfalls einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER bewirkt (5). Handelt es sich bei dem mGluR um einen Rezeptor der Gruppe II oder III, so wird nach Ligandenbindung ein anderes G-Protein aktiviert (6), welches dann die Adenylatcyclase (AC) inhibiert (7).

Zudem kann die Aktivierung von mGluR1 durch Tyrosin-Phosphorylierung einer Adhäsionskinase und vermittelt durch einen PLC- und  $\text{Ca}^{2+}$  / Calmodulin-Signalweg einen direkten Effekt auf das Zytoskelett der Zellen haben [600]. In jedem Fall führt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung und Aktivierung der PKC zu einer Aktivierung der Phospholipase D sowie Induktion mehrerer Proteinkinase Signalwege (Casein-Kinase 1, Jun-Kinase

sowie MAPK / ERK und MTOR/p70 S6-Kinase (*mammalian target of rapamycin/p70 S6*). Dabei erwies sich vor allem der MAPK / ERK / MTOR p70 S6- Kinase Signalweg als wichtig für die Regulation synaptischer Plastizität durch mGluRs [598]. Rezeptoren der Gruppen II und III hemmen die membranständige Adenylatcyklase über G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-Proteine [580, 598] (*Abb. EIN 11*). Sie sind auch in der Lage, Ionenkanäle durch die Freisetzung der  $\beta/\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins direkt zu regulieren [598]. Außerdem sind auch für die Gruppen II und III alternative Signalwege (MAPK) sehr wahrscheinlich [598].

Die Expression der exzitatorischen metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I (mGluR1 und mGluR5) konnte auf mRNA Niveau und auf Proteinebene für viele hypothalamische und extra-hypothalamische Kerngebiete nachgewiesen werden. So scheinen mGluRs der Gruppe I im LH der Ratte an der Regulation des Fressverhaltens, im SON an der Regulation neurosekretorischer Zellen, im SCN an der zirkadianen Rythmik und im PVN an der Aufrechterhaltung des peripheren Gefäßtonus in Ruhe beteiligt zu sein [588, 591, 602–605]. Der mGluR1 wurde dabei vor allem in Dendriten, Zellkörpern und Axonen des medullären NTS, des *Nucleus ambiguus* [606] sowie des ARC [607, 608] der Ratte mittels Immunzytochemie und *in situ* Hybridisierung detektiert [601]. Die Expression beider Splice-Varianten (mGluR1 $\alpha$  und mGluR1 $\beta$ ) wurde für die Kerngebiete ARC, SCN, SON und PVN nachgewiesen [584, 609–612]. Der mGluR5 wurde ebenfalls in hypothalamischen Kerngebieten wie dem SCN, PVN und lateralen Hypothalamus nachgewiesen [613–616]. Parvozelluläre Neurone des PVN mit Bedeutung für die hypothalamo-hypophyse-adrenale (HHA) Stressachse bewirkten nach zentraler Mikroapplikation eines Gruppe I spezifischen Rezeptoragonisten (3,5-DHPG) eine gesteigerte HHA Aktivierung und adrenale Glukokortikosteroidfreisetzung [600, 617]. Andere Autoren beschreiben im Gegensatz dazu eine mGluR (Gruppe I) induzierte präsynaptische Hemmung der HHA-Achse [618]. Metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppen II und III konnten nur in geringem Maße in hypothalamischen Kerngebieten identifiziert werden. Im SCN wurde eine Expression von mGluR2 und mGluR3 gezeigt [613] und für SON und PVN wurde die Expression von mGluR4, mGluR7 und mGluR8 beschrieben [604]. Extrahypothalamisch wurde mGluR4 auch im *Cerebellum*, im Hippocampus und in den Basalganglien detektiert [598].

In mehreren Gehirnarealen bzw. Kerngebieten ergeben sich teilweise komplexe Interaktionen zwischen iono- und metabotropen Glutamatrezeptoren [620, 621, 621,

622]. So können Agonisten des mGluR1 die NMDA-Rezeptor vermittelte Aktivierung von Neuronen vermutlich durch die PLC-spezifische Signalkaskade potenzieren [620]. So steigerten aktivierte Gruppe I mGluRs die Öffnungswahrscheinlichkeit von NMDA-Rezeptoren durch Aktivierung der PLC, wobei zumindest ein Teil dieser Potenzierung durch einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  und der damit verbundenen Stimulation der PKC ausgelöst wurde [620]. Zudem wurde eine direkte Interaktion zwischen mGluRs der Gruppe I mit Kainatrezeptoren beschrieben [621]. Auch hier bestand die Interaktion vor allem in der Aktivierung der PKC durch mGluR-Agonisten der Gruppe I [621]. Des Weiteren gibt es direkte Interaktionen zwischen mGluRs und AMPA- bzw. NMDA-Rezeptoren. Zum einen konnten G-Proteine die PLC aktivieren, welche dann wiederum eine Mobilisierung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  und Aktivierung diverser Kinasen (u.a. PKC) bewirkte [622]. Zum anderen könnten iGluRs (AMPA, NMDA) mit mGluRs unter Beteiligung postsynaptischer Gerüstproteine (Homer-Proteine) mittels verschiedener Signal-Kaskaden (Shank / SAPAP / PSD95-Komplex) verbunden sein [622]. In den *melanin concentrating hormone* immunpositiven Neuronen des ARC mit Bedeutung für die Regulation der HHA-Achse und der Nahrungsaufnahme führte eine kombinierte Stimulation beider Gruppe I Rezeptorsubtypen mit 3,5-DHPG sowohl *per se* zu einer schnellen Depolarisation als auch zu einer lange anhaltenden Sensibilisierung der Zellen gegenüber NMDA-Rezeptoragonisten [623].

Glutamat stellt einen wichtigen exzitatorischen Neurotransmitter neuronaler Afferenzen zum SFO und Efferenzen vom SFO zu anderen hypothalamischen Kerngebieten dar [587, 624–629]. Eine bedeutende glutamaterge Afferenz stammt dabei aus der für die kardiovaskuläre Regulation wichtigen caudo-ventrolateralen *Medulla* (CVLM) [624, 625]. Ein weiterer wichtiger Anteil der glutamatergen Afferenzen hat seinen zellulären Ursprung im Bereich des wie das SFO zur *Lamina terminalis* gehörenden OvLTs und MnPOs [557, 630]. In elektrophysiologischen Studien an Gehirnschnitten der Ratte konnte eine Stimulation von SFO-intrinsischen Neuronen sowohl durch die Aktivierung ionotroper als auch metabotroper Glutamatrezeptoren gezeigt werden [628, 631–633]. Glutamat erhöhte dabei die neuronale Erregbarkeit SFO-spezifischer Neurone und verringerte die Erregbarkeit inhibitorischer GABAerger Neurone [632]. Zudem kam es durch den Einsatz von Agmatin (NMDA-Antagonist) zu einer verringerten Aktivierung glutamaterger Neurone im SFO [633]. Die Glutamattransporter EAAT1 / GLAST sowie vGLUT2 konnten in hoher Dichte im SFO nachgewiesen werden und deuten neben der afferenten auch auf eine mögliche intrinsische

glutamaterge Innervation von Neuronen und Gliazellen des SFOs hin [553, 634–636]. EAAT2 (GLT1) konnte hingegen nur in sehr geringer Ausprägung in SFO-spezifischen Zellen detektiert werden [634, 637]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine optogenetische Aktivierung glutamaterger Neurone des SFOs in der Maus das Trinkverhalten stimulierte, die Aktivierung GABAerger SFO-intrinsischer Neurone hingegen zu einer Hemmung der Trinkantwort führte [557, 629]. Glutamat stimulierte zudem die SFO-intrinsische Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) und Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) als volatilem Gasotransmitter in Neuronen des SFOs bzw. dessen Diffusion aus Afferenzen des medialen *Septum* oder MnPOs zum SFO [631, 638, 639]. Das aus Neuronen des SFOs freigesetzte NO könnte dazu dienen, diese und andere Neurone des SFOs vor Übererregung zu schützen [631]. An der ACh-Freisetzung im SFO scheinen NMDA- und Kainatrezeptoren beteiligt zu sein, wobei die nicht-NMDA-Rezeptoren den cholinergen Input vom medialen *Septum* potenzieren [638]. Außerdem können nNOS exprimierende Neurone aus dem OvLT und MnPO über NMDA-Rezeptoren aktiviert werden [640]. Zahlreiche glutamaterge SFO-spezifische Neurone exprimieren zudem selbst nNOS sowie den für ANG II spezifischen AT<sub>1</sub>-Rezeptor und projizieren zu OvLT, SON, MnPO und PVN [629].

## 1.5 Fragestellungen und Ziele der Promotionsarbeit

Das erste Ziel der hier vorliegenden Promotionsarbeit ist der funktionelle und zellspezifische Nachweis eines SFO-intrinsischen Renin-Angiotensin Systems (RAS) der Ratte, welches der hypothalamischen Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie der Kreislaufregulation dient. Hierfür bedarf es zunächst der Etablierung einer neuro-glialen SFO-spezifischen Primärzellkultur, welche unter Zuhilfenahme immunzytochemischer Nachweismethoden hinsichtlich der vorkommenden Zelltypen und deren quantitative Erfassung sowie der Expression der Neurotransmitter Glutamat,  $\gamma$ -Aminobuttersäure und des Enzyms neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase charakterisiert wird. Die so charakterisierte neuro-gliale Primärzellkultur des SFOs wird dann in Calcium-Imaging Versuchen mit Fura-2 als fluoreszierendem Calciumchelator einer funktionellen Analyse unterzogen. Ziel dieser funktionellen Untersuchung ist es, durch den Einsatz von bestimmten Enzyminhibitoren die biologische Aktivität von Schlüsselenzymen eines SFO-intrinsischen RAS (Renin, ACE, Cathep-

sine und Chymasen) nachzuweisen, sowie die Responsivität von Neuronen und Astrozyten des SFOs auf Angiotensin-Präkursoren bzw. -peptide (Angiotensinogen, ANG (1-12), ANG I und ANG II ) zu analysieren. Des Weiteren sollen RAS-Komponenten (Aogen, ACE, ANG II) mittels Immunzytochemie in Primärzellkulturen des SFOs sowie der jeweils exprimierende Zelltyp eruiert werden. Der Einsatz quantitativer *real-time* PCR soll den Nachweis für die Expression der mRNAs bestimmter RAS-Komponenten (Aogen, Renin, ACE, Chymasen, Cathepsine) erbringen.

Das zweite Ziel besteht in der Charakterisierung Glutamat-induzierter intrazellulärer Calciumsignale sowie der beteiligten Rezeptorproteine in der SFO-spezifischen Primärzellkultur der Ratte. Calcium-Imaging Versuche sollen zunächst zeigen, dass Glutamat zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Neuronen und Astrozyten der Primärzellkultur führen kann und dass diese Calciumsignale repetitiv auslösbar sind, ohne zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren zu führen. Anschließend wird zum einen eine Dosis-Wirkungs-Kurve für Glutamat erstellt und zum anderen die Herkunft des Calciums (extra- vs. intrazellulär) in Neuronen und Astrozyten geklärt werden. In anschließenden Calcium-Imaging Versuchen wird unter Einsatz spezifischer Antagonisten für vorrangig metabotrope (mGluRs), limitiert auch ionotrope (iGluRs) Glutamatrezeptoren untersucht, welche Rezeptorsubtypen für die Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration in Zellen des SFOs verantwortlich sind. Dabei kommen vorrangig Agonisten und Antagonisten für metabotrope Rezeptoren der Gruppe I sowie Antagonisten für NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoren zum Einsatz. Mittels Immunzytochemie und quantitativer *real-time* PCR wird die Expression der beiden im Calcium-Imaging charakterisierten metabotropen Rezeptorsubtypen mGluR1 und mGluR5 auf Protein- und mRNA-Ebene erfasst. Die durch Glutamat aktivierten Neurone der SFO-spezifischen Primärkultur werden durch immunzytochemisches „*transmitter coding*“ charakterisiert.

Als drittes Ziel soll die SFO-Primärzellkultur in Calcium-Imaging Versuchen einer Superfusionsstimulation mit dem erst 2013 entdeckten Neuropeptid Phoenixin unterzogen und durch Phoenixin etwaig ausgelöste Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration erfasst werden. Zusätzlich soll untersucht werden, inwieweit Phoenixin die in *Ziel zwei* erfassten Calciumsignale durch Superfusionsstimulation mit Glutamat zu modulieren vermag.

Das vierte Ziel besteht darin, in Analogie zum SFO des Säugetiers funktionelle Studien bezüglich eines intrinsischen RAS im *Organum subseptale* (SSO) des Huhnes durchzuführen. Dafür muss zunächst die *de novo* Etablierung einer neuro-glialen Primärzellkultur des SSOs aus dem Gehirn früh postnataler Hühnerküken erfolgen. Zur Optimierung der Kulturbedingungen werden zunächst Zellpräparationen des gesamten Hypothalamus durchgeführt. Beide Kulturen werden im Anschluss an die erfolgreiche Etablierung hinsichtlich ihrer Zelltypen und deren quantitativer Verteilung immunzytochemisch charakterisiert. Um die funktionelle Vitalität der Primärzellkultur (Hypothalamus und SSO) zu zeigen, werden diese in Calcium-Imaging Versuchen einer Superfusionsstimulation mit Glutamat unterzogen. In der SSO-spezifischen Primärzellkultur sollen mittels Calcium-Imaging Versuchen und dem Einsatz spezifischer Inhibitoren für ACE und ANG II Rezeptoren Komponenten eines SSO-intrinsischen RAS nachgewiesen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Materialien

#### Technische Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	2540 E	Systec, D-Wettenberg
Bipolarer Temperaturfühler	CL-100	Warner Instruments, Hamden, CT, USA
Eismaschine	Icematic F120 und D100	CastelMAC SpA., Castelfranco Veneto, Italien
Heißluftsterilisator	ED 115/E2	Binder GmbH, D-Tuttlingen
Kühlkammer	EP200ED	Viessmann, D-Allendorf
Laborspülmaschine	22-02	Rübesam, D-Genthin
Magnetrührer	PTFE-ummantelt	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Mikrozentrifuge	Force 7	Denver Instrument, Bohemia, NY, USA
Minizentrifuge	D-6015	neoLab, D-Heidelberg
pH-Meter	inoLab <sup>®</sup> 7110	WTW GmbH, D-Weilheim
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, D-Fernwald
Reinstwasseranlage	Elix3 Essential und Milli-Q Biocel	Millipore GmbH, D-Schwalbach
Schüttelapparat	3006	GFL GmbH, D-Burgwedel
Schüttelapparat	Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, D-Schwabach
Schüttelapparat	RotoMix Typ 50800	Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA
Thermoblock	Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik GmbH, D-Gehrden
Thermoblock	QBT	VWR, D-Darmstadt
Tischrühr- und Heizgerät	RCT Basic	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co, KG, D-Staufen
Vortexmischer	VF und VF2	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co, KG, D-Staufen
Waagen zum Abwiegen von Trockensubstanzen	P1210N, AE 50 und PM 2500	Mettler Toledo, D-Gießen
Wärmeschrank	T5050 EK	Medizin- und Labortechnik H. Kretschmer, D-Gießen
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech GmbH, D-Osterode
Zentrifuge	Spectrafuge mini	Neo Lab, D-Heidelberg

**Gebrauchsmaterialien**

<b>Gebrauchsmaterial</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Computerprogramme	Adobe Photoshop, Version 6.0	Adobe Systems GmbH, D-Unterschleißheim
	Graph Pad Prism®, Version 5.0	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
	Windows Microsoft Word, Version 6.0	Microsoft Corporation, D-München
	Windows Microsoft Excel, Version 6.0	Microsoft Corporation, D-München
	Citavi 5	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Glasgefäße	Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Stehkolben, Meßzylinder	MAGV Laborbedarf, D-Rabenau
Objektträgermappen		MAGV, D-Rabenau
Pipetten	20 / 200 / 0,5-2 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipetten	8-Kanal, 0,1-2,5 / 0,5-2 / 2-10 / 2-20 / 10-100 / 20-200 / 100- 1000 / 200-1000 / 500- 2500 µl	Eppendorf AG, D-Hamburg

**Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Alufolie	0954.1	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Einmalhandschuhe Latex	No. 1202	Unigloves Arzt- und Klinikbedarf Handgesellschaft mbH, D-Troisdorf
Einmalkanülen	Sterican® 0,9x40 mm, 20 G	Braun, D-Melsungen
Einwegspritzen	BD Plastipak	Becton-Dickinson, D-Heidelberg
Faltenfilter	604 ½ (Ø 240 mm)	Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel
Kimtech Science Delicate Task Wipes	7216	Kimberly-Clark Europe Ltd., Surrey, UK
Kimtech Science Precision Wipes	7552	Kimberly-Clark Europe Ltd., Surrey, UK

Parafilm®		Roth, D-Karlsruhe
Pipettenspitzen ohne Filter	1-2,5 / 10 / 100 / 1000 µl	Sarstedt AG und Co. KG, D-Nümbrecht
Reaktionsgefäße	0,5 1,5 2 und 5 ml	Eppendorf AG, D-Hamburg
Röhrchen, steril	15 und 50 ml	Sarstedt, D-Nümbrecht
Serologische Pipetten	1, 5, 10 und 25 ml	Sarstedt, D-Nümbrecht
Sterilfilter	FP 30/0,2 CA-S	Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel

## Chemikalien

Chemikalie	Typ	Hersteller
Äthanol	vergällt	Schmidt, D-Dillenburg
	unvergällt	Merck, D-Darmstadt
Kalibrierlösungen pH-Meter	Qualilab Pufferlösung pH 6, 8 + 9, 27	Kleinfeld Labortechnik, D-Hannover
Trockeneis		Cleanas GmbH und Co. KG, D-Willingen

## 2.2 Versuchstiere

### 2.2.1 Ratten

Als Versuchstiere wurden Wistar-Ratten der institutseigenen Zucht (§11 Genehmigung) verwendet. Für die *in vitro* Imaging Versuche in der primären Zellkultur des *Organum subfornicale* wurden vier bis sechs Tage alte Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts eingesetzt. Die Aufzucht der Ratten erfolgte in transparenten Polycarbonat-Käfigen (Typ III) bei einer Raumtemperatur von  $23 \pm 1$  °C, einem Beleuchtungsregime von 12:12 Stunden (7:00/19:00 Uhr) Licht : Dunkel und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 %. Wasser und Futter (Altromin Rattenzuchtfutter) standen *ad libitum* zur Verfügung und als Einstreu wurde Altromin *animal bedding* eingesetzt. Nach Erreichen des Absetzgewichtes von  $110 \pm 10$  g wurden Ratten, die nicht neonatal für Zellkulturstudien eingesetzt wurden, nach Geschlechtern getrennt und in Gruppen von bis zu fünf Tieren in große Polycarbonat-Käfige (Typ IV) umgesetzt. Unter diesen Haltungsbedingungen verblieben die Tiere bis sie ihrerseits für die Zucht eingesetzt wurden. Vor Versuchsbeginn wurden durch das RP Hessen die durchzuführenden Tiertötungen als Anzeige genehmigt (Projektnummern M\_540 und M\_580).

**Tierhaltung**

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Einstreu für Tierkäfige	Altromin animal bedding	Altromin GmbH & Co KG, D-Lage-Lippe
Standard Rattenfutter	Standard Rattenfutter R-Z V1324-000	Sniff, D-Soest
Tierfutter	Zucht-Diätfutter	Altromin GmbH & Co KG, D-Lage-Lippe
Transparente Polycarbonat-Käfige	Typ III (28 x 42 x 15 cm) Typ IV (38 x 59 x 18 cm)	FA. Dipl.-Ing W. Ehret GmbH, D-Emmerdingen

**2.2.2 Eintagsküken**

Als Versuchstiere wurden Küken der Spezies *Gallus gallus domesticus*, sogenannten Legehybriden, verwendet. Für die *de novo* Etablierung einer neuro-glialen Primärzellkultur des vogelspezifischen *Organum subseptale* (SSO) wurden Küken beiderlei Geschlechts am Tag eins nach dem Schlupf (=P1), sogenannte Eintagsküken, verwendet. Das Ausbrüten sowie der Schlupf der Eintagsküken erfolgte in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische (KVRAF) der JLU Gießen. Die befruchteten Bruteier wurden von der Firma VALO BioMedia GmbH (Osterholz-Scharmbeck) an die Virologie der KVRAF geliefert. Anschließend erfolgte das Ausbrüten der Eier in einem Inkubator der Firma Hemel (Typ Top Profi 310). Zunächst fand eine Vorbrut von Embryonaltag eins (=E1) bis 18 (=E18) bei einer Inkubationstemperatur von 37,8 °C statt, im Anschluss daran von Tag E18 bis Tag E21 die Schlupfbrut bei 37,0 °C. Nach dem Schlupf wurden die Eintagsküken in einer belüfteten Styroporbox mit einer Grundfläche von 400 cm<sup>2</sup> (Temperatur 25 - 30 °C) von der KVRAF in das Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie verbracht und in dieser für wenige Minuten bis zur Tötung belassen. Vor Versuchsbeginn wurden durch das RP Hessen die durchzuführenden Tiertötungen als Anzeige genehmigt (Projektnummer M\_680).

**2.3 Etablierung neuro-glialer Primärkulturen des rattenspezifischen SFOs und des vogelspezifischen SSOs****Technische Geräte (zusätzlich zu Kap. MM 2.1)**

Gerät	Typ	Hersteller
Absaugpumpe	Minni A	Leybold-Heraeus, D-Hanau
Stereomikroskop	Stemi SV 11	Carl Zeiss AG,

Gerät	Typ	Hersteller
Stereomikroskop mit Kamera	SMZ-U	D-Oberkochen Nikon Deutschland, D-Düsseldorf
Brutschrank	NuAire™ USAutoflow	NuAire Inc., Plymouth, MN, USA
Inverses Mikroskop	Fluovert FU	Leica Microsystems, D-Wetzlar
Schwanenhalslampe	KL 1500	Schott AG, D-Mainz
Sicherheits-Bunsenbrenner	Fireboy eco	Integra Biosciences GmbH, D-Fernwald
Sterilbank	Microflow Biological Safety Cabinet	Thermo Scientific, D-Dreieich
Thermoblock	Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik GmbH, D-Gehrden

### Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Operationsbesteck	Irisschere Nabelschnurschere nach Schuhmacher Pinzette anatomisch Pinzette chirurgisch Pinzette klein gebogen Skalpell Spatel	Aesculap-Werke AG, D-Tuttlingen
Petrischale	Glas, Ø 15 cm	MAGV, D-Rabenau

### Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Deckgläschen	15x15 mm Stärke 1 (für Zellkultur)	Menzel GmbH, D-Braun- schweig
Grid-Coverslips	25 x 25 mm CELL-VU DRM800	Millennium Sciences, New York, NY, USA
Klingen für Aesculap Rasiermesser		Aesculap Werke AG, D-Tuttlingen
Pasteurpipetten	230 mm aus Glas	MAGV, D-Rabenau
Petrischalen	(Plastik) 100 x 20 und 35 x 10 mm	Sarstedt, D-Nümbrecht
Zählkammer Neubauer		Brand GmbH + CO KG, D-Wertheim
Zellkulturkammer	flexiPerm micro 12, Volu- men: 0,35 ml/Komparti- ment	Greiner-Bio One GmbH, D-Frickhausen

**Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
B 27 Supplement		Invitrogen, San Diego, CA, USA
Carbogen		Messer Griesheim GmbH, D-Neuried
Dispase I		Roche Diagnostics, D-Mannheim
EDTA (Ethyldiamintetra-essigsäure)		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gewebekleber	Histoacryl B.	Braun, D-Melsungen
Gey`s Balanced Salt Solution (GBSS)		Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
D-Glukose		Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin		Biochrom, D-Berlin
Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)		Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES Lösung		PAA, Pasching, Österreich
Neurobasal-A Medium		Invitrogen, San Diego, CA, USA
Penicillin / Streptomycin		Biochrom, D-Berlin
Poly-L-Lysin		Biochrom, D-Berlin
Sauerstoff		Messer Griesheim GmbH, D-Neuried
Steriles Wasser für Zellkultur		PAA, Pasching, Österreich
True Blue		MoBiTec, D-Göttingen

**2.3.1 Lösungen für die Zellkulturpräparation****Neurobasal-A / B27 Medium**

Dieses supplementierte aber serumfreie Medium ist hervorragend dazu geeignet, primäre Nervenzellen mit hohem Differenzierungsgrad zu kultivieren [641]. Neurobasal-A Medium wurde steril aus der Originalpackung (50 ml) entnommen und diesem 1 ml B 27 (2 %), 0,5 ml Penicillin / Streptomycin (100 µg/ml) sowie 0,5 ml Glutamin (2 mM / L) zugesetzt. Diese Lösung wurde am Tag der Zellpräparation auf 37°C erwärmt und als Zellkulturmedium eingesetzt.

### **Gey's Balanced Salt Solution (GBSS)**

GBSS (100 ml), welchem zuvor D-Glukose (1 %) zugesetzt wurde, wurde steril aus der Originalverpackung (500 ml) entnommen und in zwei sterile 50 ml Röhren überführt und auf Eis gekühlt. Der Verschluss wurde mit einer sterilen Kanüle zweimal perforiert und GBSS über einen vorgeschalteten Sterilfilter und ein Schlauchsystem, welches mit einer Sauerstoffdruckflasche verbunden war, für ca. 20 min oxygeniert. GBSS wurde zum einen für die Kühlung der entnommenen Gehirne und angefertigten Hirnschnitte verwendet, zum anderen sorgte es für eine ausreichende Versorgung der Zellen im Gewebeverband mit Sauerstoff und D-Glukose.

### **Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)**

HBSS (50 ml) wurde steril aus der Originalverpackung (500 ml) entnommen und 1,6 ml HEPES (20 mM / L; 3,2 %) hinzugefügt. Die Lösung wurde in ein steriles 50 ml Röhren überführt und der Verschluss mit einer sterilen Kanüle zweimal perforiert. Danach wurde HBSS auf Eis gekühlt und mittels einer Kanüle mit Sterilfilter über ein Schlauchsystem, welches mit einer Sauerstoffdruckflasche verbunden war, für ca. 20 Minuten oxygeniert. HBSS wurde zum Ansetzen der Dispase-Lösung, der EDTA-Lösung (Inaktivierungslösung) sowie zur Kühlung und Versorgung der zu dissoziierenden Gewebestücke mit Sauerstoff eingesetzt.

### **Dispase I-HBSS Gebrauchslösung**

Hierfür wurde Dispase I (30 I.U. / ml) mit HBSS auf eine Enzymaktivität von 2 I.U./ml verdünnt und in Aliquots zu je 1000 µl bei -20 °C eingefroren. Diese Aliquots wurden jeweils vor der Zellkulturpräparation aufgetaut und als Dispase I-HBSS Gebrauchslösung für die enzymatische Dissoziation der präparierten SFO- bzw. SSO-spezifischen Gewebeproben eingesetzt.

Um die calciumabhängige Dispase zu inaktivieren, wurden 100 µl EDTA (1 mM / L; 1 %) zu 10 ml HBSS hinzugefügt und diese als EDTA-HBSS Lösung verwendet.

## **2.3.2 Etablierung einer neuro-glialen Primärzellkultur zirkumventrikulärer Organe**

Zur detaillierten *in vitro* Analyse wichtiger Botenstoffe (Renin-Angiotensin System und Glutamat) inklusive ihrer membranständigen Rezeptoren und nachgeschalteter

intrazellulärer Signalwege (intrazelluläres Calcium) in einer sensorischen zirkumventrikulären Organstruktur des Säuger- bzw. Vogelgehirns stellte die Etablierung primärer neuro-glialer Zellkulturen eine unabdingbare Voraussetzung dar.

### **2.3.2.1 Neuro-gliale Primärzellkultur des *Organum subfornicale* (Ratte)**

Die funktionelle Charakterisierung einzelner Zellen der rattenspezifischen Primärzellkultur des *Organum subfornicale* wurde hauptsächlich an Neuronen und Astrozyten durchgeführt. In dem im Folgenden beschriebenen Verfahren zur Herstellung einer neuro-glialen Primärzellkultur des SFO muss davon ausgegangen werden, dass es sich um eine „SFO-angereicherte Kultur“ handelte. Aufgrund der geringen Größe dieses CVOs konnte nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen an „Fremdgewebe“ (beispielsweise der dorsal lokalisierten hippocampalen Kommissur) kopräpariert wurden. Bedingt durch die latero-ventrale Juxtaposition des SFOs zum *Liquor cerebrospinalis* wird die Zellkultur dennoch im Folgenden als „neuro-gliale Primärzellkultur des SFOs“ bezeichnet. Die Erstetablierung von neuro-glialen Primärzellkulturen hypothalamischer bzw. medullärer Strukturen des Rattengehirns fand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Gerstberger am Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung (Bad Nauheim) von 1994 - 2000 statt. Auf Grundlage der in dieser Zeit erarbeiteten Protokolle zur Herstellung primärer Zellkulturen für das SFO sowie das OvLT [642, 643] wurden am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der JLU von 2000 bis *dato* erfolgreich primäre neuro-gliale Zellkulturen für den MnPO [644–647], das OvLT [648, 649], den PVN [645], den ARC [650] sowie für die AP [649, 651, 652] etabliert. Die dabei erlangten Erfahrungen und aufgezeichneten Daten dienten zur Re-Etablierung einer primären neuro-glialen Zellkultur des SFOs, welche dieser Arbeit zugrunde liegt.

### **2.3.2.2 Neuro-gliale Primärzellkultur des Hypothalamus sowie des *Organum subseptale* des Huhns**

Zur Durchführung von *in vitro* Versuchen zur funktionellen Charakterisierung des wichtigen Botenstoffs ANG II in einem dem SFO der Ratte analogen, sensorischen zirkumventrikulären Organ des Vogelgehirns war die Etablierung sowohl einer primären neuro-glialen Zellkultur des Hypothalamus als auch des *Organum subseptale* aus Gehirnen von Eintagsküken unabdingbar. Die Erstpräparation der neuro-glialen Primärzellkultur des gesamten Hypothalamus frisch geschlüpfter Hühnerküken

diente dabei der Gewinnung grundlegender experimenteller Daten für die nachfolgende *de novo* Etablierung einer Primärzellkultur des vogelspezifischen SSOs. Funktionelle Studien wurden im Wesentlichen an Neuronen und Astrozyten durchgeführt. Aufgrund der geringen Größe des SSOs und dessen unmittelbarem Kontakt zu anderen neuro-glialen Strukturen kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Präparation geringe Anteile benachbarter Kerngebiete (NHpC) kopräpariert wurden. Deshalb handelte es sich auch in diesem Fall um eine „SSO-angereicherte neuro-gliale Primärzellkultur“, im Folgenden dennoch als „neuro-gliale Primärzellkultur des SSOs“ bezeichnet. Die Primärzellkultur des gesamten Hypothalamus betreffend wurde vornehmlich eine in der AG Gerstberger 2016 etablierte Präparationstechnik des Rückenmarks früh postnataler Ratten in modifizierter Form eingesetzt [647, 653]. Bei der in *Kap. MM 2.3.2.6* beschriebenen Präparationstechnik des aviären SSOs wurde im Wesentlichen die in *Kap. MM 2.3.2.4* dargestellte Präparationstechnik des rattenspezifischen SFOs verwendet. Da bis zur Erstellung dieser Arbeit keinerlei Erfahrungen bei der Etablierung neuro-glialer Primärzellkulturen des Hühirns vorlagen, musste dabei auf die Erfahrungen für neuro-gliale Primärzellkulturen des Rattengehirns (*Kap. MM 2.3.2.1*) zurückgegriffen werden.

### **2.3.2.3 Vorbereitung der Zellkulturkammern**

Um eine bestmögliche Sterilität während der Zellpräparation zu gewährleisten, wurden sämtliche Schritte unter einer *laminar flow* Sterilbank durchgeführt. Für die Kultivierung der Zellen, wurde ein miniaturisiertes Kultursystem benutzt. Dieses bestand aus einer runden Flexiperm®-Mikrokammer (Durchmesser 6 mm, Grundfläche 28 mm<sup>2</sup> bei einem Gesamtvolumen von 350 µl). Den Boden dieses Inkubationssystems stellte ein mit einem Koordinatensystem versehenes Deckgläschen (CELL-VU *grid coverslip*) für Calcium-Imaging bzw. ein normales Deckgläschen für immunhistochemische Analysen dar. Beide Deckgläschen bestanden aus Borosilikatglas, welches sich besonders für die Adhäsion von Zellen eignet. Die CELL-VU *grid coverslips* weisen außerdem optimale optische Eigenschaften für die Studien zur kontinuierlichen Messung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_{iz}$ ) auf. Der Grund dafür liegt in der hohen Durchlässigkeit von Licht bis zu einer Wellenlänge von 290 nm, bei vernachlässigbarer sphärischer und chromatischer Aberration. Um Adhäsion und Differenzierung der Zellen zu begünstigen, wurden die Mikrokulturkammern mit 20 µl Poly-L-Lysin befüllt und im Anschluss für 12 Stunden lichtgeschützt und steril bei 4°C inkubiert. Um die Zellen vor Membranschäden, verursacht durch das Poly-L-Lysin,

zu schützen, wurden die Zellkulturkammern anschließend mit sterilem Reinstwasser gewaschen. Danach wurden die Zellkulturkammern bis zum Kultivieren der Zellen bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt.

#### **2.3.2.4 Präparation des *Organum subfornicale* früh postnataler Ratten**

Die Präparation des Gehirns der vier bis sechs Tage alten neonatalen Ratten erfolgte mit äthanol- oder hitzesterilisierten Instrumenten. Zur Präparation wurden drei bis fünf neonatale Ratten mit einer scharfen Schere dekapitiert und der jeweilige Kopf für wenige Sekunden in 4 °C kaltes Äthanol (70 %) zur Oberflächendesinfektion überführt. Im Anschluss daran wurde der Kopf aus dem Äthanol in eine sterile Petrischale aus Glas verbracht und mit einer Pinzette in den medialen Augenwinkeln fixiert. Die Kopfhaut wurde mit einem sterilen Skalpell durchtrennt und mit einer Pinzette abgezogen. Anschließend wurde die Schädelkalotte mit Hilfe einer Irisschere eröffnet und mit einer Pinzette entfernt. Das nun freiliegende Gehirn wurde mit einem zweiten Skalpell in einen anterioren (Großhirn inklusive *Diencephalon*) und einen posterioren (Hirnstamm mit *Cerebellum*) Anteil getrennt. Der anteriore Anteil wurde unter Zuhilfenahme eines sterilen Spatels in eine Petrischale (Ø 35 mm), welche mit oxygeniertem GBSS befüllt war, überführt und bis zur finalen Feinpräparation auf Eis gelagert.

Mit Hilfe zweier Spatel wurde die caudale Schnittfläche des *Prosencephalon* mit Gewebekleber (Histoacryl) auf einem Teflonblock fixiert, welcher in eine mit 4 °C kaltem, oxygenierten GBSS gefüllte Plexiglaskammer (5 x 8 x 12 cm ; H x B x L) eingespannt wurde. Diese wurde in die Führungsschiene des Vibratoms eingeführt. Mit diesem wurden serielle, coronale Schnitte (500 µm) des Vorderhirns (*Tel-* und *Diencephalon*) hergestellt und in oxygeniertes GBSS auf Eis überführt. Unter einem Binokular (Stereomikroskop) wurde das SFO aus dem entsprechenden coronalen Gehirnschnitt steril mit einer Irisschere und Pinzette herauspräpariert und anhängende Komponenten des *Plexus choroideus* vorsichtig entfernt. Das isolierte SFO wurde in einer Petrischale mit oxygeniertem HBSS auf Eis bis zur enzymatischen Behandlung aufbewahrt. Zur zielsicheren Präparation des SFOs diente seine topographische Position im Bezug auf den dritten Ventrikel sowie die benachbarten Blutgefäße des *Plexus choroideus*. Um nun die Zellen aus dem Gewebeverband zu vereinzeln und die interzellulären Verbindungen zu lösen, wurde eine Kombination aus proteolytischer und enzymatischer Dissoziation gewählt [642, 643]. Hierfür wurden zunächst

die SFO-Explantate bei 37 °C für ca. 40 Minuten in 1 ml Dispase I-HBSS Gebrauchslösung (2 I.U. / ml) und ständiger Oxygenierung inkubiert. Dieses Verfahren sollte eine Erleichterung der anschließenden mechanischen Dissoziation durch unvollständiges Lösen des Gewebeverbandes bzw. interzellulärer Verbindungen bewirken, ohne dabei die Plasmamembran der Zellen zu beschädigen [654, 655]. Die enzymatische Dissoziation der SFO-Explantate wurde durch sequentielles dreimaliges Waschen mit 37 °C warmer EDTA-HBSS Lösung sowie 37 °C warmem Neurobasal-A Medium gestoppt. Daraufhin folgte die milde mechanische Dissoziation durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einer 1 ml Eppendorf-Pipette. Von der nun vorhandenen Zellsuspension wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellzahl pro Volumeneinheit bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 50.000 Zellen / ml mit Neurobasal-A Medium verdünnt und jeweils 350 µl der Suspension in die auf 37 °C vorgewärmten Zellkulturkammern verbracht, welche dann bei 37 °C und einem Gasmisch aus Luft und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator aufbewahrt wurden. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium erneuert, um Zellfragmente und nicht adhäsive Zellen zu entfernen. Die SFO-spezifischen Primärkulturen wurden für drei bis fünf Tage zur Differenzierung im Inkubator belassen und im Anschluss sowohl für die immunozytochemische Charakterisierung von Zelltypen und Neuronenspezifischen Transmittersystemen als auch für verschiedene Calcium-Ratio-Imaging Versuche zur funktionellen Charakterisierung der intrinsischen Renin-Angiotensin und Glutamat-Systeme im SFO herangezogen.

#### **2.3.2.5 Etablierung einer neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Küken**

Die *de novo* Präparation hypothalamischer neuro-glialer Primärzellkulturen des Eintagsküchens erfolgte analog zur in *Kap. MM 2.3.2.4* dargestellten Präparationstechnik mit äthanol- und hitzesterilisierten Instrumenten. Es wurden pro Präparation drei Eintagsküken mit einer scharfen Schere dekapitiert und der jeweilige Kopf für einige Sekunden in 4 °C kaltes Äthanol (70 %) zur Oberflächendesinfektion überführt. Anschließend wurde der Kopf in eine sterile Petrischale aus Glas verbracht und mit Hilfe einer Pinzette am Schnabel fixiert. Die Kopfhaut wurde samt Federn mit einem sterilen Skalpell durchtrennt und mit einer chirurgischen Pinzette entfernt. Die Schädelkalotte wurde dann mittels einer Irisschere eröffnet und mit einer Pinzette vorsichtig abgelöst. Das frei liegende Gehirn wurde nach Durchtrennung der Sehnerven in

eine sterile Petrischale überführt, deren Boden mit einem GBSS-getränkten Filterpapier ausgelegt war. Mit der ventralen Oberfläche des Gehirns nach oben zeigend wurde das Kleinhirn mit einer sterilen Stechklinge in einem Winkel von 45° hinter dem Hypophysenstiel (*Infundibulum*) abgetrennt. Anschließend wurde mit der sterilen Stechklinge unmittelbar vor dem Hypophysenstiel eine *Inzisur* gesetzt und ein ca. zwei mm dicker coronaler Gehirnschnitt auf Höhe des Hypothalamus angefertigt. Dieser wurde in eine sterile Petrischale mit oxygeniertem GBSS überführt.

Unter einem Binokular wurde die Region des Hypothalamus aus dem coronalen Gehirnschnitt unter sterilen Kautelen mit einer Irisschere und Pinzette herausgeschnitten, in acht etwa gleich große Gewebefragmente zerteilt und in einer mit oxygeniertem HBSS gefüllten Petrischale auf Eis bis zur enzymatischen Behandlung aufbewahrt. Dabei diente der dritte Hirnventrikel zur topographischen Orientierung. Um möglichst viele Zellen aus dem Gewebeverband sowie deren interzelluläre Verbindungen zu lösen, wurde eine Kombination aus enzymatischer und mechanischer Dissoziation verwendet. Da es sich um eine *de novo* Präparation handelte, wurden zur Optimierung drei verschiedene Enzym-Kombinationen eingesetzt. Alle enzymatischen Prozesse fanden bei 37 °C und ständiger Oxygenierung statt.

- 1) Der Hühner Hypothalamus wurde in einer Mischung aus Dispase I (5 mg / ml) und Collagenase (2,5 mg / ml) für 20 Minuten enzymatisch verdaut.
- 2) Der Enzymmix aus Dispase I und Collagenase wurde 1:2 mit HBSS verdünnt und für 40 Minuten eingesetzt.
- 3) Die in *Kap. MM 2.3.2.4* verwendete Dispase I-HBSS Gebrauchslösung kam für 30 Minuten zum Einsatz.

Die Gewebefragmente wurden im Anschluss an den enzymatischen Verdau mit Hilfe einer Pipette vorsichtig mechanisch dissoziiert und die enzymatische Dissoziation mit 37 °C warmer EDTA-HBSS Lösung gestoppt. Anschließend wurde die jeweilige Zellsuspension für zwei Minuten bei 175 g pelletiert und der Überstand mit Gewebefragmenten abgenommen. Das Zellpellet wurde in DMEM, versetzt mit B27 (2 %), Glutamin (2 mM / L), Penicillin / Streptomycin (100 µg / ml) und 10 % fötalem Kälberserum, gelöst und ein zweites Mal zentrifugiert. Nach Rezentrifugieren wurde das Zellpellet in 1,0 ml DMEM gelöst. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Volumeneinheit wurden 10 µl der Suspension in eine zuvor vorbereitete Neubauer-Zählkammer überführt. Die Zellsuspension wurde final auf 50.000 Zellen pro ml mit DMEM verdünnt

und jeweils 350 µl der Suspension in eine auf 37 °C vorgewärmte Zellkulturkammer pipettiert. Die Zellkulturkammern wurden anschließend bei 37 °C und einem Gasgemisch aus Luft und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach zwei Stunden wurde das Kulturmedium (DMEM) gegen serumfreies Neurobasal-A Medium getauscht; dies diente unter anderem dem Entfernen von Zellfragmenten und nicht-adhäsiven Zellen. Die hypothalamischen neuro-glialen Primärzellkulturen wurden für drei bis vier Tage zur Differenzierung im Inkubator belassen und im Anschluss für funktionelle *in vitro* Studien herangezogen.

### **2.3.2.6 Präparation des *Organum subseptale* von Eintagsküken**

Die *de novo* Präparation von Primärzellkulturen des *Organum subseptale* (SSO) aus Gehirnen von Eintagsküken erfolgte analog zu dem in *Kap. MM 2.3.2.4* beschriebenen Vorgehen. Dabei wurden, wie in *Kap. MM 2.3.2.5* beschrieben, je Präparationstag drei Eintagsküken dekapitiert und das jeweilige Gehirn entnommen. Nach Transfer des jeweiligen Gehirns in eine sterile Petrischale (der Boden war wieder mit einem Filterpapier und oxygeniertem GBSS bedeckt) wurde es mit einer sterilen Stechklunge in eine anteriore (Großhirn inklusive *Diencephalon*) und eine posteriore (Hirnstamm mit *Cerebellum*) Komponente getrennt. Nach Erzeugung einer glatten Anschnittfläche für den anterioren Anteil wurde die craniale Schnittfläche mittels zweier Spatel und Gewebekleber (Histoacryl) auf einem Teflonblock fixiert, welcher in eine mit 4 °C kaltem, oxygeniertem GBSS gefüllte Plexiglaskammer eingespannt wurde. Nachfolgend wurde das auf den Teflonblock geklebte Gehirn mit Hilfe einer sterilen Stechklunge zu einem Dreieck zugeschnitten, wobei die Spitze des Dreiecks durch das *Chiasma opticum*, also den ventralen Teil des Gehirns, gebildet wurde. In einem Vibratom wurden im Anschluss serielle, coronale Schnitte (500 µm) des Vorderhirns hergestellt und jeweils in oxygeniertes GBSS auf Eis überführt.

Unter einem Binokular wurde das SSO jeweils aus einem dieser coronalen Gehirnschnitte mittels einer Irisschere und Pinzette steril herauspräpariert. Als *landmarks* dienten dabei zum einen die Lage des dritten Gehirnventrakels, zum anderen die *Commissurae anterior* und *posterior*. Die SSOs von jeweils drei Eintagsküken wurden nach der Präparation in einer sterilen Petrischale, gefüllt mit oxygeniertem HBSS, bis zur enzymatischen Behandlung auf Eis aufbewahrt. Die SSO-Explantate wurden, analog zu der in *Kap. MM 2.3.2.4* beschriebenen Präparationstechnik, einem enzymatischen Verdau in 1,0 ml Dispase I-HBSS Gebrauchslösung (2 I.U. / ml) bei

ständiger Oxygenierung und 37 °C unterzogen. Im Anschluss wurde die enzymatische Dissoziation durch dreimaliges Waschen mit 37 °C warmer EDTA-HBSS Lösung gestoppt, die SSO-Explantate dreimalig mit 37 °C warmem Neurobasal-A Medium gewaschen und zuletzt vorsichtig mit einer Pipette mechanisch dissoziiert. Die Zellzahl der so entstandenen Zellsuspension wurde bestimmt und auf 50.000 Zellen pro ml mit Neurobasal-A Medium verdünnt. Die Zellkulturkammern (350 µl) wurden mit dieser Zellsuspension befüllt, für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, und dann ein Medienwechsel zur Entfernung von Zellfragmenten und nicht adhärenen Zellen durchgeführt. Nach drei bis vier Tagen Inkubation wurden die Zellen für immunzytochemische Charakterisierungen von Zelltypen und für Calcium-Ratio-Imaging Versuche herangezogen.

## 2.4 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Fura-2 AM Ratio-Imaging Technik

**Technische Geräte** (zusätzlich zu Kap. MM 2.1)

Gerät	Typ	Hersteller
Calcium-Imaging System bestehend aus:		Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
digitale schwarz/weiß Kamera	Spot Pursuit, Model 23.0	Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
Fililterrad und Steuereinheit	MAC 5000	Ludl Electronic Products Ltd, New York, NY, USA
Fluoreszenzlampe	BH2-RFL-T3	Olympus Optical, D-Hamburg
Inverses Mikroskop	IMT-2	Olympus-Optical D-Hamburg
Kompressor	Silent 30	MAGV GmbH, D-Rabenau
Kondensor	IMT-NAC 2	Olympus Optical D-Hamburg
Schwingungsfreier Tisch	WS-5	TMC, Peabody, MA, USA
Teflon Zellkultur Mess- kammer		Werkstatt Kerckhoff Insti- tut, D-Bad Nauheim
Wechselspannungs- stabilisator		Wandel & Goltermann, D-Reutlingen
Hahnenbank		AG Gerstberger, D-Gießen
Peltier Kühlung		Werkstatt Kerckhoff Insti- tut, D-Bad Nauheim

Gerät	Typ	Hersteller
Schlauchpumpe	Minipuls-3	Abimed Analysen Technik GmbH, D-Langenfeld
Solution In-Line Heater/Cooler Two Line		Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA

### Gebrauchsmaterialien (zusätzlich zu Kap. MM 2.1)

Gebrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Computerprogramm	MetaFluor Version 7.7.8	Diagnostic Instruments Visitron Systems, D-Puchheim
Glasgefäße	Verschiedene Durchmesser mit Polycarbonateinsätzen	W.G. Kerckhoff-Institut, D-Bad Nauheim

### Chemikalien

Chemikalie	Typ	Hersteller
Aliskiren hemifumarate		Tocris Bioscience, D-Wiesbaden-Nordensstadt
[Ile <sup>5</sup> ]Angiotensin I		Sigma-Aldrich, D-München
[Asp <sup>1</sup> ,Val <sup>5</sup> ,Ser <sup>9</sup> ]Angiotensin I		Sigma-Aldrich, D-München
[Ile <sup>5</sup> ]Angiotensin II		Sigma-Aldrich, D-München
[Val <sup>5</sup> ]Angiotensin II		Bachem, D-Weil am Rhein
[Sar <sup>1</sup> ,Ile <sup>8</sup> ]Angiotensin II		Bachem, D-Weil am Rhein
[Ile <sup>5</sup> ]Angiotensin (1-12)		Bachem, D-Weil am Rhein
Angiotensinogen (Aogen) Tetradecapeptid		Eurogentec, Fremont, CA, USA
Calciumchlorid		Merck, D-Darmstadt
Captopril		Sigma-Aldrich, D-München
Chymostatin		Bachem, D-Weil am Rhein
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fura-2 Acetyl-Methyl(AM)ester (Fura-2 AM)		MoBiTec GmbH, D-Göttingen
L-Glutamat	Monosodium-Salz	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

GYKI 53655 Hydrochlorid		Tocris Bioscience, D-Wiesbaden-Norden- stadt
HEPES Natriumsalz	(N-(2-Hydroxyethyl)-Piper- azin-N-(2-Ethansulfon- säure)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	KCl	Merck, D-Darmstadt
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Merck, D-Darmstadt
MTEP Hydrochlorid		Tocris Bioscience, D-Wiesbaden-Norden- stadt
Natriumchlorid	NaCl	Merck, D-Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)		Merck, D-Darmstadt
Phoenixin (1-14)		Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA
Phoenixin (1-20)		Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA
[ <sup>125</sup> J] [Tyr <sup>0</sup> ] Phoenixin (1-20)		Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA
Phosphate buffered saline tablets (PBS)		Sigma Aldrich, D-Mün- chen
(S)-3,5 DHPG		Tocris Bioscience, D-Wiesbaden-Norden- stadt
YM-202074 Sequifumarat Hydrat		Sigma Aldrich, D-Mün- chen

## 2.4.1 Lösungen für Ratio-Imaging Messungen

### Calciummesspuffer

Der für das Calcium-Imaging eingesetzte Calciummesspuffer wurde wie folgt hergestellt:

Die entsprechende Menge Reinstwasser (5 L) wurde mit HEPES Natriumsalz (5 mM / L), NaCl (130 mM / L), D-Glukose (10 mM / L), KCl (5 mM / L), MgCl<sub>2</sub> (1 mM / L) und CaCl<sub>2</sub> (1,25 mM / L) in der jeweils passenden Menge gemischt. Dieser Puffer wurde für alle Calcium-Imaging Messungen zur Erfassung der intrazellulären Calciumkonzentration verwendet.

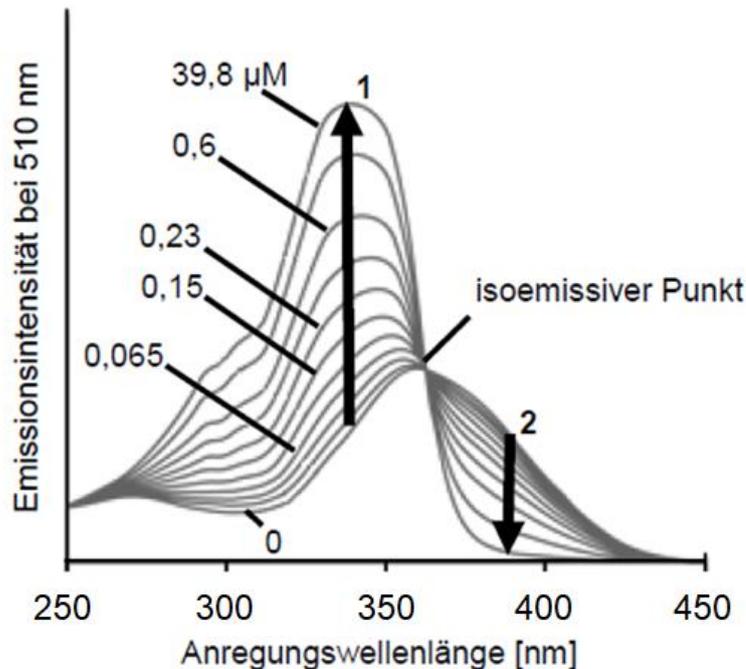
### 2.4.2 Grundlagen der Calcium-Ratio-Imaging Technik

Der Einsatz der Ratio-Imaging Technik dient der kontinuierlichen Messung der Konzentration freier intrazellulärer Ionen wie Calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in einzelnen Zellen verschiedener Gewebe und somit auch des zentralen Nervensystems [656, 657]. Die Transmitter-induzierte intrazelluläre Signalübertragung kann dabei durch diese Technik effizient in kultivierten Zellen neuronaler Strukturen (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikrogliazellen und Tanyzyten) untersucht werden [579, 601, 642, 645–652, 658–663].

Die experimentelle Grundlage zur Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  bilden selektive  $Ca^{2+}$ -chelierende Fluoreszenzfarbstoffe [664]. Der erste wissenschaftlich genutzte Indikator zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentration im Rahmen der Kontraktion isolierter Muskelfasern war das aus der Quallenart *Aequora forskolea* isolierte Aequorin [665]. Heute stehen zur Bestimmung der  $[Ca^{2+}]_i$  eine Vielzahl von Indikatoren, wie zum Beispiel Derivate des Fluoresceins (z.B. Fluo-3), des Rhodamins (z.B. Rhod-2) sowie des EGTA's (z.B. Quin-2, Indo-1, Fura-2) zur Verfügung [666]. Sie werden in die beiden Gruppen der Wellenlängen-ändernden (*wavelength shifting*) und der Wellenlängen-stabilen (*wavelength stable*) Fluorochrome eingeteilt. Wellenlängen-ändernde Fluoreszenzindikatoren bezeichnet man auch als radiometrische Fluoreszenzfarbstoffe. Hier kommt es bei Calciumbindung zur Verschiebung ihrer maximalen Exzitations- und Emissionsspektren [664, 667–671]. Das in dieser Arbeit eingesetzte Fura-2, dessen Exzitationsmaximum in der calciumfreien Form bei einer Wellenlänge von 363 nm liegt, gehört ebenfalls zur Gruppe der Wellenlängen-ändernden Fluoreszenzfarbstoffe. Die calciumgesättigte Form des Farbstoffs weist ein Anregungsmaximum bei 335 nm auf. Das Emissionsmaximum beider Fura-2 Isoformen ändert sich nicht und bleibt bei etwa 510 nm konstant (calciumfreies Fura-2: 512 nm, calciumbindendes Fura-2: 505 nm) [668, 670] (*Abb. MM 1*). Charakteristisch für die Wellenlängen-stabilen Fluoreszenzfarbstoffe wie Quin-2, Rod-2 oder Fluo-Indikatoren ist, dass sich bei Calciumbindung lediglich die Emissionsintensität, nicht aber die Emissions- und Exzitationsspektren ändern.

Zur Messung der Emissionsintensität wird gängigerweise eine Anregungswellenlänge (ARW) für die calciumgesättigte Fura-2 Isoform von 340 und für die calciumfreie Isoform von 380 nm gewählt. Die ARW von 380 nm anstelle von 363 nm für die Exzitation des calciumfreien Fura-2 wird aufgrund der Nähe der optimalen ARW zum

isoemissiven Punkt (358 nm) des Fura-2 spezifischen Spektralverhaltens gewählt, an welchem die Fluoreszenzintensität des Fura-2 Signals unabhängig von der  $[Ca^{2+}]_i$  ist [672]. Bei einer ARW von 340 nm hingegen ist die Differenz der Fluoreszenzemission für calciumfreies und calciumgesättigtes Fura-2 größtmöglich (Abb. MM 1).



**Abb. MM 1: Emissionsspektren von Fura-2 in Abhängigkeit von der vorhandenen Konzentration an freien Calciumionen**

Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei 510 nm in Anwesenheit steigender Konzentrationen freier Calciumionen [ $\mu\text{M}$ ] und in Abhängigkeit von der ARW [nm].

Kurve 1: Fura-2 calciumbeladen; Emissionsmaximum bei 340 nm

Kurve 2: Fura-2 calciumfrei; Emissionsmaximum bei 380 nm

Pfeile: Emissionsintensitäten bei ARW 340 und 380 nm. Die Differenz der Fluoreszenzintensität für calciumfreies und -gebundenes Fura-2 ist hier am größten.

Modifiziert nach O'Connor & Silver (2007) und Pollatzek (2016)

Bei der Ratio-Imaging Technik wird der Quotient  $[\text{Emission (340 nm ARW)} / \text{Emission (380 nm ARW)}]$  aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei beiden ARWs rechnerisch ermittelt. Dieser stellt das Verhältnis (Ratio) von calciumgesättigtem zu freiem Fura-2 dar [673].

Der Einsatz von Wellenlängen-ändernden Fluoreszenzindikatoren ist gegenüber Wellenlängen-stabilen vorteilhaft, da die Ratio-Bildung aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei Anregung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen es ermög-

licht, Faktoren, welche die Messungen negativ beeinflussen können, in ihrer Bedeutung zu minimieren. Dadurch werden die Messungen unabhängig von Faktoren wie der intrazellulär vorhandenen Menge an Indikatorsubstanz, einer gegebenenfalls ungleichmäßigen Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes sowie der Zelldicke und den Effekten des Ausbleichens (*photo bleaching*) oder Austretens des Fluorochroms [668, 673]. Gemäß dem Massenwirkungsgesetz verhält sich die Ratio proportional zur Konzentration an vorhandenem freien bzw. gebundenen Calcium. Unter Zuhilfenahme der folgenden Gleichung [666] kann aus dem im Versuch ermittelten Quotienten die absolute intrazelluläre Calciumkonzentration  $[(Ca^{2+})_{iz}]$  berechnet werden:

$$[Ca^{2+}]_{iz} = KD \times ((R - R_{min}) / (R_{max} - R)) \times (Sf2/Sb2)$$

**Formellegende:**

- KD = Dissoziationskonstante des Fura-2 für Calcium (145 nmol/l)
- R = Ratio der Emissionsintensitäten bei 340 nm und 380 nm
- R<sub>min</sub> = Ratio bei calciumfreiem Fura-2
- R<sub>max</sub> = Ratio bei calciumgesättigtem Fura-2
- Sf2 = *Proportionalitätskoeffizienten* des Ca<sup>2+</sup>-freien Fura-2 (ARW von 380 nm)
- Sb2 = *Proportionalitätskoeffizienten* des Ca<sup>2+</sup>-gesättigten Fura-2 (ARW von 380 nm)

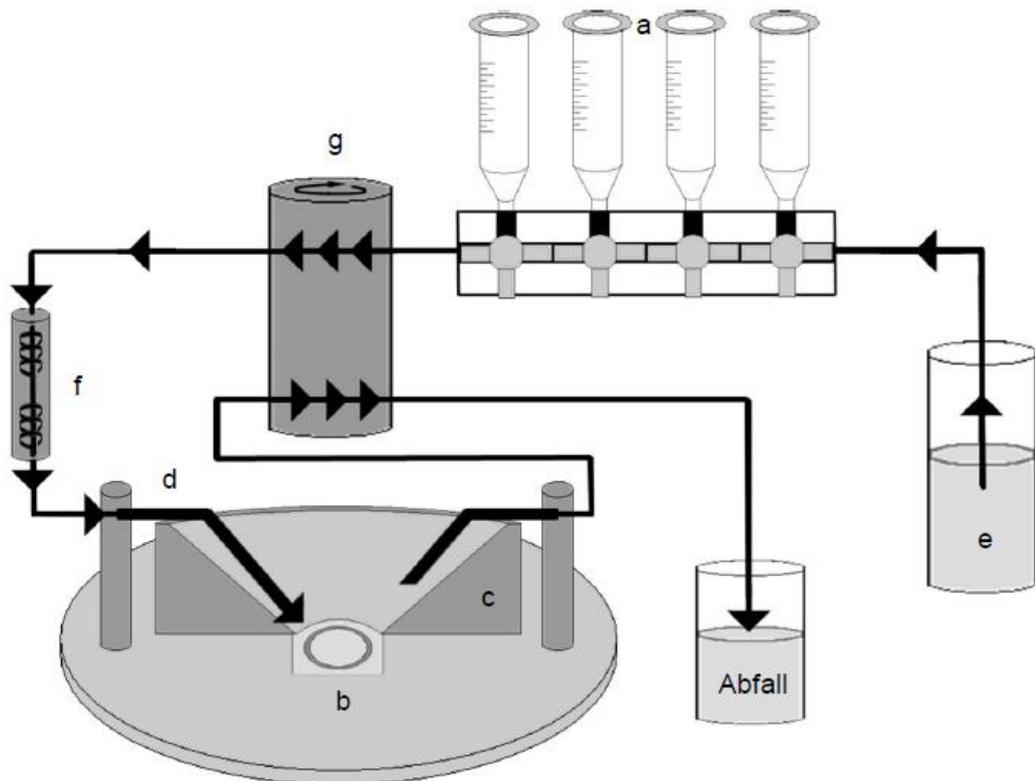
In der hier vorliegenden Arbeit wurde die absolute  $[Ca^{2+}]_{iz}$  aus den ermittelten Ratio-Werten allerdings nicht errechnet. Es wurde nur die jeweilige Amplitude der Ratio-änderung ( $\Delta$ Ratio) als quantifizierbares Zeichen einer zellulären Reaktion herangezogen. Es wurde Fura-2 als Indikatorfarbstoff gewählt, um die Responsivität von Neuronen und Astrozyten der SFO- sowie SSO-spezifischen Primärzellkulturen auf bestimmte Neuromodulatoren des Renin-Angiotensin Systems (RAS) wie Angiotensinogen (Aogen), Angiotensin (1-12) (ANG (1-12)), Angiotensin I und II (ANG I / II) sowie den klassischen Neurotransmitter Glutamat (GLUT) oder das erst kürzlich entdeckte Neuropeptid Phoenixin (Phoe) [674, 675] im Rahmen der hypothalamischen Kontrolle homöostatischer Regelkreise anhand einer transienten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{iz}$  zu analysieren. Da es sich bei Fura-2 um ein hydrophiles Molekül handelt, ist es nicht in der Lage, die Zellmembran zu permeieren. Um dennoch eine Beladung der zu untersuchenden Zellen zu gewährleisten, wurde das Acetoxymethylester-Derivat Fura-2 AM eingesetzt. Da Fura-2 AM amphiphil und ungeladen ist, kann es die Zellmembran ohne Zellschädigung durchdringen. Allerdings ist es nicht in der Lage Calciumionen zu binden. Deshalb wird Fura-2 AM in der Zelle durch zytoplasmati-

sche Esterasen hydrolysiert. Das freigesetzte Fura-2 verbleibt membran-impermeabel in der Zelle und bindet an seinen negativ geladenen Carboxylgruppen zweiwertige Kationen, vor allem freies Calcium, reversibel.

### 2.4.3 Messstand für die Calcium-Imaging Versuche

Die Ratio-Imaging Versuche zur kontinuierlichen Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  in der neuroglialen Primärzellkultur des SFOs (Ratte) bzw. SSOs (Huhn) wurden an einem Messstand durchgeführt, der sich aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop, einem Filterrad mit Filtern für 340 und 380 nm, einem Shutter, einem Steuerrad für Filter und Shutter, einer 14-bit-CCD-Restlichtkamera, einer Messkammer und einer Quecksilberdampf-Lampe als Lichtquelle zusammensetzte (*Abb. MM 2*). Ein CELL-VU Deckglas, welches mittig auf der konzentrischen, runden Öffnung ( $\varnothing$  11 mm) einer Stahlscheibe platziert und mit Hilfe eines Teflonringes, welcher gleichzeitig die Außenwand der Messkammer darstellte, befestigt wurde, bildete den Boden der gesamten Messkammer. An zwei gegenüberliegenden Seiten der Messkammer befanden sich Anschlüsse für Zu- und Abfluss des Messpuffers, um die auf dem Deckglas adhärenen Zellen zu superfundieren (*Abb. MM 2*).

Die neuroglialen Zellkulturen des SFOs respektive SSOs wurden mittels Quecksilberlampe und des rotierenden Filterrads alternierend mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm belichtet. Filterrad und Shutter wurden über eine Steuereinheit elektronisch reguliert, welche es ermöglichte, sowohl Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes, Belichtungszeit und Abstand zwischen zwei Belichtungen einzustellen. Durch den Filter erzeugtes, nahezu monochromatisches Licht wurde mit Hilfe des dichromatischen Spiegels des Inversmikroskopes und ein Fluoreszenzobjektiv in die Messkammer geleitet, wo es das intrazelluläre Fura-2 zur Lichtemission anregte. Das von Fura-2 emittierte Licht wurde aus der Messkammer wieder zurück durch Fluoreszenzobjektiv, einen 515 nm-Sperfilter und den dichromatischen Spiegel in eine 14-bit-CCD-Restlichtkamera gelenkt. Die Kamera übermittelte daraufhin alle fünf Sekunden ( $=0,2$  Hz) ein Bild an den Computer. Die Auswertung der bei den unterschiedlichen ARWs (Fura-2: 340 / 380 nm) dokumentierten Bilder erfolgte mit der systemeigenen Metafluor-Software, welche aus den resultierenden Werten die Fluoreszenz-Ratiowerte (Emission bei 340 nm ARW / Emission bei 380 nm ARW) ermittelte.



**Abb. MM 2: Schematischer Aufbau des Superfusions-Systems zur Stimulation der neuro-glialen Zellen der SFO- (Ratte) bzw. SSO-(Huhn) angereicherten Primärkultur.**

Für die funktionelle Charakterisierung einzelner Komponenten des SFO- bzw. SSO-intrinsischen RAS sowie der in den Zellen exprimierten Glutamaterezeptoren wurden verschiedene Vorläuferpeptide des ANG II in Ab- bzw. Anwesenheit spezifischer Enzyminhibitoren sowie Glutamat in Ab- bzw. Anwesenheit subtypspezifischer Rezeptorantagonisten über eine Drei-Wege Hahnenbank (a) im Schlauchsystem direkt in die Messkammer, bestehend aus CELL-VU Deckglas (b) und Teflonring (c), eingeleitet. Zur Temperierung des Messpuffers wurde zwischen der Messpuffer-zuführenden Kanüle (d) und dem Puffer-Reservoir (e) ein elektronisch regulierbares Heizelement (f) geschaltet. Mit Hilfe der Schlauchpumpe (g) und des Heizelementes wurde eine gleichbleibende Füllung der Messkammer von 1,0 ml, und eine stabile Temperatur ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) in der Kammer bei kontinuierlichem Pufferwechsel ermöglicht.

Modifiziert nach Hatzelmann (2012) und Pollatzek (2016)

#### 2.4.4 Vorbereitung der Versuchsdurchführung

Die neuro-glialen Zellen der SFO- bzw. SSO-angereicherten Primärzellkulturen wurden jeweils drei bis vier Tage nach der Präparation der Zellen für die Ratio-Imaging Versuche herangezogen. Zur Charakterisierung des SFO- bzw. SSO-intrinsischen Renin-Angiotensin Systems (Ratte bzw. Huhn) sowie funktionell exprimierter Glutamaterezeptoren (Ratte) bzw. ANG II spezifischer Rezeptoren (Huhn) wurden die zu untersuchenden Zellen mit  $2 \mu\text{M}$  Fura-2 AM (Stocklösung:  $1 \text{ mM} / \text{L}$  in DMSO) in Neurobasal-A Medium (Verdünnung  $1 : 500$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ CO}_2$  für 30 bis 45

Minuten im Brutschrank inkubiert und unmittelbar vor Versuchsbeginn in das in *Abb. MM 2* dargestellte Messsystem verbracht. Hierfür wurde zunächst das CELL-VU Glas, auf welchem sich die beladenen, adhärenen Zellen befanden, von der FlexiPerm-Kammerwand gelöst und in die Messkammer, deren Boden es bildete, eingespannt. Im Anschluss daran wurde die Messkammer in eine hierfür vorgesehene Öffnung des Objektisches am Inversmikroskop eingesetzt, sowohl Zu- und Ablauf der Schlauchpumpe waren mittels zweier Kanülen an der Kammer sichergestellt. Mit einer konstanten Flussrate von 2 ml / Minute konnten über diese Kanülen Messpuffer oder in Messpuffer gelöste Testsubstanzen aus ihrem Reservoir (Applikationsspritze der Hahnenbank) in die Messkammer eingeleitet bzw. aus dieser abgesaugt werden. Unter Zuhilfenahme eines elektronisch regulierbaren Peltier-Elementes, welches zwischen Puffer-Reservoir bzw. Hahnenbank und die zuführende Kanüle geschaltet war, konnte die Temperatur von Messpuffer und Testsubstanzen dem Messprotokoll entsprechend in der Messkammer konstant gehalten werden. Heizelement und Schlauchpumpe dienten sowohl der Gewährleistung einer gleichbleibenden Temperatur ( $\pm 0,5$  °C) als auch einer gleichbleibenden Füllung der Messkammer (1,0 ml) bei kontinuierlichem Pufferwechsel und minimaler Bildung von Turbulenzen [648–650].

#### **2.4.5 Versuchsdurchführung**

Um die Untersuchung von Neuronen und Astrozyten der SFO- bzw. SSO-angereicherten Primärkulturen neonataler Ratten aus verschiedenen Würfen bzw. von Eintagsküken verschiedener Brutgelege zu ermöglichen, wurde jeder experimentelle Versuchsansatz (*Kap. MM 2.4.6*) an Zellkulturen mit neuro-glialen Zellen aus mehreren Zellpräparationen durchgeführt. Dem Versuch vorausgehend wurde die erfolgreiche Beladung der Zellen mit Fura-2 AM am Inversmikroskop überprüft, und ein für den Versuch geeigneter Bereich auf dem CELL-VU Glas festgelegt. Die hier befindlichen Zellen sollten möglichst gut differenziert sein, sich auf dem Koordinatensystem des Deckglases befinden und vorrangig vereinzelt liegen. Dies diente der Vermeidung bzw. Minimierung von indirekten Stimulationen oder Hemmungen einzelner Zellen aufgrund direkter Zellinteraktionen während der Superfusionsstimulation. Anschließend wurden die zu messenden Zellen mittels Metamorph-Software als *regions of interest* (ROIs) markiert und fortlaufend nummeriert, sodass das Programm in der Lage war, den entsprechenden Zellen die ermittelten Fluoreszenz-Ratio-Werte direkt für die Datenauswertung zuzuordnen. Die Fluoreszenz-Ratio-Werte wurden

von dem Programm während der Versuchsdurchführung in einem Excel-Datenblatt gespeichert und anschließend zur Endauswertung herangezogen.

Eine fünf- bis 10-minütige Messpuffer-Superfusion zu Beginn des Versuchs diente der Entfernung von nicht aufgenommenem Fura-2 AM, wodurch sich im 340 / 380 nm Ratio-Graph letztlich eine konstante Basislinie der Fluoreszenz-Ratiowerte für jede einzelne der ROIs einstellte. Nach dieser Äquilibrationsphase konnte mit dem jeweiligen Messprotokoll begonnen werden. Bei jedem Protokoll wurde abschließend ein dreiminütiger Vitalitätstest mittels Superfusion von kaliumreichem Ca<sup>2+</sup>-Messpuffer (50 mM / L KCl) durchgeführt. Dieser diente außerdem der besseren Unterscheidung von Neuronen und Astrozyten. Während KCl bei vitalen Neuronen zur Depolarisation und somit unter anderem zum Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum führt, bleibt diese Reaktion bei Astrozyten weitestgehend aus.

#### **2.4.6 Messprotokolle für die Calcium-Ratio-Imaging Versuche**

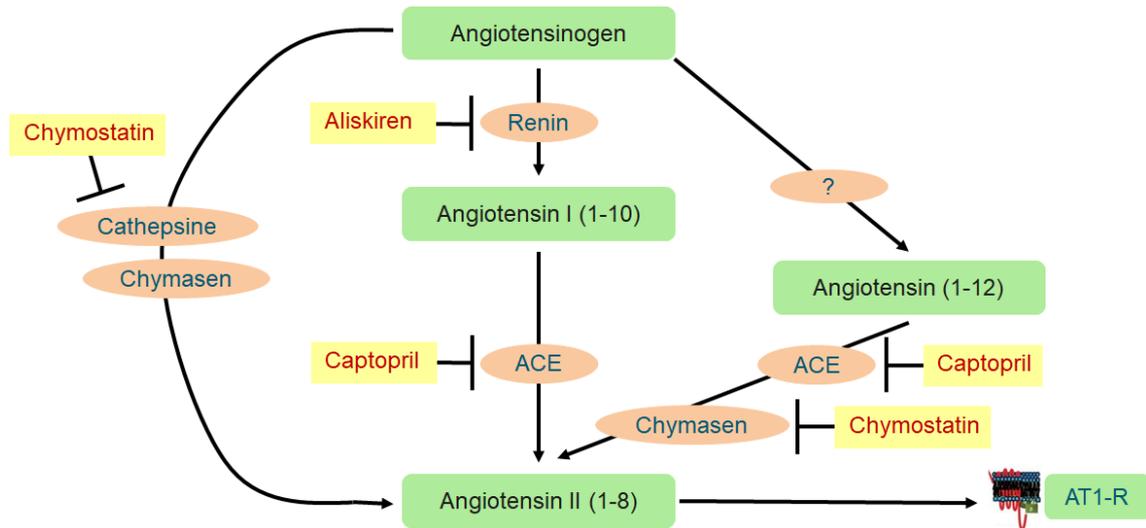
Für die funktionelle Charakterisierung eines SFO- bzw. SSO-intrinsischen Renin-Angiotensin Systems bzw. iono- und vor allem metabotroper Glutamatrezeptoren im SFO der Ratte wurden unter Anwendung der Calcium-Ratio-Imaging Technik detaillierte Messprotokolle verwendet, welche im Folgenden erläutert werden. Die Ermittlung der Fluoreszenz-Ratio-Werte aller ROIs erfolgte bei einer Frequenz von 0,2 Hz und Belichtungszeiten von jeweils 70 Millisekunden (bei 340 nm ARW) bzw. 35 Millisekunden (bei 380 nm ARW). Die Testsubstanzen wurden als hochkonzentrierte Aliquots bei -20 °C gelagert und erst unmittelbar vor Beginn der Messungen aufgetaut, um ihre Degradation zu minimieren. Je nach Konzentration der eingefrorenen Stocklösung und der erwünschten Endkonzentration in der Messkammer wurde die jeweilige Substanz mit temperiertem Messpuffer sequentiell verdünnt und in die Applikationsspritzen der Hahnenbank (*Abb. MM 2*) pipettiert. Durch Öffnen des entsprechenden 3-Wege-Hahns der Hahnenbank wurde von reinem Messpuffer auf substanzhaltigen Puffer als Superfusat (2 ml / Minute) umgeschaltet und dieser in die Messkammer und somit zu den Zellen geleitet. Der jeweils dreiminütigen Stimulation folgte eine acht- bzw. 15-minütige Auswaschphase mit reinem Messpuffer. Nach Beendigung der Messung wurden die Zellen auf dem CELL-VU Glas in einer Multiwell-Platte für ca. 15 Minuten in 4 °C kaltem 4 % PFA fixiert und anschließend in PBS bis zu ihrer immunzytochemischen Identifikation bei 4 °C aufbewahrt.

Für alle im folgenden skizzierten Messprotokolle gilt, dass einerseits zu Beginn des jeweiligen Teilversuchs (= Superfusionsstimulation eines „wells“ der SFO- bzw. SSO-spezifischen Primärzellkultur) eine achtminütige Äquilibrationsphase mit Messpuffer zur Etablierung einer stabilen Basislinie für das Calcium-Ratio-Imaging durchgeführt wurde. Andererseits wurden vor Beendigung jedes Teilversuchs die Zellen des jeweiligen „wells“ mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) zur Vitalitätskontrolle der Neurone superfundiert.

### **Funktioneller Nachweis enzymatischer Komponenten eines SFO-intrinsischen Renin-Angiotensin Systems (RAS) in der primären neuro-glialen Zellkultur der Ratte**

Ziel dieser Studie war es, durch intrazelluläres Calcium-Imaging in Superfusionsstudien *in vitro* Neurone und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur hinsichtlich der Expression von Schlüsselenzymen der Biosynthese für ANG II aus verschiedenen Präkursoren dieses Neuropeptides funktional zu charakterisieren (*Abb. MM 3*).

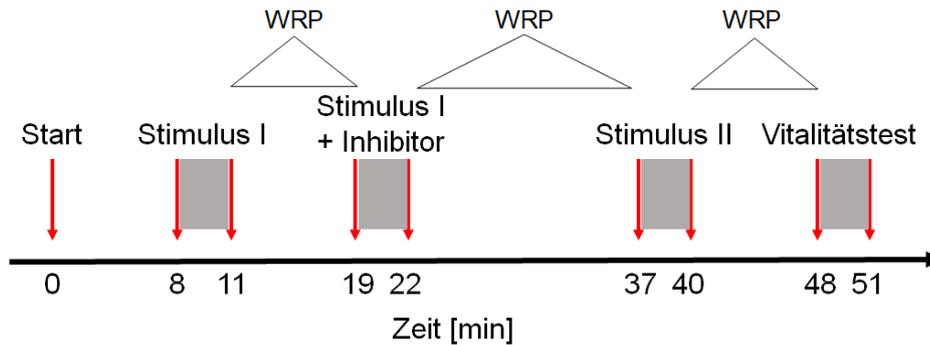
Das RAS betreffend sind dabei mehrere in Gehirn, Hypothalamus bzw. SFO nachgewiesene Präkursorproteine bzw. -peptide (*Kap. EIN 1.3.2*) von entscheidender Bedeutung. Hier ist zum einen das bei der Ratte aus 452 Aminosäuren bestehende Angiotensinogen (Aogen) zu nennen, welches in neuro-glialem Gewebe durch ein Renin-ähnliches Enzym zu Angiotensin I (ANG I) umgewandelt werden kann [676–678]. Als Reninsubstrat kam dabei das C-terminale Tetradecapeptid (TDP) von Aogen zum Einsatz. ANG I diente seinerseits als Substrat für das *angiotensin-converting enzyme* (ACE), welches ANG I in ANG II umwandelt [676–678]. Aogen kann zudem durch Cathepsine und Chymasen direkt in ANG II überführt werden [679–681]. Den Nachweis für das funktionelle Vorhandensein und die biologische Aktivität dieser Enzyme (Renin-ähnliches Enzym, ACE, Cathepsine und Chymasen) zu erbringen, war der wichtigste Aspekt dieser Studie. Neben den beiden klassischen Präkursoren Aogen und ANG I spielt möglicherweise das erst seit Kurzem bekannte Angiotensin (1-12) (ANG (1-12)) [447, 458] eine wichtige Rolle im SFO-intrinsischen RAS. Dementsprechend wurde untersucht, durch welche Enzyme das Vorläufer-Peptid ANG (1-12) in der SFO-spezifischen Primärkultur zum reaktiven ANG II umgewandelt werden kann.



**Abb. MM 3: Schema des SFO-intrinsischen Renin-Angiotensin Systems (RAS)**

Im Rahmen eines postulierten SFO-intrinsischen RAS wird das Präkursorprotein Angiotensinogen (Aogen) durch Renin oder ein Renin-ähnliches Enzym in Angiotensin I (ANG I) umgewandelt. Um den Nachweis für ein Renin-ähnliches Enzym zu erbringen, wurde in Superfusionsstudien der Renin-spezifische Inhibitor Aliskiren verwendet. ANG I seinerseits dient als Substrat für das *angiotensin-converting enzyme* (ACE), welches ANG I in reaktives Angiotensin II (ANG II) überführt. Um die funktionelle und biologische Aktivität von ACE nachzuweisen, wurde in Superfusionsstudien der ACE-spezifische Inhibitor Captopril verwendet. Darüber hinaus könnte Aogen durch Cathepsine und Chymasen alternativ direkt in reaktives ANG II umgewandelt werden. Es wurde der für Cathepsine und Chymasen spezifische Inhibitor Chymostatin verwendet. Des Weiteren ist eine mögliche Rolle von Angiotensin 1-12 (ANG (1-12)) im SFO bis *dato* nicht untersucht. Um die mögliche Umwandlung von ANG (1-12) in ANG II durch ACE und Chymasen zu überprüfen, wurden die Inhibitoren Captopril (ACE) und Chymostatin (Chymasen) eingesetzt. ANG II interagiert im Bereich des SFOs vorrangig mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)

In jedem dieser Versuchsansätze wurden die Zellen (ROIs) nach einer achtminütigen Äquibrierungsphase mit einem der genannten Neuropeptide (Aogen-TDP, ANG I, ANG (1-12)) in einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  M / L (in Messpuffer) jeweils für drei Minuten superfundiert (Stimulus I, *Abb MM 4*). Im Anschluss wurden die Zellen einer achtminütigen Auswasch- bzw. Regenerationsphase (WRP) mit reinem Messpuffer unterzogen (*Abb. MM 4*). Danach wurde eine Superfusionsstimulation der Zellen mit dem gleichen ANG II Präkursor, diesmal jedoch in Kombination mit dem jeweils spezifischen Inhibitor für eines der genannten Enzyme in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M / L, durchgeführt (Stimulus I + Inhibitor, *Abb. MM 4*). Dieser Superfusionsstimulation schloss sich eine WRP von 15 Minuten an. Die längere WRP wurde gewählt, um sicher zu gehen, dass keine Rückstände des Inhibitors mehr in der Messkammer vorlagen. In einer dritten Superfusionsstimulation zur Überprüfung der Responsivität der analysierten Zellen auf das biologisch aktive Oktapeptid ANG II wurde dieses in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M / L eingesetzt (Stimulus II, *Abb. MM 4*).



**Abb. MM 4: Darstellung der zeitlichen Abfolge des Calcium Ratio-Imaging Messprotokolls für Superfusionsstimulation von Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur (Ratte) mit Präkursorpeptiden und spezifischen Enzyminhibitoren des intrinsischen Renin-Angiotensin Systems**

Schematisches Messprotokoll eines „wells“ der SFO-spezifischen neuro-glialen Primärzellkultur für sequentielle Superfusionsstimulationen (jeweils drei Minuten) mit einem der Angiotensin-Präkursoren Aogen-TDP, ANG I oder ANG (1-12) (jeweils  $10^{-6}$  M / L in Messpuffer) *per se* [Stimulus I] und nach achtminütiger Wasch- und Regenerationsphase (WRP) in Kombination mit einem spezifischen Enzyminhibitor (Aliskiren, Captopril, Chymostatin; jeweils  $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus I + Inhibitor]. Nach 15-minütiger WRP erfolgte eine Superfusion für drei Minuten mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus II] mit nachfolgender achtminütiger WRP. Die finale Superfusion (drei Minuten) mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) diente vorrangig als Vitalitätstest für Neurone und der funktionellen Differenzierung zwischen Neuronen und Astrozyten.

Aogen wurde als C-terminales TDP eingesetzt [676]. Um den Nachweis für das Vorhandensein SFO-intrinsischen Renins zu erbringen, wurde der Renin-spezifische Inhibitor Aliskiren verwendet [677, 678] (Abb. MM 3). Die folgende Konversion von ANG I zu ANG II durch ACE wurde durch den ACE-spezifischen Inhibitor Captopril untersucht (Abb. MM 3). Zum Nachweis anderer SFO-intrinsischer Proteasen (Cathepsine, Chymasen), die Aogen direkt zu ANG II konvertieren können, wurde der Cathepsin- / Chymasen-spezifische Inhibitor Chymostatin eingesetzt [679–681] (Abb. MM 3), welcher ausschließlich in Dimethylsulfoxid (DMSO) löslich ist. Um zellschädigende Wirkungen des DMSOs sowie dessen mögliche Interaktion mit den Fura-2 medierten Signalen auszuschließen, wurde in Vorversuchen diejenige Konzentration an DMSO (0,5 %) ermittelt, in der Chymostatin löslich, und DMSO nicht zellschädigend und nicht interferierend war. Zum Nachweis der Umwandlung von ANG (1-12) in ANG II, und der daran beteiligten Enzyme wurden in zwei Versuchsansätzen Captopril und Chymostatin eingesetzt (Abb. MM 3).

Um auszuschließen, dass einer der Inhibitoren (Aliskiren, Captopril, Chymostatin) selbst zu einer Modulation der  $[Ca^{2+}]_i$  führen könnte, wurden SFO-spezifische Zellkulturen in Vorversuchen sequentiell mit den drei Inhibitoren in einer Konzentration von jeweils  $10^{-5}$  M / L superfusionsstimuliert.

### **Superfusionsstimulationen der neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Hühner mit Glutamat**

Nachdem, wie in *Kap. MM 2.3.2.5* beschrieben die *de novo* Etablierung einer Primärzellkultur des Hypothalamus aus Gehirnen früh postnataler Küken durchgeführt wurde, wurde zum einen, um einen Nachweis zu erbringen, dass neuro-gliale Primärzellkulturen aus Gehirnen von Hühnern diesen Alters möglich sind und zum anderen, um ideale Kulturbedingungen für die nachfolgende Etablierung einer neuro-glialen Primärkultur des *Organum subseptale* (SSO) zu ermitteln, mittels Superfusionsstimulationen die Vitalität der in dieser Primärzellkultur vorkommenden Zellen bestimmt. Dafür wurde pro „well“ eine Gruppe von Neuronen und Astrozyten ohne interzelluläre Kontakte nach Superfusionsstimulation mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) analysiert.

### **Funktioneller Nachweis der enzymatischen ACE-Aktivität und Expression eines ANG II spezifischen Rezeptors in der neuro-glialen Zellkultur des aviären SSOs**

#### ***Modulation der durch ANG II induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen der aviären Primärzellkultur des SSOs durch einen Rezeptorantagonisten***

Für diese Versuche wurden die in *Kap. MM 2.3.2.6* beschriebenen Primärzellkulturen des *Organum subseptale* (SSO) von Eintagsküken nach vier bis fünf tägiger Inkubationszeit für Calcium-Imaging Versuche herangezogen. Ziel dieser Teilstudie war es, die funktionelle Expression eines Rezeptors für vogelspezifisches (Val<sup>5</sup>)ANG II in Neuronen und Astrozyten der SSO-Primärzellkultur nachzuweisen. Dafür wurde (Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)ANG II als spezifischer Inhibitor für den ratten- und ebenso vogelspezifischen ANG II Rezeptor in Superfusionsstimulationsversuchen, wie in *Abb. MM 4* gezeigt, eingesetzt. Ein *cluster* freiliegender Zellen, hauptsächlich aus Neuronen und Astrozyten bestehend, wurde zunächst mit (Val<sup>5</sup>)ANG II in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M / L (Stimulus I) superfusionsstimuliert. Danach wurden die Zellen einer achtminütigen WRP unterzogen und im Anschluss mit (Val<sup>5</sup>)ANG II ( $10^{-7}$  M / L) in Kombination mit dem Antagonisten (Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)ANG II ( $10^{-6}$  M / L) superfundiert (Stimulus I + Inhibitor). Im Anschluss daran wurden die Zellen einer 15-minütigen WRP unterzogen und dann nochmals mit (Val<sup>5</sup>)ANG II ( $10^{-7}$  M / L) stimuliert (Stimulus II).

***Superfusionsstimulationen der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit vogelspezifischem ANG I zum Nachweis der intrinsischen ACE-Aktivität***

Ziel dieser Teilstudie war es, analog zu den Experimenten am SFO der Ratte (Kap. MM 2.4.6), eine Beteiligung des *angiotensin-converting enzymes* (ACE) an der Umwandlung von vogelspezifischem (Asn<sup>1</sup>,Val<sup>5</sup>,Ser<sup>9</sup>)ANG I in reaktives (Val<sup>5</sup>)ANG II nachzuweisen und damit erste Hinweise auf ein SSO-intrinsisches Renin-Angiotensin System zu liefern. Dafür wurde wieder das in Abb. MM 4 dargestellte Messprotokoll entsprechend verändert eingesetzt und SSO-spezifische Primärzellkulturen mit (Asn<sup>1</sup>,Val<sup>5</sup>,Ser<sup>9</sup>)ANG I in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M / L für drei Minuten superfusionsstimuliert. Nach einer achtminütigen WRP wurden die Zellen der SSO-Primärkultur mit vogelspezifischem ANG I (10<sup>-6</sup> M / L) in Kombination mit dem ACE-spezifischen Inhibitor Captopril (10<sup>-5</sup> M / L) superfundiert und anschließend einer 15 Minuten andauernden WRP unterzogen. Im Anschluss daran erfolgte eine als Kontrolle dienende Superfusionsstimulation mit (Val<sup>5</sup>)ANG II (10<sup>-7</sup> M / L).

Um Effekte von Captopril und (Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)ANG II auf Zellen der SSO-spezifischen Kultur auszuschließen, wurden diese in Vorversuchen zunächst mit Captopril und (Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>)ANG II allein superfusionsstimuliert.

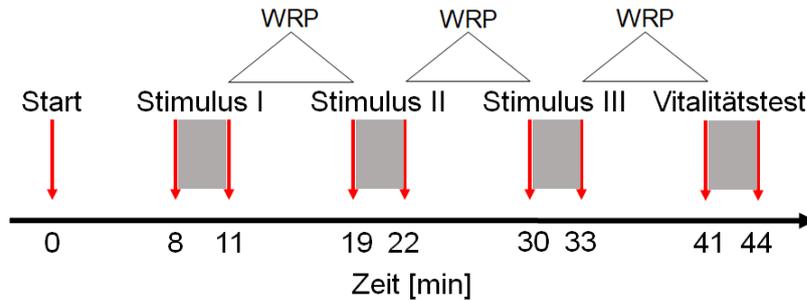
**Funktioneller Nachweis für die Expression metabotroper und ionotroper Glutamatrezeptoren in der SFO-spezifischen Primärzellkultur der Ratte**

Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe von intrazellulärem Calcium-Imaging in Superfusionsversuchen *in vitro* Neurone und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur der Ratte hinsichtlich der Expression verschiedener metabotroper und ionotroper Glutamatrezeptoren funktionell zu untersuchen.

***Repetitive Superfusionsstimulation der SFO-Primärzellkultur mit Glutamat in äquimolarer Konzentration***

Die im Folgenden dargestellten Vorversuche erwiesen sich als unabdingbar für die detaillierte pharmakologische Charakterisierung der in Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur exprimierten Glutamatrezeptoren durch den Einsatz subtypspezifischer Antagonisten. Um mögliche durch Glutamat induzierte Desensibilisierungs-Phänomene in den Änderungen der zytoplasmatischen Calciumkonzentration in Neuronen und Astrozyten der SFO-angereicherten Primärzellkultur ausschließen zu können,

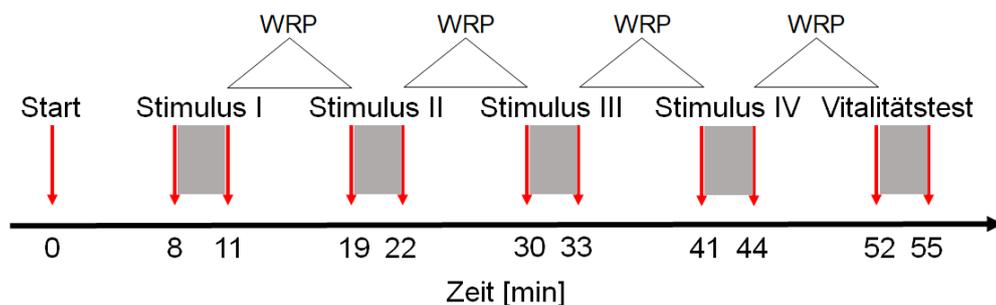
wurde das in *Abb. MM 5* dargestellte Messprotokoll einer repetitiven Superfusionsstimulation mit Glutamat eingesetzt. Die Zellen eines „wells“ der Zellkultur wurden dabei dreimal repetitiv (Stimulus I - III) mit Glutamat in einer äquimolaren Endkonzentration von  $10^{-5}$  M / L bei rattenspezifischer Körpertemperatur ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) superfundiert. Die WRP dauerten in dieser Versuchsserie bei jedem Waschschriff mit Messpuffer acht Minuten.



**Abb. MM 5: Darstellung der zeitlichen Abfolge des Calcium Ratio-Imaging Messprotokolls für repetitive Superfusionsstimulationen von Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur (Ratte) mit Glutamat**

Schematisches Messprotokoll eines „wells“ der SFO-spezifischen neuro-glialen Primärzellkultur für repetitive Superfusionsstimulationen (jeweils drei Minuten) mit Glutamat (jeweils  $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus I - III]. Nach jeder Stimulation erfolgte eine achtminütige Wasch- und Regenerationsphase (WRP). Die finale Superfusion (drei Minuten) mit kaliumreichem Messpuffer ( $50\text{ mM}$  / L) diente vorrangig als Vitalitätstest für Neurone und der funktionellen Differenzierung zwischen Neuronen und Astrozyten.

### ***Dosis-abhängige Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Zellen der SFO-Primärzellkultur nach Superfusionsstimulation mit Glutamat***



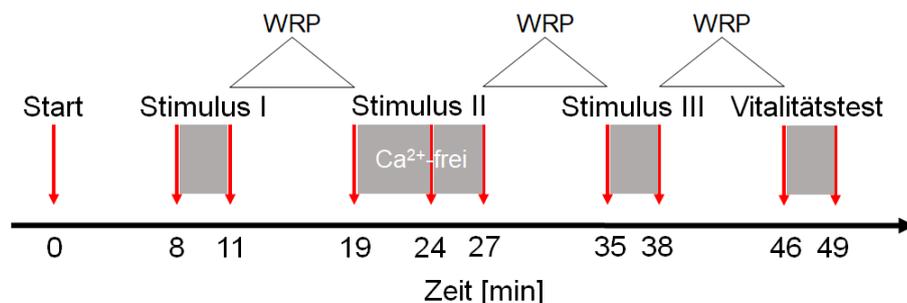
**Abb. MM 6: Darstellung der zeitlichen Abfolge des Calcium Ratio-Imaging Messprotokolls für Superfusionsstimulation von Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur (Ratte) mit Glutamat aufsteigender Konzentration**

Schematisches Messprotokoll eines „wells“ der SFO-spezifischen neuro-glialen Primärzellkultur für sequentielle Superfusionsstimulationen (jeweils drei Minuten) mit Glutamat aufsteigender Konzentration ( $10^{-6}$  /  $3,16 \times 10^{-6}$  /  $10^{-5}$  /  $3,16 \times 10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus I - IV]. Nach jeder Stimulation erfolgte eine achtminütige Wasch- und Regenerationsphase (WRP). Die finale Superfusion (drei Minuten) mit kaliumreichem Messpuffer ( $50\text{ mM}$  / L) diente vorrangig als Vitalitätstest für Neurone und der funktionellen Differenzierung zwischen Neuronen und Astrozyten.

Zur Untersuchung einer dosisabhängigen Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration in Neuronen und Astrozyten der SFO-Primärzellkultur, ausgelöst durch eine Superfusionsstimulation mit Glutamat, wurde Glutamat gemäß des in *Abb. MM 6* dargestellten Schemas in sequentiell aufsteigenden Konzentrationen ( $10^{-6}$  /  $3,16 \times 10^{-6}$  /  $10^{-5}$  /  $3,16 \times 10^{-5}$  M / L) eingesetzt (Stimulus I – IV).

***Repetitive Superfusionsstimulation der SFO-Primärzellkultur mit Glutamat in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Calcium***

Zur Ermittlung, ob der stimulationsbedingte Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{iz}$ , gemessen als Erhöhung der ermittelten Fluoreszenz-Ratio nach Anregung bei 340 bzw. 380 nm für Fura-2 AM ausschließlich aus dem Extrazellulärraum oder teilweise auch aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen *Reticulum* oder den Mitochondrien stammt, wurde eine alternierende Superfusionsstimulation der SFO-Primärzellkultur mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Calcium durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Responsivität der zu analysierenden Zellen auf Glutamat in calciumhaltigem Messpuffer untersucht (Stimulus I, *Abb. 7*). Es folgte eine achtminütige WRP, an welche sich eine achtminütige Superfusion mit calciumfreiem, EGTA-haltigen Messpuffer anschloss. Während der letzten drei Minuten wurden die Zellen eines „wells“ erneut mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) stimuliert (Stimulus II).



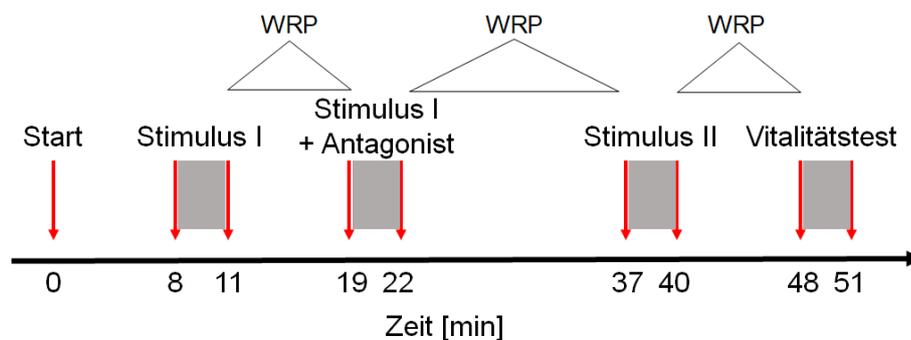
**Abb. MM 7: Darstellung der zeitlichen Abfolge des Calcium Ratio-Imaging Messprotokolls für calciumfreie Superfusionsstimulation von Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur (Ratte) mit Glutamat**

Schematisches Messprotokoll eines „wells“ der SFO-spezifischen neuro-glialen Primärzellkultur für sequentielle Superfusionsstimulationen (jeweils drei Minuten) mit Glutamat (jeweils  $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) in calciumhaltigem [Stimulus I und III] und calciumfreiem [Stimulus II] Messpuffer. Nach jeder Stimulation erfolgte ein achtminütige Wasch- und Regenerationsphase (WRP). Der zweiten glutamatergen Stimulation ging dabei eine fünfminütige Superfusions der Zellen mit calciumfreiem Messpuffer voraus. Die finale Superfusions (drei Minuten) mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) diente vorrangig als Vitalitätstest für Neurone und der funktionellen Differenzierung zwischen Neuronen und Astrozyten.

Danach wurde der calciumfreie wieder durch calciumhaltigen Messpuffer ersetzt und die Zellen einer erneuten WRP von acht Minuten unterzogen. Abschließend erfolgte eine dritte Superfusionsstimulation der Zellen mit Glutamat (Stimulus III), um einen quantitativen Amplitudenvergleich der drei aufeinander folgenden Calciumsignale zu ermöglichen und zudem eine Desensibilisierung der Zellen auszuschließen.

***Modulation der durch Glutamat induzierten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{iz}$  in Zellen der SFO-Primärzellkultur durch Agonisten / Antagonisten metabotroper Glutamatrezeptoren***

Ziel dieser Teilstudie war es herauszufinden, welche membranständigen metabotropen Glutamatrezeptoren in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur funktionell exprimiert werden und nach Aktivierung zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bei Superfusionsstimulation mit Glutamat führen. Dabei erfolgte eine Beschränkung auf die metabotropen Glutamatrezeptoren 1 (mGluR1) und 5 (mGluR5) der Gruppe I, da diese die einzigen exzitatorischen metabotropen Glutamatrezeptoren repräsentieren [551]. Die in Gruppe II und III klassifizierten metabotropen Glutamatrezeptoren zeigen eine langsam inhibitorische Wirkung [597, 598].



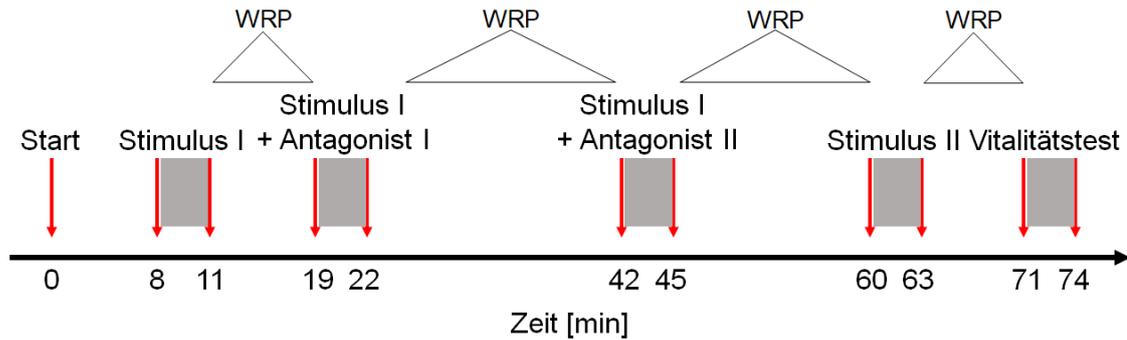
**Abb. MM 8: Darstellung der zeitlichen Abfolge des Calcium Ratio-Imaging Messprotokolls für Superfusionsstimulation von Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur (Ratte) mit Glutamat und spezifischen Rezeptorantagonisten für die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) 1 und 5**

Schematisches Messprotokoll eines „wells“ der SFO-spezifischen neuro-glialen Primärzellkultur für sequentielle Superfusionsstimulationen (jeweils drei Minuten) mit Glutamat (jeweils  $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) *per se* [Stimulus I] und nach achtminütiger Wasch- und Regenerationsphase (WRP) in Kombination mit dem spezifischen Rezeptorinhibitor des mGluR1 (YM202074;  $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus I + Antagonist] oder mGluR5 (MTEP;  $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus I + Antagonist]. Nach dem Einsatz des Antagonisten erfolgte eine 15-minütige WRP und anschließend eine Superfusion für drei Minuten mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus II] mit nachfolgender achtminütiger WRP. Die finale Superfusion (drei Minuten) mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) diente vorrangig als Vitalitätstest für Neurone und der funktionellen Differenzierung zwischen Neuronen und Astrozyten.

Die Zellen eines „wells“ wurden mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) mit nachfolgender achtminütiger WRP superfusionsstimuliert (Stimulus I) (*Abb. MM 8*). Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) in Kombination mit einem spezifischen Antagonisten für mGluR1 bzw. mGluR5 (jeweils  $10^{-5}$  M / L) superfundiert (Stimulus I + Antagonist). Nach einer WRP von 15 Minuten fand eine erneute Superfusionsstimulation der Zellen mit Glutamat der Konzentration  $10^{-5}$  M / L statt (Stimulus II). Für die pharmakologische Inhibition und damit eindeutige Identifizierung von mGluR1 wurde der spezifische Antagonist YM202074 in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M / L eingesetzt. Für den Expressionsnachweis von mGluR5 in Neuronen und Astrozyten der SFO-Primärzellkultur wurde der spezifische, nicht kompetitive Antagonist MTEP in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M / L verwendet.

Im Anschluss an diese Teilstudie wurden Astrozyten und Neurone der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) allein sowie sequentiell in Anwesenheit entweder des Antagonisten für mGluR1 oder mGluR5 superfusionsstimuliert. Ziel dieser Studie war es zu analysieren, in welchen Zellen beide Rezeptoren auf der Oberfläche exprimiert werden und welche Zellen nur einen der beiden Rezeptorsubtypen exprimieren (*Abb. MM 9*). Zunächst wurden die Zellen eines „wells“ einer Äquilibrierungsphase unterzogen und anschließend mit Glutamat superfusionsstimuliert (Stimulus I, *Abb. 9*). Nach einer achtminütigen WRP wurden die Zellen mit Glutamat in Kombination mit dem spezifischen Antagonisten für mGluR1 oder mGluR5 in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M / L superfundiert (Stimulus I + Antagonist I). Nach einer langen WRP von 20 Minuten - hier diente die WRP der vollständigen Elimination des Antagonisten - wurden die Zellen einer weiteren Superfusionsstimulation mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) und dem jeweils anderen spezifischen Antagonisten für einen der beiden mGluRs (Stimulus I + Antagonist II) unterzogen. Dabei wurde die Reihenfolge der Antagonisten in verschiedenen „wells“ der SFO-Primärzellkultur randomisiert. Nach einer erneuten WRP von 15 Minuten wurden die Zellen nochmal mit Glutamat (Stimulus II) superfusionsstimuliert. Dies diente als pharmakologische Kontrolle und zum Ausschluss einer Desensibilisierung der Zellen (*Abb. MM 9*).

Um mögliche agonistische Wirkungen der beiden Antagonisten (YM202074, MTEP) an sich auszuschließen, wurde die SFO-spezifische Primärzellkultur in Vorversuchen mit beiden Antagonisten *per se* superfusionsstimuliert.



**Abb. MM 9: Darstellung der zeitlichen Abfolge des Calcium Ratio-Imaging Messprotokolls für Superfusionsstimulation von Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur (Ratte) mit Glutamat und spezifischen Rezeptorinhibitoren für die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR) 1 und 5**

Schematisches Messprotokoll eines „wells“ der SFO-spezifischen neuro-glialen Primärzellkultur für sequentielle Superfusionsstimulationen (jeweils drei Minuten) mit Glutamat (jeweils  $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) *per se* [Stimulus I] und nach achtminütiger Wasch- und Regenerationsphase (WRP) in Kombination mit dem spezifischen Rezeptorinhibitor des mGluR1 (YM202074;  $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus I + Antagonist I] oder mGluR5 (MTEP;  $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus I + Antagonist II]. Nach dem Einsatz eines jeden Inhibitors erfolgte eine 15-minütige WRP und anschließend eine Superfusion für drei Minuten mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus II] mit nachfolgender achtminütiger WRP. Die finale Superfusion (drei Minuten) mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) diente vorrangig als Vitalitätstest für Neurone und der funktionellen Differenzierung zwischen Neuronen und Astrozyten.

Um einen weiteren Nachweis für die funktionelle Expression von mGluR1 und mGluR5 zu erhalten, wurde ein selektiver Agonist dieser Gruppe, das (S)-3,5-DHPG, verwendet. Hierfür wurde das Calcium-Imaging Messprotokoll der *Abb. MM 5* entsprechend modifiziert. Die Zellen eines „wells“ wurden dabei nach einer Äquilibrierungsphase zunächst mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) superfundiert. Nach einer achtminütigen WRP fand eine Superfusionsstimulation der Zellen mit (S)-3,5-DHPG in einer äquimolaren Konzentration ( $10^{-5}$  M / L) statt, woran sich wiederum eine WRP von acht Minuten anschloss. Danach wurden die Zellen zum zweiten Mal mit Glutamat superfusionsstimuliert und einer achtminütigen WRP unterzogen.

***Modulation der durch Glutamat induzierten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in der SFO-Primärzellkultur durch spezifische Antagonisten der ionotropen NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoren***

Mit Hilfe dieser Versuchsserie sollte die Bedeutung ionotroper Glutamatrezeptoren für die Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration nach Superfusionsstimulation mit Glutamat in Neuronen und Astrozyten untersucht werden. In der Literatur wird zwischen drei Gruppen ionotroper Glutamatrezeptoren unterschieden [586]. Ne-

ben der Gruppe der NMDA-Rezeptoren gibt es dabei noch die AMPA- und Kainatrezeptoren, wobei sich jede dieser Gruppen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Rezeptorsubtypen zusammensetzt. Da alle drei Rezeptorklassen eine schnelle exzitatorische Wirkung zeigen, wurden gruppenspezifische Antagonisten eingesetzt. Wie in den zuvor dargestellten Versuchsreihen wurde ein *cluster* freiliegender Zellen, in erster Linie bestehend aus Astrozyten und Neuronen, analog zu dem in *Abb. MM 8* dargestellten Messprotokoll nach Superfusionsstimulation analysiert. Im Anschluss an eine Äquilibrierungsphase wurden die Zellen mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) stimuliert (Stimulus I) und danach für acht Minuten einer WRP unterzogen. Die zweite Stimulationsphase bestand aus Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) und einem spezifischen Antagonisten ( $10^{-5}$  M / L) für eine (oder zwei) der ionotropen Glutamatrezeptorgruppen (Stimulus I + Antagonist), gefolgt von einer 15-minütigen WRP. Anschließend wurden die Zellen mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) (Stimulus II) superfusionsstimuliert.

Um die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren an der Glutamat induzierten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu charakterisieren, wurde der selektive, kompetitive Antagonist D-AP5 in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M / L eingesetzt. Da sich die beiden Rezeptor-Gruppen AMPA- und Kainatrezeptoren sehr ähnlich sind [682, 683], wurde hier GYKI53655 ( $10^{-5}$  M / L) als Antagonist gewählt, welcher sowohl an AMPA- als auch Kainatrezeptoren mit hoher Affinität bindet.

Um auszuschließen, dass einer der Inhibitoren (D-AP5, GYKI53655) möglicherweise teilagonistische Aktivität hinsichtlich der Calciumsignale aufweist, wurde die SFO-spezifische Zellkultur in Vorversuchen mit den Inhibitoren *per se* superfusionsstimuliert.

### **Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärkultur mit dem Neuropeptid Phoenixin (1-14)**

Da die Expression des Neuropeptids Phoenixin (1-14) sowie seines Rezeptors GPR173 in Kerngebieten des Hypothalamus einschließlich des SFOs in der Literatur bereits beschrieben wurde [675], war es von gesteigertem Interesse zu untersuchen, ob eine Superfusionsstimulation der SFO-Primärzellkultur mit Phoenixin zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen würde. Für diese Studien wurde das Neuropeptid Phoenixin-14 Amid mit der Aminosäuresequenz Asp-Val-Gln-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Val-Trp-Ser-Asp-Pro-Phe-NH<sub>2</sub> in der Konzentration  $10^{-7}$  M

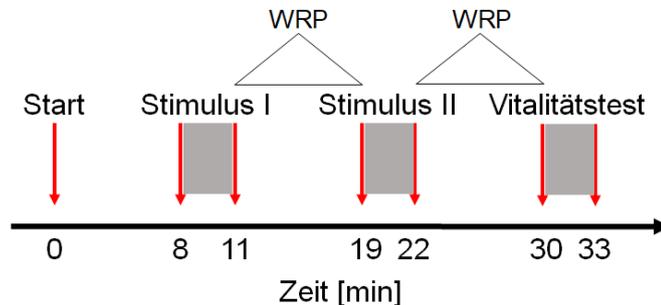
/ L verwendet. Um dies zu untersuchen, wurden die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Calcium-Imaging Messprotokolle (*Abb. 3– 6*) so modifiziert, dass als letzte Stimulation nach einer achtminütigen WRP eine weitere Superfusionsstimulation, nämlich mit Phoenixin (1-14) der Konzentration  $10^{-7}$  M / L, stattfand.

Neben der potentiellen Eigenwirkung des Phoenixin (1-14) sollte zudem untersucht werden, inwieweit Phoenixin durch Glutamat induzierte Calciumsignale in Neuronen und Astrozyten der SFO-Primärzellkultur zu modulieren vermochte: verstärken oder abschwächen. Hierfür wurde das in *Abb. MM 5* dargestellte Messprotokoll wie folgt angepasst: Nach einer Äquilibrationsphase zur Erstellung einer Basislinie wurden die Zellen mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) superfusionsstimuliert und dann einer WRP von acht Minuten unterzogen (Stimulus I). In der nachfolgenden Stimulationsphase wurde mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) und Phoenixin der Konzentration  $10^{-6}$  M / L (Stimulus I + Phoe) stimuliert. Anschließend fand eine WRP von 15 Minuten statt, an welche sich eine weitere Superfusionsstimulation mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) anschloss (Stimulus II). Es wurde das Neuropeptid Phoenixin (1-14) in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M / L eingesetzt, um mögliche modulierende Effekte von Phoenixin zu verstärken.

### **Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit ANG II und Glutamat für *transmitter coding* aktivierter Neurone**

Ziel dieser Teilstudie war es zunächst herauszufinden, inwieweit Neurone und Astrozyten der SFO-Primärzellkultur durch Glutamat und ANG II kostimulierbar sind. Darüber hinaus sollte durch die postexperimentelle immunzytochemische Analyse erfasst werden, welche Neurotransmitter von Neuronen der SFO-Primärzellkultur, die auf eine Superfusionsstimulation mit ANG II, Glutamat oder beide Transmitter mit intrazellulären Calciumsignalen reagiert haben, gebildet werden. Es wurde ein *cluster* freiliegender Zellen eines „wells“ nach einer Äquilibrationsphase von acht Minuten mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) superfusionsstimuliert (Stimulus I, *Abb. MM 10*). Im Anschluss konnten die Zellen während einer WRP regenerieren und wurden dann einer Superfusionsstimulation mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L) unterzogen (Stimulus II). Nachdem die Zellen in 4 °C kaltem, 4 % Paraformaldehyd für ca. 15 Minuten fixiert wurden, konnten mittels Immunzytochemie (*Kap. MM 2.5*) die Neurotransmitter Glutamat und

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) sowie das NO generierende Enzym neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) in den reaktiven Neuronen der Primärkultur nachgewiesen werden.



**Abb. MM 10: Darstellung der zeitlichen Abfolge des Calcium Ratio-Imaging Messprotokolls für Superfusionsstimulation von Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur (Ratte) mit ANG II und Glutamat**

Schematisches Messprotokoll eines „wells“ der SFO-spezifischen neuro-glialen Primärzellkultur für sequentielle Superfusionsstimulationen (jeweils drei Minuten) mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus I] und nach achtminütiger Wasch- und Regenerationsphase (WRP) mit Glutamat ( $10^{-5}$  M / L in Messpuffer) [Stimulus II]. Die finale Superfusion (drei Minuten) mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) diente vorrangig als Vitalitätstest für Neurone und der funktionellen Differenzierung zwischen Neuronen und Astrozyten.

#### 2.4.6.1 Datenevaluierung und Statistik

Die kontinuierliche Erfassung und Speicherung der anregungswellenabhängigen Intensitätsänderungen der Fura-2 spezifischen Fluoreszenzsignale durch Calciumbindung von mehreren ROIs bei einer Frequenz von 0,2 Hz erfolgte unter Zuhilfenahme eines computergestützten Messsystems. Die Metamorph-Software registrierte dabei den Quotienten der digitalisierten Fluoreszenzintensitäten für jede erfasste Zelle in Excel-Datenblättern. Nach jeder Superfusionsstimulationsphase wurde die maximale, absolute Änderung der Fluoreszenz-Ratio als Reaktion der Zelle gewertet und in Bezug zu den zuvor gemessenen Basiswerten ermittelt. Die 340 / 380 nm Ratio-Werte jeder einzelnen Zelle wurden zeitabhängig digital in einem Koordinatensystem dargestellt. Für die Auswertung wurden generell ausschließlich Zellen herangezogen, deren Fura-2 Ratio-Werte und dementsprechend deren intrazelluläre Calciumkonzentration im Verlauf eines Versuches eine stabile Basislinie zeigten. Zellen, deren Ratio-Werte nach einer Superfusionsstimulation nicht wieder zu einer stabilen Basislinie zurückkehrten, die während der Messung einen ausgeprägten, diskontinuierlichen Anstieg oder Abfall der Basislinie zeigten oder die starke Fluktuationen

der Basislinie während Messpuffer Superfusion zeigten, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Damit eine eindeutige Differenzierung zwischen methodenbedingtem, spektrofluorimetrischem Hintergrundrauschen und marginalen, durch Superfusionsstimulation ausgelösten Calciumantworten stattfinden konnte, wurde ein Schwellenwert der  $\Delta$ -Ratio-Erhöhung von  $\geq 0,05$  zur Basislinie für ein eindeutiges Calciumsignal festgelegt. Des Weiteren wurden Zellen von der statistischen Analyse und Datenevaluierung ausgeschlossen, die innerhalb eines Messprotokolls, zum Beispiel mit Glutamat, zwar auf die erste Superfusionsstimulation einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{iz}$ , jedoch keine Responsivität auf die letzte Stimulation mit Glutamat aufwiesen. Gleiches gilt für die Superfusionsstimulationen mit Angiotensin-Neuropeptiden. Zuletzt wurden Zellen aus der Datenevaluierung ausgeschlossen, die durch die postexperimentell durchgeführte Immunzytochemie nicht eindeutig einem Zelltyp (Neuron, Astrozyt) zugeordnet werden konnten.

Alle gemessenen Werte wurden gespeichert und nach einer ersten Auswertung mit Microsoft Excel zur Bearbeitung und graphischen Darstellung in das Programm GraphPad Prism® (Version 5.0) exportiert. Für jedes der oben dargestellten Messprotokolle, sei es mit Antagonisten spezifischer Enzyme des RAS oder mit Antagonisten glutamaterger Rezeptoren, bzw. für jede Veränderung physiologischer Parameter (extrazelluläres Calcium) wurde prozentual ermittelt, wie viele der jeweils untersuchten Zellen (Neurone und Astrozyten) hinsichtlich ihrer intrazellulären Calciumkonzentration moduliert werden konnten. Es wurden jeweils arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.) der Ratio-Änderung für alle Stimulationsperioden eines Messprotokolls für jede responsive Zelle ermittelt. Eine Darstellung in Form von Balkendiagrammen sowie die statistische Analyse der Daten erfolgte ebenfalls mit Hilfe von GraphPad Prism®-Software. Dabei wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) in Kombination mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrisches Verfahren und dem Dunn's post-hoc Test zur statistischen Signifikanzanalyse eingesetzt. Unterschiede der Ratio-Änderungen ( $\Delta$ Ratio) bei einzelnen Teilstudien wurden auf folgende Signifikanzniveaus getestet:  $p \leq 0,05$  (# / \* / \$),  $p \leq 0,01$  (## / \*\* / \$\$) oder  $p \leq 0,001$  (### / \*\*\* / \$\$\$).

## 2.5 Immunzytochemie / Immunhistochemie

### Technische Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop mit: digitale schwarz/weiß Kamera	BX-50 Spot Insight, Model 3.1.0	Olympus Optical, D-Hamburg Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
Kamera-Software	Spot Insight	Diagnostic Instruments, MI, USA
Kamera (Durchlichtmikro- skopie)	Camedia C-3030	Olympus Corporation, To- kio, Japan
Kryostat	CryoStar NX50	Thermo Scientific, D-Dreieich

### Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Computerprogramm	MetaMorph 7.7.5	Diagnostic Instruments Vi- sitron Systems, D-Puchheim
Pap-Pen	Z377821-1EA	
Pinsel	Rotmaderhaar	Renensis, D-Flensburg
Objektträgerboxen		MAGV GmbH, D-Rabenau
Spatel		Roth, D-Karlsruhe

### Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Deckgläschen	24 x 60 mm, Nr. H878604	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Nagellack	handelsüblich	diverse
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH, D-Braunschweig

### Chemikalien

Chemikalie	Typ	Hersteller
4'6 – Diamidin-2-Phenylin- dol Dihydrochlorid (DAPI)		Mobitec, D-Göttingen
Citifluor®		Cityfluor LTD, London, UK
Dinatriumhydrogenphos- phat	Monohydrat	Sigma Aldrich, D-München
Entellan		Merck, D-Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)		PAA, Pasching, Öster- reich

Histoclear		Ward`s Natural Science, Rochester, NY, USA
Kresylviolett		Sigma Aldrich, D-München
Lithium-Carbonat	L4283-1006	Sigma Aldrich, D-München
Luxol-Fast-Blue	AAA1539514	Fischer Scientific, Ontario, OT, USA
Natriumdihydrogenphosphat		Merck, D-Darmstadt
Normal horse serum (NHS)		PAA, Pasching, Österreich
Paraformaldehyd (PFA)		Merck, D-Darmstadt
Phosphate buffered saline tablets (PBS)		Sigma Aldrich, D-München
Poly-L-Lysin		Biochrom, D-Berlin
Saccharose		Merck, D-Darmstadt
Tissue Tek®		Leica Instruments GmbH, D-Nussloch
Triton-X-100		Sigma Aldrich, D-München
Xylol		Merck, D-Darmstadt

### 2.5.1 Lösungen für Immunzytochemie

#### Inkubationspuffer für immunzytochemische Untersuchungen

Als Grundlage des Inkubationspuffers, der zum Antigennachweis in den primären neuro-glialen Zellkulturen des ratten- und vogelspezifischen SFOs / SSOs eingesetzt wurde, dienten *phosphate buffered saline* (PBS) *tablets*, welche in Reinstwasser gelöst wurden (PBS: 130 mM / L NaCl, 8 mM / L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Dem PBS wurden Triton-X-100 (finale Konzentration: 0,05 %) und fötales Kälberserum (finale Konzentration: 10 %) zugesetzt. Der Inkubationspuffer wurde bei 4 °C gelagert.

#### Waschpuffer für immunzytochemische Untersuchungen

Als Waschpuffer diente PBS mit einem Zusatz von 0,05 % Triton-X-100.

#### Phosphatpuffer (PB)

Als Basis für die Herstellung einer 4 % Paraformaldehydlösung diente frisch ange-setzter 0,1 M / L Phosphatpuffer (PB). Dieser Puffer wurde aus 0,2 M / L Stammlösungen von Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) und Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) in Reinstwasser hergestellt. Durch Mischen von 720 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

und 280 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  erhielt man einen 0,2 M / L PB mit einem pH von 7,4, welcher durch Zugabe des gleichen Volumens Reinstwasser (1 L) auf 0,1 M / L verdünnt wurde. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte unter Zuhilfenahme eines pH-Meters.

### **Paraformaldehydlösung (PFA 4 %)**

Antikörper / -seren die in der Immunzytochemie bzw. -histochemie eingesetzt werden, sind jeweils spezifisch für ein bestimmtes Antigen. Die Konformation des Antigens beeinflusst hierbei maßgeblich die spezifische Bindung des Antikörpers. Um die zelluläre Lokalisation und Konformation des jeweiligen Antigens zu erhalten, wurden primäre Zellkulturen des SFOs / SSOs sowie coronale Gehirnschnitte mit frisch angesetzter 4 % Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert. Bei PFA handelt es sich um kurzkettige ( $n < 50$ ) Polymere des Formaldehyds. Dabei beruht die fixierende Wirkung auf der Kreuzvernetzung reaktiver Gruppen in Polypeptidketten von Proteinen. Pulverförmiges PFA wurde unter Rühren bei 60 °C in PB gelöst und die trübe Lösung durch tropfenweise Zugabe von NaOH (2 M / L) geklärt. Im Anschluss daran wurde die Lösung mit Hilfe eines Faltenfilters ( $\varnothing$  240 mm) filtriert und auf ca. 4 °C abgekühlt.

### **2.5.2 Grundlagen der Methode**

Die Grundlage der Immunzyto- bzw. -histochemie bildet die Interaktion der Paratope spezifischer Antikörper (AK) mit bestimmten Epitopen des entsprechend zu detektierenden Antigens (Ag) in der Zellkultur bzw. des entsprechend vorbehandelten Gewebeschnitts. Aufgrund der komplexen Immunbiologie der Immunglobulin-bildenden Plasmazellen kann ein gereifter B-Lymphozyt (= Plasmazelle) nur ein, in seiner  $F_{ab}$ -Komponente für eine bestimmte antigene Struktur spezifisches Immunglobulin der Klassen IgG, IgA oder IgM bilden [684]. Zusammen bilden Ag und AK mit hoher Affinität einen Antigen-Antikörper Komplex. Um antigene Strukturen in oder auf Zellen bzw. in Gewebeschnitten zu lokalisieren, werden Ag-spezifische mono- bzw. polyklonale Antikörper / -seren verwendet und die so entstehenden Komplexe anschließend auf mikroskopischer Ebene sichtbar gemacht. Hierzu werden kommerzielle Sekundäntikörper eingesetzt, deren  $F_c$ -Komponente mit einem Enzym oder Fluorophor gekoppelt ist [685].

In der vorliegenden Arbeit wurden im Wesentlichen Antikörper / -seren der IgG-Klasse verwendet. Alle Primäntikörper wurden durch die Immunisierung von Ka-

ninchen (= polyklonal) oder Mäusen (= monoklonal) hergestellt. Die Sekundärantikörper (polyklonal) hingegen wurden durch Immunisierung von Ziegen bzw. Eseln mit den entsprechenden Primärantikörpern gewonnen [685]. Während letztere in allen Fällen kommerziellen Ursprungs waren, stammten einige der gegen Neuropeptide des Renin-Angiotensin Systems gerichteten polyklonalen Antiseren aus der Eigenproduktion der AG Gerstberger (Tab. MM 2 und MM 3). Die Produktion der kommerziell erworbenen monoklonalen Primärantikörper basiert auf der Immunglobulinsynthese muriner Hybridoma-Zelllinien [686].

Der Nachweis spezifischer Antigene vor allem in Zellen der neuro-glialen Primärzellkultur des *Organum subfornicale* und des *Organum subseptale*, aber auch in coronalen Gefrierschnitten des Rattengehirns, erfolgte durch die Methode der indirekten Immunfluoreszenz [648, 649, 651, 652]. Dabei wird zunächst ein gegen ein spezifisches Antigen gerichteter Antikörper, der Primärantikörper, verwendet. Anschließend wird nach ausreichender Inkubationszeit ein zweiter, mit einem Fluorophor gekoppelter Antikörper (Sekundärantikörper) zur Detektion des Primärantikörpers eingesetzt. Dieser bindet dabei mit seinem F<sub>ab</sub>-Fragment an das konservierte F<sub>c</sub>-Fragment des Primärantikörpers. Dabei ist darauf zu achten, dass beide Antikörper aus verschiedenen Tierspezies stammen. Durch Anregung des antikörpergebundenen Fluorophors mit Licht geeigneter Wellenlänge (300 / 550 nm) in einem mit den entsprechenden Anregungsfiltern ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop kommt es zur Lichtemission durch das Fluorophor im längerwelligen Bereich des sichtbaren Lichtspektrums (450 – 700 nm). Hierbei können durch den Einsatz primärer AK aus unterschiedlichen Tierspezies und der Wahl geeigneter sekundärer AK mit unterschiedlichen Fluorophoren mehrere Antigene gleichzeitig detektiert werden (Doppel- und Dreifachmarkierung). Ein Nachteil dieser Methode bei hoher Sensitivität des immunfluoreszenzmikroskopischen Antigennachweises besteht darin, dass die Fluorophore bei Anregung im UV-Bereich relativ schnell ausbleichen.

Zusätzlich zu den sowohl in der SFO- bzw. SSO-Primärzellkultur als auch an den Gehirnschnitten neonataler Ratten durchgeführten immunologischen Doppelmarkierungen jeweils durch zwei Antikörper aus unterschiedlichen Tierspezies gegen zwei verschiedene Antigene wurden die Kerne aller Zellen durch das interkalierende Fluorophor 4'6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht. DAPI interagiert dabei sowohl mit DNA als auch mit RNA, wobei sich die Emissionsintensitäten und –max-

ima des DNA- (461 nm) und RNA-gebundenen DAPI (500 nm) unterscheiden. Das Exzitationsmaximum hingegen liegt bei 858 nm.

### 2.5.3 Verwendete Antikörper / -seren

#### Primärantikörper

Mit Hilfe immunzytochemischer Doppelmarkierungen zum Nachweis von jeweils zwei verschiedenen Zellmarkerproteinen wurde die für die Fura-2 Ratio-Imaging Untersuchungen wichtige postexperimentelle Zuordnung der biophysikalisch analysierten Zellen der Primärzellkultur zu spezifischen neuro-glialen Zelltypen durchgeführt. Zur Darstellung von Astrozyten wurden dabei zwei Primärantikörper eingesetzt, welche für das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), ein zytoplasmatisches Intermediärfilament, spezifisch sind [648, 659]. Um Neurone zweifelsfrei charakterisieren zu können, wurden Primärantikörper verwendet die entweder gegen das *microtubule associated protein 2* (MAP<sub>2a+2b</sub>) [648, 659] oder die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) gerichtet waren (*Tab. MM 1*) [687].

Des Weiteren wurde zur Bestimmung der unterschiedlichen Zelltypen und deren prozentualer Verteilung innerhalb der SFO- und SSO-Primärzellkultur für Oligodendrozyten ein Primärantikörper gegen das zytoplasmatische Enzym *CNPase* eingesetzt [688]. Mikrogliazellen bzw. perivaskuläre Makrophagen ließen sich in der SFO-spezifischen Primärzellkultur durch den gegen das Oberflächenprotein CD (*cluster of differentiation*) 68 gerichteten Primärantikörper ED1 detektieren [659], wohingegen der monoklonale *mouse anti-KUL01* Antikörper Mikrogliazellen in der Primärzellkultur des vogelspezifischen SSOs detektierte [689]. Für die Markierung von Tanyzyten diente ein Primärantikörper gegen das zytoplasmatische Intermediärfilament Vimentin, welches charakteristisch für mesenchymales Gewebe ist (*Tab. MM 1*) [690].

Wie ausführlich in der Einleitung beschrieben (*Kap. EIN 1.2*) repräsentiert das SFO ein wichtiges sensorisches CVO für die zentrale Kontrolle des Flüssigkeitshaushaltes und der kardiovaskulären Homöostase. Neben der direkten Wirkung von zirkulierendem ANG II wird von zahlreichen Autoren die Existenz eines SFO-intrinsischen RAS postuliert [227, 362, 386, 475, 492, 691, 692]. Für den immunzytochemischen Nachweis einiger ausgewählter Komponenten des SFO-intrinsischen RAS in Neuronen und Gliazellen in der Primärzellkultur wurden die in *Tab. MM 1* aufgelisteten Primärantikörper verwendet.

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bestellnummer/Hersteller
CNPase	mouse	1:1000	#015M4758V; Sigma-Aldrich, D-München
ED1	mouse	1:1000	MCA341R; BioRad, D-München
GFAP	rabbit	1:1000	20028619; DAKO Agilent, Santa Clara, CA, USA
GFAP	mouse	1:1000	K1216; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
Chicken-KUL01	mouse	1:100	SBA-8420/01; SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
MAP <sub>2a+2b</sub>	mouse	1:1000	#073M4774; Sigma-Aldrich, D-Munich
nNOS	rabbit	1:2000	H0604; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
nNOS	mouse	1:2000	K0812; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
Vimentin	mouse	1:2000	20022872; DAKO Agilent, Santa Clara, CA, USA
Rat-Glutamat	rabbit	1:2000	23090423; Merck-Millipore, D-Darmstadt
Rat-mGluR1	mouse	1:100	55631; BD biosciences, D-Heidelberg
Rat-mGluR5	rabbit	1:300	ABIN3185549; AB-online, D-Aachen
GABA	rabbit	1:2000	2052; Sigma-Aldrich, D-München
Human-Aogen	rabbit	1:2000	Institut für Vet.-Physiologie, D-Gießen
Rat-Aogen	rabbit	5 µg/ml	A20170602545; LOXO GmbH, D-Dossenheim
Human-ANG II	rabbit	1:3000	6/4; Institut für Vet.-Physiologie, D-Gießen
Rat-ACE	rabbit	5 µg/ml	A20180131549; LOXO GmbH, D-Dossenheim
STAT3	rabbit	1:6000	F1410; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA

**Tab. MM 1: Liste der verwendeten Primärantikörper**

Zur Beurteilung der Biosynthese von Aogen in bestimmten Zelltypen, wurde zum einen ein von Prof. Gerstberger 1986 produziertes polyklonales Antiserum gegen humanes Aogen, sowie ein kommerzieller polyklonaler Antikörper gegen rattenspezifisches Aogen eingesetzt. Zudem sollte durch den Einsatz eines polyklonalen Antiserums gegen die Aminosäuresequenz 334 - 409 für das *angiotensin-converting enzyme* der entsprechende Zelltyp identifiziert werden, welcher besagtes Enzym produziert. Schließlich wurde ein in der AG Gerstberger 1986 produziertes polyklonales Antiserum gegen [Ile<sup>5</sup>]ANG II genutzt, um den exprimierenden Zelltyp zu charakterisieren. Für die in der AG Gerstberger hergestellten Antiseren gegen Aogen und ANG II wurden Negativkontrollen durchgeführt, um die spezifische Bindung an ihr Antigen zu untermauern. Zum einen wurde dabei im Rahmen des immunzytochemischen Protokolls der jeweilige Primärantikörper gegen *blocking* Lösung ausgetauscht. Zum

anderen wurde sowohl der Aogen als auch ANG II spezifische Primärantikörper mit dem jeweiligen Antigen präexperimentell abgesättigt. Für diese Präabsorptionskontrolle wurden Antikörper und Antigen (rekombinantes Aogen respektive ANG II) im molaren Verhältnis von 1:100 für 120 Minuten vorinkubiert. Danach wurde der abgesättigte Antikörper in der aus *Tab. MM 1* entnehmbaren Verdünnung in dem immunzytochemischen Versuchsprotokoll eingesetzt. Um die durch ANG II ausgelöste nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) zu zeigen, wurde ein polyklonales Antiserum gegen STAT3 verwendet. Dabei wurden die Zellen zum einen mit ANG II und zum anderen mit PBS als Kontrolle stimuliert und anschließend im Rahmen des immunzytochemischen Protokolls ausgewertet.

Für den immunzytochemischen Nachweis metabotroper Glutamatrezeptoren in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur wurde zum einen ein monoklonaler Antikörper gegen ein rekombinantes Fusionsprotein des metabotropen Glutamatrezeptors 1 [608, 693], zum anderen ein polyklonales Antiserum gegen den N-Terminus des metabotropen Glutamatrezeptors 5 eingesetzt. Zudem sollte der Neurotransmitter Glutamat (GLUT) mit Hilfe eines polyklonalen Antiserums in Neuronen der SFO-Primärzellkultur nachgewiesen werden sowie dessen Kolokalisierung mit dem Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und dem NO generierenden Enzym neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS).

Zur eindeutigen Identifizierung des SFOs in Gehirnschnitten neonataler Ratten wurde eine immunhistochemische Untersuchung mit einem gegen nNOS gerichteten Primärantikörper durchgeführt. Da nNOS in zahlreichen Zellen des SFOs vorhanden ist [694], wurde der Nachweis dieses Enzyms dazu verwendet eindeutig zu zeigen, dass für die SFO-Primärzellkulturen tatsächlich das SFO präpariert wurde.

### **Sekundärantikörper**

Die mit den Fluorophoren Cy3<sup>TM</sup> bzw. Alexa Fluor® 488 markierten Sekundärantikörper unterschiedlicher Spezies (*Tab. MM 2*) wurden in einer Endverdünnung von 1:1000 respektive 1:500 im jeweiligen Inkubationspuffer verwendet.

Fluorophor/Exzitationsmaximum	aus Spezies	gegen Spezies	Bestellnummer/Hersteller
Cy3™ (550 nm)	donkey IgG	rabbit IgG	711-165-152; Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA
Cy3™ (550 nm)	goat IgG	mouse IgG	115-165-003; Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA
Alexa Fluor® 488 (495 nm)	donkey IgG	mouse IgG	A32723; Thermo Fischer Scientific, D-Darmstadt
Alexa Fluor® 488 (495 nm)	donkey IgG	rabbit IgG	A21206; Thermo Fischer Scientific, D-Darmstadt

Tab. MM 2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

#### 2.5.4 Immunzytochemische Charakterisierung der SFO- respektive SSO-Primärzellkultur

##### Versuchsprotokoll

Arbeitsschritt	Vorgehen	Dauer
Waschen	4 °C, mit PBS	3 x 5 Minuten
Blocken	RT, mit <i>blocking</i> Lösung (10 % FKS)	2 h
Primärantikörper-Inkubation	RT oder 4 °C, feuchte dunkle Kammer, in „ <i>blocking</i> “ Lösung	24 oder 48 Stunden
Waschen	4 °C, mit PBS	3 x 5 Minuten
Sekundärantikörper-Inkubation	RT, feuchte dunkle Kammer, in <i>blocking</i> Lösung	2 Stunden
Waschen	4 °C, mit PBS	3 x 5 Minuten
DAPI-Inkubation	4 °C, abgedunkelt	7 Minuten
Waschen	4 °C, mit PBS	3 x 5 Minuten
Deckeln	Mit Citifluor auf gereinigten Objektträgern, Deckgläschen in Reinstwasser dippen	

Tab. MM 3: Protokoll der Immunzytochemie

Die durch eine 15-minütige Inkubation mit PFA (4 %) fixierten neuro-glialen Zellen der SFO- bzw. SSO-Primärzellkultur wurden innerhalb weniger Tage (Lagerung in PBS bei 4 °C im Dunkeln) dem immunzytochemischen Antigennachweis unterzogen. Dabei enthielten die Inkubationslösungen 0,05 % Triton-X-100 zur Permeabilisierung der Zellen und zur Minderung der Oberflächenspannung gemäß Protokoll (Tab. MM 3). Um unspezifische Antigenstrukturen abzusättigen wurde eine *blocking* Lösung verwendet, die 10 % fötales Kälberserum enthielt.

### **Immunzytochemische Charakterisierung der in der SFO- und SSO-Primärkultur vorhandenen neuro-glialen Zelltypen**

Die in der SFO- bzw. SSO-spezifischen Primärzellkultur vorkommenden Zelltypen wurden im Rahmen einer immunzytochemischen Doppelmarkierung mittels zelltypspezifischer Primärantikörper (MAP<sub>2a+b</sub>, GFAP, ED1, CNPase, Vimentin) und der Kernfärbung mittels DAPI ermittelt sowie die absoluten Zellzahlen und prozentualen Anteile an Neuronen, Astrozyten, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und Tanyzyten an der Gesamtzellpopulation bestimmt. Um präparationsbedingte Unterschiede auszuschließen, wurden je Zelltyp mindestens acht „wells“ aus vier unterschiedlichen Präparationen zur Auswertung herangezogen. Pro Zellkultur „well“ wurden sieben rechteckige Zählfelder (Einzelfläche: ca. 0,28 mm<sup>2</sup>) randomisiert auf einem Deckgläschen ausgewählt und die immunreaktiven Zellen ausgezählt. Anschließend wurden pro „well“ aus den sieben Zählfeldern die mittleren Zellzahlen errechnet und als Mittelwert mit Standardfehler (S.E.M.) desselbigen dargestellt. Die ermittelte Anzahl an Neuronen, Astrozyten, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und Tanyzyten wurde zuletzt auf die Gesamtfläche der Primärzellkultur (28 mm<sup>2</sup>) extrapoliert und somit die Gesamtzellzahl für den jeweiligen Zelltyp pro „well“ (Deckgläschen) ermittelt. Aus allen Präparationen wurden schließlich die Gesamtzellzahlwerte als finaler Mittelwert für jeden Zelltyp und als finaler prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl ( $\pm$  S.E.M.) bestimmt.

Nach den Ratio-Imaging Versuchen wurden die hinsichtlich der zelltypspezifischen Expression einzelner Komponenten des SFO- respektive SSO-intrinsischen RAS bzw. verschiedener Glutamatrezeptoren (SFO) untersuchten SFO- und SSO-Primärzellkulturen ebenfalls mit 4 % PFA fixiert und postexperimentell einer immunzytochemischen Charakterisierung und quantitativen Analyse der reaktiven Zelltypen unterzogen. Unter Zuhilfenahme eines auf dem CELL-VU Glas eingetätzten Koordinatensystems, eines digitalen Durchlichtbildes der Kultur sowie der immunzytochemischen Untersuchung konnte eine eindeutige Zuordnung und Typisierung der in Ratio-Imaging Versuchen reaktiven Zellen vorgenommen werden.

### **Neurotransmitter-spezifische Charakterisierung der Neurone in der SFO-Primärzellkultur**

In der SFO-spezifischen Primärzellkultur wurden immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt, um die Expression wichtiger Neurotransmitter in Neuronen qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Zum einen sollte dadurch die Präparation einer zumindest „SFO-angereicherten“ Primärzellkultur bestätigt werden, zum anderen eine Transmitter-spezifische Kodierung des NO generierenden Enzyms nNOS sowie der Neurotransmitter Glutamat und GABA in SFO Neuronen allgemein sowie in Neuronen des SFOs, welche sich als responsiv für Glutamat und / oder ANG II erwiesen, durchgeführt werden. Dadurch ergaben sich folgerichtig immunzytochemische Doppelmarkierungen mit einem Neuronen-spezifischen Primärantikörper und einem Primärantikörper gegen eines der Transmittersysteme des SFOs (nNOS, GABA, Glutamat) oder mit zwei Primärantikörpern gegen unterschiedliche Neurotransmitter (Tab. MM 4). Wie bereits oben erwähnt wurden pro Doppelbestimmung sieben bis acht „wells“ analysiert, wobei jeweils sieben randomisiert ausgewählte Zählfelder hinsichtlich ihrer Anzahl an eindeutig identifizierbaren Neuronen, dem zu untersuchenden Neurotransmitter „X“, sowie doppelmarkierten Zellen charakterisiert wurden.

	<b>1. Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>		<b>2. Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>
1	MAP <sub>2a+b</sub>	mouse	1 : 1000		nNOS	rabbit	1 : 2000
2	MAP <sub>2a+b</sub>	mouse	1 : 1000		GABA	rabbit	1 : 2000
3	MAP <sub>2a+b</sub>	mouse	1 : 1000		Glutamat	rabbit	1 : 2000
4	nNOS	mouse	1 : 2000		nNOS	rabbit	1 : 2000
5	nNOS	mouse	1 : 2000		GABA	rabbit	1 : 2000
6	nNOS	mouse	1 : 2000		Glutamate	rabbit	1 : 2000

**Tab. MM 4: Antikörperkombinationen (Doppelmarkierung) für das Neurotransmitter coding der SFO-spezifischen Neurone**

### **Charakterisierung des polyklonalen Angiotensin II spezifischen Primärantikörpers**

Mögliche Kreuzreaktivitäten des in der AG Gerstberger 1986 hergestellten Primärantiserums gegen ANG II wurden durch präexperimentelle Absorptionsstudien mit anschließender Intensitätsmessung des erzeugten immunzytochemischen Signals

charakterisiert. Dabei wurde eine Inkubation des Primärantikörpers mit seinem Antigen ANG II, sowie peptidergen Vorläuferstufen (Aogen-TDP, ANG I und ANG (1-12)) in aufsteigenden Konzentrationen ( $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M / L) für 120 Minuten bei 20 °C durchgeführt. Anschließend wurde der abgesättigte Antikörper in der aus *Tab. MM 1* entnehmbaren Verdünnung in das immunzytochemische Versuchsprotokoll eingebracht. Die Auswertung erfolgte nach dem in *Kap. MM 2.5.5.1* dargestellten Verfahren.

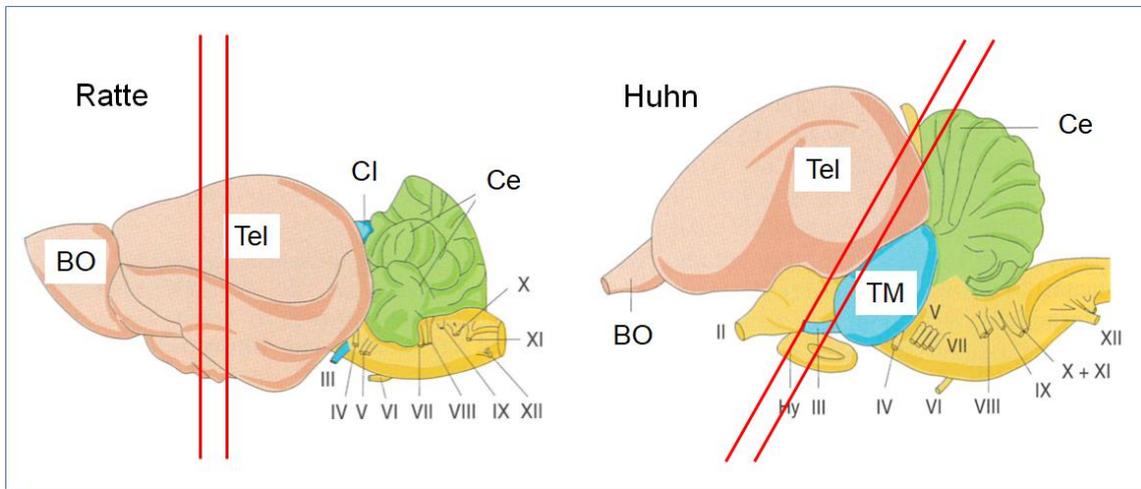
### **2.5.5 Nachweis SFO- und SSO-intrinsischer Neurone in Gehirnschnitten neonataler Ratten und Eintagsküken**

Für die Durchführung des immunhistochemischen Nachweises neuronaler NOS [695] sowie der klassischen histologischen Darstellung SFO- bzw. SSO-intrinsischer Neurone mittels Kresylviolett-Markierung neuronaler Nisslschollen [696, 697] wurden coronale Hirnschnitte neonataler Ratten respektive Gesamtgehirnpräparationen von Eintagsküken angefertigt, wie in *Kap. MM 2.3.2.4* respektive *Kap. MM 2.3.2.5* beschrieben. Beide neuro-glialen Gewebe wurden in frisch angesetztem 4 % PFA für 24 Stunden bei 4 °C fixiert und nachfolgend für weitere 24 Stunden in 20 % Saccharose-Lösung überführt (4 °C), um Gefrierartefakte der Gewebeproben während des Schockfrierens in pulverisiertem Trockeneis zu minimieren. In Parafilm® und vorgekühlte Aluminiumfolie verpackt wurden die Gewebeproben bis zur Anfertigung von Kryostatschnitten bei -40 °C luftdicht gelagert.

#### **Anfertigung von Gefrierschnitten**

Die tiefgefrorenen Hirnschnitte / Gesamtgehirnpräparationen von Ratte respektive Huhn wurden für die serielle Anfertigung von Kryostatschnitten unter Verwendung von *tissue freezing medium*® auf den Objektblock des Kryostaten aufgefroren (Kammertemp. ca. -20 °C; Objektischtemp. -5 bis -10 °C), und in rostro-caudaler Richtung bei der Ratte bzw. caudo-rostraler Richtung beim Huhn 20 µm dicke, coronale Gewebeschnitte auf gekühlte, mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen (*Abb. MM 11*). Die Beschichtung diente dabei der besseren Adhäsion der Gewebeschnitte an der Objektträgeroberfläche, da anionische Bestandteile der Zelloberflächen mit kationischen L-Lysin-Polymeren interagieren [698]. Der zu schneidende Bereich umfasste bei der Ratte die gesamte *Lamina terminalis* mit OvLT, MnPO und SFO, beim Huhn das SSO mit assoziierten Strukturen wie dem NHpC. Dabei wurden

serielle Kryostatschnitte beider Präparationen bis zur Durchführung der immunhistochemischen Markierung im Dunkeln gelagert.



**Abb. MM 11: Schematische Darstellung der Durchföhrung serieller coronaler Schnitte des Ratten- bzw. Hühnergehirns**

Schematische Darstellung der Anfertigung serieller coronaler Schnitte im Ratten- respektive Hühnergehirn. Bei der Ratte umfasste der zu schneidende Bereich die gesamte *Lamina terminalis* am Kommissurensystem des *Telencephalon* (Tel); *Cerebellum* und *Bulbus olfactorius* wurde bereits zuvor abgetrennt. Beim Eintagsküken umfasste der zu schneidende Bereich das SSO sowie den assoziierten NHPc, wobei hier in einem 45 ° Winkel zwischen Tel und *Tectum mesencephali* (TM) eine Inzision gesetzt wurde.

### **Versuchsprotokoll zur immunhistochemischen Markierung SFO-intrinsischer Neurone der Ratte**

Die Gewebeschnitte wurden zur Rehydrierung mit PBS gewaschen (3 x 5 Minuten). Anschließend wurden die coronalen Gehirnschnitte eines jeden Objektträgers mit einem Lipidmarker umrandet, um eine Flüssigkeitsbarriere zu schaffen. Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen erfolgte analog zu *Kap. MM 2.5* mittels einer *blocking* Lösung, welche 10 % *normal donkey serum* (NDS) und 0,3 % Triton-X-100 enthielt. Zum Nachweis SFO-intrinsischer Neurone wurden die Schnitte mit polyklonalem anti-nNOS Antiserum (Kaninchen) in einer Konzentration von 1:500 für 48 Stunden bei 4 °C in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper Cy3™ (*donkey anti rabbit*, 1:1000) für zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) in einer Feuchtekammer inkubiert. Zum Schutz vor Ausbleichen des Sekundärantikörpers wurden alle Arbeitsschritte unter lichtarmen Bedingungen nach dem in *Tab. MM 5* dargestellten Protokoll durchgeführt. Die

Objektträger mit immunhistochemisch markierten, adhärennten Gehirnschnitten wurden im Anschluss lichtdicht bei 4 °C bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop gelagert. Zum Nachweis der Spezifität des Primärantikörpers erfolgte die parallele Durchführung von Negativkontrollen, bei welchen der Primärantikörper gegen *blocking* Lösung ausgetauscht wurde. Somit konnte eine potentielle Fremdmarkierung durch den Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper ausgeschlossen werden.

Arbeitsschritt	Vorgehen	Dauer
	RT, Umrandung der Schnitte mit Lipidmarker	
Waschen	RT, mit <i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	3 x 5 Minuten
Blocken	RT, mit <i>blocking</i> Lösung (10 % NDS; 0,3 % Triton-X-100)	2 Stunden
Primärantikörper-Inkubation	4 °C, feuchte dunkle Kammer, in <i>blocking</i> Lösung, ca. 250 µl/Objektträger	48 Stunden
waschen	RT, mit PBS	3 x 5 Minuten
Sekundärantikörper-Inkubation	RT, feuchte dunkle Kammer, in <i>blocking</i> Lösung, ca. 250 µl/Objektträger	2 Stunden
Waschen	RT, mit PBS	3 x 5 Minuten
Deckeln	Mit Citifluor (2 - 4 Tropfen) auf Objektträger, Deckgläschen mit Nagellack abdichten	

Tab. MM 5: Protokoll Immunhistochemie

### Versuchsprotokoll zur Kresylviolett-Färbung von Gehirnschnitten der Ratte und zur Klüver-Barrera-Färbung von Gehirnschnitten des Huhns

Für die histologische Markierung der neuronalen Nisslschollen in Gehirnschnitten neonataler Ratten auf Ebene des SFOs wurden Gefrierschnitte wie in *Kap. MM 2.5.5* beschrieben angefertigt und anschließend bei 4 °C im Dunkeln bis zum Beginn der Färbung gelagert. Die Gehirnschnitte wurden mit Kresylviolett gefärbt, einem Farbstoff, der sich an basophile Verbindungen wie RNA oder DNA bindet und somit die *Nucleoli* blau und die Ribosomen violett färbt. Die Kresylviolett-Färbelösung enthielt 0,1 g Kresylviolettacetat, gelöst in 100 ml Aqua bidest und 0,25 ml konzentrierten Eisessig. Da die Nervenzellkörper im Vergleich zu ihren Dendriten und dem Axon eine deutlich höher konzentrierte Anzahl an Ribosomen aufweisen, werden nur die Perikaryen markiert. Dabei entstehen die so genannten Nissl-Schollen, dem rauen

endoplasmatischen *Reticulum* mit den assoziierten Ribosomen [696, 697]. Die Färbung erfolgte nach dem in *Tab. MM 6* dargestellten Protokoll.

Arbeitsschritt	Vorgehen	Dauer
Entfettung	RT, in HistoClear	2 Stunden
Rehydrierung	RT, Alkoholreihe abwärts (2 x 100%, 90%, 70%, 50%)	je 2 Minuten
Waschen	RT, kurzes Eintauchen in Aqua bidest	≤ 1 Minuten
Kresylviolett-Färbung	RT, in Kresylviolett-Färbelösung	20-30 Sekunden
Dehydrierung	RT, Alkoholreihe aufwärts (50%, 70%, 90%, 95%, 2 x 100%)	je 30 Sekunden
Entfettung	RT, in HistoClear	mind. 5 Minuten
Entwässern	RT, in Xylol	bis zum Deckeln
Deckeln	Mit Entellan auf Objektträger	

**Tab. MM 6: Protokoll für die Kresylviolett-Markierung SFO-intrinsischer Neurone in coronalen Gehirnschnitten der Ratte**

Zur Durchführung der Färbetechnik nach Klüver-Barrera [699] wurden Gehirne von Eintagsküken, wie in *Kap. MM 2.3.2.5* beschrieben, präpariert und anschließend Gehirnschnitte, wie in *Kap. MM 2.5.5* dargestellt, angefertigt. Bei der Klüver-Barrera-Färbung werden die Zellkörper der Neurone mittels der Nisslschollen-Färbung mit Kresylviolett angefärbt. Zusätzlich wird hier der Farbstoff *luxol-fast-blue* (LFB) eingesetzt, welcher markhaltige Regionen tiefblau hervortreten lässt, und somit Bahnen myelinisierter Axone deutlich erkennbar macht.

Arbeitsschritt	Vorgehen	Dauer
Rehydrierung	RT, in 96 % Alkohol	10 Minuten
LFB-Färbung	60 °C, <i>luxol-fast-blue</i> Färbelösung	40 Minuten
Differenzieren	RT, in 96 % Alkohol	9 Minuten
Differenzieren	RT, in Lithiumcarbonat-Lösung	4 Minuten
Differenzieren	RT, in 96 % Alkohol	4 Minuten
Differenzieren	RT, in Lithiumcarbonat-Lösung	2 Minuten
Waschen	RT, in Aqua bidest	1 Minute
Kresylviolett-Färbung	60 °C, in Kresylviolett-Färbelösung	8 Minuten
Differenzieren	RT, in 96 % Alkohol	5 Minuten
Entwässern	RT, in Xylol	5 Minuten
Deckeln	Mit Entellan auf Objektträger	

**Tab. MM 7: Protokoll für die Färbung SSO-intrinsischer Neurone und Faserverbindungen in coronalen Gehirnschnitten des Hühnerküchens nach Klüver-Barrera**

LFB ist ein in Alkohol löslicher Kupfer-Phthalocyanid Farbstoff, welcher sich an basische Lipoproteine der Markscheide von Axonen anlagert [700]. Zunächst wurde dafür die *luxol-fast-blue* Färbelösung aus 0,1 g LFB gelöst in 1000 ml Äthanol (95 %) und 5 ml Essigsäure (10 %) hergestellt. Außerdem wurde die für die Differenzierung wichtige Lösung aus Lithiumcarbonat angefertigt (0,05 g Lithiumcarbonat gelöst in 100 ml Aqua bidest). Anschließend wurde die Färbung der Gehirnschnitte von Eintagsküken nach dem in *Tab. MM 7* dargestellten Protokoll durchgeführt.

#### **2.5.5.1 Auswertung der immunzyto- und -histochemischen Untersuchungen, sowie der Kresylviolett- und Klüver-Barrera-Färbungen**

Immunzyto- und histologische Untersuchungen von SFO- und SSO-Primärzellkulturen bzw. Gehirnschnitten der Ratte wurden direkt am Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener Schwarzweißkamera bei verschiedenen Vergrößerungen und Belichtungszeiten ausgewertet. Spezielle Filter, zum einen Alexa®488-Filter (ARW 450 - 490 nm), zum anderen Cy3™-Filter (ARW 510 - 530 nm), wurden zur Detektion der Antigen-Antikörper Komplexe verwendet. Die Zellkerne wurden nachgewiesen, indem DAPI bei 359 nm angeregt wurde und blaues Licht bei einer Wellenlänge von 461 nm emittierte. Zur Vereinfachung der Beurteilung von Kollokationen bzw. -distributionen zweier oder dreier Einzelsignale wurde das Programm Metamorph verwendet, welches die einzelnen Farbkanäle (rot, grün, blau) der Kamera zu einem dreifarbigem Bild zusammenfügt.

Die Auswertung der immunzytochemischen Absorptionsstudien des institutseigenen Primärantikörpers erfolgte ebenfalls am oben genannten Fluoreszenzmikroskop mit dem Programm Metamorph. Im *live* Bild wurde die Intensität des immunzytochemischen Signals des Angiotensin II Primärantisera bei 30 Zellen pro „well“ bestimmt, indem eine ROI um das jeweilige Signal gelegt wurde und das Programm die Intensität des in der ROI vorkommenden immunzytochemischen Signals gemessen hat. Wichtig war dabei, dass die Belichtungszeit bei jeder Zelle konstant bei 350 Millisekunden gehalten wurde. Anschließend wurde aus den 30 Zellen pro „well“ ein Mittelwert errechnet. Um die Hintergrundstrahlung des Primärantisera zu erfassen und von den ermittelten Werten abzuziehen, wurde bei 60 Zellen aus 20 unterschiedlichen „wells“, die kein immunzytochemisches Signal für das ANG II Antiserum aufwiesen, die Intensität bestimmt, somit ein Leerwert gebildet, und von den tatsächlich gemessenen Signalintensitäten abgezogen.

Die Auswertung der mit Kresylviolett- oder Klüver-Barrera-Färbetechnik gefärbten Gehirnschnitte von Ratte respektive Eintagsküken wurde mit Hilfe von Durchlichtbildern auf einem hoch auflösenden Mikroskop in der Veterinär-Pathologie, JLU Gießen, durchgeführt.

## 2.6 Quantitative *real-time* PCR

### Technische Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Real-Time PCR System	StepOnePlus™	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Zentrifuge für 96-„well“ Platten	Perfect Spin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, D-Erlangen

### Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Computerprogramme	DataAssist	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	GeNorm Software	PrimerDesign Ltd, Southampton, UK
	NormFinder	Department of Molecular Medicine, Universität Aarhus, Aarhus, Dänemark
	StepOne Software v. 2.1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
MicroAmp™ 96-Well Support base	N4379590	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Applicator	N4333183	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

### Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
MicroAmp™ 8-Cap Strip	N8010535	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
MicroAmp™ 8-Tube Strip	N8010580	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
MicroAmp™ Fast Optical 96-“well” Reaction Plate	N4346907	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

MicroAmp™ Optical Adhesive Film	N4311971	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
---------------------------------	----------	-----------------------------------------

### Chemikalien

Chemikalie	Typ	Hersteller
Desoxynucleotide Mix (dNTPs)	SLBF4536V	Sigma Aldrich, D-München
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	BCBF0080V	Sigma Aldrich, D-München
Dithiothreitol (DTT)	1102601	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lysis Puffer RA1	1684/532	Macherey-Nagel, D-Düren
MDB	4568/003	Macherey-Nagel, D-Düren
M-MLV Reverse Transkriptase	1889245	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NucleoSpin RNA XS	1710/002	Macherey-Nagel, D-Düren
Primer Design PerfectProbe geNorm gene kit rat	gePLUS-SY-6	PrimerDesign Ltd, Southampton, UK
Random Hexamer	181608	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RT-Puffer	1734529	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Taqman Gene Expression Master Mix	1705287	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Taqman DNA Polymerase	BIO-21105/S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TCEP	1476/008	Macherey-Nagel, D-Düren
Wasch Puffer RA3	5624/011	Macherey-Nagel, D-Düren

### Verwendete „Taqman gene expression assays“ der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Gen	Assay-ID
Grm1 (met. GLUT-Rez. 1)	Rn00566625_m1
Grm5 (met. GLUT-Rez. 5)	Rn00566628_m1
Agt (Angiotensinogen)	Rn00593114_m1
Ren (Renin)	Rn00561847_m1
Ace (Angiotensin-Converting-Enzym)	Rn00561094_m1
Ctsd (Cathepsin D)	Rn00592528_m1
Cma1 (Chymasen)	Rn00565319_m1

---

**Verwendete „Reference gene expression“ der Firma PrimerDesign / Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA**

Gen	Assay-ID
CANX	JN110253
B2M	JN110254
UBC	JN110228
18S	JN110236
GAPDH	JN110223
B-Actin	JN110224

---

### 2.6.1 Allgemeine Grundlagen

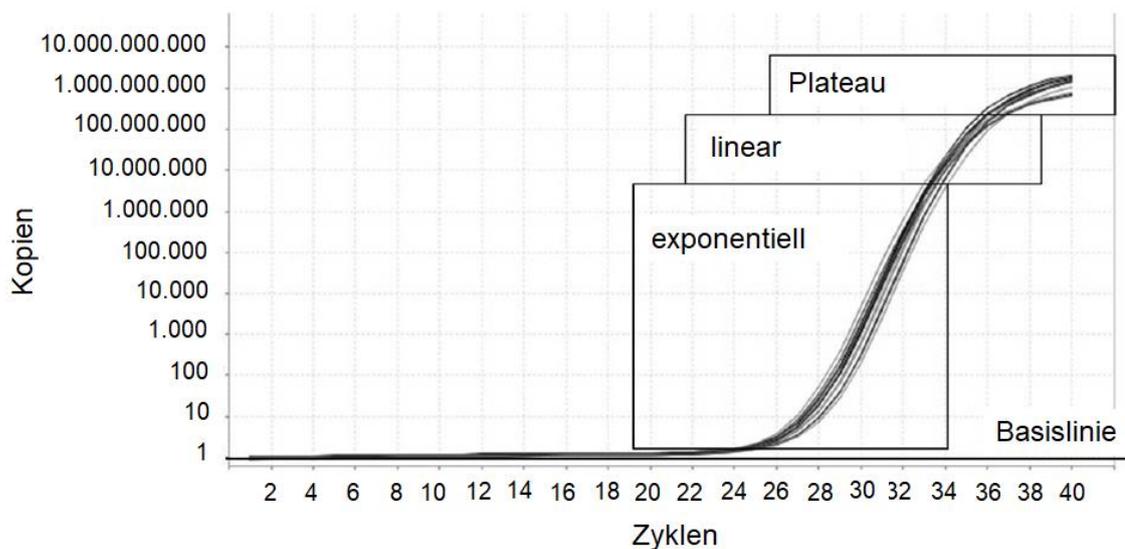
#### PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen Vervielfältigung (Amplifikation) definierter, einzel- (*single strand*, ss) oder doppelsträngiger (*double strand*, ds) DNA-Sequenzen. Für die Durchführung werden Oligodeoxynukleotide aus max. 30 Nukleotiden als Primer verwendet, welche sich komplementär an eine zu amplifizierende ssDNA-Sequenz anlagern und somit als Startpunkte für DNA-replizierende Enzyme wie z.B. die Taq-Polymerase dienen.

Der typische Ablauf einer PCR lässt sich in drei Schritte unterteilen [701]: (1) Denaturierung des dsDNA *template* (Vorlage), (2) Hybridisierung (*annealing*) der spezifischen Primer an die entstehende ssDNA und (3) Elongation des dsDNA Amplifikats. Zunächst erfolgt die Trennung der beiden DNA-Stränge des *template* bei einer Temperatur von 94 – 95 °C. Die Anlagerung der im Überschuss vorhandenen Primer an die nun einzelsträngige DNA findet während der Absenkung der Temperatur auf 55 °C statt. Anschließend wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, welche dem Temperaturoptimum der thermostabilen Taq-Polymerase entspricht. Dieses Enzym ist in der Lage, ausgehend vom gebundenen Primer, einen komplementären Strang aus den im Reaktionsansatz vorliegenden dNTP-Molekülen (Desoxyribonukleosidtriphosphate) zu synthetisieren und somit nach einem Reaktionszyklus eine exakte Kopie des dsDNA *templates* herzustellen. Während der Elongation läuft die Komplementierung an beiden Einzelsträngen der *template*-DNA ab, was zur Folge hat, dass die *template*-DNA nach einem Reaktionszyklus verdoppelt ist. Beim Wiederholen der Zyklen dienen die Produkte der vorherigen Zyklen als Vorlagen der nächsten Zyklen und ermöglichen somit theoretisch eine exponentielle Amplifikation der spezifischen

Sequenz [702]. Dadurch entsteht eine Vielzahl an identischen dsDNA-Fragmenten mit spezifischer Basensequenz und Länge.

Die lange Phase einer exponentiellen Amplifikation geht dabei mit Zunahme der dsDNA Vervielfältigungen in eine lineare Phase der Amplifikation und letztendlich in eine Plateau- oder Endpunktphase über. Die Gründe hierfür sind vielfältiger Natur. Zum einen spielt die Verringerung der zur Verfügung stehenden intakten dNTPs und Oligonukleotidprimer eine Rolle, zum anderen die Anhäufung von Pyrophosphat sowie die vorkommende Bindung der Amplifikate untereinander anstelle der Primer.



**Abb. MM 12: Anzahl der Kopien der amplifizierten DNA-Sequenz in Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Zyklen einer qRT-PCR**

Zu Beginn verläuft die Amplifikation exponentiell, später sinkt die Geschwindigkeit der Amplifikation, sodass erst die lineare, später die Plateau-Phase erreicht wird.

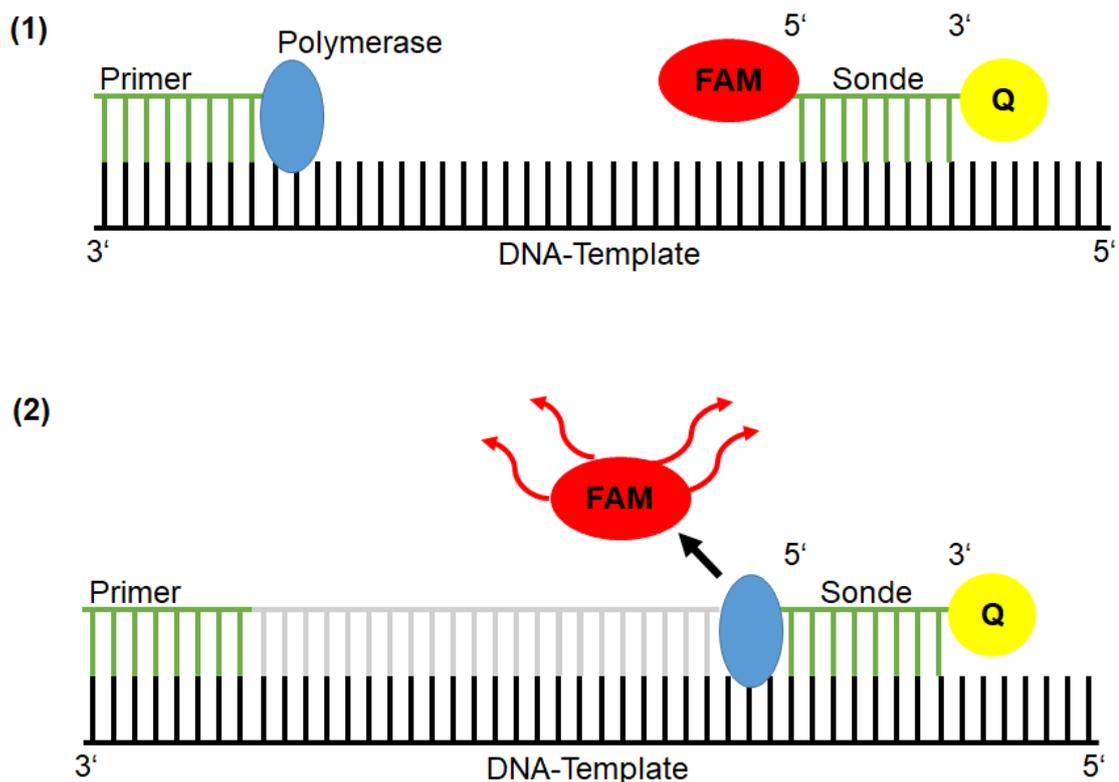
Modifiziert nach Schneiders (2015)

Im Anschluss an eine traditionelle PCR erfolgt die elektrophoretische Auftrennung aller Fragmente zuzüglich eines parallel aufgetragenen Sets an Größenmarkern im Agarose-Gel. Der Visualisierung dient dann ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff wie Ethidiumbromid, welches sich zwischen die komplementären Basenpaare der dsDNA-Fragmente im mittleren Abstand von 10 Basenpaaren einlagert [703–705]. Die Quantifizierung der Amplifikatmenge erfolgt mittels der Bestimmung der Bandendicke bzw. der Intensität der Bandenfluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm [706]. Bei diesem Verfahren zum Nachweis der PCR-Amplifikation wird die Plateau- oder Endpunktphase der PCR-Reaktion nach einer bestimmten Zyklanzahl genutzt, die Reaktionskinetik hingegen wird dabei nicht berücksichtigt. Die

Quantifizierung der Ausgangsmenge an *template* ist dementsprechend relativ unpräzise.

### Quantitative *real-time* PCR

Im Gegensatz zur klassischen PCR bietet die *real-time* PCR die Möglichkeit einer genaueren Quantifizierung der für ein bestimmtes Protein kodierenden DNA- oder RNA-Sequenz unter Berücksichtigung der Reaktionskinetik. Die *state-of-the-art* quantitative *real-time* PCR-Methode verbindet dabei die Amplifizierung von Nukleinsäuren mit der Quantifizierung in Echtzeit [707]. In dieser Arbeit wurden dabei sogenannte TaqMan®-Sonden eingesetzt [708]. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen, die komplementär zu einer Sequenz am 5'-Ende des gesuchten Gens sind und ein Fluorophor (6-Carboxyfluorescein, FAM) sowie einen „Quencher“ tragen.



**Abb. MM 13: Detektion des vom Fluorophor FAM emittierten Lichts während der quantitativen *real-time* PCR**

(1) Die TaqMan®-Sonde bindet spezifisch an die gesuchte Gensequenz. Die Sonde trägt dabei ein Fluorophor (FAM) und einen „Quencher“ (Q), der das vom Fluorophor emittierte Licht absorbiert. (2) Während der Elongation wird das Fluorophor von der Sonde abgespalten, während der Rest der Sonde mit dem „Quencher“ hydrolysiert wird. Durch die Trennung von Farbstoff und „Quencher“ kann das Fluorophor Licht emittieren.

Modifiziert nach Schneiders (2015) und LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA

Licht der Wellenlänge 495 nm regt das Fluorophor FAM an, welches daraufhin Licht der Wellenlänge 517 nm emittiert. Solange die TaqMan®-Sonde intakt ist und dadurch Fluorophor und „Quencher“ dicht beieinander lokalisiert sind, absorbiert der „Quencher“ das vom Fluorophor emittierte Licht. Bindet die Sonde aber an die gesuchte Gensequenz und wird diese dann amplifiziert, so löst die DNA-Polymerase das Fluorophor vom 5'-Ende der Sonde ab, während der Rest der Sonde und der „Quencher“ hydrolysiert werden. Nach der räumlichen Trennung von „Quencher“ und Fluorophor wird von letzterem emittiertes Licht nicht mehr vom „Quencher“ absorbiert und kann somit detektiert werden (*Abb. MM 13*). Die Amplitude der detektierten Lichtquanten bei der für das Fluorophor charakteristischen Emissionswellenlänge von 517 nm ist demnach proportional zur Anzahl der während der PCR synthetisierten Genkopien. Die Detektion des emittierten Lichtes erfolgt am Ende jeder Elongationsphase; somit kann der Verlauf der PCR in Echtzeit verfolgt werden.

### **2.6.2 Extraktion der RNA aus kultivierten SFO-Zellen**

Vorbereitend für die quantitative *real-time* PCR wurde zunächst die RNA aus den zu untersuchenden Zelllysaten extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben [709, 710]. Dieses Verfahren ermöglichte eine Untersuchung der Expression bestimmter Zielgene auf mRNA-Ebene.

Die RNA-Extraktion aus primären SFO-spezifischen Zellkulturen erfolgte nach einem Protokoll der Firma Macherey und Nagel (Düren, Deutschland), von welcher alle Reagenzien im sogenannten „NucleoSpin® RNA XS Kit“ erworben wurden [711–714]. Die Zellkulturen wurden dabei wie in *Kap. MM 2.3.2.4* beschrieben hergestellt und für die RNA-Extraktion nach einer Kultivierungszeit von vier Tagen herangezogen. Zur vollständigen Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen zunächst in der Mikro-Kulturkammer mit sterilem PBS gewaschen, um eine mögliche Aktivitätsminderung des nachfolgend eingesetzten Lysispuffers auszuschließen. Anschließend wurde das PBS vollständig aus den Zellkulturkammern abgesaugt und die Kammern von den die Zellen tragenden Deckgläschen mittels einer Pinzette entfernt. Die Deckgläschen mit den darauf befindlichen SFO Zellen wurden auf einem sterilen Filterpapier platziert, und 200 µl RA1-Lysispuffer wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Die adhärenierten Zellen in der Mitte der Deckgläschen wurden im Anschluss jeweils mit ca. 30 µl RA1-Lysispuffer überschichtet, wobei dieser aufgrund der Poly-L-Lysinbeschichtung als Tropfen genau über der Zellkulturfläche verblieb.

Arbeitsschritt	Vorgehen	Dauer
Vollständige Zellyse und Homogenisierung	Zugabe von 4 µl TCEP zu je 200 µl Zellsuspension; vortexen	2 x 5 Sekunden
Zugabe der Carrier-RNA	Zugabe von 5 µl carrier-RNA „working solution“; Erneutes Vortexen und abschließende Zentrifugation	2 x 5 Sekunden 1 Sekunde bei 1.000 g
Lysat-Reinigung	Proben auf Nucleospin-Filter-violett (2 ml tubes) pipettieren und zentrifugieren	30 Sekunden bei 11.000 g
Ausfällen der RNA	Filter verwerfen. Zum Filtrat 200 µl Äthanol geben und durch Auf- und Abpipettieren (5 x) mischen.	
RNA-Filterbindung	Proben auf Nucleospin-Filter-blau (2 ml tubes) pipettieren. Zentrifugieren zur Bindung von RNA an Filter. Überführung der Filter in 2 ml tubes.	30 Sekunden bei 11.000 g
Entsalzung	Zugabe von 100 µl MDB (mebrane desalting buffer) zu den Proben.	30 Sekunden bei 11.000 g
DNA-Verdau	rDNAse-Mix (3 µl rDNAse + 27 µl Reaktionspuffer) ansetzen und je 25 µl auf direkt auf die Membran der Filter pipettieren. Deckel der Filter verschließen und bei RT inkubieren	15 min
Waschen und Trocknen der Silicamembran	Zugabe von 100 µl RA2 (Inaktivierung rDNAse). Nach der Inkubationszeit werden die Filter zentrifugiert und anschließend in neue 2 ml Tubes überführt.	2 Minuten 30 Sekunden bei 11.000 g
Waschen der Silicamembran	Zugabe von 400 µl RA3 (Wasch Puffer). Anschließend Zentrifugation und Überführung in neue 2 ml Tubes.	30 Sekunden bei 11.000 g
Waschen und Trocknen der Silicamembran	Zugabe von 200 µl RA3 (Wasch Puffer) und Zentrifugation. Danach Überführung der Filter in 1,5 ml Tubes.	2 Minuten bei 11.000 g
Eluation der RNA	Zweimalige Elution der RNA mit je 10µl RNAse freiem H <sub>2</sub> O und naheliegender Zentrifugation.	30 Sekunden bei 11.000 g

Tab. MM 8: Protokoll der RNA-Extraktion

Nach fünfminütiger Inkubation wurden die im Lysispuffer gelösten Zellen mit Hilfe einer Pipette resuspendiert, vom Deckgläschen gelöst, in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Zur finalen

Durchführung der RNA-Extraktion wurden alle Zellkulturlysate langsam auf Eis aufgetaut und gemäß Protokoll (Tab. MM 8) behandelt.

### 2.6.3 Reverse Transkription

Um die *real-time* PCR für spezifische RNAs aus Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur durchzuführen, müssen sogenannte cDNA-*templates* generiert werden, welche mit Hilfe der reversen Transkription aus der Proben-mRNA gewonnen wurden. Das Prinzip der cDNA Synthese beruht auf der Umschreibung eines mRNA-*template* in einsträngige cRNA und letztendlich dsDNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, auch „Reverse Transkriptase“ genannt, die z.B. von Retroviren wie dem *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV) exprimiert wird [702]. Wie auch andere DNA-Polymerasen benötigt auch dieses Enzym Primer zur Initiierung der Reaktion. Natürlich vorkommende mRNA weist in den meisten Fällen einen poly(A)-Schwanz (Aneinanderreihung mehrerer hundert Adenin-Nukleotide am 3'-Ende) auf; deshalb kann ein Oligonukleotid, das nur aus komplementären Thymin-Nukleotiden besteht [Oligo(dT)], als Primer eingesetzt werden. Alternativ können auch zufällige Primer (Hexamere) einzeln oder in Kombination mit Oligo(dT)-Primern verwendet werden. Dies bietet den Vorteil, dass auch beschädigte mRNA transkribiert werden kann. Dabei wird die mRNA auf 65 °C erhitzt und unterstützend Dithiothreitol (DTT) zugesetzt um die Auflösung von Sekundärstrukturen der mRNA zu ermöglichen und diese so leichter zugänglich für die Primer und Polymerase zu machen. Die Reverse Transkriptase synthetisiert bei 37 – 42 °C einen zur mRNA komplementären DNA-Strang (= cDNA) aus den im Ansatz vorliegenden dNTPs, welcher als *first strand* bezeichnet wird. Damit am Ende eine doppelsträngige cDNA für die folgenden Schritte der PCR vorliegt, synthetisiert die Reverse Transkriptase auch den komplementären DNA-Strang. Zur Inaktivierung des Enzyms wird der Ansatz abschließend auf 90 °C erhitzt (Tab. MM 9).

Zur Kontrolle der einzelnen Reaktionsschritte wurde jeweils ein Reaktionsgefäß mit 4 µl DEPC-Wasser anstelle der RNA (*blank 1*) bzw. 11 µl DEPC-Wasser anstelle des erhitzten Ansatzes (*blank 2*) eingesetzt. Diese dienten dem Nachweis eventueller Verunreinigungen der verwendeten Lösungen mit RNA oder DNA ohne Zugabe des eigentlichen *templates*. 1 µl der verdünnten Lösung entsprach dabei der cDNA, die aus 50 ng der Gesamt-RNA gewonnen wurde und konnte somit in der *real-time* PCR eingesetzt werden. Die Lagerung, sofern erforderlich, erfolgte bei -20 °C.

Arbeitsschritt	Vorgehen	Dauer
Ansetzen	Mix I (pro 1 µg RNA): 5 µl DEPC-Wasser 1 µl Random-Hexamer 1 µl dNTPs Mix II (pro 1 µg RNA): 4 µl RT-Puffer 2 µl Steriles Wasser 2 µl 0,1 M DTT 1 µl RT-Enzym (M-MLV) Es werden 4 µl RNA-Probe (= 1 µg mRNA im Ansatz) mit 7 µl RT-MIX I pro Well vermischt.	
Erhitzen	Im <i>real-time</i> Cycler auf 65 °C	10 Minuten
Abkühlen	4 °C auf Eis	
Zugabe RT-Mix II	Es werden 9 µl RT-Mix II zu jedem reaktionsgefäß hinzugegeben.	
Erwärmen	Im <i>real-time</i> Cycler auf 37 °C	60 Minuten
Erhitzen	Im <i>real-time</i> Cycler auf 90 °C	5 Minuten
Abkühlen	4 °C auf Eis	
Verdünnen	Es wird 1 : 20 verdünnt mit autoklaviertem H <sub>2</sub> O	

Tab. MM 9: Protokoll der Reversen Transkription

#### 2.6.4 Durchführung der quantitativen *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR wurde im Anschluss an die reverse Transkription nach dem in Tab. MM 10 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Arbeitsschritt	Vorgehen	Dauer
Ansetzen	PCR-Mix: 3,5 µl autoklaviertes Wasser 5 µl Gene Expression Master Mix 0,5 µl Primer	
Vorlegen	9 µl <i>real-time</i> PCR-Mix pro "well" in 96-Well-Platte	
Zugabe cDNA	1 µl pro „well“	
Aktivierung Polymerase	Im <i>real-time</i> Cycler bei 50 °C	2 Minuten
Denaturierung	Im <i>real-time</i> Cycler bei 95 °C	10 Minuten
Denaturierung Annealing, Elongation	Im <i>real-time</i> Cycler bei 95 °C  Im <i>real-time</i> Cycler bei 60 °C	15 Sekunden 60 Sekunden (je 40 Zyklen)

Tab. MM 10: Protokoll der quantitativen *real-time* PCR

Dabei wurden alle Proben in Duplikaten analysiert. Des Weiteren wurde, neben den beiden *blanks* aus der reversen Transkription, ein weiteres *blank* mit 1 µl autoklaviertem Wasser anstelle der cDNA-Probe als Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen analysiert.

#### **2.6.4.1 Ermittlung der optimalen endogenen Kontrolle mit Hilfe des Primer Design "Reference Gene Kits"**

Unter einer endogenen Kontrolle im Rahmen quantitativer RT-PCR Analysen versteht man die Koexpression eines Gens, welches in den vorliegenden Proben ohne Einfluss durch die jeweilige Behandlung möglichst konstant exprimiert wird. Dies dient der Normalisierung der Proben, um eventuelle Unterschiede in der Menge der in die PCR eingesetzten cDNA auszugleichen. Zur Ermittlung der besten endogenen Kontrolle für das in dieser Arbeit verwendete PCR-Protokoll wurden sechs sogenannte *house keeping* Gene im Rahmen der mRNA-Analyse rattenspezifischen Gewebes getestet [715]. Zu diesen *house keeping* Genen gehörten  $\beta$ -Actin, CANX, B2M, GAPDH, UBC und 18s (*Kap. MM 2.6*). Die Daten wurden im Anschluss mit Hilfe der Programme NormFinder und DataAssist ausgewertet. Alle Programme ermittelten  $\beta$ -Actin als das *house keeping* Gen mit der stabilsten Expression und demnach als das jeweilige Gen, welches als zuverlässigste endogene Kontrolle für mRNAs der SFO-spezifischen Primärzellkultur fungiert. Die Anwendung des Programms NormFinder hat zudem ergeben, dass das  $\beta$ -Actin Gen mit der geringsten Schwankungsbreite zwischen den und innerhalb der biologischen Gruppen exprimiert wurde. Die Expression von  $\beta$ -Actin wurde deshalb als am besten geeignete endogene Kontrolle ermittelt und somit als selbige ausgewählt.

#### **2.6.4.2 Auswertung der quantitativen *real-time* PCR**

Die Auswertung der Expressionsrate verschiedener Zielgene in der neuro-glialen SFO-Primärzellkultur erfolgte unter Zuhilfenahme der  $\Delta C_T$ -Methode [716]. Der jeweilige  $C_T$ -Wert beschreibt denjenigen Zyklus der PCR, bei welchem das Fluoreszenzsignal erstmalig die Hintergrundfluoreszenz überschreitet und wird als *threshold* (T) oder „Schwellenwert“ bezeichnet (*Abb. MM 12*). Zu diesem Zeitpunkt kann noch von einer exponentiellen Phase der *template*-DNA Amplifikation ausgegangen werden [717]. Auf dieser Grundlage kann zum einen durch Vergleich mit den  $C_T$ -Werten einer Standardkurve die tatsächliche Menge des *templates*, die ursprünglich im Reaktionsansatz vorlag, festgestellt werden (absolute Quantifizierung). Die relative

Quantifizierung auf Basis der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode, beschreibt hingegen die relative Expressionsänderung eines Zielgens in Relation zur endogenen Kontrolle [716], die *relative quantity* (relative Menge, RQ). Alle Proben aus der neuro-glialen Primärkultur wurden dabei im doppelten Ansatz gemessen und die  $C_T$ -Werte aus beiden Ansätzen gemittelt. Im Anschluss daran wurde für jede Probe die Differenz zwischen dem  $C_T$ -Wert des Zielgens und dem  $C_T$ -Wert der endogenen Kontrolle gebildet ( $\Delta C_T$ -Wert). Zusätzlich dazu wurde ein Vergleich der Zielgenexpressionen aller Proben eines Versuchsansatzes mit einer Referenzprobe, dem sogenannten „Kalibrator“ durchgeführt, der im einfachsten Fall die Probe mit der insgesamt geringsten Expression ist [716] und somit der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert errechnet. Schließlich konnte mit  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  die x-fache Expression (RQ) jeder Probe im Vergleich zur Referenzprobe berechnet werden [717] (Tab. MM 11).

Vorraussetzung für diese Art der Berechnung ist, dass die Effizienz der PCR jeweils optimal war, d.h. in jedem Zyklus eine Verdopplung der *template* Menge stattgefunden hat, was einer Effizienz von 100 % entspricht [717] bzw. als Faktor 1 [716] bezeichnet wird. Aufgrund der Verdopplung der DNA wird eine optimale Effizienz auch oft mit dem Faktor 2 beschrieben [716]. Des Weiteren muss durch gleichbleibende Reaktionsbedingungen gewährleistet werden, dass die Effizienz der Amplifikation des Referenzgens ebenso hoch wie die jeweilige der Zielgenamplifikation ist [718]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Primern und unter Verwendung der Originalprodukte garantiert der Hersteller *ThermoFisher* eine optimale Effizienz der PCR (Angaben des Herstellers).

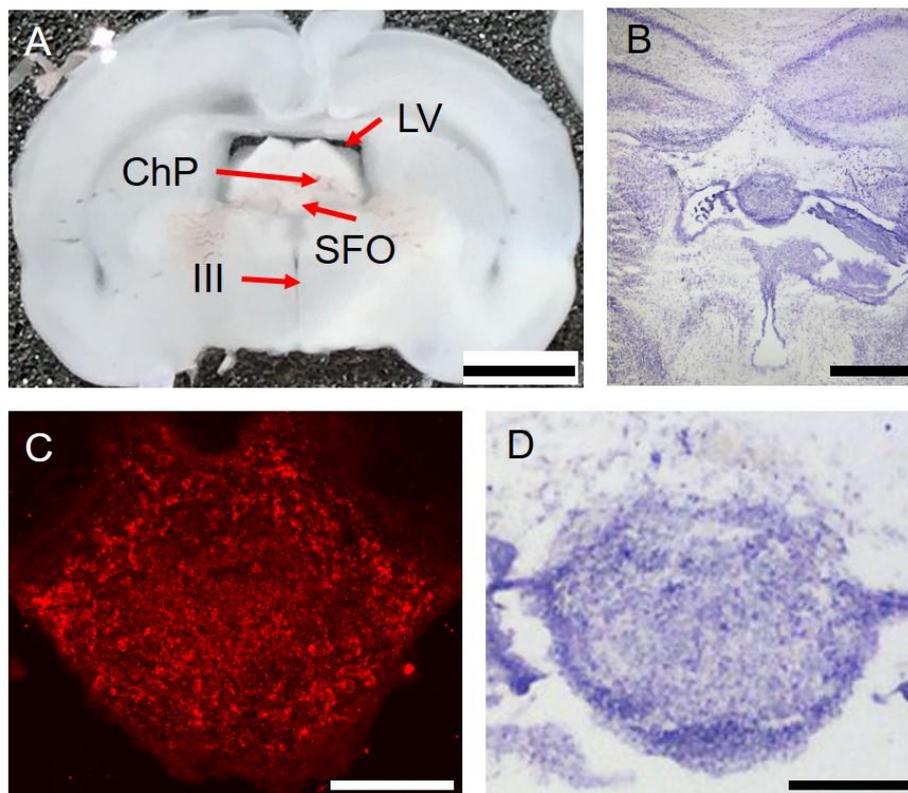
Variable	Berechnung
$\Delta C_T$	$C_T\text{Zielgen} - C_T\text{Referenzgen}$
$\Delta\Delta C_T$	$\Delta C_T\text{Zielgen} - \Delta C_T\text{Zielgen der Referenzprobe}$
RQ	$2^{-\Delta\Delta C_T}$

Tab. MM 11: Formeln zur Berechnung der RQ

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der neuro-glialen Primärzellkultur des *Organum subfornicale* neonataler Ratten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine bereits von der AG Gerstberger etablierte [643] SFO angereicherte, neuro-gliale Primärzellkultur neonataler Wistar-Ratten für die detaillierte funktionelle Charakterisierung derselben eingesetzt (*Kap. MM 2.3.2.4*). Als wichtige *landmarks* im Rahmen der Präparation des SFOs aus seriellen, coronalen Vibratomschnitten des früh postnatalen Rattengehirns unter dem Binokular dienten dabei der dritte Gehirnvventrikel, die Blutgefäße des typischerweise vorkommenden *Plexus choroideus*, die *Commissura hippocampale* sowie das mittels Immunhistochemie nachgewiesene und für das SFO typische Enzym neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) (*Abb. ERG 1*).



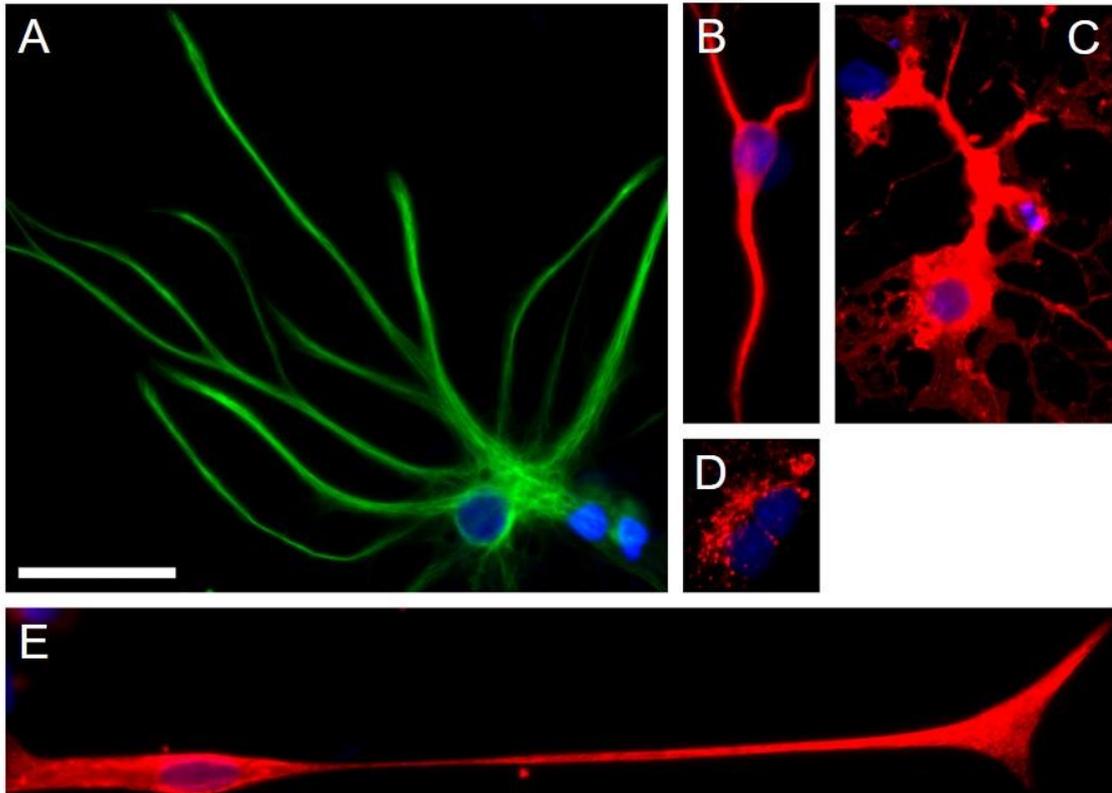
**Abb. ERG 1: Das rattenspezifische SFO als sensorisches zirkumventrikuläres Organ**

Neuroanatomische Lokalisation des SFOs in coronalen Gehirnschnitten neonataler Ratten. Übersichtsansicht als nativer coronaler Gehirnschnitt (**A**) (Größenmarker entspricht 2,5 mm) sowie nach Kresylviolett-Färbung (**B**) (Größenmarker entspricht 1 mm) des SFOs. (**C**) zeigt eine immunhistochemische Markierung von SFO-Neuronen, welche das für das SFO typische Enzym neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) exprimieren. In (**D**) ist eine detaillierte Ansicht einer Kresylviolett-Färbung des SFOs dargestellt. Der Größenmarker in (**C**) und (**D**) entspricht 500  $\mu\text{m}$

Hinsichtlich der Etablierung einer neuro-glialen SFO-spezifischen Primärzellkultur in Form einer Mikrokultur zur Minimierung der einzusetzenden Anzahl neonataler Ratten wurde die durch enzymatische und mechanische Dissoziation erhaltene Zellsuspension (*Kap. MM 2.3.2.4*), nach Erfassung der Zellzahl pro Volumeneinheit in einer Neubauer-Zählkammer, auf eine Zelldichte von durchschnittlich 50.000 Zellen pro Milliliter (ca. 17.500 Zellen pro „well“) verdünnt. Nach einer drei bis vier tägigen Kultivierung der Zellen, welche der vollständigen Differenzierung der verschiedenen Zelltypen diene, wurden die in „wells“ kultivierten Zellen für unterschiedliche *in vitro* Analysen herangezogen.

### **3.1.1 Immunzytochemische Charakterisierung der neuro-glialen Zelltypen in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

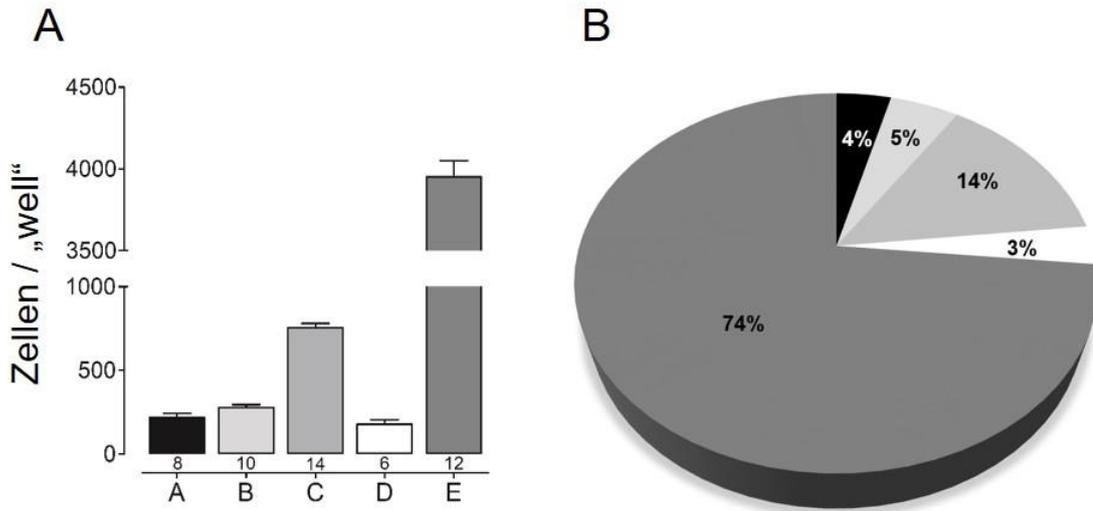
Unter Zuhilfenahme verschiedener Primärantikörper / -seren gegen zelltypspezifische Markerproteine wurden die in der neuro-glialen SFO-spezifischen Primärzellkultur vorkommenden Zelltypen typisiert. Hierfür wurden in mehreren „wells“ aus vier verschiedenen Zellkulturpräparationen die absolute Zellzahl und der prozentuale Anteil (*Abb. ERG 3*) an Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikrogliazellen und Tanyzyten immunzytochemisch bestimmt. Im arithmetischen Mittel ergaben sich pro „well“ der SFO-spezifischen Primärkultur  $756 \pm 25$  Neurone (ca. 14 %),  $3952 \pm 99$  Astrozyten (ca. 74 %),  $178 \pm 27$  Oligodendrozyten (ca. 3 %),  $277 \pm 17$  Mikrogliazellen (ca. 5 %) und  $220 \pm 23$  Tanyzyten (ca. 4 %) (*Abb. ERG 2 und Abb. ERG 3*). Der Nachweis von Endothelzellen, welche aufgrund der Nähe zum *Plexus choroideus* vorhanden sein könnten, fiel mittels immunzytochemischen Nachweises für „von Willebrandt Faktor“ negativ aus (*Abb. ERG 4*). Dabei erbrachte der Antikörper gegen „von Willebrandt Faktor“ in Gehirnschnitten bereits eindeutig positive Ergebnisse [191].



**Abb. ERG 2: Immunzytochemische Charakterisierung der Zellen in der SFO-Primärzellkultur neonataler Ratten**

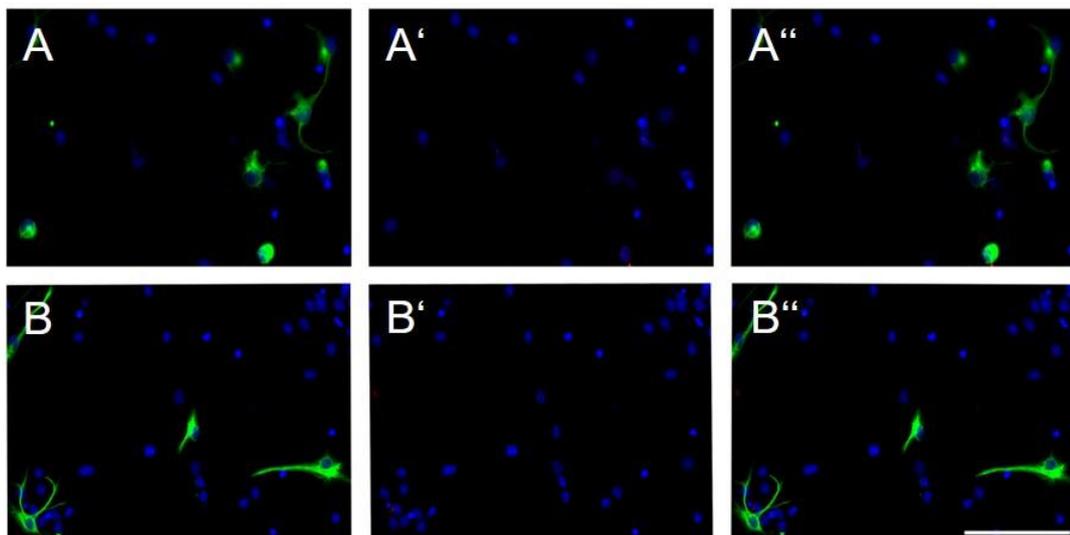
- (A) Indirekter Immunfluoreszenznachweis von Astrozyten mittels polyklonalem rabbit anti-GFAP Antiserum. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (grün).
- (B) Identifizierung von Neuronen mit Hilfe von monoklonalem mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub> Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3<sup>TM</sup> –gekoppeltes goat anti-mouse IgG verwendet (rot).
- (C) Markierung von Oligodendrozyten durch monoklonalen mouse anti-CNPase Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3<sup>TM</sup> –gekoppeltes goat anti-mouse IgG verwendet (rot).
- (D) Immunzytochemischer Nachweis von Mikrogliazellen mittels monoklonalem mouse anti-ED1 Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3<sup>TM</sup> –gekoppeltes goat anti-mouse IgG verwendet (rot).
- (E) Indirekter Immunfluoreszenznachweis von Tanyzyten unter Zuhilfenahme von monoklonalem mouse anti-Vimentin Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3<sup>TM</sup> –gekoppeltes goat anti-mouse IgG verwendet (rot).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 25 µm.



**Abb. ERG 3: Absolute Zellzahl und prozentualer Anteil der immunzytochemisch charakterisierten Zelltypen in der neuro-glialen SFO-spezifischen Primärzellkultur**

Der Nachweis der (A) absoluten und (B) prozentualen Anteile verschiedener Zelltypen innerhalb der SFO-spezifischen Primärzellkultur wurde mittels Marker-spezifischer Antikörper / -seren durchgeführt: Neurone (MAP<sub>2a+2b</sub> immunopositiv, C, 14 %); Astrozyten (GFAP immunopositiv, E, 74 %); Oligodendrozyten (Cnpase immunopositiv, D, 3 %); Mikrogliazellen (ED1 immunopositiv, B, 5 %); Tanyzyten (Vimentin immunopositiv, A, 4 %). Die Zahlen unter den Balken repräsentieren die Anzahl ausgewerteter Zellkultur „wells“.



**Abb. ERG 4: Negativer immunzytochemischer Nachweis von Endothelzellen in der SFO-spezifischen Zellkultur**

Indirekter Immunfluoreszenznachweis von Neuronen (A) und Astrozyten (B) mittels monoklonalem mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub>, respektive monoklonalem mouse anti-GFAP Antikörper. (A') und (B') zeigen die Markierung von Endothelzellen mit Hilfe von polyklonalem rabbit anti-von Willebrand Faktor (vWF) Antikörper. In (A'') und (B'') ist die digitale Superposition beider Bilder dargestellt. Als sekundäre Antikörper wurden Alexa<sup>®</sup> 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG (grün) und Cy3<sup>™</sup>–gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).

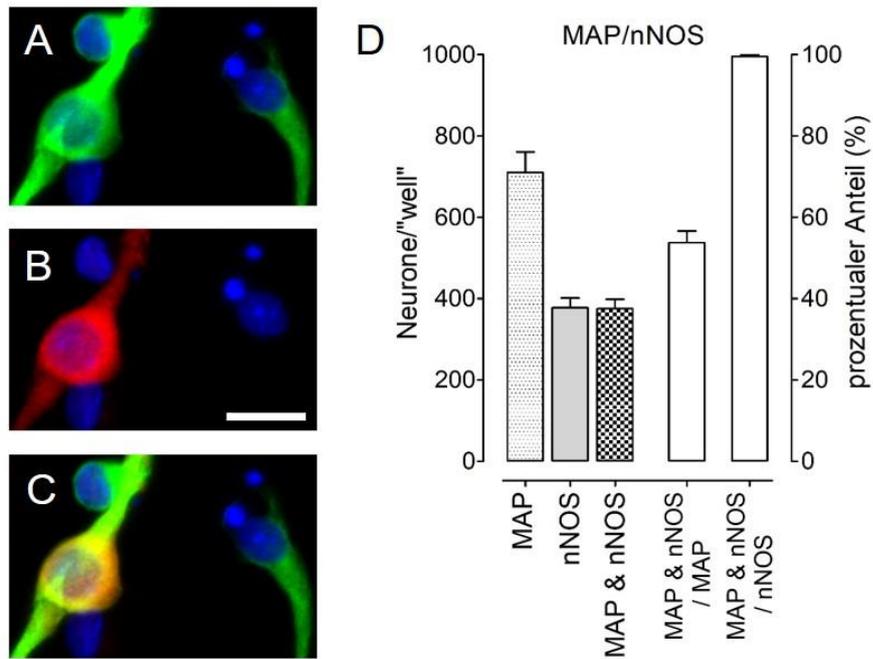
Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 100  $\mu$ m.

### 3.1.2 Immunzytochemischer Nachweis wichtiger Neurotransmittersysteme in der Primärzellkultur des *Organum subfornicale*

In vergleichenden, immunzytochemischen Untersuchungen an den Primärzellkulturen des früh postnatalen Ratten SFOs wurden sowohl Häufigkeiten als auch mögliche Kolo-kalisationen einiger für das SFO typischer Neurotransmittersysteme [557, 624, 695, 719–721] durch den Expressionsnachweis für neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS), Glutamat (GLUT) und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) analysiert. Hierzu wurden aus je einem „well“ von sieben Präparationen im Rahmen immunzytochemischer Doppelmarkierungen zum einen die Anzahl MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiver Neurone, zum anderen die Anzahl der GLUT, GABA oder nNOS (führt zur Freisetzung des Gasotransmitters NO) synthetisierenden Neurone bestimmt. Anschließend erfolgte eine mikroskopisch exakte Analyse und quantitative sowie prozentuale Ermittlung der doppelmarkierten Neurone (*Abb. ERG 5-10*).

Die Anzahl Neuronenmarker- bzw. Neurotransmitter-positiver Zellen erfolgte für jeden Versuchsansatz als arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  S.E.M.) von sieben analysierten „wells“ aus sieben Zellpräparationen (*Abb. ERG 5-10*). Zusätzlich wurden die jeweils prozentualen Anteile GLUT, GABA oder nNOS synthetisierender Neurone an der Gesamtzahl eindeutig immunzytochemisch identifizierter Neurone errechnet (*Abb. ERG 5-10*). Sowohl die Markierung des neuronalen Strukturproteins MAP<sub>2a+2b</sub> als auch die indirekte Immunfluoreszenz für den Nachweis der verschiedenen Transmittersysteme zeigte sich vor allem als zytosolisch uniform.

In der SFO-spezifischen Primärkultur erwiesen sich  $375 \pm 23$  ( $54 \pm 3$  %) der durchschnittlich  $710 \pm 51$  MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiven Neurone als nitrerg (nNOS-immunopositiv) (*Abb. ERG 5*). Bezogen auf die Anzahl nNOS-immunopositiver Zellen zeigten 99,5 % eine Kolo-kalisation mit MAP<sub>2a+2b</sub>, wodurch nNOS als hochspezifischer Marker für Neurone angesehen werden kann. Ein sehr geringer Anteil (0,5 %) MAP<sub>2a+2b</sub>-immunonegativer Zellen erwiesen sich dabei als nNOS-immunopositiv, was vermutlich darauf zurückzuführen war, dass marginal differenzierte Neurone nicht immer das Mikrotubuli-assoziierte Protein (2a+2b) exprimieren [722].



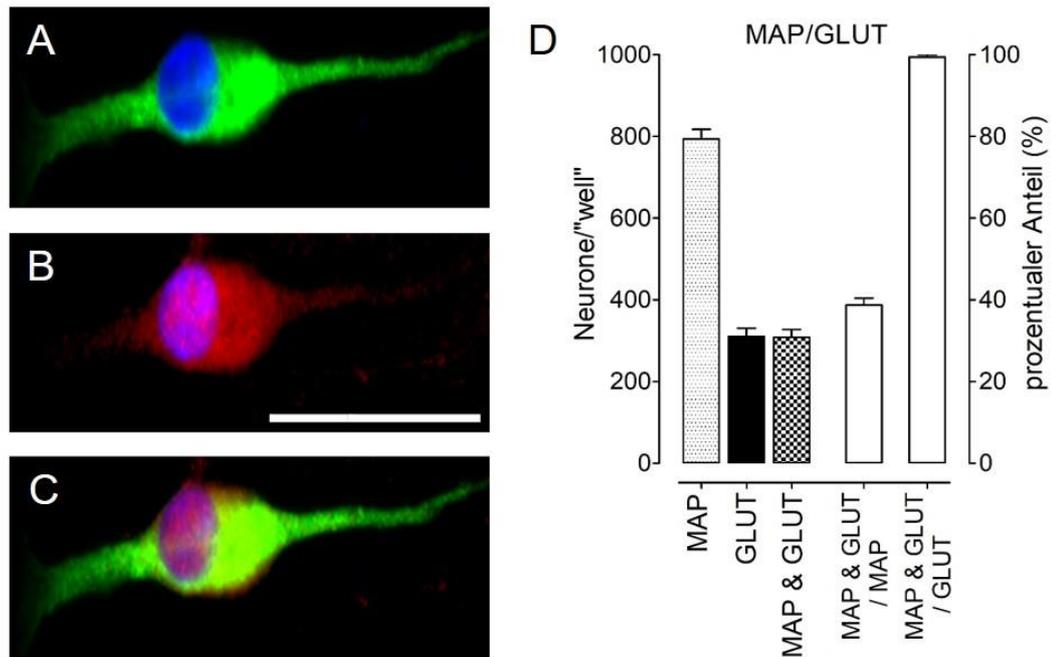
**Abb. ERG 5: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile nitrerger Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das Neuronen-spezifische Markerprotein MAP<sub>2a+2b</sub>. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub> Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für das NO generierende Enzym nNOS mittels eines polyklonalen rabbit anti-nNOS Antiserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™ –gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5 µm.

- (D) Absolute und prozentuale Anteile nitrerger Neurone (nNOS –immunopositiv) an der Gesamtzahl an Neuronen (MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiv) pro „well“ und *vice versa*.

Bei quantitativer Analyse immunzytochemisch markierter Neurone der SFO-spezifischen Primärkultur (je ein „well“ aus sieben Präparationen) belief sich der prozentuale Anteil glutamaterger Neurone ( $308 \pm 19$ ) an der Gesamtzahl aller immunzytochemisch als MAP<sub>2a+2b</sub> exprimierende Neurone charakterisierten Zellen ( $794 \pm 24$ ) im Mittel auf  $39 \pm 2$  % (Abb. ERG 6). Bezogen auf die Anzahl GLUT-immunopositiver Zellen zeigten 99,5 % eine Kolokalisation mit MAP<sub>2a+2b</sub>, wodurch auch GLUT als hochspezifischer Marker für Neurone angesehen werden kann.



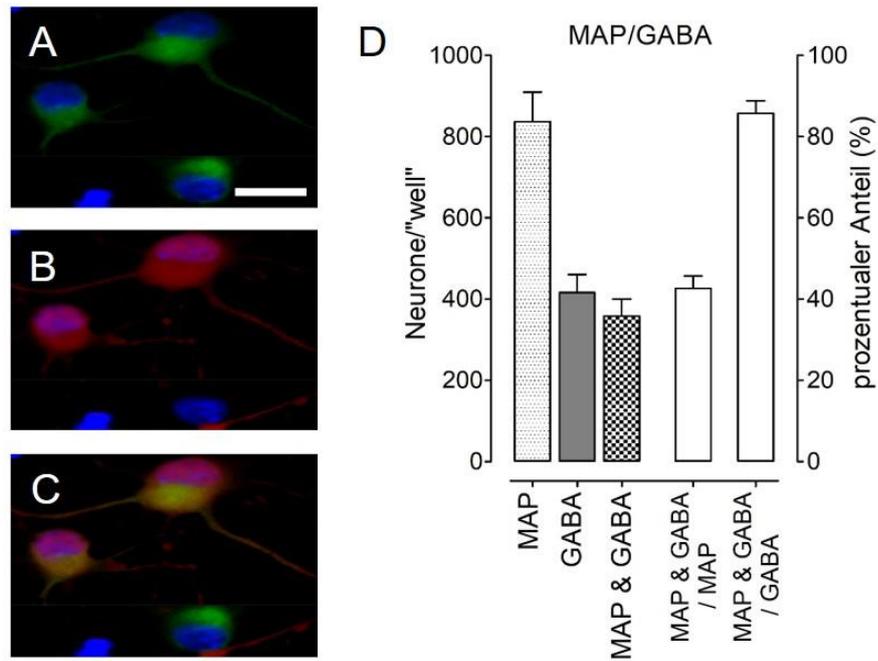
**Abb. ERG 6: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile glutamaterger Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das Neuronen-spezifische Markerprotein MAP<sub>2a+2b</sub>. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub> Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für den Neurotransmitter GLUT mittels eines polyclonalen rabbit anti-GLUT Primärserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5 µm.

- (D) Absolute und prozentuale Anteile glutamaterger Neurone (GLUT-immunopositiv) an der Gesamtzahl an Neuronen (MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiv) pro „well“ und *vice versa*.

In sieben „wells“ aus sieben Zellpräparationen zeigten  $359 \pm 41$  Zellen und damit  $43 \pm 3$  % aller immunzytochemisch eindeutig identifizierten Neurone ( $837 \pm 73$ ) eine Markierung für den Neurotransmitter GABA (Abb. ERG 7). Andererseits waren  $86 \pm 3$  % aller GABAergen Zellen eindeutig als MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositive Neurone zu identifizieren. Die Ursache hierfür könnte zum einen darin liegen, dass auch nicht-neuronale Zelltypen der SFO-spezifischen Primärzellkultur und anderer Primärzellkulturen des Hypothalamus GABAerg sein können [723] zum anderen, dass marginal differenzierte Neurone nicht das Mikrotubuli-assoziierte Protein (2a+2b) exprimierten.



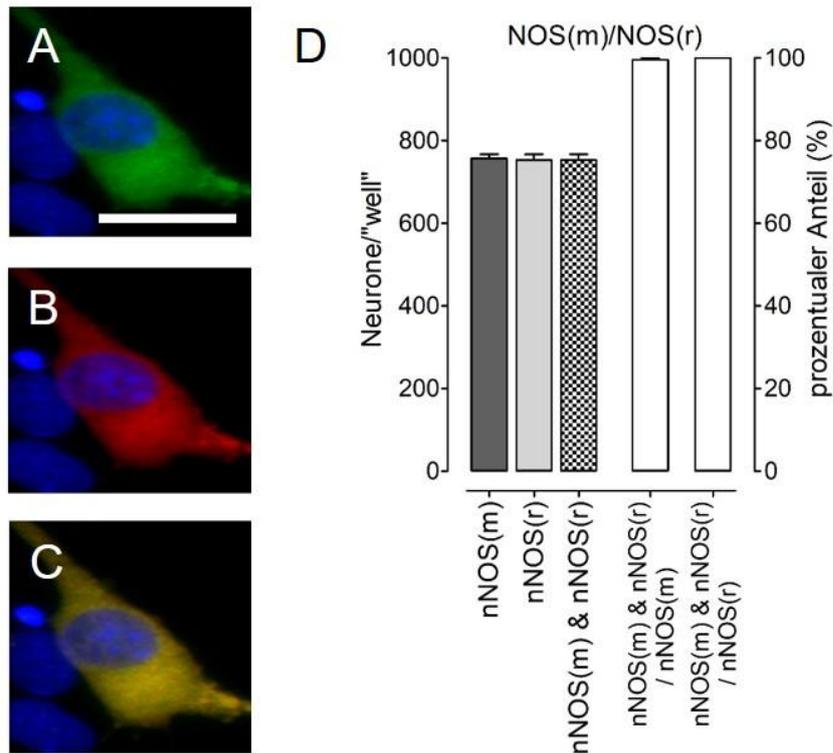
**Abb. ERG 7: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile GABAerger Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das Neuronen-spezifische Markerprotein MAP<sub>2a+2b</sub>. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub> Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für den Neurotransmitter GABA mittels eines polyklonalen rabbit anti-GABA Primärserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5 µm.

- (D) Absolute und prozentuale Anteile GABAerger Neurone (GABA-immunopositiv) an der Gesamtzahl an Neuronen (MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiv) pro „well“ und *vice versa*.

Im Rahmen der Erfassung von Kollokationen der Neurotransmitter GLUT und GABA sowie des NO generierenden Enzyms nNOS musste zunächst in einem Vorversuch gezeigt werden, dass das polyklonale Primärantiserum *rabbit* anti-nNOS einen homologen immunzytochemischen Nachweis nitrerger Neurone zu immunzytochemischen Markierungen mit einem monoklonalen Primärantikörper *mouse* anti-nNOS liefern kann. Dies war notwendig, da für die hier vorliegende Arbeit für die beiden klassischen Neurotransmitter (GLUT, GABA) lediglich die polyklonalen Primärantiseren *rabbit* anti-GLUT und *rabbit* anti-GABA vorhanden waren. Es zeigte sich, dass von  $757 \pm 10$  nitrerger Neuronen (*mouse* anti-nNOS)  $753 \pm 13$  (entsprechend 99,5 %) eine homologe immunzytochemische Markierung beim Einsatz des *rabbit* anti-nNOS Primärantikörpers aufwiesen (Abb. ERG 8).



**Abb. ERG 8: Vergleich zweier Primärantikörper bzw. -seren für den immunzytochemischen Nachweis nitreger Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur sowie deren absolute Zellzahlen und prozentualen Anteile**

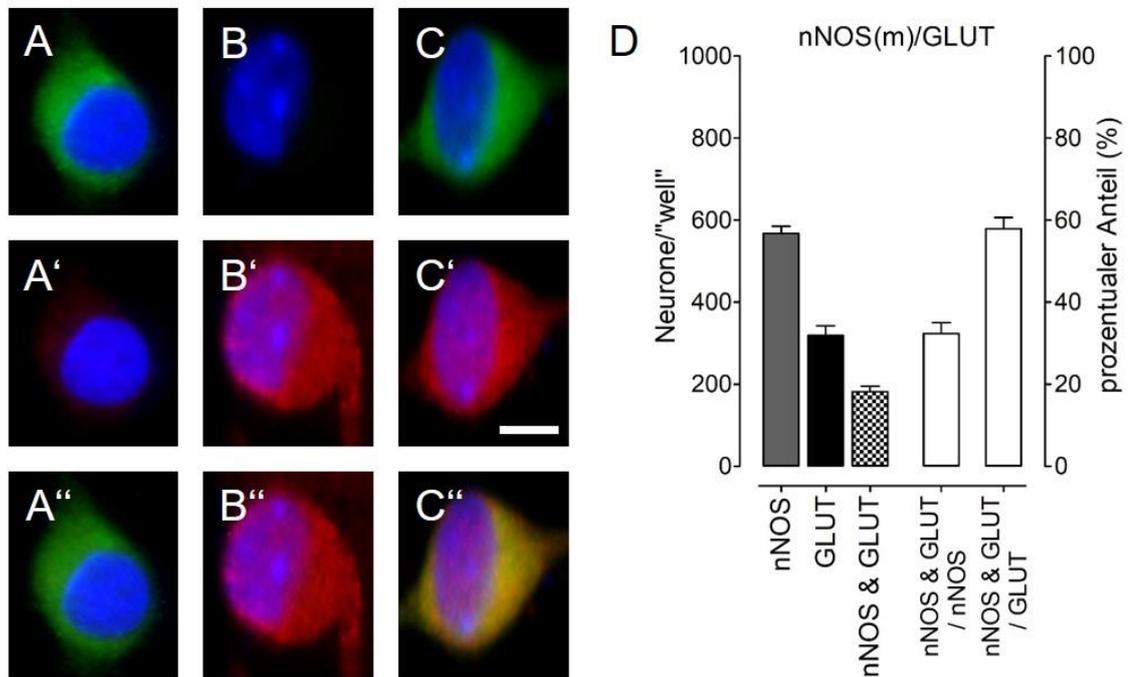
- (A) Immunzytochemische Markierung für das Neuronen-spezifische Markerenzym nNOS. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-nNOS Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für das Neuronen-spezifische Markerenzym nNOS mittels eines polyklonalen rabbit anti-nNOS Primärantiserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™–gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5 µm.

- (D) Absolute und prozentuale Anteile beim Vergleich zweier Primärantikörper / -seren gegen nNOS.

Die Anzahlen an nitregeren, glutamatergen und GABAergen Neuronen pro „well“ in der Primärzellkultur des SFOs erwiesen sich mit mittleren Zahlen von 375, 308 und 359 als vergleichbar, bei einer mittleren Gesamtanzahl von 710 bis 837 MAP<sub>2a+2b</sub>-immunpositiven Neuronen. In der SFO-spezifischen Zellkultur erwiesen sich von 568 ± 18 nitregeren Neuronen 182 ± 13 Neurone als ebenfalls glutamaterg, zeigten dementsprechend eine Kolo-kalisation beider Neurotransmitter. Der prozentuale Anteil glutamaterger an demjenigen nitreger MAP<sub>2a+2b</sub>-immunpositiver Neurone der SFO-spezifischen Primärkultur betrug 32 ± 3 %. Hingegen erwiesen sich 58 ± 3 %

der GLUT-immunopositiven SFO-spezifischen Neurone als ebenfalls nNOS-immunopositiv (Abb. ERG 9).



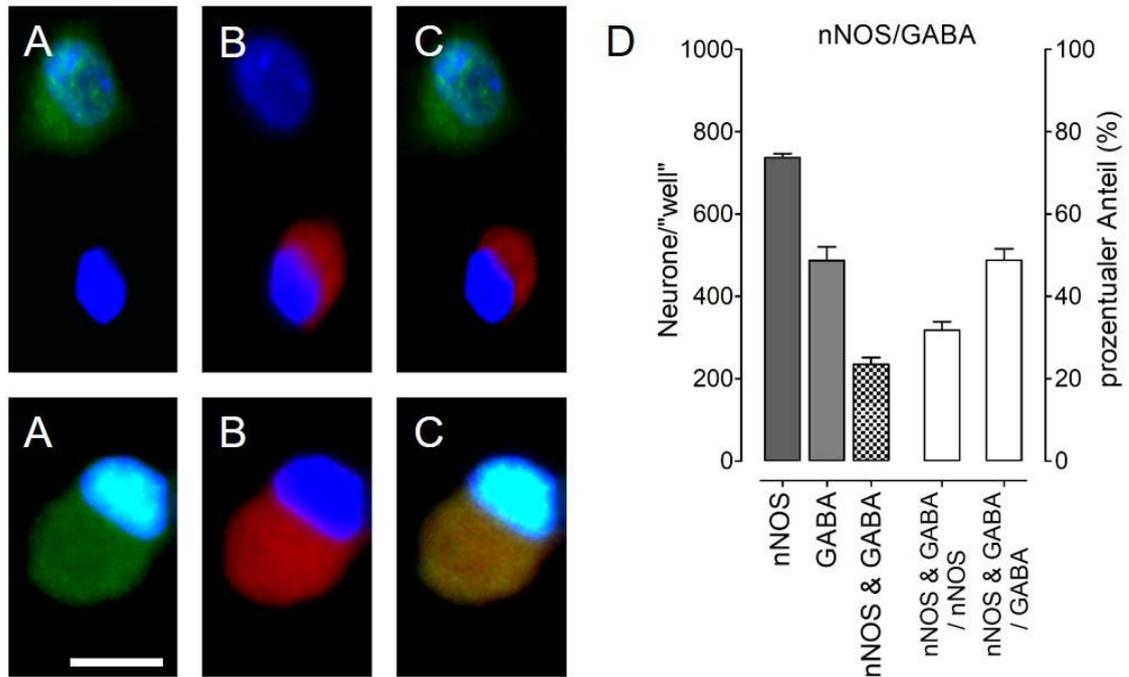
**Abb. ERG 9: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile glutamaterger und nitrenger Neurone inklusive deren neuronale Kollokalisation in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das NO generierende Enzym nNOS. Als Primäran-tikörper diente ein monoklonaler mouse anti-nNOS Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün). (A') Negativer immunzytochemischer Nachweis für GLUT. (A'') Digitale Superposition beider immunzy-tochemischer Nachweise.
- (B) Negative immunzytochemische Markierung für das NO generierende Enzym nNOS. (B') Indirekter Immunfluoreszenznachweis für den Neurotransmitter GLUT mittels eines polyklonalen rabbit anti-GLUT Primärantiserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™ –gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot). (B'') Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise.
- (C) Immunzytochemischer Nachweis von nNOS. (C') Indirekter Immunfluoreszenznachweis für GLUT im gleichen Neuron. (C'') Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 6,25 µm.

- (D) Absolute und prozentuale Anteile von nitrengen und glutamatergen Neuronen sowie deren Kollokalisation.

Der Anteil GABAerger MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiver Neurone (235 ± 17) der SFO-spezifischen Primärzellkultur am Anteil der nNOS-immunopositiven Neurone (737 ± 10) belief sich im Mittel auf 32 ± 2 %. Nitrenger MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositive SFO-spezifische Neurone machten hingegen 49 ± 3 % der GABA-immunopositiven Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur aus (Abb. ERG 10).



**Abb. ERG 10: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile GABAerger und nitrerger Neurone inklusive deren neuronale Kolokalisation in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das NO generierende Enzym nNOS. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-nNOS Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für den Neurotransmitter GABA mittels eines polyklonalen rabbit anti-GABA Primärantisera. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™ –gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 6,25 µm.

- (D) Absolute und prozentuale Anteile von nitrergen und GABAergen Neuronen sowie deren Kolokalisation.

### 3.2 Funktionelle Charakterisierung eines lokalen Renin-Angiotensin Systems im *Organum subfornicale* der Ratte

In der immunzytochemisch charakterisierten Primärkultur (Kap. ERG 3.1) des SFOs wurde eine funktionelle Charakterisierung des lokalen Renin-Angiotensin Systems (RAS) durchgeführt. Dafür wurden SFO-spezifische Primärzellkulturen nach viertägiger Inkubationszeit, welche der Differenzierung der Zellen diente, für *in vitro* Versuche herangezogen. Dabei wurden Analysen mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik (Kap. ERG 3.2.1), Immunzytochemie (Kap. ERG 3.2.2) sowie quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Kap. ERG 3.2.3) durchgeführt.

### **3.2.1 Einsatz der Fura-2 Ratio-Imaging Technik zur Charakterisierung wichtiger Komponenten des lokalen RAS im Subfornikalorgan der Ratte**

Die Fura-2 Ratio-Imaging Technik basiert auf der kontinuierlichen Erfassung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in Neuronen und Astrozyten und sollte im Sinne der Fragestellung (*Kap. EIN 1.5*) den Nachweis dafür erbringen, **(a)** ob lediglich ANG II oder auch seine direkten Präkursoren (Aogen, ANG (1-12) und ANG I) eine transiente Aktivierung dieser Zellen induzieren können und **(b)** welche in der Primärkultur des SFOs exprimierten Schlüsselenzyme an der eventuellen Konversion der Präkursoren zu biologisch aktivem ANG II beteiligt sind. Die Dauer eines einzelnen Versuchs betrug 50 bis 70 Minuten. Grund dafür war, dass spezifische Inhibitoren für Schlüsselenzyme des RAS eingesetzt wurden und dementsprechend die WRP nach Einsatz der Inhibitoren auf 15 Minuten angesetzt wurde. Je Zellkulturkammer („well“) wurden 15 – 30 Zellen bei minimalen Zell-zu-Zell Kontakten parallel analysiert. Für die endgültige Analyse der Daten wurden bestimmte Kriterien festgelegt.

- I. Zeitabhängig konstante Fluoreszenz Ratio-Werte des intrazellulären Fura-2 und damit eine stabile Basislinie.
- II. Transiente Erhöhung der ermittelten 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Fura-2 während Superfusionsstimulation (drei Minuten) mit einem Angiotensin Präkursor bzw. ANG II von  $\geq 0,05$  im Vergleich zur Basislinie.
- III. Responsivität auf eine finale Superfusionsstimulation mit ANG II.
- IV. Eindeutige postexperimentelle immunzytochemische Identifikation der analysierten Zellen.

In die Gruppe der nicht und partiell inhibierten Zellen wurden jene aufgenommen, die in Anwesenheit eines Inhibitors für ein RAS Schlüsselenzym eine Inhibition ihrer Calciumsignale von  $< 20\%$  und von  $20 - 80\%$  zeigten. Zellen deren intrazelluläre Calciumsignale  $> 80\%$  inhibiert wurden, wurden der Gruppe der vollständig inhibierten zugeordnet.

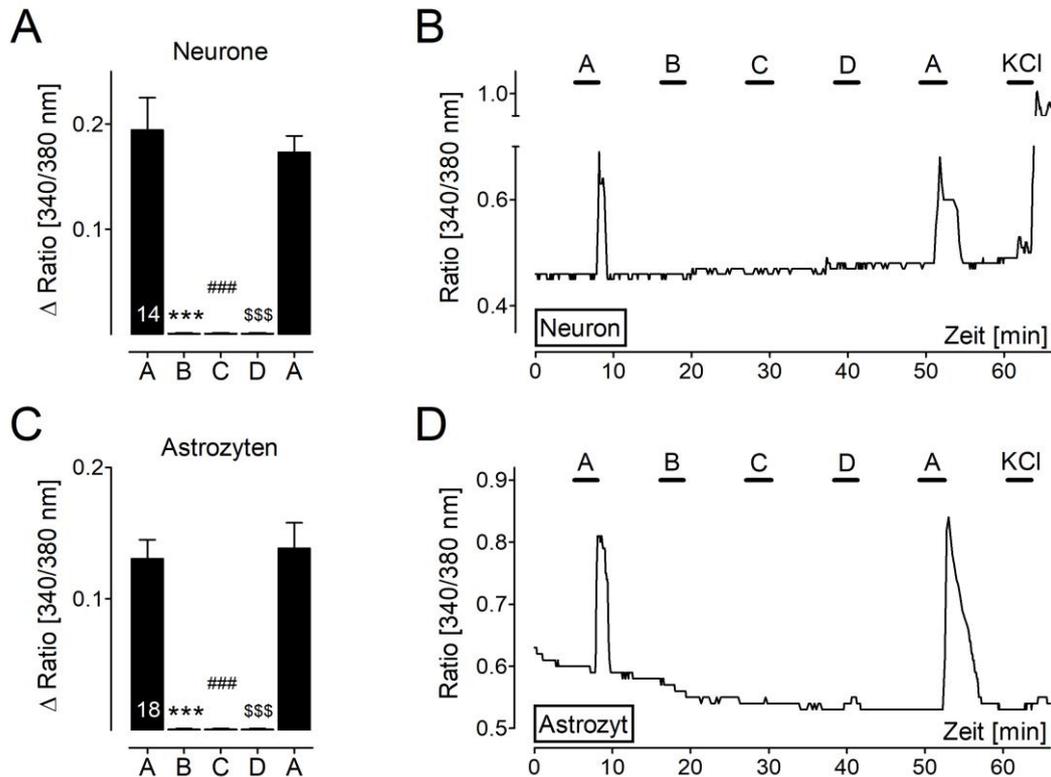
#### **3.2.1.1 Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Inhibitoren der verschiedenen RAS Schlüsselenzyme**

Mit Hilfe dieses Vorversuchs sollte ausgeschlossen werden, dass die spezifisch gegen einzelne Schlüsselenzyme des RAS gerichteten Inhibitoren Captopril (ACE In-

hibitor), Aliskiren (Renin Inhibitor) und Chymostatin (Chymasen und Cathepsin Inhibitor) in Superfusionsstimulationsversuchen *per se* zu Änderungen der basalen 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur führten. Dafür wurde das in *Kap. MM 2.4.6* dargestellte Messprotokoll eingesetzt, wobei die Zellen der SFO-spezifischen Zellkultur zur Detektion ANG II responsiver Neurone und Astrozyten zunächst mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) nachfolgend sequentiell mit den Inhibitoren Captopril, Aliskiren und Chymostatin (jeweils  $10^{-5}$  M / L) wiederum mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) sowie final mit kaliumreichem Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone superfusionsstimuliert wurden. Für diese Teilstudie wurden 57 Neurone und 116 Astrozyten aus acht „wells“ und drei Zellpräparationen analysiert. Dabei zeigten 14 und somit 25 % der Neurone transiente intrazelluläre Calciumsignale auf beide Superfusionsstimulationen mit ANG II bei vergleichbaren 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,19 \pm 0,03$  bzw.  $0,17 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 11 A*). Die Superfusionsstimulationen mit den Inhibitoren für die verschiedenen Enzyme des RAS hingegen führten zu keinen Änderungen der  $\Delta$ Ratio-Werte (*Abb. ERG 11 A*).

Die Astrozyten betreffend konnten von 116 untersuchten Astrozyten 18 (16 %) als ANG II responsiv charakterisiert werden. Diese Astrozyten zeigten auf die Superfusionsstimulationen mit ANG II eine Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,13 \pm 0,01$  bzw.  $0,14 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 11 C*). Auch bei den Astrozyten bewirkte eine Superfusionsstimulation mit den Inhibitoren keine Abweichungen der  $\Delta$ Ratio-Werte von der Basislinie (*Abb. ERG 11 C*). Somit zeigte keiner der Inhibitoren *per se* agonistische oder zytotoxische Wirkungen.

Weder bei Neuronen noch bei Astrozyten konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Signalamplituden für die erste und zweite Superfusionsstimulation mit ANG II beobachtet werden. Dementsprechend führte ANG II bei SFO-spezifischen Neuronen und Astrozyten zu keiner Desensibilisierung. Die statistische Auswertung zeigte, dass zwischen den Superfusionsstimulationen mit ANG II und den Inhibitoren hoch signifikante Unterschiede für die 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte bestanden. *Abb. ERG 11 B* und *D* zeigen exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte für je ein Neuron und einen Astrozyten.



**Abb. ERG 11: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensin II (ANG II) und Inhibitoren gegen RAS spezifische Enzyme**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit ANG II (A) ( $10^{-7}$  M / L) und den Enzyminhibitoren Captopril (B), Aliskiren (C) und Chymostatin (D) (je  $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnung der jeweils intrazellulären ANG II Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit ANG II (A) und den Inhibitoren Captopril (B), Aliskiren (C) und Chymostatin (D) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitaltest für Neurone.

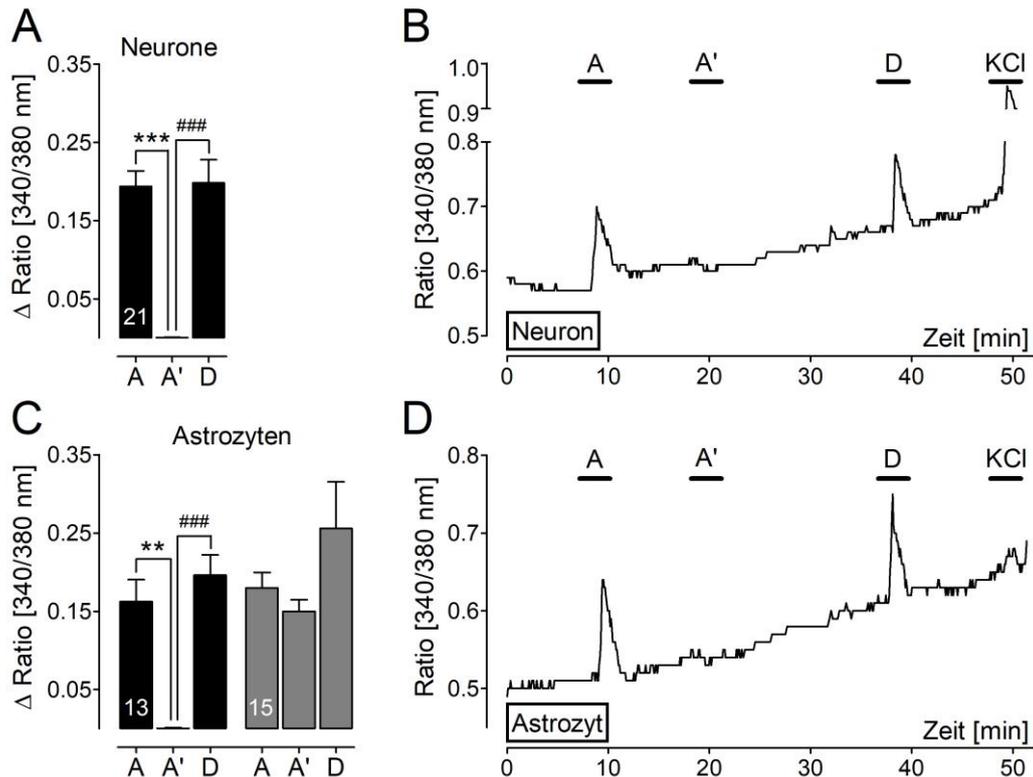
### 3.2.1.2 Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensinogen und dem Renin-spezifischen Inhibitor Aliskiren

Diese Fura-2 Ratio-Imaging Teilstudie diente zum einen dem Nachweis, dass Neurone und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur auf eine Superfusionsstimulation mit dem Angiotensin-Präkursor Aogen-TDP mit einer signifikanten Änderung ihrer  $[Ca^{2+}]_i$  reagieren, somit also aktiviert werden. Zum anderen dienten die Studien mit dem Einsatz von Aliskiren als spezifischem Inhibitor für Renin zum Nachweis des Enzyms Renin oder eines Renin-ähnlichem Enzyms, welches N-terminal das Dekapeptid ANG I von Aogen abspaltet. Die Applikation von Aogen-TDP (Aogen) in Ab- und Anwesenheit von Aliskiren erfolgte nach dem in *Kap. MM 2.4.6*

dargestellten Messprotokoll. Von 18 analysierten „wells“ aus zehn Präparationen gingen nach den zuvor beschriebenen Kriterien 155 Neurone und 222 Astrozyten in die Endauswertung ein. Von allen ausgewerteten Zellen erwiesen sich 21 Neurone (14 %) und 28 Astrozyten (13 %) mit mittleren 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werten von  $0,19 \pm 0,02$  respektive  $0,17 \pm 0,02$  (arithmetischer Mittelwert  $\pm$  S.E.M), als responsiv auf eine Superfusionsstimulation mit Aogen ( $10^{-6}$  M / L). Alle 21 Neurone und 28 Astrozyten zeigten ebenfalls eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  auf die finale Superfusionsstimulation mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) ( $0,20 \pm 0,03$  bzw.  $0,20 \pm 0,04$ ). Bei allen Aogen responsiven Neuronen konnte unter Einsatz des Renin-spezifischen Inhibitors Aliskiren das transiente Calciumsignal vollständig unterdrückt werden (*Abb. ERG 12 A*).

Von den 28 Aogen responsiven Astrozyten hingegen führte der Einsatz von Aliskiren lediglich bei 13 (46 %) zu einer vollständigen Inhibition des Anstiegs an  $[Ca^{2+}]_i$ , wohingegen 15 Astrozyten (54 %) lediglich eine partielle (20 – 80 %) bzw. keine (< 20 %) Inhibition zeigten (*Abb. ERG 12 C*). Die 13 vollständig inhibierten Astrozyten zeigten auf die Superfusionstimulation mit Aogen eine durchschnittliche Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,16 \pm 0,03$  und auf ANG II von  $0,19 \pm 0,03$ . Bei den 15 partiell oder nicht inhibierten Astrozyten hingegen konnte eine durchschnittliche Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte durch Superfusionsstimulation mit Aogen von  $0,18 \pm 0,02$ , mit Aogen in Anwesenheit von Aliskiren von  $0,15 \pm 0,01$  und durch die finale Stimulation mit ANG II von  $0,30 \pm 0,06$  ermittelt werden (*Abb. ERG 12 C*).

Im Rahmen der statistischen Auswertungen wurden folglich für die vollständig inhibierten Neurone und Astrozyten hoch signifikante Unterschiede für die  $\Delta$ Ratio-Werte zwischen der Superfusionsstimulation mit und ohne Aliskiren festgestellt. Weder für Neurone noch für Astrozyten konnten statistische Unterschiede der Signalamplituden für Aogen ( $10^{-6}$  M / L) und ANG II ( $10^{-7}$  M / L) ermittelt werden. Dies zeigt, dass SFO-spezifisches Renin lediglich einen Teil des Aogens in biologisch aktives ANG II konvertiert hat. In *Abb. ERG 12 B* und *D* sind exemplarisch Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines durch Aliskiren vollständig inhibierten Neurons und Astrozyten dargestellt.



**Abb. ERG 12: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensinogen TDP (Aogen) in An- und Abwesenheit des Renin-spezifischen Inhibitors Aliskiren**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit Aogen ( $10^{-6}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (A') des Renin-spezifischen Inhibitors Aliskiren ( $10^{-5}$  M / L) sowie ANG II ( $10^{-7}$  M / L) (D) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) und nicht vorhandener (< 20 %) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Inhibitors. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit Aogen in Ab- (A) und Anwesenheit (A') des Renin-spezifischen Inhibitors Aliskiren, mit ANG II (D) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

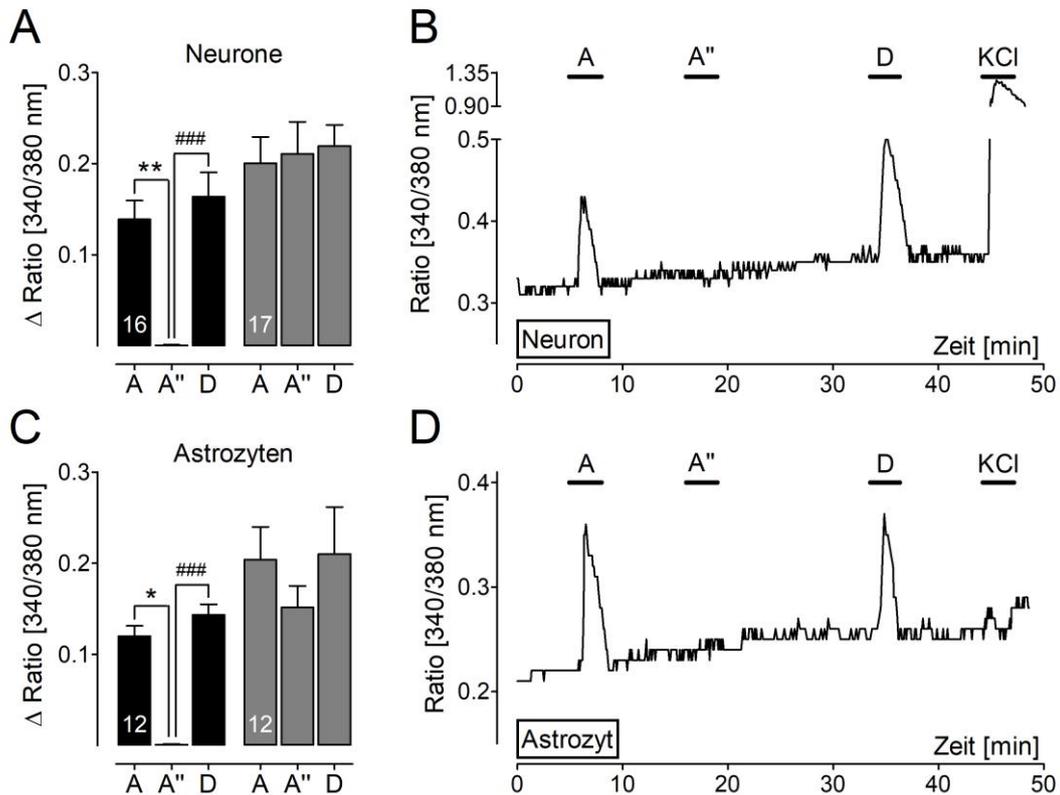
### 3.2.1.3 Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensinogen und dem Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitor Chymostatin

Für den experimentellen Nachweis einer funktionellen Expression von Chymasen und / oder Cathepsinen, welche die direkte Konversion des Präkursorproteins Aogen in reaktives ANG II katalysieren, wurden 201 Neurone und 253 Astrozyten in 14 „wells“ aus sechs Präparationen auf ihre Responsivität gegenüber Aogen und ANG II sowie auf das Vorhandensein von Chymasen und Cathepsinen untersucht. Dabei

erfolgte eine Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärkultur zunächst mit Aogen ( $10^{-6}$  M / L) allein, anschließend in Kombination mit dem Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitor Chymostatin ( $10^{-5}$  M / L) und abschließend mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) sowie kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) als Vitalitätstest für Neurone. Die Applikation erfolgte nach dem in *Kap. MM 2.4.6* dargestellten Messprotokoll. 33 der 201 untersuchten Neurone (16 %) und 24 der 253 untersuchten Astrozyten (9 %) zeigten eine Responsivität auf die Superfusionsstimulation mit Aogen mit einer mittleren Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,17 \pm 0,02$  respektive  $0,16 \pm 0,02$ . Das intrazelluläre Calciumsignal in 16 der Aogen responsiven Neurone (48 %) konnte unter Einsatz von Chymostatin vollständig inhibiert werden; diese Neurone zeigten auf die Superfusionsstimulation mit Aogen eine Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,14 \pm 0,02$  und auf ANG II von  $0,16 \pm 0,03$ . Siebzehn (52 %) der Aogen responsiven Neurone hingegen zeigten keine oder lediglich eine geringgradige partielle Inhibition in Anwesenheit von Chymostatin. Die Amplituden der 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte erwiesen sich mit mittleren Werten von  $0,20 \pm 0,03$  während Superfusionsstimulation mit Aogen, ebenfalls  $0,20 \pm 0,03$  beim Einsatz von Aogen und Chymostatin, sowie  $0,21 \pm 0,02$  nach Aktivierung durch ANG II als nahezu unverändert (*Abb. ERG 13 A*).

Die Astrozyten betreffend konnte unter Einsatz des Inhibitors Chymostatin bei 12 der 24 Aogen responsiven Astrozyten das Calciumsignal vollständig und ebenfalls bei 12 Astrozyten lediglich partiell oder nicht inhibiert werden (jeweils 50 %) (*Abb. ERG 13 C*). Die 12 vollständig inhibierten Astrozyten zeigten auf die Superfusionsstimulation mit Aogen eine Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,12 \pm 0,01$  und auf ANG II von  $0,14 \pm 0,01$ . Die partiell oder nicht inhibierten Astrozyten reagierten auf die Stimulation mit Aogen mit einer Erhöhung der 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,20 \pm 0,04$ , in Anwesenheit von Chymostatin von  $0,15 \pm 0,02$  und während der Superfusion mit ANG II von  $0,20 \pm 0,05$  (*Abb. ERG 13 C*).

Im Rahmen der statistischen Auswertungen wurden folglich für die vollständig inhibierten Neurone und Astrozyten (hoch) signifikante Unterschiede für die  $\Delta$ Ratio-Werte zwischen der Superfusionsstimulation mit Aogen in Ab- bzw. Anwesenheit von Chymostatin ermittelt. In *Abb. ERG 13 B* und *D* sind exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der  $\Delta$ Ratio-Werte jeweils eines durch Chymostatin vollständig inhibierten Neurons und Astrozyten dargestellt.



**Abb. ERG 13: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensinogen TDP (Aogen) in An- und Abwesenheit des Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitors Chymostatin**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation ( $37^\circ\text{C}$ ) mit Aogen ( $10^{-6}\text{ M/L}$ ) in Ab- (A) und Anwesenheit (A') des Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitors Chymostatin ( $10^{-5}\text{ M/L}$ ) sowie ANG II ( $10^{-7}\text{ M/L}$ ) (D) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / #  $P < 0,05$ ; \*\* / ##  $P < 0,01$ ; \*\*\* / ###  $P < 0,001$ ]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger ( $> 80\%$ ), graue Balkendiagramme mit partieller ( $20 - 80\%$ ) und nicht vorhandener ( $< 20\%$ ) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Inhibitors. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

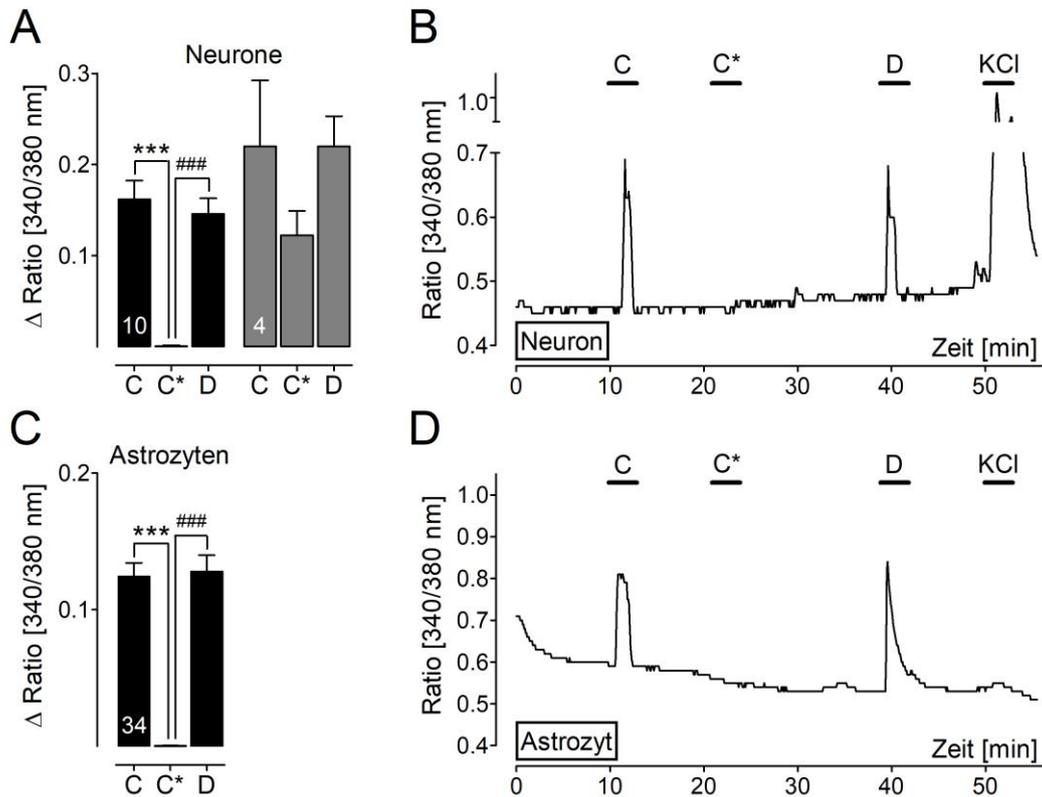
Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit Aogen in Ab- (A) und Anwesenheit (A') des Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitors Chymostatin, mit ANG II (D) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Zusammenfassend wurde in Versuchen der *Kap. ERG 3.2.1.2* und *3.2.1.3* nachgewiesen, dass Aogen in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur sowohl durch Renin als auch durch Chymasen bzw. Cathepsine in biologisch aktives ANG II konvertiert wird. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Signalamplituden für Aogen ( $10^{-6}\text{ M/L}$ ) und ANG II ( $10^{-7}\text{ M/L}$ ) ermittelt werden, was darauf hinweist, dass lediglich ein geringer Anteil des applizierten Aogens in ANG II konvertiert wurde.

#### 3.2.1.4 Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensin I und dem ACE-spezifischen Inhibitor Captopril

Im Rahmen des klassischen RAS stellt das Dekapeptid ANG I das primäre Produkt der enzymatischen Reninaktivität dar. In weiterführenden Untersuchungen sollte daher die potentiell funktionelle Expression von *angiotensin-converting enzyme* (ACE) in der Primärkultur des SFOs nachgewiesen werden, welches durch die Abspaltung zweier C-terminaler Aminosäuren die Umwandlung des Präkursorpeptids ANG I in ANG II katalysiert. Dafür wurden aus 32 „wells“ und 13 Präparationen der SFO-spezifischen Primärzellkultur 117 Neurone und 318 Astrozyten zur Analyse herangezogen und auf ihre Responsivität gegenüber ANG I und ANG II untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst eine Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Zellen mit ANG I ( $10^{-6}$  M / L) allein sowie in Kombination mit dem ACE-spezifischen Inhibitor Captopril ( $10^{-5}$  M / L), abschließend mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) und kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) als Vitalitätstest für Neurone. Die Applikation erfolgte nach dem in *Kap. MM 2.4.6* dargestellten Messprotokoll. Von allen untersuchten Neuronen zeigten 14 (12 %) und allen analysierten Astrozyten 34 (11 %) eine Responsivität auf die Superfusionsstimulation mit ANG I, bei einer mittleren Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,18 \pm 0,02$  respektive  $0,12 \pm 0,01$ . Unter Einsatz von Captopril konnte bei 10 Neuronen (71 %) das Calciumsignal vollständig unterdrückt werden, wohingegen bei vier Neuronen (29 %) trotz Einsatzes des ACE-spezifischen Inhibitors das Calciumsignal vollständig oder partiell erhalten blieb. Die vollständig inhibierten Neurone wiesen auf die Superfusionsstimulation mit ANG I eine Erhöhung der 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,16 \pm 0,02$  und auf ANG II von  $0,15 \pm 0,02$  auf. Die beim Einsatz von ANG I in Anwesenheit von Captopril nicht oder nur partiell inhibierten Neurone zeigten auf die Superfusionsstimulation mit ANG I eine Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,22 \pm 0,07$ , in Anwesenheit von Captopril von  $0,12 \pm 0,03$  und auf ANG II von  $0,22 \pm 0,03$  (*Abb. ERG 14 A*).

Bei den 34 ANG I responsiven Astrozyten wiesen alle (100 %) bei einer Superfusionsstimulation mit ANG I und Captopril eine vollständige Reduktion der intrazellulären Calciumsignale auf. Diese Astrozyten reagierten auf die Superfusionsstimulation mit ANG I mit einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,12 \pm 0,01$  und auf diejenige mit ANG II von  $0,13 \pm 0,01$  (*Abb. ERG 14 C*).



**Abb. ERG 14: Superfusionsstimulation der SFO-Primärzellkultur mit Angiotensin I (ANG I) in An- und Abwesenheit des *angiotensin-converting enzyme*- (ACE-) spezifischen Inhibitors Captopril**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit ANG I ( $10^{-6}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (A') des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril ( $10^{-5}$  M / L) sowie ANG II ( $10^{-7}$  M / L) (D) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) und nicht vorhandener (< 20 %) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Inhibitors. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit ANG I in Ab- (A) und Anwesenheit (A') des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril, mit ANG II (D) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Mittels statistischer Auswertung konnten folglich für vollständig durch den ACE-spezifischen Inhibitor gehemmte Neurone und Astrozyten hoch signifikante Unterschiede der Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte bei Superfusionsstimulation mit oder ohne Captopril festgestellt werden. *Abb. ERG 14 B* und *D* zeigen exemplarisch Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der  $\Delta$ Ratio Werte jeweils eines durch Captopril vollständig inhibierten Neurons und Astrozyten während Superfusionsstimulation mit ANG I.

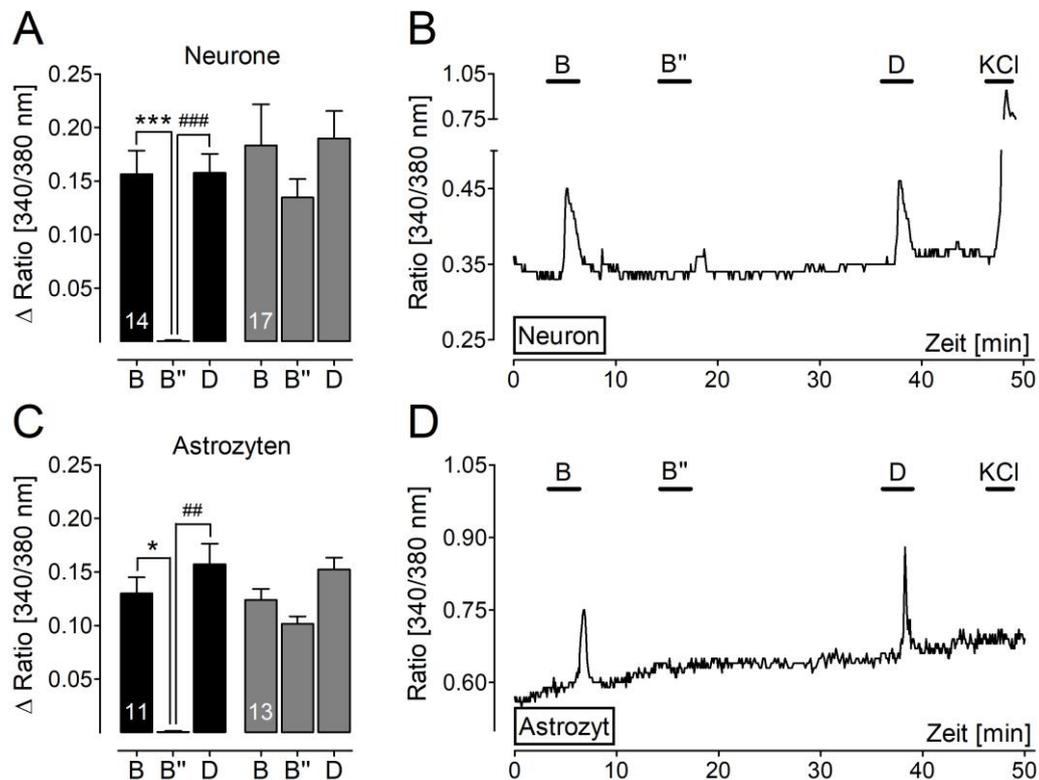
In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass ANG I in Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur durch ACE in biologisch aktives ANG II konvertiert wurde. Außerdem konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Signalamplituden für ANG I ( $10^{-6}$  M / L) und ANG II ( $10^{-7}$  M / L) ermittelt werden, was darauf hinweist, dass lediglich ein geringer Anteil des ANG I in aktives ANG II konvertiert wurde.

### **3.2.1.5 Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensin (1-12) und dem Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitor Chymostatin**

Angiotensin (1-12) repräsentiert ein erst 2006 entdecktes Präkursorpeptid des RAS für die finale Bildung von ANG II. In dieser Teilstudie diente die Fura-2 Ratio-Imaging Technik daher zum einen dem Nachweis, dass sowohl Neurone als auch Astrozyten der SFO-spezifischen Primärkultur auf eine Superfusionsstimulation mit dem Angiotensin Präkursorpeptid ANG (1-12) mit einer signifikant erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$  reagieren können. Zum anderen sollte mit dem Einsatz des Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitors Chymostatin eine potentielle Beteiligung beider Enzymfamilien an der Umwandlung von ANG (1-12) in ANG II nachgewiesen werden. Die Applikation von ANG (1-12) erfolgte nach dem unter *Kap. MM 2.4.6* dargestellten Messprotokoll in einer finalen Konzentration von  $10^{-6}$  M / L und Chymostatin wurde in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M / L eingesetzt. Eine nachfolgende Superfusionsstimulation mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) sowie final mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) als Vitalitätstest für Neurone wurden ebenfalls durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden 14 „wells“ aus sieben Präparationen der SFO-spezifischen Primärzellkultur analysiert, wobei sich von allen Zellen 133 als Neurone und 288 als Astrozyten mittels Immunzytochemie darstellen ließen. Von den 133 untersuchten Neuronen zeigten 31 (23 %) eine Responsivität auf die Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) bei einer durchschnittlichen Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,17 \pm 0,02$ . Beim parallelen Einsatz von ANG (1-12) und Chymostatin konnte bei 14 (45 %) der ANG (1-12) responsiven Neurone das intrazelluläre Calciumsignal vollständig unterdrückt werden (*Abb. ERG 15 A*). Diese Neurone reagierten auf die Superfusionsstimulation sowohl mit ANG (1-12) als auch ANG II mit einer Erhöhung ihrer 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,16 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 15 A*). Bei 17 (55 %) der ANG (1-12) responsiven Neurone hingegen konnte unter Einsatz von Chymosta-

tin das Calciumsignal nicht oder nur partiell inhibiert werden. Diese Neurone reagierten auf die Superfusionsstimulation von ANG (1-12) mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,18 \pm 0,04$ , in Anwesenheit von Chymostatin von  $0,13 \pm 0,02$  und auf ANG II von  $0,19 \pm 0,03$  (Abb. ERG 15 A).



**Abb. ERG 15: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensin (1-12) (ANG (1-12)) in An- und Abwesenheit des Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitors Chymostatin**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation ( $37^\circ\text{C}$ ) mit ANG (1-12) ( $10^{-6}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (A') des Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitors Chymostatin ( $10^{-5}$  M / L) sowie ANG II ( $10^{-7}$  M / L) (D) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) und nicht vorhandener (< 20 %) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Inhibitors. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) in Ab- (A) und Anwesenheit (A') des Chymasen- und Cathepsin-spezifischen Inhibitors Chymostatin, mit ANG II (D) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Die Astrozyten betreffend zeigten sich von allen analysierten Astrozyten 24 (8 %) mit einer durchschnittlichen Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,13 \pm 0,01$  als responsiv auf eine Superfusionsstimulation mit ANG (1-12). Bei 11 (46 %) dieser Astrozyten konnte mittels Einsatz von Chymostatin das Calciumsignal vollständig unterdrückt

werden. Diese Gruppe von Astrozyten reagierte auf die Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,13 \pm 0,02$  und auf diejenige mit ANG II von  $0,16 \pm 0,02$  (Abb. ERG 15 C). Bei 13 (54 %) der ANG (1-12) responsiven Astrozyten vermochte Chymostatin die Calciumsignale nicht oder nur partiell zu inhibieren. Diese Astrozyten wiesen eine durch ANG (1-12) allein ausgelöste Erhöhung ihrer 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,12 \pm 0,01$  auf, vergleichbar zu den bei Koapplikation mit Chymostatin ermittelten Werten von  $0,10 \pm 0,01$ . ANG II bewirkte eine Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,15 \pm 0,02$  (Abb. ERG 15 C).

Folglich konnten mit Hilfe der statistischen Auswertung für vollständig inhibierte Neurone und Astrozyten (hoch) signifikante Unterschiede hinsichtlich der Amplitude der induzierten Calciumsignale bei Superfusionsstimulation mit *versus* ohne Chymostatin-Applikation festgestellt werden. In Abb. ERG 15 B und D sind exemplarisch Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz-Ratio Werte jeweils eines durch Chymostatin vollständig inhibierten Neurons und Astrozyten während Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) dargestellt.

### **3.2.1.6 Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit ANG (1-12) und dem ACE-spezifischen Inhibitor Captopril**

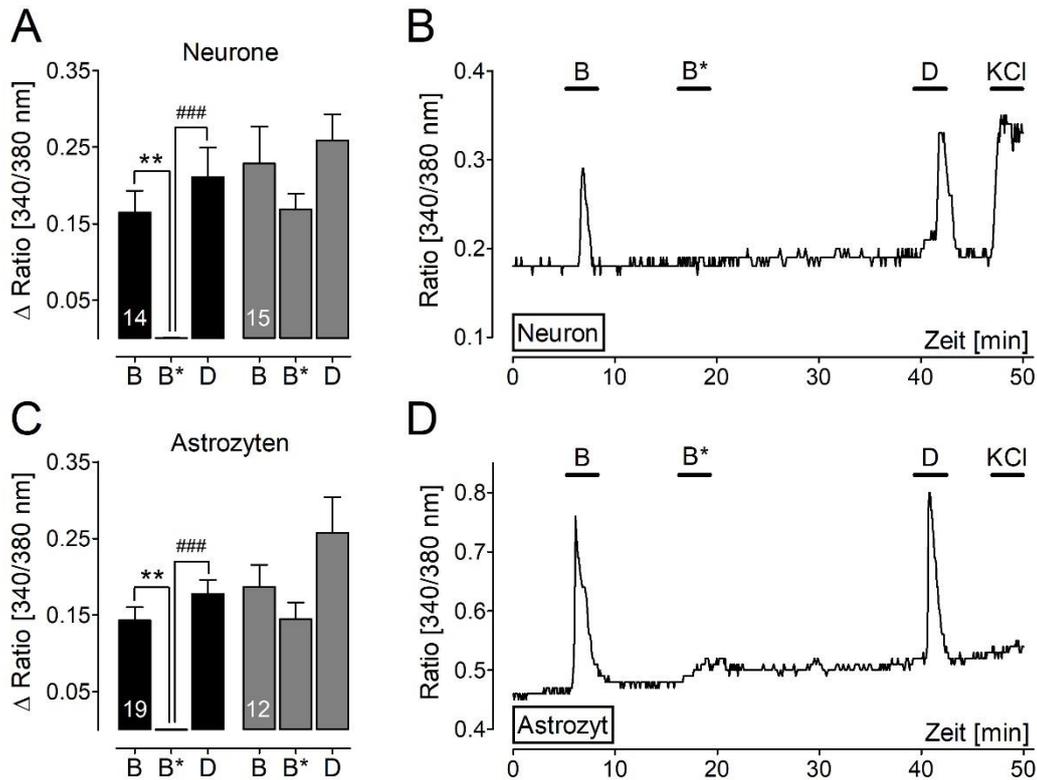
Die Literaturrecherche ergab für periphere Organe Hinweise, dass ANG (1-12) sowohl durch Chymasen / Cathepsine als auch ACE enzymatisch zu ANG II umgewandelt werden kann [447, 453, 460]. Im Rahmen dieser Teilstudie sollte deshalb die potentielle Beteiligung des in Zellen der Primärzellkultur exprimierten ACE an der Umwandlung von ANG (1-12) in biologisch aktives ANG II untersucht werden. Dafür wurden von 528 Zellen in 14 „wells“ aus sechs Präparationen der SFO-spezifischen Zellkultur 128 Neurone und 389 Astrozyten hinsichtlich ihrer Responsivität auf ANG (1-12) und ANG II sowie vor allem die funktionelle Expression von ACE getestet. Zu diesem Zweck wurden die „wells“ der SFO-Primärzellkultur im Superfusat zunächst mit ANG (1-12) in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M / L, anschließend mit ANG (1-12) in Anwesenheit des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril ( $10^{-5}$  M / L) und schließlich mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) sowie kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) als Vitalitätstest für Neurone stimuliert. Die Applikationen erfolgten nach dem in Kap. MM 2.4.6 dargestellten Messprotokoll.

Von den 128 analysierten Neuronen reagierten 29 (23 %) auf die Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,19 \pm 0,03$  und

31 (8 %) der 389 Astrozyten mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,16 \pm 0,02$ . Unter Einsatz von Captopril konnte bei 14 (48 %) der ANG (1-12) responsiven Neurone das Calciumsignal vollständig und bei 15 Neuronen (52 %) nicht oder partiell inhibiert werden (*Abb. ERG 16 A*). Die vollständig inhibierten Neurone reagierten dabei auf die Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,17 \pm 0,03$  und auf ANG II von  $0,21 \pm 0,04$  (*Abb. ERG 16 A*). Die nicht oder partiell inhibierten Neurone zeigten eine durch die Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) bedingte Erhöhung ihrer 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,23 \pm 0,05$ , in zusätzlicher Anwesenheit von Captopril um  $0,17 \pm 0,02$  und nach Applikation von ANG II von  $0,26 \pm 0,03$  (*Abb. ERG 16 A*).

Bei den Astrozyten konnte unter Einsatz von Captopril bei 19 (61 %) der ANG (1-12) responsiven Zellen das Calciumsignal vollständig unterdrückt werden. Diese Astrozyten zeigten eine Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,14 \pm 0,02$  bei Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) und von  $0,18 \pm 0,02$  auf ANG II (*Abb. ERG 16 C*). Die nicht oder partiell inhibierten Astrozyten (39 %) betreffend, reagierten diese auf die Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) allein mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,19 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 16 C*). Der parallele Einsatz des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril bewirkte eine nicht signifikante Reduktion dieser 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,15 \pm 0,02$ . Auf die finale Superfusion mit ANG II zeigten diese Astrozyten eine Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,26 \pm 0,05$  (*Abb. ERG 16 C*).

Mit Hilfe statistischer Auswertungen konnten folglich (hoch) signifikante Unterschiede hinsichtlich der Amplitude intrazellulärer Calciumsignale in der Gruppe vollständig inhibierter Neurone und Astrozyten bei Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit ANG (1-12) in Ab- versus Anwesenheit des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril ermittelt werden. *Abb. ERG 16 B* und *D* zeigen exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz-Ratio Werte jeweils eines vollständig durch Captopril inhibierten Neurons und Astrozyten während Superfusionsstimulation mit ANG (1-12).



**Abb. ERG 16: Superfusionsstimulation der SFO-Primärzellkultur mit ANG (1-12) in An- und Abwesenheit des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit ANG (1-12) ( $10^{-6}$  M / L) in Ab- (**A**) und Anwesenheit (**A'**) des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril ( $10^{-5}$  M / L) sowie ANG II ( $10^{-7}$  M / L) (**D**) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) und nicht vorhandener (< 20 %) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Inhibitors. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit ANG (1-12) in Ab- (**A**) und Anwesenheit (**A'**) des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril, mit ANG II (**D**) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass ANG (1-12) in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärkultur sowohl durch Chymasen / Cathepsine als auch durch ACE in biologisch aktives ANG II konvertiert wurde. Außerdem zeigten sich zwischen Superfusionsstimulationen mit ANG (1-12) und ANG II keine signifikanten Unterschiede der Signalamplituden, was darauf hindeutet, dass lediglich ein geringer Anteil des applizierten ANG (1-12) in ANG II umgewandelt wurde.

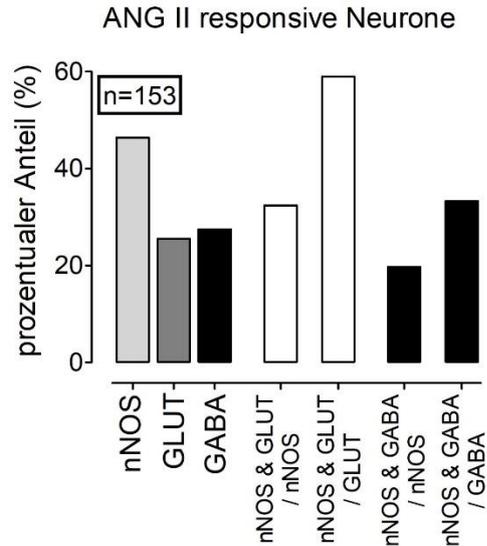
### 3.2.1.7 Neurotransmitter *coding* Angiotensin II responsiver Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur

Mit Fura-2 beladene SFO-spezifische Primärzellkulturen (44 „wells“ aus 9 Präparationen) wurden zunächst mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) und abschließend mit kaliumreichem Messpuffer superfusionsstimuliert. Anschließend wurde eine immunzytochemische Markierung der ANG II responsiven Zellen im Hinblick auf deren Expression wichtiger Neurotransmitter (GLUT, GABA) oder des NO generierenden Enzyms nNOS durchgeführt. Somit wurde jede der durch Superfusion mit ANG II aktivierten Zellen einem bis dreien der genannten Neurotransmittersysteme zugeordnet (*Abb. ERG 17*). Dabei wurden nur Zellen berücksichtigt, die durch folgende Faktoren eindeutig als Neurone identifizierbar waren:

- I. Mikroskopische Identifikation der Fura-2 beladenen Zelle im Durchlicht als Neuron an Hand von Erfahrungswerten.
- II. Responsivität der Zelle auf die finale Superfusion mit kaliumreichem Messpuffer mit einer Erhöhung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Werte für Fura-2  $\geq 0,2$  gegenüber der Basislinie.

Wie aus Daten der *Abb. ERG 5–7* (s. Seiten 128 – 130) ersichtlich, exprimierten in „wells“ der SFO-spezifischen Primärkultur 99 % der glutamatergen Zellen, etwa 99% der nitrergen Zellen und über 85 % der GABAergen Zellen den neuronalen Marker MAP<sub>2a+2b</sub> und sind somit als Neurone charakterisiert.

Von den 539 analysierten Neuronen zeigten 153 (28,4 %) ein transientes intrazelluläres Calciumsignal sowohl während Superfusion mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) als auch nachfolgender Depolarisation der Zellen im kaliumreichen Messpuffer. Von diesen ANG II responsiven Neuronen konnten durch postexperimentell durchgeführte, immunzytochemische Markierungen 71 (46,3 %) als nitrerg, 39 (25,2 %) als glutamaterg und 42 (27,5 %) als GABAerg charakterisiert werden (*Abb. ERG 17*). Zahlreiche Neurone zeichneten sich durch die Koexpression von zumindest zwei verschiedenen Neurotransmittersystemen aus. So konnten 32,4 % der nitrergen Neurone auch als glutamaterg und 59 % der glutamatergen als ebenfalls nitrerg identifiziert werden. Weiterhin zeigten sich 19,7 % der nitrergen Neurone auch als GABAerg und 33,3 % der GABAergen als ebenso nitrerg (*Abb. ERG 17*).



**Abb. ERG 17: Transmitter coding ANG II responsiver Neurone der SFO-spezifischen Primärkultur**

Links: Darstellung prozentualer Anteile nitrender (nNOS), glutamaterger (GLUT) und GABAerger (GABA) Neurone an der Zellpopulation der ANG II responsiven (intrazelluläre Calciumsignale) Neurone in der SFO-spezifischen Zellkultur. Rechts: Neuronale Kolokalisation der Transmitter GLUT bzw. GABA mit dem Stickstoffmonoxid generierenden Enzym nNOS (prozentuale Anteile, jeweils bezogen auf eines der beiden kolokalisierten Transmittersysteme). Bei den prozentualen Anteilen handelt es sich um Mittelwerte aller untersuchten „wells“ ohne S.E.M.

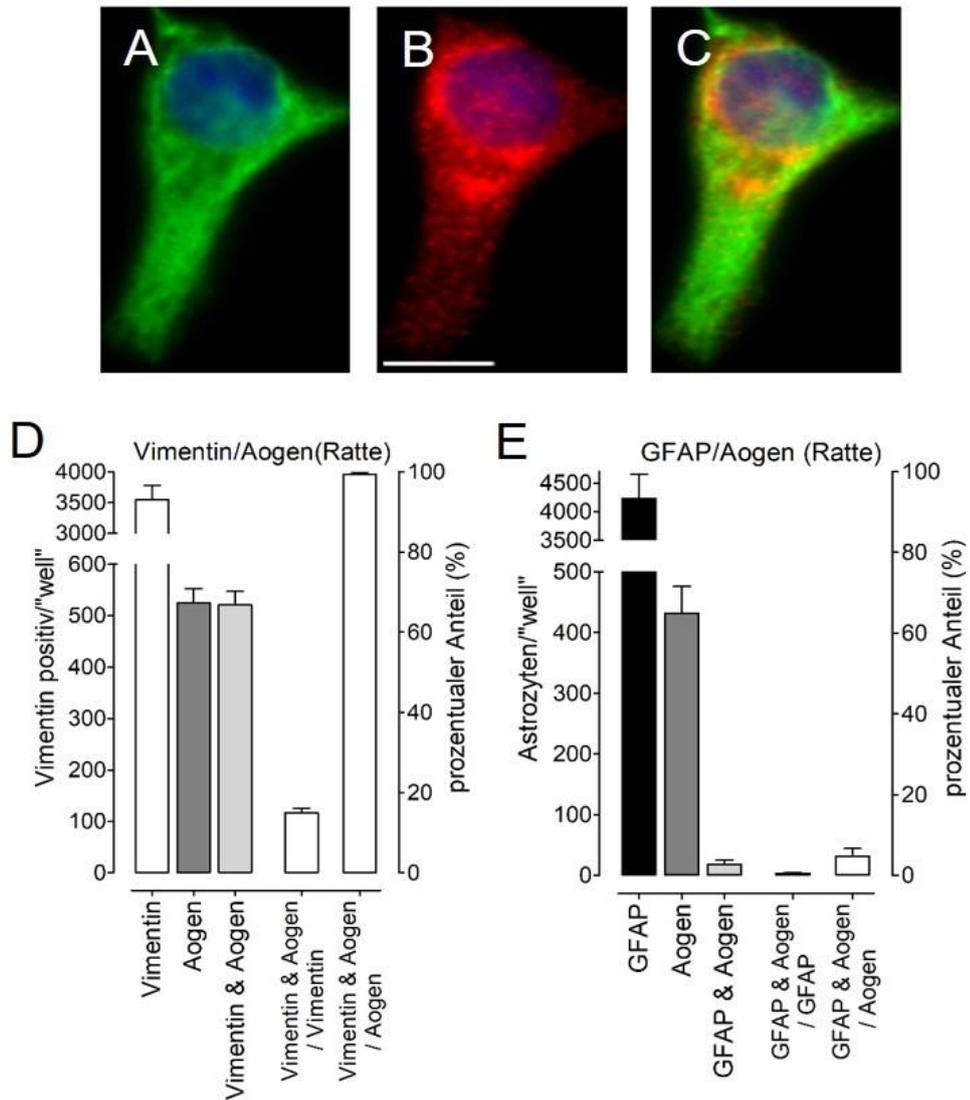
### 3.2.2 Immunzytochemischer Nachweis verschiedener Komponenten eines SFO-intrinsischen RAS

Mit Hilfe immunzytochemischer Doppelmarkierungen sollte in der SFO-spezifischen Primärzellkultur die Expression verschiedener Komponenten eines SFO-intrinsischen RAS nachgewiesen und der jeweils exprimierende Zelltyp identifiziert werden. Dazu wurden antigenspezifische Primärantikörper / -seren sowohl gegen einzelne Komponenten des RAS als auch zelltypspezifische Markerproteine eingesetzt, um die Zuordnung etwa einer bestimmten RAS Komponente zu einem bestimmten Zelltyp der neuro-glialen Primärzellkultur des früh postnatalen Ratten-SFOs zu ermöglichen. Zu den nachzuweisenden Komponenten des RAS gehörten dabei Aogen, ANG (1-12), ANG II, ACE sowie der Transkriptionsfaktor STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) nach nukleärer Translokation aufgrund vorheriger Stimulation der Zellen mit ANG II. In jeweils sieben „wells“ aus mindestens drei Präparationen wurde einerseits entweder die Anzahl pro „well“ an Vimentin-immunopositiven Tanyzyten / Ependymozyten, GFAP-immunopositiven Astrozyten oder MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiven Neuronen bestimmt (*Kap. MM 2.5*), sowie andererseits

die Anzahl der eine der Komponenten des RAS exprimierenden Zellen. Danach erfolgte eine mikroskopisch exakte Analyse und quantitative sowie prozentuale Ermittlung doppelmarkierter Zellen und somit eine Zuordnung bestimmter RAS-Komponenten zu bestimmten Zelltypen.

### **3.2.2.1 Immunzytochemischer Nachweis der zellulären Expression von Aogen in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

In Doppelmarkierungsstudien konnte für die SFO-spezifische Zellkultur in sieben „wells“ aus drei Präparationen ein eindeutiger Hinweis für die Expression des Präkursorproteins Aogen erbracht werden. Dabei wurde zum einen ein kommerzielles polyklonales Primärantiserum gegen rattenspezifisches Aogen und zum anderen ein in der AG Gerstberger hergestelltes polyklonales Primärantiserum gegen humanspezifisches Aogen eingesetzt. Im Falle des kommerziellen, rattenspezifischen Primärantiserums konnte durch präexperimentelle Absorption mit dem für diesen Antikörper passenden Antigen eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei der zellulären Markierung um ein spezifisches Signal handelte. Das polyklonale *rabbit anti-rat* Antiserum deckte zudem einen Großteil des gesamten Aogen Proteins ab, was eine Erhöhung der Spezifität dieses Antiserums bedingte. Da für das in der AG Gerstberger hergestellte Primärantiserum gegen humanspezifisches Aogen das zur Herstellung eingesetzte Antigen nicht zur Verfügung stand, wurde eine präexperimentelle Absorptionsstudie mit kommerziellem humanen Aogen durchgeführt. In beiden Versuchsansätzen zeigte sich, dass es sich bei den immunzytochemischen Markierungen mit beiden Primärantiseren um spezifische Signale handelte, da die zellulären Immunfluoreszenzsignale nach Inkubation mit antigengesättigtem Antiserum vollständig unterdrückt waren. Immunzytochemische Doppelmarkierungen mit Zellmarker spezifischen Antikörpern / -seren erwiesen sich als negativ für Neurone (MAP<sub>2a+2b</sub>), Oligodendrozyten (CNPase) und Mikrogliazellen (ED1). Von  $3549 \pm 228$  Vimentin-immunopositiven Zellen (Tanyzyten / Ependymozyten) pro „well“ exprimierten im arithmetischen Mittel  $521 \pm 26$  und somit  $15,0 \pm 1,1$  % rattenspezifisches Aogen (*Abb. ERG 18*). Mit  $99,0 \pm 0,4$  % repräsentierten Vimentin-immunopositive Tanyzyten dementsprechend den wichtigsten Aogen exprimierenden Zelltyp.



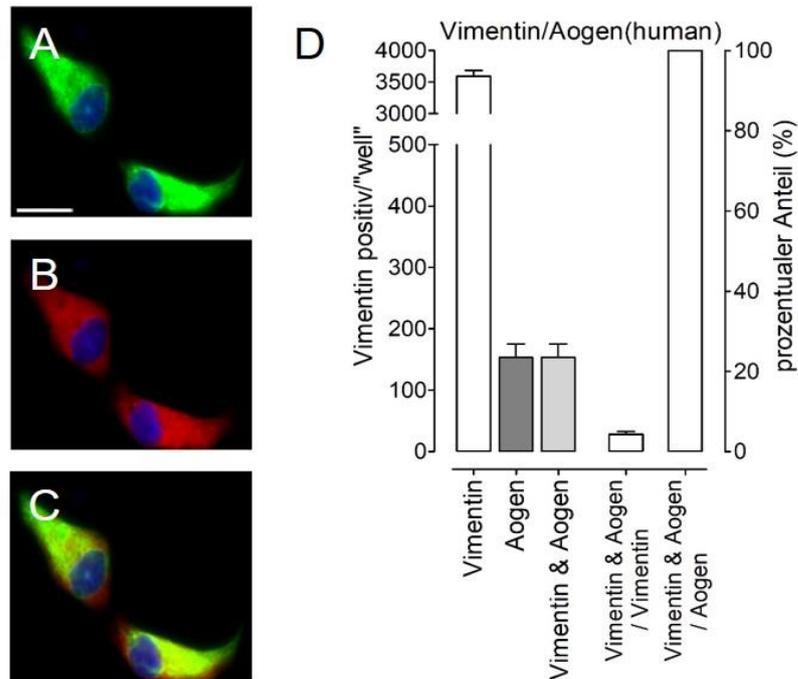
**Abb. ERG 18: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile rattenspezifisches Aogen exprimierender Tanyzyten und Astrozyten in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das Tanyzyten- / Ependymozyten-spezifische Markerprotein Vimentin. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-Vimentin Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für das Angiotensin Präkursormolekül Aogen mittels eines polyklonalen rabbit anti-rat Aogen Primäntiserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™–gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 6,25 µm.

- (D) Absolute und prozentuale Anteile von Aogen exprimierenden Vimentin–immunopositiven Zellen an der Gesamtzahl an Vimentin-immunopositiven Zellen pro „well“ und *vice versa*.
- (E) Absolute und prozentuale Anteile von Aogen exprimierenden Astrozyten (GFAP–immunopositive Zellen) an der Gesamtzahl an Astrozyten (GFAP-immunopositiver Zellen) pro „well“ und *vice versa*.

Neben Tanyzyten markierte das polyklonale Primärantiserum gegen rattenspezifisches Aogen in  $18 \pm 7$  ( $0,5 \pm 0,2$  %) GFAP-immunopositiven Astrozyten ein immunzytochemisches Signal. Somit konnten vor allem Vimentin-immunopositive Tanyzyten, aber auch GFAP-immunopositive Astrozyten als Aogen exprimierender Zelltyp in der SFO-spezifischen Primärzellkultur nachgewiesen werden.



**Abb. ERG 19: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile humanspezifisches Aogen exprimierender Tanyzyten / Ependymozyten in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das Tanyzyten- / Ependymozyten-spezifische Markerprotein Vimentin. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-Vimentin Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für das Angiotensin Präkursormolekül Aogen mittels eines in der AG Gerstberger hergestellten polyklonalen rabbit anti-human Aogen Primärantiseraums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™–gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht  $12,5 \mu\text{m}$ .

- (D) Absolute und prozentuale Anteile von Aogen exprimierenden Vimentin–immunopositiven Zellen an der Gesamtzahl an Vimentin-immunopositiven Zellen pro „well“ und *vice versa*.

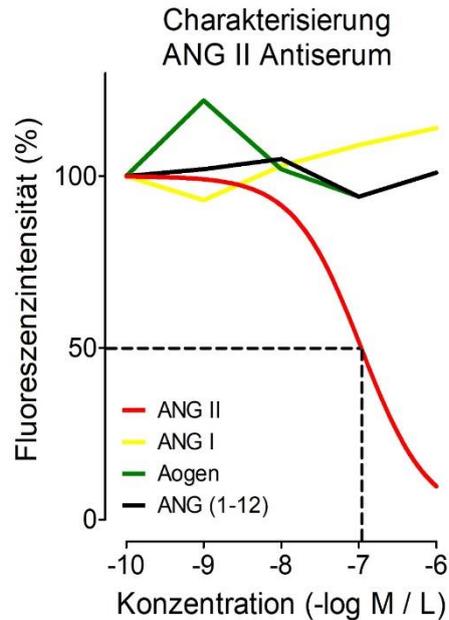
Das in der AG Gerstberger entwickelte polyklonale Primärantiserum gegen humanspezifisches Aogen zeigte im arithmetischen Mittel in  $153 \pm 22$  ( $4,0 \pm 0,7$  %) der

durchschnittlich  $3594 \pm 91$  Vimentin-immunopositiven Tanyzyten eine immunzytochemische Markierung für humanspezifisches Aogen. Tanyzyten waren in diesem Falle der einzige Zelltyp, in welchem humanspezifisches Aogen durch dieses Primärintiserum markiert wurde (*Abb. ERG 19*).

### **3.2.2.2 Immunzytochemischer Nachweis von zellulärem ANG II in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

Im Rahmen des immunzytochemischen Nachweises des Oktapeptids ANG II in Zelltypen der Primärzellkultur des früh postnatalen SFOs wurde einerseits die Anzahl MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiver Neurone, GFAP-immunopositiver Astrozyten oder Vimentin-immunopositiver Tanyzyten / Ependymozyten, sowie andererseits die Anzahl der ANG II immunopositiven Zellen in sieben „wells“ aus drei bzw. vier Präparationen ermittelt. Als Primärintikörper gegen ANG II wurde ein in der AG Gerstberger hergestelltes polyklonales Antiserum verwendet. Um die Spezifität dieses Antiserums zu eruieren, wurden präexperimentelle Antigen-Antikörper Bindungsstudien durchgeführt, wobei eine konstante Antiserumkonzentration mit verschiedenen Angiotensin Präkursoren (Aogen, ANG I, ANG (1-12)) und ANG II in aufsteigenden Konzentrationen ( $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M / L) *in vitro* in Kontakt gebracht wurden (*Kap. MM 2.5.5.1*).

Nach durchgeführter immunzytochemischer Markierung von Zellen der Primärkultur wurde die jeweilige Fluoreszenzintensität des an den sekundären Antikörper gekoppelten Fluorophors Cy3™ semiquantitativ ermittelt. Mit Hilfe dieser Antigen-Antikörper Bindungsstudien konnte der Nachweis erbracht werden, dass das in der AG Gerstberger hergestellte polyklonale Antiserum für ANG II einen IC<sub>50</sub>-Wert von  $1,07 \times 10^{-7}$  M / L für ANG II aufwies (*Abb. ERG 20*). Hingegen führten Absorptionsstudien mit Aogen, ANG (1-12) und ANG I selbst in hohen Konzentrationen ( $10^{-6}$  M / L) zu keiner Bindung am polyklonalen Antiserum (*Abb. ERG 20*). Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass das in der AG Gerstberger hergestellte polyklonale Antiserum gegen ANG II ein spezifisches immunzytochemisches Signal für das Oktapeptid ANG II in Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur lieferte.

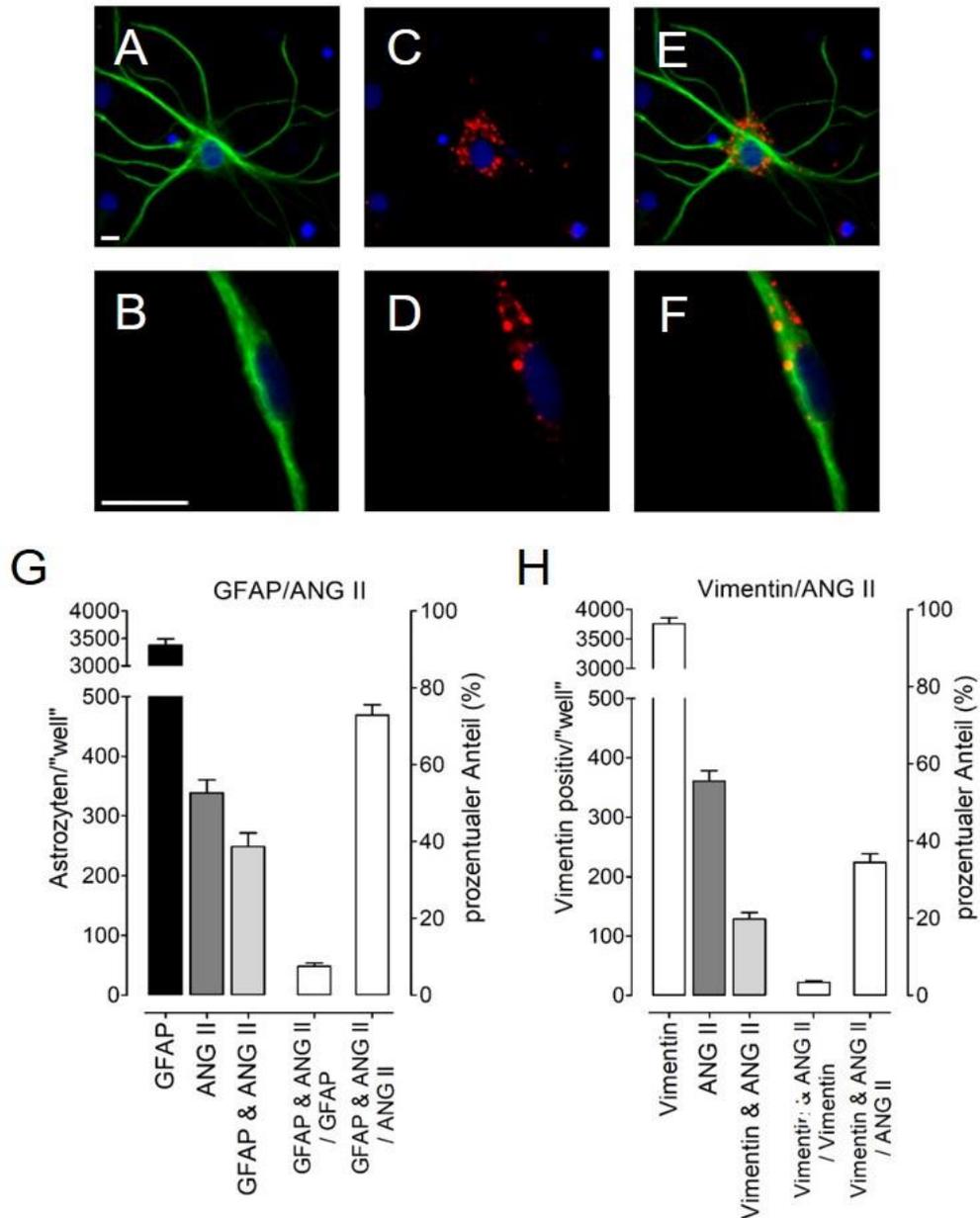


**Abb. ERG 20: Immunzytochemische Charakterisierung (Kreuzreaktivitäten) des polyklonalen Antiserums gegen ANG II**

Bestimmung der Kreuzreaktivitäten des für den immunzytochemischen Nachweis von ANG II in der SFO-spezifischen Primärkultur eingesetzten polyklonalen rabbit anti-ANG II Primärantiserums für Aogen TDP, ANG (1-12), ANG I und ANG II ( $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M / L) durch präexperimentelle Absättigung des Antiserums (Verdünnung 1 : 3000) für zwei Stunden. Semiquantitative Auswertung der immunzytochemischen Signale des sekundären Antikörpers (Cy3<sup>TM</sup> als Fluorophor) in der Primärkultur.

Pro „well“ der Primärkultur zeigten im arithmetischen Mittel von  $3375 \pm 117$  GFAP-immunopositiven Astrozyten  $249 \pm 23$  und damit  $7,5 \pm 0,8$  % eine Doppelmarkierung für ANG II als vorrangig zytoplasmatisches, vesikuläres immunzytochemisches Signal (Abb. ERG 21 G). Nahezu drei Viertel ( $73 \pm 2,7$  %) der ANG II immunopositiven Zellen erwiesen sich somit als Astrozyten.

Neben Astrozyten zeigte das polyklonale Antiserum gegen ANG II auch immunzytochemische Markierungen in Vimentin-immunopositiven Tanyzyten. ANG II war in Tanyzyten ebenfalls in vesikulärer Form zytoplasmatisch nachweisbar, wobei von den  $361 \pm 17$  angiotensinergen Zellen  $34,0 \pm 2,2$  % das Tanyzyten spezifische Markerprotein Vimentin exprimierten (Abb. ERG 21 H). Astrozyten (73 %) und Tanyzyten (34 %) konnten somit als die ANG II exprimierenden Zelltypen in der SFO-spezifischen Primärzellkultur identifiziert werden. Die Überschneidung beider Zelltypen kann mit der Koexpression von GFAP und Vimentin durch einige Astrozyten erklärt werden.



**Abb. ERG 21: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile ANG II exprimierender Astrozyten und Tanyzyten in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A+B)** Immunzytochemische Markierung für GFAP- (A, Astrozyten) und Vimentin-immunopositive Zellen (B, Tanyzyten). Als Primärantikörper dienten monoklonale mouse anti-GFAP und anti-Vimentin Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 – gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (C+D)** Indirekter Immunfluoreszenznachweis für ANG II mittels eines polyklonalen rabbit anti-ANG II Primärantiserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (E+F)** Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5 µm.

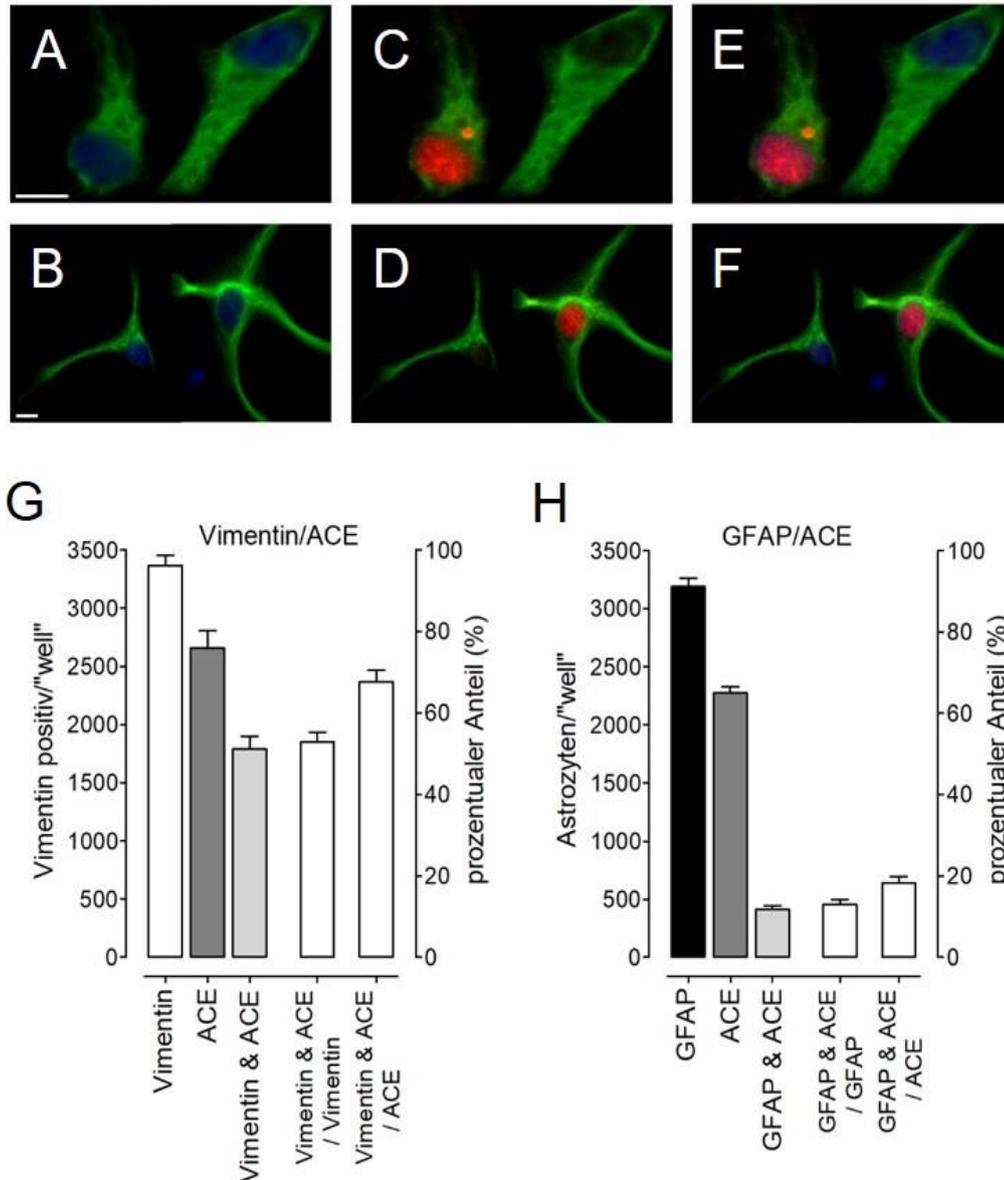
- (G+H)** Absolute und prozentuale Anteile von ANG II exprimierenden GFAP- und Vimentin-immunopositiven Zellen an der Gesamtzahl GFAP- und Vimentin-immunopositiver Zellen pro „well“ und vice versa.

### 3.2.2.3 Immunzytochemischer Nachweis der zellulären Expression von *angiotensin-converting enzyme* in der SFO-spezifischen Primärzellkultur

Nach dem immunzytochemischen Nachweis von Aogen und ANG II als Präkursor und finalem Neuropeptid des RAS (*Kap. ERG 3.2.2.1* und *ERG 3.2.2.2*) vorrangig in Astrozyten und Tanyzyten der SFO-Primärzellkultur konnte auf Ebene der Schlüsselenzyme lediglich die Expression des ACE in Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur detektiert werden. Die Testung einer Vielzahl an Antikörpern / -seren zum Nachweis anderer RAS Schlüsselenzyme (Renin, Chymasen, Cathepsine) der Firmen *Alomone* und *Santa Cruz* lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Zum Nachweis der ACE Expression wurde einerseits die jeweilige Anzahl an GFAP- (Astrozyten), Vimentin- (Tanyzyten / Ependymozyten) und MAP<sub>2a+2b</sub> (Neurone) -immunopositiven Zellen sowie andererseits die Anzahl der ACE-immunopositiven Zellen in je sieben „wells“ aus drei Präparationen ermittelt.

Als Primärantikörper gegen ACE wurde dabei ein polyklonales *rabbit* anti-ACE Antiserum verwendet, dessen Antigenspezifität in präexperimentellen Absorptionsstudien mit dem kommerziell erhältlichen Antigen nachgewiesen werden konnte. Dabei ist zu beachten, dass dieses Antigen zwar nur etwa ein Zehntel des gesamten Proteins ACE abdeckte, es sich bei diesem Anteil jedoch um etwa 100 Aminosäuren handelte. Die Größe des abgedeckten Anteils des ACE Proteins erhöhte somit die Spezifität des Antiserums.

Es zeigte sich, dass von den  $3365 \pm 87$  Vimentin-immunopositiven Tanyzyten / Ependymozyten pro „well“  $1790 \pm 111$  und somit  $53,0 \pm 2,4$  % das Enzym ACE exprimierten. Vimentin-immunopositive Tanyzyten machten somit mit  $68 \pm 3,1$  % den größten Anteil der Zellen aus, welche eine immunzytochemische Markierung für ACE aufwiesen (*Abb. ERG 22*). Immunzytochemische Markierungen für ACE konnten jedoch auch in anderen Zelltypen der SFO-spezifischen Primärzellkultur nachgewiesen werden. Auch in GFAP-immunopositive Astrozyten konnte ein immunzytochemisches Signal für ACE detektiert werden. In  $412 \pm 35$  ( $13,4 \pm 1,3$  %) der  $3190 \pm 74$  analysierten Astrozyten konnte die Expression von ACE auf Proteinebene nachgewiesen werden. Somit konnten  $18 \pm 1,6$  % der ACE-immunopositiven Zellen eindeutig als Astrozyten identifiziert werden (*Abb. ERG 22*). In weiteren Untersuchungen konnte die Beteiligung von Neuronen (MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiv) an der Expression von ACE gezeigt werden. Dabei exprimierten von  $731 \pm 19$  analysierten Neuronen  $316 \pm 9$  und somit  $43,1 \pm 2,1$  % das Enzym ACE (*Abb. ERG 23*).



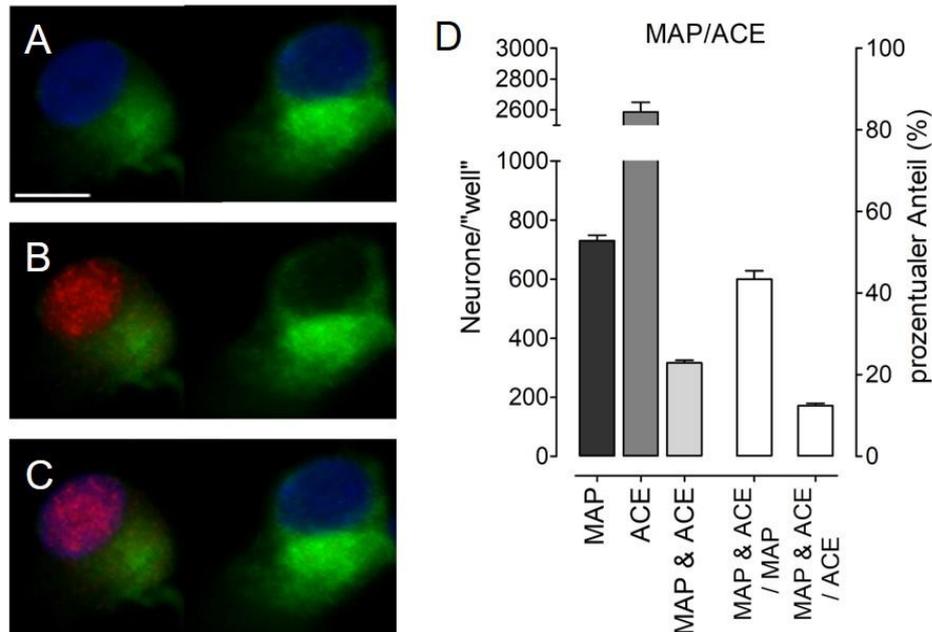
**Abb. ERG 22: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile ACE exprimierender Tanyzyten und Astrozyten in der SFO-Primärzellkultur**

- (A+B)** Immunzytochemische Markierung für Vimentin- (A, Tanyzyten / Ependymozyten), und GFAP (B, Astrozyten) -immunopositive Zellen. Als Primäntikörper dienten monoklonale mouse-anti Vimentin und anti-GFAP Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (C+D)** Indirekter Immunfluoreszenznachweis für ACE mittels eines polyklonalen rabbit anti-ACE Primäntiserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (E+F)** Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 6,25 µm.

- (G+H)** Absolute und prozentuale Anteile von ACE exprimierenden Vimentin- und GFAP-immunopositiven Zellen an der Gesamtzahl Vimentin- und GFAP-immunopositiver Zellen pro „well“ und vice versa.

Sowohl Aogen als Präkursor als auch ANG II als finales Neuropeptid des RAS konnten lediglich in Tanyzyten und Astrozyten nachgewiesen werden (Kap. ERG 3.2.2.1 und 3.2.2.2), wohingegen etwa die Hälfte der SFO-spezifischen Neurone das ANG II generierende Enzym ACE exprimierten.



**Abb. ERG 23: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile ACE exprimierender Neurone in der SFO-Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das Neuronen-spezifische Markerprotein MAP<sub>2a+2b</sub>. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub> Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für ACE mittels eines polyklonalen rabbit anti-ACE Primäriserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™ –gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5 µm.

- (D) Absolute und prozentuale Anteile von ACE exprimierenden MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiven Neuronen an der Gesamtzahl an MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiven Zellen pro „well“ und *vice versa*.

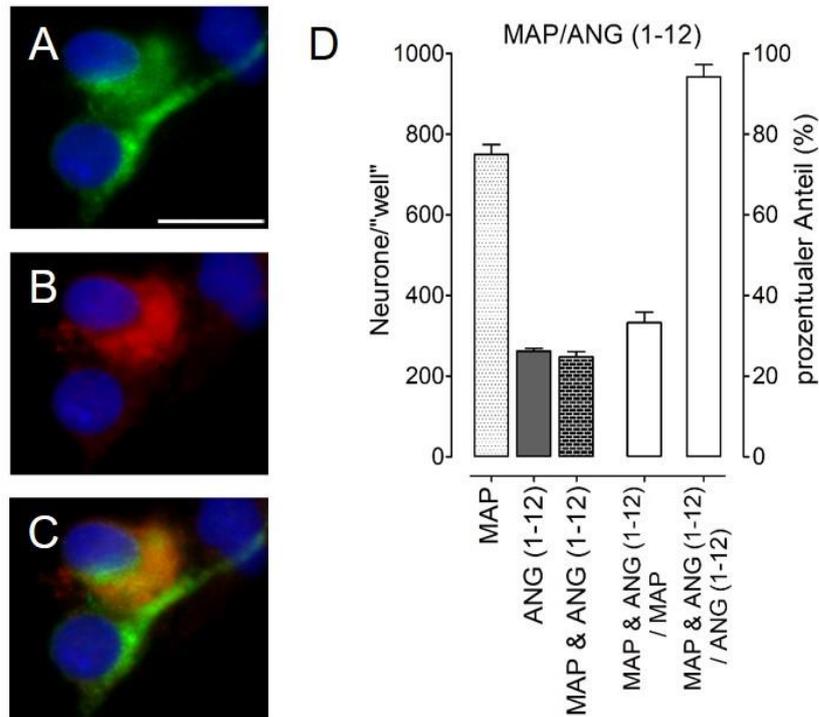
In allen ACE exprimierenden Zelltypen (Tanyzyten, Astrozyten, Neuronen) markierte das in dieser Arbeit verwendete polyklonale Antiserum ein nukleäres Signal für die Expression von ACE auf Proteinebene. Da es sich bei ACE um ein Enzym und keinen Transkriptionsfaktor handelt, war dieses Ergebnis als ungewöhnlich einzustufen

und kritisch zu hinterfragen. Die immunzytochemische Markierung für ACE im *Nucleus* konnte jedoch mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antiserum gegen einen bestimmten Aminosäureabschnitt des ACE erklärt werden (*Kap. DIS 4.1.1*).

#### **3.2.2.4 Immunzytochemischer Nachweis von ANG (1-12) in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

Mittels immunzytochemischer Doppelmarkierungsstudien in der SFO-Primärkultur (sechs „wells“) aus drei Präparationen konnte der Nachweis für das Präkursorpeptid ANG (1-12) ausschließlich in Neuronen (MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiv) erbracht werden. Dafür wurden die SFO-Primärzellkulturen mit PFA und Pikrinsäure (Zamboni) fixiert. Es wurde ein polyklonales Primärantiserum gegen rattenspezifisches ANG (1-12) verwendet, für welches in präexperimentellen Absorptionsstudien mit ANG (1-12) die Antigenspezifität nachgewiesen werden konnte. Von  $750 \pm 24$  MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiven Neuronen pro „well“ der SFO-spezifischen Primärkultur exprimierten  $248 \pm 14$  und somit  $33,2 \pm 2,6$  % rattenspezifisches ANG (1-12) (*Abb. ERG 24*). Mit  $94,0 \pm 3,1$  % erwiesen sich Neurone als vorrangiger Zelltyp der Primärzellkultur, welcher ANG (1-12) exprimierte.

Zusammenfassend konnte mittels immunzytochemischer Doppelmarkierungsstudien in der SFO-spezifischen Primärzellkultur gezeigt werden, dass das Präkursorprotein Aogen ausschließlich in Vimentin-immunopositiven Tanyzyten exprimiert wurde. ANG II als finales Neuropeptid des RAS hingegen konnte in Tanyzyten und Astrozyten nachgewiesen werden. Das ANG II generierende Schlüsselenzym ACE konnte durch den Einsatz von Immunzytochemie sowohl in glialen Tanyzyten und Astrozyten als auch in SFO-spezifischen Neuronen nachgewiesen werden. Immunzytochemische Markierungen für das 2006 entdeckte Präkursorpeptid ANG (1-12) konnten ausschließlich in Neuronen der SFO-spezifischen Primärzellkultur detektiert werden.



**Abb. ERG 24: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile ANG (1-12) exprimierender Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das Neuronen-spezifische Markerprotein MAP<sub>2a+2b</sub>. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub> Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für ANG (1-12) mittels eines polyklonalen rabbit anti-Angiotensin (1-12) Primäntiserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™–gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

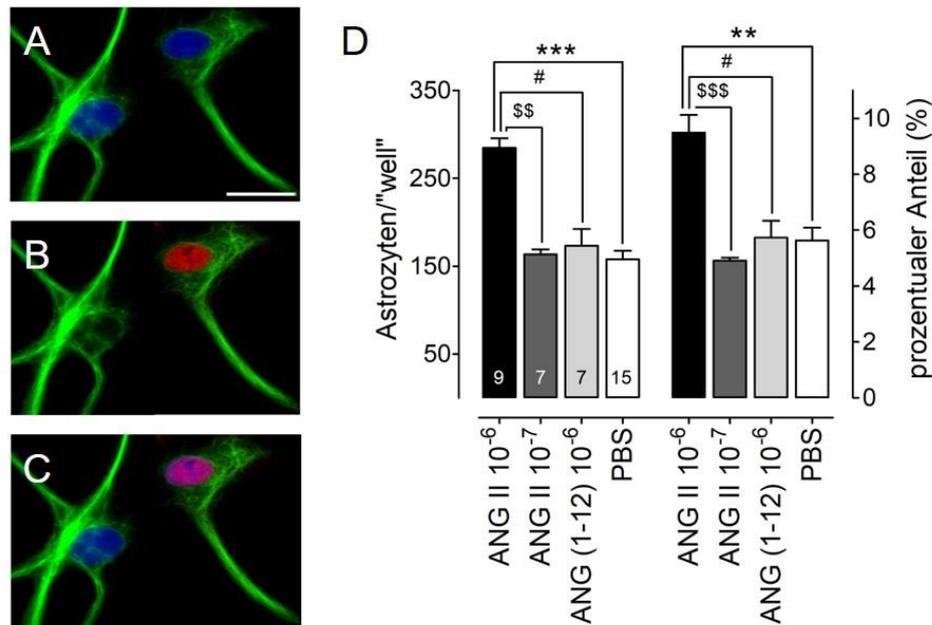
Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5 µm.

- (D) Absolute und prozentuale Anteile von ANG (1-12) exprimierenden MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiven Zellen an der Gesamtzahl MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiver Zellen pro „well und vice versa.

### 3.2.2.5 Immunzytochemischer Nachweis der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 nach ANG II Stimulation

Ziel dieser Teilstudie war es zu eruieren, ob eine Stimulation von Zellen der neuroglialen SFO-spezifischen Primärzellkultur mit ANG II zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) in den Zellkern dieser Zellen führt, wie es für andere Gehirngebiete gezeigt werden konnte [724]. Hierfür wurden die Zellen der SFO-Primärzellkultur im Inkubator bei 37 °C mit ANG II in den Konzentrationen 10<sup>-6</sup> und 10<sup>-7</sup> M / L sowie mit ANG (1-12) (10<sup>-6</sup>

M / L) und als Kontrolle mit PBS für zwei Stunden stimuliert und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach dem immunzytochemischen Procedere wurde einerseits die jeweilige Anzahl an MAP<sub>2a+2b</sub>- oder GFAP-immunopositiven Zellen sowie andererseits die Anzahl der Zellen, welche eine deutliche nukleäre Translokation von STAT3 aufwiesen analysiert und quantitativ erfasst. Für ANG II ( $10^{-6}$  M / L) wurden dabei neun „wells“ aus vier Präparationen, für ANG II ( $10^{-7}$  M / L) und ANG (1-12) ( $10^{-6}$  M / L) jeweils sieben „wells“ aus drei Präparationen und für PBS 15 „wells“ aus sieben Präparationen untersucht.



**Abb. ERG 25: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile an nukleär transloziertem STAT3 in Astrozyten in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das Astrozyten-spezifische Markerprotein GFAP. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-GFAP Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis für nukleär transloziertes STAT3 mittels eines polyclonalen rabbit anti-STAT3 Primäntiserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™ –gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (C) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5  $\mu$ m.

- (D) Absolute Zellzahlen (links) und prozentuale Anteile (rechts) von Astrozyten mit nukleärer Translokation von STAT3 an der Gesamtzahl an Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur nach Stimulation mit ANG II ( $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  M / L), ANG (1-12) ( $10^{-6}$  M / L) und PBS ( $10^{-6}$  M / L) als Kontrolle.

Eine nukleäre Translokation von STAT3 konnte ausschließlich in Astrozyten festgestellt werden. Nach Stimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit ANG II

( $10^{-6}$  M / L) konnte bei  $285 \pm 11$  von  $3065 \pm 103$  Astrozyten und somit bei  $9,5 \pm 0,6$  % eine nukleäre Translokation von STAT3 manifestiert werden (Abb. ERG 25). Die Stimulation der SFO-Primärzellkultur mit ANG II ( $10^{-7}$  M / L) führte bei  $152 \pm 4$  von  $2981 \pm 22$  und somit  $4,9 \pm 0,1$  % der analysierten Astrozyten zu einer nukleären Translokation von STAT3 (Abb. ERG 25 D). Stimulation der SFO-Primärzellkultur mit ANG (1-12) in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M / L bewirkte bei  $173 \pm 19$  von  $3016 \pm 23$  ( $5,7 \pm 0,6$  %) untersuchten Astrozyten eine nukleäre Translokation von STAT3 (Abb. ERG 25 D). Die Kontrollstimulation mit PBS führte bei  $165 \pm 12$  von  $2943 \pm 42$  ( $5,6 \pm 0,5$  %) der analysierten Astrozyten zu einer STAT3 Translokation (Abb. ERG 25 D). Dementsprechend führte lediglich eine Stimulation der SFO-spezifischen Astrozyten mit ANG II der Konzentration  $10^{-6}$  M / L zu einer nukleären STAT3 Translokation, wohingegen ANG II ( $10^{-7}$  M / L), ANG (1-12) ( $10^{-6}$  M / L) und PBS unwirksam blieben.

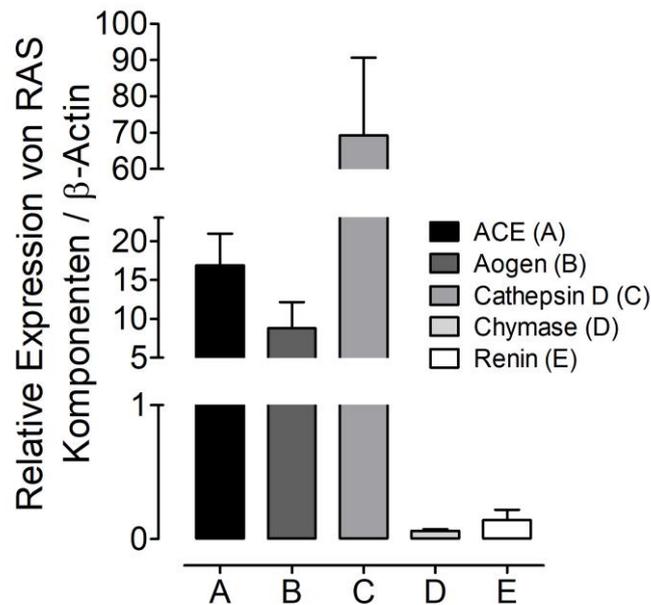
### 3.2.3 Quantitative *real-time* PCR für Komponenten des SFO-intrinsischen RAS

Mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR (qRT-PCR) sollte die relative mRNA Expression einzelner Komponenten des SFO-intrinsischen RAS in der Primärzellkultur erfasst werden. Für den semiquantitativen Vergleich der basalen Expressionsraten verschiedener RAS-Komponenten wurde das jeweils am geringsten exprimierte Zielgen als Kalibrator verwendet.

Im Fall der vorliegenden Studie zeigte eine der Proben aus der SFO-Primärkultur für die quantitative Bestimmung der Renin-spezifischen mRNA die niedrigste mRNA Expressionsrate und wurde als Kalibrator für die Expressionsanalysen herangezogen. Alle anderen Gene wurden hinsichtlich ihrer mRNA Expression auf diesen Kalibrator bezogen. Als interne Kontrolle wurde die Expression des *house keeping* Gens für  $\beta$ -Actin verwendet, welches sich in vorausgegangenen Kontrolluntersuchungen als am besten geeignete endogene Kontrolle zeigte (Kap. MM 2.6.4.1). Die graphische Darstellung der relativen Expressionsstärken einzelner Komponenten des SFO-intrinsischen RAS in Relation zu der erwähnten Reninprobe wird in Abb. ERG 26 gezeigt. ACE erwies sich auf mRNA-Ebene im arithmetischen Mittel ( $n = 4$ ) als  $16,9 \pm 4,1$  fach stärker exprimiert als der Kalibrator. Aogen zeigte auf mRNA-Ebene eine  $8,8 \pm 3,4$  fach höherer Expression als der Kalibrator und Cathepsin D eine  $69,2 \pm 21,5$  fach

stärkere Expression. Die Expression der mRNA von Chymasen war im arithmetischen Mittel ( $n = 4$ )  $0,06 \pm 0,01$  fach erhöht und die von Renin selbst  $0,14 \pm 0,08$  fach erhöht im Vergleich zum Kalibrator (*Abb. ERG 26*).

Dementsprechend konnte mittels quantitativer *real-time* PCR die Expression der mRNA für wichtige Komponenten des SFO-intrinsischen RAS gezeigt werden. Dabei wurde Aogen, ACE und Cathepsin D auf mRNA-Ebene stark, Chymasen und Renin hingegen schwach exprimiert.



**Abb. ERG 26: Relative mRNA Expression wichtiger Komponenten eines intrinsischen RAS in der neuro-glialen SFO-spezifischen Primärzellkultur**

Dargestellt ist die relative mRNA Expression verschiedener Komponenten eines SFO-intrinsischen RAS als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. im Bezug auf die Expressionsrate der am niedrigsten exprimierten Probe Renin. Je Gen betrug die Anzahl analysierter Proben 4.

### 3.3 Charakterisierung funktionell exprimierter Glutamatrezeptoren im *Organum subfornicale* der Ratte

Ziel dieser Studie war die detaillierte Charakterisierung funktionell exprimierter Subtypen von Glutamatrezeptoren in Zellen des SFOs neonataler Ratten. Zu diesem Zweck wurden SFO-spezifische Primärzellkulturen angefertigt und nach viertägiger Kultivierung für *in vitro* Versuche herangezogen. Dabei wurden Analysen mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik, Immunzytochemie sowie PCR an Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Zellkultur durchgeführt.

### **3.3.1 Funktionelle Charakterisierung glutamaterger Rezeptoren in der SFO-spezifischen Primärzellkultur mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik**

In dieser Teilstudie diente die Fura-2 Ratio-Imaging Technik der kontinuierlichen Erfassung intrazellulärer Calciumkonzentrationen ( $[Ca^{2+}]_{iz}$ ) und der Untersuchung welche unterschiedlichen Glutamatrezeptoren zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{iz}$  in verschiedenen Zelltypen der SFO-spezifischen Primärzellkultur führten. Der Versuch für ein „well“ dauerte ca. 50 Minuten, wobei wegen des Einsatzes von Antagonisten für verschiedene metabotrope und ionotrope Glutamatrezeptoren die WRP der Zellen nach Einsatz eines Antagonisten auf 15 Minuten erhöht wurde. Wie in *Kap. ERG 3.2.1* beschrieben, wurden 15 – 30 Zellen mit minimalen Zell-zu-Zell Kontakten analysiert, und die unter *Kap. ERG 3.2.1* beschriebenen Kriterien für Zellen, die zur Auswertung herangezogen wurden, angewandt. Einzige Ausnahme war, dass Glutamat und nicht ein Angiotensin Neuropeptid als Hauptstimulus eingesetzt wurde.

#### **3.3.1.1 Verschiedene Superfusionsstimulationen der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat als Grundlage pharmakologischer Untersuchungen**

Als Grundlage für pharmakologische Untersuchungen zur funktionellen Expression metabotroper und ionotroper Glutamatrezeptoren in Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur wurden zunächst durch repetitive Superfusionsstimulation der SFO-Primärzellkultur mit GLUT Neurone und Astrozyten selektiert, die keine Desensibilisierung der durch GLUT induzierten intrazellulären Calciumsignale zeigten. Zudem wurde mittels sequentieller Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Zellkulturen mit GLUT in steigender Konzentration eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für Neurone und Astrozyten ermittelt und durch Superfusionsstimulation mit GLUT in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Calcium die Herkunft des die intrazellulären Signale auslösenden Calciums eruiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser drei Vorversuche dargestellt.

#### ***Repetitive Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in äquimolarer Konzentration***

Da repetitive Stimulationen neuro-glialer Zellen mit GLUT zur Desensibilisierung einiger Subtypen metabotroper und ionotroper Glutamatrezeptoren und damit einhergehend Änderungen der zytoplasmatischen Calciumkonzentration führen können,

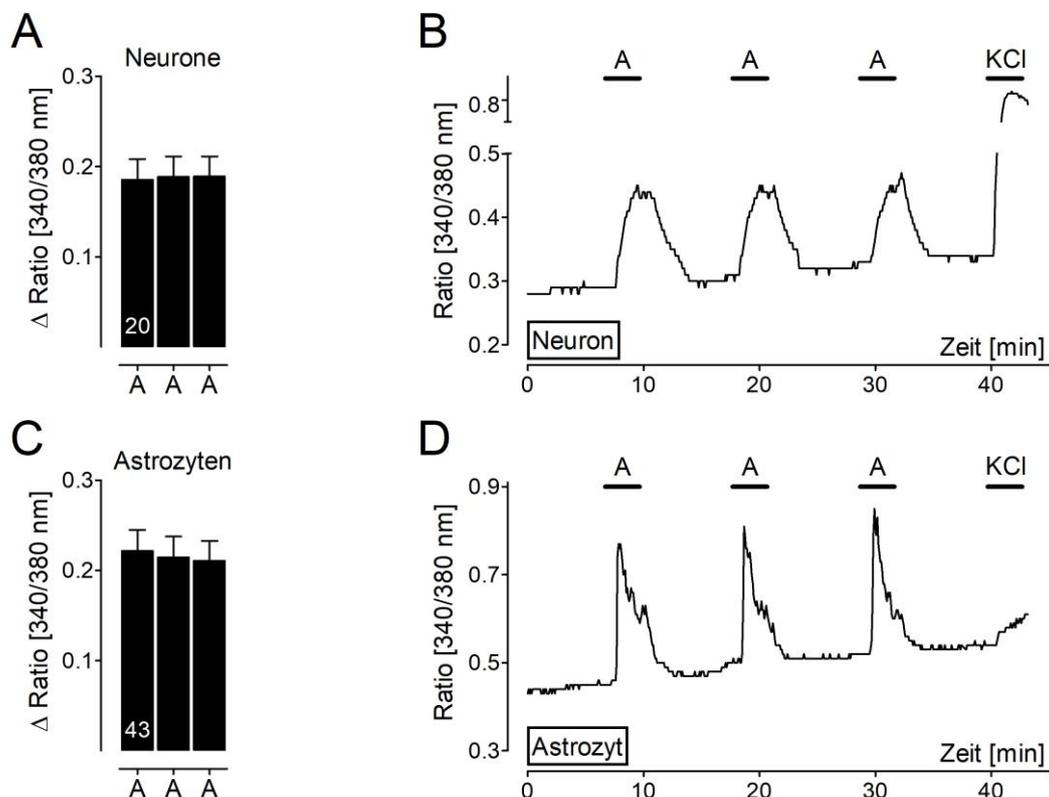
wurde das in *Kap. MM 2.4.6* beschriebene Messprotokoll zur repetitiven (3x) Superfusionsstimulation der SFO-Primärkultur mit GLUT in äquimolarer Konzentration ( $10^{-5}$  M / L) eingesetzt. Zusätzlich zu den in *Kap. ERG 3.2.1* dargestellten Kriterien wurden in diese Studie ausschließlich Neurone und Astrozyten eingeschlossen, welche keine Desensibilisierungs-Phänomene nach repetitiver Superfusionsstimulation mit GLUT zeigten. Dabei sollte die 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Änderung einer Zelle auf eine Superfusionsstimulation mit GLUT um nicht mehr als 0,05 im Vergleich zu den beiden anderen Superfusionsstimulationen abweichen:  $(\text{Peak1} + \text{Peak2}) / 2 = \text{Peak3} \pm 0,05$ . Dieses Telexperiment in der SFO-spezifischen Zellkultur stellte somit die Grundlage nachfolgender Untersuchungen mit subtypspezifischen Antagonisten für metabotrope und ionotrope Glutamatrezeptoren dar, welche der pharmakologischen Charakterisierung potentiell exprimierter Glutamatrezeptoren in Neuronen und Astrozyten dienen. Die Datenauswertung zeigte, dass eine durch GLUT induzierte Desensibilisierung der zellulären Antwort (intrazelluläres Calciumsignal) bei Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur bei Intervallzeiten von acht Minuten der sequentiellen GLUT-Applikation für die meisten Zellen nicht nachweisbar waren.

Für die Analyse des Desensibilisierungsverhaltens der durch repetitive Superfusion mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) induzierten intrazellulären Calciumsignale wurden 19 „wells“ aus neun Präparationen herangezogen und 79 Neurone sowie 148 Astrozyten auf ihre repetitive Responsivität gegenüber GLUT ( $10^{-5}$  M / L) ausgewertet. Von den untersuchten Neuronen zeigten 27 (34,2 %) eine Responsivität auf die erste GLUT Applikation, wobei 20 (25,3 %) dieser Neurone keine Desensibilisierung der zellulären Antwort aufwiesen. Die nicht desensibilisierenden Neurone reagierten auf alle drei Superfusionsstimulationen mit GLUT mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,19 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 27 A*).

Die Astrozyten betreffend zeigten von 148 untersuchten Astrozyten 48 und somit 32,4 % eine Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte nach Superfusionsstimulation mit GLUT, wobei 43 (29 %) der untersuchten Astrozyten keine Desensibilisierung bei repetitiver Superfusionsstimulation mit GLUT zeigten. Die nicht desensibilisierten Astrozyten reagierten auf die erste glutamaterge Superfusion mit einer durchschnittlichen Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,22 \pm 0,02$ . Die zweite und dritte Superfusionsstimulation führten zu einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte um jeweils  $0,21 \pm 0,02$  (*Abb. ERG*

27 C). Mittels statistischer Auswertungen konnten weder bei Neuronen noch bei Astrozyten signifikante Unterschiede für die 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte zwischen den repetitiven Superfusionsstimulationen mit GLUT festgestellt werden. Exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines nicht desensibilisierten Neurons und Astrozyten sind in *Abb. ERG 27 B* und *D* dargestellt.

Zusammenfassend wurde in diesen Versuchen gezeigt, dass eine repetitive Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit äquimolarem GLUT bei 75 % der responsiven Neurone und 90 % der responsiven Astrozyten nicht zu Desensibilisierungs-Phänomenen führte.



**Abb. ERG 27: Repetitive Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach repetitiver Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der GLUT responsiven Zellen.

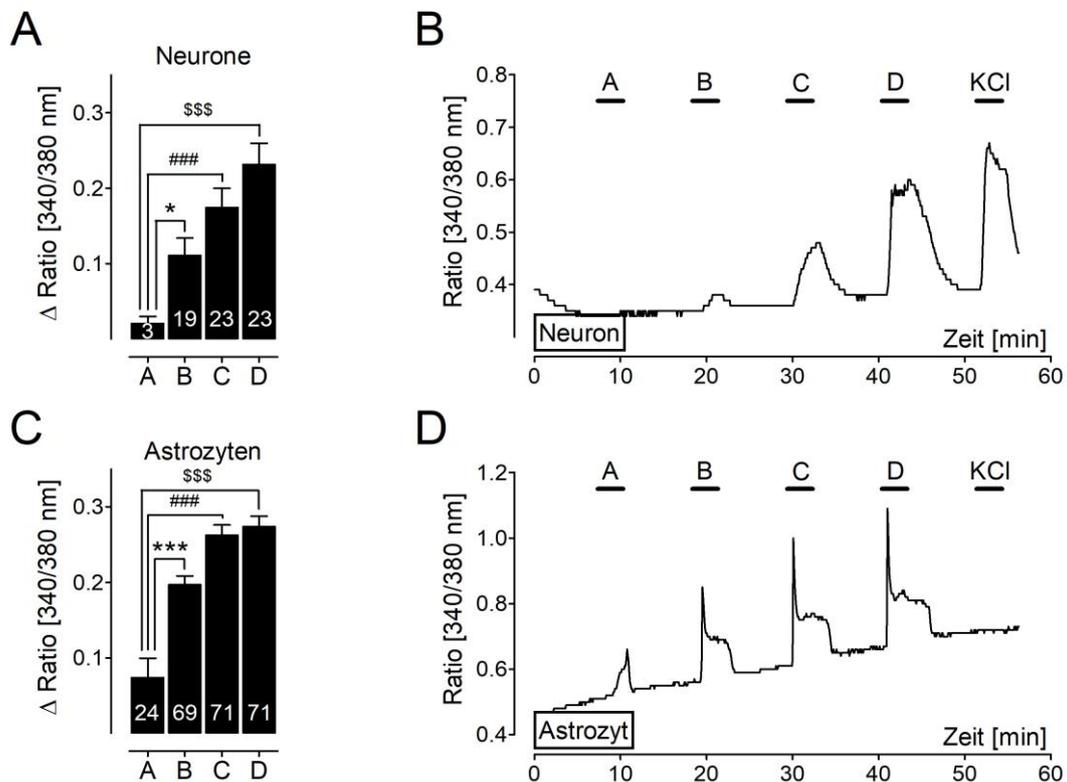
Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach repetitiver Superfusionsstimulation mit GLUT sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

**Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Glutamatkonzentration und Amplitude intrazellulärer Calciumsignale**

In dieser Teilstudie sollte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung im Rahmen der durch Superfusion mit GLUT induzierten intrazellulären Calciumsignale ermittelt werden. Dazu wurden SFO-spezifische Zellen sequentiell mit GLUT in aufsteigender Konzentration ( $10^{-6}$  /  $3,16 \times 10^{-6}$  /  $10^{-5}$  /  $3,16 \times 10^{-5}$  M / L) superfusionsstimuliert (Kap. MM 2.4.6). Für die finale Auswertung wurden nur Zellen herangezogen, die bei der letzten Superfusion und zugleich höchsten GLUT Konzentration ( $3,16 \times 10^{-5}$  M / L) einen Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte  $\geq 0,05$  zeigten. Reagierten diese Zellen auf die vorherigen und zugleich niedriger konzentrierten Superfusionsstimulationen mit GLUT nicht ( $\Delta$ Ratio  $< 0,05$ ), so wurden deren  $\Delta$ Ratio-Werte als 0,01 in die Berechnung für die mittleren 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte einbezogen, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. In diesem Experiment wurden in sechs „wells“ aus vier Präparationen 29 Neurone und 85 Astrozyten auf ihre Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich GLUT untersucht. Auf die sequentiell ansteigenden GLUT Konzentrationen antworteten von den Neuronen 3 (10 %), 19 (66 %), 23 (79 %) und 23 (79 %). Dabei zeigten diese Neurone Änderungen ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,02 \pm 0,01$  ( $10^{-6}$  M / L) /  $0,11 \pm 0,02$  ( $3,16 \times 10^{-6}$  M / L) /  $0,17 \pm 0,03$  ( $10^{-5}$  M / L) und  $0,23 \pm 0,03$  ( $3,16 \times 10^{-5}$  M / L) (Abb. ERG 28 A).

Auch für die Astrozyten konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Superfusion mit GLUT in sequentiell ansteigender Konzentration festgestellt werden. In der Endauswertung zeigten sich von 85 untersuchten Astrozyten 24 (28 %), 69 (81 %), 71 (84 %) und 71 (84 %) responsiv auf eine sequentiell ansteigende GLUT Konzentration. Die durchschnittlich ermittelten  $\Delta$ Ratio-Werte betragen dabei  $0,07 \pm 0,03$  ( $10^{-6}$  M / L) /  $0,20 \pm 0,01$  ( $3,16 \times 10^{-6}$  M / L) /  $0,26 \pm 0,01$  ( $10^{-5}$  M / L) und  $0,27 \pm 0,01$  ( $3,16 \times 10^{-5}$  M) (Abb. ERG 28 C). Mit Hilfe statistischer Auswertung konnten somit sowohl bei Neuronen als auch bei Astrozyten dosisabhängig (hoch) signifikante Anstiege der  $\Delta$ Ratio-Werte ermittelt werden (Abb. ERG 28 A und C). In Abb. ERG 28 B und D sind exemplarisch Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der dosisabhängigen Fluoreszenz Ratio-Werte eines Neurons und Astrozyten dargestellt. Desensibilisierungsphänomene, wie in Kap. ERG 3.3.1.1 dargestellt, konnten nur für wenige Neurone und Astrozyten festgestellt werden. Sie zeigten eine negative Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass sowohl Neurone als auch Astrozyten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für GLUT induzierte Calciumsignale zeigten, wobei Astrozyten eine höhere Sensitivität aufwiesen.



**Abb. ERG 28: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in aufsteigender Konzentration (Dosisabhängigkeit)**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT in aufsteigenden Konzentrationen (A =  $10^{-6}$ , B =  $3,16 \times 10^{-6}$ , C =  $10^{-5}$  und D =  $3,16 \times 10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT aufsteigender Konzentrationen sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

### ***Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Calcium***

In diesem Telexperiment sollte untersucht werden, ob intrazelluläre Calciumsignale SFO-spezifischer Zellen durch einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum oder über eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speicherorganellen, wie

dem rauen endoplasmatischen *Reticulum* (rER), ins Zytoplasma erfolgte. Ein Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum würde eine Beteiligung ionotroper Glutamatrezeptoren indizieren, jedoch eine zusätzliche Expression metabotroper Glutamatrezeptoren in diesen Zellen nicht ausschließen. In neun „wells“ und fünf Präparationen des SFOs wurden 109 Neurone und 93 Astrozyten untersucht. Auch hier wurden alle Zellen, welche Desensibilisierungs-Phänomene zeigten, von der Endauswertung ausgeschlossen und nur Neurone und Astrozyten mit repetitiver Aktivierbarkeit durch GLUT ausgewertet. Die Zellpräparation eines „wells“ wurde zunächst mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in calciumhaltigem Messpuffer superfusionsstimuliert. Anschließend erfolgte eine achtminütige WRP, gefolgt von einer fünfminütigen Superfusion mit calciumfreiem, EGTA-haltigen Messpuffer, welche dem vollständigen Austausch von calciumhaltigen durch calciumfreien Messpuffer diente. Danach wurden die Zellen mit GLUT in calciumfreiem Messpuffer und zuletzt wieder mit GLUT in calciumhaltigem Messpuffer nach dem in *Kap. MM 2.4.6* dargestellten Messprotokoll superfusionsstimuliert. In der Endauswertung zeigte sich dabei, dass basierend auf ihrer Abhängigkeit von extrazellulärem Calcium, sowohl Neurone als auch Astrozyten in zwei Gruppen einzuteilen waren:

- I. Zellen, deren GLUT induzierte Calciumsignale ausschließlich auf dem Einstrom von extrazellulärem Calcium beruhten (*highly extracellular calcium dependent*, **HECD**).
- II. Zellen, deren GLUT induzierte Calciumsignale zumindest partiell auf der Freisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgte (*extracellular calcium independent*, **ECID**).

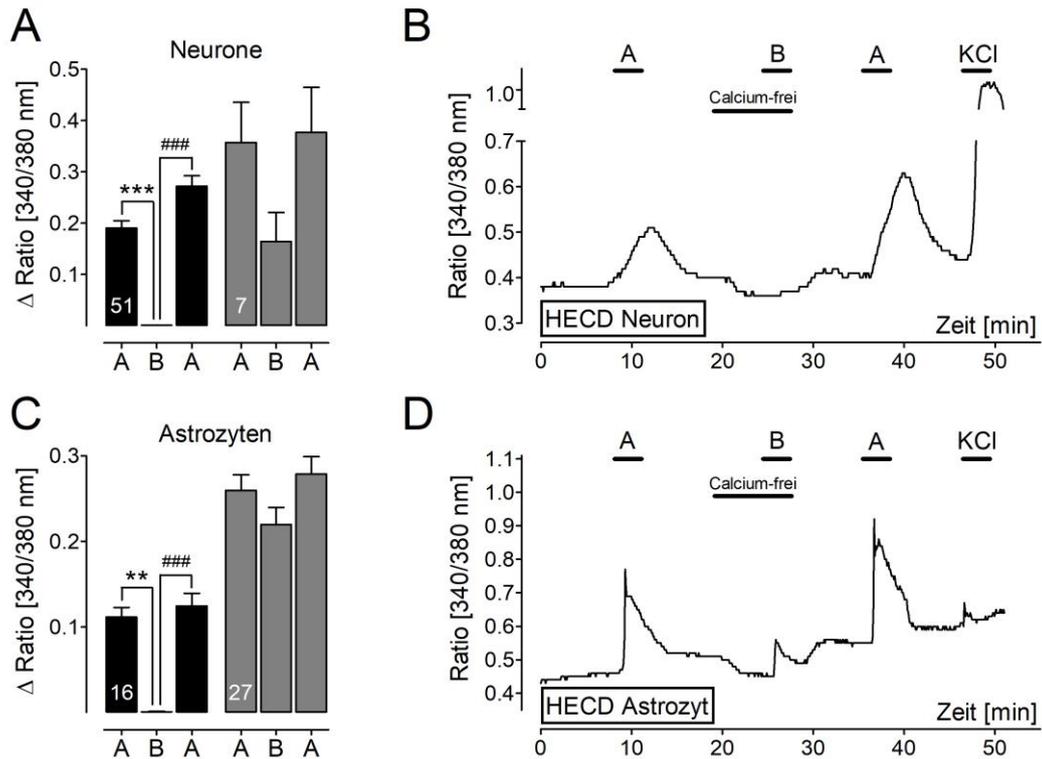
Von den immunzytochemisch als Neurone identifizierten Zellen zeigten 58 (53 %) einen Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte in Folge der ersten respektive dritten Superfusion mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in calciumhaltigem Messpuffer. Dabei konnten 51 (88 %) Neurone aufgrund der zuvor genannten Kriterien der HECD-Gruppe und sieben (12 %) Neurone der ECID-Gruppe zugeordnet werden. Die Neurone der HECD-Gruppe reagierten auf die erste bzw. dritte Applikation von GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in calciumhaltigem Messpuffer mit einer Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,19 \pm 0,01$  respektive  $0,27 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 29 A*). Die Superfusionsstimulation mit GLUT in calciumfreiem Messpuffer hingegen führte zu keiner Änderung ihrer 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte (*Abb. ERG 29 A*). In Neuronen der ECID-Gruppe führten die erste und dritte Super-

fusionsstimulation, jeweils mit GLUT in calciumhaltigem Messpuffer, zu einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,36 \pm 0,08$  bzw.  $0,38 \pm 0,09$  (*Abb. ERG 29 A*). In Abwesenheit von extrazellulärem Calcium zeigten diese Neurone einen Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,17 \pm 0,06$  der tendenziell jedoch verglichen mit Calciumsignalen der ersten und dritten Superfusion nicht signifikant erniedrigt war (*Abb. ERG 29 A*). Interessanterweise wiesen die Neurone der ECID-Gruppe in Gegenwart von extrazellulärem Calcium einen signifikant ( $p < 0,05$ ) höheren Anstieg ihrer 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte als die Neurone der HECD-Gruppe auf (*Abb. ERG 29 A*).

Im Rahmen der Untersuchungen an Astrozyten reagierten von 93 immunzytochemisch identifizierten Astrozyten 43 (46 %) mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte auf die erste und dritte Superfusion mit GLUT in calciumhaltigem Messpuffer. Von diesen wurden 16 Astrozyten (37 %) der HECD-Gruppe zugeordnet und 27 (63 %) in die ECID-Gruppe eingestuft. Astrozyten der HECD-Gruppe reagierten auf die Stimulationsperioden mit GLUT in calciumhaltigem Messpuffer mit einer Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,11 \pm 0,01$  respektive  $0,12 \pm 0,01$  (*Abb. ERG 29 C*). Die Superfusionsstimulation mit GLUT in calciumfreiem Messpuffer hingegen führte zu keiner Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte (*Abb. ERG 29 C*). Die in die ECID-Gruppe eingestuft Astrozyten zeigten einen Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,26 \pm 0,02$  auf die erste und  $0,28 \pm 0,02$  auf die dritte glutamaterge Applikation (*Abb. ERG 29 C*). Die Superfusion mit GLUT in calciumfreiem Messpuffer führte zu einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,22 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 29 C*). Auch für die Astrozyten zeigten die Zellen der ECID-Gruppe eine hoch signifikant stärker ausgeprägte Signalamplitude der intrazellulären Calciumsignale während Superfusionsstimulationen mit GLUT in calciumhaltigem Messpuffer im Vergleich zur HECD-Gruppe (*Abb. ERG 29 C*). Die statistische Auswertung ergab folglich eine hoch signifikante Reduktion der intrazellulären Calciumsignale in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium für die HECD-Gruppen (Neurone und Astrozyten) im Vergleich zu vorausgehenden und nachfolgenden Calciumsignalen in Anwesenheit von extrazellulärem Calcium (*Abb. ERG 29 A* und *C*). Für die ECID-Gruppen hingegen konnten weder bei den Neuronen noch bei den Astrozyten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte für ein Neuron und einen Astrozyten aus den HECD-Gruppen sind in *Abb. ERG 29 B* und *D* dargestellt.

Abschließend kann gesagt werden, dass durch GLUT induzierte intrazelluläre Calciumsignale in Neuronen primär von extrazellulärem Calcium abhängig waren und

Calcium über die Zellmembran ins Zytosol gelangte. Dabei ist eine Aufnahme des extrazellulären Calciums möglich durch (1) ionotrope Glutamatrezeptoren oder (2) Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren und dadurch bedingte Öffnung membranständiger Calciumkanäle. Vergleichbares gilt für die HECD-Gruppe der Astrozyten. Für die ECID-Gruppe der Astrozyten kann zusätzlich von einer IP<sub>3</sub>- und / oder Ryanodin-vermittelten Calciumfreisetzung aus dem ER ausgegangen werden.



**Abb. ERG 29: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Calcium**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in An- (A) und Abwesenheit (B) von extrazellulärem Calcium im Messpuffer als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / #  $P < 0,05$ ; \*\* / ##  $P < 0,01$ ; \*\*\* / ###  $P < 0,001$ ]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) und nicht vorhandener (< 20 %) Signalunterdrückung in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT in An- (A) und Abwesenheit (B) von extrazellulärem Calcium sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

### **3.3.1.2 Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Anwesenheit spezifischer Antagonisten und Agonisten für die metabotropen Glutamatrezeptoren 1 und 5**

Aufbauend auf den in *Kap. ERG 3.3.1.1* gewonnenen Ergebnissen wurden in diesen Teilstudien die potentiell von Zellen der SFO-spezifischen Zellkultur exprimierte metabotropen Glutamatrezeptoren 1 und 5 (mGluR1 und mGluR5) mit Hilfe des Einsatzes subtypspezifischer Antagonisten und Agonisten nachgewiesen. Wiederum wurden die in *Kap. ERG. 3.2.1* dargestellten Kriterien zur Aufnahme von Zellen in die Endauswertung angewendet, wobei eine Einteilung in vollständig inhibierte (> 80 %), partiell inhibierte (20 – 80 %) und nicht inhibierte (< 20 %) Zellgruppen vorgenommen wurde. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Teilstudien für die pharmakologische Charakterisierung von mGluR1 und mGluR5 dargestellt.

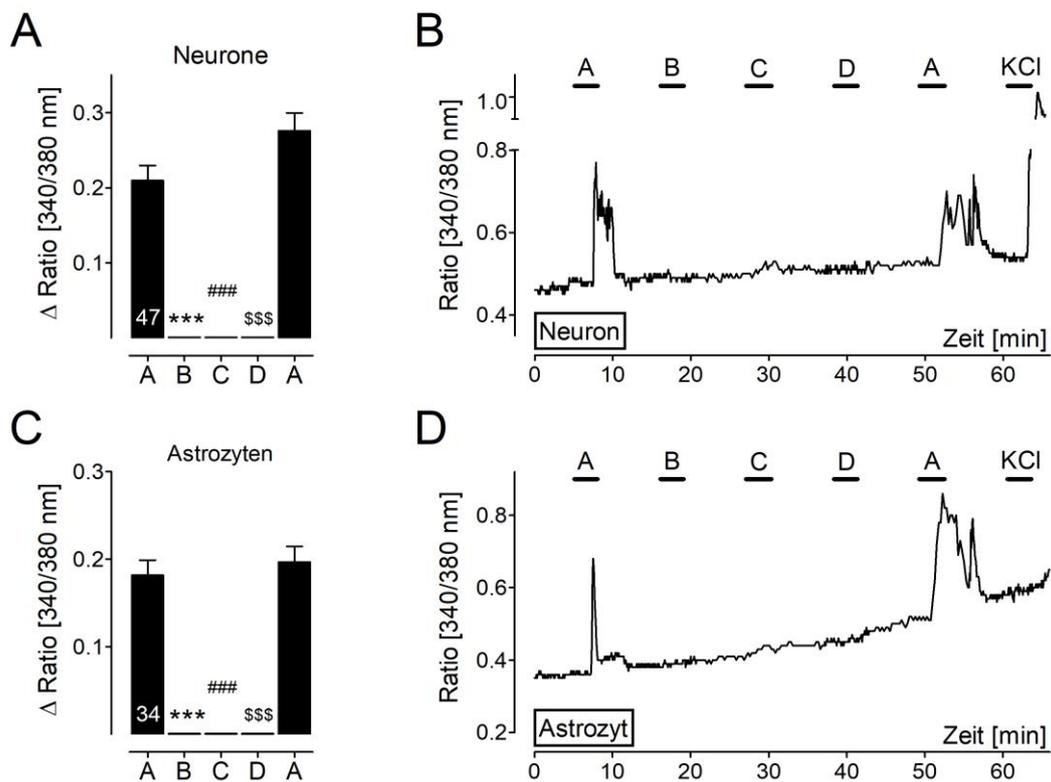
#### ***Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Antagonisten der metabotropen Glutamatrezeptoren***

Mit Hilfe dieses Vorversuchs sollte ausgeschlossen werden, dass der für mGluR1 spezifische Antagonist YM202074 sowie der für mGluR5 spezifische Antagonist MTEP in Superfusionsversuchen *per se* zu Veränderungen der basalen  $\Delta$ Ratio-Werte in SFO-spezifischen Neuronen und Astrozyten führte. Zu diesem Zweck wurde das in *Kap. MM 2.4.6* beschriebene Versuchsprotokoll eingesetzt, wobei die Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur zunächst mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) zum Nachweis ihrer GLUT Responsivität superfusionsstimuliert wurden. Anschließend wurden beide Antagonisten erst einzeln und danach in Kombination (jeweils  $10^{-5}$  M / L) in Superfusionen eingesetzt. Zuletzt erfolgte eine erneute Stimulation der Zellen mit GLUT sowie ein finaler Vitalitätstest für Neurone.

Es wurden insgesamt 88 Neurone und 75 Astrozyten in sieben „wells“ aus vier Präparationen getestet und analysiert. Von den Neuronen erwiesen sich insgesamt 47 (53 %) als GLUT responsiv und reagierten auf die glutamaterge Aktivierung mit vergleichbarer Zunahme ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,21 \pm 0,02$  und  $0,28 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 30 A*). Die Superfusion der Primärkulturen mit YM202074, MTEP und YM202074 + MTEP bewirkten keine Veränderungen der  $\Delta$ Ratio-Werte (*Abb. ERG 30 A*).

Von den analysierten Astrozyten konnten 34 (45 %) als GLUT responsiv charakterisiert werden. Diese Astrozyten antworteten auf die Superfusion mit GLUT mit einer Steigerung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,18 \pm 0,02$  bzw.  $0,20 \pm 0,02$ . Die Applikation der

mGluR1- respektive mGluR5-spezifischen Antagonisten bewirkte keine intrazellulären Calciumsignale (Abb. ERG 30 C). Mittels statistischer Auswertung konnten (hoch) signifikante Unterschiede der  $\Delta$ Ratio-Werte nach Superfusionsstimulation mit GLUT bzw. den Antagonisten ermittelt werden. Keiner der Antagonisten zeigte dementsprechend *per se* agonistische oder zytotoxische Wirkungen. Exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines Neurons und Astrozyten sind in Abb. ERG 30 B und D dargestellt.



**Abb. ERG 30: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat und den Antagonisten für mGluR1 und mGluR5 allein**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT (10<sup>-5</sup> M / L) (A) und YM202074 (10<sup>-5</sup> M / L) (B) bzw. MTEP (10<sup>-5</sup> M / L) (C) sowie einer Kombination beider (D) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

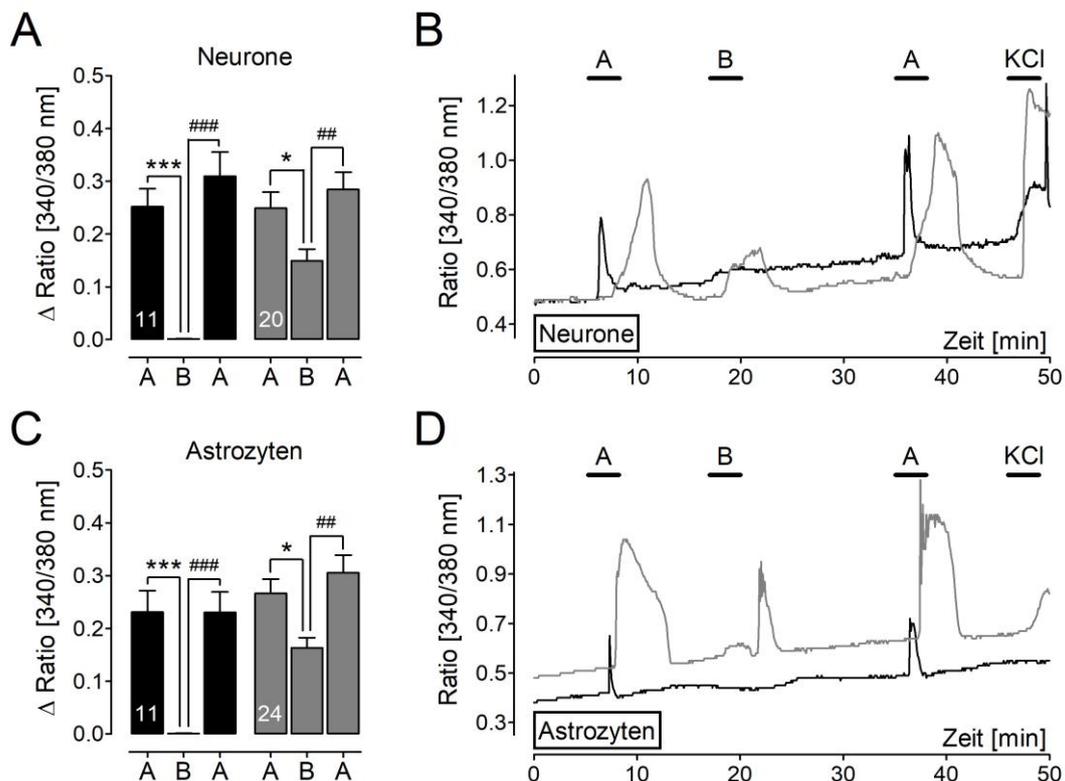
Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT sowie YM202074, MTEP und deren Kombination sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

***Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Anwesenheit des mGluR1-spezifischen Antagonisten YM202074***

Dieses Telexperiment diente dem Nachweis der funktionellen Expression des metabotropen Glutamatrezeptors mGluR1 in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur. Dafür wurde der subtypspezifische Antagonist YM202074 nach dem in *Kap. MM 2.4.6* dargestellten Messprotokoll in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M / L eingesetzt. In 14 „wells“ aus sieben Präparationen wurden 143 Neurone und 153 Astrozyten nach den zuvor beschriebenen Kriterien in die Endauswertung aufgenommen. Von den analysierten Neuronen zeigten 67 (47 %) einen deutlichen Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte nach Superfusionsstimulation mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) und etwa die Hälfte dieser Neurone ( $n = 36$ ) (54 %) wiesen in Anwesenheit von YM202074 keine Minderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte auf und exprimierten offensichtlich nicht den mGluR1 Subtyp. Diese Neurone reagierten auf die Superfusionsstimulation mit GLUT in Abwesenheit des Antagonisten mit einer Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,26 \pm 0,02$  respektive  $0,31 \pm 0,02$ . In Anwesenheit von YM202074 zeigten sie einen vergleichbaren Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,28 \pm 0,02$ . Von allen durch GLUT aktivierten Neuronen konnte in Gegenwart von YM202074 bei 20 (30 %) eine partielle Hemmung (20 – 80 %) der  $\Delta$ Ratio-Werte festgestellt werden. Diese Neurone zeigten nach Superfusionsstimulation mit GLUT in Abwesenheit des Antagonisten einen Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,25 \pm 0,03$  und  $0,28 \pm 0,03$ . In Anwesenheit von YM202074 konnte eine signifikante Inhibition des Calciumsignals auf  $0,15 \pm 0,02$  errechnet werden (*Abb. ERG 31 A*). Final konnten 11 (16 %) der GLUT responsiven Neurone der Gruppe der vollständig inhibierten Neurone (> 80 %) zugeordnet werden. Diese Neurone antworteten auf die Stimulation mit GLUT in Abwesenheit von YM202074 mit einer Steigerung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,25 \pm 0,03$  respektive  $0,31 \pm 0,05$ , wohingegen in Anwesenheit von YM202074 kein Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte nachweisbar war (*Abb. ERG 31 A*).

Von allen untersuchten Astrozyten zeigten sich 78 (51 %) als GLUT responsiv und für 44 (56 %) von ihnen konnte in Anwesenheit von YM202074 keine Inhibition der  $\Delta$ Ratio-Werte ermittelt werden. Diese Astrozyten reagierten auf die Superfusionsstimulationen in Abwesenheit von YM202074 mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,29 \pm 0,02$  bzw.  $0,28 \pm 0,02$  und in Anwesenheit des Antagonisten konnte ein vergleichbarer Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,27 \pm 0,02$  eruiert werden. Von allen GLUT responsiven Astrozyten demonstrierten 24 (31 %) durch den Einsatz von

YM202074 eine partielle Inhibition (20 – 80 %). Diese Astrozyten antworteten auf die Superfusionsstimulation mit GLUT in Abwesenheit von YM202074 mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,27 \pm 0,03$  und  $0,31 \pm 0,03$ . Der Einsatz von YM202074 bewirkte eine signifikante Reduktion der  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,16 \pm 0,02$  (Abb. ERG 31 C).



**Abb. ERG 31: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Ab- und Anwesenheit eines subtypspezifischen Antagonisten für mGluR1**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (B) des mGluR1 spezifischen Antagonisten YM202074 ( $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Antagonisten. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale jeweils zweier Neurone (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT in Ab- (A) und Anwesenheit (B) des mGluR1 spezifischen Antagonisten YM202074 sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Der Gruppe vollständig inhibierter Astrozyten (> 80 %) konnten 11 (14 %) der GLUT responsiven Astrozyten zugeordnet werden. Dabei führten die Superfusionen dieser

Astrozyten mit GLUT *per se* zu einer durchschnittlichen Änderung ihrer 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte von jeweils  $0,23 \pm 0,04$ , wohingegen der Einsatz von YM202074 in Kombination mit GLUT zu keinem Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte führte (*Abb. ERG 31 C*). Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden für die vollständig bzw. partiell inhibierten Neurone und Astrozyten signifikante Unterschiede für die Amplituden der GLUT induzierten Calciumsignale in Ab- versus Anwesenheit des mGluR1-spezifischen Antagonisten errechnet. In *Abb. ERG 31 B* und *D* sind jeweils exemplarisch Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines durch YM202074 vollständig und partiell inhibierten Neurons und Astrozyten während Superfusionsstimulation mit GLUT dargestellt.

Zusammenfassend wurde in diesen Versuchen gezeigt, dass etwa die Hälfte aller GLUT responsiven Neurone und Astrozyten den mGluR 1 exprimierten, wobei es die vorgenommene Gruppeneinteilung ermöglichte, vollständig von partiell inhibierten Neuronen und Astrozyten zu differenzieren, was möglicherweise auf unterschiedliche Expressionsdichten bzw. Affinitäten des Rezeptors zurückzuführen ist.

### ***Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Anwesenheit des mGluR5-spezifischen Antagonisten MTEP***

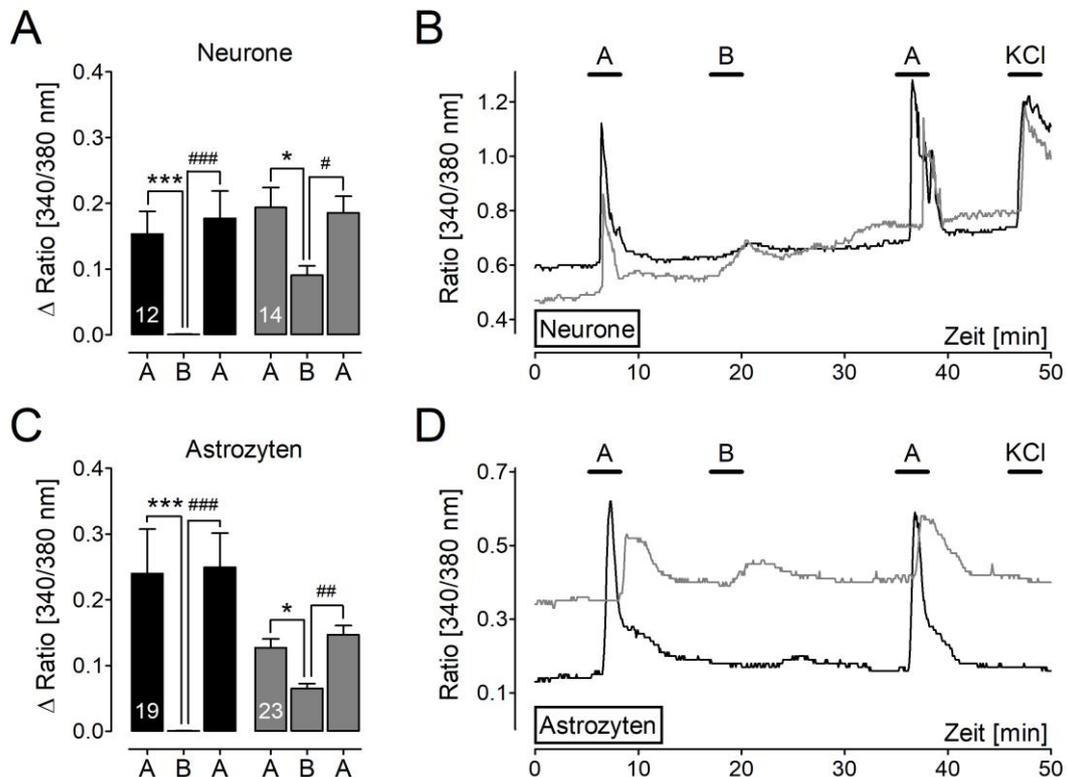
In dieser Teilstudie sollte nachgewiesen werden, ob Neurone und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur den metabotropen Glutamatrezeptor mGluR5 exprimieren. Zu diesem Zweck wurde das in *Kap. MM 2.4.6* dargestellte Messprotokoll mit dem Einsatz des für mGluR5 subtypspezifischen Antagonisten MTEP in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M / L herangezogen. Untersucht wurden dabei 124 Neurone und 225 Astrozyten in 16 „wells“ aus acht Präparationen des SFOs. In der Endauswertung wurden sowohl Neurone als auch Astrozyten nach den bereits beschriebenen Kriterien in eine Gruppe nicht inhibierter (< 20 %), eine Gruppe partiell inhibierter (20 – 80 %) und eine Gruppe vollständig inhibierter (> 80 %) Zellen eingeteilt.

Von den ausgewerteten Neuronen zeigten 55 (44 %) eine Responsivität auf die Superfusion mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) zu Beginn und am Ende des Versuchs. Von diesen GLUT responsiven Neuronen reagierten 29 (53 %) in Anwesenheit von MTEP mit einer nicht oder nur minimal (< 20 %) reduzierten Signalamplitude im Vergleich zu den beiden Kontrollstimulationen mit GLUT alleine. Die Kontrollstimulationen mit GLUT führten bei dieser Gruppe zu einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,14 \pm 0,02$  und  $0,19 \pm 0,03$ , wohingegen in Anwesenheit von MTEP ein vergleichbares

intrazelluläres Calciumsignal von  $0,15 \pm 0,02$  ermittelt wurde. Bei 14 (25 %) der GLUT responsiven Neurone führte MTEP zu einer partiellen Inhibition (20 – 80 %) der durch GLUT induzierten Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte. Neurone dieser Gruppe antworteten auf die Applikation von lediglich GLUT mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,19 \pm 0,03$  vor respektive  $0,19 \pm 0,02$  nach der Superfusion von GLUT und MTEP. Bei Koapplikation von GLUT und MTEP ergab sich eine 50 prozentige Amplitudenreduktion des Calciumsignale auf  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,09 \pm 0,01$  (Abb. ERG 32 A). Zudem konnten 12 (22 %) der GLUT responsiven Neuronen der Gruppe der vollständig inhibierten Neurone (> 80 %) zugeordnet werden. Diese Neurone reagierten auf die Superfusionsstimulationen mit GLUT in Abwesenheit von MTEP mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,15 \pm 0,03$  und  $0,18 \pm 0,04$ , während es in Anwesenheit von MTEP zu keiner Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte kam (Abb. ERG 32 A).

Bei 74 der untersuchten Astrozyten (33 %) konnte eine Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte bei Superfusionsstimulation mit GLUT ermittelt werden. Von diesen Astrozyten konnte der für mGluR5 spezifische Antagonist MTEP bei 32 (43 %) keine Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte hervorrufen. Diese Astrozyten reagierten sowohl auf die beiden Superfusionen mit GLUT *per se* als auch in Gegenwart von MTEP mit einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,09 \pm 0,01$ . Bei 23 (31 %) der GLUT responsiven Astrozyten kam es durch den Einsatz von MTEP zu einer partiellen Inhibition (20 – 80 %) der durch GLUT induzierten Erhöhung der 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte. Diese Gruppe an Astrozyten zeigte eine durchschnittliche Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,13 \pm 0,01$  und  $0,15 \pm 0,01$  als Reaktion auf die Superfusion mit GLUT allein. Der Einsatz von MTEP hingegen führte zu einer (hoch) signifikanten Reduktion der durch GLUT induzierten  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,07 \pm 0,01$  (Abb. ERG 32 C). In die Gruppe der vollständig durch MTEP inhibierten Zellen konnten 19 der GLUT responsiven Astrozyten (26 %) eingeordnet werden. Bei diesen Astrozyten wurde eine durch die Superfusion mit GLUT in Abwesenheit von MTEP ausgelöste Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,24 \pm 0,07$  vor und  $0,25 \pm 0,05$  nach der Koapplikation von GLUT und MTEP ermittelt. Die Superfusionsstimulation dieser Astrozyten mit GLUT in Anwesenheit von MTEP hingegen führte zu keiner Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte (Abb. ERG 32 C). Unter Zuhilfenahme statistischer Auswertung konnten für die vollständig inhibierten Neurone und Astrozyten hoch signifikante Unterschiede für die  $\Delta$ Ratio-Werte zwi-

schen Superfusionsstimulationen in Ab- und Anwesenheit von MTEP ermittelt werden. *Abb. ERG 32 B* und *D* zeigen exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte je eines durch MTEP vollständig und partiell inhibierten Neurons und Astrozyten während Superfusionsstimulation mit GLUT.



**Abb. ERG 32: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Ab- und Anwesenheit eines subtypspezifischen Antagonisten für mGluR5.**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (B) des mGluR5 spezifischen Antagonisten MTEP ( $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Antagonisten. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale jeweils zweier Neurone (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT in Ab- (A) und Anwesenheit (B) des mGluR5 spezifischen Antagonisten MTEP sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Insgesamt wurde in diesen Studien nachgewiesen, dass etwa die Hälfte aller GLUT responsiven Neurone und Astrozyten mGluR5 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die

vorgenommene Gruppeneinteilung ermöglichte es dabei, vollständig von partiell inhibierten Neuronen und Astrozyten zu differenzieren, was möglicherweise auf unterschiedliche Expressionsdichten bzw. Affinitäten des Rezeptors zurückzuführen ist. Außerdem war auffällig, dass die partiell und nicht inhibierten Astrozyten eine wesentlich geringere Aktivierung durch GLUT zeigten als die vollständig inhibierten.

***Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Anwesenheit der mGluR1- und mGluR5-spezifischen Antagonisten YM202074 und MTEP***

Ziel dieser Versuchsreihe war es zu untersuchen, ob und in welchen Zelltypen der SFO-spezifischen Primärkultur beide mGluRs koexprimiert werden. Dabei wurde das in Kap. MM 2.4.6 dargestellte Messprotokoll angewendet, bei welchem die Zellen eines „wells“ zunächst mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) allein, danach mit GLUT in Kombination mit einem der beiden Antagonisten für den mGluR1 (YM202074) bzw. den mGluR5 (MTEP) (je  $10^{-5}$  M / L), nach einer langen WRP mit GLUT in Kombination mit dem jeweils anderen Antagonisten, und zuletzt wiederum mit GLUT superfusionsstimuliert wurden. Nach diesem Messprotokoll wurden 34 „wells“ aus acht Präparationen der SFO-spezifischen Primärzellkultur untersucht und dabei 304 Neurone und 419 Astrozyten analysiert. Die in die Endauswertung aufgenommenen Neurone und Astrozyten, wurden nach folgenden Kriterien in vier Gruppen eingeteilt. Die sequentiell viermal mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) stimulierten und auf die erste und vierte Superfusion mit GLUT *per se* responsiven Zellen zeigten:

- I. keine Inhibition des Calciumsignals durch den Rezeptor Antagonisten A und keine (< 20 %) bzw. partielle (20 – 80 %) Inhibition des Calciumsignals durch den Rezeptor Antagonisten B und *vice versa*.
- II. eine vollständige (> 80 %) bzw. partielle (20 – 80 %) Inhibition des Calciumsignals durch beide Rezeptor Antagonisten.
- III. eine vollständige (> 80 %) Inhibition des Calciumsignals durch Rezeptor Antagonist A und keine (< 20 %) bzw. partielle (20 – 80 %) Inhibition des Calciumsignals durch Rezeptor Antagonist B.
- IV. eine vollständige (> 80 %) Inhibition des Calciumsignals durch Rezeptor Antagonist B und keine (< 20 %) bzw. partielle (20 – 80 %) Inhibition des Calciumsignals durch Rezeptor Antagonist A.

Die ausgewerteten Neurone betreffend zeigten 175 (58 %) eine Responsivität auf die Superfusion mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) *per se*. Davon wurden der Gruppe I in der Endauswertung 101 Neurone entsprechend 58 % der GLUT responsiven Neurone zugeordnet. In dieser Gruppe führte die Superfusionsstimulation mit GLUT in Abwesenheit beider Antagonisten zu einem Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,20 \pm 0,02$  in der ersten und  $0,27 \pm 0,02$  in der vierten Stimulationsperiode. Die Applikation von GLUT in Anwesenheit des mGluR1-spezifischen Antagonisten resultierte in einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,20 \pm 0,01$  und jene mit GLUT in Anwesenheit des mGluR5 Antagonisten von  $0,24 \pm 0,02$ .

Von den GLUT responsiven Neuronen wurden 34 (19 %) der Gruppe II zugeordnet. Diese Neurone reagierten auf die Superfusion mit GLUT *per se* mit einer Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,31 \pm 0,03$  und  $0,31 \pm 0,02$ . Die Koapplikation des mGluR1 Antagonisten resultierte in einer Reduktion der Calciumsignale auf  $0,09 \pm 0,02$  und bei Einsatz von MTEP kam es zu einer Inhibition der  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,10 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 33 A*).

Die Endauswertung ergab, dass 14 (8 %) der GLUT responsiven Neurone der Gruppe III zugewiesen wurden. Neurone dieser Gruppe zeigten auf die Superfusionsstimulationen mit GLUT in Abwesenheit beider Antagonisten einen Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,19 \pm 0,03$  bzw.  $0,22 \pm 0,02$ . Während der Einsatz des mGluR1-spezifischen Antagonisten zu einer vollständigen Inhibition (> 80 %) der Calciumsignale führte, ergab die Superfusion mit GLUT in Anwesenheit von MTEP noch eine Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,16 \pm 0,03$  (*Abb. ERG 33 A*).

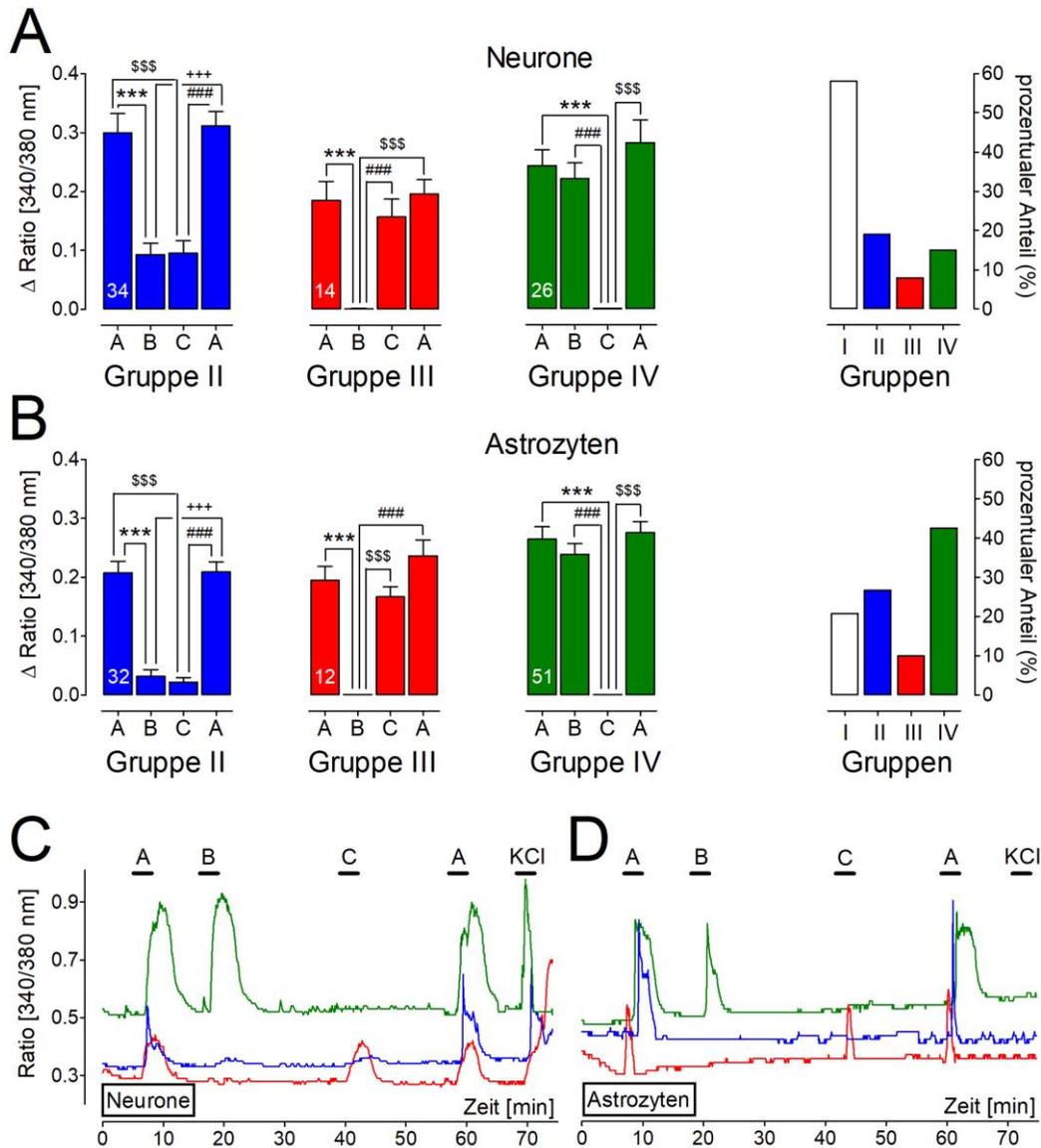
Die verbleibenden 26 (15 %) der GLUT responsiven Neurone wurden der Gruppe IV zugeteilt, da sie ausschließlich den Rezeptorsubtyp mGluR5 exprimierten. Bei diesen Neuronen führten die Superfusionsstimulationen mit GLUT in Abwesenheit beider Antagonisten zu einem Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,24 \pm 0,03$  in der ersten und  $0,28 \pm 0,04$  in der vierten Stimulationsperiode. Die Superfusion mit GLUT und MTEP bewirkte eine vollständige (> 80 %) Reduktion der  $\Delta$ Ratio-Werte, wohingegen die Applikation von GLUT und YM202074 Calciumsignale mit  $\Delta$ Ratio-Werten von  $0,22 \pm 0,03$  auslöste (*Abb. ERG 33 A*). Bei den Gruppen II – IV führten die vollständigen Inhibitionen (> 80 %) zu hoch signifikanten Unterschieden der 340 / 380 nm

$\Delta$ Ratio-Werte bei Superfusionsstimulation mit dem jeweiligen Antagonisten gegenüber den Superfusionsstimulationen in Abwesenheit beider oder eines Antagonisten (*Abb. ERG 33 A*).

Von den in dieser Teilstudie untersuchten Astrozyten zeigten 117 (27 %) eine Responsivität auf eine Superfusionsstimulation mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in Abwesenheit der Antagonisten. Dabei konnten 25 (21 %) der GLUT responsiven Astrozyten in Gruppe I eingeordnet werden, die weder mGluR1 noch mGluR5 exprimierten. Diese Astrozyten reagierten auf die Superfusion mit GLUT in Abwesenheit beider Antagonisten mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,27 \pm 0,02$  und  $0,32 \pm 0,03$ . Die Superfusionsstimulationen mit GLUT in Anwesenheit von YM202074 und MTEP bewirkten keine signifikante Abschwächung (< 20 %) der intrazellulären Calciumsignale und die Astrozyten zeigten Erhöhungen ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,27 \pm 0,03$  respektive  $0,23 \pm 0,02$ .

Der Gruppe II, Astrozyten die sowohl mGluR1 als auch mGluR5 exprimierten, konnten 32 (27 %) der GLUT responsiven Astrozyten zugeordnet werden. Astrozyten dieser Gruppe zeigten eine durch die Superfusion mit GLUT in Abwesenheit beider Antagonisten bedingte Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von jeweils  $0,21 \pm 0,02$ . Bei Koapplikation von GLUT und dem mGluR1 Antagonisten kam es zu einer Reduktion der GLUT induzierten  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,03 \pm 0,01$  und der Einsatz des mGluR5 Antagonisten führte zu einer Inhibition der  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,02 \pm 0,01$  (*Abb. ERG 33 B*).

Der Gruppe III (Astrozyten, die nur mGluR1 exprimieren) wurden 12 (10 %) der GLUT responsiven Astrozyten zugeteilt. Diese Astrozyten antworteten auf die Superfusion mit GLUT in Abwesenheit beider Antagonisten mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,20 \pm 0,02$  in der ersten respektive  $0,24 \pm 0,03$  in der vierten Stimulationsperiode. Eine Superfusionsstimulation mit GLUT in Anwesenheit von YM202074 führte zu einer vollständigen Inhibition (> 80 %) der  $\Delta$ Ratio-Werte, wohingegen die Superfusionsstimulation mit GLUT in Anwesenheit von MTEP einen von den Kontrollwerten statistisch nicht unterschiedlichen Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,17 \pm 0,02$  bewirkte (*Abb. ERG 33 B*).



**Abb. ERG 33: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Ab- und Anwesenheit subtypspezifischer Antagonisten für mGluR1 und mGluR5**

In **A** und **B** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**B**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (B und C) der mGluR1- (B) und mGluR5- (C) spezifischen Antagonisten YM202074 und MTEP (jeweils  $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Blaue Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %) Antagonisierung beider Rezeptoren, rote Balkendiagramme mit nahezu vollständiger Antagonisierung von mGluR1 und grüne Balkendiagramme mit nahezu vollständiger Antagonisierung von mGluR5. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen. Für Neurone (**A**) und Astrozyten (**B**) sind die prozentualen Anteile jeweils rechts dargestellt. Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale jeweils eines Neurons (**C**) und Astrozyten (**D**) jeder Gruppe (II – IV) nach Superfusionsstimulation mit GLUT in Ab- (A) und Anwesenheit (B und C) der mGluR1- und mGluR5-spezifischen Antagonisten YM202074 und MTEP sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Der Gruppe IV (Astrozyten, die ausschließlich mGluR5 exprimierten) gehörten in der Endauswertung 51 (44 %) der GLUT responsiven Astrozyten an. Astrozyten aus dieser Gruppe reagierten auf die Superfusionsstimulationen mit GLUT in Abwesenheit beider Antagonisten mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,26 \pm 0,02$  bzw.  $0,28 \pm 0,02$ . Der Einsatz von MTEP bewirkte eine vollständige Unterdrückung ( $> 80$  %) der GLUT induzierten Calciumsignale (*Abb. ERG 33 B*). Die Superfusion mit GLUT in Anwesenheit des mGluR1-spezifischen Antagonisten bewirkte einen Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,24 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 33 B*). Auch bei den Astrozyten konnten mittels statistischer Auswertung bei den Gruppen II – IV für die vollständigen Inhibitionen ( $> 80$  %) hoch signifikante Unterschiede der  $\Delta$ Ratio-Werte bei Superfusionsstimulation mit dem jeweiligen Antagonisten gegenüber Superfusion in Abwesenheit beider oder eines Antagonisten festgestellt werden (*Abb. ERG 33 B*). Exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte jeweils eines Neurons und Astrozyten aus den Gruppen II – IV sind in *Abb. ERG 33 C* und *D* dargestellt.

Abschließend ging aus den Ergebnissen hervor, dass etwa 40 % aller GLUT responsiven Neurone einen oder beide metabotropen Glutamatrezeptoren exprimierten. Von diesen Neuronen zeigte die Hälfte eine Koexpression beider Rezeptorsubtypen. Für die Astrozyten zeigte sich ein abweichendes Bild; etwa drei Viertel aller GLUT responsiven Astrozyten exprimierten einen oder beide mGluRs auf ihrer Oberfläche, wobei mGluR5 den dominierenden Rezeptorsubtyp repräsentierte.

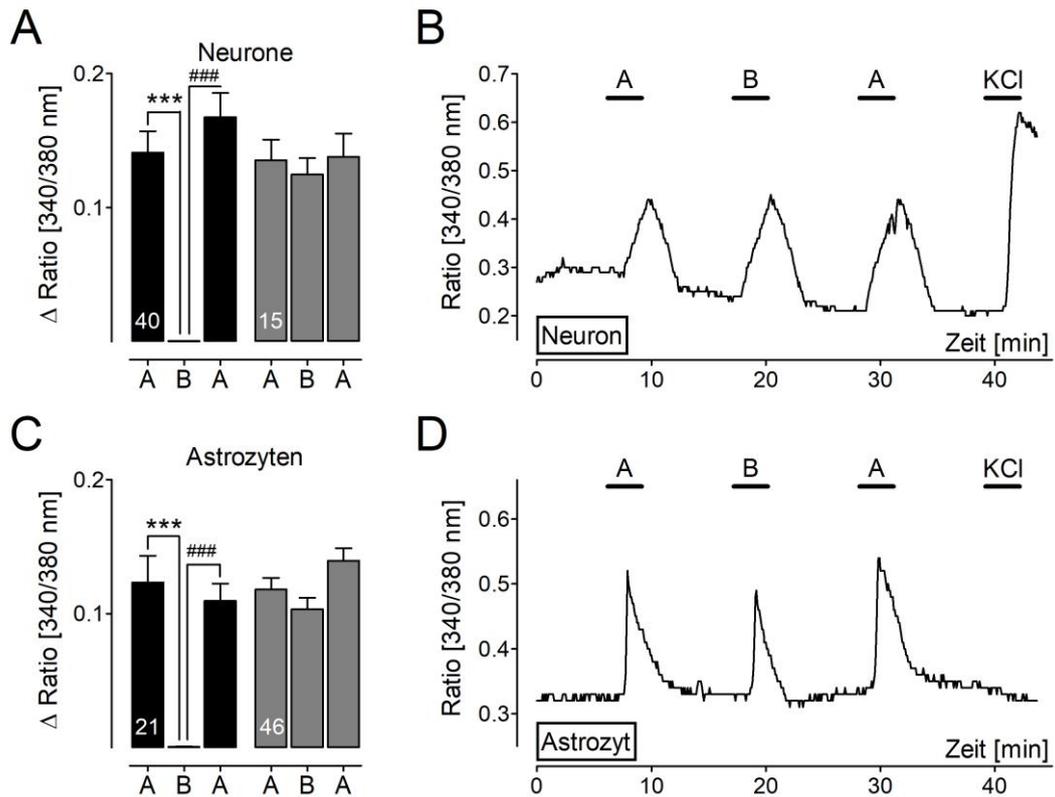
### ***Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärkultur mit dem mGluR1- und mGluR5-spezifischen Agonisten (S)-3,5-DHPG***

Mit dem Einsatz eines für mGluR1 und mGluR5 spezifischen Agonisten (DHPG) sollte die intrinsische potentielle Generierung intrazellulärer Calciumsignale sowie ein weiterer Nachweis für die Expression beider Rezeptorsubtypen in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur erbracht werden. DHPG wurde dabei nach dem in *Kap. MM 2.4.6* beschriebenen Messprotokoll in einer zu GLUT äquimolaren Konzentration von  $10^{-5}$  M / L eingesetzt. Insgesamt wurden in 13 „wells“ aus fünf Präparationen 143 Neurone und 215 Astrozyten analysiert. Von den untersuchten Neuronen konnten 55 (38 %) als GLUT responsiv charakterisiert werden, und von diesen GLUT responsiven Neuronen konnte die Superfusion mit äquimolarem DHPG in 40 Neuronen (73 %) kein intrazelluläres Calciumsignal auslösen. Diese

Gruppe an Neuronen reagierte auf die Applikation von GLUT mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,14 \pm 0,02$  vor und  $0,17 \pm 0,02$  nach der Superfusion mit DHPG (*Abb. ERG 34 A*). Hingegen konnten 15 (27 %) der GLUT responsiven Neurone als DHPG responsiv identifiziert werden. Bei diesen Neuronen lösten die beiden Superfusionen mit GLUT eine Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von jeweils  $0,14 \pm 0,02$  aus. Die dazwischen liegende Superfusionsstimulation mit DHPG führte bei dieser Population an Neuronen zu einem vergleichbaren Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,13 \pm 0,01$  (*Abb. ERG 34 A*).

Bei den Astrozyten zeigte sich im direkten Vergleich zu den Neuronen ein umgekehrtes Bild. Von den untersuchten Astrozyten konnte bei 67 (31 %) eine Responsivität für GLUT manifestiert werden. Lediglich 21 (31 %) dieser GLUT responsiven Astrozyten antworteten auf Superfusion von DHPG nicht mit einem intrazellulären Calciumsignal. Die Superfusion mit GLUT bewirkte dabei einen durchschnittlichen Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,12 \pm 0,02$  respektive  $0,11 \pm 0,01$  (*Abb. ERG 34 C*). Von den GLUT responsiven Astrozyten wurden 46 (69 %) als DHPG responsiv charakterisiert. Diese Astrozyten reagierten auf die Superfusionsstimulationen mit GLUT mit einer Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,12 \pm 0,01$  bzw.  $0,14 \pm 0,01$ . Die dazwischen liegende Applikation von DHPG führte bei diesen Astrozyten zu einem Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte von vergleichbarer Amplitude ( $0,11 \pm 0,01$ ) (*Abb. ERG 34 C*). Die statistische Auswertung dieses Telexperiments ergab bei nicht DHPG responsiven Neuronen und Astrozyten hoch signifikante Unterschiede für die  $\Delta$ Ratio-Werte im Vergleich der Superfusionsstimulationen mit GLUT und denen mit DHPG. In *Abb. ERG 34 B* und *D* sind exemplarisch Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte jeweils eines DHPG responsiven Neurons und Astrozyten abgebildet.

In diesen Versuchen der hier vorliegenden Arbeit konnte dementsprechend gezeigt werden, dass etwa 30 Prozent der Neurone und 70 Prozent der Astrozyten DHPG responsiv waren, dementsprechend metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I exprimierten.



**Abb. ERG 34: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat und dem mGluR1- und mGluR5-spezifischen Agonisten DHPG**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) (A) und dem mGluR1 und mGluR5 Agonisten DHPG ( $10^{-5}$  M / L) (B) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nicht vorhandenem (< 20 %), graue Balkendiagramme mit partiell (20 – 80 %) oder vollständig (> 80 %) vorhandenem Signal für DHPG. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT (A) und DHPG (B) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

### 3.3.1.3 Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat zur Charakterisierung ionotroper Glutamatrezeptoren (NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoren)

Mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik und unter Einsatz subtypspezifischer Antagonisten und Agonisten für metabotrope Glutamatrezeptoren wurde in *Kap. ERG 3.3.1.2* nachgewiesen, dass etwa 30 % der SFO-spezifischen Neurone und 70 % der Astrozyten diese G-Protein gekoppelten Rezeptorproteine exprimierten. Etwa 70 % der GLUT responsiven Neurone und 30 % der GLUT responsiven Astrozyten in der

SFO-spezifischen Primärkultur wurden demnach nicht durch mGluRs aktiviert. Deshalb sollten in diesen Teilstudien die potentiell von SFO-spezifischen Zellen exprimierten ionotropen Glutamatrezeptoren der Gruppen NMDA, AMPA und Kainat mit Hilfe des Einsatzes spezifischer Antagonisten nachgewiesen werden. Es wurden die in *Kap. ERG. 3.2.1* dargestellten Kriterien zur Aufnahme von Zellen in die Endauswertung angewandt, wobei eine Einteilung in vollständig inhibierte (> 80 %), partiell inhibierte (20 – 80 %) und nicht inhibierte (< 20 %) Zellgruppen vorgenommen wurde. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Teilstudien für die pharmakologische Charakterisierung von iGluRs dargestellt.

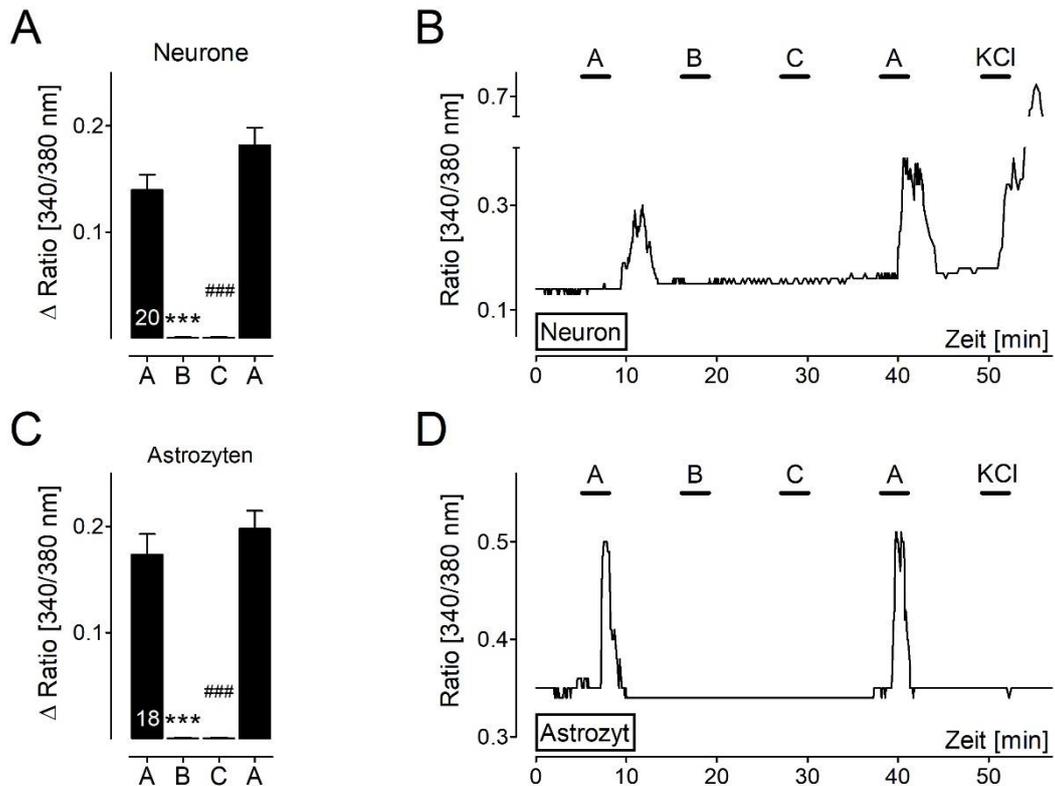
### ***Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Antagonisten der ionotropen Glutamatrezeptoren***

Mit Hilfe dieses Vorversuches sollte ausgeschlossen werden, dass weder der für NMDA-Rezeptoren spezifische Antagonist D-AP5, noch der für AMPA- und Kainatrezeptoren spezifische Antagonist GYKI53655 *per se* zu Änderungen der basalen  $\Delta$ Ratio-Werte von SFO-spezifischen Neuronen und Astrozyten führte. Dafür wurde das in *Kap. MM 2.4.6* beschriebene Messprotokoll verwendet, in welchem die Zellen der SFO-spezifischen Zellkultur mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) zum Nachweis ihrer GLUT Responsivität sowie mit D-AP5 und GYKI53655 (jeweils  $10^{-5}$  M / L) superfusionsstimuliert wurden. Zum Schluss erfolgte eine erneute Superfusion mit GLUT und ein finaler Vitalitätstest mit kaliumreichem Messpuffer.

In diesem Vorversuch wurden in acht „wells“ aus drei Präparationen 46 Neurone und 116 Astrozyten getestet und analysiert. Von den Neuronen erwiesen sich 20 (43 %) als GLUT responsiv und reagierten auf die Applikation von GLUT mit einer vergleichbaren Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,14 \pm 0,01$  zu Beginn und  $0,18 \pm 0,02$  am Ende des Versuchs (*Abb. ERG 35 A*). Die Superfusion der SFO-spezifischen Primärkultur mit D-AP5 oder GYKI53655 bewirkten keine Änderungen der  $\Delta$ Ratio-Werte (*Abb. ERG 35 A*).

Bei den Astrozyten zeigten sich von 62 analysierten Astrozyten 18 (29 %) als GLUT responsiv. Diese Astrozyten antworteten auf die glutamaterge Aktivierung mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,17 \pm 0,02$  und  $0,21 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 35 C*). Die Applikation der NMDA- und AMPA- bzw. Kainat-spezifischen Antagonisten bewirkten keine intrazellulären Calciumsignale (*Abb. ERG 35 C*). Die statistische Auswertung zeigte, dass nach Superfusionsstimulation mit GLUT bzw. den Antagonisten

hoch signifikante Unterschiede ermittelbar waren. Dementsprechend zeigte keiner der Antagonisten *per se* agonistische oder zytotoxische Wirkungen. *Abb. ERG 35 B* und *D* zeigen exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines Neurons und Astrozyten.



**Abb. ERG 35: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat und den spezifischen Antagonisten für iGluRs**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) (A) und den Antagonisten D-AP5 (B) sowie GYKI53655 (C) (jeweils  $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / #  $P < 0,05$ ; \*\* / ##  $P < 0,01$ ; \*\*\* / ###  $P < 0,001$ ]. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT (A), D-AP5 (B) und GYKI53655 (C) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

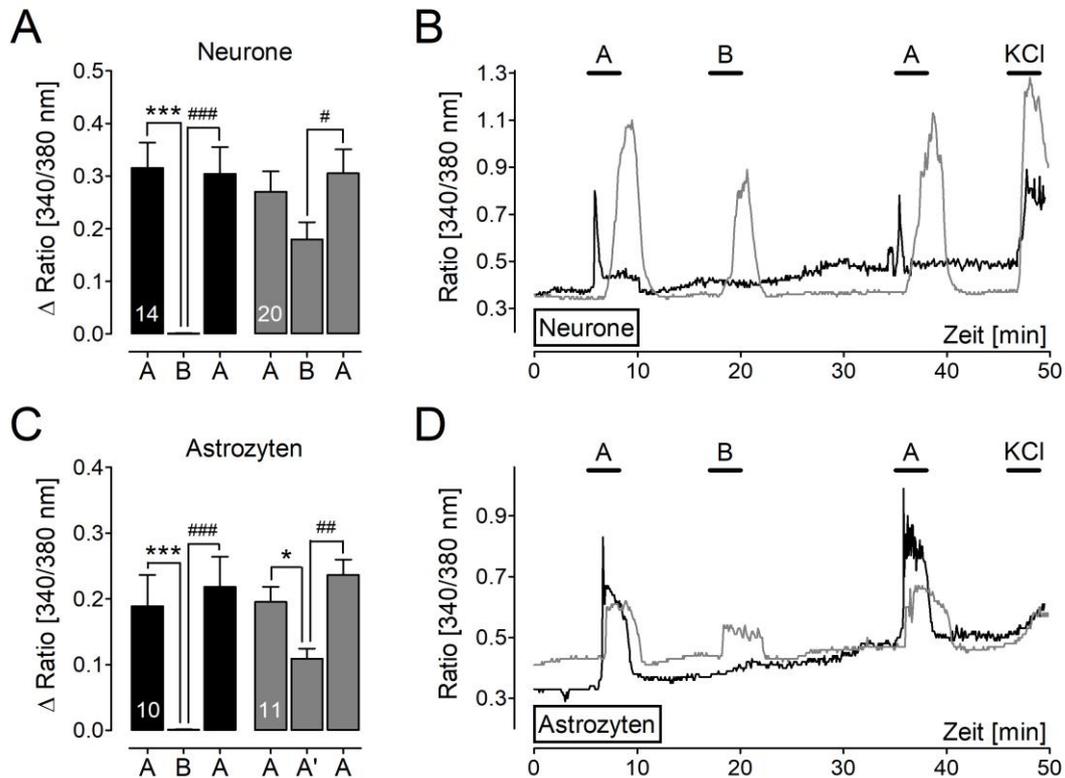
### ***Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Anwesenheit des NMDA-spezifischen Rezeptor Antagonisten D-AP5***

Versuche dieser Studie dienten dem Nachweis der funktionellen Expression ionotroper Glutamatrezeptoren der NMDA-Gruppe in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur. Aus diesem Grund wurde das in *Kap. MM 2.4.6* dargestellte Messprotokoll mit dem NMDA-spezifischen Antagonisten D-AP5 in einer

Konzentration von  $10^{-5}$  M / L eingesetzt und nach diesem Messprotokoll 18 „wells“ aus sechs Präparationen der SFO-spezifischen Zellkultur untersucht. Dabei wurden 186 Neurone und 283 Astrozyten nach genannten Kriterien in die Gruppe der nicht inhibierten (< 20 %), der partiell inhibierten (20 – 80 %) und der vollständig inhibierten (> 80 %) Zellen eingeteilt. Von den analysierten Neuronen antworteten 107 (58 %) auf die Superfusion mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) *per se* mit einer Zunahme ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte und 73 (68 %) dieser GLUT responsiven Neurone wurden der Gruppe der nicht inhibierten (< 20 %) Neurone zugeordnet. Neurone dieser Population reagierten auf die glutamaterge Aktivierung mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,25 \pm 0,02$  bzw.  $0,3 \pm 0,02$ . In Gegenwart von D-AP5 zeigten sie eine vergleichbare Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,28 \pm 0,02$ . Die Population der partiell inhibierten (20 – 80 %) Neurone umfasste 20 (19 %) der GLUT responsiven Neurone. Diese Neurone antworteten auf die Applikation von GLUT *per se* mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,27 \pm 0,04$  respektive  $0,31 \pm 0,05$ . In Anwesenheit des NMDA-spezifischen Antagonisten konnte eine signifikante Reduktion der  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,18 \pm 0,03$  errechnet werden (*Abb. ERG 36 A*). Der Gruppe der vollständig inhibierten (> 80 %) Neurone wurden 14 (13 %) der GLUT responsiven Neurone zugeordnet. Diese Neurone reagierten auf die Superfusion mit GLUT in Abwesenheit von D-AP5 mit einer Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,32 \pm 0,05$  bzw.  $0,31 \pm 0,05$ , wohingegen in Anwesenheit von D-AP5 keine intrazellulären Calciumsignale nachweisbar waren (*Abb. ERG 36 A*).

Bei den Astrozyten waren 94 (33 %) der untersuchten Astrozyten GLUT responsiv und 74 (79 %) von ihnen konnten in der Endauswertung der Gruppe der nicht inhibierten (< 20 %) Astrozyten zugeordnet werden. Diese Astrozyten antworteten auf die Superfusion mit GLUT *per se* mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,24 \pm 0,02$  respektive  $0,31 \pm 0,02$  und in Anwesenheit des NMDA-spezifischen Antagonisten konnte ein vergleichbarer Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,27 \pm 0,02$  eruiert werden. Bei 11 (12 %) der GLUT responsiven Astrozyten löste der Antagonist eine partielle (20 – 80 %) Inhibition der intrazellulären Calciumsignale aus. Diese Astrozyten reagierten auf die Superfusionsstimulation mit GLUT in Abwesenheit von D-AP5 mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,20 \pm 0,02$  und  $0,24 \pm 0,02$ . Die Koapplikation von GLUT und D-AP5 führte zu einer signifikanten Reduktion der  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,11 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 36 C*). Der Gruppe vollständig inhibierter (> 80 %) Astrozyten konnten 10 (11 %) der GLUT responsiven Astrozyten zugeordnet werden

und die Superfusionsstimulation mit GLUT in Abwesenheit von D-AP5 löste bei diesen Astrozyten eine Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,19 \pm 0,05$  zu Beginn bzw.  $0,22 \pm 0,05$  am Ende des Versuchs aus. Der Einsatz von D-AP5 bewirkte eine vollständige Inhibition der intrazellulären Calciumsignale (Abb. ERG 36 C).



**Abb. ERG 36: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in An- und Abwesenheit des NMDA-spezifischen Antagonisten D-AP5**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (B) des NMDA-spezifischen Antagonisten D-AP5 ( $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Antagonisten. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale jeweils zweier Neurone (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT in Ab- (A) und Anwesenheit (B) des NMDA-spezifischen Antagonisten D-AP5 sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Mit Hilfe statistischer Auswertung konnten schließlich für die vollständig inhibierten Neurone und Astrozyten hoch signifikante Unterschiede für die die Amplitude der GLUT induzierten Calciumsignale in Ab- versus Anwesenheit des NMDA-spezifischen

schen Antagonisten errechnet werden. In Abb. ERG 36 B und D sind jeweils exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines durch D-AP5 vollständig und partiell inhibierten Neurons und Astrozyten während Superfusionsstimulation mit GLUT dargestellt.

Zusammenfassend ist den Ergebnissen zu entnehmen, dass iGluRs der NMDA-Gruppe durch ein Drittel der SFO-spezifischen Neurone exprimiert wurden. Bei den Astrozyten exprimierten weniger als ein Viertel der GLUT responsiven Astrozyten NMDA-Rezeptoren.

### ***Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat in Anwesenheit des AMPA- und Kainatrezeptor spezifischen Antagonisten GYKI53655***

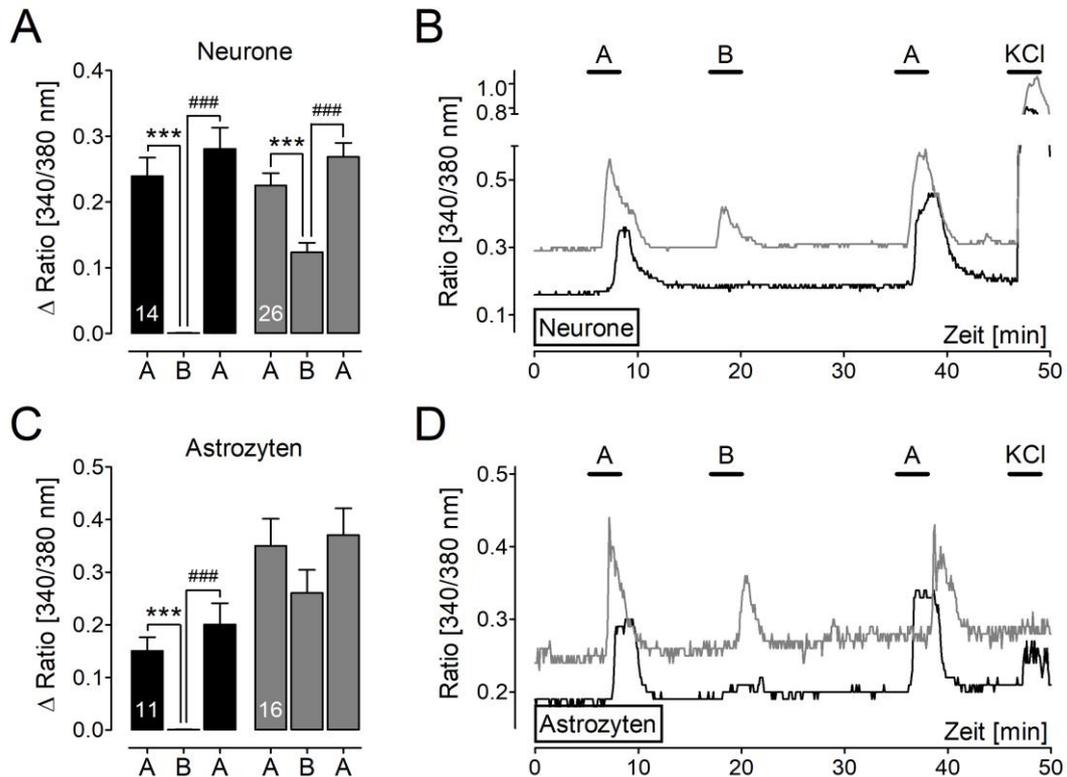
In dieser Teilstudie sollte nachgewiesen werden, ob Neurone und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärkultur ionotrope Glutamatrezeptoren der AMPA und Kainat Gruppe exprimieren. Hierfür wurde das in Kap. MM 2.4.6 dargestellte Messprotokoll unter Einsatz des für AMPA- und Kainatrezeptoren spezifischen Antagonisten GYKI53655 ( $10^{-5}$  M / L) herangezogen. Untersucht wurden dabei 145 Neurone und 273 Astrozyten in 14 „wells“ aus vier Präparationen des SFOs und nach beschriebenen Kriterien in eine Gruppe nicht inhibierter (< 20 %), partiell inhibierter (20 – 80 %) und vollständig inhibierter (> 80 %) Zellen eingeteilt.

Die Neurone betreffend konnte bei 92 (63 %) eine GLUT Responsivität nachgewiesen werden. Von diesen GLUT responsiven Neuronen wurden 52 (57 %) der Gruppe der nicht inhibierten (< 20 %) Neurone zugeordnet und reagierten auf die Applikation mit GLUT in Abwesenheit von GYKI53655 mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,25 \pm 0,02$  bzw.  $0,33 \pm 0,03$ . In Anwesenheit von GYKI53655 zeigten sie eine vergleichbare Änderung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,27 \pm 0,02$ . Bei 26 (28 %) der GLUT responsiven Neurone führte der Antagonist zu einer partiellen Inhibition der durch GLUT induzierten Calciumsignale. Diese Neurone antworteten auf die Superfusion mit GLUT *per se* mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,23 \pm 0,02$  vor und  $0,27 \pm 0,02$  nach der Applikation von GLUT und GYKI53655. Bei Koapplikation von GLUT und GYKI53655 ergab sich eine signifikante Amplitudenreduktion der Calciumsignale auf  $0,12 \pm 0,01$  (Abb. ERG 37 A). Der Gruppe der vollständig inhibierten (> 80 %) Neurone konnten 14 (15 %) der GLUT responsiven Neurone zugeteilt werden. Diese Population an Neuronen antwortete auf die Superfusion mit GLUT mit einer

Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,24 \pm 0,03$  respektive  $0,28 \pm 0,03$ , wohingegen die Kostimulation mit GLUT und GYKI53655 eine vollständige Inhibition der GLUT induzierten Calciumsignale auslöste (*Abb. ERG 37 A*).

Bei 114 (42 %) der untersuchten Astrozyten konnte eine GLUT Responsivität ermittelt werden, wobei 87 (76 %) der GLUT responsiven Astrozyten unter Einsatz des Antagonisten keine Inhibition der  $\Delta$ Ratio-Werte zeigten. Diese Astrozyten reagierten auf die Superfusionsstimulationen mit GLUT *per se* mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,25 \pm 0,01$  bzw.  $0,30 \pm 0,03$ . In Gegenwart von GYKI53655 antworteten sie mit einer nicht oder nur minimal (< 20 %) veränderten Signalamplitude im Vergleich zu den beiden Kontrollstimulationen ( $0,26 \pm 0,01$ ). Der Population der partiell inhibierten (20 – 80 %) Astrozyten konnten 16 (14 %) der GLUT responsiven Astrozyten zugeordnet werden. Die Applikation mit GLUT allein führte in diesen Astrozyten zu einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,35 \pm 0,05$  und  $0,37 \pm 0,05$ , während eine Koapplikation von GLUT und GYKI53655 eine Reduktion der  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,26 \pm 0,04$  (*Abb. ERG 37 C*) bewirkte. In die Gruppe der vollständig durch GYKI53655 inhibierten (> 80 %) Zellen wurden 11 (10 %) der GLUT responsiven Astrozyten eingeordnet. Diese Astrozyten reagierten auf die glutamaterge Aktivierung in Abwesenheit des Antagonisten mit einer Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,15 \pm 0,02$  bzw.  $0,2 \pm 0,04$ . In Anwesenheit von GYKI53655 kam es zu keinen Änderungen der  $\Delta$ Ratio-Werte (*Abb. ERG 37 C*). Mit Hilfe statistischer Auswertungen konnten für die vollständig bzw. partiell inhibierten Neurone und Astrozyten (hoch) signifikante Unterschiede für die Amplitude der GLUT induzierten Calciumsignale in Ab- versus Anwesenheit des AMPA- und Kainatrezeptor spezifischen Antagonisten GYKI53655 errechnet werden. *Abb. ERG 37 B* und *D* zeigt jeweils exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines durch GYKI53655 vollständig und partiell inhibierten Neurons und Astrozyten während Superfusionsstimulation mit GLUT.

Alles in allem zeigen diese Ergebnisse, dass etwa die Hälfte aller GLUT responsiven Neurone iGluRs vom Typ der AMPA- und Kainatrezeptoren exprimierten. Von den GLUT responsiven Astrozyten exprimierte nur etwa ein Viertel AMPA- und Kainatrezeptoren.



**Abb. ERG 37: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit GLUT in An- und Abwesenheit des AMPA und Kainat spezifischen Antagonisten GYKI53655**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (37 °C) mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (B) des AMPA und Kainat spezifischen Antagonisten GYKI53655 ( $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Antagonisten. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale jeweils zweier Neurone (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT in Ab- (A) und Anwesenheit (B) des AMPA und Kainat spezifischen Antagonisten GYKI53655 sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

### 3.3.1.4 Modulation Glutamat induzierter intrazellulärer Calciumsignale durch das Neuropeptid Phoenixin in der SFO-spezifischen Primärzellkultur

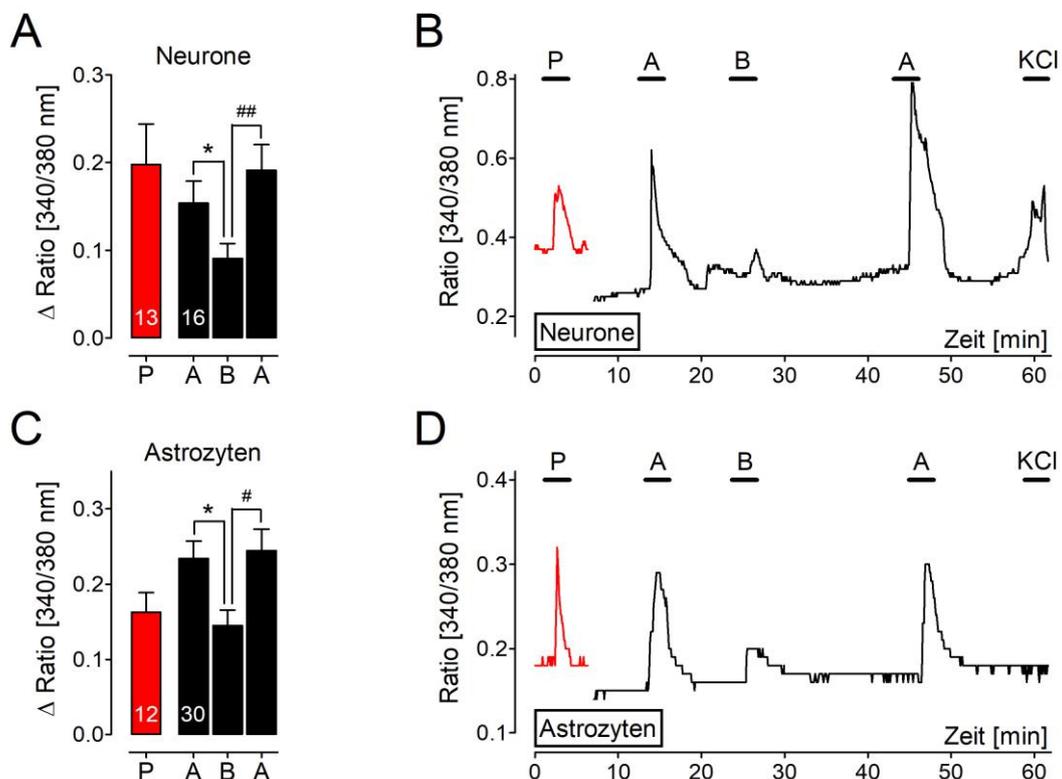
Wie bereits in *Kap. MM 2.4.6* beschrieben, konnte der G-Protein gekoppelte Rezeptor für das im Jahr 2013 entdeckte Neuropeptid Phoenixin in wichtigen Kerngebieten des Hypothalamus inklusive des SFOs nachgewiesen werden. Eine physiologische Bedeutung dieses Neuropeptides für das SFO ist bis *dato* nicht bekannt. Deshalb war es von gesteigertem Interesse herauszufinden, ob Phoenixin in Zellen der SFO-spezifischen Zellkultur zu Calciumsignalen führen würde. Zudem sollte untersucht

werden, ob Phoenixin die durch GLUT induzierten Calciumsignale modulieren würde. Zu diesem Zweck wurde das in *Kap. MM 2.4.6* dargestellte Messprotokoll für die Experimente mit Phoenixin eingesetzt. Das Neuropeptid wurde dabei in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M / L bzw. in Kombination mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M / L verwendet. Für die Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärkultur mit Phoenixin *per se* wurden 497 Neurone und 908 Astrozyten in 70 „wells“ aus 24 Präparationen der SFO-spezifischen Zellkultur zur Analyse herangezogen. Von den untersuchten Neuronen reagierten insgesamt 13 (2,6 %) auf eine Superfusion mit Phoenixin mit einem Anstieg ihrer 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,21 \pm 0,05$  (*Abb. ERG 38 A, roter Balken*). Hinsichtlich der Astrozyten wurden 12 (1,3 %) als Phoenixin responsiv charakterisiert. Diese Population reagierte auf die Superfusionsstimulation mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,16 \pm 0,03$  (*Abb. ERG 38 C, roter Balken*).

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Phoenixin die durch GLUT induzierten intrazellulären Calciumsignale in SFO-spezifischen Neuronen und Astrozyten modulieren (potenzieren oder inhibieren) würde. In diesen Telexperimenten wurden aus neun Präparationen der SFO-Zellkultur in 17 „wells“ 95 Neurone und 202 Astrozyten untersucht. Von den analysierten Neuronen zeigten insgesamt 63 (66 %) einen Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte nach Superfusion mit GLUT. Von diesen GLUT responsiven Neuronen konnten 47 (75 %) der Gruppe der nicht-modulierten (Änderung der Signalamplitude < 20 %) Neurone zugeordnet werden. Diese Population an Neuronen antwortete auf die sequentielle Applikation von GLUT in Abwesenheit von Phoenixin (erste und dritte Superfusionsperiode) mit einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,23 \pm 0,03$  respektive  $0,25 \pm 0,02$ , und in Anwesenheit von Phoenixin ( $10^{-6}$  M / L) (zweite Superfusionsperiode) mit einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von vergleichbarer Amplitude ( $0,23 \pm 0,02$ ). In der Endauswertung konnten 16 (25 %) der GLUT responsiven Neurone der Gruppe der durch Phoenixin modulierten Zellen zugeordnet werden. Diese Neurone reagierten auf die Superfusionsstimulation mit GLUT in Abwesenheit von Phoenixin mit einer Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,15 \pm 0,02$  bzw. von  $0,19 \pm 0,03$  (*Abb. ERG 38 A*). In Anwesenheit von Phoenixin wurde der GLUT induzierte Anstieg der  $\Delta$ Ratio-Werte signifikant auf  $0,09 \pm 0,02$  nahezu halbiert (*Abb. ERG 38 A*).

Bezüglich der Astrozyten reagierten 148 (73 %) mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte auf die Superfusion mit GLUT. In die Gruppe der nicht-modulierten Astrozyten

konnten dabei 118 (80 %) dieser Astrozyten eingeordnet werden. Sie antworteten auf die Applikation von GLUT in Abwesenheit von Phoenixin (erste und dritte Superfusionsperiode) mit einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,20 \pm 0,01$  bzw.  $0,21 \pm 0,01$ , und in Anwesenheit von Phoenixin (zweite Superfusionsperiode) mit einer vergleichbaren Zunahme der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,19 \pm 0,01$ . Astrozyten, die in Anwesenheit von Phoenixin im Superfusat eine Reduktion ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte zeigten, gehörten mit 30 (20 %) zur kleineren Population. Diese Astrozyten reagierten auf die Superfusion mit GLUT *per se* mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,23 \pm 0,02$  und  $0,24 \pm 0,03$  (Abb. ERG 38 C) und in Anwesenheit von Phoenixin wurden die  $\Delta$ Ratio-Werte signifikant reduziert ( $0,14 \pm 0,02$ ) (Abb. ERG 38 C).



**Abb. ERG 38: Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Phoenixin *per se* sowie mit Glutamat in An- und Abwesenheit von Phoenixin**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation ( $37^\circ\text{C}$ ) mit Phoenixin allein ( $10^{-7}$  M / L) (P, rote Balken) sowie mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von Phoenixin ( $10^{-6}$  M / L) (schwarze Balken) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit Phoenixin allein (rot) sowie mit GLUT in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von Phoenixin (schwarz) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Unter Zuhilfenahme statistischer Analysen konnten für 25 % bzw. 20 % der Neurone und Astrozyten hoch signifikante Unterschiede der jeweiligen  $\Delta$ Ratio-Werte für die Superfusion mit GLUT in Ab- versus Anwesenheit von Phoenixin ermittelt werden. Exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte von jeweils einem Phoenixin responsiven Neuron und Astrozyten (in rot) sowie von jeweils einem Neuron und Astrozyten, deren GLUT induzierte intrazelluläre Calciumsignale durch Phoenixin moduliert wurden, sind in *Abb. ERG 38 B* und *D* dargestellt.

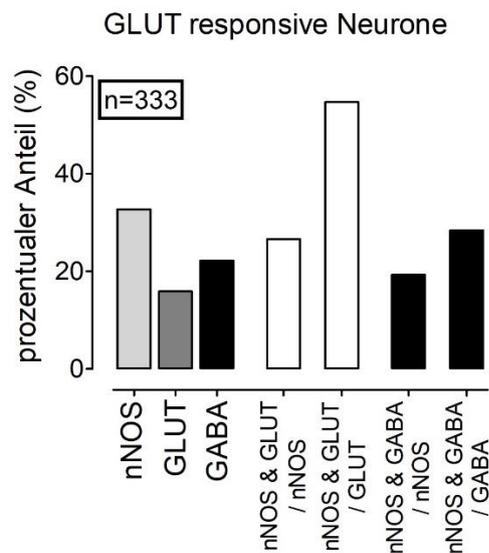
Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass einerseits nur zwei bis drei Prozent der GLUT responsiven Neurone und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärkultur auf Superfusion mit Phoenixin ( $10^{-7}$  M / L) ein intrazelluläres Calciumsignal generierten, andererseits die Koapplikation von Phoenixin ( $10^{-6}$  M / L) in 20 bis 25 Prozent der analysierten Zellen des SFOs zu einer signifikanten, partiellen Inhibition der durch GLUT ( $10^{-5}$  M / L) induzierten Calciumsignale führte.

### **3.3.1.5 Neurotransmitter *coding* Glutamat responsiver Neurone in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

Wie schon in *Kap. ERG 3.2. 1.7* beschrieben, wurden 44 mit Fura-2 beladene „wells“ aus 9 Präparationen der SFO-spezifischen Primärkultur mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) und nachfolgend kaliumreichem Messpuffer superfusionsstimuliert. Nach Fixierung in 4% PFA (*Kap. MM 2.5*) erfolgte die immunzytochemische Markierung der GLUT responsiven Neurone im Hinblick auf deren Expression klassischer Neurotransmitter sowie des Enzyms nNOS. Jedem durch GLUT aktivierten Neuron konnte(n) somit ein oder zwei Neurotransmitter (GABA, GLUT, NO) zugeordnet werden (*transmitter coding*) (*Abb. ERG 39*). Für die Auswertung wurden nur Zellen berücksichtigt, die als Fura-2 beladene Zelle mikroskopisch als Neuron identifiziert wurden und auf Superfusion mit kaliumreichem Messpuffer eine Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $\geq 0,2$  gegenüber der Basislinie zeigten. Zudem gilt die schon in *Kap. ERG 3.2. 1.7* gemachte Feststellung, dass 99 % aller GLUT oder nNOS und mehr als 85 % aller GABA immunoreaktiven Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur den neuronalen Marker MAP<sub>2a+2b</sub> exprimierten.

Von allen analysierten Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur zeigten 333 Neurone eine transiente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  sowohl während Superfusion mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) als auch nachfolgender Depolarisation der Zellen mit kaliumreichem

Messpuffer. Von diesen GLUT responsiven Neuronen erwiesen sich aufgrund post-experimenteller, immunzytochemischer Analyse 109 (32,7 %) als nitroerg, 53 (15,9%) als glutamaterg und 74 (22,2 %) als GABAerg (Abb. ERG 39). Es konnten ebenfalls Kolokalisationen der Neurotransmitter ermittelt werden. 26,6 % der nitroergen Neurone waren auch glutamaterg und 54,7 % der glutamatergen Neurone ebenso nitroerg. Des Weiteren zeigten 19,3 % der nitroergen Neurone eine Kolokalisation mit GABA und 28,4 % der GABAergen Neurone waren ebenfalls nitroerg (Abb. ERG 39).



**Abb. ERG 39: Transmitter coding** Glutamat responsiver Neurone der SFO-spezifischen Primärkultur

Links: Darstellung prozentualer Anteile nitroerger (nNOS), glutamaterger (GLUT) und GABAerger (GABA) Neurone an der Zellpopulation der GLUT responsiven (intrazelluläre Calciumsignale) Neurone in der SFO-spezifischen Zellkultur. Rechts: Neuronale Kolokalisation der Transmitter GLUT bzw. GABA mit dem Stickstoffmonoxid generierenden Enzym nNOS (prozentuale Anteile, jeweils bezogen auf eines der beiden kolokalisierten Transmittersysteme). Bei den prozentualen Anteilen handelt es sich um Mittelwerte aller untersuchten „wells“ ohne S.E.M.

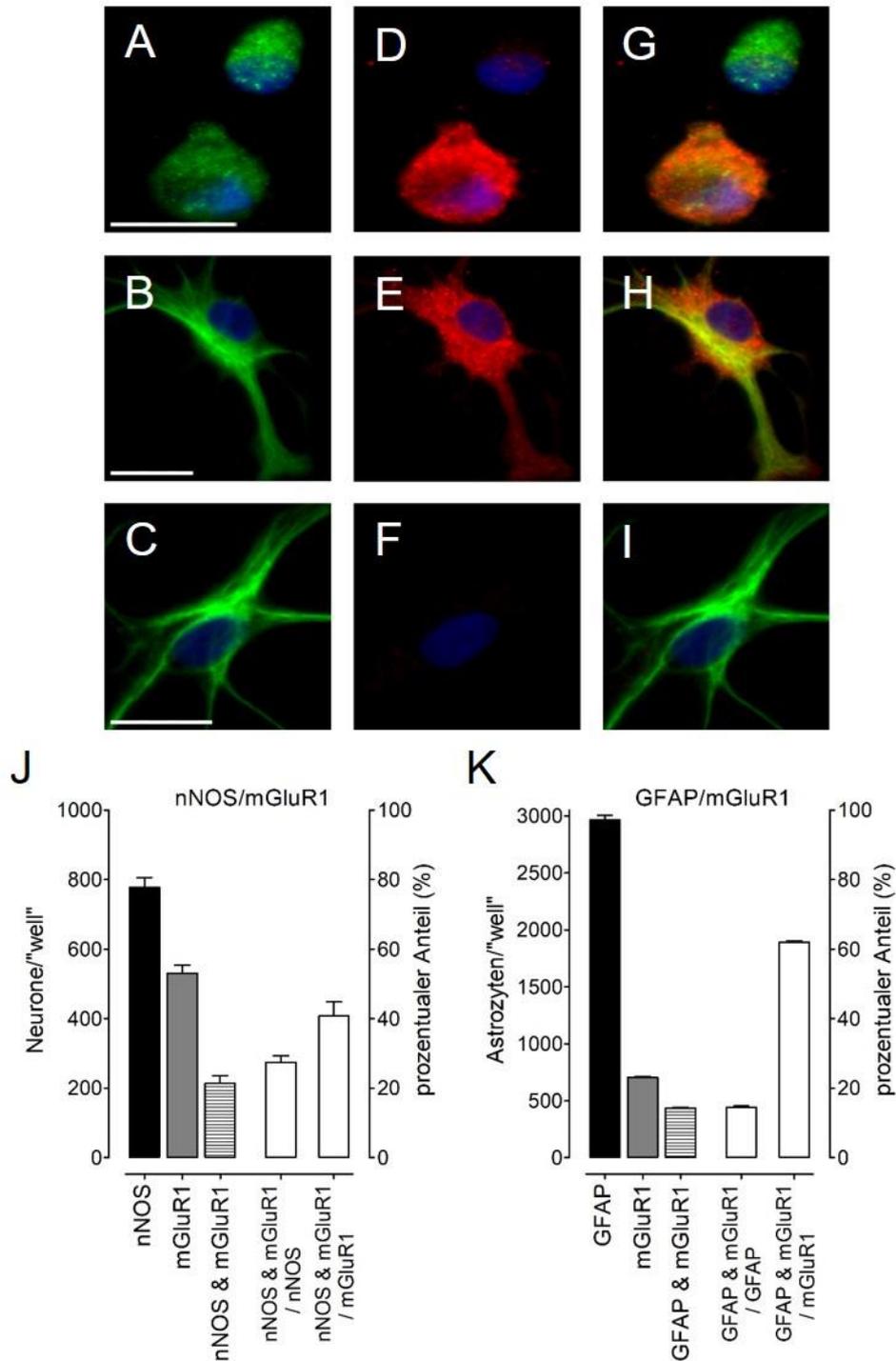
### 3.3.2 Immunzytochemischer Nachweis verschiedener exzitatorischer metabotroper Glutamatrezeptoren

Der Einsatz immunzytochemischer Untersuchungen in der SFO-spezifischen Primärzellkultur diente dem immunzytochemischen Nachweis der mittels Fura-2 Ratio-Imaging Technik charakterisierten mGluRs (Kap. ERG 3.3.1.2). Wie bereits in Kap. ERG 3.1.2 beschrieben, konnten insgesamt  $34 \pm 2$  % aller Neurone in der SFO-Primärzellkultur als eindeutig glutamaterg charakterisiert werden. An Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Zellkultur führte GLUT über unterschiedliche mGluRs und iGluRs zu Calciumsignalen (Kap. ERG 3.3.1). Aus Mangel an passenden Primärantikörpern / -seren wurde sich in diesen Teilstudien auf mGluR1 und

mGluR5 beschränkt. Dafür sollte mit Primärantikörpern gegen mGluR1 bzw. -5 und gegen zelltypspezifische Markerproteine die Zuordnung eines Rezeptors zu einem bestimmten Zelltyp der SFO-spezifischen Primärzellkultur getroffen werden. Es wurden jeweils in sieben „wells“ aus mindestens drei Präparationen im Rahmen immunzytochemischer Doppelmarkierungen einerseits die Anzahl MAP<sub>2a+2b</sub><sup>-</sup> (Neurone), nNOS- (Neurone) und GFAP-immunopositiver (Astrozyten) Zellen, sowie andererseits die Anzahl der einen der beiden Rezeptoren exprimierenden Zellen bestimmt. In der Endauswertung erfolgte eine mikroskopisch exakte Analyse und quantitative sowie prozentuale Ermittlung der doppelmarkierten Zelltypen und somit eine Zuordnung von mGluR1 und mGluR5 zu Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärkultur.

### **3.3.2.1 Immunzytochemischer Nachweis von mGluR1 in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

Doppelmarkierungsstudien der SFO-Primärzellkultur früh postnataler Ratten lieferten den Nachweis der Expression von mGluR1 in Neuronen und Astrozyten. Dabei wurde ein kommerzieller, monoklonaler Primärantikörper gegen den rattenspezifischen mGluR1 nach dem in *Kap. MM 2.5.4* dargestellten Protokoll in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Um die Spezifität des Signals für mGluR1 nachzuweisen, wurde in einigen Teilstudien kein Primärantikörper eingesetzt. Präexperimentelle Absorptionsstudien konnten nicht durchgeführt werden, da das für diesen Primärantikörper korrespondierende Antigen nicht zur Verfügung stand. Als zelltypspezifische Marker wurden hier das Enzym neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) für Neurone und GFAP für Astrozyten verwendet. Von  $777 \pm 28$  nNOS-immunopositiven Neuronen pro „well“ exprimierten  $214 \pm 21$  ( $27,0 \pm 1,9$  %) mGluR1 (*Abb. ERG 40*). Neurone waren mit  $41,0 \pm 4,1$  % ein wichtiger Zelltyp, welcher mGluR1 exprimierte (*Abb. ERG 40*). In der SFO-spezifischen Primärzellkultur konnte bei  $435 \pm 6$  ( $15,1 \pm 0,3$  %) der insgesamt  $2965 \pm 38$  GFAP-immunopositiven Astrozyten pro „well“ ein immunzytochemisches Signal für mGluR1 ermittelt werden (*Abb. ERG 40*). Damit stellten die Astrozyten mit  $62 \pm 0,4$  % den zweiten wichtigen Zelltyp bei der Expression von mGluR1 (*Abb. ERG 40*).



**Abb. ERG 40: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile mGluR1 exprimierender Neurone und Astrozyten in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

**(A-C)** Immunzytochemische Markierung für nNOS- (A, Neurone) und GFAP-immunopositive Astrozyten (B und C). Als Primärantikörper dienten polyklonale rabbit-anti nNOS und anti-GFAP Antisera. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (grün).

**(D-F)** Indirekter Immunfluoreszenznachweis für mGluR1 mittels eines monoklonalen mouse anti-mGluR1 Primärantikörpers. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™-gekoppeltes goat anti-mouse IgG verwendet (rot).

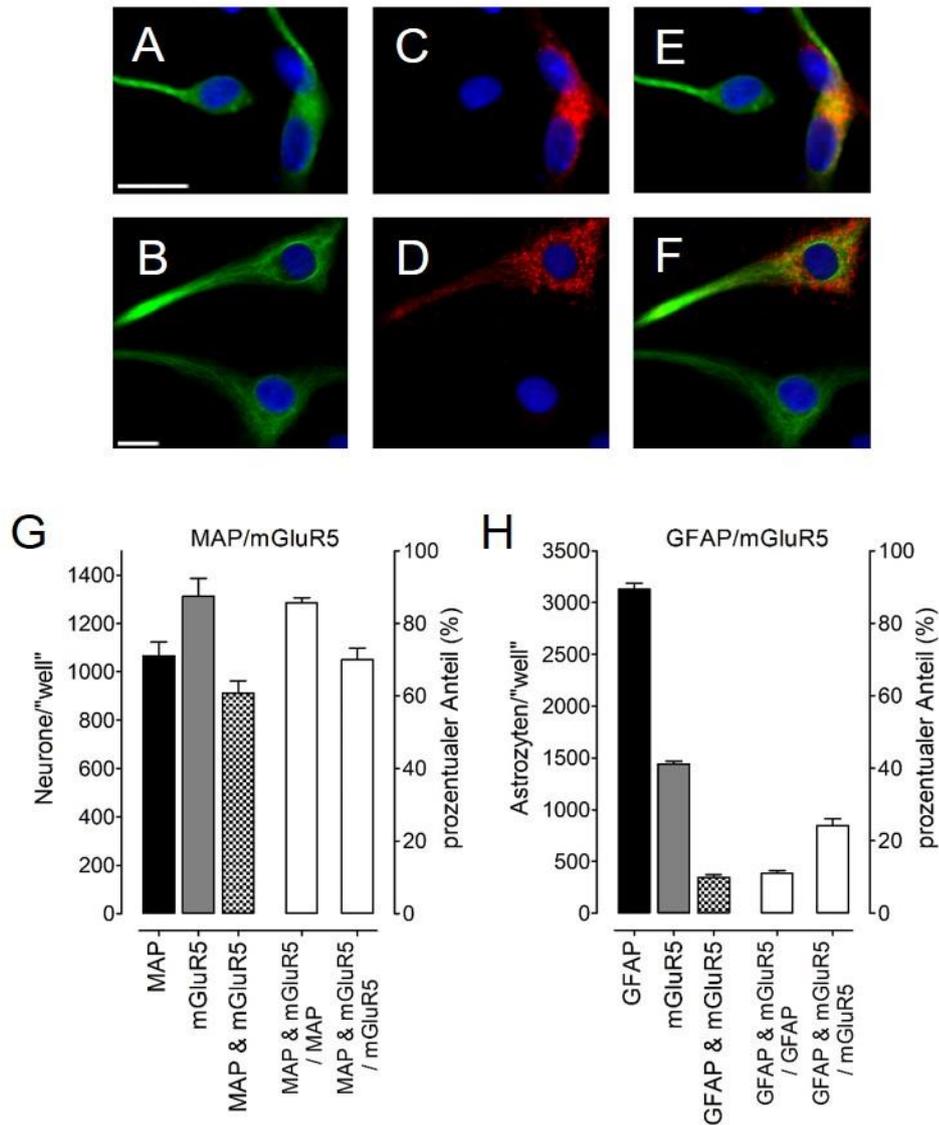
(G-I) Digitale Superposition beider immunzytochemischer Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5 µm.

(J+K) Absolute und prozentuale Anteile von mGluR1 exprimierenden nNOS- und GFAP-immunopositiven Zellen an der Gesamtzahl an nNOS- und GFAP-immunopositiven Zellen pro „well“ und *vice versa*.

### 3.3.2.2 Immunzytochemischer Nachweis von mGluR5 in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur

Mittels immunzytochemischer Doppelmarkierungsstudien in der SFO-spezifischen Zellkultur konnte der eindeutige immunzytochemische Nachweis für die Expression von mGluR5 in Neuronen und Astrozyten erbracht werden. Zu diesem Zweck wurde ein kommerzielles, polyklonales Primärantiserum gegen den rattenspezifischen mGluR5 nach dem in Kap. MM 2.5.4 beschriebenen Protokoll in einer Konzentration von 1:300 eingesetzt. Die Spezifität des Antiserums wurde dabei nachgewiesen, indem in Teilstudien lediglich ein Sekundär-, nicht jedoch der Primärantikörper verwendet wurde. Präexperimentelle Absorptionsstudien, wie sie *lege artis* sind, konnten für dieses Antiserum nicht durchgeführt werden, da das zu diesem Antiserum korrespondierende Antigen nicht verfügbar war. Als zelltypspezifische, monoklonale Antikörper wurden in diesem Telexperiment MAP<sub>2a+2b</sub> für Neurone sowie GFAP für Astrozyten verwendet. Hinsichtlich der Neurone konnte bei  $912 \pm 50$  und somit bei  $86,2 \pm 1,4$  % aller  $1065 \pm 58$  MAP<sub>2a+2b</sub>-immunopositiven Neurone die Expression von mGluR5 festgestellt werden (Abb. ERG 41). Bei  $70,3 \pm 3,1$  % der identifizierten immunzytochemischen Signale für mGluR5 konnten damit Neuronen als exprimierender Zelltyp ermittelt werden. Die Astrozyten betreffend zeigten von  $3131 \pm 56$  eindeutig identifizierten Astrozyten (GFAP-immunopositiv)  $347 \pm 26$  ( $11,0 \pm 0,8$  %) ein immunzytochemisches Signal für mGluR5 (Abb. ERG 41). Dementsprechend konnten  $24,3 \pm 2,1$  % aller ermittelten immunzytochemischen Signale für mGluR5 in Astrozyten nachgewiesen werden (Abb. ERG 41).



**Abb. ERG 41: Immunzytochemischer Nachweis sowie absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile mGluR5 exprimierender Neurone und Astrozyten in der SFO-spezifischen Primärzellkultur**

- (A+B)** Immunzytochemische Markierung für MAP<sub>2a+2b</sub><sup>-</sup> (A, Neurone) und GFAP-immunopositive Astrozyten (B). Als Primäntikörper dienten monoklonale mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub> und anti-GFAP Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 – gekoppeltes donkey anti-mouse IgG eingesetzt (grün).
- (C+D)** Indirekter Immunfluoreszenznachweis für mGluR5 mittels eines polyklonalen rabbit anti-mGluR5 Primäntiserums. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG verwendet (rot).
- (E+F)** Digitale Superposition beider immunzytochemischen Nachweise (Doppelmarkierung) (gelb).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 12,5 µm.

- (G+H)** Absolute und prozentuale Anteile von mGluR5 exprimierenden MAP<sub>2a+2b</sub><sup>-</sup> und GFAP-immunopositiven Zellen an der Gesamtzahl an MAP<sub>2a+2b</sub><sup>-</sup> und GFAP-immunopositiver Zellen pro „well“ und vice versa.

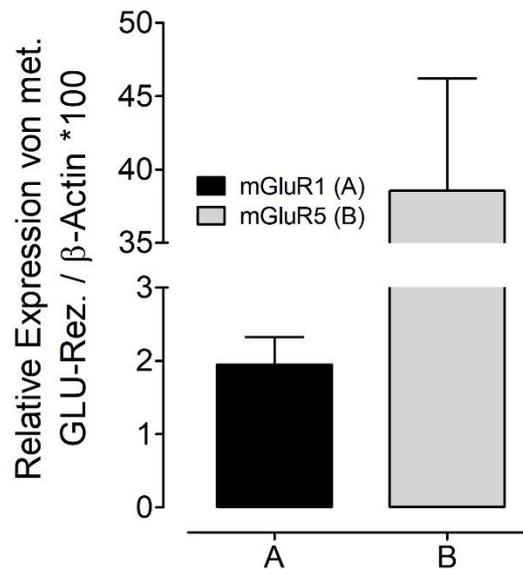
Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass 27 % der SFO-spezifischen Neurone und 15 % der Astrozyten mGluR1 exprimierten, wobei die Verteilung der immunzytochemischen Signale für mGluR1 zwischen Neuronen und Astrozyten vergleichbar waren (41 % *versus* 62 %). Ein Großteil SFO-spezifischer Neurone (86 %) exprimierte mGluR5, wohingegen nur wenige Astrozyten (11 %) ein immunzytochemisches Signal für mGluR5 zeigten. Die immunzytochemischen Markierungen für mGluR5 konnten dabei in höherem Maße in Neuronen ermittelt werden (70 % *versus* 24 %).

### 3.3.3 Quantitative *real-time* PCR für mGluR1 und mGluR5

Die qRT-PCR wurde in diesem Telexperiment eingesetzt, um die relative mRNA Expression für mGluR1 und mGluR5 in Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur zu erfassen. Das jeweils am geringsten exprimierte Zielgen wurde für den semiquantitativen Vergleich der basalen Expressionsraten beider mGluRs als Kalibrator verwendet.

Im Fall der vorliegenden Studie zeigte eine der Proben aus der SFO-spezifischen Primärkultur für die quantitative Bestimmung der mGluR1-spezifischen mRNA die niedrigste mRNA Expressionsrate und wurde als Kalibrator für die Expressionsanalysen eingesetzt. Alle anderen Gene wurden hinsichtlich ihrer mRNA Expression auf diesen Kalibrator bezogen. Auch hier wurde die Expression des *house keeping* Gens  $\beta$ -Actin als interne Kontrolle verwendet, da es sich in vorangegangenen Kontrolluntersuchungen als am besten geeignete endogene Kontrolle gezeigt hatte (*Kap. MM 2.6.4.1*). *Abb. ERG 42* zeigt die graphische Darstellung der relativen mRNA Expressionsstärken von mGluR1 und mGluR5 in Relation zum Kalibrator. Der metabotrope Glutamatrezeptor 5 erwies sich im Mittel ( $n = 4$ ) als  $39 \pm 8$  fach höher exprimiert als der Kalibrator. Der metabotrope Glutamatrezeptor 1 zeigte eine  $2 \pm 0,4$  fach höhere Expression als der Kalibrator (*Abb. ERG 42*).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die relative Expression der mRNA für mGluR1 im Vergleich zu der für mGluR5 deutlich geringer war.



**Abb. ERG 42: Relative mRNA Expression von mGluR1 und mGluR5 in der neuro-glialen SFO-spezifischen Primärzellkultur**

Dargestellt ist die relative mRNA Expression von mGluR1 (A) und -5 (B) in der SFO-spezifischen Primärzellkultur. Je Gen betrug die Anzahl analysierter Proben 4. Als Kalibrator wurde die am niedrigsten exprimierte Probe mGluR1 herangezogen.

### 3.4 Etablierung sowie funktionelle und immunzytochemische Charakterisierung von Primärzellkulturen des Hypothalamus und *Organum subseptale* des Huhnes

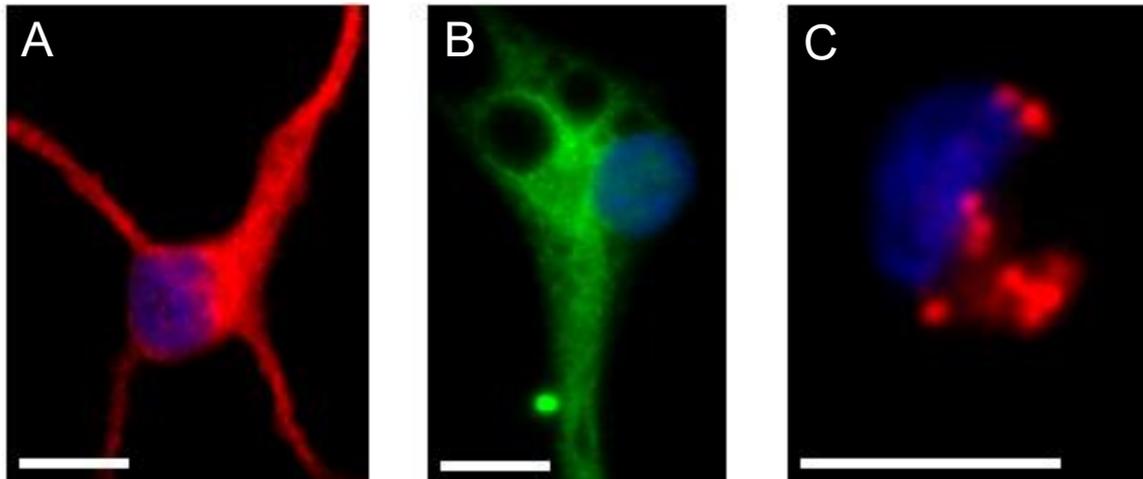
In Analogie zur Charakterisierung eines intrinsischen RAS im SFO, durchgeführt an neuro-glialen Primärkulturen der neonatalen Ratte (*Kap. ERG 3.2*), war es ein wichtiges Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, erstmalig an Hühnerküken stellvertretend für die Wirbeltierklasse der Vögel einige Aspekte eines intrinsischen RAS im Bereich des zum SFO analogen *Organum subseptale* (SSO) zu untersuchen. Dafür erfolgte zunächst die *de novo* Etablierung und Charakterisierung einer Primärzellkultur des gesamten Hypothalamus von Eintagsküken zur Optimierung der Kulturbedingungen für das neuro-gliale SSO. Dafür wurden die in *Kap. MM 2.3.2.5* und *2.3.2.6* beschriebenen Präparationstechniken verwendet und Primärzellkulturen des gesamten Hypothalamus und nachfolgend auch des SSOs früh postnataler Hühner etabliert. Nach viertägiger Inkubation, welche der Differenzierung der neuro-glialen Zellen diene, wurden diese für *in vitro* Studien wie Immunzytochemie und Fura-2 Ratio-Imaging herangezogen.

### **3.4.1 Immunzytochemische und funktionelle Charakterisierung einer neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Küken**

Die Versuche dieser Teilstudie dienten primär als Vorversuche für *in vitro* Untersuchungen am SSO des früh postnatalen Hühnergehirns. Zu diesem Zweck erfolgte die *de novo* Etablierung einer Primärzellkultur des gesamten Hypothalamus früh postnataler Küken nach der in *Kap. MM 2.3.2.5* dargestellten Präparationstechnik, um ideale Kulturbedingungen für die Differenzierung von Neuronen und Gliazellen aus dem Hühnergehirn zu ermitteln. Zur Minimierung der einzusetzenden Anzahl an Eintagsküken wurde die durch enzymatische und mechanische Dissoziation erhaltene Zellsuspension (*Kap. MM 2.3.2 und 2.3.2.5*) nach Erfassung der Zellzahl pro Volumeneinheit auf eine Zelldichte von durchschnittlich 50.000 Zellen pro Milliliter (ca. 17.500 Zellen pro „well“) verdünnt und nach vier Tagen Kultivierung für *in vitro* Studien herangezogen.

#### **3.4.1.1 Immunzytochemische Charakterisierung der neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Hühnerküken**

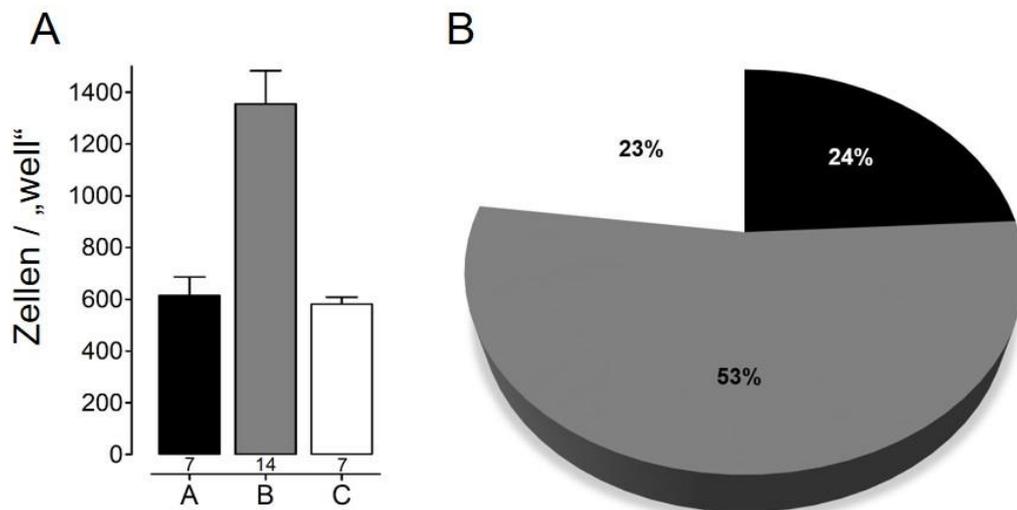
Unter Verwendung verschiedener Primärantikörper / -seren gegen zelltypspezifische Markerproteine wurden die in der neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Hühner vorkommenden Zelltypen charakterisiert. Dabei ergab sich zunächst die Situation, dass einige der gegen zelltypspezifische Markerproteine des Säugetiers eingesetzten Primärantikörper / -seren (*Kap. MM 2.5.3*) bei Primärzellkulturen von Vögeln keine oder nur eine geringe Wirksamkeit zeigten. Aus diesem Grund konnten lediglich Primärantikörper gegen Markerproteine für Neurone (MAP<sub>2a+2b</sub>), Astrozyten (GFAP) und Mikrogliazellen (KUL01) verwendet werden. Nicht identifizierbare Zellen mit dem Phänotyp klassischer Oligodendrozyten ließen sich nicht mit dem für Säugetiere spezifischen Antikörper gegen CNPase markieren. In 7 – 14 „wells“ aus vier Präparationen wurde der absolute und prozentuale Anteil an Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen immunzytochemisch bestimmt (*Abb. ERG 44*). Im arithmetischen Mittel ergaben sich pro „well“ der neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus  $614 \pm 72$  Neurone (24 %),  $1354 \pm 129$  Astrozyten (53 %) und  $582 \pm 27$  Mikrogliazellen (23 %) aller identifizierbaren Zellen (*Abb. ERG 43 und 44*).



**Abb. ERG 43: Immunzytochemische Charakterisierung der Zellen in der Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Küken**

- (A) Immunzytochemische Markierung für das Neuronen-spezifische Markerprotein MAP<sub>2a+2b</sub>. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub> Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™-gekoppeltes goat anti-mouse IgG verwendet (rot).
- (B) Indirekter Immunfluoreszenznachweis von Astrozyten mittels polyklonalem rabbit anti-GFAP Antiserum. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa@ 488-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (grün).
- (C) Immunzytochemischer Nachweis von Mikrogliazellen mittels monoklonalem mouse anti-KUL01 Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™-gekoppeltes goat anti-mouse IgG verwendet (rot).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 6,25 µm.



**Abb. ERG 44: Absoluter und prozentualer Anteil der immunzytochemisch charakterisierten Zelltypen in der neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus**

Der Nachweis der (A) absoluten und (B) prozentualen Anteile verschiedener Zelltypen in der Primärzellkultur des Hypothalamus von Eintagsküken wurde mittels Marker-spezifischer Antikörper / -seren durchgeführt: Neurone (A, 24 %); Astrozyten (B, 53 %); Mikrogliazellen (C, 23 %). Die Zahlen unter den Balken repräsentieren die Anzahl ausgewerteter Zellkultur „wells“.

### 3.4.1.2 Einsatz der Fura-2 Ratio-Imaging Technik zum Vitalitätsnachweis von Neuronen und Astrozyten in der neuro-glialen Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Hühnerküken

In dieser Teilstudie wurde die Fura-2 Ratio-Imaging Technik zur kontinuierlichen Erfassung der  $[Ca^{2+}]_i$  als Vitalitätsnachweis für Neurone und Astrozyten der *de novo* etablierten Primärzellkultur des Hypothalamus früh postnataler Küken eingesetzt. Außerdem diente sie der Unterscheidung der Vitalität nach unterschiedlichem enzymatischem Verdau mit Dispase I / Collagenase sowie Dispase I / Collagenase in einer Verdünnung von 1:2 und Dispase I-HBSS Gebrauchslösung. Der Versuch für ein „well“ dauerte dabei ca. 20 Minuten, wobei die Zellen zunächst mit GLUT in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M / L und final mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) superfusionsstimuliert wurden. Anschließend wurden die Zellen analog zum SFO der Säugetiere mittels 4 % PFA fixiert und unter Einsatz von Immunzytochemie eindeutig einem Zelltyp zugeordnet. Es wurden pro „well“ 15 – 30 Zellen mit minimalen Zell-zu-Zell Kontakten untersucht, wobei in die Endauswertung nur Neurone und Astrozyten eingingen, die folgende Kriterien erfüllten:

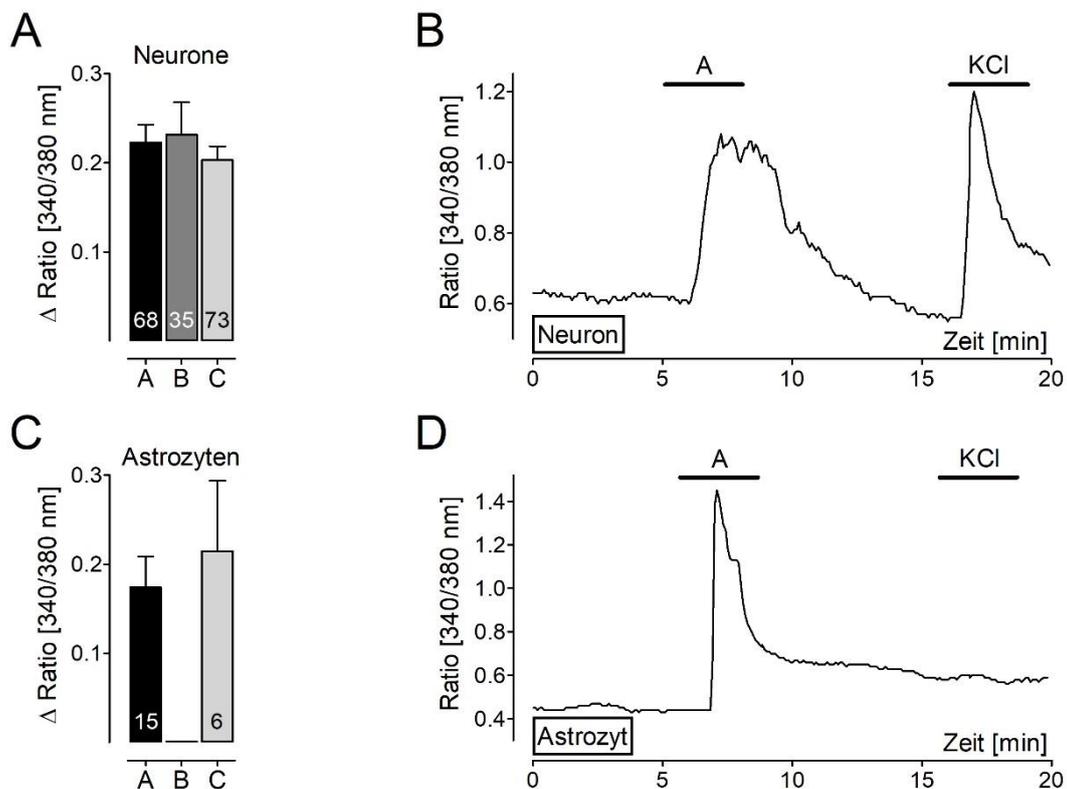
- I. Stabile Fluoreszenz Ratio-Werte des intrazellulären Fura-2 und damit eine stabile Basislinie.
- II. Erhöhung der ermittelten  $\Delta$ Ratio-Werte für Fura-2 nach Superfusionsstimulation mit GLUT von  $\geq 0,05$  gegenüber der Basislinie.
- III. Postexperimentelle immunzytochemische Identifikation der analysierten Zellen.

Für den ersten Versuchsansatz (Dispase I (5 mg / ml) / Collagenase (2,5 mg / ml)) wurden 143 Neurone und 92 Astrozyten in 12 „wells“ aus vier Präparationen analysiert. Von den untersuchten Neuronen reagierten 68 (48 %) auf eine Superfusionsstimulation mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) mit einem Anstieg ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,22 \pm 0,02$  (Abb. ERG 45 A). Zudem zeigten 15 (16 %) der 92 untersuchten Astrozyten eine Responsivität auf GLUT mit einer transienten Erhöhung ihrer 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,17 \pm 0,03$  (Abb. ERG 45 C).

Im zweiten Versuchsansatz (Dispase I / Collagenase in einer Verdünnung von 1:2) wurden neun „wells“ aus drei Präparationen analysiert. Dabei handelte es sich um 65 Neurone und 66 Astrozyten, wobei 35 (54 %) der analysierten Neurone auf die

Superfusionsstimulation mit GLUT mit einem intrazellulären Calciumsignal, bei  $\Delta$ Ratio-Werten von  $0,23 \pm 0,04$ , reagierten (Abb. ERG 45 A). Von den 66 untersuchten Astrozyten zeigte kein einziger eine GLUT Responsivität (Abb. ERG 45 C).

Der dritte Versuchsansatz (Dispase I-HBSS Gebrauchslösung) umfasste 129 Neurone und 76 Astrozyten in 12 „wells“ aus vier Präparationen. Von den analysierten Neuronen reagierten 73 (57 %) auf die Superfusionsstimulation mit GLUT mit einem Calciumsignal, respektive eine Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte auf  $0,20 \pm 0,02$  (Abb. ERG 45 A). Zudem zeigten von 76 untersuchten Astrozyten sechs und somit acht Prozent eine Responsivität auf die Superfusionsstimulation mit GLUT bei einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,22 \pm 0,08$  (Abb. ERG 45 C).



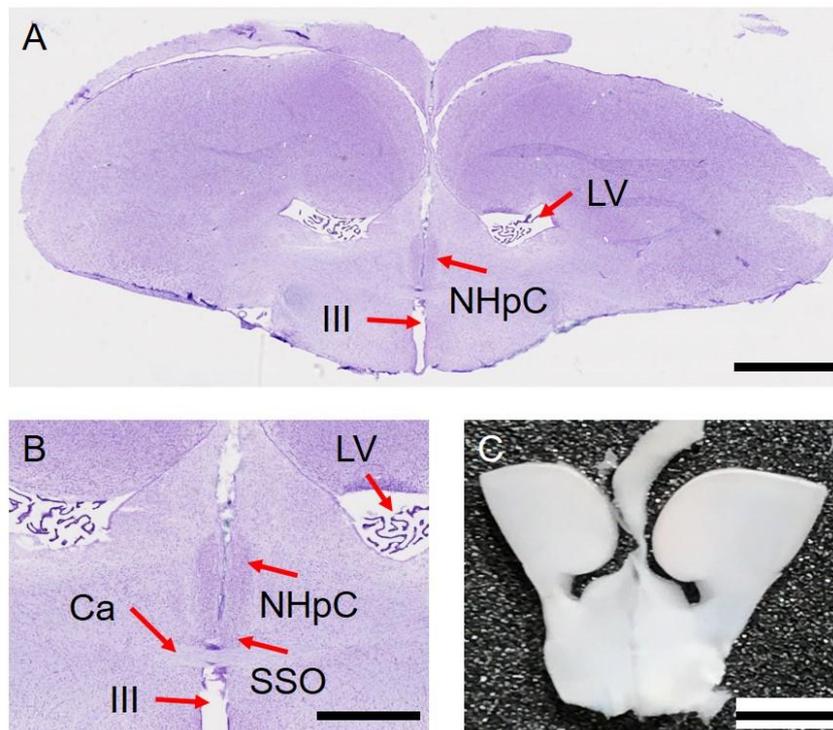
**Abb. ERG 45: Superfusionsstimulation der Primärzellkultur des Hypothalamus früh-postnataler Küken mit GLUT bei vogelspezifischer Körpertemperatur (39°C)**

In **A** und **C** sind die durchschnittlichen Erhöhungen der  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach Superfusionsstimulation mit GLUT ( $10^{-5}$  M / L) für drei enzymatische Dissoziationsprotokolle (A, B, C) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach Superfusionsstimulation. Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein Neuron (**B**) und einen Astrozyten (**D**) des ersten Versuchsansatzes (Dispase I / Collagenase) nach Superfusionsstimulation mit GLUT (A) sowie finaler Superfusionsstimulation mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Mit Hilfe statistischer Auswertungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen  $\Delta$ Ratio-Werten der GLUT responsiven Neurone und Astrozyten festgestellt werden, bei fehlender Responsivität der Astrozyten im zweiten Versuchsansatz. Die Entscheidung für Versuchsansatz 1 liegt darin begründet, dass sich in diesem Versuchsansatz am meisten Zellen, vor allem die Astrozyten betreffend, als GLUT responsiv erwiesen. *Abb. ERG 45 B und D* zeigen deshalb exemplarische Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte eines GLUT responsiven Neurons und Astrozyten aus dem ersten Versuchsansatz.

### 3.4.2 Immunzytochemische und funktionelle Charakterisierung einer Primärzellkultur des *Organum subseptale*

Die für den Gesamthypothalamus erarbeiteten Optimierungsschritte für die Etablierung einer neuro-glialen Primärkultur wurden auf die *de novo* Etablierung einer Primärzellkultur des *Organum subseptale* übertragen.

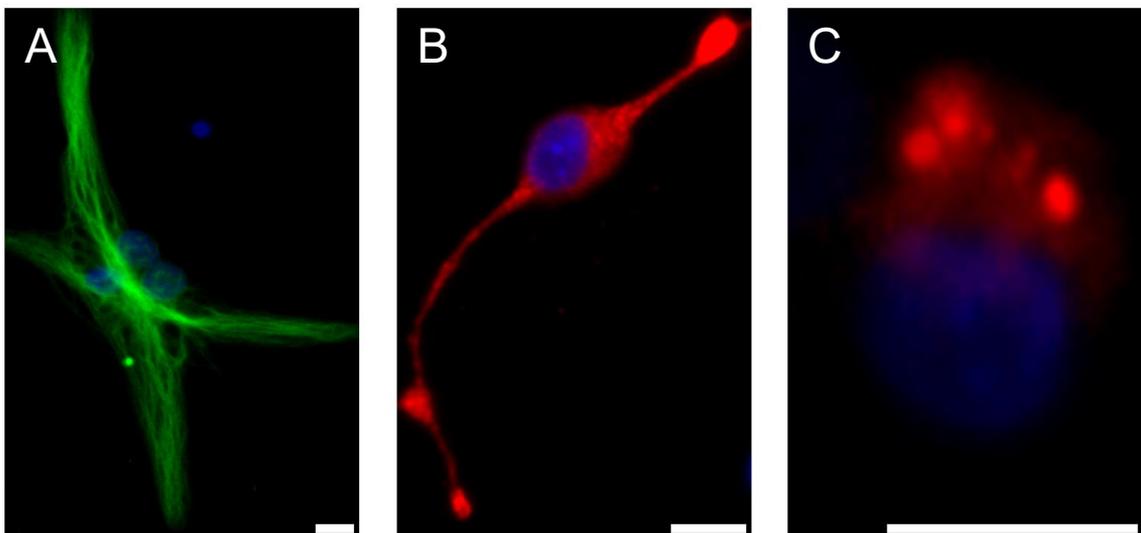


**Abb. ERG 46: Das Hühner-SSO als sensorisches zirkumventrikuläres Organ**

Neuroanatomische Lokalisation des SSOs in coronalen Gehirnschnitten neonataler Küken. Übersichtsansicht als Klüver-Barrera Färbung (**A**, Größenmarker entspricht 3 mm) sowie als nativer Hirnschnitt (**C**, Größenmarker entspricht 2,5 mm) des SSOs. (**B**) zeigt eine detaillierte Ansicht einer Klüver-Barrera Färbung des SSOs (Größenmarker entspricht 1 mm). Als *landmarks* für die Präparation des *Organum subseptale* (SSO) dienten der dritte Hirnventrikel (III), die lateralen Ventrikel (LV), der *Nucleus commissurae hippocampale* (NHpC) und die *Commissura anterior* (Ca).

Danach wurde die SSO-spezifische Primärzellkultur zunächst mittels Immunzytochemie hinsichtlich ihres Zelltypenprofils analysiert. In Fura-2 Ratio-Imaging Versuchen sollten analog zum SFO der Ratte Komponenten eines SSO-intrinsischen RAS funktionell erfasst werden. Dabei erfolgte eine Fokussierung auf das *angiotensin-converting enzyme* (ACE) und das Rezeptorprotein für ANG II. Zu diesem Zweck erfolgte eine *de novo* Etablierung einer Primärzellkultur des SSOs postnataler Eintagsküken nach dem in *Kap. MM 2.3.2.4* dargestellten Präparationsprotokoll. Wichtige Orientierungshilfen bei der Präparation des SSOs waren die *Commissurae anterior* und *hippocampale* sowie der dritte und die lateralen Hirnventrikel (*Abb. ERG 46*).

#### 3.4.2.1 Immunzytochemische Charakterisierung der neuro-glialen Primärzellkultur des *Organum subseptale* früh postnataler Hühnerküken

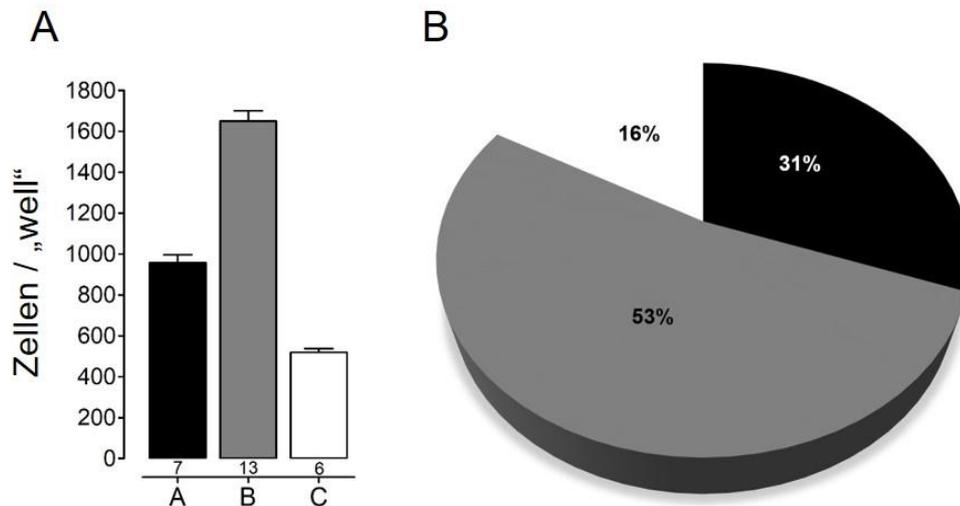


**Abb. ERG 47: Immunzytochemische Charakterisierung der Zellen in der Primärzellkultur des *Organum subseptale* früh postnataler Küken**

- (A) Indirekter Immunfluoreszenznachweis von Astrozyten mittels polyklonalem rabbit anti-GFAP Antiserum. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa® 488 –gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG eingesetzt (grün).
- (B) Immunzytochemische Markierung für das Neuronen-spezifische Markerprotein MAP<sub>2a+2b</sub>. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler mouse anti-MAP<sub>2a+2b</sub> Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™ –gekoppeltes goat anti-mouse IgG verwendet (rot).
- (C) Immunzytochemischer Nachweis von Mikrogliazellen mittels monoklonalem mouse anti-KUL01 Antikörper. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3™ –gekoppeltes goat anti-mouse IgG verwendet (rot).

Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Größenmarker entspricht 6,25 µm.

Zur Charakterisierung der in der *de novo* etablierten SSO-spezifischen Primärzellkultur vorkommenden Zelltypen sowie deren quantitative Erfassung wurden Primärantikörper / -seren gegen zelltypspezifische Markerproteine für Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen eingesetzt. In 7 -14 „wells“ aus vier Präparationen wurde der absolute und prozentuale Anteil an Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen immunzytochemisch ermittelt (Abb. ERG 48). Pro „well“ der SSO-spezifischen Primärkultur ergaben sich im arithmetischen Mittel  $957 \pm 39$  Neurone (31 %),  $1649 \pm 50$  (53 %) Astrozyten und  $519 \pm 18$  (16 %) Mikrogliazellen (Abb. ERG 47 und 48).



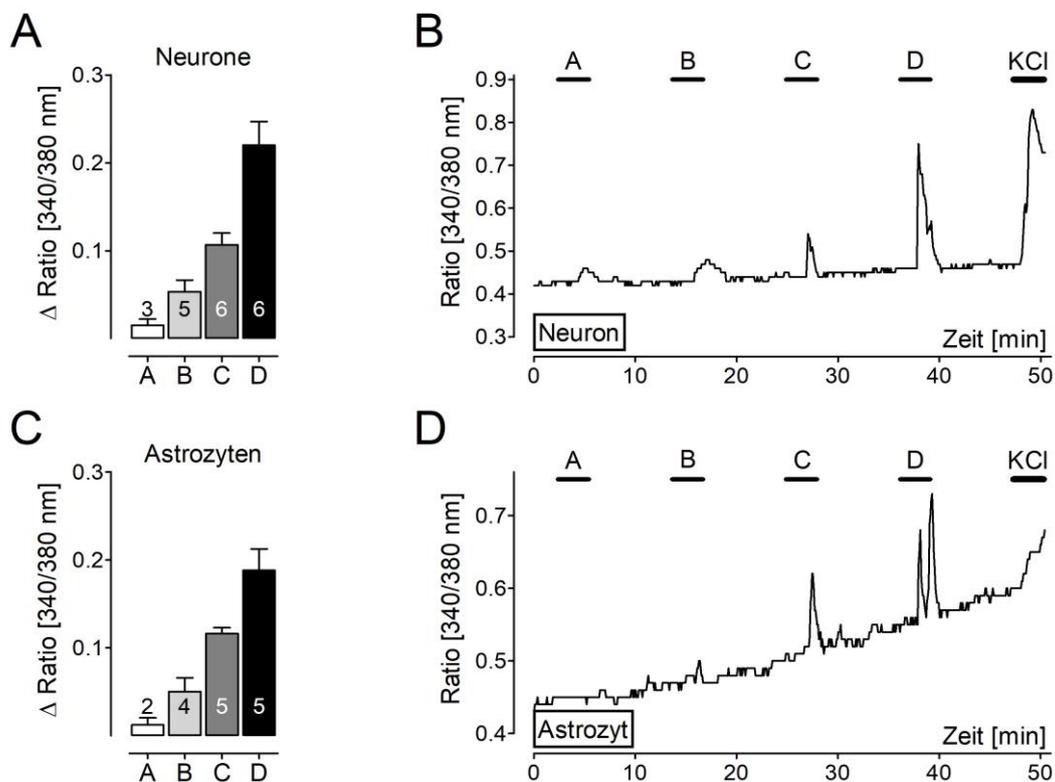
**Abb. ERG 48: Absoluter und prozentualer Anteil der immunzytochemisch charakterisierten Zelltypen in der neuro-glialen SSO-spezifischen Primärzellkultur**

Der Nachweis der (A) absoluten und (B) prozentualen Anteile verschiedener Zelltypen in der Primärzellkultur des *Organum subseptale* von Eintagsküken wurde mittels Marker-spezifischer Antikörper / -seren durchgeführt: Neurone (A, 31 %); Astrozyten (B, 53 %); Mikrogliazellen (C, 16 %). Die Zahlen unter den Balken repräsentieren die Anzahl ausgewerteter Zellkultur „wells“.

### 3.4.2.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung für ANG II Rezeptoren hinsichtlich intrazellulärer Calciumsignale

Ziel dieser Teilstudie war es, eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Superfusionsstimulation primärer Zellkulturen des aviären SSOs mit ANG II hinsichtlich der induzierten Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration zu erstellen. Aus diesem Grund wurden zwei „wells“ aus zwei Präparationen der SSO-spezifischen Primärzellkultur sequentiell mit vogelspezifischem ANG II in aufsteigender Konzentration ( $10^{-10}$  /  $10^{-9}$  /  $10^{-8}$  /  $10^{-7}$  M / L) superfusionsstimuliert (Kap. MM 2.4.6). Für die finale Auswertung wurden ausschließlich Zellen herangezogen, die im Zuge der letzten Superfusionsstimulation ( $10^{-7}$  M / L) mit einem Anstieg ihrer Fluoreszenz-Ratio-

Werte von  $\geq 0,05$  reagierten. Zeigten diese Zellen auf die vorherigen und zugleich niedriger konzentrierten Superfusionsstimulationen mit ANG II keine Responsivität ( $< 0,05$ ), so wurden deren  $\Delta$ Ratio-Werte als 0,01 in die Berechnung für die mittleren 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte einbezogen, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. In diesem Telexperiment wurden 50 Neurone und 37 Astrozyten auf ihre Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich ANG II getestet. Alle sechs ANG II responsiven Neurone (12 %) reagierten auf die ansteigenden Konzentrationen ( $10^{-10}$  –  $10^{-7}$  M / L) an ANG II mit einer zunehmenden Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,015 \pm 0,007$  ( $10^{-10}$  M / L) /  $0,05 \pm 0,01$  ( $10^{-9}$  M / L) /  $0,11 \pm 0,01$  ( $10^{-8}$  M / L) und  $0,22 \pm 0,03$  ( $10^{-7}$  M / L) (Abb. ERG 49 A).



**Abb. ERG 49: Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit vogelspezifischem ANG II in aufsteigender Konzentration (Dosisabhängigkeit) bei 39 °C**

In **A** und **C** sind die durchschnittlichen Erhöhungen der  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach Superfusionsstimulation mit vogelspezifischem ANG II in aufsteigenden Konzentrationen (A =  $10^{-10}$ , B =  $10^{-9}$ , C =  $10^{-8}$  und D =  $10^{-7}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen nach Superfusionsstimulation.

Exemplarische Aufzeichnungen der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein responsives Neuron (**B**) und einen responsiven Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit ANG II (A - D) in aufsteigenden Konzentrationen sowie finaler Superfusionsstimulation mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

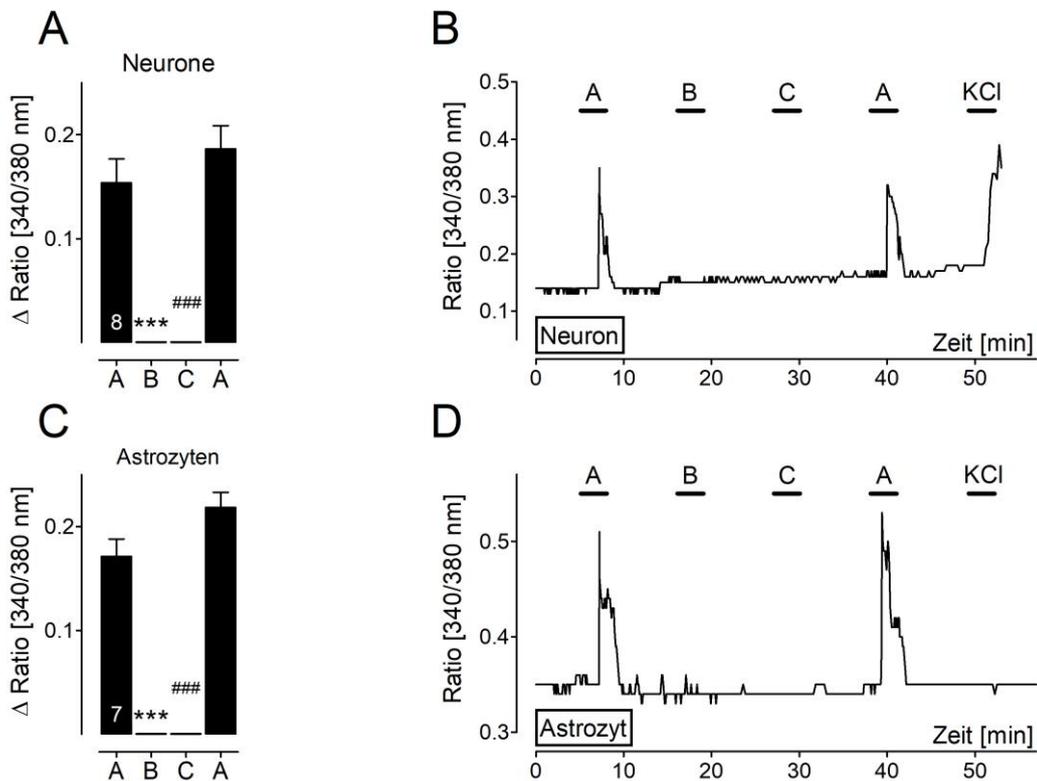
Auch für die Astrozyten konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für Superfusionsstimulationen mit ANG II in logarithmisch ansteigenden Konzentrationen festgestellt werden. In der Endauswertung zeigten sich fünf von 37 untersuchten Astrozyten (14 %) als ANG II responsiv. Die durchschnittlich ermittelten  $\Delta$ Ratio-Werte betragen dabei  $0,01 \pm 0,007$  ( $10^{-10}$  M / L) /  $0,05 \pm 0,02$  ( $10^{-9}$  M / L) /  $0,12 \pm 0,01$  ( $10^{-8}$  M / L) und  $0,19 \pm 0,02$  ( $10^{-7}$  M / L) (Abb. ERG 49 C).

In der neuro-glialen Primärzellkultur zeigten sowohl Neurone als auch Astrozyten eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung für ANG II und intrazelluläre Calciumsignale.

### **3.4.2.3 Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit Inhibitoren für ACE und den vogelspezifischen ANG II Rezeptor**

Mit diesem Vorversuch sollte ausgeschlossen werden, dass die spezifisch gegen ACE (Captopril) und den vogelspezifischen ANG II Rezeptor ( $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{ANG II}$ ) gerichteten Inhibitoren in Superfusionsstimulationsversuchen *per se* zu Calciumsignalen in Neuronen und Astrozyten der SSO-spezifischen Primärzellkultur führten. Zu diesem Zweck wurde das in Kap. MM 2.4.6 dargestellte Messprotokoll eingesetzt, wobei die Zellen der SSO-Zellkultur zunächst zur Detektion ANG II responsiver Zellen mit vogelspezifischem ANG II ( $10^{-7}$  M / L), nachfolgend mit den Inhibitoren Captopril und  $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{ANG II}$  (je  $10^{-5}$  M / L) sowie abschließend erneut mit vogelspezifischem ANG II sowie kaliumreichem Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone superfusionsstimuliert wurden. In drei „wells“ aus drei Präparationen wurden 61 Neurone und 55 Astrozyten analysiert. In die Endauswertung wurden acht Neurone (13,1 %) und sieben Astrozyten (12,7 %) aufgenommen, die auf die Superfusionsstimulationen mit vogelspezifischem ANG II mit einer Erhöhung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte um  $0,15 \pm 0,02$  respektive  $0,19 \pm 0,02$  reagierten (Abb. ERG 50 A). Superfusionsstimulationen mit den beiden Inhibitoren führten hingegen zu keinen intrazellulären Calciumsignalen (Abb. ERG 50 A). Die ANG II responsiven Astrozyten zeigten auf die Superfusionsstimulationen mit vogelspezifischem ANG II eine Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,17 \pm 0,02$  und  $0,22 \pm 0,01$  (Abb. ERG 50 C). Auch bei den Astrozyten führte die alleinige Superfusion mit den beiden Inhibitoren zu keinen intrazellulären Calciumsignalen (Abb. ERG 50 C).

Die statistische Auswertung zeigte, dass zwischen den Superfusionsstimulationen mit vogelspezifischem ANG II und den Inhibitoren allein hoch signifikante Unterschiede für die  $\Delta$ Ratio-Werte bestanden. *Abb. ERG 50 B* und *D* zeigen exemplarische Einzelbespiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte für je ein Neuron und einen Astrozyten.



**Abb. ERG 50: Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit vogelspezifischem ANG II und Inhibitoren gegen ACE und ANG II Rezeptor**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach Superfusionsstimulation mit vogelspezifischem ANG II ( $10^{-7}$  M / L) (A) und den Inhibitoren Captopril (B) und  $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{ANG II}$  (C) (jeweils  $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnung der 340 / 380 nm Fluoreszenz Ratio-Signale für ein Neuron (**B**) und einen Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit vogelspezifischem ANG II (A) und den Inhibitoren Captopril (B) und  $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{ANG II}$  (C) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitaltest für Neurone.

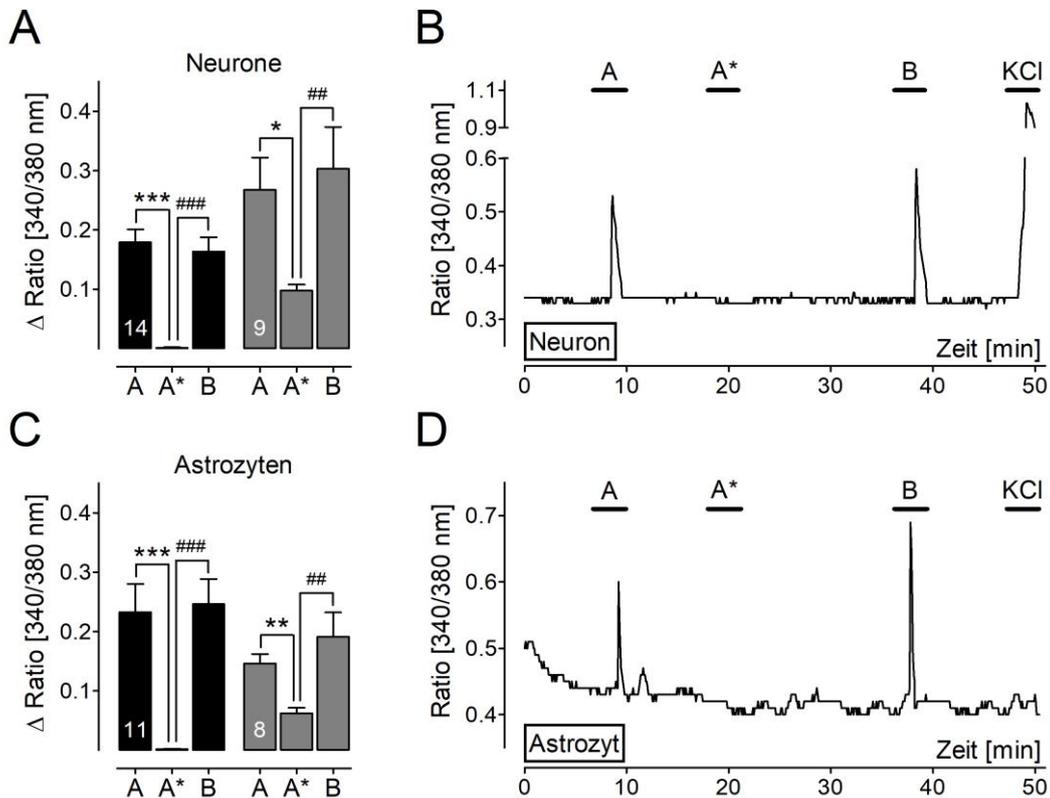
#### 3.4.2.4 Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit Angiotensin I und dem *angiotensin-converting enzyme* spezifischen Inhibitor Captopril

In dieser Teilstudie sollte die funktionelle Expression des für die Bildung von SSO-intrinsischem ANG II essentiellen Schlüsselenzyms ACE nachgewiesen werden. Dafür wurden in 12 „wells“ aus drei Präparationen der SSO-spezifischen Primärkultur insgesamt 283 Neurone und 156 Astrozyten analysiert und auf ihre Responsivität gegenüber vogelspezifischem ANG I und II sowie die funktionelle Expression von ACE untersucht. Vogelspezifisches ANG I unterscheidet sich als Substrat des ACE in drei von zehn Aminosäuren vom ANG I der meisten Säugetiere. Nach dem in *Kap. MM 2.4.6* dargestellten Messprotokoll wurden die Zellen zunächst mit [Asn<sup>1</sup>,Val<sup>5</sup>,Gly<sup>9</sup>]ANG I ( $10^{-6}$  M / L), anschließend in Kombination mit dem spezifischen ACE Inhibitor Captopril ( $10^{-5}$  M / L), mit vogelspezifischem ANG II ( $10^{-7}$  M / L) und final mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) superfundiert.

Von 283 untersuchten Neuronen zeigten 31 (11 %) und von 156 untersuchten Astrozyten 23 (15 %) eine Responsivität auf die Superfusionsstimulation mit ANG I mit einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,23 \pm 0,03$  respektive  $0,19 \pm 0,03$ . Unter Einsatz des spezifischen ACE Inhibitors Captopril konnte bei 14 (45 %) der responsiven Neurone das Calciumsignal vollständig unterdrückt werden, wohingegen bei neun Neuronen (29 %) das Calciumsignal partiell und bei acht Neuronen (26 %) vollständig erhalten blieb (*Abb. ERG 51 A*). Die vollständig inhibierten Neurone zeigten auf die Superfusionsstimulation mit ANG I eine Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,18 \pm 0,02$  und auf ANG II von  $0,16 \pm 0,02$ . Die beim Einsatz von ANG I in Anwesenheit von Captopril partiell inhibierten Neurone zeigten auf die Superfusionstimulation mit ANG I eine Erhöhung der 340 / 380 nm  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,27 \pm 0,05$  und in Anwesenheit von Captopril von  $0,09 \pm 0,01$  sowie auf ANG II von  $0,30 \pm 0,07$  (*Abb. ERG 51 A*).

Bei den 23 ANG I responsiven Astrozyten wiesen 11 (48 %) bei einer Superfusionsstimulation mit ANG I und Captopril eine vollständige Inhibition der Calciumsignale auf, wohingegen Captopril das Calciumsignal bei acht (35 %) Astrozyten partiell und bei vier (17 %) nicht inhibierte. Die 11 vollständig inhibierten Astrozyten reagierten auf die Superfusionsstimulation mit ANG I mit einer Erhöhung der  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,23 \pm 0,05$  und auf die Superfusionsstimulation mit ANG II von  $0,25 \pm 0,04$  (*Abb.*

ERG 51 C). Die partiell inhibierten Astrozyten reagierten auf die Superfusionsstimulation mit ANG I mit einer Steigerung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,15 \pm 0,02$ , in Anwesenheit von Captopril von  $0,06 \pm 0,01$  und auf die Superfusionsstimulation mit ANG II von  $0,19 \pm 0,04$ .



**Abb. ERG 51: Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit aviärem Angiotensin I in An- und Abwesenheit des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation (39 °C) mit aviärem ANG I ( $10^{-6}$  M / L) in Ab- (A) und Anwesenheit (A\*) des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril ( $10^{-5}$  M / L) sowie vogelspezifischem ANG II ( $10^{-7}$  M / L) (B) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %), graue Balkendiagramme mit partieller (20 – 80 %) Signalunterdrückung in Anwesenheit des Inhibitors. Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen. Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit vogelspezifischem ANG I in Ab- (A) und Anwesenheit (A\*) des ACE-spezifischen Inhibitors Captopril, mit aviärem ANG II (B) sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

Mittels statistischer Auswertung konnte folglich für die vollständig sowie partiell inhibierten Neurone und Astrozyten signifikante Unterschiede der Erhöhung hinsichtlich der  $\Delta$ Ratio-Werte bei Superfusionsstimulation mit bzw. ohne den spezifischen ACE

Inhibitor Captopril konstatiert werden. *Abb. ERG 51 B* und *D* zeigen exemplarisch Einzelbeispiele für den Zeitverlauf der Fluoreszenz-Ratio Werte jeweils eines durch Captopril vollständig inhibierten Neurons und Astrozyten.

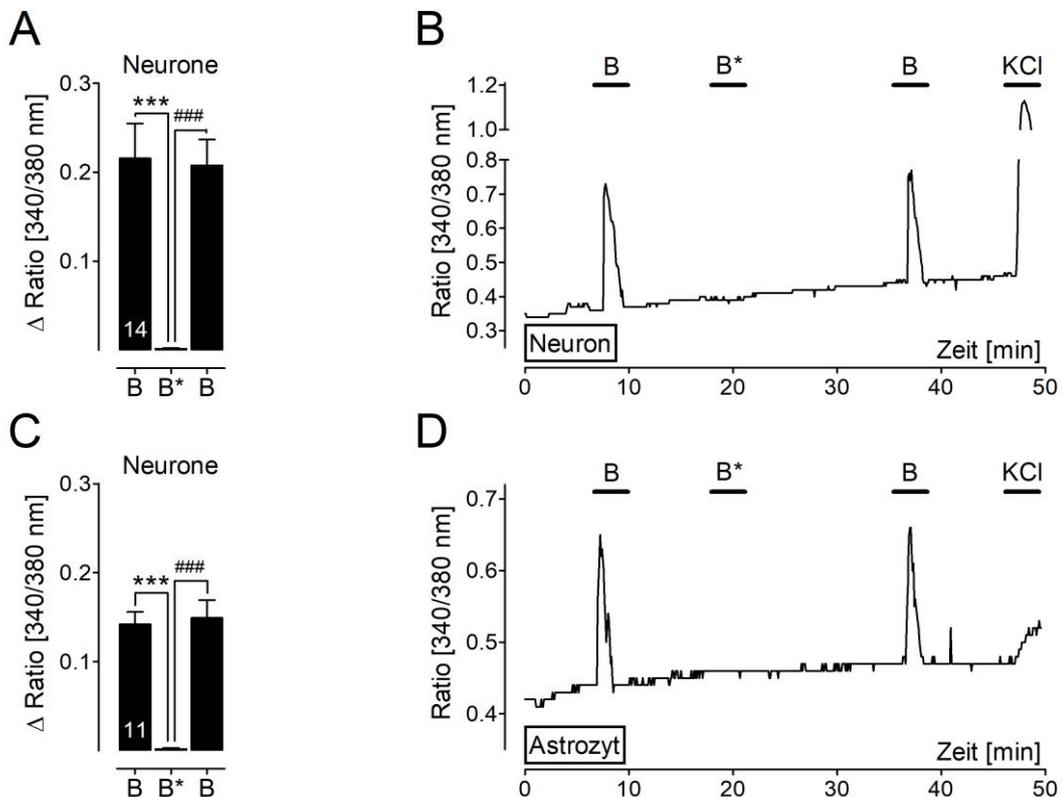
#### **3.4.2.5 Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit aviärem Angiotensin II und dem spezifischen Angiotensin-Rezeptor Antagonisten [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]ANG II**

Bis *dato* ist die Struktur des aviären ANG II Rezeptors noch nicht vollständig bekannt. Andererseits kann dieser Rezeptor funktionell – und vergleichbar zum Säugetier – mit [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]ANG II kompetitiv gehemmt werden. Ziel dieser Teilstudie war es daher, ANG II responsive Zellen in der SSO-spezifischen Primärzellkultur zu identifizieren und die Expression eines funktionellen, vogelspezifischen ANG II Rezeptors nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen des SSOs zunächst mit vogelspezifischem [Val<sup>5</sup>]ANG II ( $10^{-7}$  M / L), anschließend mit ANG II und dem Rezeptor Antagonisten [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]ANG II ( $10^{-7}$  respektive  $10^{-5}$  M / L), erneut mit ANG II und final mit kaliumreichem Messpuffer (50 mM / L) als Vitalitätstest für Neurone stimuliert. Aus drei Präparationen (sieben „wells“) gingen nach den in *Kap. ERG 3.2.1* beschriebenen Kriterien 116 Neurone und 102 Astrozyten in die Datenauswertung ein.

Von allen analysierten Zellen erwiesen sich 16 Neurone (14 %) und 12 Astrozyten (12 %) als responsiv auf beide Superfusionsstimulationen mit vogelspezifischem ANG II. Die ANG II responsiven Neurone reagierten dabei mit mittleren  $\Delta$ Ratio-Werten von  $0,22 \pm 0,04$  respektive  $0,21 \pm 0,03$  (*Abb. ERG 52 A*). Dabei kam es bei 14 (88 %) dieser Neurone in Anwesenheit von [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]ANG II zu einer vollständigen Inhibition der ANG II induzierten intrazellulären Calciumsignale (*Abb. ERG 52 A*). Die 12 ANG II responsiven Astrozyten zeigten auf die Superfusionsstimulationen mit vogelspezifischem ANG II eine Änderung ihrer  $\Delta$ Ratio-Werte von  $0,14 \pm 0,01$  und  $0,15 \pm 0,02$  (*Abb. ERG 52 C*). Bei Superfusion mit ANG II in Anwesenheit von [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]ANG II konnte bei 11 (92 %) der Astrozyten eine vollständige Inhibition der Calciumsignale nachgewiesen werden (*Abb. ERG 52 C*).

Im Rahmen der statistischen Auswertungen wurde folglich für die vollständig inhibierten Neurone und Astrozyten hoch signifikante Unterschiede für die  $\Delta$ Ratio-Werte zwischen der Superfusionsstimulation in An- bzw. Abwesenheit von [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]ANG II festgestellt. In *Abb. ERG 52 B* und *D* sind exemplarisch Einzelbeispiele für den

Zeitverlauf der Fluoreszenz Ratio-Werte jeweils eines durch  $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{ANG II}$  vollständig inhibierten Neurons und Astrozyten dargestellt.



**Abb. ERG 52: Superfusionsstimulation der SSO-spezifischen Primärzellkultur mit aviärem Angiotensin II in An- und Abwesenheit des Rezeptor Antagonisten  $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{ANG II}$**

In **A** und **C** sind die Erhöhungen der Fura-2  $\Delta$ Ratio-Werte für Neurone (**A**) und Astrozyten (**C**) nach sequentieller Superfusionsstimulation ( $39^\circ\text{C}$ ) mit aviärem ANG II ( $10^{-7}$  M / L) in Ab- (B) und Anwesenheit (B\*) des Rezeptor Antagonisten  $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{ANG II}$  ( $10^{-5}$  M / L) als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  S.E.M dargestellt. Statistisch vergleichende Datenanalyse mittels one-way ANOVA in Kombination mit nicht-parametrischem Kruskal-Wallis Test und Dunn's post-hoc Test; [\* / # P < 0,05; \*\* / ## P < 0,01; \*\*\* / ### P < 0,001]. Schwarze Balkendiagramme repräsentieren jeweils Zellpopulationen mit nahezu vollständiger (> 80 %). Die Zahlen innerhalb der Balken repräsentieren jeweils die Anzahl der responsiven Zellen.

Exemplarische Aufzeichnungen der intrazellulären Calciumsignale eines Neurons (**B**) und Astrozyten (**D**) nach Superfusionsstimulation mit vogelspezifischem ANG II in Ab- (B) und Anwesenheit (B\*) des Rezeptor Antagonisten  $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]\text{ANG II}$  sowie final mit kaliumreichem (KCl) Messpuffer als Vitalitätstest für Neurone.

In den Studien des *Kap. ERG 3.4* konnte gezeigt werden, dass neuro-gliale Primärzellkulturen des Hypothalamus und SSOs von Eintagsküken Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen beinhalten. Zudem wurde eruiert, dass Neurone und Astrozyten einer Primärzellkultur des Hypothalamus GLUT responsiv sind. SSO-spezifische Neurone und Astrozyten zeigten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für ANG II Rezep-

toren hinsichtlich intrazellulärer Calciumsignale und es konnte die funktionelle Expression des RAS Schlüsselenzyms ACE sowie des aviären ANG II Rezeptorproteins nachgewiesen werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Das intrinsische Renin-Angiotensin System (RAS) im Subfornikal- und Subseptalorgan des Säugetiers bzw. Vogels

Für die zentralnervöse Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie der Kreislaufregulation spielt Gehirn-intrinsisches Angiotensin II im Säugetier-SFO und Vogel-SSO eine wichtige Rolle. Für die Untersuchung und Charakterisierung SFO- und SSO-intrinsischer RAS-Komponenten bietet sich vor allem die neuro-gliale Primärzellkultur *in vitro* an. Diese bietet die Möglichkeit, funktionelle und morphologische Eigenschaften einzelner kultivierter Zellen zu untersuchen, wobei Einflüsse durch äußere oder zirkulierende Faktoren reduziert bzw. ausgeschlossen werden können. In vorangegangenen Studien wurden neuro-gliale Primärzellkulturen neonataler Ratten bereits für das SFO und andere Hirngebiete (MnPO, ARC, OvLT, AP) etabliert [642, 643, 646–650, 653, 658]. Die dort gewonnen Erkenntnisse wurden für die in *Kap. MM 2.3.2.1* beschriebene Präparation einer SFO-spezifischen Primärzellkultur der Ratte genutzt. Die Präparation der vogelspezifischen Primärzellkultur (*Kap. MM 2.3.2.2*) erfolgte hingegen *de novo*. Der Einsatz einer Primärzellkultur *in vitro* gewährt im Vergleich zu *in vivo* Studien zusätzlich den Vorteil, dass eine Beeinflussung der Zellkultur durch im Blut zirkulierende RAS-Komponenten ausgeschlossen werden kann. Vorhandene RAS-Komponenten (Aogen, Renin, ACE), welche aus dem Blut in das SFO bzw. SSO aufgenommen worden sein könnten, wurden zudem durch viele Waschschriffe während der Präparation entfernt (*Kap. MM 2.3.2*). Auch ein Nachweis für Endothelzellen, welche bestimmte RAS-Komponenten (ACE) produzieren, konnte in der SFO-spezifischen Primärzellkultur nicht erbracht werden (*Kap. ERG 3.1.1*). Die Zellkultur bietet außerdem den Vorteil, dass die Zellen eines spezifischen Hirngebietes (SFO / SSO) vollständig separiert vorliegen, dementsprechend afferente Konnektivitäten aus anderen Hirngebieten (MnPO, ARC, PVN, NTS, PBN), welche einen angiotensinergen Input ins SFO bzw. SSO senden, ausgeschlossen werden können [20, 140, 159–162].

Aus unterschiedlichen Gründen wurden bei der Präparation sowohl der SFO- als auch SSO-spezifischen Primärzellkultur neonatale Ratten bzw. Hühner verwendet. Neuro-gliale Zellen der neonatalen Ratte (Tag vier bis sechs) oder des Huhns (Tag eins) eignen sich für die Kultivierung besonders, da sie sich in dem Zellkultursystem

nach Auflösen des Gewebeverbandes noch differenzieren. Dies bietet in der Primärzellkultur den Vorteil, dass sich die einzeln kultivierten Neurone und Gliazellen binnen drei bis fünf Tagen differenzieren und somit eine vergleichbare Morphologie und Funktionalität wie *in vivo* aufweisen. Des Weiteren sind während der Ontogenese bereits Komponenten eines intrinsischen RAS in einigen Gehirnregionen nachweisbar. So wurde Aogen in Hirngebieten wie dem SFO, OvLT und der ME am 16. bis 18. Tag der Fetalentwicklung in Astrozyten detektiert [363]. Der Angiotensin-Rezeptor AT<sub>1A</sub>R wurde in verschiedenen Kerngebieten wie MnPO, OvLT, PVN und NTS ab dem 19., im SFO ab dem 21. Tag der Fetalentwicklung nachgewiesen [484].

#### 4.1.1 SFO-intrinsische Komponenten des RAS

Wie bereits in *Kap. EIN 1.3.2* beschrieben, haben zahlreiche Arbeitsgruppen Hinweise für ein Gehirn- respektive SFO-intrinsisches RAS gefunden. Auch in der hier vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Expression und funktionelle Charakterisierung verschiedener RAS-Komponenten in einer neuro-glialen SFO-Primärzellkultur untersucht (*Kap. ERG 3.2*). Im Folgenden werden die dort gewonnen Ergebnisse kritisch beleuchtet, wobei jede der analysierten RAS-Komponenten (Aogen, Renin, ACE, andere Proteasen, ANG II) einzeln diskutiert wird. Trotz zahlreicher Hinweise auf ein Gehirn-intrinsisches RAS wird seine Existenz kontrovers diskutiert [725]. Gründe dafür sind vor allem, dass einige der RAS-Komponenten auf Proteinebene nur in geringem Maße nachweisbar sind, und somit eine von der Peripherie unabhängige Bildung von ANG II im Gehirn in Frage gestellt wird [725].

Die Bedeutung von Hirn-intrinsisch gebildetem Aogen für die zentrale Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes sowie der Kreislaufregulation wurde in diversen Studien nachgewiesen. So führte die genetische Ablation des Aogen-Gens in Mäusen zu einer Verminderung des durch zentrale Renin-Applikation ausgelösten Blutdruckanstiegs [385]. Außerdem wurde, vor allem mittels *in situ* Hybridisierung, Aogen mRNA in hypothalamischen bzw. medullären Kerngebieten wie dem MnPO, OvLT, ARC, der AP sowie in höchster Dichte dem SFO detektiert [362, 372, 373, 376, 386–388]. Es wird jedoch auch kontrovers diskutiert, ob die im Gehirn vorkommenden Aogen Konzentrationen hoch genug sein können, um zur intrinsischen Biosynthese von ANG II beizutragen [725]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde Aogen in der SFO-spezifischen Primärzellkultur mittels quantitativer *real-time* PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen (*Kap. ERG 3.2.3*). Der exprimierende Zelltyp konnte dabei

nicht identifiziert werden. Dennoch liefert der Nachweis der Aogen mRNA in SFO-spezifischen Primärkulturen einen weiteren deutlichen Hinweis für SFO-intrinsisch gebildetes Aogen, da die SFO-Zellkultur wie in *Kap. DIS 4.1* beschrieben durch viele Waschschriffe vermutlich frei von zirkulierendem Aogen war. Des Weiteren kann durch die Art der Zellkulturpräparation weitestgehend ausgeschlossen werden, dass andere als SFO-spezifische Zellen in der Primärkultur vorhanden waren (*Kap. MM 2.3.2.1 und 2.6.2*). Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene wurden Astrozyten als wichtigster Zelltyp für die Biosynthese und Sezernierung von Aogen in den Extrazellulärraum der jeweiligen Gehirnregion identifiziert [335, 353, 358, 359, 369, 374, 378, 379, 381, 383, 388]. Neben Astrozyten wurde von einigen Autoren auch beschrieben, dass Neurone in der Lage sind Aogen zu bilden [353, 375, 377]. Mittels Immunzytochemie konnte Aogen in der hier vorliegenden Arbeit auf Proteinebene primär in Vimentin-positiven, GFAP-negativen Zellen nachgewiesen werden (*Kap. ERG 3.2.2.1*). Vimentin ist ein Typ-3 Intermediärfilament, welches in Zellen mesenchymalen Ursprungs vorkommt. Dazu zählen innerhalb von Nervengewebe vor allem die Ependymzellen und Tanyzyten. Tanyzyten gehen aus Ependymzellen hervor und schützen durch ihre *gap junctions* neuro-hämale Regionen ohne BHS, wie sie im SFO vorliegen. Somit sind Tanyzyten, und nicht Astrozyten oder Neurone, der Aogen exprimierende Zelltyp in der SFO-spezifischen Primärzellkultur (*Kap. ERG 3.2.2.1*). Dabei ist zu beachten, dass im ZNS auch teilungsfähige Astroglia-vorläuferzellen vorhanden sind, die das Intermediärfilament Vimentin anstelle des klassischen GFAPs exprimieren [726–728]. Somit ist nicht eindeutig zu sagen, ob es sich bei den Aogen bildenden Zellen in der SFO-spezifischen Primärzellkultur um Tanyzyten oder um Vimentin-positive Astroglia-vorläuferzellen handelte. Mit Sicherheit kann nur gesagt werden, dass weder Neurone noch voll differenzierte Astrozyten Aogen im SFO-intrinsischen RAS exprimierten.

Für den Nachweis von Aogen in Zellen der SFO-Primärzellkultur wurden zwei unterschiedliche Antiseren verwendet (*Kap. MM 2.5.3 und 2.5.4*). Zum einen wurde ein in der AG Gerstberger entwickeltes polyklonales Antiserum gegen humanspezifisches Aogen, zum anderen ein kommerziell erhältliches polyklonales Antiserum gegen rattenspezifisches Aogen eingesetzt (*Kap. MM 2.5.3*). Mittels präexperimenteller Absorptionsstudien mit rekombinanten humanen Aogen konnten die Signale des in der AG Gerstberger hergestellten Antiserums unterdrückt werden. Dieses Antiserum markierte *in toto* jedoch weniger Zellen als jenes gegen rattenspezifisches Aogen

(Kap. ERG 3.2.2.1). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die mit dem Antiserum gegen rattenspezifischen Aogen (Aminosäuren 25 - 477) erzielten Ergebnisse die zelluläre Expression von Aogen im rattenspezifischen SFO widerspiegeln (Abb. ERG 18). Neben der Funktion im SFO-intrinsischen RAS weisen einige Studien darauf hin, dass Aogen darüber hinaus auch Aufgaben im Rahmen der Immunmodulation, des Energiestoffwechsels und der Entwicklung des Gehirns übernimmt [363, 729, 730]. So wurde Aogen bereits am 16. bis 18. Tag der Fetalentwicklung im Gehirn nachgewiesen und könnte somit an der Differenzierung des Gehirns beteiligt sein [363]. Dies bestätigt die zuvor beschriebene Theorie, dass es sich bei Aogen-immunopositiven Zellen in SFO-spezifischen Primärkulturen um Astroglia-vorläuferzellen handeln könnte [728].

Renin, welches das Dekapeptid ANG I von Aogen abspaltet, konnte im Gehirn vor allem nach seiner transgenen Expression in Mäusen sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten verschiedener Hirnregionen nachgewiesen werden [370, 390, 391, 394, 398]. Dabei ist zu beachten, dass die Konzentration an Renin mRNA im Gehirn allgemein sehr gering war, weshalb seine Gehirn-intrinsische Produktion kontrovers diskutiert wird [353, 355, 357, 358, 365, 725]. Demnach ist es eher wahrscheinlich, dass im Blut zirkulierendes Renin in das Parenchym des Gehirns aufgenommen wird [399], und dass im Gehirn detektierbares Renin dem im Blut zirkulierenden entspricht [731]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Expression der mRNA für Renin mittels quantitativer *real-time* PCR in der SFO-spezifischen Primärzellkultur nachgewiesen werden (Kap. ERG 3.2.3). Dabei ist jedoch zu beachten, dass auch in diesen SFO-spezifischen Zellkulturen die Expression von Renin mRNA im Vergleich zu ACE, Aogen und Cathepsin D sehr gering war (Abb. ERG 26). Insofern bestätigen die Daten der hier vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der Fachliteratur. Allerdings ist es für die in dieser Studie eingesetzte SFO-Primärzellkultur, anders als in der Fachliteratur beschrieben [399, 731], unwahrscheinlich, dass zirkulierendes Renin aufgenommen wurde (Kap. DIS 4.1), weshalb postuliert werden kann, dass die hier nachgewiesene Renin mRNA zur Bildung SFO-intrinsischen Renins gedient haben könnte. Mittels Calcium-Imaging Studien konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine ANG I bildende Aktivität von Renin in der SFO-spezifischen Zellkultur gezeigt werden (Kap. ERG 3.2.1.2). Dabei wurde als Renin Inhibitor Aliskiren verwendet, welches bei i.c.v. Applikation den durch injiziertes Renin induzierten Anstieg der ANG II Konzentration in der CSF verminderte [396, 397]. Ein Vorteil des Calcium-Imagings ist

es, dass neben Neuronen auch andere Zelltypen analysiert werden können. So wurde in Versuchen der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Renin sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten für die Umwandlung von Aogen in ANG I verantwortlich gewesen sein könnte (*Abb. ERG 12*). Ob oder in welchem Ausmaß Renin dabei intrazellulär Aogen in ANG I umwandeln konnte ist fraglich. Für eine intrazelluläre Konversion müsste das sehr große Präkursorprotein Aogen internalisiert worden sein, was unwahrscheinlich erscheint. Es gab auch wenige reaktive Zellen, die mittels Immunzytochemie weder Neuronen noch Astrozyten zugeordnet werden konnten. Bei diesen Zellen könnte es sich um Mikrogliazellen, Oligodendrozyten oder Tanyzyten gehandelt haben. Da andere Arbeitsgruppen Aogen und Renin in benachbarten Zellen des SFOs gefunden haben, besteht die Möglichkeit, dass Renin und Aogen von diesen Zellen sezerniert werden und die Bildung von ANG I extrazellulär stattfindet [387].

Neben der klassischen Form des Renins, wurde in der Literatur eine alternative, Gehirn-intrinsische Form mit verändertem ersten Exon beschrieben [356, 395, 399–403]. Es gibt bislang nur wenige Erkenntnisse zum alternativen Renin, es könnte jedoch an der intrazellulären ANG II Bildung in Mitochondrien beteiligt sein [404]. Dementsprechend ist es möglich, dass es sich bei enzymatisch aktivem Renin in Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur um die alternative Form des Renins handeln könnte, und ANG I auch intrazellulär gebildet wird. Wie in *Kap. EIN 1.3.2* beschrieben, wird auch die Beteiligung von Prorenin und seinem Rezeptor (PRR) an der SFO-intrinsischen Bildung von ANG I kontrovers diskutiert [359, 380]. Dabei wurde vor allem die Expression von PRR in Neuronen und Gliazellen nachgewiesen, wobei dieser durch Prorenin Bindung katalytische Aktivität erhält und den MAPK-Signalweg aktiviert [406, 407]. Die Bindung von Prorenin an seinen Rezeptor führte im Vergleich zu Renin zu einer vierfach höheren Konversion von Aogen zu ANG I [360]. Die Beteiligung von Prorenin und PRR an kardiovaskulären Aufgaben des Gehirns ist jedoch fraglich, da Prorenin im Gehirn nicht nachweisbar war [359, 725]. In Studien dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Prorenin und PRR nicht beleuchtet. Eine Beteiligung beider am SFO-intrinsischen RAS kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Im SFO der Ratte konnte angiotensin-converting enzyme (ACE) auf mRNA-Ebene, immunhistochemisch oder durch die Bindung eines radioaktiv markierten Inhibitors detektiert werden [357, 386, 410, 411, 413–416]. Dabei handelte es sich primär um

den Subtyp ACE1 (*Kap. EIN 1.3.2*), welches vom Dekapeptid ANG I das Oktapeptid ANG II abspaltet, das anschließend an seinen Rezeptor bindet und eine Signalkaskade auslöst (*Kap. EIN 1.3.2*). ACE1 konnte dabei in Neuronen und auch nicht-neuronalen Zellen detektiert werden [359, 379, 413]. Trinkwasserentzug bei der Ratte für 48 Stunden führte ebenso wie gesteigerte Na<sup>+</sup>-Konzentrationen in der CSF und i.c.v. Applikationen von Leptin zu einer Steigerung der ACE1 im SFO [409, 417, 419, 732]. Dies unterstreicht zum einen die Bedeutung SFO-intrinsischen ACE1 bei der Regulation des Blutdrucks und der ionalen Plasmazusammensetzung [409, 417], zum anderen scheint SFO-intrinsisches ACE1 auch eine Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes zu spielen [732]. Andere Autoren haben auch die Expression von ACE2 innerhalb des SFOs beschrieben [426, 733]. Die Beteiligung von ACE2 am Gehirn-intrinsischen RAS ist zwar bis *dato* umstritten, jedoch weist die Detektion des Rezeptors für das ACE2 spezifische Endprodukt ANG (1-7) (Mas-Rezeptor) im SFO auch auf mögliche Beeinflussungen des Hirn-RAS durch ACE2 hin [424–426, 733]. ACE2 hat vasodilatatorische Wirkungen und könnte somit einen Gegenspieler zu ACE1 darstellen [427]. Andere Autoren bringen ACE2 als Schlüsselenzym für die ANG II Bildung ins Spiel [423]. In der hier vorliegenden Promotionsarbeit wurde ausschließlich die Expression von ACE1 in SFO-spezifischen Zellen mittels Calcium-Imaging, Immunzytochemie und quantitativer *real-time* PCR untersucht (*Kap. ERG 3.2.1.4, 3.2.2.3 und 3.2.3*).

Die ANG II bildende Aktivität von ACE1 in der SFO-Primärzellkultur konnte in Calcium-Imaging Studien der hier vorliegenden Arbeit unter Zuhilfenahme des ACE Inhibitors Captopril nachgewiesen werden (*Kap. ERG 3.2.1.4 und Abb. ERG 14*). Captopril inhibierte bei Applikation in das SFO zum einen die Wasseraufnahme, zum anderen unterdrückte es die Entladungsrate von SFO-Neuronen nach ANG I Applikation [420, 421]. In den hier vorliegenden Studien ist tendenziell nicht davon auszugehen, dass ACE1 aus der Zirkulation aufgenommen werden konnte (*Kap. DIS 4.1*). Es konnte gezeigt werden, dass eine biologisch aktive Form des ACE1 sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten für die Bildung von reaktivem ANG II verantwortlich sein könnte (*Abb. ERG 14*). Ob oder inwieweit eine Internalisierung von ANG I zur intrazellulären Bildung von ANG II dabei stattgefunden haben könnte bleibt fraglich. Weiterhin ist zu beachten, dass, die Astrozyten betreffend, keine Zellen gefunden wurden, in welchen es in Anwesenheit von Captopril zu keiner oder einer partiellen Inhibition kam (*Abb. ERG 14*). Deshalb könnte es sein, dass in Astrozyten

*per se* ACE1 für die ANG II Bildung verantwortlich ist. Alternativ könnte es sein, dass durch Zufall in keinem der analysierten „wells“ ein Astrozyt als *region of interest* markiert wurde, welcher durch Captopril eine Inhibition erfahren hätte. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass Neurone, Astrozyten oder andere Zellen ACE1 sezernieren, sodass extrazellulär die Bildung von ANG II erfolgt, welches anschließend auto-/parakrin seine Wirkungen entfaltet. Hier ist fraglich, wie ACE1 in der Primärzellkultur während ständiger Superfusion seine Wirkung entfalten konnte ohne abgeschwemmt zu werden.

Mittels immunzytochemischer Analysen konnte nukleär lokalisiertes ACE1 in primär Vimentin-positiven, GFAP-negativen Zellen (Tanzzyten oder Astrozytenvorläuferzellen) und Neuronen gefunden werden (*Kap. ERG 3.2.2.3* und *Abb. ERG 22* und *Abb. ERG 23*). In differenzierten, GFAP-positiven Astrozyten konnte ACE1 nur in geringem Maße detektiert werden (*Abb. ERG 22*). Diese Beobachtung deckt sich mit Angaben in der Literatur, in welcher ACE1 im MnPO ebenfalls in GFAP-negativen Astrozyten (ggf. Astrozytenvorläuferzellen) nachgewiesen wurde [734].

Die Expression von ACE1 in Zellkernen von SFO-spezifischen Zellen kann mit dem in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Antiserum erklärt werden (*Kap. MM 2.5.3*). Dieses polyklonale Antiserum ist spezifisch für den Aminosäurenabschnitt 334 bis 409 des rekombinaten ACE1. Ein sehr ähnlicher Aminosäureabschnitt (330 bis 429) des ACE1 zeigte auch in glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Mesangialzellen eine nukleäre Translokation [735, 736]. Vermutlich kam es also auf der Plasmamembran von Astrozytenvorläuferzellen und Neuronen (geringgradig Astrozyten) der SFO-Primärzellkultur, ähnlich den Endothelzellen, zur Proteolyse von ACE1 und Internalisierung von Fragmenten in den *Nucleus* dieser Zellen [737]. Auf mRNA-Ebene konnte in der hier vorliegenden Arbeit die Expression von ACE1 mittels quantitativer *real-time* PCR in der SFO-spezifischen Zellkultur detektiert werden (*Kap. ERG 3.2.3*). Dabei wurde ACE1 auf mRNA-Ebene im Vergleich zu anderen Komponenten (Renin, Chymasen) mit einer sehr starken Expressionsdichte nachgewiesen (*Abb. ERG 26*). Der exprimierende Zelltyp konnte nicht identifiziert werden. Es ist jedoch aufgrund der wahrscheinlichen Abwesenheit von zirkulierenden Faktoren (*Kap. DIS 4.1*) davon auszugehen, dass es sich um SFO-intrinsische ACE1 mRNA gehandelt haben könnte. Abschließend kann konstatiert werden, dass der funktionelle Nachweis für ACE1 in der SFO-spezifischen Primärzellkultur mittels Calcium-Imaging Studien der hier vorliegenden Arbeit erbracht wurde. Zudem konnte

ACE1 auf Protein- und mRNA-Ebene in der SFO-spezifischen Primärkultur nachgewiesen werden, wobei ACE1 auf Proteinebene vor allem in Astrozytenvorläuferzellen / Tanyzyten und Neuronen detektiert wurde.

Andere Proteasen (Chymasen, Cathepsine, Tonin, Kallikrein, Elastase-2) scheinen im Gehirn-intrinsischen RAS neben den klassischen Enzymen (Renin, ACE) ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Bildung von biologisch aktivem ANG II zu spielen [365, 428, 438, 440] (*Kap. EIN 1.3.2*). Dabei sind Chymasen, Cathepsin G und Tonin von gesteigertem Interesse, da ihre Expression im Gehirn und ihre Beteiligung an der Bildung von ANG II nachgewiesen wurde [355, 358, 434, 437]. Auch Cathepsin D wurde im Rattengehirn detektiert, und könnte eine Rolle in einem Gehirn-intrinsischen RAS spielen [738–740]. Andere Autoren diskutieren die Rolle von Cathepsin D kritisch, da es hauptsächlich intrazellulär in Lysosomen zu finden war [340]. In Versuchen der hier vorliegenden Arbeit wurde mittels Calcium-Imaging und quantitativer *real-time* PCR zum einen die funktionelle Expression anderer Proteasen, zum anderen die Expression spezifischer mRNA für diese Enzyme untersucht (*Kap. ERG 3.2.1.3* und *3.2.3*). In Calcium-Imaging Studien wurde der für die meisten der oben genannten Proteasen (Chymasen, Cathepsine, Elastase-2, Tonin) spezifische Inhibitor Chymostatin eingesetzt [429, 430, 444]. Dabei wurde in diesem Teilexperiment der hier vorliegenden Arbeit lediglich die Beteiligung dieser Enzyme an der direkten Konversion von Aogen zu reaktivem ANG II untersucht (*Kap. ERG 3.2.1.3*). Aus den in *Kap. DIS 4.1* genannten Gründen war es unwahrscheinlich, dass im Blut zirkulierende Proteasen in der SFO-Primärkultur vorhanden waren. Es wurde in diesen Versuchen gezeigt, dass in etwa der Hälfte aller Neurone und Astrozyten Proteasen wie Chymasen und Cathepsine für eine direkte Konversion von Aogen in ANG II verantwortlich zu sein schienen (*Kap. ERG 3.2.1.3* und *Abb. ERG 13*). Ob diese Konversion intrazellulär oder nach Sekretion der Proteasen extrazellulär stattgefunden hat, war mittels dieser Versuche nicht abschließend zu klären. Dabei erscheint es als unwahrscheinlich, dass Aogen die Zellmembran permeieren konnte. Ebenso könnte es sein, dass andere Zelltypen als Astrozyten oder Neurone, z.B. Oligodendrozyten, Tanyzyten oder Mikrogliazellen, Chymasen und Cathepsine freisetzen, welche anschließend extrazellulär ANG II aus Aogen bilden, wobei hier fraglich ist, inwieweit diese Enzyme in einem permanent superfundierten Zellkultursystem fungieren konnten. Auch in der Literatur wurde beschrieben, dass ANG II extrazellulär gebildet und

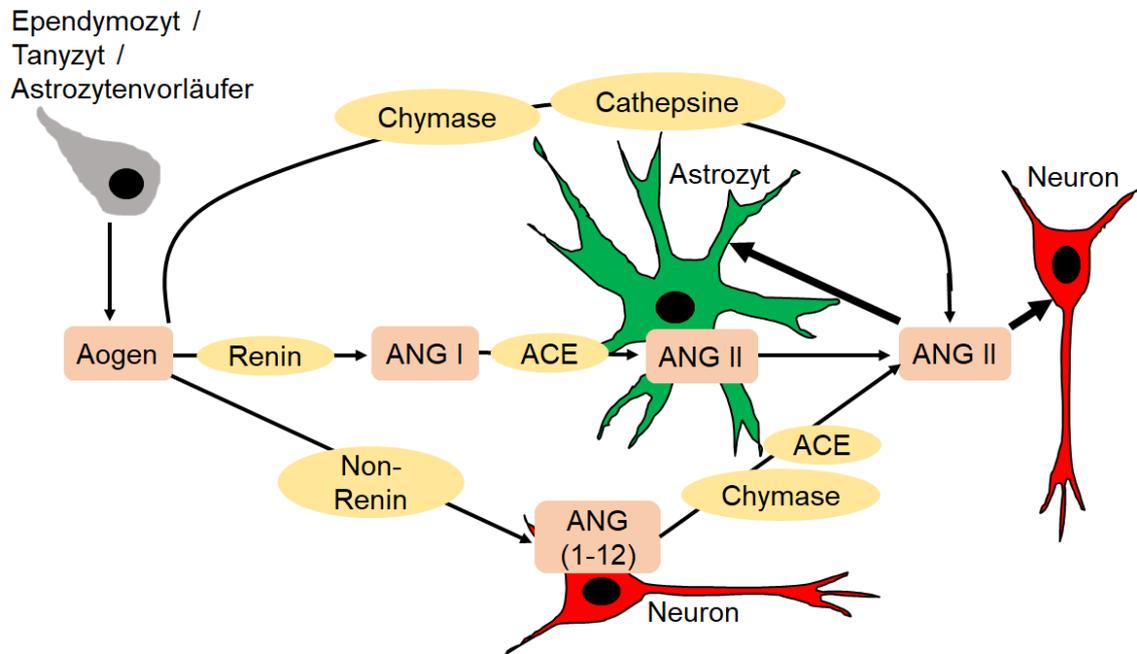
durch Rezeptor-Internalisierung aufgenommen wird bzw. direkt auto- / parakrin auf Zellen wirkte [340].

Der Subtyp der Cathepsine (D / G), welcher im SFO-intrinsischen RAS für die Bildung von ANG II aus Aogen verantwortlich ist, konnte mittels der Calcium-Imaging Versuche nicht identifiziert werden. Da Cathepsin D laut Literatur intrazellulär in Lysosomen vorkommt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um Cathepsin G handelte [340, 738]. Mittels PCR wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Expression verschiedener Proteasen auf mRNA-Ebene untersucht (*Kap. MM 2.6.4*). Dabei stellte sich heraus, dass vor allem Cathepsin D mRNA in der SFO-spezifischen Primärzellkultur nachweisbar war (*Abb. ERG 26*). Chymasen mRNA war hingegen nur in sehr geringem Umfang detektierbar (*Abb. ERG 26*). Der Grund für die hohe Expressionsdichte von Cathepsin D mRNA in der SFO-spezifischen Primärkultur könnte darin liegen, dass die Zellen mittels Lyse aufgebrochen wurden und dementsprechend auch intrazelluläre Komponenten in der PCR ermittelbar waren (*Kap. MM 2.6.2*). Inwieweit Cathepsin D an der Bildung von SFO-intrinsischem ANG II beteiligt war, war abschließend nicht vollständig zu klären, es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass Cathepsin D eine Rolle spielte [738]. Allerdings bleibt offen, ob **(a)** Aogen die Zellmembran permeieren konnte und **(b)**, ob Cathepsin D freigesetzt werden konnte, da es bis *dato* lediglich intrazellulär gefunden wurde [738]. Andere Proteasen wie Tonin, welches in Astrozyten detektiert wurde [440], aber auch Trypsin, Kallikrein und Elastase-2 wurden in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Wobei vor allem die Beteiligung von Elastase-2 und Tonin an der SFO-intrinsischen ANG II Bildung nicht ausgeschlossen werden kann, da beide ebenfalls von Chymostatin inhibiert werden [355, 429, 430, 436].

Ein Nachweis für Gehirn-intrinsisch gebildetes ANG II und anderer Angiotensin-Neuropeptide erfolgte für das rattenspezifische SFO mittels immunzytochemischer Verfahren und dem Einsatz transgener Tiere [20, 270, 421, 467, 478, 479] (*Kap. EIN 1.3.2*). Dabei wurden vor allem zur *de novo* Synthese von ANG II befähigte Neurone im Bereich des rattenspezifischen SFO *anulus* beschrieben [368, 420, 421, 470, 476]. ANG II Immunreaktivitäten konnten in diesen Neuronen primär in Axonen und Nervenendigungen, aber auch in Dendriten, Perikaryen und Vesikeln festgestellt werden [413, 472]. Andere Autoren haben hingegen auch ANG II immunopositive Astrozyten im SFO beschrieben [490, 491]. Die ANG II Bildung erfolgte demnach

extrazellulär nach vorheriger Sekretion von Aogen, Renin und ACE mit anschließender Aufnahme von ANG II durch Neurone und Astrozyten [355, 358, 365]. Alternativ könnte Aogen aufgenommen und durch intrazellulär gebildetes Renin und ACE zu ANG II umgewandelt werden, welches im Anschluss mittels anterograden Transportes zum Axonende transportiert und dort als Neurotransmitter verwendet wird [358, 400, 403]. Andere Arbeitsgruppen stellten die intrazelluläre Bildung von ANG II in Neuronen in Frage [382].

Im Rahmen der hier vorliegenden Promotionsarbeit wurde mittels Immunzytochemie versucht, ANG II in Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur nachzuweisen (*Kap. ERG 3.2.2.2*). Dabei wurde ein in der AG Gerstberger hergestelltes polyklonales Antiserum gegen humanes ANG II nach vorheriger Charakterisierung (*Abb. ERG 20*) verwendet (*Kap. MM 2.5.4*). Durch diese Charakterisierung konnte die Spezifität dieses Antiserums nachgewiesen werden. ANG II spezifische Immunoreaktivität konnte in perinukleären Vesikeln vor allem in GFAP-immunopositiven Astrozyten (ca. 70 %), aber auch in GFAP-immunonegativen, Vimentin-positiven Tanyzyten oder Astrozytenvorläuferzellen (ca. 30 %) nachgewiesen werden (*Kap. ERG 3.2.2.2* sowie *Abb. ERG 21*). In Neuronen hingegen konnten, obwohl in der Literatur mannigfaltig beschrieben, keine ANG II immunopositiven Vesikel identifiziert werden. Da die immunzytochemischen Signale in Astrozyten und Tanyzyten / Astrozytenvorläuferzellen mittels präexperimenteller Absorptionsstudien inhibiert werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein spezifisches Signal gehandelt haben könnte. Der negative immunzytochemische Nachweis von ANG II in Neuronen stellt diese Spezifität allerdings in Frage. In Calcium-Imaging Studien dieser Arbeit zeigten ca. 18 % der Neurone und 10 % der Astrozyten eine Responsivität für ANG II (*Kap. ERG 3.2.1.2 bis 3.2.1.6*). *Summa summarum* waren dementsprechend etwa 28 % der getesteten SFO-spezifischen Zellen ANG II responsiv. Dieser prozentuale Anteil an ANG II responsiven Zellen deckte sich mit Befunden anderer Arbeitsgruppen, welche in Calcium-Imaging Versuchen an SFO-Zellen neonataler Ratten eine Responsivität von ca. 25 % aller untersuchten Zellen auf ANG II nachweisen konnten [477].



**Abb. DIS 1: Schematische Darstellung des in der hier vorliegenden Promotionsarbeit erarbeiteten SFO-intrinsischen RAS**

Mittels Immunzytochemie konnten Tanyzyten / Ependymozyten / Astrozytenvorläuferzellen als Aogen freisetzender Zelltyp detektiert werden. Aogen wird extrazellulär entweder durch Chymasen und Cathepsine in reaktives ANG II umgewandelt, oder durch Renin in ANG I konvertiert, welches anschließend extrazellulär oder intrazellulär in Astrozyten mittels ACE zu ANG II konvertiert wird. Des Weiteren kann Aogen durch ein bisher unbekanntes Enzym zum Präkursorprotein ANG (1-12) werden, welches mittels Immunzytochemie in Neuronen nachweisbar war, und durch Chymasen / Cathepsine und ACE in reaktives ANG II umgewandelt wurde. ANG II führte sowohl bei Neuronen als auch bei Astrozyten zu Calciumsignalen.

Die für diese Aktivierung von SFO-Zellen verantwortlichen ANG II Rezeptoren wurden in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht (*Kap. EIN 1.3.2*), da in vorangegangenen Studien der AG Gerstberger der im SFO verantwortliche Rezeptor für ANG II bereits als  $AT_1R$  identifiziert wurde [368]. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass neben diesem klassischen ANG II Rezeptorprotein auch alternative Bindungsstellen für ANG II wie z.B.  $AT_4R$  [482], der ANG (1-7) spezifische Mas-Rezeptor [482], Neurolysin [741] oder der Protonen-Rezeptor GPR4 [742] eine Rolle im SFO-intrinsischen RAS spielen könnten.

#### 4.1.2 Angiotensin (1-12) im Subfornikalorgan des Säugetiers

Das 2006 entdeckte Angiotensin Präkursorpeptid Angiotensin (1-12) wurde in verschiedenen Geweben wie Herz, Nieren, aber auch dem Gehirn nachgewiesen [359, 449, 457] (*Kap. EIN 1.3.2*). Dabei wurde ANG (1-12) in der Blutbahn nach exogener Infusion durch ACE, nicht jedoch durch Chymasen oder Renin, in biologisch aktives

ANG II umgewandelt [460, 461]. In der Niere und dem Herzen der Ratte inhibierte Chymostatin die Bildung von ANG II aus ANG (1-12) [462]. In diesen Organen waren dementsprechend v.a. Chymasen und Cathepsine für die ANG II Generierung verantwortlich [453, 455]. Für das Gehirn der Ratte (NTS, RVLM, PVN) konnte nachgewiesen werden, dass sowohl eine ACE- als auch Chymasen-Aktivität für die Bildung von ANG II aus ANG (1-12) von Bedeutung waren [438, 447, 449, 458]. ANG (1-12) wurde dementsprechend in reaktives ANG II konvertiert, welches anschließend über den AT<sub>1</sub>R zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden führte [447, 463, 465].

In der hier vorliegenden Promotionsarbeit sollte zum einen mittels Calcium-Imaging Versuchen nachgewiesen werden, dass ANG (1-12) im Säuger-SFO ein funktionelles Präkursorpeptid für ANG II ist, zum anderen sollten in diesen Versuchen die ANG (1-12) umwandelnden Enzyme charakterisiert werden (*Kap. MM 2.4.6*). Da es als unwahrscheinlich gilt, dass Renin an der Bildung von ANG II aus ANG (1-12) beteiligt ist, wurden in diesen Versuchen Chymostatin und Captopril für die Inhibition von Chymasen / Cathepsinen und ACE eingesetzt (*Kap. MM 2.4.6*). Es konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass ANG (1-12) in SFO-spezifischen Primärzellkulturen der Ratte als funktionelles Präkursorpeptid fungiert (*Kap. ERG 3.2.1.5 und 3.2.1.6*). Des Weiteren erfolgte der Nachweis, dass in etwa der Hälfte aller SFO-spezifischen Neurone und Astrozyten Chymasen und Cathepsine für die Bildung von biologisch aktivem ANG II verantwortlich waren, wohingegen in der anderen Hälfte aller Zellen ACE die Umwandlung von ANG (1-12) induzierte (*Abb. ERG 15 und 16*). Da es unwahrscheinlich war, dass diese Enzyme aus der Zirkulation aufgenommen wurden (*Kap. DIS 4.1*), musste es sich um SFO-intrinsisch gebildete Enzyme handeln. Bezüglich der Chymasen und Cathepsine ist es wahrscheinlich, dass Cathepsine, in diesem Fall Cathepsin D, und nicht Chymasen für die ANG II Bildung aus ANG (1-12) verantwortlich waren. Der Grund dafür liegt in der hohen Expressionsdichte von Cathepsin D mRNA und der niedrigen Expressionsdichte von Chymasen mRNA in der SFO-spezifischen Primärzellkultur (*Kap. ERG 3.2.3.1*). Dies steht im Widerspruch zu Angaben in der Fachliteratur, in welcher im Gehirn neben ACE vor allem Chymasen für die Konversion von ANG (1-12) verantwortlich gemacht wurden [380, 438, 447, 449, 461]. Ob die Umwandlung von ANG (1-12) zu ANG II in der SFO-spezifischen Zellkultur dabei intrazellulär nach Aufnahme von ANG (1-12) und intrazellulärer Bildung der Enzyme, oder extrazellulär nach Freisetzung aller benötigten Komponenten stattgefunden hat, konnte mittels dieser Versuche nicht abschließend

geklärt werden. Inwiefern bzw. ob die Konversion von ANG (1-12) in ANG II dabei intrazellulär vonstatten ging bleibt fraglich. Auch eine extrazelluläre Konversion scheint möglich, wobei kritisch diskutiert werden muss, ob die Enzyme bei ständiger Superfusion im Zellkultursystem verbleiben würden. Auch wurde nicht untersucht, inwieweit andere Enzyme, wie Neprilysin, welches ANG (1-12) in ANG (1-7) und ANG (1-4) umwandelt, an einem SFO-intrinsischen RAS beteiligt sein könnten [743].

Mittels immunzytochemischer Analysen in der hier vorliegenden Arbeit wurde ANG (1-12) in Neuronen der SFO-Primärzellkultur detektiert (*Kap. ERG 3.2.2.4* und *Abb. ERG 24*). Dementsprechend bestehen mehrere Möglichkeiten, wie es dazu kommen könnte. Zum einen könnte ANG (1-12) durch Neurone gebildet, in den Extrazellulär-raum freigesetzt und dort in biologisch aktives ANG II konvertiert werden, welches anschließend auto- / parakrine Wirkungen entfaltet oder durch Rezeptor-Internalisierung in Zellen aufgenommen wird. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass ANG (1-12) nach vorheriger Freisetzung durch andere Zellen (Astrozyten, Tanyzyten, Oligodendrozyten) in Neurone aufgenommen, dort intrazellulär in reaktives ANG II umgewandelt und nach anterogradem Transport zum Axonende als Neurotransmitter verwendet wird. Ein Indiz für letztere Möglichkeit ist der immunzytochemische Nachweis von ACE in Neuronen (*Kap. ERG 3.2.2.3*).

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass ANG (1-12) im SFO-intrinsischen RAS ein wichtiges Präkursorpeptid für die ANG II Bildung darstellt, dass vor allem Cathepsin D und ACE für diese Umwandlung verantwortlich zu sein scheinen, und dass SFO-spezifische Neurone an diesem Prozess beteiligt sein könnten. ANG (1-12) könnte eine entscheidende Rolle bei der Bildung von biologisch aktivem ANG II spielen, da seine Konzentrationen in anderen Hirngebieten (NTS) deutlich höher sind als jene von ANG I [449, 458]. Andere Autoren berichteten, dass ANG (1-12) auch im Herzen ein effektiveres Substrat für die ANG II Bildung darstellt als ANG I [453, 455].

#### **4.1.3 Angiotensin II bedingte nukleäre Translokation proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren in Zellen des SFOs**

Der *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) ist ein proinflammatorischer Transkriptionsfaktor, welcher durch Bindung von Zytokinen an ihre Rezeptoren aktiviert wird [744]. Dabei kommt es zunächst zur Phosphorylierung von Tyrosin

in der intrazellulären Janus- und Tyrosinkinase 2, welche anschließend ihr Substrat STAT3 phosphorylieren und zu einer nukleären Translokation mit anschließender Expression von Zielgenen durch STAT3 führen [744]. Die Aktivierung von STAT3 führt in diesem Fall (Zytokin-Bindung) zur Induktion von Hirn-kontrollierten Krankheitssymptomen wie Fieber, Apathie, Anorexie und anderen [745]. Neben Zytokinen ist auch ANG II in der Lage durch Bindung an seinen G-Protein gekoppelten Rezeptor (AT<sub>1</sub>R) eine nukleäre Translokation von STAT3 in verschiedenen Geweben auszulösen [500, 501, 507, 724, 746]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine nukleäre Translokation von STAT3 nach vorheriger ANG II Stimulation (10<sup>-6</sup> M / L) in Astrozyten detektiert werden (*Kap. ERG 3.2.2.5*).

Auch in der Literatur wurde eine nukleäre Translokation von STAT3 nach vorheriger ANG II Stimulation vor allem in Astrozyten beschrieben [507]. Dabei kam es durch Aktivierung des AT<sub>1</sub>R nach zuvor beschriebener STAT3-Aktivierung zur Phosphorylierung des p62-Proteins, welches einen *nuclear pore complex* bildet, durch welchen STAT3 in den *Nucleus* transloziert [724]. Die Rolle, welche eine ANG II bedingte STAT3-Aktivierung einnimmt, wird bis *dato* kontrovers diskutiert. Es könnte jedoch am ANG II induzierten Zellwachstum von Astrozyten beteiligt sein, oder zu einer Sekretion von Interleukin-6, einem proinflammatorischen Zytokin, führen [501, 505–507]. In Versuchen der hier vorliegenden Promotionsarbeit führte lediglich eine Stimulation mit ANG II der Konzentration 10<sup>-6</sup> M / L zu einer nukleären Translokation von STAT3. Stimulationen mit ANG II der Konzentration 10<sup>-7</sup> M / L, mit ANG (1-12) (10<sup>-6</sup> M / L) und PBS hingegen bewirkten keine Aktivierung von STAT3 (*Kap. ERG 3.2.2.5* und *Abb. ERG 25*). Die fehlende nukleäre Translokation von STAT3 durch ANG (1-12) kann so erklärt werden, dass ANG (1-12) innerhalb der SFO-spezifischen Primärzellkultur zwar in biologisch aktives ANG II konvertiert werden könnte (*Kap. ERG 3.2.1.5* und *3.2.1.6*), die Konzentration des resultierenden ANG II jedoch nicht für eine STAT3-Aktivierung auszureichen scheint. Darauf deutet auch die fehlende nukleäre Translokation von STAT3 durch ANG II der Konzentration 10<sup>-7</sup> M / L hin (*Kap. ERG 3.2.2.5*). Abschließend lässt sich sagen, dass eine Stimulation von SFO-spezifischen Zellen mit ANG II in hohen Konzentrationen zu einer nukleären Translokation des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors STAT3 führte (*Abb. ERG 25*). Die physiologische Bedeutung dieser Aktivierung wurde in diesen Versuchen allerdings nicht weiter untersucht.

#### 4.1.4 Die *de novo* Etablierung vogelspezifischer Primärzellkulturen

Das *Organum subseptale* des Vogels stellt das Analogon zum SFO der Säugetiere dar. Nachdem nachgewiesen wurde, dass bei Vögeln der wichtigste Faserzug des limbischen Systems (*Fornix*) fehlt, wurde es als *Organum subseptale* (SSO) bezeichnet [5] (*Kap. EIN 1.1.2*). Das SSO liegt etwa auf der Mittellinie der *Commissura anterior* und reicht von dort bis zum ventralen Anteil des *Nucleus commissurae hippocampale* (NHpC) [112] (*Kap. EIN 1.1.2*). Dementsprechend wurde in der Literatur beschrieben, dass diese beiden Kerngebiete aufgrund ihrer anatomischen Lokalisation nicht getrennt voneinander betrachtet werden können [112]. Auch in der hier vorliegenden Promotionsarbeit muss deshalb davon ausgegangen werden, dass es sich bei der „SSO-spezifischen Primärzellkultur“ um eine Mischkultur aus SSO und NHpC handelte. Die Präparationstechnik (*Kap. MM 2.3.2.6*) ließ es nicht zu, das SSO scharf begrenzt zu präparieren. Dies stellte einen großen Unterschied zur Präparation der SFO-spezifischen Primärzellkultur des Säugetiers dar, weil das SFO scharf begrenzt ist und in keiner unmittelbaren Nähe zu anderen Kerngebieten liegt (*Kap. EIN 1.1.2*). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zum vogelspezifischen Angiotensin-Rezeptor (cATR) (*Kap. ERG 3.4.2.5*) stellte die Mischkultur aus SSO und NHpC allerdings kein Hindernis dar, weil die Expression des cATRs in beiden Kerngebieten nachgewiesen wurde [127, 309, 311, 323]. In der Fachliteratur wurde beschrieben, dass das SSO durch eine lecke BHS gekennzeichnet ist, die BHS in unterschiedlichen Anteilen des SSOs jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist [119] (*Kap. EIN 1.1.2*). So besitzen caudale Anteile des SSOs eine stark ausgeprägte BHS. Unterschiede in der Ausprägung der BHS waren in Studien dieser Arbeit jedoch zu vernachlässigen, da die Zellen der SSO-spezifischen Primärkultur aus dem Gewebeverband gelöst sowie vereinzelt wurden und somit die in Calcium-Imaging Versuchen (*Kap. ERG 3.4.2.2 bis 3.4.2.5*) verwendeten Substanzen direkt Auswirkungen auf die Zellen haben konnten. Des Weiteren bietet auch beim Vogel eine Primärzellkultur den Vorteil, dass die Zellen nicht durch im Blut zirkulierende Faktoren beeinflusst werden können, und dass Konnektivitäten zu anderen Hirngebieten keine Auswirkungen auf Zellen haben (*Kap. DIS 4.1*).

Die *de novo* Etablierung einer Primärkultur des gesamten Hypothalamus diente primär der Gewinnung von Erkenntnissen zur Optimierung von Kulturbedingungen für neuro-gliale Primärzellkulturen des Vogels (*Kap. MM 2.3.2.5*). Dabei wurden für die

Präparationstechnik zunächst unterschiedliche Enzyme und Verdünnungen (Dispase I / Collagenase; Dispase I / Collagenase in einer Verdünnung 1:2; Dispase I-HBSS Gebrauchslösung) für den enzymatischen Verdau der Zellen untersucht (*Kap. MM 2.3.2.5*). Nach Auswertung der Daten zu Vitalitätsversuchen (*Kap. ERG 3.4.1.2*) wurde eine Lösung aus Dispase I / Collagenase, wie sie bereits für andere Kulturen verwendet wurde [659], als idealer enzymatischer Verdau für Zellen des gesamten vogelspezifischen Hypothalamus identifiziert. Für das SSO hingegen (*Kap. MM 2.3.2.6*) wurde nach wenigen Präparationsversuchen festgestellt, dass der enzymatische Verdau mit dieser Enzymlösung (Dispase I / Collagenase) nicht geeignet war, da die bei der Präparationstechnik des SFOs (*Kap. MM 2.3.2.4*) verwendete Dispase I-HBSS Gebrauchslösung für kleinvolumige Hirnstrukturen deutlich schonender zu sein schien.

Weiterhin wurde die Präparation der Zellkultur des gesamten Hypothalamus ähnlich zu in der Literatur beschriebenen Techniken durchgeführt [659, 747, 748]. Dabei wurden die Zellen zum einen wiederholt pelletiert um sie von *Dura* und *Pia mater* zu befreien, zum anderen fand die Kultivierung zunächst in DMEM statt [747, 748] (*Kap. MM 2.3.2.5*). Für die *de novo* Präparation des SSOs hingegen wurde nach einigen Präparationsversuchen ebenfalls die deutlich schonendere Präparationstechnik ohne Zentrifugation angewendet (*Kap. MM 2.3.2.6*). Es muss weiterhin beachtet werden, dass beide Primärzellkulturen in Studien der hier vorliegenden Arbeit bei der für Vögel unphysiologischen Temperatur von 37 °C kultiviert wurden (*Kap. MM 2.3.2.5* und *2.3.2.6*). Der Grund dafür ist technischer Natur, da kein geeigneter Inkubator für die Kultivierung bei der vogelspezifischen Körperkerntemperatur von etwa 40 °C zur Verfügung stand. Insofern müssen die gewonnenen Erkenntnisse zu funktionellen Aspekten SSO- bzw. Hypothalamus-spezifischer Zellen kritisch betrachtet werden, da sich die Ergebnisse bei vogelphysiologischer Körpertemperatur (40 °C) gegebenenfalls verschieben würden.

Mittels immunzytochemischer Charakterisierung konnten sowohl in Primärzellkulturen des Hypothalamus als auch des SSOs Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen identifiziert werden (*Kap. ERG 3.4.1.1* und *3.4.2.1*). Dabei wurde für Neurone der beim Säugetier verwendete Primärantikörper gegen das neuronale Strukturprotein MAP<sub>2a+2b</sub> eingesetzt (*Abb. ERG 43* und *47*). In der Literatur wurde für vogelspezifische Neurone ein Antikörper gegen das Neuronen-spezifische nukläre Protein NeuN verwendet [689], welcher in Kulturen der hier vorliegenden Arbeit keine Neurone

markierte. Zur Identifikation von Astrozyten wurde der Primärantikörper verwendet, welcher, analog zum Säugetier, für das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) spezifisch ist [689, 749]. Vogelspezifische Mikrogliazellen konnten mit einem monoklonalen *mouse* anti-KUL01 Antikörper detektiert werden [689, 750] (*Abb. ERG 43 und 47*). Der für die immunzytochemische Charakterisierung von Mikrogliazellen des Säugetiers verwendete Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD68 (*Kap. ERG 3.1.1*) markierte keine vogelspezifischen Mikrogliazellen. Gründe dafür könnten sein, dass vogelspezifische Mikrogliazellen kein CD68 oder ein in seiner Struktur verändertes CD68 exprimieren. Beim Säugetier war es möglich, mittels eines Primärantikörpers gegen das zytoplasmatische Enzym CNPase, Oligodendrozyten zu identifizieren (*Kap. ERG 3.1.1*). Vogelspezifische Oligodendrozyten waren entweder in Zellkulturen des Hypothalamus und SSOs nicht vorhanden oder exprimierten keine CNPase bzw. eine in ihrer Struktur vom Säugetier abweichende CNPase. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten mittels eines Primärantikörpers gegen basisches Myelinprotein (MBP) Oligodendrozyten des Vogels nachweisen, dieser Antikörper wurde in Versuchen der hier vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht [689, 751]. Für die Markierung von Tanyzyten beim Säugetier diente ein Primärantikörper gegen das zytoplasmatische Intermediärfilament Vimentin (*Kap. ERG 3.1.1*). In Zellkulturen des vogelspezifischen Hypothalamus und SSOs konnten jedoch keine Tanyzyten unter Einsatz dieses Antikörpers nachgewiesen werden, obwohl in der Literatur beschrieben wurde, dass auch Tanyzyten des Vogels Vimentin exprimieren [749, 752–755]. Dementsprechend ist die Abwesenheit von Tanyzyten in den hier charakterisierten Kulturen vermutlich damit zu erklären, dass vogelspezifische Tanyzyten eine abweichende Struktur des Vimentins aufweisen, oder in diesen vogelspezifischen Zellkulturen nicht vorhanden waren.

#### **4.1.5 SSO-intrinsische Komponenten des RAS**

Wie bereits in *Kap. EIN 1.3.2* beschrieben, wurden in der Literatur von zahlreichen Autoren auch für den Vogel Hinweise auf ein Gehirn- bzw. SSO-intrinsisches RAS beschrieben [291, 307, 510]. So führten i.c. und i.c.v. Injektionen von ANG II bei unterschiedlichen Vogelarten wie der Taube, Ente, Wachtel oder dem Huhn zu gesteigerter Trinkwasseraufnahme und Antidiurese [291, 310, 313, 319, 330, 511, 512]. In Studien der hier vorliegenden Promotionsarbeit wurde einerseits die Expression eines ACE-ähnlichen Enzyms und andererseits von vogelspezifischen ANG II Bindungsstellen (cATR) in Primärzellkulturen des SSOs untersucht (*Kap. ERG 3.4*). Die

in diesen Versuchen gewonnenen Ergebnissen werden im Folgenden kontrovers diskutiert.

Die Existenz eines Gehirn- respektive SSO-intrinsischen RAS beim Vogel wurde lange kritisch diskutiert, da kein Nachweis für die Expression vieler RAS-Komponenten (Aogen, Renin, ACE, ANG I) erbracht werden konnte [309]. Erst im Jahre 2005 erfolgte die erfolgreiche Klonierung der cDNA für vogelspezifisches Aogen, Renin und ACE [293]. Für die Expression von ACE im Gehirn bzw. im SSO liegen für den Vogel nur wenige Daten vor. Eine ACE-ähnliche Aktivität wurde jedoch in Lunge, Nieren, Gefäßsystem und in geringem Maße auch im Gehirn von Hühnern nachgewiesen [294]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde mittels Calcium-Imaging Versuchen die Expression eines funktionellen ACE bzw. eines ACE-ähnlichen Enzyms in der *de novo* etablierten SSO-spezifischen Primärzellkultur untersucht (*Kap. ERG 3.4.2.4*). Mit Hilfe des ACE Inhibitors Captopril, welcher nachweislich auch beim Vogel die Aktivität des ACE inhibiert [296, 756], wurde in Calcium-Imaging Versuchen die ANG II bildende Aktivität von ACE nachgewiesen (*Kap. ERG 3.4.2.4* und *Abb. ERG 51*). In diesen Studien war es analog zum Säugetier (*Kap. DIS 4.1*) unwahrscheinlich, dass zirkulierendes ACE aufgenommen werden konnte. Somit könnte es sich bei der ANG II bildenden Aktivität um SSO-intrinsisch gebildetes ACE handeln. Eine biologisch aktive Form des ACE sorgte dabei sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten für die Konversion von ANG I in aktives ANG II, welches durch Bindung an seinen Rezeptor zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führte und somit Calciumsignale bei den untersuchten Zellen auslöste (*Abb. ERG 51*). Ob die Bildung von ANG II durch ACE dabei intrazellulär oder nach Freisetzung von ACE extrazellulär stattgefunden hat, lässt sich durch diese Versuche nicht eindeutig klären. Intrazelluläre Konversion scheint dabei unwahrscheinlich, da ANG I internalisiert werden müsste und eine extrazelluläre Konversion ist fraglich, da nicht klar ist wie ACE bei ständiger Superfusion nach Freisetzung seine Wirkung entfalten kann. Auch ob andere Zelltypen als Astrozyten oder Neurone (Oligodendrozyten, Tanyzyten) an der Generierung von ANG II durch ACE beteiligt waren, wurde in Versuchen der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Der Grund liegt darin, dass keine Antikörper für diese Zelltypen zur Verfügung standen (*Kap. DIS 4.1.4*). Es konnte dementsprechend der Nachweis für die funktionelle Expression von SSO-intrinsischem ACE erbracht werden; welche Zelltypen allerdings ACE produzieren und ob die Bildung von

ANG II durch ACE extra- oder intrazellulär abläuft, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Der Nachweis eines vogelspezifischen Rezeptors für ANG II (cATR) [302] im Gehirn konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen für unterschiedliche Vogelarten erbracht werden. So wurde die Bindung von ANG II an seinen Rezeptor bei der Ente mittels Rezeptorautoradiographie gezeigt [322, 324–326, 515] (*Kap. EIN 1.3.2*). Die Expression von cATR konnte ab dem 20. Tag der Fetalentwicklung in verschiedenen Hirnregionen, unter anderem im SSO, des Vogels detektiert werden [324, 326].

In Versuchen der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für cATR hinsichtlich intrazellulärer Calciumsignale in Zellen der SSO-spezifischen Primärzellkultur erstellt (*Kap. ERG 3.4.2.2*). Dabei zeigte sich, dass SSO-spezifische Neurone und Astrozyten eine vergleichbare Sensitivität für ANG II aufwiesen (*Abb. ERG 49*). In weiterführenden Calcium-Imaging Studien wurde die funktionelle Expression von cATR durch Neurone und Astrozyten der SSO-spezifischen Zellkultur untersucht (*Kap. ERG 3.4.2.5*). Zwar wurde cATR im vogelspezifischen SSO mittels Rezeptorautoradiographie (Ente) [311], Injektionsstudien (Wachtel) [514] und Elektrophysiologie (Ente) [322, 323] bereits detektiert, seine funktionelle Expression auf Einzelzellniveau mittels Calcium-Imaging konnte bis *dato* jedoch nicht gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurde der vogelspezifische cATR-Antagonist [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]ANG II eingesetzt (*Kap. MM 2.4.6*). [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]ANG II inhibierte den durch i.v. appliziertes ANG II ausgelösten dipsogenen Effekt bei Ente und Wachtel [297, 308]. Die für Säugetiere üblicherweise eingesetzten ANG II Rezeptor-Inhibitoren zeigten beim Vogel keine bzw. eine verminderte Wirkung [297]. Der Nachweis für die funktionelle Expression von cATR in der SSO-spezifischen Zellkultur konnte in Studien der hier vorliegenden Arbeit sowohl für Neurone als auch für Astrozyten erbracht werden (*Kap. ERG 3.4.2.5* und *Abb. ERG 52*). In der Fachliteratur wurde zum einen oft beschrieben, dass die Expression von cATR in Gliazellen fraglich sei [309], zum anderen wurden keine direkten Effekte durch ANG II im SSO beschrieben. Eine katecholaminerge Innervation des SSOs durch die POA, welche durch ANG II perzipierte Informationen über Noradrenalin an das SSO weiterleitet, wurde vermutet [309, 514, 515]. Die Ergebnisse in *Kap. ERG 3.4.2.5* zeigen jedoch, dass sowohl SSO-spezifische Neurone als auch Astrozyten cATR exprimieren, und dass ANG II im vogelspezifischen SSO vermutlich para- / autokrine Funktionen hat.

Abschließend lässt sich bezüglich eines SSO-intrinsischen RAS des Vogels die Aussage treffen, dass RAS Komponenten (ACE, cATR) in der SSO-spezifischen Primärzellkultur nachgewiesen werden konnten. Dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass auch im SSO des Vogels analog zum SFO ein intrinsisches RAS vorhanden sein könnte. Weiterführende Untersuchungen zu anderen RAS-Komponenten (Aogen, Renin, ANG I, Cathepsine / Chymasen), welche ein SSO-intrinsisches RAS komplettieren würden, wurden in der hier vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

## **4.2 Glutamatrezeptoren im Subfornikalorgan des Säugetiers**

### **4.2.1 Das glutamaterge System des *Organum subfornicale***

Glutamat (GLUT) ist beim Säugetier einer der bedeutensten exzitatorischen Botenstoffe des ZNS [550, 551] (*Kap. EIN 1.4.3*). Dabei wird GLUT als Neurotransmitter eine Vielzahl von Aufgaben in unterschiedlichsten Hirnregionen zugeschrieben (*Kap. EIN 1.4.3*). Dies wirft zum einen die in dieser Promotionsarbeit analysierte Frage auf, ob GLUT auch im *Organum subfornicale* des Säugetiers eine wichtige Rolle als exzitatorischer Botenstoff spielt, zum anderen stellt sich die Frage, über welche glutamatergen Rezeptorproteine dieser Neurotransmitter im rattenspezifischen SFO agiert. Die in *Kap. ERG 3.3* dargestellten Ergebnisse zur funktionellen Expression verschiedener Glutamatrezeptoren sowie zum Nachweis dieser Rezeptoren auf Protein- und mRNA-Ebene werden im Folgenden diskutiert.

Mittels Immunzytochemie konnte in Versuchen der hier vorliegenden Arbeit ein Nachweis von GLUT in Neuronen der SFO-spezifischen Primärzellkultur erbracht werden (*Kap. ERG 3.1.2* und *Abb. ERG 6*). GLUT in SFO-spezifischen Nervenzellen kann dabei unterschiedlicher Herkunft sein. Zum einen könnte es aus glutamaterger Innervation des SFOs durch andere Gehirnregionen stammen. Dabei könnten vor allem afferente glutamaterge Innervationen des SFOs durch den PVN [628, 757], aber auch durch den NTS und die caudo-ventrolaterale *Medulla* (CVLM) [624, 625] sowie das OvLT und den MnPO [557, 630] von entscheidender Bedeutung sein. Da die Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur aus dem Gewebeverband gelöst und vereinzelt wurden (*Kap. MM 2.3.2.1*), ist es unwahrscheinlich, dass die hier nachgewiesenen glutamatergen Neurone ihr GLUT durch Afferenzen aus anderen Hirnregionen erhalten und speichern konnten.

GLUT in SFO-spezifischen Neuronen könnte weiterhin aus der Blutbahn stammen und durch Nervenzellen aufgenommen worden sein [758]. GLUT kann dabei nur in sensorischen CVOs (SFO) mit lecker BHS diese überwinden und auf Zellen des jeweiligen Kerngebietes wirken [758]. Zudem scheinen vor allem Perizyten Transportproteine für GLUT zu exprimieren, mit welchen GLUT ins Parenchym eines Kerngebietes eintreten kann [759]. Unterschiedliche Autoren haben beschrieben, dass aus der Blutbahn stammendes GLUT zu Läsionen in bestimmten Hirngebieten wie dem SFO der Ratte führt [563–565, 567, 760]. Astrozyten innerhalb des SFOs exprimieren sogenannte *uptake* Transporter für GLUT, um Neurotoxizitäten zu verhindern. Dabei ist EAAT1 oder GLAST im SFO (*Kap. EIN 1.4.3*) der wichtigste dieser *uptake* Transporter [551, 558–560, 634]. Astrozyten stellen den Neuronen das somit aufgenommene GLUT in Form von Glutamin innerhalb des Glutamat-Glutamin Zyklus zur erneuten Bildung von GLUT zur Verfügung (*Abb. EIN 8*). Da GLUT in der hier vorliegenden Arbeit nicht in Astrozyten nachgewiesen werden konnte (*Abb. ERG 6*), kann diese Aufnahme durch Astrozyten nicht bestätigt, jedoch ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Da im Experimentalmodell einer neuro-glialen Primärkultur des SFOs eine Aufnahme von GLUT aus der Blutbahn als unwahrscheinlich gilt, könnte GLUT in den Neuronen synthetisiert, gespeichert und als exzitatorischer Neurotransmitter verwendet werden. Grundsätzlich gibt es zur Identifizierung glutamaterger Neurone, neben der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Immunzytochemie für GLUT selbst, auch die Möglichkeit, einen der vesikulären Glutamattransporter (vGLUT1-3) nachzuweisen, welcher GLUT in Vesikel einschließt, das dann an der präsynaptischen Membran zur Signaltransduktion dient [553, 554] (*Kap. EIN 1.4.3*). Durch den Nachweis von vGLUT2 in Neuronen des rattenspezifischen SFOs konnten glutamaterge Nervenzellen in diesem für die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes wichtigen Kerngebiet identifiziert werden [635, 636]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Trinkwasserentzug bei Ratten die vGLUT2 positiven Neurone im SFO aktiviert [635].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das in Versuchen der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesene GLUT in Neuronen der SFO-spezifischen Zellkultur vermutlich intrinsisch in diesen Zellen gebildet worden sein könnte, um anschließend als exzitatorischer Botenstoff verwendet zu werden.

Unter anderem mittels elektrophysiologischer Studien konnte die Bedeutung von GLUT als exzitatorischer Neurotransmitter im SFO nachgewiesen werden. Dabei wurden SFO-intrinsische Neurone durch GLUT über ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren aktiviert [557, 628, 631, 632]. Eine optogenetische Aktivierung glutamaterger Neurone (vGLUT2 positiv) in Kerngebieten mit Bedeutung für die Regulation des Wasserhaushaltes führte ebenso wie die glutamaterge Stimulation von rattenspezifischen SFO-Neuronen mittels Mikroinjektion zu einer gesteigerten Trinkwasseraufnahme [557, 720]. Außerdem aktivierte Trinkwasserentzug glutamaterge Neurone im SFO der Ratte [635]. In elektrophysiologischen Studien am SFO der Ratte verursachte eine GLUT-Applikation weiterhin eine Aktivierung ANG II responsiver Neurone [631]. Mittels retrogradem *tracing* konnte außerdem nach Injektion von GLUT in das rattenspezifische SFO die Freisetzung von endogenem ANG II im PVN beobachtet werden [757]. In elektrophysiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass GLUT im rattenspezifischen SFO die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) aktivierte, welche daraufhin den volatilen Gasotransmitter Stickstoffmonoxid (NO) bildete [631]. In immunzytochemischen Studien der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nNOS in SFO-spezifischen Neuronen exprimiert wurde (*Kap. ERG 3.1.2* und *Abb. ERG 5*). NO seinerseits führte zur vermehrten Entstehung des sekundären Botenstoffs „zyklisches Guanosinmonophosphat“ (cGMP), welches inhibitorisch auf Neurone wirkt und diese somit vor Übererregung durch GLUT schützt [420, 631]. Dieser zweite Schutzmechanismus SFO-intrinsischer Neurone (neben den astrozytären *uptake* Transportern) vor Neurotoxizitäten durch GLUT konnte dadurch bestätigt werden, dass L-NAME (nNOS-Inhibitor) SFO-spezifische glutamaterge Neurone in elektrophysiologischen Untersuchungen von Gewebeschnitten der Ratte aktivierte [633].

Einen weiteren möglichen Schutzmechanismus SFO-spezifischer Neurone vor neurotoxischen Auswirkung durch GLUT aus der Blutbahn könnte das sogenannte  $X_c^-$  System darstellen [761]. Dieses Transportsystem besteht aus zwei Komponenten (xCT und 4F3 Antigen), welche beide auf mRNA-Ebene im SFO von Mäusen nachgewiesen wurden [761]. Das  $X_c^-$  System scheint dabei für den Austausch von GLUT im SFO gegen Cystin aus der CSF verantwortlich zu sein, und könnte somit ebenfalls neurotoxische GLUT-Konzentrationen im SFO eliminieren [761].

GLUT kann durch die Glutamat-Decarboxylase zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des ZNS, umgewandelt werden [551]

(Kap. EIN 1.4.3). Eine optogenetische Aktivierung GABAerger Neurone im maus-spezifischen SFO führte wiederum zu einer Reduzierung des Trinkverhaltens [629]. Dementsprechend scheint GABA als Gegenspieler zu GLUT intrinsisch im SFO gebildet zu werden. Die Bildung von GABA konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit durch immunzytochemische Untersuchungen der SFO-spezifischen Primärzellkultur nachgewiesen werden (Kap. ERG 3.1.2 und Abb. ERG 7). Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen am SFO der Ratte konnte außerdem gezeigt werden, dass vor allem metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe II (Abb. EIN 9) die GABA-Freisetzung hemmen [627, 632]. Alles in allem machen diese Ausführungen deutlich, dass GLUT als exzitatorischer Botenstoff an einer Vielzahl physiologischer Funktionen im SFO mitwirkt.

In der Fachliteratur werden jedoch auch andere Gehirnregionen beschrieben, in welchen GLUT für unterschiedlichste Aufgaben verantwortlich ist. So haben beispielsweise Mikroinjektionen mit GLUT oder anderen Agonisten glutamaterger Rezeptoren (NMDA, Kainat) in die AP der Ratte eine Tachykardie und einen Blutdruckanstieg ausgelöst [594, 640]. Dabei kam es vermutlich zu einer glutamatergen, efferenten Innervation des NTS durch die AP, welche anschließend Veränderungen des arteriellen Druckes auslöste [594]. Zusätzlich wurde beschrieben, dass die Infusion eines NMDA-Antagonisten in die Ventrikel der Ratte zu einer verminderten Trinkwasseraufnahme nach 22 Stunden Dehydratation führte [587]. Dabei wurden vor allem Effekte durch den MnPO, SON und PVN festgestellt [587]. Im gesamten Hirnstamm scheinen metabotrope Glutamatrezeptoren bei Aktivierung für das Absenken der Futteraufnahme bei hungernden Ratten verantwortlich zu sein. Zusätzlich aktivierten sie Neurone des NTS und PBN nach peripherer Inflammation durch LPS [762]. Für den PVN der Ratte wurde beschrieben, dass Mikroinjektionen mit Agonisten verschiedener ionotroper Glutamatrezeptoren (NMDA, AMPA, Kainat) zu einer Modulation des Blutdruckes führten [585]. Eine Verbindung zwischen dem MnPO und dem SFO konnte mittels elektrophysiologischer Untersuchungen an der Ratte festgestellt werden [630]. Dabei wurden sowohl prä- als auch postsynaptische metabotrope Glutamatrezeptoren detektiert, welche diese Konnektivität mediierten [630].

Weiterhin wurden mittels Calcium-Imaging Versuchen an sogenannten *punch* Kulturen des SCN der Ratte ionotrope Glutamatrezeptoren identifiziert, welche für die Transduktion perzipierter Informationen aus der Retina verantwortlich sind [591]. Metabotrope Glutamatrezeptoren hingegen hatten einen inhibitorischen Effekt [591].

Dabei handelte es sich vermutlich um Rezeptorproteine der Gruppe II und III (*Abb. EIN 9*). Es konnte in diesen Versuchen, analog zu Studien dieser Arbeit, gezeigt werden, dass sowohl Neurone als auch Astrozyten in primären Zellkulturen mit Calciumsignalen auf Superfusionsstimulationen mit GLUT oder anderen Agonisten glutamaterger Rezeptorproteine reagierten.

Immunzytochemische Nachweise von mGluR1 im SON, ARC und PVN der Ratte lassen darauf schließen, dass dieser Rezeptorsubtyp in genannten Kerngebieten an der physiologischen Kontrolle neuroendokriner Abläufe beteiligt ist [612]. Elektrophysiologische und PCR Untersuchungen am ARC der Ratte zeigten, dass eine periphere Inflammation zu einer gesteigerten Expression von NMDA-Rezeptoren führte und GLUT dementsprechend auch bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielte [593]. Mittels *in vivo* Studien im OvLT der Ratte konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass eine periphere Inflammation durch LPS zu einer Freisetzung von GLUT in diesem Kerngebiet führte, und dass der Einsatz von Cyclooxygenase-Inhibitoren diese GLUT-Freisetzung inhibierte [763]. Auch eine Beteiligung glutamaterger Rezeptoren der POA an der Modulation der Körper- und Gehirntemperatur konnte mittels *in vivo* Studien gezeigt werden [596].

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass der immunzytochemische Nachweis von GLUT in Versuchen der hier vorliegenden Promotionsarbeit vermutlich auf eine intrinsische Bildung von GLUT in SFO-spezifischen Neuronen schließen lässt. Zudem wurde in der Fachliteratur beschrieben, dass GLUT sowohl im SFO als auch in zahlreichen anderen Kerngebieten eine wichtige Rolle in der Modulation physiologischer Prozesse spielt.

#### **4.2.2 Die Expression metabotroper und ionotroper Glutamatrezeptoren im SFO der Ratte**

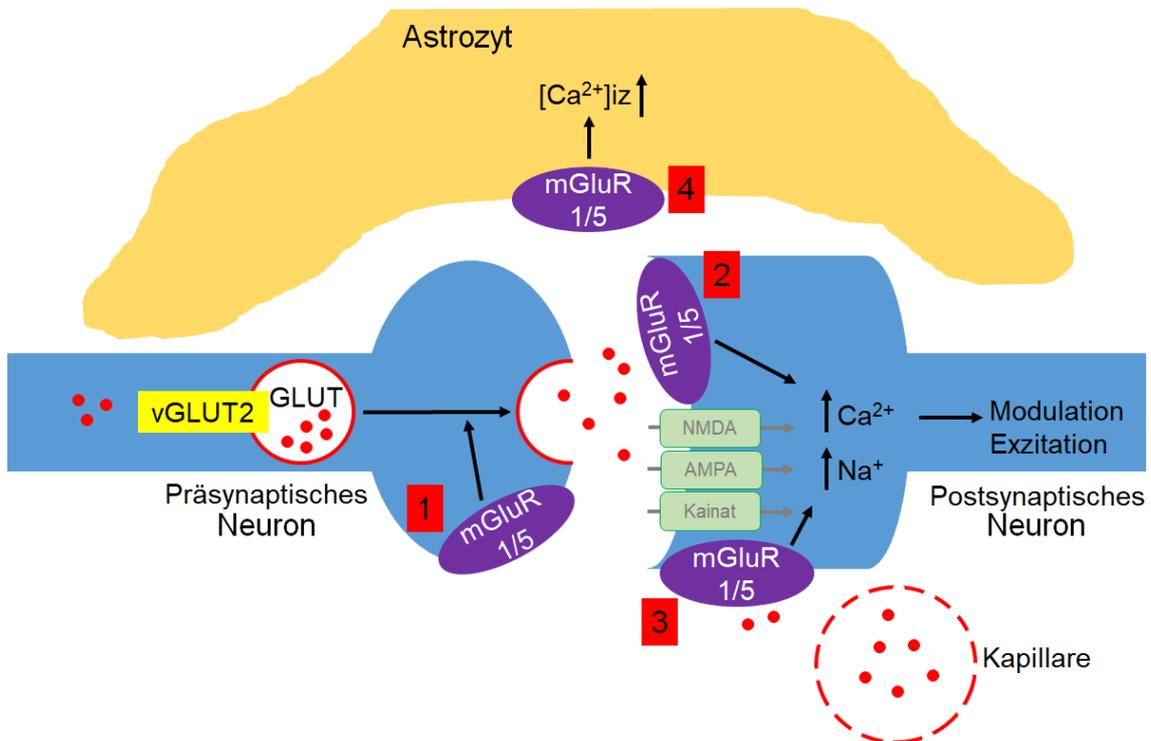
In Versuchen der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression von metabotropen Glutamatrezeptoren auf Protein- und mRNA-Ebene in Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur untersucht und die funktionelle Expression metabotroper und ionotroper Glutamatrezeptoren in Neuronen und Astrozyten analysiert (*Kap. ERG 3.3*). Im Folgenden werden die einzelnen in *Kap. ERG 3.3* dargestellten Ergebnisse diskutiert und besonders markante Ergebnisse nochmals hervorgehoben.

In den Untersuchungen zur Expression metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluRs) wurden die Subtypen mGluR1 und mGluR5 untersucht. Dies begründete sich dadurch, dass die zur Gruppe I der mGluRs gehörenden mGluR1 und mGluR5 die einzigen mGluRs mit exzitatorischer Wirkung sind [580] (*Abb. EIN 9*). Dementsprechend sind lediglich mGluR1 und mGluR5 in Calcium-Imaging Studien experimentell erfassbar, da sie zu einer Aktivierung von Zellen durch Einstrom von außen oder intrazelluläre Freisetzung von Calcium führen können (*Kap. EIN 1.4.3*). Zudem wurde beschrieben, dass mGluR1 und mGluR5 sowohl prä- und postsynaptisch als auch außerhalb des synaptischen Spaltes exprimiert werden, wobei vor allem die außerhalb der Synapse exprimierten mGluRs im SFO aufgrund der lecken BHS durch zirkulierendes GLUT aus benachbarten Kapillaren erregt werden könnten [550, 551, 623] (*Abb. DIS 2*).

Die Expression von mGluR1 und mGluR5 konnte bereits mittels *in situ* Hybridisierung, Immunzytochemie und Calcium-Imaging Messungen in Neuronen und hypothalamischen Astrozyten nachgewiesen werden [584, 608, 610]. In immunzytochemischen Analysen der hier vorliegenden Arbeit wurden mGluR1 und mGluR5 ebenfalls in Neuronen und Astrozyten nachgewiesen (*Kap. ERG 3.3.2*). Bei diesen Ergebnissen ist auffällig, dass die Verteilung von mGluR1 zwischen Neuronen und Astrozyten nahezu identisch war (*Abb. ERG 40*), wohingegen mGluR5 deutlich stärker in Neuronen exprimiert wurde (*Abb. ERG 41*). Die physiologische Bedeutung dieser ungleichen Verteilung bleibt jedoch offen.

In experimentellen Studien wurden mGluR1 und mGluR5 mittels Autoradiographie im Hypothalamus der Ratte nachgewiesen [603]. In immunzytochemischen Untersuchungen an Gehirnstrukturen der Ratte wurden mGluR1 und mGluR5 in Perikaryen, Dendriten und Axonen von NTS-spezifischen Neuronen [606], sowie in Perikaryen und Dendriten ARC-spezifischer Neurone [604, 609] detektiert. Auch in Neuronen des SON, SCN, PVN und LH der Ratte konnten mGluR1 und mGluR5 nachgewiesen werden [584, 588, 601, 615, 616]. Für das SFO hingegen konnte bis *dato* lediglich die Expression von inhibitorischen mGluRs der Gruppe II (*Abb. EIN 9*) gezeigt werden [632], weitere diesbezügliche Daten lagen bis *dato* nicht vor. Bereits neonatal wurde die Expression von mGluR1 und mGluR5 an postsynaptischen Membranen nachgewiesen [579, 580, 599]. Ab der dritten Woche postnatal kam es zur deutlichen Reduzierung von mGluR1 und mGluR5 in neuronalem Gewebe von Ratten und Mäu-

sen [599, 601, 764]. Da die Versuche dieser Arbeit an SFO-spezifischen Primärzellkulturen der Ratte an Tag vier bis sechs (Kap. MM 2.3.2.4) durchgeführt wurden, muss kritisch hinterfragt werden, ob Unterschiede im Alter der eingesetzten Ratten einen Effekt auf die Expression von mGluR1 und mGluR5 hatten.



**Abb. DIS 2: Schematische Darstellung der Verteilung metabotroper und ionotroper Glutamatrezeptoren in Synapsen des SFOs**

Dargestellt ist der schematische Aufbau einer Synapse mit präsynaptischer Membran, einem synaptischen Spalt, einer postsynaptischen Membran und einem Astrozyten. Glutamat wird wie in *Abb. EIN 8* dargestellt durch den vesikulären Glutamattransporter 2 (vGLUT2) in Vesikel eingeschlossen. Ionotrope Glutamatrezeptoren (NMDA, AMPA, Kainat) werden auf der postsynaptischen Membran exprimiert und führen bei Aktivierung zum Einstrom von Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ). Exzitatorische metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR1/5) werden (1) an der präsynaptischen Membran exprimiert, an welcher sie bei Aktivierung zur vermehrten Freisetzung von GLUT in den synaptischen Spalt führen. Zudem werden mGluR1/5 an der postsynaptischen Membran (2) und außerhalb der Synapse (3) exprimiert, wobei sie jeweils bei Aktivierung zur Freisetzung von Kationen aus intrazellulären Speichern führen. Außerhalb der Synapse exprimierte mGluR1/5 (3) können durch GLUT aktiviert werden, welches durch fenestrierte Kapillaren des SFOs ins Gehirnparenchym eintreten kann. Weiterhin werden mGluR1/5 durch Astrozyten exprimiert (4), wobei die physiologische Bedeutung selbiger nicht eindeutig geklärt ist. Sie führten jedoch in Versuchen dieser Arbeit zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ ).

Modifiziert nach Pakevich et al. 2011

In den in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Calcium-Imaging Studien wurde mittels einer Dosis-Wirkungs-Beziehung für GLUT (Kap. ERG 3.3.1.1) die

Konzentration  $10^{-5}$  M / L als ideale Konzentration zur Aktivierung glutamaterger Rezeptorproteine auf Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur ermittelt (*Abb. ERG 28*). Für die physiologische Konzentration von GLUT nach vesikulärer Freisetzung in den synaptischen Spalt wurde in der Fachliteratur die Konzentration von  $10^{-3}$  M / L nachgewiesen [765–768]. Trotz der geringeren Konzentration konnte in den in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen eine Aktivierung der glutamatergen Rezeptoren gezeigt werden (*Abb. ERG 28*). Grund dafür könnte sein, dass im physiologischen Zustand eine Abnahme der Konzentration an GLUT bereits nach wenigen Millisekunden eintritt und dementsprechend an den Rezeptoren der postsynaptischen Membran eine geringere Endkonzentration an GLUT vorliegt [768]. Zudem wurde in diesen Untersuchungen die geringst mögliche Konzentration an GLUT zur Aktivierung glutamaterger Rezeptoren verwendet, damit keine Desensibilisierungs-Phänomene auftreten konnten (*Abb. ERG 27*).

Für die funktionelle Expression von mGluR1 in Neuronen und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur wurde in Calcium-Imaging Versuchen der spezifische Rezeptor Antagonist YM202074 (*Kap. MM 2.4.6*) eingesetzt [769]. YM202074 ( $IC_{50}$ -Wert = 8,6 nM / L) wurde dabei erfolgreich in Zellkulturen des rattenspezifischen *Cerebellum* getestet [769]. Die Primärzellkulturen des *Cerebellum* waren mit den in dieser Arbeit genutzten SFO-spezifischen Primärzellkulturen gut vergleichbar, da die Präparationstechniken nahezu identisch waren [769] (*Kap. MM 2.3.2.4*). Dementsprechend reichte die eingesetzte Konzentration an YM202074 ( $10^{-5}$  M / L) aus, um mGluR1 zuverlässig zu inhibieren. Andere Arbeitsgruppen [607, 770] verwendeten abweichende mGluR1-Antagonisten (BAY36-7620 und JNJ16259685). BAY36-7620 wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht genutzt, da es bislang lediglich mittels Rezeptorautoradiographie in Gehirnschnitten getestet wurde [607] und JNJ16259685 nicht, weil es nur in zellschädigendem DMSO löslich ist [770]. Für Untersuchungen zur funktionellen Expression von mGluR5 wurde in Calcium-Imaging Versuchen der spezifische mGluR5-Antagonist MTEP verwendet (*Kap. MM 2.4.6*). MTEP ( $IC_{50}$ -Wert = 5 nM / L) wurde bislang zwar nicht direkt in neuronalem Gewebe getestet, zeigte jedoch in corticalen Membranen eine überzeugende Inhibition von mGluR5 [771, 772]. Vor allem zeigte MTEP im Vergleich zu dem von anderen Arbeitsgruppen genutzten MPEP eine deutlich höhere Spezifität für mGluR5 [605, 771]. Der in dieser Arbeit verwendete Agonist für mGluRs der Gruppe I (S)-3,5-DHPG (DHPG) wurde bereits in *in vivo* Studien der Ratte für den lateralen Hypothalamus,

aber auch in elektrophysiologischen Untersuchungen in hypothalamischen Gehirnschnitten erfolgreich getestet [602, 623, 773]. Dabei könnte DHPG allerdings Wechselwirkungen mit NMDA-Rezeptoren eingehen, was in den Versuchen dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden konnte [773].

In Neuronen des SFOs konnte unter Zuhilfenahme von Calcium-Imaging Untersuchungen in der hier vorliegenden Promotionsarbeit sowohl die Existenz von mGluR1 als auch mGluR5 festgestellt werden (*Kap. ERG 3.3.1.2* und *Abb. ERG 31* sowie *32*). Dabei sind vor allem die Studien mit Einsatz beider Antagonisten für mGluR1 und mGluR5 für die Interpretation der Ergebnisse von großer Bedeutung (*Abb. ERG 33*). Hier konnte mit Hilfe der erwähnten Rezeptor Antagonisten gezeigt werden, dass etwa zwei Drittel der SFO-spezifischen Neurone weder über mGluR1 noch über mGluR5 verfügen (*Abb. ERG 33*). Dies deckt sich zum einen mit den Ergebnissen, welche durch den Einsatz des mGluR1 und mGluR5 Agonisten DHPG gewonnen wurden (*Abb. ERG 34*) und zum anderen mit jenen, die bei Superfusionsstimulationen in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium generiert wurden (*Abb. ERG 29*). Etwa 70 % der SFO-spezifischen Neurone reagierten nicht auf DHPG, hatten also weder mGluR1 noch mGluR5 (*Abb. ERG 34*). Die allermeisten Neurone (88 %) waren abhängig von extrazellulärem Calcium und konnten dementsprechend kaum Calcium aus intrazellulären Speichern mobilisieren, wie es für mGluRs typisch wäre (*Abb. ERG 29*). Alles in allem konnte mittels dieser Versuche dargelegt werden, dass SFO-spezifische Neurone nur in geringem Maße mGluRs zu exprimieren scheinen, und dass die durch GLUT generierten Calciumsignale vor allem auf der Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren beruhen.

Die Astrozyten betreffend, konnte mittels Calcium-Imaging Versuchen der hier vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass in diesem Zelltyp sowohl mGluR1 als auch mGluR5 exprimiert wurden (*Kap. ERG 3.3.1.2* und *Abb. ERG 31* sowie *32*). Auch hinsichtlich der Astrozyten sind vor allem die Versuche unter Einsatz beider Antagonisten für die Auswertung der Ergebnisse von großer Bedeutung (*Abb. ERG 33*). Es wurde gezeigt, dass etwa drei Viertel aller analysierten Astrozyten über entweder mGluR1 oder mGluR5 verfügten, wobei mGluR5 der vorherrschende Rezeptorsubtyp war (*Abb. ERG 33*). Auch hier deckte sich das Ergebnis mit jenen aus Superfusionsstimulationen mit DHPG (*Abb. ERG 34*) und in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium (*Abb. ERG 29*). So reagierten ca. 70 % der Astrozyten auf DHPG, exprimierten also einen oder beide mGluRs (*Abb. ERG 34*). Des Weiteren waren 63 %

der Astrozyten unabhängig von extrazellulärem Calcium, generierten ihre Calciumsignale also primär aus intrazellulären Speichern, wie es nach Aktivierung von mGluRs typisch ist (*Abb. ERG 29*). Zusammenfassend lässt sich bezüglich SFO-spezifischer Astrozyten sagen, dass die in Versuchen dieser Promotionsarbeit beobachteten Calciumsignale der Astrozyten durch GLUT vor allem auf der Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren beruhten. Weiterhin ist *Abb. ERG 33* zu entnehmen, dass sowohl bei SFO-spezifischen Neuronen als auch Astrozyten eine deutlich geringere funktionelle Expression von mGluR1 vorlag. Diese Beobachtung wurde durch den Einsatz der quantitativen *real-time* PCR in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt (*Kap. ERG 3.3.3*). In den SFO-spezifischen Primärkulturen war die Expression von mGluR1 im Vergleich zu mGluR5 auf mRNA-Ebene signifikant geringer (*Abb. ERG 42*).

Hinsichtlich der Expression ionotroper Glutamatrezeptoren (iGluRs) durch Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur wurden in der hier vorliegenden Promotionsarbeit iGluRs der Gruppen NMDA- sowie in Kombination AMPA- und Kainatrezeptoren (nicht-NMDA-Rezeptoren) untersucht (*Kap. ERG 3.3.1.3*). Dabei wurden lediglich die beiden großen Gruppen der iGluRs ohne Berücksichtigung der zahlreichen Rezeptoruntereinheiten (*Abb. EIN 9*) untersucht, da zum einen nur für wenige der Rezeptoruntereinheiten ein spezifischer Antagonist zur Verfügung stand, zum anderen eine detaillierte Analyse der Vielzahl an Rezeptorsubtypen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Dieser limitierende Faktor ist bei allen in *Kap. ERG 3.3.1.3* dargestellten Ergebnissen zu beachten. In der Fachliteratur wurde beschrieben, dass iGluRs lediglich an der postsynaptischen Membran exprimiert werden, wobei es bei Aktivierung durch GLUT oder ihren spezifischen Agonisten (*Kap. EIN 1.4.3*) zu einer Konformationsänderung des Ionenkanals, dadurch zum Einstrom von Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ) und somit zur Auslösung eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials kommt [550, 551] (*Abb. DIS 2*). Ionotrope Glutamatrezeptoren haben dementsprechend ausnahmslos exzitatorische Auswirkungen auf die postsynaptische Membran [550, 551] (*Abb. EIN 9*).

Wie in *Kap. EIN 1.4.3* beschrieben, wurden iGluRs in zahlreichen Kerngebieten des Gehirns nachgewiesen. Im PVN scheinen NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoren an der Regulation des Blutdruckes und der Sympathikusaktivierung beteiligt zu sein [559, 585]. Eine Beteiligung von NMDA-Rezeptoren im PVN an der Regulation des Trinkverhaltens konnte ebenfalls gezeigt werden [587]. Auch für SON und SCN

konnte unter Einsatz von PCR und Calcium-Imaging Versuchen bei der Ratte die funktionelle Expression von iGluRs nachgewiesen werden [586, 588, 591]. Für ARC, AP, MnPO und ME der Ratte wurde mittels elektrophysiologischer Studien und *in situ* Hybridisierung die Existenz von iGluRs gezeigt [582, 586, 594].

Die Expression sowohl von NMDA- als auch von nicht-NMDA-Rezeptoren im Subfornikalorgan des Säugetiers wurde bereits nachgewiesen. So führte eine Stimulation von SFO-intrinsischen Nervenzellen mit dem NMDA-Rezeptor Agonisten NMDA zu einer Produktion von cGMP, wie bereits in *Kap. DIS 4.2.1* beschrieben wurde [631]. Des Weiteren verringerte Agmatin, als Decarboxylierungs-Produkt der Aminosäure Arginin, durch Blockade von NMDA-Rezeptoren die Aktivierung SFO-intrinsischer Neurone [633]. Unter Einsatz elektrophysiologischer Studien am SFO der Ratte wurde auch die Beteiligung von nicht-NMDA-Rezeptoren, also AMPA- und Kainatrezeptoren, an der exzitatorischen postsynaptischen Aktivierung von Neuronen des SFOs gezeigt [628]. Andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass das glutamaterge System im SFO die Freisetzung von Acetylcholin (ACh) mittels nicht-NMDA-Rezeptoren bewirkte, welches unter anderem die SFO-medierte Trinkantworten modulierte [638].

In Calcium-Imaging Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde, wie oben beschrieben, lediglich ein Rezeptor Antagonist für die Gruppe der NMDA-Rezeptoren und ein Rezeptor Antagonist für die Gruppe der nicht-NMDA-Rezeptoren (AMPA, Kainat) eingesetzt (*Kap. ERG 3.3.1.3*). Als Antagonist für iGluRs der NMDA Gruppe, wurde der kompetitive Rezeptor Antagonist D-AP5 verwendet (*Kap. MM 2.4.6*), welcher je nach Rezeptorsubtyp einen  $IC_{50}$ -Wert von 2,8 – 4,6 nM / L aufweist. Dabei wurde D-AP5 bereits in isolierten Rückenmarkszellen der Katze und der früh postnatalen Ratte erfolgreich getestet [774, 775]. Vor allem die an früh postnatalen Ratten durchgeführten Versuche sind mit jenen in der hier vorliegenden Arbeit gut zu vergleichen [775]. Zum Nachweis der funktionellen Expression von nicht-NMDA-Rezeptoren in Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur wurde der nicht-kompetitive Antagonist GYKI53655 eingesetzt. GYKI53655 zeigte dabei für AMPA-Rezeptoren einen  $IC_{50}$ -Wert von 1  $\mu$ M / L, wohingegen zur Antagonisierung von Kainatrezeptoren eine höhere Konzentration ( $IC_{50}$ -Wert = 18  $\mu$ M / L) notwendig war [776]. Dies ist bei den Ergebnissen dieser Arbeit zu berücksichtigen, da bei der hier verwendeten Konzentration (*Kap. MM 2.4.6*) nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass AMPA-Rezeptoren stärker antagonisiert wurden als Kainatrezeptoren. Dennoch wurde

GYKI53655 mittels elektrophysiologischer Studien sowohl in kultivierten Neuronen von Spinalganglien als auch hippocampalen Zellen erfolgreich zur Antagonisierung von AMPA- und Kainatrezeptoren eingesetzt [776, 777]. Andere Arbeitsgruppen haben abweichende Antagonisten für NMDA- und nicht-NMDA-Rezeptoren wie NBQX [682, 762], ACEA-1011 [682] oder SYM2081 [778] beschrieben, welche in der hier vorliegenden Arbeit nicht eingesetzt wurden.

Mittels Calcium-Imaging Analysen konnte in der hier vorliegenden Promotionsarbeit eine funktionelle Expression ionotroper Glutamatrezeptoren vom NMDA und nicht-NMDA Typ durch Neurone und Astrozyten der SFO-spezifischen Primärzellkultur nachgewiesen werden (*Kap. ERG 3.3.1.3*). Dabei zeigte sich, dass NMDA-Rezeptoren von ca. 33 % der SFO-Neurone exprimiert wurden (*Abb. ERG 36*), wohingegen etwa 50 % nicht-NMDA-Rezeptoren (AMPA, Kainat) exprimierten (*Abb. ERG 37*). Für Astrozyten wurde dagegen die funktionelle Expression sowohl von NMDA- als auch von nicht-NMDA-Rezeptoren in jeweils 25 % der SFO-spezifischen Astrozyten gezeigt (*Abb. ERG 36 und 37*). Eine immunzytochemische Detektion ionotroper Glutamatrezeptoren wurde in der hier vorliegenden Arbeit aus Mangel an geeigneten Primärantikörpern nicht durchgeführt. Ebenso konnte eine quantitative Auswertung der Häufigkeit von Koloaktionen beider iGluR Gruppen nicht gezeigt werden. Dementsprechend konnte durch die hier durchgeführten Versuche lediglich die Aussage getroffen werden, dass iGluRs der NMDA und nicht-NMDA Gruppe durch Neurone und Astrozyten der SFO-spezifischen Zellkultur exprimiert wurden. Es wurde jedoch nicht identifiziert in welcher Häufigkeit diese vorkamen und ob Koloalitionen zwischen beiden Gruppen existierten.

Es wäre außerdem für zukünftige Untersuchungen von gesteigertem Interesse, ob auch zwischen iGluRs und mGluRs Koexpressionen durch Zellen der SFO-spezifischen Primärkultur vorliegen. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da der Einsatz aller Antagonisten (YM202074, MTEP, D-AP5, GYKI53655) technisch nicht in einem Messprotokoll für Calcium-Imaging Versuche durchführbar war. Dennoch ist von Interesse, ob iGluRs und mGluRs auf bestimmten Zellen koexprimiert werden, da auch in der Fachliteratur Wechselwirkungen zwischen iGluRs und mGluRs beschrieben wurden. So konnte mittels Calcium-Imaging Versuchen in kultivierten corticalen Zellen der Ratte eine Verstärkung von Kainatrezeptor Signalen durch Gruppe I mGluRs gezeigt werden [621]. Des Weiteren potenzierte mGluR1 die Antwort von NMDA-Rezeptoren in elektrophysiologischen Studien an Oozyten von

Fröschen der Gattung *Xenopus laevis* [620]. Der Ablauf dieser Beeinflussung von iGluRs durch mGluRs wurde noch nicht abschließend geklärt, es besteht jedoch die Vermutung, dass dies über Gerüstproteine wie z.B. Homer-Proteine (*Abb. EIN 11*) vonstatten gehen könnte [622].

Eine Interaktion zwischen iGluRs und mGluRs konnte mittels der in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Versuche nicht ausgeschlossen werden. Es könnte also sein, dass es durch Kollokationen beider Rezeptor Familien gegebenenfalls zu Interaktionen kam, welche Auswirkungen auf Calciumsignale der Neurone und Astrozyten der SFO-spezifischen Zellkultur hatten. Daraus könnte folgerichtig der Schluss gezogen werden, dass beide Gruppen nicht vollständig getrennt voneinander zu betrachten sind. Andere Autoren haben allerdings beschrieben, dass durch die räumliche Trennung von iGluRs und mGluRs eine separierte Aktivierung beider wahrscheinlich sei, dementsprechend iGluRs und mGluRs separat betrachtet werden können [779].

Interaktionen von Glutamatrezeptoren mit anderen Rezeptoren oder Peptiden konnten im Rahmen der in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Versuche gezeigt werden (*Kap. ERG 3.3.1.4*). So führte eine Kostimulation von Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Glutamat und dem erst 2013 entdeckten Neuropeptid Phoenixin [674, 675] in 25 % der Neurone und 20 % der Astrozyten zu einem durch Phoenixin abgeschwächten Calciumsignal (*Abb. ERG 38*). Die Modulation der Glutamat induzierten Calciumsignale könnte dabei zum einen darauf beruhen, dass Phoenixin einen Teil der Glutamatrezeptoren kompetitiv antagonisierte, zum anderen könnte es durch Interaktionen zwischen Glutamat- und Phoenixinrezeptoren auf je einer Zelle zu dieser Abschwächung der Calciumsignale gekommen sein. Da bislang wenige Daten zu Phoenixin, seiner physiologischen Bedeutung oder zu Interaktionen mit anderen Neuropeptiden vorliegen, bleibt die funktionelle Interpretation dieser Befunde zunächst spekulativ. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass das Rezeptorprotein für Phoenixin sowohl im gesamten Hypothalamus als auch im SFO stark exprimiert wird [780, 781]. Weiterhin wurde Phoenixin mit reproduktiven Aufgaben [782–784], Aufgaben im Energiestoffwechsel [785, 786], Modulationen der Herzfunktion [787] sowie Angst, Stress und Gedächtnismodulationen [788–790] in Verbindung gebracht. Die exakten Funktionen von Phoenixin, vor allem hinsichtlich der Interaktion mit Glutamatrezeptoren des SFOs, kann in künftigen Studien unter Einsatz weiterer methodischer Ansätze charakterisiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Das in der *Lamina terminalis* des rostralen Hypothalamus in unmittelbarer Nähe zum dritten Hirnventrikel gelegene *Organum subfornicale* (SFO) der Ratte repräsentiert ebenso wie das analoge *Organum subseptale* (SSO) des Huhnes eines der sensorischen zirkumventrikulären Organe (CVOs) des Gehirns. Aufgrund ihrer Lage, der hohen Dichte fenestrierter Kapillaren und dem Vorhandensein zahlreicher paravollularer Neurone spielen sowohl das SFO als auch das SSO eine entscheidende Rolle als sensorische neuro-gliale Messfühler u.a. im Rahmen der zentralnervösen Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes sowie des Kreislaufsystems. Neurone und auch gliale Zellen beider CVOs sind dabei in der Lage, aufgrund der durchlässigen endothelialen Blut-Hirn Schranke im Blut zirkulierende Signalmoleküle wie Angiotensin II (ANG II) oder Elektrolyte zu detektieren. Basierend auf den reziproken neuronalen Verbindungen zu über- bzw. nachgeordneten (extra-)hypothalamischen Hirnstrukturen kommt es zu einer finalen Induktion von Trinkwasseraufnahme, peripherer Vasokonstriktion, renaler Natrium- und Wasserretention sowie Sympathikusaktivierung. Für die sensorischen Funktionen des SFOs der Ratte respektive des SSOs des Huhnes gibt es in der Fachliteratur der letzten 40 Jahre zahlreiche Hinweise darauf, dass dabei sowohl das zirkulierende Renin-Angiotensin System (RAS) mit seinem finalen Peptidhormon ANG II eine entscheidende Rolle spielt als auch ein postuliertes SFO- bzw. SSO-intrinsisches RAS von Bedeutung sein könnte. Weiterhin könnte dem im ZNS wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat (GLUT) durch Aktivierung iono- und metabotroper Rezeptorproteine im SFO der Ratte eine entscheidende Rolle im Rahmen der neuronalen Integration perzipierter afferenter Informationen zukommen. Ziel der hier vorliegenden Promotionsarbeit war es daher, einerseits die Expression einzelner Komponenten eines SFO- bzw. SSO-intrinsischen RAS in der Primärzellkultur zu identifizieren sowie die funktionale biologische Aktivität der Schlüsselenzyme nachzuweisen. Für das glutamaterge System sollte andererseits die funktionale Expression metabotroper und ionotroper Rezeptoren in Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur charakterisiert werden.

Zur Charakterisierung eines SFO-intrinsischen RAS wurde eine neuro-gliale Primärzellkultur dieses sensorischen CVOs aus dem Gehirn neonataler Ratten etabliert und nach vier- bis fünftägiger Kultivierung, welche der Differenzierung der Zellen diente, für *in vitro* Studien herangezogen. Mittels immunzytochemischer Untersuchungen

unter Einsatz spezifischer Antikörper / -seren gegen einzelne Komponenten des RAS wurde die Expression des Präkursorproteins Angiotensinogen (Aogen) ausschließlich in Vimentin-immunopositiven Zellen nachgewiesen, bei denen es sich vermutlich um Tanyzyten und / oder Astrozytenvorläuferzellen handelte. Das erst 2006 entdeckte Präkursorpeptid Angiotensin (1-12) (ANG (1-12)) wurde in SFO-intrinsischen Neuronen, und ANG II als aktive Komponente des SFO-intrinsischen RAS in perinukleären Vesikeln differenzierter Astrozyten detektiert. Des Weiteren konnte die Expression des *angiotensin-converting enzyme* (ACE), welches das Präkursorpeptid Angiotensin I (ANG I) zu ANG II konvertiert, in Neuronen, Astrozytenvorläuferzellen und differenzierten Astrozyten verifiziert werden. Die quantitative Erfassung der mRNA Expression für rattenspezifische(s) Aogen, Renin, ACE, Cathepsin D und Chymasen in der SFO-spezifischen Zellkultur mittels *real-time* PCR ergab hohe Expressionsraten für Aogen, ACE und Cathepsin D, wohingegen Renin und Chymasen niedrige Expressionsraten zeigten. Dies stellt eine Bestätigung der immunzytochemischen Analysen zum Nachweis der SFO-intrinsischen Biosynthese einzelner Komponenten des RAS dar.

Zahlreiche Calcium-Imaging Experimente in der SFO-spezifischen neuro-glialen Primärzellkultur dienten der funktionalen Expressionsanalyse wichtiger Schlüsselenzyme (Renin, ACE, Cathepsine, Chymasen) für die SFO-intrinsische Generierung des bioaktiven Neuropeptids ANG II. So induzierte die Superfusionsstimulation der SFO-spezifischen Primärzellkultur mit Aogen, ANG (1-12) bzw. ANG I im Rahmen der Signaltransduktion – hinsichtlich ihrer Amplitude quantifizierbare – transiente intrazelluläre Calciumsignale der Fura-2 beladenen Neurone und Astrozyten. Der Einsatz spezifischer Inhibitoren für Renin [Aogen → ANG I], ACE [ANG (1-12) bzw. ANG I → ANG II] sowie Cathepsine und Chymasen [Aogen bzw. ANG (1-12) → ANG II] bewirkte eine partielle bis vollständige Inhibition der durch Superfusion der Primärkulturen mit Aogen, ANG (1-12) oder ANG I induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in quantitativ erfassten und statistisch analysierten Zellpopulationen. Dementsprechend konnte mittels Calcium-Imaging Methodik die funktionale Expression von Renin, ACE sowie Cathepsin D bzw. Chymasen in der SFO-spezifischen Primärkultur demonstriert werden.

Die mittels Immunzytochemie (ACE) und *real-time* PCR (Renin, ACE, Cathepsin D, Chymasen) nachgewiesene Expression enzymatischer RAS-Komponenten konnte durch die funktionalen Analysen in der Primärzellkultur bestätigt werden.

Für die partielle, experimentelle Charakterisierung des vogelspezifischen SSO-intrinsischen RAS erfolgte zunächst die *de novo* Etablierung einer neuro-glialen Primärzellkultur dieses sensorischen CVOs aus dem Gehirn von Eintagsküken, basierend auf der Optimierung der Präparationstechnik. Nach vier- bis fünftägiger Kultivierung konnten Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen durch den immunzytochemischen Nachweis zelltypspezifischer Markerproteine identifiziert und quantitativ erfasst werden. In ersten Calcium-Imaging Experimenten an Fura-2 beladenen Neuronen und Astrozyten wurde erfolgreich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die durch ANG II induzierten intrazellulären Calciumsignale erstellt. Die offensichtliche Existenz eines ANG II spezifischen Rezeptors in Zellen der SSO-spezifischen Primärkultur wurde durch die vollständige Inhibition der durch ANG II hervorgerufenen transienten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in Gegenwart des auch bei Vögeln wirksamen kompetitiven Antagonisten  $[Sar^1, Ile^8]ANG II$  verifiziert. Analog zu den Studien in der Primärzellkultur des SFOs konnte in zahlreichen Zellen durch Einsatz eines spezifischen Inhibitors die Konversion von vogelspezifischem ANG I zu ANG II durch ACE und folgerichtig die Generierung intrazellulärer Calciumsignale partiell bzw. vollständig inhibiert werden. Diese vielversprechenden Ergebnisse mögen als Ausgangsbasis für weitere vergleichend biologische Studien dienen.

Für die Charakterisierung Glutamat-spezifischer Rezeptorproteine wurden SFO-spezifische Primärzellkulturen für *in vitro* Untersuchungen herangezogen. Mit Hilfe immunzytochemischer Analysen konnten dabei die metabotropen Glutamatrezeptoren 1 und 5 (mGluR1 und mGluR5) in SFO-spezifischen Neuronen und Astrozyten nachgewiesen werden. Außerdem wurde die Expression der mRNA für mGluR1 und mGluR5 in Zellen der SFO-spezifischen Primärzellkultur mittels PCR Untersuchungen gezeigt.

In zahlreichen Calcium-Imaging Studien in der SFO-spezifischen Primärkultur konnte die funktionale Expression beider Rezeptorproteine unter Einsatz subtypspezifischer Antagonisten für mGluR1 und mGluR5 in Neuronen und Astrozyten nachgewiesen werden. Es wurde eruiert, dass etwa ein Drittel der SFO-spezifischen Neurone metabotrope Glutamatrezeptoren exprimierten, wohingegen etwa drei Viertel der Astrozyten diese Rezeptoren exprimierten. Durch den Einsatz eines Agonisten für mGluR1 und mGluR5 konnten diese Ergebnisse zusätzlich untermauert werden. Mit Hilfe spezifischer Antagonisten für NMDA- und AMPA- bzw. Kainatrezeptoren in Calcium-Imaging Versuchen wurde außerdem die funktionale Expression ionotroper

Glutamatrezeptoren in SFO-spezifischen Neuronen und Astrozyten nachgewiesen. Glutamat induzierte Calciumsignale in Neuronen wurden dementsprechend vornehmlich durch ionotrope, in Astrozyten hingegen durch metabotrope Glutamatrezeptoren ausgelöst. Weiterhin wurden Glutamat induzierte Calciumsignale bei Koapplikation mit dem 2013 entdeckten Neuropeptid Phoenixin in etwa einem Viertel der SFO-spezifischen Neurone und Astrozyten abgeschwächt.

## 6. Summary

The mammalian *Organum subfornicale* (SFO) and the avian *Organum subseptale* (SSO) represent sensory circumventricular organs (CVO) in the brain and are located in the *Lamina terminalis* close to the third ventricle. Because of their location, the lack of an endothelial blood brain barrier function and the existence of many parvocellular neurons the SFO as well as SSO play eminent roles as sensory elements in the central control of body fluid or cardiovascular homeostasis. Neurons and glial cells of both CVOs are, due to their lack of an endothelial blood brain barrier function, able to sense elevated levels of plasma hormones like angiotensin II (ANG II) and extracellular tonicity. Based on reciprocal neuronal connections to hypothalamic integrative brain structures, final induction of thirst, peripheral vasoconstriction, renal sodium or water retention and sympathetic activation is triggered. The circulating renin-angiotensin system (RAS) with its final neuropeptide ANG II as well as an SFO-respectively SSO-intrinsic RAS are discussed to be responsible for these actions. Moreover glutamate (GLUT), as the most important excitatory neurotransmitter in the central nervous system, could play an eminent role in the rat SFO for the neuronal integration of perceived afferent information. Aims of the present studies were therefore, on the one hand to identify the expression of specific components of an SFO- and SSO-intrinsic RAS, and on the other hand to verify the functional activity of RAS key enzymes. Concerning the glutamatergic system, the functional expression of metabotropic and ionotropic receptors in SFO-specific cells should be distinguished.

In order to characterize an SFO-intrinsic RAS, primary neuro-glial cell cultures of postnatal rat SFO explants were prepared and used for *in vitro* analysis. Using immunocytochemistry and specific antibodies against different RAS components, the expression of angiotensinogen (Aogen) in vimentin-immunopositive tanycytes was detected. The precursor peptide angiotensin (1-12) (ANG (1-12)) was found in SFO-specific neurons, whereas ANG II as the active RAS compound was proved to be expressed in astrocytes. The key enzyme angiotensin-converting enzyme (ACE), which converts angiotensin I (ANG I) into ANG II, could be verified in neurons, astrocytes and tanycytes. Using quantitative real-time PCR, high expression rates for Aogen, ACE and cathepsin D could be determined, whereas the expression rates for renin and chymases were low, confirming the immunocytochemical detections of RAS components.

Numerous calcium-imaging studies were used to determine the functional expression of eminent key enzymes (renin, ACE, cathepsins, chymases), which form SFO-intrinsic ANG II. Superfusion stimulations with Aogen, ANG (1-12) and ANG I induced transient intracellular calcium signals in SFO-specific neurons and astrocytes. These elevations of intracellular calcium concentrations could be completely or at least partially inhibited with the use of specific inhibitors for key enzymes like renin [Aogen → ANG I], ACE [ANG (1-12) → ANG II resp. ANG I → ANG II] as well as cathepsins and chymases [Aogen → ANG II resp. ANG (1-12) → ANG II]. These results demonstrate the functional expression of renin, ACE as well as cathepsins and chymases in SFO primary cell cultures and confirm the results gained with immunocytochemistry (ACE) and real-time PCR (Renin, ACE, Cathepsin D, Chymases).

In order to partially characterize an intrinsic RAS in the avian SSO, primary neuroglial cell cultures of this brain structure had to be established *de novo*. Neurons, astrocytes and microglial cells could be identified with the help of immunocytochemical analysis after four to five days of cultivation. Preliminary calcium-imaging experiments were applied to successfully show a dose-dependency of SSO-specific neurons and astrocytes for intracellular calcium signals caused by ANG II superfusions. The existence of an ANG II specific receptor in cells of SSO primary cell cultures was verified by the complete inhibition of calcium signalling in the presence of [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]ANG II as a competitive antagonist for the avian ANG II specific receptor. Numerous elevations of intracellular calcium concentrations in SSO-specific cells, provoked by superfusion stimulations with ANG I, could be inhibited using a specific inhibitor for ACE. Based on these results further comparative studies between the avian SSO-and mammalian SFO-specific RAS can be performed.

For the characterization of glutamatergic receptors, SFO-specific primary neuroglial cell cultures for used for *in vitro* studies. The expression of metabotropic glutamate receptors 1 and 5 (mGluR1 and mGluR5) as well as their mRNA expression in SFO-specific neurons and astrocytes could be verified by immunocytochemistry and real-time PCR analysis.

Calcium-imaging studies with the use of specific antagonists were applied in order to demonstrate the functional expression of mGluR1 and mGluR5 in SFO-specific neurons and astrocytes. Approximately one third of all investigated neurons and three quarters of all investigated astrocytes expressed metabotropic glutamate receptors.

These results could be confirmed using a specific agonist. Antagonists for NMDA, AMPA and kainate receptors were used in calcium-imaging studies to prove the expression of ionotropic receptors in SFO-specific neurons and astrocytes. According to these results mainly ionotropic glutamate receptors were responsible for GLUT induced calcium signalling in neurons, whereas GLUT induced calcium signals in astrocytes were mainly provoked by metabotropic glutamate receptors. Furthermore GLUT induced calcium signalling in approximately 20 percent of SFO-specific neurons and astrocytes was inhibited by the newly discovered neuropeptide Phoenixin.

## 7. Verzeichnisse

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AAT	Aspartat-Aminotransferase
Aqua bidest	<i>Aqua bidestillata</i> (zweifach destilliertes Wasser)
AC	Adenylatcyklase
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ACh	Acetylcholin
ADH	Antidiuretisches Hormon
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoazolepropionsäure
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
ANG (1-12)	Angiotensin (1-12)
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Aogen	Angiotensinogen
AP	<i>Area postrema</i>
ARC	<i>Nucleus arcuatus</i>
ARW	Anregungswellenlänge
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Angiotensin-Rezeptor
AT <sub>1</sub> R	Angiotensin-1 Rezeptor
AT <sub>2</sub> R	Angiotensin-2 Rezeptor
AVP	Vasopressin
AVT	Arginin-Vasotocin
BHS	Blut-Hirn Schranke
BNTS	<i>Nucleus striae terminalis</i>
Ca	<i>Commissura anterior</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cATR	Vogelspezifischer Angiotensin-Rezeptor
CHAT	Cholin-Acetyltransferase

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ChP	<i>Plexus choroideus</i>
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CVLM	Caudo-ventrolaterale <i>Medulla</i>
CVO	Zirkumventrikuläres Organ
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAAT	<i>excitatory amino acid transporter</i>
EET	Epoxyeicosatriensäure
EH	Energiehaushalt
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ET-3	Endothelin-3
EZ	Ependymzelle
EZF	Extrazellulärflüssigkeit
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLN	Glutamin
GLUT	Glutamat
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse
i.c.	Intracranial
i.c.v.	Intracerebroventriculär
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
i.v.	Intravenös
K <sup>+</sup>	Kalium
Kainat	2-Carboxy-3-Carboxymethyl-4-Isopropenylpyrrolidin
K <sub>ATP</sub>	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
KMZ	Kardiomyozyt
LFB	<i>luxol-fast-blue</i>
LH	Lateraler Hypothalamus
LPS	Lipopolysacharid

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
LSO	<i>Organum septale laterale</i>
LT	<i>Lamina terminalis</i>
mAChR	Muskarinerner Acetylcholin Rezeptor
MAPK	<i>mitogen associated protein kinase</i>
MAP	<i>microtubule associated protein</i>
ME	<i>Eminentia mediana</i>
MSG	Monosodiumglutamat
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
MnPO	<i>Nucleus praeopticus medianus</i>
NA	Noradrenalin
Na <sup>+</sup>	Natrium
nAChR	Nikotinerger Acetylcholin Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>x</sub> -Kanal	Atypischer Natriumkanal
NDS	<i>normal donkey serum</i>
NH	Neurohypophyse
NHpC	<i>Nucleus commissurae hippocampale</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid Synthase
NR	<i>Nuclei raphes</i>
NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
OvLT	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBN	<i>Nucleus parabrachialis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
Phoe	Phoenixin
PIN	<i>Corpus pineale</i>
PKC	Proteinkinase C

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PLC	Phospholipase C
POA	Präoptische Region
PRR	Prorenin-Rezeptor
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
PVO	<i>Organum paraventriculare</i>
RAS	Renin-Angiotensin System
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
RVLM	Rostro-ventrolaterale <i>Medulla</i>
s.c.	Subkutan
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SCO	<i>Organum subcommissurale</i>
STO	<i>Organum subtrochleare</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
t-PA	<i>tissue plasminogen activator</i>
S.E.M.	Standardfehler der Mittelwerte
SON	<i>Nucleus supraopticus</i>
SFO	<i>Organum subfornicale</i>
SSO	<i>Organum subseptale</i>
TDP	Tetradecapeptid
TJ	<i>tight junction</i>
vGLUT	Vesikulärer Glutamattransporter
TRPV	<i>transient receptor potential vanilloid</i>
WRP	Wasch- und Regenerationsphase
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7.2 Literaturverzeichnis

- [1] **J. Correale, A. Villa** (2009): Cellular elements of the blood-brain barrier, *Neurochemical Research* 34: 2067–2077.
- [2] **C. Greene, N. Hanley, M. Campbell** (2019): Claudin-5: Gatekeeper of neurological function, *Fluids and Barriers of the CNS* 16: 3.
- [3] **N.J. Abbott** (2005): Dynamics of CNS barriers: Evolution, differentiation, and modulation, *Cellular and Molecular Neurobiology* 25: 5–23.
- [4] **N.R. Saunders, C.J. Ek, M.D. Habgood, K.M. Dziegielewska** (2008): Barriers in the brain: A renaissance?, *Trends in Neurosciences* 31: 279–286.
- [5] **W.J. Kuenzel, A. van Tienhoven** (1982): Nomenclature and location of avian hypothalamic nuclei and associated circumventricular organs, *The Journal of Comparative Neurology* 206: 293–313.
- [6] **S. Morita, S. Miyata** (2012): Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain, *Cell and Tissue Research* 349: 589–603.
- [7] **E.E. Benarroch** (2011): Circumventricular organs: Receptive and Homeostatic Functions and Clinical Implications, *Neurology* 77: 1198–1204.
- [8] **C.C.T. Hindmarch, A.V. Ferguson** (2016): Physiological roles for the subfornical organ: A dynamic transcriptome shaped by autonomic state, *The Journal of Physiology* 594: 1581–1589.
- [9] **J.-S. Joly, J. Osorio, A. Alunni, H. Auger, S. Kano, S. Retaux** (2007): Windows of the brain: Towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18: 512–524.
- [10] **G.T. Cottrell, A.V. Ferguson** (2004): Sensory circumventricular organs: Central roles in integrated autonomic regulation, *Regulatory Peptides* 117: 11–23.
- [11] **H.M. Duvernoy, P.-Y. Risold** (2007): The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization, *Brain Research Reviews* 56: 119–147.
- [12] **C. Kaur, E.-A. Ling** (2017): The circumventricular organs, *Histology and Histopathology* 32: 879–892.
- [13] **C. Bouchaud, M. Le Bert, P. Dupouey** (1989): Are close contacts between astrocytes and endothelial cells a prerequisite condition of a blood-brain barrier? The rat subfornical organ as an example, *Biology of the Cell* 67: 159–165.
- [14] **T. Petrov, A.G. Howarth, T.L. Krukoff, B.R. Stevenson** (1994): Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS, *Brain research. Molecular Brain Research* 21: 235–246.
- [15] **G.B. Wislocki, E.H. Leduc** (1952): Vital staining of the hematoencephalic barrier by silver nitrate and trypan blue, and cytological comparisons of the neurohypophysis, pineal body, area postrema, intercolumnar tubercle and supraoptic crest, *The Journal of Comparative Neurology* 96: 371–413.
- [16] **J.S. Kizer, M. Palkovits, M.J. Brownstein** (1976): Releasing factors in the circumventricular organs in the rat brain, *Endocrinology* 98: 311–317.
- [17] **A. Weindl, A. Schwink, R. Wetzstein** (1967): The fine structure of the vascular organ of the lamina terminalis in rabbits, *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 79: 1–48.
- [18] **W.F. Ganong** (2000): Circumventricular organs: Definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 27: 422–427.
- [19] **H. Hofer** (1958): Zur Morphologie der circumventrikulären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere, *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*: 202–251.
- [20] **M.J. McKinley, R.M. McAllen, P. Davern, M.E. Giles, J. Penschow, N. Sunn, A. Uschakov, B.J. Oldfield** (2003): The sensory circumventricular organs of the mammalian brain, *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 172: III-XII, 1-122.

- 
- [21] **P. Mestres, K. Rascher** (1994): The ventricular system of the pigeon brain: A scanning electron microscope study, *Journal of Anatomy* 184: (Pt 1) 35–58.
- [22] **S. Mikami, T. Kurosu, D.S. Farner** (1975): Light- and electron-microscopic studies on the secretory cytology of the adenohypophysis of the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*, *Cell and Tissue Research* 159: 147–165.
- [23] **A.K. Johnson, P.M. Gross** (1993): Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways, *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7: 678–686.
- [24] **K.M. Dziegielewska, J. Ek, M.D. Habgood, N.R. Saunders** (2001): Development of the choroid plexus, *Microscopy Research and Technique* 52: 5–20.
- [25] **D.F. Emerich, A.V. Vasconcellos, R.B. Elliott, S.J.M. Skinner, C.V. Borlongan** (2004): The choroid plexus: Function, pathology and therapeutic potential of its transplantation, *Expert Opinion on Biological Therapy* 4: 1191–1201.
- [26] **M.J. Schmidt, C. Rummel, J. Hauer, M. Kolecka, N. Ondreka, V. McClure, J. Roth** (2016): Increased CSF aquaporin-4, and interleukin-6 levels in dogs with idiopathic communicating internal hydrocephalus and a decrease after ventriculo-peritoneal shunting, *Fluids and Barriers of the CNS* 13: 12.
- [27] **A.V. Ferguson, J.S. Bains** (1997): Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: Implications for long term control of autonomic output, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 24: 96–101.
- [28] **J.B. Simpson, A. Routtenberg** (1975): Subfornical organ lesions reduce intravenous angiotensin-induced drinking, *Brain Research* 88: 154–161.
- [29] **M.L. Mangiapane, J.B. Simpson** (1980): Subfornical organ lesions reduce the pressor effect of systemic angiotensin II, *Neuroendocrinology* 31: 380–384.
- [30] **M. Iovino, L. Steardo** (1984): Vasopressin release to central and peripheral angiotensin II in rats with lesions of the subfornical organ, *Brain Research* 322: 365–368.
- [31] **R. Dantzer, J.P. Konsman, R.M. Bluthé, K.W. Kelley** (2000): Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: Parallel or convergent?, *Autonomic Neuroscience Basic & Clinical* 85: 60–65.
- [32] **R. Dantzer, J.C. O'Connor, G.G. Freund** (2008): R.W. Johnson, K.W. Kelley, From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain, *Nature Reviews. Neuroscience* 9: 46–56.
- [33] **T. Riediger, H.A. Schmid, T. Lutz, E. Simon** (2001): Amylin potently activates AP neurons possibly via formation of the excitatory second messenger cGMP, *American Journal of Physiology* 281: R1833-43.
- [34] **N.E. Rowland, R.M. Richmond** (1999): Area postrema and the anorectic actions of dexfenfluramine and amylin, *Brain Research* 820: 86–91.
- [35] **P.M. Sexton, G. Paxinos, M.A. Kenney, P.J. Wookey, K. Beaumont** (1994): In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain, *Neuroscience* 62: 553–567.
- [36] **L. Ever, N. Gaiano** (2005): Radial 'glial' progenitors: Neurogenesis and signaling, *Current Opinion in Neurobiology* 15: 29–33.
- [37] **M. Gotz** (2003): Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: Developmental perspectives on neural stem cells, *The Neuroscientist a Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 9: 379–397.
- [38] **M. Gotz, Y.-A. Barde** (2005): Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons, *Neuron* 46: 369–372.
- [39] **H. Rützel, T.H. Schiebler** (1980): Prenatal and early postnatal development of the glial cells in the median eminence of the rat, *Cell and Tissue Research* 211: 117–137.
- [40] **K. Akert, H.D. Potter, J.W. Anderson** (1961): The subfornical organ in mammals. I. Comparative and topographical anatomy, *The Journal of Comparative Neurology* 116: 1–13.

- 
- [41] **H.D. Dellmann** (1998): Structure of the subfornical organ: A review, *Microscopy Research and Technique* 41: 85–97.
- [42] **P.J. Larsen, J.D. Mikkelsen** (1995): Functional identification of central afferent projections conveying information of acute "stress" to the hypothalamic paraventricular nucleus, *The Journal of Neuroscience* 15: 2609–2627.
- [43] **P.J. Larsen, M. Moller, J.D. Mikkelsen** (1991): Efferent projections from the periventricular and medial parvicellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat: A Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study, *The Journal of Comparative Neurology* 306: 462–479.
- [44] **K. Szabo** (1983): The vascular architecture of the developing organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) in the rat, *Cell and Tissue Research* 233: 579–592.
- [45] **K. Yamaguchi, A. Morimoto, N. Murakami** (1993): Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) in rabbit and rat: Topographic studies, *The Journal of Comparative Neurology* 330: 352–362.
- [46] **M.J. McKinley, D.A. Denton, M. Leventer, J. Penschow, R.S. Weisinger, R.D. Wright** (1983): Morphology of the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) of the sheep, *Brain Research Bulletin* 11: 649–657.
- [47] **M.J. McKinley, A.M. Allen, J. Clevers, G. Paxinos, F.A. Mendelsohn** (1987): Angiotensin receptor binding in human hypothalamus: Autoradiographic localization, *Brain Research* 420: 375–379.
- [48] **M.J. McKinley, A.M. Allen, P. Burns, L.M. Colvill, B.J. Oldfield** (1998): Interaction of circulating hormones with the brain: The roles of the subfornical organ and the organum vasculosum of the lamina terminalis, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology. Supplement* 25: S61-7.
- [49] **M.E. Giles, R.T. Fernley, Y. Nakamura, I. Moeller, G.P. Aldred, T. Ferraro, J.D. Penschow, M.J. McKinley, B.J. Oldfield** (1999): Characterization of a specific antibody to the rat angiotensin II AT1 receptor, *The journal of histochemistry and cytochemistry Official Journal of the Histochemistry Society* 47: 507–516.
- [50] **A.M. Allen, J. Zhuo, F.A. Mendelsohn** (2000): Localization and function of angiotensin AT1 receptors, *American Journal of Hypertension* 13: 31S-38S.
- [51] **H. Duvernoy, J.G. Koritke** (1964): The Vascular Supply Of The Lamina Terminalis In Various Birds, *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft* 58: 391–404.
- [52] **R.M. Torack, E.H. Finke** (1971): Evidence for a sequestration of function within the area postrema based on scanning electron microscopy and the penetration of horseradish peroxidase, *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria)* 118: 85–96.
- [53] **E.W. Dempsey** (1973): Neural and vascular ultrastructure of the area postrema in the rat, *The Journal of Comparative Neurology* 150: 177–199.
- [54] **F.M. Faraci, J. Choi, G.L. Baumbach, W.G. Mayhan, D.D. Heistad** (1989): Microcirculation of the area postrema. Permeability and vascular responses, *Circulation Research* 65: 417–425.
- [55] **P.M. Gross** (1991): Morphology and physiology of capillary systems in subregions of the subfornical organ and area postrema, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 69: 1010–1025.
- [56] **M.D. Joy** (1971): The intramedullary connections of the area postrema involved in the central cardiovascular response to angiotensin II, *Clinical Science* 41: 89–100.
- [57] **R.A. Leslie** (1986): Comparative aspects of the area postrema: Fine-structural considerations help to determine its function, *Cellular and Molecular Neurobiology* 6: 95–120.
- [58] **A.D. Miller, R.A. Leslie** (1994): The area postrema and vomiting, *Frontiers in Neuroendocrinology* 15: 301–320.
- [59] **A. Porzionato, V. Macchi, L. Morsut, A. Parenti, R. de Caro** (2005): Microvascular patterns in human medullary tegmentum at the level of the area postrema, *Journal of Anatomy* 206: 405–410.

- [60] **R.E. Shapiro, R.R. Miselis** (1985): The central neural connections of the area postrema of the rat, *The Journal of Comparative Neurology* 234: 344–364.
- [61] **M. Srinivasan, F. Bongiani, G.A. Fontana, T. Pantaleo** (1993): Respiratory responses to electrical and chemical stimulation of the area postrema in the rabbit, *The Journal of Physiology* 463: 409–420.
- [62] **M.K. Sun, K.M. Spyer** (1991): GABA-mediated inhibition of medullary vasomotor neurones by area postrema stimulation in rats, *The Journal of Physiology* 436: 669–684.
- [63] **D. van der Kooy, L.Y. Koda** (1983): Organization of the projections of a circumventricular organ: The area postrema in the rat, *The Journal of Comparative Neurology* 219: 328–338.
- [64] **R. Kroidl** (1968): The arterial and venous supply of the area postrema of the rat, *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria 1948)* 89: 430–452.
- [65] **G.I. Roth, W.S. Yamamoto** (1968): The microcirculation of the area postrema in the rat, *The Journal of Comparative Neurology* 133: 329–340.
- [66] **P.M. Gross** (1992): Circumventricular organ capillaries, *Progress in Brain Research* 91: 219–233.
- [67] **N.M. Sposito, P.M. Gross** (1987): Topography and morphometry of capillaries in the rat subfornical organ, *The Journal of Comparative Neurology* 260: 36–46.
- [68] **H.D. Dellmann, J.B. Simpson** (1979): The subfornical organ, *International Review of Cytology* 58: 333–421.
- [69] **S.W. Shaver, M. Kadekaro, P.M. Gross** (1990): Differential rates of glucose metabolism across subregions of the subfornical organ in Brattleboro rats, *Regulatory Peptides* 27: 37–49.
- [70] **R.W. Lind** (1986): Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system, *Brain Research* 384: 250–261.
- [71] **C.B. Saper, D. Levisohn** (1983): Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: Anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region, *Brain Research* 288: 21–31.
- [72] **R.R. Miselis** (1981): The efferent projections of the subfornical organ of the rat: A circumventricular organ within a neural network subserving water balance, *Brain Research* 230: 1–23.
- [73] **K. Gruber, A. McRae-Degueurce, L.D. Wilkin, L.D. Mitchell, A.K. Johnson** (1987): Forebrain and brainstem afferents to the arcuate nucleus in the rat: Potential pathways for the modulation of hypophyseal secretions, *Neuroscience Letters* 75: 1–5.
- [74] **L.W. Swanson, R.W. Lind** (1986): Neural projections subserving the initiation of a specific motivated behavior in the rat: New projections from the subfornical organ, *Brain Research* 379: 399–403.
- [75] **O. Spoerri** (1963): Concerning The Vascularization Of The Subfornical Organ Of The Rat, *Acta Anatomica* 54: 333–348.
- [76] **H.D. Dellmann, L.F. Lue, S.I. Bellin** (1987): Fine structural characteristics of neurophysin-positive perivascular plexus that develop in the rat hypothalamus following interruption of the hypothalamo-neurohypophysial tract, *Cell and Tissue Research* 247: 137–143.
- [77] **H.D. Dellmann, S.J. Stahl** (1984): Fine structural cytology of the rat subfornical organ during ontogenesis, *Brain Research Bulletin* 13: 135–145.
- [78] **S. Miyata** (2015): New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains, *Frontiers in Neuroscience* 9: 390.
- [79] **S. Morita, E. Furube, T. Mannari, H. Okuda, K. Tatsumi, A. Wanaka, S. Miyata** (2016): Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain, *Cell and Tissue Research* 363: 497–511.

- [80] **L. Dimou, M. Simons** (2017): Diversity of oligodendrocytes and their progenitors, *Current Opinion in Neurobiology* 47: 73–79.
- [81] **F. Langlet, A. Mullier, S.G. Bouret, V. Prevot, B. Dehouck** (2013): Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain, *The Journal of Comparative Neurology* 521: 3389–3405.
- [82] **M. Prager-Khoutorsky, C.W. Bourque** (2015): Anatomical organization of the rat organum vasculosum laminae terminalis, *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 309: R324-37.
- [83] **B.V. Zlokovic** (2011): Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders, *Nature reviews. Neuroscience* 12: 723–738.
- [84] **A. Castaneyra-Perdomo, G. Meyer, D.J. Heylings** (1992): Early development of the human area postrema and subfornical organ, *The Anatomical Record* 232: 612–619.
- [85] **C. Kiecker** (2018): The origins of the circumventricular organs, *Journal of Anatomy* 232: 540–553.
- [86] **V. Fotaki, D.J. Price, J.O. Mason** (2008): Newly identified patterns of Pax2 expression in the developing mouse forebrain, *BMC Developmental Biology* 8: 79.
- [87] **Z. Lenkei, P. Corvol, C. Llorens-Cortes** (1995): The angiotensin receptor subtype AT1A predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control, *Brain research. Molecular Brain Research* 30: 53–60.
- [88] **Z. Lenkei, M. Palkovits, P. Corvol, C. Llorens-Cortès** (1997): Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: A functional neuroanatomical review, *Frontiers in Neuroendocrinology* 18: 383–439.
- [89] **M. van Houten, E.L. Schiffrin, J.F. Mann, B.I. Posner, R. Boucher** (1980): Radioautographic localization of specific binding sites for blood-borne angiotensin II in the rat brain, *Brain Research* 186: 480–485.
- [90] **M. van Houten, M.L. Mangiapane, I.A. Reid, W.F. Ganong** (1983): [Sar,Ala] angiotensin II in cerebrospinal fluid blocks the binding of blood-borne 125Iangiotensin II to the circumventricular organs, *Neuroscience* 10: 1421–1426.
- [91] **M. van Houten, B.I. Posner** (1983): Circumventricular organs: Receptors and mediators of direct peptide hormone action on brain, *Advances in Metabolic Disorders* 10: 269–289.
- [92] **F.A. Mendelsohn, A.M. Allen, S.Y. Chai, P.M. Sexton, R. Figdor** (1987): Overlapping distributions of receptors for atrial natriuretic peptide and angiotensin II visualized by in vitro autoradiography: Morphological basis of physiological antagonism, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 65: 1517–1521.
- [93] **P.A. Phillips, J.M. Abrahams, J. Kelly, G. Paxinos, Z. Grzonka, F.A. Mendelsohn, C.I. Johnston** (1988): Localization of vasopressin binding sites in rat brain by in vitro autoradiography using a radioiodinated V1 receptor antagonist, *Neuroscience* 27: 749–761.
- [94] **T.Y. Hiyama, E. Watanabe, H. Okado, M. Noda** (2004): The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na(x) sodium channels for the control of salt-intake behavior, *The Journal of Neuroscience* 24: 9276–9281.
- [95] **B. Nehmé, M. Henry, D. Mouginot, G. Drolet** (2012): The Expression Pattern of the Na(+) Sensor, Na(X) in the Hydromineral Homeostatic Network: A Comparative Study between the Rat and Mouse, *Frontiers in Neuroanatomy* 6: 26.
- [96] **V. Vialou, A. Amphoux, R. Zwart, B. Giros, S. Gautron** (2004): Organic cation transporter 3 (Slc22a3) is implicated in salt-intake regulation, *The Journal of Neuroscience* 24: 2846–2851.
- [97] **K.V. Rogers, C.K. Dunn, S.C. Hebert, E.M. Brown** (1997): Localization of calcium receptor mRNA in the adult rat central nervous system by in situ hybridization, *Brain Research* 744: 47–56.

- [98] **R. Goke, P.J. Larsen, J.D. Mikkelsen, S.P. Sheikh** (1995): Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: Evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites, *The European Journal of Neuroscience* 7: 2294–2300.
- [99] **T. Kishi, C.J. Aschkenasi, B.J. Choi, M.E. Lopez, C.E. Lee, H. Liu, A.N. Hollenberg, J.M. Friedman, J.K. Elmquist** (2005): Neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in rodent brain: Distribution and colocalization with melanocortin-4 receptor, *The Journal of Comparative Neurology* 482: 217–243.
- [100] **P.M. Smith, A.P. Chambers, C.J. Price, W. Ho, C. Hopf, K.A. Sharkey, A.V. Ferguson** (2009): The subfornical organ: A central nervous system site for actions of circulating leptin, *American Journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296: R512-20.
- [101] **K.J. Pulman, W.M. Fry, G.T. Cottrell, A.V. Ferguson** (2006): The subfornical organ: A central target for circulating feeding signals, *The Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26: 2022–2030.
- [102] **S.W. Barth, T. Riediger, T.A. Lutz, G. Rechkemmer** (2004): Peripheral amylin activates circumventricular organs expressing calcitonin receptor a/b subtypes and receptor-activity modifying proteins in the rat, *Brain Research* 997: 97–102.
- [103] **H.A. Schmid, M. Rauch, J. Koch** (1998): Effect of calcitonin on the activity of ANG II-responsive neurons in the rat subfornical organ, *The American Journal of Physiology* 274: R1646-52.
- [104] **J. Roth, E.-M. Harre, C. Rummel, R. Gerstberger, T. Hubschle** (2004): Signaling the brain in systemic inflammation: Role of sensory circumventricular organs, *Frontiers in Bioscience a Journal and Virtual Library* 9: 290–300.
- [105] **S. Lacroix, D. Feinstein, S. Rivest** (1998): The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations, *Brain Pathology* 8: 625–640.
- [106] **K. Matsumura, Y. Watanabe, H. Onoe, O. Hayaishi** (1990): High density of prostaglandin E2 binding sites in the anterior wall of the 3rd ventricle: A possible site of its hyperthermic action, *Brain Research* 533: 147–151.
- [107] **Y. Takahashi, P. Smith, A. Ferguson, Q.J. Pittman** (1997): Circumventricular organs and fever, *The American Journal of Physiology* 273: R1690-5.
- [108] **S.J. Somponpun, A.K. Johnson, T. Beltz, C.D. Sladek** (2004): Estrogen receptor-alpha expression in osmosensitive elements of the lamina terminalis: Regulation by hypertonicity, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative physiology* 287: R661-9.
- [109] **T.C.D. Burazin, K.J. Johnson, S. Ma, R.A.D. Bathgate, G.W. Tregear, A.L. Gundlach** (2005): Localization of LGR7 (relaxin receptor) mRNA and protein in rat forebrain: Correlation with relaxin binding site distribution, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1041: 205–210.
- [110] **D. O'Donnell, S. Ahmad, C. Wahlestedt, P. Walker** (1999): Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: Distinct distribution from GALR1, *The Journal of Comparative Neurology* 409: 469–481.
- [111] **Y.C. Patel, G. Baquiran, C.B. Srikant, B.I. Posner** (1986): Quantitative in vivo autoradiographic localization of 125I-Tyr11somatostatin-14- and Leu8,D-Trp22-125I-Tyr25somatostatin-28-binding sites in rat brain, *Endocrinology* 119: 2262–2269.
- [112] **W.J. Kuenzel** (2017): Mapping the brain of the chicken (*Gallus gallus*), with emphasis on the septal-hypothalamic region, *General and Comparative Endocrinology*.
- [113] **N.A. Aman, G. Nagarajan, S.W. Kang, M. Hancock, W.J. Kuenzel** (2016): Differential responses of the vasotocin 1a receptor (V1aR) and osmoreceptors to immobilization and osmotic stress in sensory circumventricular organs of the chicken (*Gallus gallus*) brain, *Brain Research* 1649: 67–78.
- [114] **O. Goren, I. Adorjan, M. Kalman** (2006): Heterogeneous occurrence of aquaporin-4 in the ependyma and in the circumventricular organs in rat and chicken, *Anatomy and Embryology* 211: 155–172.

- [115] **H.D. Dellmann, J.G. Linner** (1979): Ultrastructure of the subfornical organ of the chicken (*Gallus domesticus*), *Cell and Tissue Research* 197: 137–153.
- [116] **Y. Takei, K. Tsuneki, H. Kobayashi** (1978): Surface fine structure of the subfornical organ in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*, *Cell and Tissue Research* 191: 389–404.
- [117] **K. Tsuneki, Y. Takei, H. Kobayashi** (1978): Parenchymal fine structure of the subfornical organ in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*, *Cell and Tissue Research* 191: 405–419.
- [118] **U. Albrecht, H. Seulberger, H. Schwarz, W. Risau** (1990): Correlation of blood-brain barrier function and HT7 protein distribution in chick brain circumventricular organs, *Brain Research* 535: 49–61.
- [119] **H.A. Schmid** (1995): Regional differences in the blood-brain-barrier of the subfornical organs of rats and ducks (*Anas platyrhynchos*), *Journal für Hirnforschung* 36: 565–574.
- [120] **V. Esposito, G.V. Pelagalli, P. de Girolamo, G. Gargiulo** (2001): Anatomical distribution of NPY-like immunoreactivity in the domestic chick brain (*Gallus domesticus*), *The Anatomical Record* 263: 186–201.
- [121] **W.J. Kuenzel, J. McMurtry** (1988): Neuropeptide Y: Brain localization and central effects on plasma insulin levels in chicks, *Physiology & Behavior* 44: 669–678.
- [122] **G. Nagarajan, A. Jurkevich, S.W. Kang, W.J. Kuenzel** (2017): Anatomical and functional implications of corticotrophin-releasing hormone neurones in a septal nucleus of the avian brain: An emphasis on glial-neuronal interaction via V1a receptors in vitro, *Journal of Neuroendocrinology* 29.
- [123] **G.C. Panzica, R. Arevalo, F. Sanchez, J.R. Alonso, N. Aste, C. Viglietti-Panzica, J. Aijon, R. Vazquez** (1994): Topographical distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase in the brain of the Japanese quail, *The Journal of Comparative Neurology* 342: 97–114.
- [124] **J. Balthazart, G.C. Panzica, R.W. Krohmer** (2003): Anatomical relationships between aromatase-immunoreactive neurons and nitric oxide synthase as evidenced by NOS immunohistochemistry or NADPH diaphorase histochemistry in the quail forebrain, *Journal of Chemical Neuroanatomy* 25: 39–51.
- [125] **F. Sanchez, J.R. Alonso, R. Arevalo, G. Bruning, G.C. Panzica** (1996): Absence of coexistence between NADPH-diaphorase and antidiuretic hormone in the hypothalamus of two galliforms: Japanese quail (*Coturnix japonica*) and chicken (*Gallus domesticus*), *Neuroscience Letters* 216: 155–158.
- [126] **R. Selvam, A. Jurkevich, W.J. Kuenzel** (2015): Distribution of the vasotocin type 4 receptor throughout the brain of the chicken, *Gallus gallus*, *The Journal of Comparative Neurology* 523 335–358.
- [127] **G.R. Pleschka** (1993): Integrative and cellular aspects of autonomic functions: temperature and osmoregulation: Osmosensitive circumventricular structures connected to the paraventricular nucleus in the duck brain, first ed., John Libbey Eurotext.
- [128] **T.S. Dos Santos, J. Krüger, F.F. Melleu, C. Herold, K. Zilles, A. Poli, O. Güntürkün, J. Marino-Neto** (2015): Distribution of serotonin 5-HT<sub>1A</sub>-binding sites in the brainstem and the hypothalamus, and their roles in 5-HT-induced sleep and ingestive behaviors in rock pigeons (*Columba livia*), *Behavioural Brain Research* 295: 45–63.
- [129] **E. Oztas** (2003): Neuronal tracing, *Neuroanatomy* 2–5.
- [130] **A. Camacho, M.I. Phillips** (1981): Horseradish peroxidase study in rat of the neural connections of the organum vasculosum of the lamina terminalis, *Neuroscience Letters* 25: 201–204.
- [131] **A. V. Ferguson, T. A. Day, and L. P. Renaud**: Subfornical organ stimulation excites paraventricular neurons projecting to dorsal medulla.
- [132] **M.B. Gutman, J. Ciriello, G.J. Mogenson** (1986): Electrophysiological identification of forebrain connections of the subfornical organ, *Brain Research* 382: 119–128.

- 
- [133] **M.B. Gutman, D.L. Jones, J. Ciriello** (1989): Contribution of nucleus medianus to the drinking and pressor responses to angiotensin II acting at subfornical organ, *Brain Research* 488: 49–56.
- [134] **S.L. Hochstenbach, J. Ciriello** (1996): Effect of lesions of forebrain circumventricular organs on c-fos expression in the central nervous system to plasma hypernatremia, *Brain Research* 713: 17–28.
- [135] **R.W. Lind, G.W. van Hoesen, A.K. Johnson** (1982): An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat, *The Journal of Comparative Neurology* 210: 265–277.
- [136] **R.W. Lind, L.W. Swanson, D. Ganten** (1984): Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat, *Brain Research* 321: 209–215.
- [137] **P.-G. Duan, H. Kawano, S. Masuko** (2008): Collateral projections from the subfornical organ to the median preoptic nucleus and paraventricular hypothalamic nucleus in the rat, *Brain Research* 1198: 68–72.
- [138] **J.S. Bains, A. Potyok, A.V. Ferguson** (1992): Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: Functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ, *Brain Research* 599: 223–229.
- [139] **H. Kawano, S. Masuko** (2010): Region-specific projections from the subfornical organ to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat, *Neuroscience* 169: 1227–1234.
- [140] **M.P. Rosas-Arellano, L.P. Solano-Flores, J. Ciriello** (1993): Effect of arcuate nucleus activation on neuronal activity in subfornical organ, *Brain Research* 619 352–356.
- [141] **M. Shioya, J. Tanaka** (1989): Inputs from the nucleus of the solitary tract to subfornical organ neurons projecting to the paraventricular nucleus in the rat, *Brain Research* 483: 192–195.
- [142] **A.J. Silverman, D.L. Hoffman, E.A. Zimmerman** (1981): The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), *Brain Research Bulletin* 6: 47–61.
- [143] **T. Osaka, H. Yamashita, K. Koizumi** (1988): Inhibition of paraventricular neurons by subfornical organ and AV3V in cats, *The American Journal of Physiology* 255: R961-7.
- [144] **J.H. Jhamandas, R.W. Lind, L.P. Renaud** (1989): Angiotensin II may mediate excitatory neurotransmission from the subfornical organ to the hypothalamic supraoptic nucleus: An anatomical and electrophysiological study in the rat, *Brain Research* 487: 52–61.
- [145] **R.F. Johnson, T.G. Beltz, M. Jurzak, R.E. Wachtel, A.K. Johnson** (1999): Characterization of ionic currents of cells of the subfornical organ that project to the supraoptic nuclei, *Brain Research* 817: 226–231.
- [146] **M.J. McKinley, R.J. Bicknell, D. Hards, R.M. McAllen, L. Vivas, R.S. Weisinger, B.J. Oldfield** (1992): Efferent neural pathways of the lamina terminalis subserving osmoregulation, *Progress in Brain Research* 91: 395–402.
- [147] **J. Tanaka, H. Saito, H. Kaba, K. Nojima, K. Seto** (1987): Lateral hypothalamic region excites the activity of vasopressin neurons in the supraoptic nucleus through subfornical organ neurons, *Experimental Neurology* 97: 212–218.
- [148] **Z. Xu, M.G. Ross, A.K. Johnson** (2001): Intracerebroventricular carbachol induces FOS immunoreactivity in lamina terminalis neurons projecting to the supraoptic nucleus, *Brain Research* 895: 104–110.
- [149] **C. Boudaba, J.G. Tasker, D.A. Poulain** (1995): Connections from the subfornical organ to the oxytocin and vasopressin systems in the lactating rat. A study using electrical stimulations, lesions and electrophysiological recordings, *Brain Research* 672: 1–13.

- 
- [150] **S.D. Donevan, A.V. Ferguson** (1988): Subfornical organ connections with septal neurons projecting to the median eminence, *Neuroendocrinology* 48: 67–71.
- [151] **A.V. da Silva, K.R. Torres, C.A. Haemmerle, I.C. Céspedes, J.C. Bittencourt** (2013): The Edinger-Westphal nucleus II: Hypothalamic afferents in the rat, *Journal of Chemical Neuroanatomy* 54: 5–19.
- [152] **T. Osaka, H. Yamashita, K. Koizumi** (1992): Inhibitory inputs to the subfornical organ from the AV3V: Involvement of GABA, *Brain Research Bulletin* 29: 581–587.
- [153] **K.E. Krout, J. Kawano, T.C. Mettenleiter, A.D. Loewy** (2002): CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat, *Neuroscience* 110: 73–92.
- [154] **J. Ciriello, M. Patricia Rosas-Arellano, L. Pastor Solano-Flores** (1996): Direct projections to subfornical organ from catecholaminergic neurons in the caudal nucleus of the solitary tract, *Brain Research* 726: 227–232.
- [155] **H. Kawano, S. Masuko** (2001): Tyrosine hydroxylase-immunoreactive projections from the caudal ventrolateral medulla to the subfornical organ in the rat, *Brain Research* 903: 154–161.
- [156] **J. Tanaka, Y. Hayashi, S. Shimamune, M. Nomura** (1997): Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat, *Brain Research* 777: 237–241.
- [157] **A.M. Zardetto-Smith, T.S. Gray** (1987): A direct neural projection from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat, *Neuroscience Letters* 80: 163–166.
- [158] **J. Tanaka, K. Seto** (1988): Neurons in the nucleus of the solitary tract with ascending projections to the subfornical organ in the rat, *Neuroscience Letters* 89: 152–155.
- [159] **Z.S. Han, G.B. Gu, C.Q. Sun, G. Ju** (1991): Convergence of somatosensory and baroreceptive inputs onto parabrachio-subfornical organ neurons in the rat: An electrophysiological study, *Brain Research* 566: 239–247.
- [160] **H. Kawano** (2017): Synaptic contact between median preoptic neurons and subfornical organ neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus, *Experimental Brain Research* 235: 1053–1062.
- [161] **M.P. Rosas-Arellano, L.P. Solano-Flores, J. Ciriello** (1995): Glutamate stimulation of arcuate nucleus inhibits responses of subfornical organ neurons to plasma hypernatremia and angiotensin II, *Neuroscience Letters* 198: 201–204.
- [162] **M.P. Rosas-Arellano, L.P. Solano-Flores, J. Ciriello** (1996): Arcuate nucleus inputs onto subfornical organ neurons that respond to plasma hypernatremia and angiotensin II, *Brain Research* 707: 308–313.
- [163] **P.J. Larsen, M. Møller, J.D. Mikkelsen** (1991): Efferent projections from the periventricular and medial parvicellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat: A Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study, *The Journal of Comparative Neurology* 306: 462–479.
- [164] **H. Yamashita, T. Osaka, H. Kannan** (1984): Effects of electrical and chemical stimulation of the paraventricular nucleus on neurons in the subfornical organ of cats, *Brain Research* 323: 176–180.
- [165] **B.J. Oldfield, D.K. Hards, M.J. McKinley** (1991): Projections from the subfornical organ to the supraoptic nucleus in the rat: Ultrastructural identification of an interposed synapse in the median preoptic nucleus using a combination of neuronal tracers, *Brain Research* 558: 13–19.
- [166] **J. Hernesniemi, E. Kawana, H. Bruppacher, C. Sandri** (1972): Afferent connections of the subfornical organ and of the supraoptic crest, *Acta Anatomica* 81: 321–336.
- [167] **T. Ohtake** (1992): Ascending projections from the gigantocellular reticular and dorsal paragigantocellular nuclei of the medulla oblongata in the rat: An anterograde PHA-L tracing study, *Neuroscience Research* 14: 96–116.

- [168] **J. Tanaka, K. Seto** (1988): Lateral hypothalamic area and paraventricular nucleus connections with subfornical organ neurons: An electrophysiological study in the rat, *Neuroscience Research* 6: 45–52.
- [169] **D. Thellier, F. Moos, P. Richard, M.E. Stoeckel** (1994): Evidence for reciprocal connections between the dorsochiasmatic area and the hypothalamo neurohypophyseal system and some related extrahypothalamic structures, *Brain Research Bulletin* 35: 311–322.
- [170] **A. Weindl, M.V. Sofroniew** (1982): Peptide Neurohormones and Circumventricular Organs in the Pigeon, *Frontiers of Hormone Research*: 88–104.
- [171] **H. Wetzig, M. Palkovits** (1968): The development of the subfornical organ in the common gull *Larus canus* L, *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung* 79: 283–291.
- [172] **H.W. Korf** (1984): Neuronal organization of the avian paraventricular nucleus: Intrinsic, afferent, and efferent connections, *The Journal of Experimental Zoology* 232: 387–395.
- [173] **C. Knorr, D. Marks, R. Gerstberger, P.F. Muhlradt, J. Roth, C. Rummel** (2010): Peripheral and central cyclooxygenase (COX) products may contribute to the manifestation of brain-controlled sickness responses during localized inflammation induced by macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2), *Neuroscience Letters* 479: 107–111.
- [174] **J.T. Stitt** (1990): Passage of immunomodulators across the blood-brain barrier, *The Yale Journal of Biology and Medicine* 63: 121–131.
- [175] **R.H. McCusker, K.W. Kelley** (2013): Immune-neural connections: How the immune system's response to infectious agents influences behavior, *The Journal of Experimental Biology* 216: 84–98.
- [176] **S. Brochu, M. Olivier, S. Rivest** (1999): Neuronal activity and transcription of proinflammatory cytokines,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , and iNOS in the mouse brain during acute endotoxemia and chronic infection with *Trypanosoma brucei brucei*, *Journal of neuroscience Research* 57: 801–816.
- [177] **Y. Nakano, E. Furube, S. Morita, A. Wanaka, T. Nakashima, S. Miyata** (2015): Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain, *Journal of Neuroimmunology* 278: 144–158.
- [178] **S. Rivest** (2003): Molecular insights on the cerebral innate immune system, *Brain, Behavior, and Immunity* 17: 13–19.
- [179] **N.P. Turrin, S. Rivest** (2004): Unraveling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems, *Experimental Biology and Medicine* 229: 996–1006.
- [180] **T. Cartmell, G.N. Luheshi, N.J. Rothwell** (1999): Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat, *The Journal of Physiology* 518: 585–594.
- [181] **D.R. Cerqueira, H.S. Ferreira, A.L.B.B. Moiteiro, J.B. Fregoneze** (2016): Effects of interleukin-1 beta injections into the subfornical organ and median preoptic nucleus on sodium appetite, blood pressure and body temperature of sodium-depleted rats, *Physiology & Behavior* 163: 149–160.
- [182] **S.E. Desson, A.V. Ferguson** (2003): Interleukin 1beta modulates rat subfornical organ neurons as a result of activation of a non-selective cationic conductance, *The Journal of Physiology* 550: 113–122.
- [183] **J.P. Konsman, S. Vignes, L. Mackerlova, A. Bristow, A. Blomqvist** (2004): Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: Relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli, *The Journal of Comparative Neurology* 472: 113–129.
- [184] **A. Nadjar, C. Combe, S. Laye, V. Tridon, R. Dantzer, T. Amedee, P. Parnet** (2003): Nuclear factor kappaB nuclear translocation as a crucial marker of brain response to

- interleukin-1. A study in rat and interleukin-1 type I deficient mouse, *J Neurochem* 87: 1024–1036.
- [185] **C. Knorr, T. Hubschle, J. Murgott, P. Muhlradt, R. Gerstberger, J. Roth** (2008): Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever, *Brain Research* 1205: 36–46.
- [186] **L. Vallieres, S. Lacroix, S. Rivest** (1997): Influence of interleukin-6 on neural activity and transcription of the gene encoding corticotrophin-releasing factor in the rat brain: An effect depending upon the route of administration, *The European Journal of Neuroscience* 9: 1461–1472.
- [187] **L. Vallieres, S. Rivest** (1997): Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta, *J Neurochem* 69: 1668–1683.
- [188] **N.J. Simpson, A.V. Ferguson** (2017): The proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha excites subfornical organ neurons, *Journal of Neurophysiology* 118: 1532–1541.
- [189] **S.-G. Wei, Z.-H. Zhang, T.G. Beltz, Y. Yu, A.K. Johnson, R.B. Felder** (2013): Subfornical organ mediates sympathetic and hemodynamic responses to blood-borne proinflammatory cytokines, *Hypertension* 62: 118–125.
- [190] **Y. Yu, S.-G. Wei, R.M. Weiss, R.B. Felder** (2017): TNF-alpha receptor 1 knockdown in the subfornical organ ameliorates sympathetic excitation and cardiac hemodynamics in heart failure rats, *American Journal of Physiology. Heart and circulatory Physiology* 313: H744-H756.
- [191] **J. Damm, G.N. Luheshi, R. Gerstberger, J. Roth, C. Rummel** (2011): Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction, *The Journal of Comparative Neurology* 519: 480–505.
- [192] **J. Schneiders, F. Fuchs, J. Damm, C. Herden, R. Gerstberger, D.M. Soares, J. Roth, C. Rummel** (2015): The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice, *Brain, Behavior, and Immunity* 48: 147–164.
- [193] **L. Gautron, P. Lafon, M. Chaigniau, G. Tramu, S. Laye** (2002): Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge, *Neuroscience* 112: 717–729.
- [194] **E.M. Harre, J. Roth, R. Gerstberger, T. Hubschle** (2003): Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs, *Brain Research* 980: 151–155.
- [195] **E.-M. Harre, J. Roth, U. Pehl, M. Kueth, R. Gerstberger, T. Hubschle** (2002): Selected contribution: Role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats, *Journal of Applied Physiology* 92: 2657–2666.
- [196] **C. Rummel, T. Hubschle, R. Gerstberger, J. Roth** (2004): Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation, *The Journal of Physiology* 557: 671–687.
- [197] **C. Rummel, T. Voss, K. Matsumura, S. Korte, R. Gerstberger, J. Roth, T. Hubschle** (2005): Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6, *The Journal of Comparative Neurology* 491: 1–14.
- [198] **C. Eriksson, S. Nobel, B. Winblad, M. Schultzberg** (2000): Expression of interleukin 1 alpha and beta, and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in the rat central nervous system after peripheral administration of lipopolysaccharides, *Cytokine* 12: 423–431.

- [199] **J.P. Konsman, K. Kelley, R. Dantzer** (1999): Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain, *Neuroscience* 89: 535–548.
- [200] **J.P. Konsman, P. Parnet, R. Dantzer** (2002): Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications, *Trends in Neurosciences* 25: 154–159.
- [201] **J.P. Konsman, J. Veeneman, C. Combe, S. Poole, G.N. Luheshi, R. Dantzer** (2008): Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide, *The European Journal of Neuroscience* 28: 2499–2510.
- [202] **T. Nakamori, Y. Sakata, T. Watanabe, A. Morimoto, S. Nakamura, N. Murakami** (1995): Suppression of interleukin-1 beta production in the circumventricular organs in endotoxin-tolerant rabbits, *Brain Research* 675: 103–109.
- [203] **N. Quan, E.L. Stern, M.B. Whiteside, M. Herkenham** (1999): Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat, *Journal of Neuroimmunology* 93: 72–80.
- [204] **S. Nadeau, S. Rivest** (1999): Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58: 61–77.
- [205] **R. Dantzer** (2018): Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa, *Physiological Reviews* 98: 477–504.
- [206] **A. Mimee, P.M. Smith, A.V. Ferguson** (2013): Circumventricular organs: Targets for integration of circulating fluid and energy balance signals?, *Physiology & Behavior* 121: 96–102.
- [207] **P.M. Smith, G. Rozanski, A.V. Ferguson** (2010): Acute electrical stimulation of the subfornical organ induces feeding in satiated rats, *Physiology & Behavior* 99: 534–537.
- [208] **I. Alim, W.M. Fry, M.H. Walsh, A.V. Ferguson** (2010): Actions of adiponectin on the excitability of subfornical organ neurons are altered by food deprivation, *Brain Research* 1330: 72–82.
- [209] **T.D. Hoyda, P.M. Smith, A.V. Ferguson** (2005): Gastrointestinal hormone actions in the central regulation of energy metabolism: Potential sensory roles for the circumventricular organs, *International Journal of Obesity*: 33 Suppl 1 (2009) S16-21.
- [210] **N. Medeiros, L. Dai, A.V. Ferguson** (2012): Glucose-responsive neurons in the subfornical organ of the rat--a novel site for direct CNS monitoring of circulating glucose, *Neuroscience* 201: 157–165.
- [211] **A.-S.F. Ahmed, L. Dai, W. Ho, A.V. Ferguson, K.A. Sharkey** (2014): The subfornical organ: A novel site of action of cholecystokinin, *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 306: R363-73.
- [212] **E.-D. Baraboi, P. Smith, A.V. Ferguson, D. Richard** (2010): Lesions of area postrema and subfornical organ alter exendin-4-induced brain activation without preventing the hypophagic effect of the GLP-1 receptor agonist, *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298: R1098-110.
- [213] **M. Fry, A.V. Ferguson** (2007): The sensory circumventricular organs: Brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior, *Physiology & Behavior* 91: 413–423.
- [214] **C.W. Bourque, S.H. Oliet, D. Richard** (1994): Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation, *Frontiers in Neuroendocrinology* 15: 231–274.
- [215] **C.W. Bourque, S. Ciura, E. Trudel, T.J.E. Stachniak, R. Sharif-Naeini** (2007): Neurophysiological characterization of mammalian osmosensitive neurones, *Experimental Physiology* 92: 499–505.
- [216] **T.Y. Hiyama, E. Watanabe, K. Ono, K. Inenaga, M.M. Tamkun, S. Yoshida, M. Noda** (2002): Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing, *Nature Neuroscience* 5: 511–512.

- [217] **R. Gerstberger, S.W. Barth, M. Horowitz, Hudl K., Panagiotis P., T. Hübschle** (2001): Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation and Pain.: Differential activation of nitrenergic hypothalamic neurons by heat exposure and dehydration, Springer Press.
- [218] **D.A. Fitts** (1991): Effects of lesions of the ventral ventral median preoptic nucleus or subfornical organ on drinking and salt appetite after deoxycorticosterone acetate or yohimbine, *Behavioral Neuroscience* 105: 721–726.
- [219] **R.L. Thunhorst, K.J. Ehrlich, J.B. Simpson** (1990): Subfornical organ participates in salt appetite, *Behavioral Neuroscience* 104 637–642.
- [220] **J.M. Ho, D.K. Zierath, A.V. Savos, D.J. Femiano, J.E. Bassett, M.J. McKinley, D.A. Fitts** (2007): Differential effects of intravenous hyperosmotic solutes on drinking latency and c-Fos expression in the circumventricular organs and hypothalamus of the rat, *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292: R1690-8.
- [221] **P. Patronas, M. Horowitz, E. Simon, R. Gerstberger** (1998): Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration, *Brain Research* 798: 127–139.
- [222] **R.L. Miller, M.H. Wang, P.A. Gray, L.B. Salkoff, A.D. Loewy** (2013): ENaC-expressing neurons in the sensory circumventricular organs become c-Fos activated following systemic sodium changes, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 305: R1141-52.
- [223] **P. Shi, M.A. Martinez, A.S. Calderon, Q. Chen, J.T. Cunningham, G.M. Toney** (2008): Intra-carotid hyperosmotic stimulation increases Fos staining in forebrain organum vasculosum laminae terminalis neurones that project to the hypothalamic paraventricular nucleus, *The Journal of Physiology* 586: 5231–5245.
- [224] **T. Weber** (2009): Der Nucleus praeopticus medianus im Hypothalamus der Ratte als prä-integrative Struktur afferenter Signale zur Aufrechterhaltung des Salz- und Wasserhaushaltes sowie der Körperkerntemperatur, VVB Laufersweiler Verlag, Gießen.
- [225] **M.J. McKinley, D.A. Denton, R.S. Weisinger** (1978): Sensors for antidiuresis and thirst--osmoreceptors or CSF sodium detectors?, *Brain Research* 141: 89–103.
- [226] **M.B. Gutman, J. Ciriello, G.J. Mogenson** (1988): Effects of plasma angiotensin II and hypernatremia on subfornical organ neurons, *The American Journal of Physiology* 254: R746-54.
- [227] **J.W. Anderson, D.L.S. Washburn, A.V. Ferguson** (2000): Intrinsic osmosensitivity of subfornical organ neurons, *Neuroscience* 100: 539–547.
- [228] **L. Giovannelli, F.E. Bloom** (1992): c-Fos protein expression in the rat subfornical organ following osmotic stimulation, *Neuroscience Letters* 139: 1–6.
- [229] **T.J. McDonald, C. Li, M.J. Nijland, A. Caston-Balderrama, M.G. Ross** (1998): Fos response of fetal sheep anterior circumventricular organs to osmotic challenge in late gestation, *The American Journal of Physiology* 275: H609-14.
- [230] **B.J. Oldfield, E. Badoer, D.K. Hards, M.J. McKinley** (1994): Fos production in retrogradely labelled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II, *Neuroscience* 60: 255–262.
- [231] **J.R. Sibbald, J.I. Hubbard, N.E. Sirett** (1988): Responses from osmosensitive neurons of the rat subfornical organ in vitro, *Brain Research* 461: 205–214.
- [232] **C.W. Bourque, S.H. Oliet** (1997): Osmoreceptors in the central nervous system, *Annual Review of Physiology* 59: 601–619.
- [233] **S. Ciura, W. Liedtke, C.W. Bourque** (2011): Hypertonicity sensing in organum vasculosum lamina terminalis neurons: A mechanical process involving TRPV1 but not TRPV4, *The Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31: 14669–14676.
- [234] **W. Liedtke, Y. Choe, M.A. Martí-Renom, A.M. Bell, C.S. Denis, A. Sali, A.J. Hudspeth, J.M. Friedman, S. Heller** (2000): Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor, *Cell* 103: 525–535.

- [235] **W. Liedtke, J.M. Friedman** (2003): Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 13698–13703.
- [236] **M. Noda, H. Sakuta** (2013): Central regulation of body-fluid homeostasis, *Trends in Neurosciences* 36: 661–673.
- [237] **C. Zaelzer, P. Hua, M. Prager-Khoutorsky, S. Ciura, D.L. Voisin, W. Liedtke, C.W. Bourque** (2015): DeltaN-TRPV1: A Molecular Co-detector of Body Temperature and Osmotic Stress, *Cell Reports* 13: 23–30.
- [238] **M. Prager-Khoutorsky, A. Khoutorsky, C.W. Bourque** (2014): Unique interweaved microtubule scaffold mediates osmosensory transduction via physical interaction with TRPV1, *Neuron* 83: 866–878.
- [239] **Z. Zhang, C.W. Bourque** (2003): Osmometry in osmosensory neurons, *Nature Neuroscience* 6: 1021–1022.
- [240] **V. Benfenati, M. Caprini, M. Dovizio, M.N. Mylonakou, S. Ferroni, O.P. Ottersen, M. Amiry-Moghaddam** (2011): An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 2563–2568.
- [241] **M. Matsumoto, T.Y. Hiyama, K. Kuboyama, R. Suzuki, A. Fujikawa, M. Noda** (2015): Channel properties of *Na<sub>x</sub>* expressed in neurons, *PloS one* 10: e0126109.
- [242] **E. Watanabe, T.Y. Hiyama, H. Shimizu, R. Kodama, N. Hayashi, S. Miyata, Y. Yanagawa, K. Obata, M. Noda** (2006): Sodium-level-sensitive sodium channel *Na<sub>x</sub>* is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs, *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290: R568-76.
- [243] **D.A. Denton, M.J. McKinley, R.S. Weisinger** (1996): Hypothalamic integration of body fluid regulation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 7397–7404.
- [244] **A.L. Goldin, R.L. Barchi, J.H. Caldwell, F. Hofmann, J.R. Howe, J.C. Hunter, R.G. Kallen, G. Mandel, M.H. Meisler, Y.B. Netter, M. Noda, M.M. Tamkun, S.G. Waxman, J.N. Wood, W.A. Catterall** (2000): Nomenclature of voltage-gated sodium channels, *Neuron* 28: 365–368.
- [245] **T.Y. Hiyama, M. Noda** (2016): Sodium sensing in the subfornical organ and body-fluid homeostasis, *Neuroscience Research* 113: 1–11.
- [246] **M. Noda, T.Y. Hiyama** (2015): Sodium sensing in the brain, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 467: 465–474.
- [247] **M. Noda, T.Y. Hiyama** (2015): The *Na<sub>x</sub>* Channel: What It Is and What It Does, *The Neuroscientist a Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 21: 399–412.
- [248] **E. Watanabe, A. Fujikawa, H. Matsunaga, Y. Yasoshima, N. Sako, T. Yamamoto, C. Saegusa, M. Noda** (2000): *Nav2/NaG* channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS, *The Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience* 20: 7743–7751.
- [249] **T.Y. Hiyama, M. Yoshida, M. Matsumoto, R. Suzuki, T. Matsuda, E. Watanabe, M. Noda** (2013): Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of *Na<sub>x</sub>*, the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake, *Cell Metabolism* 17: 507–519.
- [250] **C. Hindmarch, M. Fry, S.T. Yao, P.M. Smith, D. Murphy, A.V. Ferguson** (2008): Microarray analysis of the transcriptome of the subfornical organ in the rat: Regulation by fluid and food deprivation, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295: R1914-20.
- [251] **H. Shimizu, E. Watanabe, T.Y. Hiyama, A. Nagakura, A. Fujikawa, H. Okado, Y. Yanagawa, K. Obata, M. Noda** (2007): Glial *Na<sub>x</sub>* channels control lactate signaling to neurons for brain *Na<sup>+</sup>* sensing, *Neuron* 54: 59–72.

- [252] **G.A. Brooks** (2009): Cell-cell and intracellular lactate shuttles, *The Journal of Physiology* 587: 5591–5600.
- [253] **H. Sakuta, E. Nishihara, T.Y. Hiyama, C.-H. Lin, M. Noda** (2016): Nax signaling evoked by an increase in Na<sup>+</sup> in CSF induces water intake via EET-mediated TRPV4 activation, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 311: R299-306.
- [254] **A.P. Sinke, C. Caputo, S.-W. Tsaih, R. Yuan, D. Ren, P.M.T. Deen, R. Korstanje** (2011): Genetic analysis of mouse strains with variable serum sodium concentrations identifies the Nalcn sodium channel as a novel player in osmoregulation, *Physiological genomics* 43: 265–270.
- [255] **R.L. Miller, A.D. Loewy** (2013): ENaC  $\gamma$ -expressing astrocytes in the circumventricular organs, white matter, and ventral medullary surface: Sites for Na<sup>+</sup> regulation by glial cells, *Journal of Chemical Neuroanatomy* 53: 72–80.
- [256] **J.L. Lavoie, C.D. Sigmund** (2003): Minireview: Overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system, *Endocrinology* 144: 2179–2183.
- [257] **Speckmann E. J., Hescheler J., Köhling R.** (2013): *Physiologie: Das Renin-Angiotensin System*, 6th Ed., Elsevir GmbH, München.
- [258] **Silverthorn D. U.** (2009): *Physiologie: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)*, 4th Ed., Pearson Studium, München.
- [259] **J.E. Sealey, S.A. Atlas, J.H. Laragh** (1980): Prorenin and other large molecular weight forms of renin, *Endocrine Reviews* 1: 365–391.
- [260] **B.J. Morris** (1989): Human renin protein and gene structures: Present and future targets for renin blockade in treatment of hypertension, *Journal of Hypertension. Supplement Official Journal of the International Society of Hypertension* 7: S9-14.
- [261] **R. Kageyama, H. Ohkubo, S. Nakanishi** (1984): Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence, *Biochemistry* 23: 3603–3609.
- [262] **P.R. Caldwell, B.C. Seegal, K.C. Hsu, M. Das, R.L. Soffer** (1976): Angiotensin-converting enzyme: Vascular endothelial localization, *Science (New York, N.Y.)* 191: 1050–1051.
- [263] **S.R. Tipnis, N.M. Hooper, R. Hyde, E. Karran, G. Christie, A.J. Turner** (2000): A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase, *The Journal of Biological Chemistry* 275: 33238–33243.
- [264] **P.J. Admiraal, A.H. Danser, M.S. Jong, H. Pieterman, F.H. Derkx, M.A. Schalekamp** (1993): Regional angiotensin II production in essential hypertension and renal artery stenosis, *Hypertension (Dallas, Tex. 1979)* 21: 173–184.
- [265] **M. de Gasparo, K.J. Catt, T. Inagami, J.W. Wright, T. Unger** (2000): International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors, *Pharmacological Reviews* 52: 415–472.
- [266] **P.B. Timmermans, P.C. Wong, A.T. Chiu, W.F. Herblin, P. Benfield, D.J. Carini, R.J. Lee, R.R. Wexler, J.A. Saye, R.D. Smith** (1993): Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists, *Pharmacological Reviews* 45: 205–251.
- [267] **N. Iwai, T. Inagami** (1992): Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor, *FEBS Letters* 298: 257–260.
- [268] **R.M. Touyz, E.L. Schiffrin** (2000): Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells, *Pharmacological Reviews* 52: 639–672.
- [269] **G.N. Swanson, J.M. Hanesworth, M.F. Sardinia, J.K. Coleman, J.W. Wright, K.L. Hall, A.V. Miller-Wing, J.W. Stobb, V.I. Cook, E.C. Harding** (1992): Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor, *Regulatory Peptides* 40: 409–419.

- [270] **A.E. Abdelaal, P.F. Mercer, G.J. Mogenson** (1976): Plasma angiotensin II levels and water intake following  $\beta$ -adrenergic stimulation, hypovolemia, cellular dehydration and water deprivation, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 4: 317–321.
- [271] **K. Kunikullaya U, V. Ananthkrishnan, J. Goturu** (2012): Robert Tigerstedt and the discovery of renin - a revisit, *International Journal of Cardiology* 158: 1–5.
- [272] **R.L. Davisson, M.I. Oliverio, T.M. Coffman, C.D. Sigmund** (2000): Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain, *The Journal of Clinical Investigation* 106: 103–106.
- [273] **A.V. Ferguson, L.P. Renaud** (1986): Systemic angiotensin acts at subfornical organ to facilitate activity of neurohypophysial neurons, *The American Journal of Physiology* 251: R712-7.
- [274] **J.T. Fitzsimons** (1998): Angiotensin, thirst, and sodium appetite, *Physiological Reviews* 78: 583–686.
- [275] **M.J. McKinley, L.L. Walker, T. Alexiou, A.M. Allen, D.J. Campbell, R. Di Nicolantonio, B.J. Oldfield, D.A. Denton** (2008): Osmoregulatory fluid intake but not hypovolemic thirst is intact in mice lacking angiotensin, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294: R1533-43.
- [276] **J.P. Collister, M.K. Olson, D.B. Nahey, A.A. Vieira, J.W. Osborn** (2013): OVLT lesion decreases basal arterial pressure and the chronic hypertensive response to AngII in rats on a high-salt diet, *Physiological Reports* 1: e00128.
- [277] **M.J. McKinley, E. Badoer, B.J. Oldfield** (1992): Intravenous angiotensin II induces Fos-immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis, *Brain Research* 594: 295–300.
- [278] **J.B. Simpson, A.N. Epstein, J.S. Camardo** (1978): Localization of receptors for the dipsogenic action of angiotensin II in the subfornical organ of rat, *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 92: 581–601.
- [279] **J.B. Simpson** (1981): The circumventricular organs and the central actions of angiotensin, *Neuroendocrinology* 32: 248–256.
- [280] **R.S. Weisinger, D.A. Denton, R. Di Nicolantonio, D.K. Hards, M.J. McKinley, B. Oldfield, P.G. Osborne** (1990): Subfornical organ lesion decreases sodium appetite in the sodium-depleted rat, *Brain Research* 526: 23–30.
- [281] **D.A. Fitts, J.A. Freece, J.E. van Bebbler, D.K. Zierath, J.E. Bassett** (2004): Effects of forebrain circumventricular organ ablation on drinking or salt appetite after sodium depletion or hypernatremia, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287: R1325-34.
- [282] **M.J. McKinley, R. Gerstberger, H. Mathai, B. Oldfield, S. Schmid** (1999): The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis, *Journal of Clinical Neuroscience Official journal of the Neurosurgical Society of Australia* 6: 289–301.
- [283] **J. Tanaka, N. Mashiko, A. Kawakami, S. Hatakenaka, S. Fujisawa, M. Nomura** (2002): The action of the A1 noradrenergic region on the activity of subfornical organ neurons in the rat, *Neuroscience Letters* 332: 41–44.
- [284] **J. Tanaka, Y. Hayashi, T. Watai, K. Hori, M. Nomura** (1998): Noradrenaline release in the rat subfornical organ area to blood pressure changes, *Experimental Neurology* 152: 303–306.
- [285] **G.T. Cottrell, A.V. Ferguson** (2004): Sensory circumventricular organs: Central roles in integrated autonomic regulation, *Regulatory Peptides* 117: 11–23.
- [286] **M.-E. Grondin, A. Gobeil-Simard, G. Drolet, D. Mougnot** (2011): Na<sup>+</sup> appetite induced by depleting extracellular fluid volume activates the enkephalin/mu-opioid receptor system in the rat forebrain, *Neuroscience* 192: 398–412.
- [287] **J. Tanaka, Y. Hayashi, S. Shimamune, M. Nomura** (1997): Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat, *Brain Research* 777:237–241.
- [288] **M.J. McKinley, S.T. Yao, A. Uschakov, R.M. McAllen, M. Rundgren, D. Martelli** (2015): The median preoptic nucleus: Front and centre for the regulation of body fluid,

- sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis, *Acta Physiologica* (Oxford, England) 214: 8–32.
- [289] **J.H. Hollis, M.J. McKinley, M. D'Souza, J. Kampe, B.J. Oldfield** (2008): The trajectory of sensory pathways from the lamina terminalis to the insular and cingulate cortex: A neuroanatomical framework for the generation of thirst, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294: R1390-401.
- [290] **A.K. Johnson, J. de Olmos, C.V. Pastuskovas, A.M. Zardetto-Smith, L. Vivas** (1999): The extended amygdala and salt appetite, *Annals of the New York Academy of Sciences* 877: 258–280.
- [291] **H. Nishimura** (2017): Renin-angiotensin system in vertebrates: Phylogenetic view of structure and function, *Anatomical Science International* 92: 215–247.
- [292] **H. Nishimura, M.A. Madey, J.N. Mugaas, M.C. Khosla, J.T. Crofton** (1981): Radioimmunoassay of fowl angiotensin I, *General and Comparative Endocrinology* 45: 262–272.
- [293] **K. Savary, A. Michaud, J. Favier, E. Larger, P. Corvol, J.-M. Gasc** (2005): Role of the renin-angiotensin system in primitive erythropoiesis in the chick embryo, *Blood* 105: 103–110.
- [294] **M.J. Polanco, M.I. Mata, M.T. Agapito, J.M. Recio** (1990): Angiotensin-converting enzyme distribution and hypoxia response in mammal, bird, and fish, *General and Comparative Endocrinology* 79: 240–245.
- [295] **M.J. Polanco, J.L. Miguel, M.T. Agapito, J.M. Recio** (1992): Characterization of chicken lung angiotensin I-converting enzyme, *The Journal of Endocrinology* 132: 261–268.
- [296] **M.J. Polanco, M.T. Agapito, J.M. Recio** (1992): Inhibition and affinity chromatography of chicken lung angiotensin I-converting enzyme with captopril, *Comparative Biochemistry and Physiology* 102: 527–533.
- [297] **Y. Takei, Y. Hasegawa** (1990): Vasopressor and depressor effects of native angiotensins and inhibition of these effects in the Japanese quail, *General and Comparative Endocrinology* 79: 12–22.
- [298] **Y. Hayashi, T. Nakajima, T.X. Watanabe, H. Sokabe, M.C. Khosla, F.M. Bumpus** (1977): Synthesis and specific pressor activity of 1-aspartic acid,5-valine,9-serineangiotensin I ("fowl angiotensin I"), *Journal of Medicinal Chemistry* 20: 315–316.
- [299] **T. Nakayama, T. Nakajima, H. Sokabe** (1973): Comparative studies on angiotensins. 3. Structure of fowl angiotensin and its identification by DNS-method, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 21: 2085–2087.
- [300] **Y. Takei, J.M.P. Joss, W. Kloas, J.C. Rankin** (2004): Identification of angiotensin I in several vertebrate species: Its structural and functional evolution, *General and Comparative Endocrinology* 135: 286–292.
- [301] **M.C. Khosla, F.M. Bumpus, H. Nishimura, D.F. Opdyke, A. Coviello** (1983): Synthesis of nonmammalian angiotensins and their comparative pressor properties in dogfish shark, domestic chicken, and rat, *Hypertension* (Dallas, Tex. 1979) 5: V22-8.
- [302] **H. Kempf, P. Corvol, J.M. Gasc** (1999): Expression of the chicken angiotensin II receptor: Atypical pattern compared to its mammalian homologues, *Mechanisms of Development* 84: 177–180.
- [303] **H. Nishimura, O.E. Walker, C.M. Patton, A.B. Madison, A.T. Chiu, J. Keiser** (1994): Novel angiotensin receptor subtypes in fowl, *The American Journal of Physiology* 267: R1174-81.
- [304] **H. Nishimura, Y. Yang, C. Hubert, J.-M. Gasc, K. Ruijtenbeek, J. de Mey, H.A.J.S. Boudier, P. Corvol** (2003): Maturation-dependent changes of angiotensin receptor expression in fowl, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285: R231-42.
- [305] **D.A. Gray, E. Simon** (1985): Control of plasma angiotensin II in a bird with salt glands (*Anas platyrhynchos*), *General and Comparative Endocrinology* 60: 1–13.

- [306] **D.A. Gray, T. Erasmus** (1988): Plasma arginine vasotocin and angiotensin II in the water deprived Kelp gull (*Larus dominicanus*), Cape gannet (*Sula capensis*) and Jackass penguin (*Spheniscus demersus*), *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology* 91: 727–732.
- [307] **D.A. Gray, E. Simon** (1987): Dehydration and arginine vasotocin and angiotensin II in CSF and plasma of pekin ducks, *The American Journal of Physiology* 253: R285–91.
- [308] **E. Simon, H.A. Schmid** (1996): Effects of angiotensin II and its blockers Sar1-Ile8-angiotensin II and DuP 753 on drinking in ducks in relation to properties of subfornical organ neurons, *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 165: 607–614.
- [309] **E. Simon, R. Gerstberger, D.A. Gray** (1992): Central nervous angiotensin II responsiveness in birds, *Progress in Neurobiology* 39: 179–207.
- [310] **M.D. Evered, J.T. Fitzsimons** (1981): Drinking and changes in blood pressure in response to precursors, fragments and analogues of angiotensin II in the pigeon *Columba livia*, *The Journal of Physiology* 310: 353–366.
- [311] **R. Gerstberger, A.R. Müller, C. Simon-Oppermann** (1992): Functional hypothalamic angiotensin II and catecholamine receptor systems inside and outside the blood-brain barrier, *Progress in Brain Research* 91: 423–433.
- [312] **D.A. Gray, R. Gerstberger, E. Simon** (1989): Role of angiotensin II in aldosterone regulation in the Pekin duck, *The Journal of Endocrinology* 123: 445–452.
- [313] **N. Snapir, B. Robinzon, M. Godschalk** (1976): The drinking response of the chicken to peripheral and central administration of angiotensin II, *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 5: 5–10.
- [314] **Y. Takei** (1977): Angiotensin and water intake in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), *General and Comparative Endocrinology* 31: 364–372.
- [315] **R.F. Volmert, J.D. Firman** (1991): Water and NaCl intake of chicks as mediated by angiotensin II, renin, or salt deficiency, *Physiology & Behavior* 50: 921–927.
- [316] **M.K. Heinz, D.A. Gray** (2001): Role of plasma ANG II in the excretion of acute sodium load in a bird with salt glands (*Anas platyrhynchos*), *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281: R346–51.
- [317] **C.A. Mueller, W.W. Burggren, D.A. Crossley** (2013): ANG II and baroreflex control of heart rate in embryonic chickens (*Gallus gallus domesticus*), *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 305: R855–63.
- [318] **Y. Takei** (2000): Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation, *The Japanese Journal of Physiology* 50: 171–186.
- [319] **Y. Takei** (1977): The role of the subfornical organ in drinking induced by angiotensin in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*, *Cell and Tissue Research* 185: 175–181.
- [320] **M. Massi, G. de Caro, L. Mazzarella, A.N. Epstein** (1986): The role of the subfornical organ in the drinking behavior of the pigeon, *Brain Research* 381: 289–299.
- [321] **R.F. Volmert, J.D. Firman** (1992): Response to angiotensin II after selective lesioning of brain regions believed to be involved in water intake regulation, *Poultry Science* 71: 1073–1078.
- [322] **K. Matsumura, E. Simon** (1990): Locations and properties of angiotensin II-responsive neurones in the circumventricular region of the duck brain, *The Journal of Physiology* 429: 281–296.
- [323] **F. Schäfer, A.R. Müller, H.A. Schmid, R. Gerstberger, E. Simon** (1996): Angiotensin II receptor subtypes in the duck subfornical organ: An electrophysiological and receptor autoradiographic investigation, *Brain Research* 711: 118–124.
- [324] **R. Gerstberger, D.P. Healy, H.T. Hammel, E. Simon** (1987): Autoradiographic localization and characterization of circumventricular angiotensin II receptors in duck brain, *Brain Research* 400: 165–170.

- [325] **C. Natke, R. Gerstberger, R. Grossmann** (1996): Angiotensin II-binding sites in chicken brain and pituitary: Autoradiographic localization, *Cell and Tissue Research* 283: 297–303.
- [326] **A.R. Müller, R. Gerstberger** (1994): Ontogenesis of the angiotensin II (ANGII) receptor system in the duck brain, *Brain Research. Developmental Brain Research* 78: 10–16.
- [327] **D.G. Butler** (1999): Mecamylamine blocks the Asp1,Val5-ANG II-induced attenuation of salt gland activity in Pekin ducks, *The American Journal of Physiology* 277: R836-42.
- [328] **A.K. Johnson, J.E. Schwob** (1975): Cephalic angiotensin receptors mediating drinking to systemic angiotensin II, *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 3: 1077–1084.
- [329] **H.A. Schmid, F. Schäfer, E. Simon** (1995): Opposite effects of angiotensin II and nitric oxide on neurons in the duck subfornical organ, *Neuroscience Letters* 187: 149–152.
- [330] **J.E. Schwob, A.K. Johnson** (1977): Angiotensin-induced dipsogenesis in domestic fowl (*Gallus gallus*), *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 91: 182–188.
- [331] **M. Bader, J. Peters, O. Baltatu, D.N. Müller, F.C. Luft, D. Ganten** (2001): Tissue renin-angiotensin systems: New insights from experimental animal models in hypertension research, *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 79: 76–102.
- [332] **V.J. Dzau, D.W. Burt, R.E. Pratt** (1988): Molecular biology of the renin-angiotensin system, *The American Journal of Physiology* 255: F563-73.
- [333] **P.S. Leung** (2004): The peptide hormone angiotensin II: Its new functions in tissues and organs, *Current Protein & Peptide Science* 5: 267–273.
- [334] **D.J. Campbell, J.F. Habener** (1986): Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat, *The Journal of Clinical Investigation* 78: 31–39.
- [335] **C.F. Deschepper, J. Bouhnik, W.F. Ganong** (1986): Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain, *Brain Research* 374: 195–198.
- [336] **R.M. Carey** (2013): Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system, *Hypertension* 62: 818–822.
- [337] **R.M. Carey, H.M. Siragy** (2003): Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation, *Endocrine Reviews* 24: 261–271.
- [338] **L.G. Navar, H. Kobori, M.C. Prieto, R.A. Gonzalez-Villalobos** (2011): Intratubular renin-angiotensin system in hypertension, *Hypertension* 57: 355–362.
- [339] **T. Matsusaka, F. Niimura, A. Shimizu, I. Pastan, A. Saito, H. Kobori, A. Nishiyama, I. Ichikawa** (2012): Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II, *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 23: 1181–1189.
- [340] **A.H. Danser** (2003): Local renin-angiotensin systems: The unanswered questions, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35: 759–768.
- [341] **J.P. van Kats, A.H. Danser, J.R. van Meegen, L.M. Sassen, P.D. Verdouw, M.A. Schalekamp** (1998): Angiotensin production by the heart: A quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions, *Circulation* 98: 73–81.
- [342] **J.P. van Kats, D.J. Duncker, D.B. Haitsma, M.P. Schuijt, R. Niebuur, R. Stubenitsky, F. Boomsma, M.A. Schalekamp, P.D. Verdouw, A.H. Danser** (2000): Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: Role of tissue angiotensin II, *Circulation* 102: 1556–1563.
- [343] **R. Kumar, C.M. Thomas, Q.C. Yong, W. Chen, K.M. Baker** (2012): The intracrine renin-angiotensin system, *Clinical Science* 123: 273–284.

- [344] **J.L. Cook, R.N. Re** (2012): Lessons from in vitro studies and a related intracellular angiotensin II transgenic mouse model, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 302: R482-93.
- [345] **T.M. Gwathmey, E.M. Alzayadneh, K.D. Pendergrass, M.C. Chappell** (2012): Novel roles of nuclear angiotensin receptors and signaling mechanisms, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 302: R518-30.
- [346] **P.M. Abadir, D.B. Foster, M. Crow, C.A. Cooke, J.J. Rucker, A. Jain, B.J. Smith, T.N. Burks, R.D. Cohn, N.S. Fedarko, R.M. Carey, B. O'Rourke, J.D. Walston** (2011): Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 14849–14854.
- [347] **N.S. Kalupahana, N. Moustaid-Moussa** (2012): The adipose tissue renin-angiotensin system and metabolic disorders: A review of molecular mechanisms, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 47: 379–390.
- [348] **F. Yiannikouris, M. Gupte, K. Putnam, S. Thatcher, R. Charnigo, D.L. Rateri, A. Daugherty, L.A. Cassis** (2012): Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in male mice, *Hypertension* 60: 1524–1530.
- [349] **C. Hubert, K. Savary, J.-M. Gasc, P. Corvol** (2006): The hematopoietic system: A new niche for the renin-angiotensin system, *Nature clinical practice. Cardiovascular Medicine* 3: 80–85.
- [350] **R. Morimoto, K. Akeda, R. Iida, A. Nishimura, M. Tsujii, S. Obata, Y. Kasai, A. Uchida, A. Sudo** (2013): Tissue renin-angiotensin system in the intervertebral disc, *Spine* 38: E129-36.
- [351] **M.S. Ola, A.S. Alhomida, C.M. Ferrario, S. Ahmad** (2017): Role of Tissue Renin-angiotensin System and the Chymase/angiotensin-(1-12) Axis in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy, *Current Medicinal Chemistry* 24: 3104–3114.
- [352] **M.I. Chernin, A.F. Candia, L.L. Stark, J.F. Aceto, K.M. Baker** (1990): Fetal expression of renin, angiotensinogen, and atriopeptin genes in chick heart, *Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice* 12: 617–629.
- [353] **R.L. Davisson** (2003): Physiological genomic analysis of the brain renin-angiotensin system, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285: R498-511.
- [354] **V.T. Karamyan, R.C. Speth** (2007): Enzymatic pathways of the brain renin-angiotensin system: Unsolved problems and continuing challenges, *Regulatory Peptides* 143: 15–27.
- [355] **A. Lippoldt, M. Paul, K. Fuxe, D. Ganten** (2009): The Brain Renin-Angiotensin System: Molecular Mechanisms of Cell to Cell Interactions, *Clinical and Experimental Hypertension* 17: 251–266.
- [356] **M. Bader, D. Ganten** (2002): It's Renin in the Brain, *Circulation Research* 90: 8–10.
- [357] **M.J. McKinley, A.L. Albiston, A.M. Allen, M.L. Mathai, C.N. May, R.M. McAllen, B.J. Oldfield, F.A.O. Mendelsohn, S.Y. Chai** (2003): The brain renin-angiotensin system: Location and physiological roles, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35: 901–918.
- [358] **K. Sakai, C.D. Sigmund** (2005): Molecular evidence of tissue renin-angiotensin systems: A focus on the brain, *Current Hypertension Reports* 7: 135–140.
- [359] **A.D. de Kloet, M. Liu, V. Rodríguez, E.G. Krause, C. Sumners** (2015): Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin system in cardiovascular control, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 309: R444-58.
- [360] **O. von Bohlen und Halbach, D. Albrecht** (2006): The CNS renin-angiotensin system, *Cell and Tissue Research* 326: 599–616.

- [361] **C. Llorens-Cortes, F.A.O. Mendelsohn** (2002): Organisation and functional role of the brain angiotensin system, *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system JRAAS* 3 Suppl 1: S39-48.
- [362] **B. Bunnemann, K. Fuxe, R. Metzger, B. Bjelke, D. Ganten** (1992): The semi-quantitative distribution and cellular localization of angiotensinogen mRNA in the rat brain, *Journal of Chemical Neuroanatomy* 5: 245–262.
- [363] **C. Sernia, T. Zeng, D. Kerr, B. Wyse** (1997): Novel perspectives on pituitary and brain angiotensinogen, *Frontiers in Neuroendocrinology* 18: 174–208.
- [364] **A.M. Allen, M.J. McKinley, F.A. Mendelsohn** (1988): Comparative neuroanatomy of angiotensin II receptor localization in the mammalian hypothalamus, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 15: 137–145.
- [365] **M.I. Phillips, E.A. Speakman, B. Kimura** (1993): Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin system, *Regulatory Peptides*: 1–20.
- [366] **M. Mathai, M.D. Evered, M.J. McKinley** (1997): Intracerebroventricular losartan inhibits postprandial drinking in sheep, *The American Journal of Physiology* 272: R1055-9.
- [367] **M.L. Mathai, M.D. Evered, M.J. McKinley** (1998): Central losartan blocks natriuretic, vasopressin, and pressor responses to central hypertonic NaCl in sheep, *The American Journal of Physiology* 275: R548-54.
- [368] **E. Gebke, A.R. Müller, M. Jurzak, R. Gerstberger** (1998): Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs, *Neuroscience* 85: 509–520.
- [369] **B. Bunnemann, K. Fuxe, D. Ganten** (1993): The renin-angiotensin system in the brain: An update 1993, *Regulatory Peptides* 46: 487–509.
- [370] **V.J. Dzau, J. Ingelfinger, R.E. Pratt, K.E. Ellison** (1986): Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains, *Hypertension* 8: 544–548.
- [371] **C.P. Genain, G.R. van Loon, T.A. Kotchen** (1985): Distribution of renin activity and angiotensinogen in rat brain. Effects of dietary sodium chloride intake on brain renin, *The Journal of Clinical Investigation* 76: 1939–1945.
- [372] **M.C. Ryan, A.L. Gundlach** (1997): Differential regulation of angiotensinogen and natriuretic peptide mRNAs in rat brain by osmotic stimulation: Focus on anterior hypothalamus and supraoptic nucleus, *Peptides* 18: 1365–1375.
- [373] **M. Schinke, O. Baltatu, M. Bohm, J. Peters, W. Rascher, G. Bricca, A. Lippoldt, D. Ganten, M. Bader** (1999): Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 3975–3980.
- [374] **R.L. Stornetta, C.L. Hawelu-Johnson, P.G. Guyenet, K.R. Lynch** (1988): Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain, *Science* 242: 1444–1446.
- [375] **W.G. Thomas, C. Sernia** (1988): Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat brain, *Neuroscience* 25: 319–341.
- [376] **G. Yang, T.S. Gray, C.D. Sigmund, M.D. Cassell** (1999): The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system, *Brain Research* 817: 123–131.
- [377] **H. Imboden, J.W. Harding, U. Hilgenfeldt, M.R. Celio, D. Felix** (1987): Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain, *Brain Research* 410: 74–77.
- [378] **J.P. Richoux, J. Bouhnik, E. Clauser, P. Corvol** (1988): The renin-angiotensin system in the rat brain. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in glial cells and neurons, *Histochemistry* 89: 323–331.
- [379] **C. Sernia** (1995): Location and secretion of brain angiotensinogen, *Regulatory Peptides* 57: 1–18.
- [380] **P. Nakagawa, C.D. Sigmund** (2017): How Is the Brain Renin-Angiotensin System Regulated?, *Hypertension* 70: 10–18.

- [381] **K.K. Parsons, T.M. Coffman** (2007): The renin-angiotensin system: It's all in your head, *The Journal of Clinical Investigation* 117: 873–876.
- [382] **R. Ramchandra, S.T. Yao, C.N. May** (2013): Organ selective regulation of sympathetic outflow by the brain Angiotensin system, *Current Hypertension Reports* 15: 401–408.
- [383] **A. Lippoldt, B. Bunnemann, N. Iwai, R. Metzger, T. Inagami, K. Fuxe, D. Ganten** (1993): Cellular localization of angiotensin type 1 receptor and angiotensinogen mRNAs in the subfornical organ of the rat brain, *Neuroscience Letters* 150: 153–158.
- [384] **K. Hermann, M.I. Phillips, U. Hilgenfeldt, M.K. Raizada** (1988): Biosynthesis of angiotensinogen and angiotensins by brain cells in primary culture, *J Neurochem* 51: 398–405.
- [385] **P. Sinnayah, E. Lazartigues, K. Sakai, R.V. Sharma, C.D. Sigmund, R.L. Davison** (2006): Genetic ablation of angiotensinogen in the subfornical organ of the brain prevents the central angiotensinergic pressor response, *Circulation Research* 99: 1125–1131.
- [386] **S.W. Barth, R. Gerstberger** (1999): Differential regulation of angiotensinogen and AT1A receptor mRNA within the rat subfornical organ during dehydration, *Molecular Brain Research* 64: 151–164.
- [387] **J.L. Lavoie, M.D. Cassell, K.W. Gross, C.D. Sigmund** (2004): Adjacent expression of renin and angiotensinogen in the rostral ventrolateral medulla using a dual-reporter transgenic model, *Hypertension* 43: 1116–1119.
- [388] **B. Bunnemann, K. Fuxe, D. Ganten** (1992): The brain renin-angiotensin system: Localization and general significance, *Journal of cardiovascular pharmacology* 19 Suppl 6: S51-62.
- [389] **K. Agassandian, J.L. Grobe, X. Liu, M. Agassandian, A.P. Thompson, C.D. Sigmund, M.D. Cassell** (2017): Evidence for intraventricular secretion of angiotensinogen and angiotensin by the subfornical organ using transgenic mice, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 312: R973-R981.
- [390] **K. Fuxe, D. Ganten, T. Hökfelt, V. Locatelli, K. Poulsen, G. Stock, E. Rix, R. Taugner** (1980): Renin-like immunocytochemical activity in the rat and mouse brain, *Neuroscience Letters* 18: 245–250.
- [391] **C. Fischer-Ferraro, V.E. Nahmod, D.J. Goldstein, S. Finkielman** (1971): Angiotensin and renin in rat and dog brain, *The Journal of Experimental Medicine* 133: 353–361.
- [392] **D. Ganten, J.L. Minnich, P. Granger, K. Hayduk, H.M. Brecht, A. Barbeau, R. Boucher, J. Genest** (1971): Angiotensin-forming enzyme in brain tissue, *Science* 173: 64–65.
- [393] **J.L. Lavoie, M.D. Cassell, K.W. Gross, C.D. Sigmund** (2004): Localization of renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model, *Physiological Genomics* 16: 240–246.
- [394] **K. Hermann, M.K. Raizada, C. Sumners, M.I. Phillips** (1987): Presence of renin in primary neuronal and glial cells from rat brain, *Brain Research* 437: 205–213.
- [395] **A. Lippoldt, K. Fuxe, F.C. Luft** (2001): A view of renin in the brain, *Journal of molecular medicine* 79: 71–73.
- [396] **B.S. Huang, R.A. White, L. Bi, F.H.H. Leenen** (2012): Central infusion of aliskiren prevents sympathetic hyperactivity and hypertension in Dahl salt-sensitive rats on high salt intake, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 302: R825-32.
- [397] **D. Peter** (2005): Aliskiren in hypertension: Evidence for its potential therapeutic value, *Core Evidence* 1: 13–22.
- [398] **J.L. Lavoie, X. Liu, R.A. Bianco, T.G. Beltz, A.K. Johnson, C.D. Sigmund** (2006): Evidence supporting a functional role for intracellular renin in the brain, *Hypertension* 47: 461–466.

- [399] **W.W. Batenburg, A.H.J. Danser** (2012): (Pro)renin and its receptors: Pathophysiological implications, *Clinical Science* 123: 121–133.
- [400] **M.A. Lee-Kirsch, F. Gaudet, M.C. Cardoso, K. Lindpaintner** (1999): Distinct Renin Isoforms Generated by Tissue-Specific Transcription Initiation and Alternative Splicing, *Circulation Research* 84: 240–246.
- [401] **S. Morimoto, M.D. Cassell, C.D. Sigmund** (2002): The brain renin-angiotensin system in transgenic mice carrying a highly regulated human renin transgene, *Circulation Research* 90: 80–86.
- [402] **K. Shinohara, X. Liu, D.A. Morgan, D.R. Davis, M.L.S. Sequeira-Lopez, M.D. Cassell, J.L. Grobe, K. Rahmouni, C.D. Sigmund** (2016): Selective Deletion of the Brain-Specific Isoform of Renin Causes Neurogenic Hypertension, *Hypertension* 68: 1385–1392.
- [403] **P.L. Sinn, C.D. Sigmund** (2000): Identification of three human renin mRNA isoforms from alternative tissue-specific transcriptional initiation, *Physiological Genomics* 3: 25–31.
- [404] **S. Clausmeyer, R. Stürzebecher, J. Peters** (1999): An alternative transcript of the rat renin gene can result in a truncated prorenin that is transported into adrenal mitochondria, *Circulation Research* 84: 337–344.
- [405] **P. Garrido-Gil, A.I. Rodriguez-Perez, P. Fernandez-Rodriguez, J.L. Lanciego, J.L. Labandeira-Garcia** (2017): Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells, *Brain Structure & Function* 222: 2559–2571.
- [406] **G. Nguyen** (2006): Renin/prorenin receptors, *Kidney International* 69: 1503–1506.
- [407] **Z. Shan, A.E. Cuadra, C. Sumners, M.K. Raizada** (2008): Characterization of a functional (pro)renin receptor in rat brain neurons, *Experimental Physiology* 93: 701–708.
- [408] **S.G. Cooper, D.P. Trivedi, R. Yamamoto, C.J. Worker, C.-Y. Feng, J.T. Sorensen, W. Yang, Z. Xiong, Y. Feng** (2018): Increased (pro)renin receptor expression in the subfornical organ of hypertensive humans, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 314: H796-H804.
- [409] **E.A. Bourassa, R.C. Speth** (2010): Water deprivation increases angiotensin-converting enzyme but not AT(1) receptor expression in brainstem and paraventricular nucleus of the hypothalamus of the rat, *Brain Research* 1319: 83–91.
- [410] **S.Y. Chai, F.A.O. Mendelsohn, G. Paxinos** (1987): Angiotensin converting enzyme in rat brain visualized by quantitative in vitro autoradiography, *Neuroscience* 20: 615–627.
- [411] **F.M. Correa, L.M. Plunkett, J.M. Saavedra** (1986): Quantitative distribution of angiotensin-converting enzyme (kininase II) in discrete areas of the rat brain by autoradiography with computerized microdensitometry, *Brain Research* 375: 259–266.
- [412] **F.M.A. Correa, S.S. Guilhaume, J.M. Saavedra** (1991): Comparative quantification of rat brain and pituitary angiotensin-converting enzyme with autoradiographic and enzymatic methods, *Brain Research* 545: 215–222.
- [413] **V.M. Pickel, J. Chan, D. Ganten** (1986): Dual peroxidase and colloidal gold-labeling study of angiotensin converting enzyme and angiotensin-like immunoreactivity in the rat subfornical organ, *J. Neurosci.* 6: 2457–2469.
- [414] **F.M. Rogerson, I. Schlawe, G. Paxinos, S.Y. Chai, M.J. McKinley, F.A.O. Mendelsohn** (1995): Localization of angiotensin converting enzyme by in vitro autoradiography in the rabbit brain, *Journal of Chemical Neuroanatomy* 8: 227–243.
- [415] **S.M. Strittmatter, S.H. Snyder** (1987): Angiotensin converting enzyme immunohistochemistry in rat brain and pituitary gland: Correlation of isozyme type with cellular localization, *Neuroscience* 21: 407–420.
- [416] **J.M. Saavedra, J. Fernandez-Pardal, C. Chevillard** (1982): Angiotensin-converting enzyme in discrete areas of the rat forebrain and pituitary gland, *Brain Research* 245: 317–325.

- [417] **B.S. Huang, W.J. Cheung, H. Wang, J. Tan, R.A. White, F.H.H. Leenen** (2006): Activation of brain renin-angiotensin-aldosterone system by central sodium in Wistar rats, *American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology* 291: H1109-17.
- [418] **B. Lu, X.J. Yang, K. Chen, D.J. Yang, J.Q. Yan** (2009): Dietary sodium deprivation evokes activation of brain regional neurons and down-regulation of angiotensin II type 1 receptor and angiotensin-conversion enzyme mRNA expression, *Neuroscience* 164: 1303–1311.
- [419] **B. Lu, J. Yan, X. Yang, J. Li, K. Chen** (2012): Involvement of brain ANG II in acute sodium depletion induced salty taste changes, *Regulatory Peptides* 179: 15–22.
- [420] **M. Rauch, H.A. Schmid** (1999): Functional evidence for subfornical organ-intrinsic conversion of angiotensin I to angiotensin II, *The American Journal of Physiology* 276: R1630-8.
- [421] **Z. Xu, J. Xinghong** (1999): Drinking and Fos-immunoreactivity in rat brain induced by local injection of angiotensin I into the subfornical organ, *Brain Research* 817: 67–74.
- [422] **M.F. Doobay, L.S. Talman, T.D. Obr, X. Tian, R.L. Davisson, E. Lazartigues** (2007): Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292: R373-81.
- [423] **K.M. Elased, T.S. Cunha, F.K. Marcondes, M. Morris** (2008): Brain angiotensin-converting enzymes: Role of angiotensin-converting enzyme 2 in processing angiotensin II in mice, *Experimental Physiology* 93: 665–675.
- [424] **Y. Feng, X. Yue, H. Xia, S.M. Bindom, P.J. Hickman, C.M. Filipeanu, G. Wu, E. Lazartigues** (2008): Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in the subfornical organ prevents the angiotensin II-mediated pressor and drinking responses and is associated with angiotensin II type 1 receptor downregulation, *Circulation Research* 102: 729–736.
- [425] **H. Xia, T.M. de Queiroz, S. Sriramula, Y. Feng, T. Johnson, I.N. Mungrue, E. Lazartigues** (2015): Brain ACE2 overexpression reduces DOCA-salt hypertension independently of endoplasmic reticulum stress, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 308: R370-8.
- [426] **P. Xu, S. Sriramula, E. Lazartigues** (2011): ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: The axis of good, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300: R804-17.
- [427] **N.E. Clarke, A.J. Turner** (2012): Angiotensin-converting enzyme 2: The first decade, *International Journal of Hypertension*: 307315.
- [428] **E.S. Lopes, M. Sumitani, L. Juliano, W.T. Beraldo, J.L. Pesquero** (1997): Distribution of tonin- and kallikrein-like activities in rat brain, *Brain Research* 769: 152–157.
- [429] **C.F. Santos, M.A.V. Caprio, E.B. Oliveira, M.C.O. Salgado, D.N. Schippers, D.H. Munzenmaier, A.S. Greene** (2003): Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 285: H775-83.
- [430] **C.F. Santos, A.S. Greene, M.C.O. Salgado, E.B. Oliveira** (2004): Conversion of renin substrate tetradecapeptide to angiotensin II by rat MAB elastase-2, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 82: 1000–1005.
- [431] **Y. Uehara, S.-i. Miura, E. Yahiro, K. Saku** (2013): Non-ACE pathway-induced angiotensin II production, *Current Pharmaceutical Design* 19: 3054–3059.
- [432] **K. Arakawa, H. Maruta** (1980): Ability of kallikrein to generate angiotensin II-like pressor substance and a proposed 'kinin-tensin enzyme system', *Nature* 288: 705–706.
- [433] **K. Arakawa, M. Yuki, M. Ikeda** (1980): Chemical identity of tryptensin with angiotensin, *The Biochemical Journal* 187: 647–653.

- [434] **L.A. Belova** (2000): Angiotensin II-generating enzymes, *Biochemistry. Biokhimiia* 65: 1337–1345.
- [435] **R. Boucher, S. Demassieux, R. Garcia, J. Genest** (1977): Tonin, angiotensin II system. A review, *Circulation Research* 41: 26–29.
- [436] **A. Lippoldt, M. Paul, K. Fuxe, D. Ganten** (1995): The brain renin-angiotensin system: Molecular mechanisms of cell to cell interactions, *Clinical and Experimental Hypertension* 17: 251–266.
- [437] **M. Uddin, O.U. Beg** (1995): Specific cleavage of synthetic renin substrate by mouse gamma-nerve growth factor, *Journal of Protein Chemistry* 14: 621–625.
- [438] **V.C. Chitravanshi, A. Proddutur, H.N. Sapru** (2012): Cardiovascular actions of angiotensin-(1-12) in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat are mediated via angiotensin II, *Experimental Physiology* 97: 1001–1017.
- [439] **M. Yoshida, Y. Watanabe, K. Yamanishi, A. Yamashita, H. Yamamoto, D. Okuzaki, K. Shimada, H. Nojima, T. Yasunaga, H. Okamura, H. Matsunaga, H. Yamanishi** (2014): Analysis of genes causing hypertension and stroke in spontaneously hypertensive rats: Gene expression profiles in the brain, *International Journal of Molecular Medicine* 33: 887–896.
- [440] **R.C. Araujo, M.P. Lima, E.S.L. Lomez, M. Bader, J.B. Pesquero, M. Sumitani, J.L. Pesquero** (2002): Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II, *Physiology & Behavior* 76: 327–333.
- [441] **K. Kondo, R. Garcia, R. Boucher, J. Genest** (1980): Effects of intracerebroventricular administration of tonin on water intake and blood pressure in the rat, *Brain Research* 200: 437–441.
- [442] **S.A. Doggrell, J.C. Wanstall** (2004): Vascular chymase: Pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition, *Cardiovascular Research* 61: 653–662.
- [443] **K. Heuston, H.P. Zeigler** (1994): Water deprivation and subfornical organ activity in the pigeon a [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose study, *Brain Research* 654: 331–335.
- [444] **M.M. Roszkowska-Chojecka, A. Walkowska, O. Gawryś, I. Baranowska, M. Kalisz, A. Litwiniuk, L. Martyńska, E. Kompanowska-Jeziarska** (2015): Effects of chymostatin, a chymase inhibitor, on blood pressure, plasma and tissue angiotensin II, renal haemodynamics and renal excretion in two models of hypertension in the rat, *Experimental Physiology* 100: 1093–1105.
- [445] **Y. Sukenaga, K. Kamoshita, S. Takai, M. Miyazaki** (2002): Development of the chymase inhibitor as an anti-tissue-remodeling drug: Myocardial infarction and some other possibilities, *Japanese Journal of Pharmacology* 90: 218–222.
- [446] **E. Yahiro, S.-i. Miura, S. Imaizumi, Y. Uehara, K. Saku** (2013): Chymase inhibitors, *Current Pharmaceutical Design* 19: 3065–3071.
- [447] **H. Arakawa, K. Kawabe, H.N. Sapru** (2013): Angiotensin-(1-12) in the rostral ventrolateral medullary pressor area of the rat elicits sympathoexcitatory responses, *Experimental Physiology* 98: 94–108.
- [448] **L.J. Dell'Italia, C.M. Ferrario** (2013): The never-ending story of angiotensin peptides: Beyond angiotensin I and II, *Circulation Research* 112: 1086–1087.
- [449] **C.M. Ferrario** (2010): New physiological concepts of the renin-angiotensin system from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism, *Hypertension* 55: 445–452.
- [450] **A.S. Brecher, R. Dubord** (2008): Effect of acetaldehyde upon cathepsin G and chymase. NRAS implications, *Digestive Diseases and Sciences* 53: 1311–1315.
- [451] **M.G. Tonnesen, M.S. Klempner, K.F. Austen, B.U. Wintroub** (1982): Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G, *The Journal of Clinical Investigation* 69: 25–30.
- [452] **S. Ahmad, T. Simmons, J. Varagic, N. Moniwa, M.C. Chappell, C.M. Ferrario** (2011): Chymase-dependent generation of angiotensin II from angiotensin-(1-12) in human atrial tissue, *PLoS one* 6: e28501.

- [453] **S. Ahmad, J. Varagic, J.L. VonCannon, L. Groban, J.F. Collawn, L.J. Dell'Italia, C.M. Ferrario** (2016): Primacy of cardiac chymase over angiotensin converting enzyme as an angiotensin-(1-12) metabolizing enzyme, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478: 559–564.
- [454] **C. Karlsson** (1998): Human Adipose Tissue Expresses Angiotensinogen and Enzymes Required for Its Conversion to Angiotensin II, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83: 3925–3929.
- [455] **H.C.G. Prosser, M.E. Forster, A.M. Richards, C.J. Pemberton** (2009): Cardiac chymase converts rat proAngiotensin-12 (PA12) to angiotensin II: Effects of PA12 upon cardiac haemodynamics, *Cardiovascular Research* 82: 40–50.
- [456] **S. Reyes, J. Varagic, S. Ahmad, J. VonCannon, N.D. Kon, H. Wang, L. Groban, C.P. Cheng, L.J. Dell'Italia, C.M. Ferrario** (2017): Novel Cardiac Intracrine Mechanisms Based on Ang-(1-12)/Chymase Axis Require a Revision of Therapeutic Approaches in Human Heart Disease, *Current Hypertension Reports* 19: 16.
- [457] **S. Nagata, J. Kato, K. Sasaki, N. Minamino, T. Eto, K. Kitamura** (2006): Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350: 1026–1031.
- [458] **A.C. Arnold, K. Isa, H.A. Shaltout, M. Nautiyal, C.M. Ferrario, M.C. Chappell, D.I. Diz** (2010): Angiotensin-(1-12) requires angiotensin converting enzyme and AT1 receptors for cardiovascular actions within the solitary tract nucleus, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 299: H763-71.
- [459] **J.A. Jessup, A.J. Trask, M.C. Chappell, S. Nagata, J. Kato, K. Kitamura, C.M. Ferrario** (2008): Localization of the novel angiotensin peptide, angiotensin-(1-12), in heart and kidney of hypertensive and normotensive rats, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 294: H2614-8.
- [460] **N. Moniwa, J. Varagic, S.W. Simington, S. Ahmad, S. Nagata, J.L. VonCannon, C.M. Ferrario** (2013): Primacy of angiotensin converting enzyme in angiotensin-(1-12) metabolism, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 305: H644-50.
- [461] **B.M. Westwood, M.C. Chappell** (2012): Divergent pathways for the angiotensin-(1-12) metabolism in the rat circulation and kidney, *Peptides* 35: 190–195.
- [462] **W.C. de Mello, L.J. Dell'Italia, J. Varagic, C.M. Ferrario** (2016): Intracellular angiotensin-(1-12) changes the electrical properties of intact cardiac muscle, *Molecular and Cellular Biochemistry* 422: 31–40.
- [463] **K.H. Chan, Y.H. Chen, Y. Zhang, Y.H. Wong, N.J. Dun** (2014): Angiotensin-1-12 interacts with angiotensin type I receptors, *Neuropharmacology* 81: 267–273.
- [464] **H.N. Sapru** (2013): Role of the hypothalamic arcuate nucleus in cardiovascular regulation, *Autonomic Neuroscience Basic & Clinical* 175: 38–50.
- [465] **T. Kawabe, K. Kawabe, H.N. Sapru** (2014): Cardiovascular effect of angiotensin-(1-12) in the caudal ventrolateral medullary depressor area of the rat, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 306: H438-49.
- [466] **D.P. Healy, S. Wilk** (1993): Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II, *Brain Research* 606: 295–303.
- [467] **R.W. Lind, L.W. Swanson, D. Ganten** (1985): Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study, *Neuroendocrinology* 40: 2–24.
- [468] **A. Lippoldt, B. Bunnemann, A. Ueki, L. Rosén, A. Cintra, U. Hasselrot, R. Metzger, U. Hilgenfeldt, B. Brosnihan, D. Ganten** (1994): On the plasticity of the cerebellar renin-angiotensin system: Localization of components and effects of mechanical perturbation, *Brain Research* 668: 144–159.

- [469] **S. Okuya, K. Inenaga, T. Kaneko, H. Yamashita** (1987): Angiotensin II sensitive neurons in the supraoptic nucleus, subfornical organ and anteroventral third ventricle of rats in vitro, *Brain Research* 402: 58–67.
- [470] **K. Sakai, K. Agassandian, S. Morimoto, P. Sinnayah, M.D. Cassell, R.L. Davisson, C.D. Sigmund** (2007): Local production of angiotensin II in the subfornical organ causes elevated drinking, *The Journal of Clinical Investigation* 117: 1088–1095.
- [471] **R.W. Lind, L.W. Swanson, T.O. Bruhn, D. Ganten** (1985): The distribution of angiotensin II-immunoreactive cells and fibers in the paraventriculo-hypophysial system of the rat, *Brain Research* 338: 81–89.
- [472] **K. Fuxe, D. Ganten, T. Hökfelt, P. Bolme** (1976): Immunohistochemical evidence for the existence of angiotensin II-containing nerve terminals in the brain and spinal cord in the rat, *Neuroscience Letters* 2: 229–234.
- [473] **K. Hermann, M.I. Phillips, M.K. Raizada** (1989): Metabolism of angiotensin peptides by neuronal and glial cultures from rat brain, *J Neurochem* 52: 863–868.
- [474] **B.J. Oldfield, D. Ganten, M.J. McKinley** (1989): An Ultrastructural Analysis of the Distribution of Angiotensin II in the Rat Brain, *Journal of Neuroendocrinology* 1: 121–128.
- [475] **J.P. Coble, M.D. Cassell, D.R. Davis, J.L. Grobe, C.D. Sigmund** (2014): Activation of the renin-angiotensin system, specifically in the subfornical organ is sufficient to induce fluid intake, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307: R376-86.
- [476] **R.W. Lind, L.W. Swanson, D. Ganten** (1984): Angiotensin II immunoreactive pathways in the central nervous system of the rat: Evidence for a projection from the subfornical organ to the paraventricular nucleus of the hypothalamus, *Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice* 6: 1915–1920.
- [477] **C.F. Roncari, R.B. David, R.F. Johnson, P.M. de Paula, D.S.A. Colombari, L.A. de Luca JR, A.K. Johnson, E. Colombari, J.V. Menani** (2014): Angiotensinergic and cholinergic receptors of the subfornical organ mediate sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus, *Neuroscience* 262: 1–8.
- [478] **R.W. Lind, L.W. Swanson, D. Ganten** (1984): Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat, *Brain Research* 321: 209–215.
- [479] **R.W. Lind** (1988): Angiotensin and the lamina terminalis: Illustrations of a complex unity, *Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice* 10 Suppl 1: 79–105.
- [480] **T. Matsuda, T.Y. Hiyama, F. Niimura, T. Matsusaka, A. Fukamizu, K. Kobayashi, K. Kobayashi, M. Noda** (2017): Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ, *Nature Neuroscience* 20: 230–241.
- [481] **P. Balakumar, G. Jagadeesh** (2014): A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology, *Cellular Signalling* 26: 2147–2160.
- [482] **K.D. Singh, S.S. Karnik** (2016): Angiotensin Receptors: Structure, Function, Signaling and Clinical Applications, *Journal of Cell Signaling* 1.
- [483] **R.C. Speth, V.T. Karamyan** (2008): Brain angiotensin receptors and binding proteins, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377: 283–293.
- [484] **A.M. Nuyt, Z. Lenkei, P. Corvol, M. Palkovits, C. Llorens-Cortés** (2001): Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor mRNAs in fetal and neonatal rat brain, *The Journal of Comparative Neurology* 440: 192–203.
- [485] **J. Monti, M. Schinke, M. Böhm, D. Ganten, M. Bader, G. Bricca** (2001): Glial angiotensinogen regulates brain angiotensin II receptors in transgenic rats, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280: R233-40.
- [486] **J.D. Walch, T.P. Nedungadi, J.T. Cunningham** (2014): ANG II receptor subtype 1a gene knockdown in the subfornical organ prevents increased drinking behavior in bile

- duct-ligated rats, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307: R597-607.
- [487] **D.L.S. Washburn, A. V. Ferguson** (2001): Selective potentiation of N-type calcium channels by angiotensin II in rat subfornical organ neurones, *The Journal of Physiology* 536: 667–675.
- [488] **N. Anthes, H.A. Schmid, M. Hashimoto, T. Riediger, E. Simon** (1997): Heterogeneous actions of vasopressin on ANG II-sensitive neurons in the subfornical organ of rats, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 273: R2105-R2111.
- [489] **A.F.L. Flôr, J.L. de Brito Alves, M.S. França-Silva, C.M. Balarini, L.L.K. Elias, S.G. Ruginsk, J. Antunes-Rodrigues, V.A. Braga, J.C. Cruz** (2018): Glial Cells Are Involved in ANG-II-Induced Vasopressin Release and Sodium Intake in Awake Rats, *Frontiers in Physiology* 9: 430.
- [490] **K. Isegawa, Y. Hirooka, M. Katsuki, T. Kishi, K. Sunagawa** (2014): Angiotensin II type 1 receptor expression in astrocytes is upregulated leading to increased mortality in mice with myocardial infarction-induced heart failure, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 307: H1448-55.
- [491] **L. Füchtbauer, M. Groth-Rasmussen, T.H. Holm, M. Løbner, H. Toft-Hansen, R. Khoroshi, T. Owens** (2011): Angiotensin II Type 1 receptor (AT1) signaling in astrocytes regulates synaptic degeneration-induced leukocyte entry to the central nervous system, *Brain, Behavior, and Immunity* 25: 897–904.
- [492] **J.P. Coble, J.L. Grobe, A.K. Johnson, C.D. Sigmund** (2015): Mechanisms of brain renin angiotensin system-induced drinking and blood pressure: Importance of the subfornical organ, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 308: R238-49.
- [493] **D. Daniels** (2014): *Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration: Diverse Roles of Angiotensin Receptor Intracellular Signaling Pathways in the Control of Water and Salt Intake*, Boca Raton.
- [494] **A. González Iglesias, C. Suárez, C. Feierstein, G. Díaz-Torga, D. Becu-Villalobos** (2001): Desensitization of angiotensin II: Effect on Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, inositol triphosphate, and prolactin in pituitary cells, *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 280: E462-70.
- [495] **A. Saxena, M. Bachelor, Y.H. Park, F.R. Carreno, T.P. Nedungadi, J.T. Cunningham** (2014): Angiotensin II induces membrane trafficking of natively expressed transient receptor potential vanilloid type 4 channels in hypothalamic 4B cells, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307: R945-55.
- [496] **C. Suárez, I.G. Tornadú, C. Cristina, J. Vela, A.G. Iglesias, C. Libertun, G. Díaz-Torga, D. Becu-Villalobos** (2002): Angiotensin and calcium signaling in the pituitary and hypothalamus, *Cellular and Molecular Neurobiology* 22: 315–333.
- [497] **C. Sumners, C.H. Gelband** (1998): Neuronal ion channel signalling pathways: Modulation by angiotensin II, *Cellular Signalling* 10: 303–311.
- [498] **S.-G. Wei, Y. Yu, Z.-H. Zhang, R.B. Felder** (2009): Angiotensin II upregulates hypothalamic AT1 receptor expression in rats via the mitogen-activated protein kinase pathway, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 296: H1425-33.
- [499] **A. Bali, A.S. Jaggi** (2016): Angiotensin II-triggered kinase signaling cascade in the central nervous system, *Reviews in the Neurosciences* 27: 301–315.
- [500] **G.J. Bhat, K.M. Baker** (1997): Angiotensin II stimulates rapid serine phosphorylation of transcription factor Stat3, *Molecular and Cellular Biochemistry* 170: 171–176.
- [501] **M.B. Marrero, B. Schieffer, W.G. Paxton, L. Heerdt, B.C. Berk, P. Delafontaine, K.E. Bernstein** (1995): Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor, *Nature* 375: 247–250.

- [502] **C. Lebrun** (1996): Complex activation of inducible transcription factors in the brain of normotensive and spontaneously hypertensive rats following central angiotensin II administration, *Regulatory Peptides* 66: 19–23.
- [503] **J.M. Mahon, M. Allen, J. Herbert, J.T. Fitzsimons** (1995): The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after intracerebroventricular injection of angiotensin II, angiotensin-(1–7) or carbachol, *Neuroscience* 69: 199–208.
- [504] **E. Deliu, G.C. Brailoiu, S. Eguchi, N.E. Hoffman, J.E. Rabinowitz, D.G. Tilley, M. Madesh, W.J. Koch, E. Brailoiu** (2014): Direct evidence of intracrine angiotensin II signaling in neurons, *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 306: C736–44.
- [505] **U. Kandalam, N. Sarmiento, D. Haspula, M.A. Clark** (2015): Angiotensin III induces signal transducer and activator of transcription 3 and interleukin-6 mRNA levels in cultured rat astrocytes, *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system* 16: 758–767.
- [506] **U. Kandalam, M.A. Clark** (2010): Angiotensin II activates JAK2/STAT3 pathway and induces interleukin-6 production in cultured rat brainstem astrocytes, *Regulatory Peptides* 159: 110–116.
- [507] **U. Kandalam, M. Palanisamy, M.A. Clark** (2012): Angiotensin II induces cell growth and IL-6 mRNA expression through the JAK2-STAT3 pathway in rat cerebellar astrocytes, *JAK-STAT* 1: 83–89.
- [508] **G. Wang, P. Sarkar, J.R. Peterson, J. Anrather, J.P. Pierce, J.M. Moore, J. Feng, P. Zhou, T.A. Milner, V.M. Pickel, C. Iadecola, R.L. Davisson** (2013): COX-1-derived PGE2 and PGE2 type 1 receptors are vital for angiotensin II-induced formation of reactive oxygen species and Ca(2+) influx in the subfornical organ, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 305: H1451–61.
- [509] **S.A. Bhat, R. Goel, R. Shukla, K. Hanif** (2016): Angiotensin Receptor Blockade Modulates NFκB and STAT3 Signaling and Inhibits Glial Activation and Neuroinflammation Better than Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition, *Molecular Neurobiology* 53: 6950–6967.
- [510] **E. Simon, R. Gerstberger, D.A. Gray, K. Matsumura** (1989): Location and functional properties of angiotensin targets in the third ventricular region, *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum* 583: 119–129.
- [511] **R. Gerstberger, D.A. Gray, E. Simon** (1984): Circulatory and osmoregulatory effects of angiotensin II perfusion of the third ventricle in a bird with salt glands, *The Journal of Physiology* 349: 167–182.
- [512] **H.A. Schmid, E. Simon** (1996): Vasotocin acts as a dipsogen in ducks at concentrations stimulating subfornical organ neurons in vitro, *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 165: 615–621.
- [513] **T. Hübschle, I. Küchenmeister, R. Gerstberger** (1999): Central action of nitric oxide in the saltwater-acclimated duck: Modulation of extrarenal sodium excretion and vasotocin release, *Brain Research* 825: 22–35.
- [514] **H. Kobayashi, Y. Takei** (1982): Mechanisms for induction of drinking with special reference to angiotensin II, *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology* 71: 485–494.
- [515] **K. Matsumura, E. Simon** (1990): Increase in basal firing rate and sensitivity to angiotensin II in subfornical organ neurones of ducks adapted to salt water, *The Journal of Physiology* 429: 297–308.
- [516] **Y. Takei, H. Kobayashi, M. Yanagisawa, T. Bando** (1979): Involvement of catecholaminergic nerve fibers in angiotensin II-induced drinking in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*, *Brain Research* 174: 229–244.
- [517] **P.G. Waser** (1960): The cholinergic receptor, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 12: 577–594.
- [518] **J. DEL Castillo, B. Katz** (1955): On the localization of acetylcholine receptors, *The Journal of Physiology* 128: 157–181.

- [519] **J. DEL Castillo, B. Katz** (1957): Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 146: 369–381.
- [520] **E. Honda, K. Ono, T. Toyono, H. Kawano, S. Masuko, K. Inenaga** (2003): Activation of muscarinic receptors in rat subfornical organ neurones, *Journal of Neuroendocrinology* 15: 770–777.
- [521] **Z. Xu, E. Pekarek, J. Ge, J. Yao** (2001): Functional relationship between subfornical organ cholinergic stimulation and cellular activation in the hypothalamus and AV3V region, *Brain Research* 922: 191–200.
- [522] **K. Inenaga, E. Honda, K. Ono** (2004): Diversity of the muscarinic and nicotinic responses of subfornical organ neurons in rat slice preparations, *Neuroscience Letters* 354: 135–138.
- [523] **R.F. Johnson, T.G. Beltz, R.V. Sharma, Z. Xu, R.A. Bhatt, A.K. Johnson** (2001): Agonist activation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in subfornical organ cells projecting to the supraoptic nucleus, *American Journal of Physiology* 280: R1592-9.
- [524] **J. Tanaka** (2003): Activation of cholinergic pathways from the septum to the subfornical organ area under hypovolemic condition in rats, *Brain Research* 61: 497–504.
- [525] **S.H. Xu, E. Honda, K. Ono, K. Inenaga** (2001): Muscarinic modulation of GABAergic transmission to neurons in the rat subfornical organ, *American Journal of Physiology* 280: R1657-64.
- [526] **J.V. Menani, W.A. Saad, L.A. Camargo, J. Antunes-Rodrigues, M.R. Covian** (1984): Effect of cholinergic and adrenergic stimulation of the subfornical organ on water intake, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 20: 301–306.
- [527] **Z. Xu, M.G. Ross, A.K. Johnson** (2001): Intracerebroventricular carbachol induces FOS immunoreactivity in lamina terminalis neurons projecting to the supraoptic nucleus, *Brain Research* 895: 104–110.
- [528] **K. Ono, M. Hirase, A. Kai, K. Inenaga** (2008): Effect of central nicotinic activation on drinking behavior, *Neuroreport* 19: 845–849.
- [529] **K. Ono, E. Honda, T. Toyono, S. Kataoka, T. Nakamura, K. Inenaga** (2003): Evidence for the presence of nicotinic receptors on rat subfornical organ neurons, *Autonomic Neuroscience Basic & Clinical* 108: 87–90.
- [530] **J. Bielecka** (1966): Adrenergic system and thyroid hormones, *Polski Tygodnik Lekarski* 21: 269–272.
- [531] **T. Kiba, A. Inamoto** (1967): Adrenergic receptors, Masui. *The Japanese Journal of Anesthesiology* 16: 1005–1012.
- [532] **E. Muscholl, K.H. Rahn** (1968): Adrenerge alpha- und beta-Rezeptoren und ihre spezifischen Hemmstoffe, *Klinische Wochenschrift* 46: 113–119.
- [533] **R.E. Gomez, M.A. Cannata** (1986): Further evidence that a beta-adrenergic mechanism regulates water intake: Role of the subfornical organ, *European Journal of Pharmacology* 126: 69–73.
- [534] **R.E. Gomez, C.M. Taquini, M.A. Cannata** (1983): Effects of propranolol on induced water intake and on the subfornical organ surface, *European Journal of Pharmacology* 94: 327–330.
- [535] **I.M. Al-Naggar, C.C. Hardy, O.G. Taweh, T. Grabauskas, D.K. Mulkey, G.A. Kuchel, P.P. Smith** (2018): HCN as a Mediator of Urinary Homeostasis: Age-Associated Changes in Expression and Function in Adrenergic Detrusor Relaxation, *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*.
- [536] **A.K. Johnson, J.T. Cunningham, R.L. Thunhorst** (1996): Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 23: 183–191.
- [537] **E.G. Krause, S.J. Melhorn, J.F. Davis, K.A. Scott, L.Y. Ma, A.D. de Kloet, S.C. Benoit, S.C. Woods, R.R. Sakai** (2008): Angiotensin type 1 receptors in the subfornical organ mediate the drinking and hypothalamic-pituitary-adrenal response to systemic isoproterenol, *Endocrinology* 149: 6416–6424.

- [538] **J.V. Menani, W.A. Saad, L.A. Camargo, J. Antunes-Rodrigues, M.R. Covian** (1984): Effect of cholinergic and adrenergic stimulation of the subfornical organ on water intake, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 20: 301–306.
- [539] **M. Takahashi, J. Tanaka** (2017): Noradrenaline receptor mechanisms modulate the angiotensin II-induced water intake in the subfornical organ in rats, *Experimental Brain Research* 235: 833–839.
- [540] **A. Ushigome, J. Tanaka, K. Kariya, M. Nomura** (2002): Paraventricular noradrenergic systems participate in angiotensin II-induced drinking, *Peptides* 23: 2169–2175.
- [541] **J.H. Kordower, J.R. Sladek JR, M.S. Fiandaca, G.Y. Bing, D.M. Gash** (1988): Tyrosine hydroxylase-immunoreactive somata within the primate subfornical organ: Species specificity, *Brain Research* 461: 221–229.
- [542] **W. Lichtensteiger** (1967): Monoamines in the subfornical organ, *Brain Research* 4: 52–59.
- [543] **Z.S. Han, G.B. Gu, C.Q. Sun, G. Ju** (1991): Convergence of somatosensory and baroreceptive inputs onto parabrachio-subfornical organ neurons in the rat: An electrophysiological study, *Brain Research* 566: 239–247.
- [544] **I. Merchenthaler** (1991): Neurons with access to the general circulation in the central nervous system of the rat: A retrograde tracing study with fluoro-gold, *Neuroscience* 44: 655–662.
- [545] **J. Tanaka, H. Miyakubo, S. Nomura, K. Sakamaki, T. Okumura, Y. Hayashi** (2001): GABAergic modulation of neurons in the nucleus of the solitary tract with ascending projections to the subfornical organ in the rat, *Brain Research* 888: 184–188.
- [546] **J. Ciriello, M.P. Rosas-Arellano, L.P. Solano-Flores** (1996): Direct projections to subfornical organ from catecholaminergic neurons in the caudal nucleus of the solitary tract, *Brain Research* 726: 227–232.
- [547] **E. Honda, K. Ono, S. Kataoka, K. Inenaga** (2006): Activation of subfornical organ neurons in rats through pre- and postsynaptic alpha-adrenoceptors, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290: 1646–1653.
- [548] **M. Kolaj, L.P. Renaud** (2007): Presynaptic alpha-adrenoceptors in median preoptic nucleus modulate inhibitory neurotransmission from subfornical organ and organum vasculosum lamina terminalis, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292: 1907–1915.
- [549] **G. Bruning, P. Kaulen, H.G. Baumgarten** (1987): Quantitative autoradiographic localization of alpha 2-antagonist binding sites in rat brain using 3Hidazoxan, *Neuroscience Letters* 83: 333–337.
- [550] **P.S. Pinheiro, C. Mülle** (2008): Presynaptic glutamate receptors: Physiological functions and mechanisms of action, *Nature reviews. Neuroscience* 9: 423–436.
- [551] **D.E. Pankevich** (2011): Glutamate-Related Biomarkers in Drug Development for Disorders of the Nervous System: Workshop Summary, Washington (DC).
- [552] **L. Hertz, D.L. Rothman** (2017): Glutamine-Glutamate Cycle Flux Is Similar in Cultured Astrocytes and Brain and Both Glutamate Production and Oxidation Are Mainly Catalyzed by Aspartate Aminotransferase, *Biology* 6.
- [553] **R.T. Fremeau, S. Voglmaier, R.P. Seal, R.H. Edwards** (2004): VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate, *Trends in Neurosciences* 27: 98–103.
- [554] **E. Hrabovszky, Z. Liposits** (2008): Novel aspects of glutamatergic signalling in the neuroendocrine system, *Journal of Neuroendocrinology* 20: 743–751.
- [555] **W. Lin, K. McKinney, L. Liu, S. Lakhani, L. Jennes** (2003): Distribution of vesicular glutamate transporter-2 messenger ribonucleic Acid and protein in the septum-hypothalamus of the rat, *Endocrinology* 144: 662–670.

- [556] **E. Hrabovszky, G. Wittmann, G.F. Turi, Z. Liposits, C. Fekete** (2005): Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2, *Endocrinology* 146: 341–347.
- [557] **S.B.G. Abbott, N.L.S. Machado, J.C. Geerling, C.B. Sape** (2016)r: Reciprocal Control of Drinking Behavior by Median Preoptic Neurons in Mice, *The Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience* 36: 8228–8237.
- [558] **A. Verkhratsky, F. Kirchhoff**: NMDA Receptors in glia, *The Neuroscientist a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 13 (2007) 28–37.
- [559] **M.E. Bardgett, Q.-H. Chen, Q. Guo, A.S. Calderon, M.A. Andrade, G.M. Toney** (2014): Coping with dehydration: Sympathetic activation and regulation of glutamatergic transmission in the hypothalamic PVN, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 306: R804-13.
- [560] **E. López-Bayghen, A. Ortega** (2011): Glial glutamate transporters: New actors in brain signaling, *IUBMB Life* 63: 816–823.
- [561] **J.W. Olney, T. de Gubareff** (1978): Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea, *Nature* 271: 557–559.
- [562] **D.R. Lucas, J.P. Newhouse** (1957): The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina, *A.M.A. Archives of Ophthalmology* 58: 193–201.
- [563] **R.J. Wurtman** (1979): *Nutrition and Brain: Evaluation of the Neurotoxic Effects of Glutamic Acid*, Raven Press, New York.
- [564] **V.J. Perez, J.W. Olney** (1972): Accumulation of glutamic acid in the arcuate nucleus of the hypothalamus of the infant mouse following subcutaneous administration of monosodium glutamate, *J Neurochem* 19: 1777–1782.
- [565] **M.T. Price, J.W. Olney, O.H. Lowry, S. Buchsbaum** (1981): Uptake of Exogenous Glutamate and Aspartate by Circumventricular Organs but Not Other Regions of Brain, *J Neurochem* 36: 1774–1780.
- [566] **Y. Takasaki** (1978): Studies on brain lesion by administration of monosodium L-glutamate to mice. I. Brain lesions in infant mice caused by administration of monosodium L-glutamate, *Toxicology* 9: 293–305.
- [567] **F. Caputo** (1995): Postnatal MSG treatment attenuates angiotensin II (All) induced drinking in rats, *Physiology & Behavior* 58: 25–29.
- [568] **F.M. Correa, J.M. Saavedra** (1992): Chemical lesion of the circumventricular organs with monosodium glutamate reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive but not of one kidney-one clip hypertensive rats, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25: 515–519.
- [569] **R. Gerstberger, T. DiPaolo, N. Barden** (1987): Impaired regulation of neurohypophysial vasopressin secretion in rats treated neonatally with monosodium-L-glutamate, *Neuroscience Letters* 81: 193–198.
- [570] **P. Pesini, J.L. Rois, L. Menéndez, S. Vidal** (2004): The neonatal treatment of rats with monosodium glutamate induces morphological changes in the subfornical organ, *Anatomia, Histologia, Embryologia* 33: 273–277.
- [571] **V.M. Reddy, S.S. Meharg, S. Ritter** (1986): Dose-related stimulation of feeding by systemic injections of monosodium glutamate, *Physiology & Behavior* 38: 465–469.
- [572] **L. Hu, J.D. Fernstrom, P.C. Goldsmith** (1998): Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice, *Neuroendocrinology* 68: 77–88.
- [573] **N. Lemkey-Johnston, W.A. Reynolds** (1974): Nature and extent of brain lesions in mice related to ingestion of monosodium glutamate. A light and electron microscope study, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 33: 74–97.
- [574] **G.N. Babu, M. Bawari, M.M. Ali** (1994): Lipid peroxidation potential and antioxidant status of circumventricular organs of rat brain following neonatal monosodium glutamate, *Neurotoxicology* 15: 773–777.

- [575] **M. Bawari, G. Nagesh Babu, M.M. Ali, U.K. Misra** (1995): Effect of neonatal monosodium glutamate on the activities of glutamate dehydrogenase and aminotransferases in the circumventricular organs of rat brain, *Amino Acids* 8: 393–395.
- [576] **I. Rogulja, J.W. Harding, S. Ritter** (1987): Reduction of <sup>125</sup>I-angiotensin II binding sites in rat brain following monosodium glutamate treatment, *Brain Research* 419: 333–335.
- [577] **C.F. Phelix, D.K. Hartle** (1990): Systematic glutamate induces degeneration of a subpopulation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat area postrema, *Brain Research* 516: 335–340.
- [578] **J. Jszai, L.M. Farkas, K. Gallatz, M. Palkovits** (1998): Effects of glutamate-induced excitotoxicity on calretinin-expressing neuron populations in the area postrema of the rat, *Cell and Tissue Research* 293: 227–233.
- [579] **A.N. van den Pol, K. Obrietan, V. Cao, P.Q. Trombley** (1995): Embryonic hypothalamic expression of functional glutamate receptors, *Neuroscience* 67: 419–439.
- [580] **J.N.C. Kew, J.A. Kemp** (2005): Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology, *Psychopharmacology* 179: 4–29.
- [581] **S. Diano, F. Naftolin, T.L. Horvath** (1998): Kainate glutamate receptors (GluR5-7) in the rat arcuate nucleus: Relationship to tanycytes, astrocytes, neurons and gonadal steroid receptors, *Journal of Neuroendocrinology* 10: 239–247.
- [582] **O. Eyigor, A. Centers, L. Jennes** (2001): Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus, *J. Comp. Neurol.* 434: 101–124.
- [583] **O. Eyigor, Z. Minbay, I. Cavusoglu, L. Jennes** (2005): Localization of kainate receptor subunit GluR5-immunoreactive cells in the rat hypothalamus, *Brain Research. Molecular Brain Research* 136: 38–44.
- [584] **A.N. van den Pol** (1994): Metabotropic glutamate receptor mGluR1 distribution and ultrastructural localization in hypothalamus, *The Journal of Comparative Neurology* 349: 615–632.
- [585] **B.-P. Cui, P. Li, H.-J. Sun, L. Ding, Y.-B. Zhou, J.-J. Wang, Y.-M. Kang, G.-Q. Zhu** (2013): Ionotropic glutamate receptors in paraventricular nucleus mediate adipose afferent reflex and regulate sympathetic outflow in rats, *Acta Physiologica* 209: 45–54.
- [586] **A.N. van den Pol** (1994): Ionotropic glutamate-receptor gene expression in hypothalamus: Localization of AMPA, kainate, and NMDA receptor RNA with in situ hybridization, *The Journal of Comparative Neurology*: 428–440.
- [587] **Z. Xu, J. Herbert** (1998): Effects of intracerebroventricular dizocilpine (MK801) on dehydration-induced dipsogenic responses, plasma vasopressin and c-fos expression in the rat forebrain, *Brain Research* 784: 91–99.
- [588] **Y. Hattori, I. Shibuya, K. Tanaka, N. Kabashima, Y. Ueta, H. Yamashita** (1998): Ionotropic and metabotropic glutamate receptor agonist-induced Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> increase in isolated rat supraoptic neurons, *Journal of Neuroendocrinology* 10: 383–389.
- [589] **F.C. Doherty, C.D. Sladek** (2011): NMDA receptor subunit expression in the supraoptic nucleus of adult rats: Dominance of NR2B and NR2D, *Brain Research* 1388: 89–99.
- [590] **C. Busnardo, C.C. Crestani, L.B.M. Resstel, R.F. Tavares, J. Antunes-Rodrigues, F.M.A. Corrêa** (2012): Ionotropic glutamate receptors in hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei mediate vasopressin and oxytocin release in unanesthetized rats, *Endocrinology* 153: 2323–2331.
- [591] **L.L. Haak** (1999): Metabotropic glutamate receptor modulation of glutamate responses in the suprachiasmatic nucleus, *Journal of Neurophysiology* 81: 1308–1317.
- [592] **H.K. Kia, G. Yen, C.J. Krebs, D.W. Pfaff** (2002): Colocalization of estrogen receptor alpha and NMDA-2D mRNAs in amygdaloid and hypothalamic nuclei of the mouse brain, *Molecular Brain Research* 104: 47–54.

- [593] **J.-M. Peng, L.-s. Xu, Q. Zhu, S. Gong, X.-m. Yu, S.-y. Guo, G.-c. Wu, J. Tao, X.-h. Jiang** (2011): Enhanced NMDA receptor NR1 phosphorylation and neuronal activity in the arcuate nucleus of hypothalamus following peripheral inflammation, *Acta Pharmacologica Sinica* 32: 160–166.
- [594] **T. Bhatnagar, V.C. Chitravanshi, H.N. Sapru** (1999): Cardiovascular responses to microinjections of excitatory amino acids into the area postrema of the rat, *Brain Research* 822: 192–199.
- [595] **K. Sun** (1996): Angiotensin II and glutamate influence area postrema neurons in rat brain slices, *Regulatory Peptides* 63: 91–98.
- [596] **T. Sengupta, A.K. Jaryal, H.N. Mallick** (2016): Effects of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in the medial preoptic area on body temperature in awake rats, *Journal of Thermal Biology* 61: 1–7.
- [597] **L.A. Blackshaw, A.J. Page, R.L. Young** (2011): Metabotropic glutamate receptors as novel therapeutic targets on visceral sensory pathways, *Frontiers in Neuroscience* 5: 40.
- [598] **C.M. Niswender, P.J. Conn** (2010): Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50: 295–322.
- [599] **G. Casabona, T. Knopfel, R. Kuhn, F. Gasparini, P. Baumann, M.A. Sortino, A. Copani, F. Nicoletti** (1997): Expression and Coupling to Polyphosphoinositide Hydrolysis of Group I Metabotropic Glutamate Receptors in Early Postnatal and Adult Rat Brain, *European Journal of Neuroscience* 9: 12–17.
- [600] **F. Ferraguti, L. Crepaldi, F. Nicoletti** (2008): Metabotropic glutamate 1 receptor: Current concepts and perspectives, *Pharmacological Reviews* 60: 536–581.
- [601] **A.N. van den Pol, L. Kogelman, P. Ghosh, P. Liljelund, C. Blackstone** (1994): Developmental regulation of the hypothalamic metabotropic glutamate receptor mGluR1, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 14: 3816–3834.
- [602] **J.R. Charles, E. Hernandez, A. Winter, C.R. Yang, B.G. Stanley** (2015): Site selective activation of lateral hypothalamic mGluR1 and R5 receptors elicits feeding in rats, *Physiology & Behavior* 139: 261–266.
- [603] **E. Hinoi, K. Ogita, Y. Takeuchi, H. Ohashi, T. Maruyama, Y. Yoneda** (2001): Characterization with [3H]quisqualate of group I metabotropic glutamate receptor subtype in rat central and peripheral excitable tissues, *Neurochemistry International* 38: 277–285.
- [604] **J.B. Kuzmiski, J.S. Bains** (2010): Metabotropic glutamate receptors: Gatekeepers of homeostasis, *Journal of Neuroendocrinology* 22: 785–792.
- [605] **D.-P. Li, H.-L. Pan** (2010): Increased group I metabotropic glutamate receptor activity in paraventricular nucleus supports elevated sympathetic vasomotor tone in hypertension, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299: R552-61.
- [606] **M. Hay, H. McKenzie, K. Lindsley, N. Dietz, S.R. Bradley, P.J. Conn, E.M. Hasser** (1999): Heterogeneity of metabotropic glutamate receptors in autonomic cell groups of the medulla oblongata of the rat, *J. Comp. Neurol.* 403: 486–501.
- [607] **H. Lavreysen, S.N. Pereira, J.E. Leysen, X. Langlois, A.S.J. Lesage** (2004): Metabotropic glutamate 1 receptor distribution and occupancy in the rat brain: A quantitative autoradiographic study using 3HR214127, *Neuropharmacology* 46: 609–619.
- [608] **R. Shigemoto** (1994): Antibodies inactivating mGluR1 metabotropic glutamate receptor block long-term depression in cultured Purkinje cells.
- [609] **J. Kiss, T.J. Gorcs, R. Kuhn, T. Knopfel, A. Csaky, B. Halasz** (1996): Distribution of metabotropic glutamate receptor 1a in the rat hypothalamus: An immunocytochemical study using monoclonal and polyclonal antibody, *Acta Biologica Hungarica* 47: 221–237.

- [610] **J. Kuo, O.R. Hariri, P. Micevych** (2009): An interaction of oxytocin receptors with metabotropic glutamate receptors in hypothalamic astrocytes, *Journal of Neuroendocrinology* 21: 1001–1006.
- [611] **M. Mahavongtrakul, M.P. Kanjiya, M. Maciel, S. Kanjiya, K. Sinchak** (2013): Estradiol dose-dependent regulation of membrane estrogen receptor- $\alpha$ , metabotropic glutamate receptor-1a, and their complexes in the arcuate nucleus of the hypothalamus in female rats, *Endocrinology* 154: 3251–3260.
- [612] **J.M. Mateos, J. Azkue, R. Bentez, R. Sarra, J. Losada, F. Conquet, F. Ferraguti, R. Kuhn, T. Knpfel, P. Grandes**: Immunocytochemical localization of the mGluR1b metabotropic glutamate receptor in the rat hypothalamus, *J. Comp. Neurol.* 390 (1998) 225–233.
- [613] **R.L. Gannon, M.J. Millan** (2011): Positive and negative modulation of circadian activity rhythms by mGluR5 and mGluR2/3 metabotropic glutamate receptors, *Neuropharmacology* 60: 209–215.
- [614] **Y.-J.I. Jong, I. Sergin, C.A. Purgert, K.L. O'Malley** (2014): Location-dependent signaling of the group 1 metabotropic glutamate receptor mGlu5, *Molecular Pharmacology* 86: 774–785.
- [615] **D.-P. Li, L.-H. Zhu, J. Pachuau, H.-A. Lee, H.-L. Pan** (2014): mGluR5 Upregulation increases excitability of hypothalamic presympathetic neurons through NMDA receptor trafficking in spontaneously hypertensive rats, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 4309–4317.
- [616] **C. Romano, M.A. Sesma, C.T. McDonald, K. O'Malley, A.N. van den Pol, J.W. Olney** (1995): Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain, *The Journal of Comparative Neurology* 355: 455–469.
- [617] **M.P. Johnson, G. Kelly, M. Chamberlain** (2001): Changes in Rat Serum Corticosterone After Treatment with Metabotropic Glutamate Receptor Agonists or Antagonists, *Journal of Neuroendocrinology* 13: 670–677.
- [618] **N.K. Evanson, J.P. Herman** (2015): Role of Paraventricular Nucleus Glutamate Signaling in Regulation of HPA Axis Stress Responses, *Interdisciplinary Information Sciences* 21: 253–260.
- [619] **N.K. Evanson, D.C. van Hooren, J.P. Herman** (2009): GluR5-mediated glutamate signaling regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress responses at the paraventricular nucleus and median eminence, *Psychoneuroendocrinology*: 34 1370–1379.
- [620] **V.A. Skeberdis, J.-y. Lan, T. Opitz, X. Zheng, M.V.L. Bennett, R.S. Zukin** (2001): mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C, *Neuropharmacology* 40: 856–865.
- [621] **K. Cho, J.C. Francis, H. Hirbec, K. Dev, M.W. Brown, J.M. Henley, Z.I. Bashir** (2003): Regulation of kainate receptors by protein kinase C and metabotropic glutamate receptors, *The Journal of Physiology* 548: 723–730.
- [622] **E.C. O'Connor, S. Bariselli, C. Bellone** (2014): Synaptic basis of social dysfunction: A focus on postsynaptic proteins linking group-I mGluRs with AMPARs and NMDARs, *The European Journal of Neuroscience* 39: 1114–1129.
- [623] **H. Huang, A.N. van den Pol** (2007): Rapid direct excitation and long-lasting enhancement of NMDA response by group I metabotropic glutamate receptor activation of hypothalamic melanin-concentrating hormone neurons, *The Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27: 11560–11572.
- [624] **T. Babic, S. Roder, J. Ciriello** (2004): Direct projections from caudal ventrolateral medullary depressor sites to the subfornical organ, *Brain Research* 1003: 113–121.
- [625] **J. Ciriello** (2013): Caudal ventrolateral medulla mediates baroreceptor afferent inputs to subfornical organ angiotensin II responsive neurons, *Brain Research* 1491: 127–135.

- [626] **Á. Csáki, K. Kocsis, J. Kiss, B. Halász** (2002): Localization of putative glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the supraoptic nucleus area of the rat hypothalamus, *European Journal of Neuroscience* 16: 55–68.
- [627] **K. Inenaga, T. Nagatomo, E. Honda, Y. Ueta, H. Yamashita** (1995): GABAergic inhibitory inputs to subfornical organ neurons in rat slice preparations, *Brain Research* 705: 85–90.
- [628] **S.-H. Xu, K. Inenaga, E. Honda, H. Yamashita** (2000): Glutamatergic synaptic inputs activate neurons in the subfornical organ through non-NMDA receptors, *Journal of the Autonomic Nervous System* 78: 177–180.
- [629] **Y. Oka, M. Ye, C.S. Zuker** (2015): Thirst driving and suppressing signals encoded by distinct neural populations in the brain, *Nature* 520: 349–352.
- [630] **M. Kolaj, L.P. Renaud** (2010): Metabotropic glutamate receptors in median preoptic neurons modulate neuronal excitability and glutamatergic and GABAergic inputs from the subfornical organ, *Journal of Neurophysiology* 103: 1104–1113.
- [631] **H.A. Schmid** (1998): Effect of glutamate and angiotensin II on whole cell currents and release of nitric oxide in the rat subfornical organ, *Amino Acids* 14: 113–119.
- [632] **H.S. Lee, W. Chong, S.K. Han, M.H. Lee, P.D. Ryu** (2001): Activation of metabotropic glutamate receptors inhibits GABAergic transmission in the rat subfornical organ, *Neuroscience* 102: 401–411.
- [633] **Z.-M. Wang, S.-M. Ji, H. Zhang, G.-Q. Sun, Z.-A. Wang, R.-R. He** (2004): Effects of agmatine on the electrical activity of subfornical organ neurons, *Acta physiologica Sinica* 56: 493–497.
- [634] **U.V. Berger, M.A. Hediger** (2000): Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia, *J. Comp. Neurol.* 421: 385–399.
- [635] **M. Grob** (2003): Characterization of the neurochemical content of neuronal populations of the lamina terminalis activated by acute hydromineral challenge, *Neuroscience*.
- [636] **D.R. Ziegler, W.E. Cullinan, J.P. Herman** (2002): Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus, *The Journal of Comparative Neurology* 448: 217–229.
- [637] **U.V. Berger, T.M. DeSilva, W. Chen, P.A. Rosenberg** (2005): Cellular and subcellular mRNA localization of glutamate transporter isoforms GLT1a and GLT1b in rat brain by in situ hybridization, *The Journal of Comparative Neurology* 492: 78–89.
- [638] **O. Shibata, J. Tanaka, M. Nomura** (2006): Non-NMDA glutamatergic receptors modulate acetylcholine release in the rat subfornical organ area, *Autonomic Neuroscience Basic & Clinical* 124: 96–102.
- [639] **J. Tanaka** (2003): Activation of cholinergic pathways from the septum to the subfornical organ area under hypovolemic condition in rats, *Brain Research Bulletin* 61: 497–504.
- [640] **G.K. Bhat, V.B. Mahesh, C.A. Lamar, L. Ping, K. Aguan, D.W. Brann** (1995): Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: Association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors, *Neuroendocrinology* 62: 187–197.
- [641] **G.J. Brewer, J.R. Torricelli, E.K. Evege, P.J. Price** (1993): Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination, *Journal of Neuroscience Research* 35: 567–576.
- [642] **E. Gebke, A.R. Müller, U. Pehl, R. Gerstberger** (2000): Astrocytes in sensory circumventricular organs of the rat brain express functional binding sites for endothelin, *Neuroscience* 97: 371–381.
- [643] **M. Jurzak, A.R. Müller, H.A. Schmid, R. Gerstberger** (1994): Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis, *Brain Research* 662: 198–208.

- [644] **N. Hitzel** (2009): Charakterisierung ionotroper purinergere Rezeptoren im Nucleus medianus praeopticus des anterioren Hypothalamus der Ratte. Dissertationsschrift, Gießen.
- [645] **T. Hatzelmann, L.M. Harden, J. Roth, R. Gerstberger** (2013): Antipyretic effect of central Pyr1apelin13 on LPS-induced fever in the rat, *Regulatory Peptides* 184: 6–13.
- [646] **B. Simm, D. Ott, E. Pollatzek, J. Murgott, R. Gerstberger, C. Rummel, J. Roth** (2016): Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus, *Neuroscience* 313: 23–35.
- [647] **S. Leisengang, D. Ott, R. Gerstberger, C. Rummel, J. Roth** (2018): Effects of thermal stimulation on neurons and astrocytes cultured from the rat median preoptic nucleus, *Neuroreport* 29: 1468–1472.
- [648] **D. Ott, J. Murgott, S. Rafalzik, F. Wuchert, B. Schmalenbeck, J. Roth, R. Gerstberger** (2010): Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines, *Brain Research* 1363: 93–106.
- [649] **D. Ott, F. Wuchert, J. Murgott, C. Rummel, R. Gerstberger, J. Roth** (2012): The viral mimetic polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) induces cellular responses in primary cultures from rat brain sites with an incomplete blood-brain barrier, *Neuroscience Letters* 530: 64–68.
- [650] **E. Pollatzek, N. Hitzel, D. Ott, K. Raisl, B. Reuter, R. Gerstberger** (2016): Functional expression of P2 purinoceptors in a primary neuroglial cell culture of the rat arcuate nucleus, *Neuroscience* 327: 95–114.
- [651] **F. Wuchert, D. Ott, J. Murgott, S. Rafalzik, N. Hitzel, J. Roth, R. Gerstberger** (2008): Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide, *Journal of Neuroimmunology* 204: 66–74.
- [652] **F. Wuchert, D. Ott, S. Rafalzik, J. Roth, R. Gerstberger** (2009): Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema, *Journal of Neuroimmunology* 206: 44–51.
- [653] **D. Ott, B. Simm, E. Pollatzek, R. Gerstberger, C. Rummel, J. Roth** (2015): Prostaglandin D2 modulates calcium signals induced by prostaglandin E2 in neurons of rat dorsal root ganglia, *Neuroscience Letters* 597: 159–163.
- [654] **K.H.K. Frangakis** (1982): An enzymatic method for preparation of dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages, *Journal of Immunological Methods*: 33–44.
- [655] **K.H.K. Frangakis** (1984): Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures., *Neurochemical Research*: 1689–1698.
- [656] **L.E. Hinman, P.J. Sammak** (1998): Intensity modulation of pseudocolor images., *BioTechniques*: 124–128.
- [657] **S.M. Baylor, S. Hollingworth** (2000): Measurement and interpretation of cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>] signals from calcium-indicator dyes, *News Physiological Science*: 19–26.
- [658] **M. Jurzak, A.R. Müller, R. Gerstberger** (1995): Characterization of vasopressin receptors in cultured cells derived from the region of rat brain circumventricular organs, *Neuroscience* 65: 1145–1159.
- [659] **S. Leisengang, D. Ott, J. Murgott, R. Gerstberger, C. Rummel, J. Roth** (2018): Primary Cultures from Rat Dorsal Root Ganglia: Responses of Neurons and Glial Cells to Somatosensory or Inflammatory Stimulation, *Neuroscience* 394: 1–13.
- [660] **S. Rafalzik, U. Pehl, D. Ott, J. Strotmann, M. Wolff, R. Gerstberger** (2008): Cholinergic signal transduction in the mouse sphenopalatine ganglion, *Brain Research* 1241: 42–55.
- [661] **N.J. Simpson, A.V. Ferguson** (2018): Tumor necrosis factor-alpha potentiates the effects of angiotensin II on subfornical organ neurons, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 315: R425-R433.

- [662] **R.F. Johnson, T.G. Beltz, R.V. Sharma, Z. Xu, R.A. Bhatt, A.K. Johnson** (2001): Agonist activation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in subfornical organ cells projecting to the supraoptic nucleus, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280: R1592-9.
- [663] **A.V. Ferguson, J.S. Bains** (1997): Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: Implications for long term control of autonomic output, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 24: 96–101.
- [664] **M. Moreton** (1994): Optical methods for imaging ionic activities, *Scanning Microscopy. Supplement*: 371–390.
- [665] **C.C. Ashley** (1970): An estimate of calcium concentration changes during the contraction of single muscle fibres, *Journal of Physiology*: 217–239.
- [666] **I. Grynkiewicz** (1985): A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties., *The Journal of Biological Chemistry*: 3440–3450.
- [667] **R.Y. Tsien** (1980): New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures, *Biochemistry*: 2396–2404.
- [668] **R.Y. Tsien, S. Poenie** (1986): Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling., *Trends in Biochemistry*: 450–455.
- [669] **R.Y. Tsien** (1989): Fluorescent probes of cell signaling., *Annual Review of Neuroscience*: 227–253.
- [670] **G. Thomas, T. Delaville** (1991): The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells, *Press Oxford*.
- [671] **R.M. Paredes, J.C. Etzler, L.T. Watts, W. Zheng, J.D. Lechleiter** (2008): Chemical calcium indicators, *Methods* 46: 143–151.
- [672] **A. Malgaroli** (1987): Fura-2 measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in monolayers and suspensions of various types of animal cells, *The Journal of Cell Biology* 105: 2145–2155.
- [673] **R.Y. Tsien** (1985): Measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths., *Cell Calcium*: 145–157.
- [674] **R.-M. Lyu, X.-F. Huang, Y. Zhang, S.L. Dun, J.J. Luo, J.-K. Chang, N.J. Dun** (2013): Phoenixin: A novel peptide in rodent sensory ganglia, *Neuroscience* 250: 622–631.
- [675] **G.L.C. Yosten, R.-M. Lyu, A.J.W. Hsueh, O. Avsian-Kretschmer, J.-K. Chang, C.W. Tullock, S.L. Dun, N. Dun, W.K. Samson** (2013): A novel reproductive peptide, phoenixin, *Journal of Neuroendocrinology* 25: 206–215.
- [676] **D.E. Dostal, K.N. Rothblum, M.I. Chernin, G.R. Cooper, K.M. Baker** (1992): Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: A localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart, *The American Journal of Physiology* 263: C838-50.
- [677] **D.M. Kaye, H. Krum** (2007): Drug discovery for heart failure: A new era or the end of the pipeline?, *Nature Reviews. Drug Discovery* 6: 127–139.
- [678] **C. Jensen, P. Herold, H.R. Brunner** (2008): Aliskiren: The first renin inhibitor for clinical treatment, *Nature Reviews. Drug Discovery* 7: 399–410.
- [679] **P. Libby, A.L. Goldberg** (1980): Effects of chymostatin and other proteinase inhibitors on protein breakdown and proteolytic activities in muscle, *The Biochemical Journal* 188: 213–220.
- [680] **H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, S. Kunimoto, M. Matsuzaki** (1970): Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes, *The Journal of Antibiotics* 23: 425–427.
- [681] **K. Tatsuta, N. Mikami, K. Fujimoto, S. Umezawa, H. Umezawa** (1973): The structure of chymostatin, a chymotrypsin inhibitor, *The Journal of Antibiotics* 26: 625–646.
- [682] **G. Wilding, P. Hüttner** (1996): Antagonist Pharmacology of Kainate- and  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid-Preferring Receptors, *Molecular Pharmacology*: 540–546.

- [683] **S. Höft, S. Griemsmann, G. Seifert, C. Steinhäuser** (2014): Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: Insights from the thalamus, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369: 20130602.
- [684] **H. Köhler** (1976): Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines, *European Journal of Immunology* 6: 292-295.
- [685] **R.T. Jones, M.S. Abedalthagafi, M. Brahmandam, E.A. Greenfield, M.P. Hoang, D.N. Louis, J.L. Hornick, S. Santagata** (2015): Cross-reactivity of the BRAF VE1 antibody with epitopes in axonemal dyneins leads to staining of cilia, *Modern Pathology* 28: 596-606
- [686] **A. Winzeler, J.T. Wang** (2013): Culturing hybridoma cell lines for monoclonal antibody production, *Cold Spring Harbor Protocols*: 640–642.
- [687] **C. Nathan, Q.W. Xie** (1994): Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls, *Cell* 78: 915–918.
- [688] **T.J. Sprinkle, J.F. Agee, R.B. Tippins, C.R. Chamberlain, G.B. Faguet, G.H. de Vries** (1987): Monoclonal antibody production to human and bovine 2': 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase): high-specificity recognition in whole brain acetone powders and conservation of sequence between CNP1 and CNP2, *Brain Research* 426: 349–357.
- [689] **B.C. Viertboeck, M.A. Hanczaruk, B. Amann, S.R. Bader, R. Schmitt, B. Sperling, S.C.N. Schwarz, W. Schmahl, C.A. Deeg, T.W. Göbel** (2013): Chicken immunoregulatory Ig-like receptor families: An overview and expression details on ggTREM-A1, *Developmental and Comparative Immunology* 41: 403–412.
- [690] **H. Herrmann, U. Aebi** (2000): Intermediate filaments and their associates: Multitalented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics, *Current Opinion in Cell Biology* 12: 79–90.
- [691] **C. Chevillard, J.M. Saavedra** (1982): Distribution of Angiotensin-Converting Enzyme Activity in Specific Areas of the Rat Brain Stem, *J Neurochem* 38: 281–284.
- [692] **A. V. Ferguson and L. P. Renaud** (1986): Systemic angiotensin acts at subfornical organ to facilitate activity of neurohypophysial neurons, *American Journal of Physiology* 252: R712-717.
- [693] **M. Masu** (1991): Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor, *Nature* 349: 760-765.
- [694] **B. Xue, M. Singh, F. Guo, M. Hay, A.K. Johnson** (2009): Protective actions of estrogen on angiotensin II-induced hypertension: Role of central nitric oxide, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297: H1638-46.
- [695] **K. Zhang, I.H. Zucker, K. P. Patel** (1998): Altered number of diaphorase (NOS) positive neurons in the hypothalamus of rats with heart failure, *Brain Research* 786: 219–225.
- [696] **A. Kádár, G. Wittmann, Z. Liposits, C. Fekete** (2009): Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining, *Journal of Neuroscience Methods* 184: 115–118.
- [697] **F. Nissl** (1894): Ueber eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans speciell zur Feststellung der Localisation der Nervenzellen, *Neurologisches Zentralblatt*: 507 f.
- [698] **D. Mazia** (1975): Adhesion of cells to surfaces coated with Polylysine, *Journal of Cellular Biology* 66:198-200.
- [699] **F. Giancanelli, E. Morettil** (1959): On a new technic for the combined staining of nerve cells and fibers: The Kluver-Barrera method, *Rivista di Patologia Nervosa e Mentale* 80: 467–469.
- [700] **B.E. Klüver** (1953): A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system, *Journal of Neuropathology*: 400–403.

- [701] **K.B. Mullis, F.A. Faloona** (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology Recombinant DNA Part F*, Academic Press: 335–350.
- [702] **C. Mülhardt** (2002): *Der Experimentator: Molekularbiologische Genomics*, Spektrum Akademischer Verlag.
- [703] **H. Gyllensten, A. Erlich** (1988): Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- [704] **O. Saiki** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*.
- [705] **D.J. Kemp, D.B. Smith, S.J. Foote, N. Samaras, M.G. Peterson** (1989): Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 2423–2427.
- [706] **G. Higuchi** (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology*: 413–417.
- [707] **R.A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, D.E. Wolf** (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 8790–8794.
- [708] **I. Heid** (1996): Real time quantitative PCR., *Genome research*: 986–994.
- [709] **A. Efstratiadis** (1976): Enzymatic in vitro synthesis of globin genes, *Cell*: 279–288.
- [710] **H. Carothers** (1989): Point mutation analysis in a mammalian gene: rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method., *BioTechniques*: 494–496.
- [711] **S. Fleige, M.W. Pfaffl** (2006): RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance, *Molecular Aspects of Medicine* 27: 126–139.
- [712] **S. Imbeaud, E. Graudens, V. Boulanger, X. Barlet, P. Zaborski, E. Eveno, O. Mueller, A. Schroeder, C. Auffray** (2005): Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces, *Nucleic Acids Research* 33: e56.
- [713] **C.L. Miller, S. Diglisic, F. Leister, M. Webster, R.H. Yolken** (2004): Evaluating RNA status for RT-PCR in extracts of postmortem human brain tissue, *BioTechniques* 36: 628–633.
- [714] **A. Schoor** (2003): Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA, *BioTechniques*: 1192–1196.
- [715] **P. Melgar-Rojas, J.C. Alvarado, V. Fuentes-Santamaría, M.C. Gabaldón-Ull, J.M. Juiz** (2015): Validation of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in Noise-Induced Hearing Loss: A Study in Wistar Rat, *PloS one* 10: e0138027.
- [716] **K.J. Livak, T.D. Schmittgen** (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method, *Methods* 25: 402–408.
- [717] **M.W. Pfaffl** (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR*: 92–95.
- [718] **S.N. Chomczynski** (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction., *Analytical Biochemistry*: 156–159.
- [719] **P. Alm, G. Skagerberg, A. Nylén, B. Larsson, K.-E. Andersson** (1997): Nitric oxide synthase and vasopressin in rat circumventricular organs An immunohistochemical study, *Experimental Brain Research* 117: 59–66.
- [720] **X. Li** (2002): Drinking behavior and c-fos expression induced by chemical or electrical stimulation of SFO in rat brain, *Chinese Journal of Applied Physiology*: 209–212.
- [721] **M. Takahashi, M. Nomura, J. Tanaka** (2016): GABAergic modulation of serotonin release in the rat subfornical organ area, *Neuroscience Letters* 630: 114–119.
- [722] **R. Mohan, A. John** (2015): Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules, *IUBMB Life* 67: 395–403.

- [723] **B.-E. Yoon, C.J. Lee** (2014): GABA as a rising gliotransmitter, *Frontiers in Neural Circuits* 8: 141.
- [724] **Di Lu, H. Yang, M.K. Raizada** (1998): Involvement of p62 Nucleoporin in Angiotensin II-Induced Nuclear Translocation of STAT3 in Brain Neurons, *J. Neurosci.* 18: 1329–1336.
- [725] **E. Uijl, L. Ren, A.H.J. Danser** (2018): Angiotensin generation in the brain: A re-evaluation, *Clinical Science* 132: 839–850.
- [726] **K. Irmady, S. Zechel, K. Unsicker** (2011): Fibroblast growth factor 2 regulates astrocyte differentiation in a region-specific manner in the hindbrain, *Glia* 59: 708–719.
- [727] **B. Reuss, R. Dono, K. Unsicker** (2003): Functions of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF-5 in astroglial differentiation and blood-brain barrier permeability: Evidence from mouse mutants, *The Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience* 23: 6404–6412.
- [728] **R. Schmidt, K. Unsicker** (2003): *Lehrbuch Vorklinik: Anatomie, Biochemie und Physiologie des Nervengewebes, der Sinnesorgane und des Bewegungsapparates*, Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln.
- [729] **S.O. Kasper, C.M. Ferrario, D. Ganten, D.I. Diz** (2006): Rats with low brain angiotensinogen do not exhibit insulin resistance during early aging, *Endocrine* 30: 167–174.
- [730] **B. Bunnemann, A. Lippoldt, J.A. Aguirre, A. Cintra, R. Metzger** (1993): Glucocorticoid regulation of angiotensinogen gene expression in discrete areas of the male rat brain. An in situ hybridization study, *Neuroendocrinology* 57: 856–862.
- [731] **B.S. van Thiel, A. Góes Martini, L. Te Riet, D. Severs, E. Uijl, I.M. Garrelds, F.P.J. Leijten, I. van der Pluijm, J. Essers, F. Qadri, N. Alenina, M. Bader, L. Paulis, R. Rajkovicova, O. Domenig, M. Poglitsch, A.H.J. Danser** (2017): Brain Renin-Angiotensin System: Does It Exist?, *Hypertension* 69: 1136–1144.
- [732] **A.M. Hilzendegeer, D.A. Morgan, L. Brooks, D. Dellsperger, X. Liu, J.L. Grobe, K. Rahmouni, C.D. Sigmund, A.L. Mark** (2012): A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 303: H197-206.
- [733] **M. Freund, T. Walther, O. von Bohlen und Halbach** (2012): Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain, *Cell and Tissue Research* 348: 29–35.
- [734] **K. Faulk, B. Shell, T.P. Nedungadi, J.T. Cunningham** (2017): Role of angiotensin-converting enzyme 1 within the median preoptic nucleus following chronic intermittent hypoxia, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 312: R245-R252.
- [735] **M.C. Camargo de Andrade, G.S. Di Marco, V. de Paulo Castro Teixeira, R.A. Mortara, R.A. Sabatini, J.B. Pesquero, M.A. Boim, A.K. Carmona, N. Schor, D.E. Casarini** (2006): Expression and localization of N-domain ANG I-converting enzymes in mesangial cells in culture from spontaneously hypertensive rats, *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 290: F364-75.
- [736] **H.A. Lucero, E. Kintsurashvili, M.E. Marketou, H. Gavras** (2010): Cell signaling, internalization, and nuclear localization of the angiotensin converting enzyme in smooth muscle and endothelial cells, *The Journal of Biological Chemistry* 285: 5555–5568.
- [737] **V. Beldent, A. Michaud, C. Bonnefoy, M.-T. Chauvet, P. Corvol** (1995): Cell Surface Localization of Proteolysis of Human Endothelial Angiotensin I-converting Enzyme: effect of the amino-terminale domain in the solubilization process, *Journal of Biological Chemistry* 270: 28962–28969.
- [738] **P. Benes, V. Vetvicka, M. Fusek** (2008): Cathepsin D--many functions of one aspartic protease, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 68: 12–28.

- [739] **H.G. Bernstein, B. Wiederanders, A. Rinne, A. Dorn** (1985): Distribution of cathepsin D immunoreactivity in the central nervous system of rat and selected brain regions of man, *Acta Histochemica* 77: 139–142.
- [740] **J.N. Whitaker, W.R. Crowley** (1983): Increased concentrations of immunoreactive cathepsin D in supraoptic nucleus of the Brattleboro rat, *Brain Research* 277: 181–185.
- [741] **R.C. Speth, E.J. Carrera, C. Bretón, A. Linares, L. Gonzalez-Reiley, J.D. Swindle, K.L. Santos, I. Schadock, M. Bader, V.T. Karamyan** (2014): Distribution of non-AT1, non-AT2 binding of <sup>125</sup>I-sarcosine<sup>1</sup>, isoleucine<sup>8</sup> angiotensin II in neurolysin knockout mouse brains, *PloS one* 9: e105762.
- [742] **X. Sun, E. Tommasi, D. Molina, R. Sah, K.B. Brosnihan, D. Diz, S. Petrovic** (2016): Deletion of proton-sensing receptor GPR4 associates with lower blood pressure and lower binding of angiotensin II receptor in SFO, *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 311: F1260-F1266.
- [743] **N.J. Wangler, K.L. Santos, I. Schadock, F.K. Hagen, E. Escher, M. Bader, R.C. Speth, V.T. Karamyan** (2012): Identification of membrane-bound variant of metalloendopeptidase neurolysin (EC 3.4.24.16) as the non-angiotensin type 1 (non-AT1), non-AT2 angiotensin binding site, *The Journal of Biological Chemistry* 287: 114–122.
- [744] **T. Kisseleva, S. Bhattacharya, J. Braunstein, C.W. Schindler** (2002): Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges, *Gene* 285: 1–24.
- [745] **J. Damm, L.M. Harden, R. Gerstberger, J. Roth, C. Rummel** (2013): The putative JAK-STAT inhibitor AG490 exacerbates LPS-fever, reduces sickness behavior, and alters the expression of pro- and anti-inflammatory genes in the rat brain, *Neuropharmacology* 71: 98–111.
- [746] **H. Yue, W. Li, R. Desnoyer, S.S. Karnik** (2010): Role of nuclear unphosphorylated STAT3 in angiotensin II type 1 receptor-induced cardiac hypertrophy, *Cardiovascular Research* 85: 90–99.
- [747] **A. Cao, C. Zhang** (2007): Sex-specific effects of androgen and estrogen on proliferation of the embryonic chicken hypothalamic neurons, *Endocrine* 31: 161–166.
- [748] **T. Kisliouk, N. Meiri** (2013): MiR-138 promotes the migration of cultured chicken embryonic hypothalamic cells by targeting reelin, *Neuroscience* 238: 114–124.
- [749] **M. Lever, B. Brand-Saberi, C. Theiss** (2014): Neurogenesis, gliogenesis and the developing chicken optic tectum: An immunohistochemical and ultrastructural analysis, *Brain Structure & Function* 219: 1009–1024.
- [750] **J. Mast, B.M. Goddeeris, K. Peeters, F. Vandesande, L.R. Berghman** (1998): Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 61: 343–357.
- [751] **J.Y. Kim, E.Y. Lee, H.J. Sohn, D.W. Kim, S.S. Cho, J.H. Seo** (2014): Sequential accumulation of iron in glial cells during chicken cerebellar development, *Acta Histochemica* 116: 570–576.
- [752] **P. Rajapaksha, Z. Wang, N. Venkatesan, K.F. Tehrani, J. Payne, R.L. Swetenburg, F. Kawabata, S. Tabata, L.J. Mortensen, S.L. Stice, R. Beckstead, H.-X. Liu** (2016): Labeling and analysis of chicken taste buds using molecular markers in oral epithelial sheets, *Scientific Reports* 6: 37247.
- [753] **N. Nagy, I. Bódi, I. Oláh** (2016): Avian dendritic cells: Phenotype and ontogeny in lymphoid organs, *Developmental and Comparative Immunology* 58: 47–59.
- [754] **P. Mohácsik, T. Füzesi, M. Doleschall, A. Szilvásy-Szabó, P. Vancamp, É. Hadadi, V.M. Darras, C. Fekete, B. Gereben** (2016): Increased Thyroid Hormone Activation Accompanies the Formation of Thyroid Hormone-Dependent Negative Feedback in Developing Chicken Hypothalamus, *Endocrinology* 157: 1211–1221.

- [755] **V. Kommata, C.R. Dermon** (2018): Transient vimentin expression during the embryonic development of the chicken cerebellum, *International Journal of Developmental Neuroscience* 65: 11–20.
- [756] **M.J. Fregly, C.F. Simpson, W.P. Palmore** (1981): Effect of captopril on the blood pressure response to angiotensin I in turkeys, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 166: 35–38.
- [757] **J.W. Wright, K.A. Roberts, L.A. Stubley, J.M. Hanesworth, J.W. Harding** (1993): Hypothalamic angiotensin release in response to all or glutamic acid stimulation of the SFO in rats, *Brain Research Bulletin* 31: 649–654.
- [758] **R.A. Hawkins, J.R. Viña** (2016): How Glutamate Is Managed by the Blood-Brain Barrier, *Biology* 5.
- [759] **M.D. Sweeney, Z. Zhao, A. Montagne, A.R. Nelson, B.V. Zlokovic** (2019): Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back, *Physiological Reviews* 99: 21–78.
- [760] **W. Chong, S.N. Kim, S.K. Han, S.Y. Lee, P.D. Ryu** (2015): Low Non-NMDA Receptor Current Density as Possible Protection Mechanism from Neurotoxicity of Circulating Glutamate on Subfornical Organ Neurons in Rats, *The Korean journal of physiology & pharmacology official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19: 177–181.
- [761] **H. Sato, M. Tamba, S. Okuno, K. Sato, K. Keino-Masu, M. Masu, S. Bannai** (2002): Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 8028–8033.
- [762] **L. Chaskiel, F. Paul, R. Gerstberger, T. Hübschle, J.P. Konsman** (2016): Brainstem metabotropic glutamate receptors reduce food intake and activate dorsal pontine and medullar structures after peripheral bacterial lipopolysaccharide administration, *Neuropharmacology* 107: 146–159.
- [763] **W.-T. Huang, J.-J. Wang, M.-T. Lin** (2004): Cyclooxygenase Inhibitors Attenuate Augmented Glutamate Release in Organum Vasculosum Laminae Terminalis and Fever Induced by Staphylococcal Enterotoxin A, *J Pharmacol Sci* 94: 192–196.
- [764] **W. Sun, E. McConnell, J.-F. Pare, Q. Xu, M. Chen, W. Peng, D. Lovatt, X. Han, Y. Smith, M. Nedergaard** (2013): Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain, *Science* 339: 197–200.
- [765] **J.D. Clements, R.A. Lester, G. Tong, C.E. Jahr, G.L. Westbrook** (1992): The time course of glutamate in the synaptic cleft, *Science* 258: 1498–1501.
- [766] **J.S. Diamond, C.E. Jahr** (1997): Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale, *J. Neurosci.* 17: 4672–4687.
- [767] **J.I. Wadiche, C.E. Jahr**: Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses, *Neuron* 32 (2001) 301–313.
- [768] **T. Budisantoso, H. Harada, N. Kamasawa, Y. Fukazawa, R. Shigemoto, K. Matsui** (2013): Evaluation of glutamate concentration transient in the synaptic cleft of the rat calyx of Held, *The Journal of Physiology* 591: 219–239.
- [769] **A. Kohara, M. Takahashi, S.-I. Yatsugi, S. Tamura, Y. Shitaka, S. Hayashibe, S. Kawabata, M. Okada** (2008): Neuroprotective effects of the selective type 1 metabotropic glutamate receptor antagonist YM-202074 in rat stroke models, *Brain Research* 1191: 168–179.
- [770] **H. Lavreysen, R. Wouters, F. Bischoff, S. Nóbrega Pereira, X. Langlois, S. Blokland, M. Somers, L. Dillen, A.S.J. Lesage** (2004): JNJ16259685, a highly potent, selective and systemically active mGlu1 receptor antagonist, *Neuropharmacology* 47: 961–972.
- [771] **P.M. Lea, A.I. Faden** (2006): Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonists MPEP and MTEP, *CNS Drug Reviews* 12: 149–166.

- [772] **J.R. Roppe, B. Wang, D. Huang, L. Tehrani, T. Kamenecka, E.J. Schweiger, J.J. Anderson, J. Brodtkin, X. Jiang, M. Cramer, J. Chung, G. Reyes-Manalo, B. Munoz, N.D.P. Cosford** (2004): 5-(2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl-2,3'-bipyridine: A highly potent, orally active metabotropic glutamate subtype 5 (mGlu5) receptor antagonist with anxiolytic activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14: 3993–3996.
- [773] **K. Wiśniewski, H. Car** (2002): (S)-3,5-DHPG: A review, *CNS Drug Reviews* 8: 101–116.
- [774] **J. Davies, J.C. Watkins** (1982): Actions of D and L forms of 2-amino-5-phosphonovalerate and 2-amino-4-phosphonobutyrate in the cat spinal cord, *Brain Research* 235: 378–386.
- [775] **R.H. Evans, A.A. Francis, A.W. Jones, D.A. Smith, J.C. Watkins** (1982): The effects of a series of omega-phosphonic alpha-carboxylic amino acids on electrically evoked and excitant amino acid-induced responses in isolated spinal cord preparations, *British Journal of Pharmacology* 75: 65–75.
- [776] **T.J. Wilding, J.E. Huettner** (1995): Differential antagonism of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-preferring and kainate-preferring receptors by 2,3-benzodiazepines, *Molecular Pharmacology* 47: 582–587.
- [777] **A.V. Paternain, M. Morales, J. Lerma** (1995): Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons, *Neuron* 14: 185–189.
- [778] **L.M. Zhou, Z.Q. Gu, A.M. Costa, K.A. Yamada, P.E. Mansson, T. Giordano, P. Skolnick, K.A. Jones** (1997): (2S,4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081): A selective, high-affinity ligand for kainate receptors, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280: 422–427.
- [779] **Z. Nusser, E. Mulvihill, P. Streit, P. Somogyi** (1994): Subsynaptic segregation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors as revealed by immunogold localization, *Neuroscience* 61: 421–427.
- [780] **A. Pałasz, E. Rojczyk, K. Bogus, J.J. Worthington, R. Wiaderkiewicz** (2015): The novel neuropeptide phoenixin is highly co-expressed with nesfatin-1 in the rat hypothalamus, an immunohistochemical study, *Neuroscience Letters* 592: 17–21.
- [781] **P. Prinz, S. Scharner, T. Friedrich, M. Schalla, M. Goebel-Stengel, M. Rose, A. Stengel** (2017): Central and peripheral expression sites of phoenixin-14 immunoreactivity in rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- [782] **L.M. Stein, C.W. Tullock, S.K. Mathews, D. Garcia-Galiano, C.F. Elias, W.K. Samson, G.L.C. Yosten** (2016): Hypothalamic action of phoenixin to control reproductive hormone secretion in females: importance of the orphan G protein-coupled receptor Gpr173, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 311: R489-96.
- [783] **A.K. Treen, V. Luo, D.D. Belsham** (2016): Phoenixin Activates Immortalized GnRH and Kisspeptin Neurons Through the Novel Receptor GPR173, *Molecular Endocrinology* 30: 872–888.
- [784] **K. Ullah, T. Ur Rahman, D.-D. Wu, X.-H. Lin, Y. Liu, X.-Y. Guo, P.C.K. Leung, R.-J. Zhang, H.-F. Huang, J.-Z. Sheng** (2017): Phoenixin-14 concentrations are increased in association with luteinizing hormone and nesfatin-1 concentrations in women with polycystic ovary syndrome, *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 471: 243–247.
- [785] **T. Hofmann, E. Weibert, A. Ahnis, U. Elbelt, M. Rose, B.F. Klapp, A. Stengel** (2017): Phoenixin is negatively associated with anxiety in obese men, *Peptides* 88: 32–36.
- [786] **M. Schalla, P. Prinz, T. Friedrich, S. Scharner, P. Kobelt, M. Goebel-Stengel, M. Rose, A. Stengel** (2017): Phoenixin-14 injected intracerebroventricularly but not intraperitoneally stimulates food intake in rats, *Peptides* 96: 53–60.
- [787] **C. Rocca, F. Scavello, M.C. Granieri, T. Pasqua, N. Amodio, S. Imbrogno, A. Gattuso, R. Mazza, M.C. Cerra, T. Angelone** (2017): Phoenixin-14: detection and

novel physiological implications in cardiac modulation and cardioprotection, Cellular and Molecular Life Sciences.

- [788] **J.H. Jiang, Z. He, Y.L. Peng, W.D. Jin, J. Mu, H.X. Xue, Z. Wang, M. Chang, R. Wang** (2015): Effects of Phoenixin-14 on anxiolytic-like behavior in mice, Behavioural Brain Research 286: 39–48.
- [789] **J.H. Jiang, Z. He, Y.L. Peng, W.D. Jin, Z. Wang, L.Y. Mu, M. Chang, R. Wang** (2015): Phoenixin-14 enhances memory and mitigates memory impairment induced by A $\beta$ 1-42 and scopolamine in mice, Brain Research 1629: 298–308.
- [790] **M. Yuruyen, G. Gultekin, G.C. Batun, H. Yavuzer, F.E. Akcan, A. Doventas, M. Emul** (2017): Does plasma phoenixin level associate with cognition? Comparison between subjective memory complaint, mild cognitive impairment, and mild Alzheimer's disease, International Psychogeriatrics 1–8.

## 8. Anhang

### 8.1 Publikationen

#### 8.1.1 Originalarbeiten in Fachzeitschriften

- **Niklas Grabbe, Bernd Kaspers, Daniela Ott, Jolanta Murgott, Rüdiger Gerstberger, Joachim Roth** (2019). „Neurons and Astrocytes of the chicken hypothalamus directly respond to lipopolysaccharide and chicken interleukin-6.“ Journal of Comparative Physiology B (In Begutachtung)

#### 8.1.2 Wissenschaftliche Konferenz- und Fachbeiträge

- **Niklas Grabbe** (2018). Vortrag: „Functional characterization of the local renin-angiotensin system in the rat *Organum subfornicale*.“ Fachgruppe Neurowissenschaften GGL Gießen
- **Niklas Grabbe, Rüdiger Gerstberger** (2018). Vortrag: „Existence of a local renin-angiotensin system in the hypothalamic *Organum subfornicale*: functional characterization of a SFO-specific primary cell culture system.“ 23. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie
- **Niklas Grabbe, Bernd Kaspers, Daniela Ott, Jolanta Murgott, Rüdiger Gerstberger, Joachim Roth** (2019). Poster: „The role of interleukin-6 (IL-6) in lipopolysaccharide (LPS)-induced fever in chicken.“ 7th International Conference on the Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation (PPTR): Poster Communication Award for Young Investigators
- **Niklas Grabbe, Bernd Kaspers, Daniela Ott, Jolanta Murgott, Rüdiger Gerstberger, Joachim Roth** (2019). Poster: „The role of interleukin-6 (IL-6) in lipopolysaccharide (LPS)-induced fever in chicken.“ 7. Leipziger Doktorandenforum: Poster-Preis

## 8.2 Danksagung

Zuerst gilt mein Dank Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für die Möglichkeit, diese Dissertation im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie anzufertigen. Außerdem danke ich Dir, Rüdiger, für die exzellente (z.T. ungewöhnliche) und engagierte, sowie konstruktive und meist produktive Betreuung und Zusammenarbeit während dieser Zeit. Dein offenes Ohr in allen Lebenslagen und die mitunter produktiven Gespräche nach dem dritten Bier sollten dabei nicht in Vergessenheit geraten.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Joachim Roth für zahlreiche „Meilensteingespräche“, beratende Tätigkeiten in allen Fragen der Doktorarbeit und für die Fertigstellung des Papers sowie des „Award-Winning-Posters“ danken.

Prof. Dr. Christoph Rummel gilt mein Dank für sein immer offenes Ohr, seine sozialkompetenten Eigenschaften sowie fachliche Expertise rund um meine Dissertationsarbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an Daniela Ott für ihre kompetente Unterstützung in nahezu allen in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Versuchen sowie für moralischen Beistand auch in schwierigen Phasen. Zudem möchte ich Jolanta Murgott für die Hilfe bei der Durchführung der Bioassays und Doreen Marks für die Einarbeitung in die Kresylviolett-Färbetechnik danken. Karin Pfeiff-Boschek danke ich für die Lösung bürokratischer Probleme.

Michael Haas, Jan Rodrigues-Fonseca und Ralf Matheisl danke ich für die Betreuung unserer Versuchstiere. Danke auch an Gerd Herber, Alexander Heinrich und Daniel Brandt für die zumeist unkomplizierte Lösung technischer Probleme. Eleonore Kager danke ich für die moralische Unterstützung und die immer wieder aufgeräumte „Lounge“.

Stephan Leisengang nín bân mellon a tass ohtar túl quando úqétima hantale na, pen le ea ya cuil mi Gießen lá bân.

Ein besonderer Dank gilt meinen Doktorandenkollegen Janne Bredehöft, Sybille Wache, Verena Peek, Carmen Rauschenbach, Fabian Pflieger, Franz Nürnberger, Mirko Gastreich-Seelig, Lena Lottig, Jasmin Becker, Maanvee Mirakhur, Jessica Hernandez, Alina Struff und Julia Beranek für schöne Abende, super Konferenzen, ein geniales Arbeitsklima und eine unvergessliche Doktorandenzeit.

Danke auch an meine Eltern, Geschwister und Großeltern, die mich auf meinem bisherigen Weg uneingeschränkt unterstützt und ermutigt haben. Besonders möchte ich meiner Mutter für die jahrelange Unterstützung und Durchführung meiner Tierzucht danken.

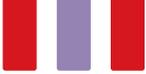
Ein persönlicher Dank gilt natürlich Magdalena Löffler, die durch moralische Unterstützung und grenzenlosen Rückhalt in allen Bereichen meines Lebens sehr zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen hat.

Zuletzt möchte ich allen „Flamngos“ für eine unvergessliche Zeit in Gießen während und nach dem Studium danken; Auf dass noch viele „Flamngos-Fahrten“ folgen.

### **8.3 Erklärung zur Doktorarbeit**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin (06.11.2012; 7.40.10 Nr. 1 S. 8) der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Niklas Grabbe



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFBENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6804-2



9 783835 196804 2