

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	11
2.1. Chemikalien	11
2.2. Sterilisation der erforderlichen Materialien und Medien	12
2.3. Hippocampale Primärkulturen der Ratte	12
2.3.1. Versuchstiere	12
2.3.2. Beschichtung von Gefäßen für die Tierpräparation	13
2.3.3. Beschichtung von Zellkulturgefäßen	13
2.3.4. Tierpräparation	13
2.3.5. Pflege hippocampaler Primärkulturen	15
2.3.6. Immuncytochemische Charakterisierung hippocampaler Primärkulturen	15
2.4. Auslösung und Nachweis eines apoptotischen Zelltodes in hippocampalen Primärkulturen	18
2.4.1. Apoptoseauslösung	18
2.4.2. Untersuchung der Zellvitalität	18
2.4.3. Untersuchung der Zellkernmorphologie	20
2.4.4. Untersuchung der DNA-Integrität	20
2.4.5. Untersuchung von Caspase-3-Aktivität	20
2.4.6. Untersuchung der Wirkung des Caspasehemmstoffes Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (ZVAD-fmk) und des Transkriptioninhibitors Actinomycin D (AMD) auf die Staurosporin-induzierte Apoptose	21
2.5. Molekularbiologische Methoden	22
2.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren	22
2.5.2. Quantifizierung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren	23
2.5.3. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	24
2.5.4. Reverse Transkription (RT)	25
2.5.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.5.6. Validierung der RT-PCR-Analyse als quantitatives Verfahren zur Bestimmung von mRNA-Leveln	27
2.5.7. Versuchsprotokoll für die Generierung und Auswertung der RT-PCR-Daten	27
2.6. Statistik	31

3. Ergebnisse	33
3.1 Hippocampale Primärkulturen der Ratte	33
3.1.1. Serumfreie Kultivierung und Verzicht auf anti-mitotische Substanzen	33
3.1.2. Immuncytochemische Charakterisierung der hippocampalen Primärkulturen	35
3.2 Auslösung und Nachweis eines apoptotischen Zelltodes in hippocampalen Primärkulturen	38
3.2.1. Morphologie der Kulturen	38
3.2.2. Zellvitalität	39
3.2.3. Zellkernmorphologie	40
3.2.4. DNA-Integrität	42
3.2.5. Caspase-3-Aktivität	43
3.2.6. Wirkung des Caspasehemmstoffes Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (ZVAD-fmk) auf die Staurosporin-induzierte Apoptose	44
3.2.7. Wirkung des Transkriptioninhibitors Actinomycin D (AMD) auf die Staurosporin-induzierte Apoptose	47
3.5 Genexpressionsuntersuchungen	49
3.5.1. Validierung der RT-PCR-Analyse als quantitatives Verfahren zur Bestimmung von mRNA-Leveln	50
3.5.2. Analyse zeitlicher Genexpressionsveränderungen in hippocampalen Primärkulturen nach Apoptoseauslösung in An- und Abwesenheit des Caspasehemmstoffes ZVAD-fmk	51
3.5.2.1. RNA-Gehalt der hippocampalen Primärkulturen und Reproduzierbarkeit der PCR- und RT-PCR-Experimente	52
3.5.2.2. Expression des "housekeeping" Gens GAPDH	52
3.5.2.3. Expression ausgewählter Gene	53
3.5.2.3.1. Die Mitglieder der bcl-2 Familie bcl-2, bcl-x _L , bax und bad	54
3.5.2.3.2. Die Transkriptionsfaktoren c-fos, c-jun und c-myc	57
3.5.2.3.3. Die Superoxiddismutase-1 und -2	60
3.5.2.3.4. Das Heat Shock Gen Hämoxxygenase-1	62
3.5.2.3.5. Das Zellzyklusgen Cyclin D1	64
4. Diskussion	65
4.1. Hippocampale Primärkulturen der Ratte	66
4.1.1. Serumfreie Kultivierung und Verzicht auf anti-mitotische Substanzen	69
4.1.1. Charakterisierung und Beurteilung der Kultur in Hinblick auf nachfolgende Untersuchungen....	70

4.2.	Auslösung und Nachweis eines apoptotischen Zelltodes in hippocampalen Primärkulturen	72
4.2.1.	Der Apoptoseauslöser Staurosporin	72
4.2.2.	Morphologie der Kulturen.....	73
4.2.3.	Zellvitalität	74
4.2.4.	Charakterisierung der Staurosporin-induzierten Apoptose anhand verschiedener Marker	77
4.2.4.1	Chromatinkondensation und Kernfragmentierung	78
4.2.4.2	DNA-Fragmentierung.....	79
4.2.4.3	Caspase-3-Aktivität	80
4.2.4.4.	Wirkung des Caspasehemmstoffes Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (ZVAD-fmk) auf die Staurosporin-induzierte Apoptose	81
4.2.4.5.	Wirkung des Transkriptioninhibitors Actinomycin D (AMD) auf die Staurosporin-induzierte Apoptose.....	84
4.3.	Genexpressionsuntersuchungen	86
4.3.1.	Validierung der RT-PCR-Analyse als quantitatives Verfahren zur Bestimmung von mRNA-Leveln.....	87
4.3.2	Analyse zeitlicher Genexpressionsveränderungen in hippocampalen Primärkulturen nach Apoptoseauslösung in An- und Abwesenheit des Caspase-hemmstoffes ZVAD-fmk	88
4.3.2.1	RNA-Gehalt der hippocampalen Primärkulturen und Reproduzierbarkeit der PCR- und RT-PCR-Experimente	88
4.3.2.3	Expression des "housekeeping" Gens GAPDH	89
4.3.2.4	Expression ausgewählter Gene	91
4.3.2.4.1	Die Mitglieder der bcl-2 Familie bcl-2, bcl-x _L , bax und bad	94
4.3.2.4.2	Die Transkriptionsfaktoren c-Fos, c-Jun und c-Myc.....	97
4.3.2.4.3	Die Superoxiddismutase-1 und -2 und die Hämoxxygenase-1 als Komponenten des antioxidativen Abwehrsystems	101
4.3.2.4.4	Das Zellzyklusgen Cyclin D1	107
4.3.2.5	Zusammenfassende Betrachtung der Genexpressionsdaten	109
4.4.	Bewertung des vorliegenden Modellsystems	110
5.	Zusammenfassung.....	112
6.	Literatur	114
7.	Anhang.....	132