

**Der Vergleich der RGC-5- mit der 661W-Zelllinie unter  
Differenzierungsbedingungen und die  
Gegenüberstellung zweier Differenzierungsprotokolle  
für RGC-5-Zellen.**

Ist die einzige retinale Ganglienzelllinie wirklich nutzlos?

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der medizinischen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

Vorgelegt von:

Attrodt, Gesine

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Spitzer

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Heiduschka

*„Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen. Neugier hat ihren eigenen Seinsgrund. Man kann nicht anders als die Geheimnisse von Ewigkeit, Leben oder die wunderbare Struktur der Wirklichkeit ehrfurchtsvoll zu bestaunen. Es genügt, wenn man versucht, an jedem Tag lediglich ein wenig von diesem Geheimnis zu erfassen. Diese heilige Neugier soll man nie verlieren.“*

Albert Einstein

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>VII</b>

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Geschichte des Glaukoms und der Glaukomforschung.....	1
1.2 Definition und Einteilung der Glaukome .....	2
1.3 Bedeutung und Epidemiologie des Glaukoms .....	3
1.4 Retinale Ganglienzellen und ihre Eigenschaften.....	4
1.5 Pathophysiologie des Glaukoms .....	5
1.5.1 Das 5-Stufen-Modell der Pathogenese .....	5
1.5.2 Apoptose.....	6
1.6 Die Etablierung und Bedeutung der RGC-5-Zelllinie.....	8
1.7 Entdifferenzierung der RGC-5-Zellen und Gegenmaßnahmen .....	9
1.7.1 Differenzierung mit Trichostatin A.....	10
1.7.2 Differenzierung mit Staurosporin .....	12
1.7.3 Etablierte Differenzierungsprotokolle für RGC-5-Zellen.....	12
1.8 Die Aktuelle Forschung und Problematik .....	14
1.8.1 Die 661W-Zelllinie.....	14
1.8.2 Eine mögliche Kontamination der RGC-5-Zelllinie mit 661W-Zellen.....	14
1.9 Das Ziel dieser Arbeit.....	16
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Materialien .....	17
2.1.1 Zellen und Nährmedien.....	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur .....	17
2.1.3 Assays & Kits .....	18
2.1.4 Spezielle Materialien für Gelelektrophorese und Western Blot .....	18
2.1.5 cDNA-Synthese und quantitative Real-Time-PCR.....	20

2.1.6 Antikörper.....	20
2.1.7 Gerätschaften .....	21
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Kultivieren von RGC-5- und 661W-Zellen .....	22
2.2.2 Die Behandlung mit Trichostatin A und Staurosporin.....	22
2.2.3 BrdU-Assay.....	23
2.2.4 MTS-Assay .....	25
2.2.5 Kristallviolett-färbung.....	26
2.2.6 Caspase-3/7-Assay.....	27
2.2.7 SDS-PAGE und Western Blot .....	28
2.2.8 Phasenkontrastmikroskopie .....	34
2.2.9 PI-Färbung.....	34
2.2.10 Immunfluoreszenz.....	34
2.2.11 cDNA-Synthese und quantitative Real-Time-PCR .....	37
2.2.12 Statistische Analyse .....	39

### **3. Ergebnisse .....** **41**

3.1 Systematik der Versuchsauswertung .....	41
3.2 RGC-5-Zellen vs. 661W-Zellen .....	41
3.2.1 Zellmorphologie (Phasenkontrastmikroskopie).....	41
3.2.2 Expression von Thy-1, VEGF und GFAP (qRT-PCR) .....	47
3.2.3 $\beta$ -III-Tubulin-Expression .....	48
3.2.4 Expression neuronaler Marker .....	54
3.2.5 Programmierter Zelltod .....	54
3.2.6 Vitalität der Zellen (MTS-Test).....	62
3.2.7 Zellzahl (Kristallviolett-färbung) .....	64
3.2.8 Zusammenfassung der Unterschiede zwischen RGC-5 und 661W .....	66
3.3 Vergleich der Differenzierungsprotokolle.....	68
3.3.1 Zellmorphologie (Phasenkontrastmikroskopie).....	68
3.3.2 Expression neuronaler Marker .....	71
3.3.3 Apoptoseverhalten .....	80
3.3.4 Zelltod (PI-Färbung).....	84
3.3.5 Vitalität (MTS-Assay) .....	89

3.3.6 Zellzahl (Kristallviolett-Färbung) .....	89
3.3.7 Proliferation (BrdU-Assay) .....	93
3.3.8 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Differenzierungsprotokolle .....	95
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>97</b>
4.1 Das Resultat dieser Arbeit.....	97
4.1.1 RGC-5-Zellen unterscheiden sich von 661W-Zellen.....	97
4.1.2 Das optimale Differenzierungsprotokoll für RGC-5-Zellen .....	98
4.2 Die Ergebnisse im Kontext der aktuellen Forschung.....	100
4.2.1 Die Eigenschaften und das Expressionsprofil der RGC-5-Zellen.....	100
4.2.2 Die Auswirkungen der TSA-Inkubation auf RGC-5-Zellen .....	102
4.2.3 Mögliche Einflussfaktoren beim Kultivieren der RGC-5-Zellen .....	107
4.2.4 Verwechslungen von Zelllinien in der Forschung.....	109
4.3 Fazit .....	111
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>113</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>7. Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>123</b>
<b>8. Veröffentlichungen .....</b>	<b>124</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Kaskade der Apoptose .....	7
Abbildung 2: Strukturformeln von Bromdesoxuridin und Thymidin .....	24
Abbildung 3: Strukturformel des Natriumdodecylsulfat (SDS) .....	29
Abbildung 4: Das Prinzip der Proteindetektion mittels Western Blot .....	30
Abbildung 5: Schema der Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	31
Abbildung 6: Phasenkontrastmikroskopie bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter .....	43
Abbildung 7: Phasenkontrastmikroskopie bei 661W mit TSA nach Schwechter .....	44
Abbildung 8: Phasenkontrastmikroskopie bei RGC-5 mit TSA nach Wood .....	45
Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskopie bei 661W mit TSA nach Wood .....	46
Abbildung 10: Relative mRNA-Expression von Thy-1 bei RGC-5 und 661W ...	47
Abbildung 11: $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 und 661W mit TSA nach Schwechter.....	49
Abbildung 12: $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 und 661W mit TSA nach Wood.....	50
Abbildung 13: $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 und 661W mit TSA.....	51
Abbildung 14: MAP-2-Expression bei RGC-5 und 661W nach Schwechter und Wood.....	52
Abbildung 15: Tau-Expression bei RGC-5 und 661W nach Schwechter und Wood.....	53
Abbildung 16: Caspase-3/7-Assay bei RGC-5 und 661W mit TSA .....	55
Abbildung 17: Caspase-3/7-Assay bei RGC-5 und 661W mit TSA und STS....	56
Abbildung 18: Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis bei RGC-5 und 661W nach Schwechter .....	58
Abbildung 19: Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis bei RGC-5 und 661W nach Wood.....	59
Abbildung 20: Bax/Bcl-2-Verhältnis bei RGC-5 und 661W mit TSA nach Schwechter.....	60
Abbildung 21: Bax/Bcl-2-Verhältnis bei RGC-5 und 661W mit TSA nach Wood	61
Abbildung 22: MTS-Test an RGC-5 und 661W mit TSA .....	62

Abbildung 23: MTS-Test an RGC-5 und 661W mit TSA und STS .....	63
Abbildung 24: Kristallviolettffärbung bei RGC-5 und 661W mit TSA .....	64
Abbildung 25: Kristallviolettffärbung bei RGC-5 und 661W mit TSA und STS...	65
Abbildung 26: Phasenkontrastmikroskopie bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter .....	69
Abbildung 27: Phasenkontrastmikroskopie bei RGC-5 mit TSA nach Wood ....	70
Abbildung 28: $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter .	72
Abbildung 29: $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 mit TSA nach Wood .....	73
Abbildung 30: $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter .	74
Abbildung 31: $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 mit TSA nach Wood .....	75
Abbildung 32: MAP-2-Expression bei RGC-5 nach Schechter und Wood.....	77
Abbildung 33: Tau-Expression bei RGC-5 nach Schechter und Wood.....	78
Abbildung 34: hNF-Expression bei RGC-5 nach Schwechter und Wood .....	79
Abbildung 35: Caspase-3/7-Aktivität bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter und Wood .....	81
Abbildung 36: Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3 bei RGC-5 nach Schwechter .....	82
Abbildung 37: Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3 bei RGC-5 nach Wood.....	83
Abbildung 38: Bax/Bcl-2-Verhältnis bei RGC-5 nach Schwechter .....	85
Abbildung 39: Bax/Bcl-2-Verhältniss bei RGC-5 nach Wood.....	86
Abbildung 40: PI-Färbung bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter.....	87
Abbildung 41: PI-Färbung bei RGC-5 mit TSA nach Wood .....	88
Abbildung 42: MTS-Test bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter und Wood .....	90
Abbildung 43: Kristallviolett-Färbung bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter und Wood .....	91
Abbildung 44: Absolute Zellzahl bei RGC-5 mit 500 nM TSA nach Schwechter und Wood .....	92
Abbildung 45: BrdU-Assay bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter und Wood ..	94
Abbildung 46: Morphologie von RGC und Zapfen sowie ihren potentiellen Zelllinien .....	98
Abbildung 47: Die HDACi-vermittelten Effekte auf Zellzyklus und Zelluntergang .....	104



## Tabellenverzeichnis

Tabelle I: Primer für die qRT-PCR und ihre Sequenzen .....	20
Tabelle II: Verwendete Differenzierungsprotokolle.....	23
Tabelle III: Ziele der spezifischen Primärantikörper beim Western Blot.....	32
Tabelle IV: Ziele der Primärantikörper in der Immunhistochemie .....	35
Tabelle V: Verdünnung der Erstantikörper (Immunhistochemie).....	36
Tabelle VI: Verdünnung der Zweitantikörper (Immunhistochemie) .....	36
Tabelle VII: Unterschiede zwischen RGC-5- und 661W-Zellen .....	66
Tabelle VIII: Gegenüberstellung der Differenzierungsprotokolle.....	95
Tabelle IX: Nachgewiesene Marker bei RGC-5-Zellen (Literatur).....	101

## Abkürzungen

Abkürzung	Englisch	Deutsch
<b>Apaf-1</b>	apoptotic protease-activating factor-1	apoptotischer Protease aktivierender Faktor 1
<b>BDNF</b>	brain derived neurotrophic factor	im ZNS produzierter neurotropher Faktor
<b>BrdU</b>	bromodeoxyuridine	Bromdesoxyuridin
<b>BSA</b>	bovin serum albumin	Rinderserumalbumin
<b>cDNA</b>	complementary DNA	komplementäre DNA
<b>Cy3</b>	cyanine-3	Cyanin 3
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (Standard-Nährmedium)
<b>DNA</b>	desoxy ribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
<b>EWG</b>	angle closure glaucoma	Engwinkelglaukom
<b>FKS</b>	fetal bovin serum	fötales Kälberserum
<b>GABA</b>	gamma-aminobutyric acid	Gamma-Amino-Buttersäure
<b>GFAP</b>	glial fibrillary acidic protein	saures Gliafaserprotein
<b>HAT</b>	histone acetyltransferase	Histon-Acetyltransferase
<b>HCl</b>	Hydrochloric acid	Chlorwasserstoff
<b>HDAC</b>	histone deacetylase	Histon-Deacetylase
<b>HDACi</b>	histone deacetylase inhibitor	Histon-Deacetylaseinhibitor
<b>hNF</b>	human neurofilament	humanes Neurofilament
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase	Meerrettichperoxidase
<b>kDa</b>	kilodalton	Kilodalton
<b>MAP-2</b>	microtubule-associated protein 2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
<b>mA</b>	milliampere	Milliampere
<b>mmHg</b>	millimeter of mercury	Millimeter-Quecksilbersäule
<b>µl</b>	microliter	Mikroliter
<b>nM</b>	nanomole	Nanomol

<b>mV</b>	millivolt	Millivolt
<b>NADP(H)</b>	nicotinamide adenine dinucleotide phosphaten	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
<b>nm</b>	nanometer	Nanometer
<b>NMDA</b>	n-methyle d-aspartate	N-Methyl-D-Aspartat
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid	Messenger-Ribonukleinsäure
<b>NT</b>	neurotropine	Neurotropin
<b>MTS</b>	dimethylthiazolyl-carboxymethoxyphenyl-sulfophenyl-tetrazolium	Dimethyl-Carboxymethoxyphenyl-Sulfophenyl-Tetrazol
<b>Opn</b>	opsine	Opsin
<b>PAGE</b>	polyacrylamide gel electrophoresis	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline	phosphatgepufferte Lösung
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
<b>POWG</b>	primary open angle glaucoma	Primäres Offenwinkelglaukom
<b>RGC</b>	retinal ganglion cell	Retinale Ganglienzelle
<b>rpm</b>	revolutions per minute	Umdrehungen pro Minute
<b>qRT-PCR</b>	quantitative real-time polymerase chain reaction	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
<b>sConA</b>	succinyl concanavalin-A	Succinyl-Concanavalin A
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate	Natriumdodecylsulfat
<b>STS</b>	staurosporine	Staurosporin
<b>TBS</b>	tris buffered saline	Tris-Pufferlösung
<b>TBST</b>	tris buffered saline and tween 20	Tris-Pufferlösung mit Tween 20
<b>TEMED</b>	tetramethylethylenediamine	Tetramethylethylendiamin
<b>Thy-1</b>	T-cell antigen / Theta antigen	T-Zell-Antigen
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor alpha	Tumornekrosefaktor alpha
<b>Trk</b>	tyrosine kinase receptor	Tyrosinkinase-rezeptor
<b>TSA</b>	trichostatin A	Trichostatin A
<b>Tween 20</b>	polysorbate 20	Polysorbat 20 (Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat)
<b>VEGF</b>	vascular growth factor	Endothelwachstumsfaktor

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Geschichte des Glaukoms und der Glaukomforschung

Seit dem Altertum wird der Begriff Glaukom für eine heterogene Gruppe an Augenerkrankungen verwendet [1]. In den Aphorismen des Hippokrates bezeichnet das Wort „Glaukoseis“ eine Erblindungsursache des Alters: „Wenn die Pupille wie die Farbe des Meeres wird, ist das Augenlicht zerstört und häufig trifft Erblindung auch das andere Auge“ [2].

Im Jahr 1622 brachte der englische Augenarzt R. Banister den grünen Star erstmals in Zusammenhang mit einem zu hohen Augeninnendruck [2]. Da man sich aber lange nicht über die Pathophysiologie des Glaukoms im Klaren war, fiel bis ins 18. Jahrhundert auch die Behandlung widersprüchlich aus. Erst durch die Erfindung des Augenspiegels durch H. Helmholtz 1850 [3] begann eine neue Ära in der Augenheilkunde und der damit verbundenen Forschung. Albrecht von Graefe war es schließlich, der Mitte des 19. Jahrhunderts postulierte, dass beim Glaukom ein zu hoher Augeninnendruck dauerhaft die Netzhaut und den Sehnerv schädige. Er führte erstmals die Gesichtsfeldbestimmung mithilfe einer Wandtafel durch und das erste Impressionstonometer wurde von ihm etabliert [4].

Nachdem 1884 das Kokain als Lokalanästhetikum entdeckt wurde [5], erfolgte die Druckmessung direkt an der Hornhaut. Bereits 1954 gelang es H. Goldmann, ein Applanationstonometer zu entwickeln, das bis heute in modifizierter Form zu den Standardinstrumenten der Augenheilkunde zählt und die zuverlässigste Methode ist, den intraokularen Druck zu bestimmen [6]. Auch hinsichtlich der Glaukomtherapie machte man Fortschritte. Mit der Iridektomie operierte von Graefe 1856 erstmals erfolgreich einen Glaukompatienten [7] und mit der Entdeckung des Pilocarpins knapp zwanzig Jahre später gab es die erste echte medikamentöse Option [2, 8] .

Die moderne Wissenschaft ist heute an einem Punkt, an dem es möglich ist, zelluläre Signalwege zu verstehen, diese auf RNA-, DNA- und Proteinebene nachzuweisen und daraus zu schließen, was sie über den Zustand der Zelle verraten. Der Begriff „Glaukom“ ist definiert [9] und medikamentöse sowie operative Therapieoptionen sind vorhanden [7, 10, 11]. Dennoch bleibt das Glaukom ein brisantes Forschungsthema, da es immer noch keine kurative Therapie gibt sondern nur einen Stopp des status quo erreichbar ist. Es gilt weiterhin, die genauen Ursachen und die Pathophysiologie des Untergangs der retinalen Ganglienzellen zu begreifen, neue Ansatzpunkte für Therapien zu entdecken und mögliche präventive Maßnahmen zu erschließen.

## 1.2 Definition und Einteilung der Glaukome

Der Begriff „Glaukom“ oder auch „grüner Star“ bezeichnet im allgemeinen ein multifaktorielles Geschehen, das in einem relativ zum Perfusionsdruck zu hohen Augeninnendruck mündet, was die progressive Degeneration der Ganglienzellschicht der Netzhaut und damit des *Nervus opticus* mit fortschreitenden Gesichtsfelddefekten zur Folge hat [12]. Im Grunde hat man es mit einer Form der Optikusneuropathie zu tun, für deren Genese heute mehrere Risikofaktoren bekannt sind [13, 14].

Prinzipiell unterscheidet man das primäre Glaukom vom Sekundärglaukom, das als Folge einer vorbestehenden Augenerkrankung oder als Nebenwirkung eines Medikaments auftritt. Ein Sonderfall ist das angeborene Glaukom. Die verschiedenen Glaukomformen unterscheiden sich zum Teil in ihrer Ätiologie und Therapie [12, 15].

Vom primären Offenwinkelglaukom (POWG) spricht man, wenn der Augeninnendruck konstant oberhalb von 25 mmHg liegt und kein akuter Winkelblock (s.u.) vorliegt. Hier besteht ein chronisches Ungleichgewicht zwischen Kammerwasserproduktion und Kammerwasserabfluss. Das POWG macht rund 90 % der Glaukome aus und wird durch den Patienten oft zu spät erkannt, da es keinerlei Symptome verursacht. Bis bemerkbare Gesichts-

felddefekte entstehen, können bereits über 70 % der Optikusfasern irreversibel geschädigt sein [12, 16].

Das akute Winkelblockglaukom (EWG), auch als Glaukomanfall bezeichnet, liegt vor, wenn der Kammerwinkel plötzlich verlegt wird, z.B. durch ein Vorwölben der Iris, und damit der Abfluss des Kammerwassers behindert ist. Der Augeninnendruck steigt schnell auf Werte über 60 mmHg an. Die Patienten haben dabei neben starken Augen- bzw. Kopfschmerzen und ausgeprägten Allgemeinsymptomen wie Übelkeit auch einen steinharten *Bulbus oculi* [12, 13].

Von einem Normaldruckglaukom spricht man, wenn der Patient zwar einen Augeninnendruck im Normbereich zwischen 10 und 21 mmHg aufweist, trotzdem aber glaukomatöse Veränderungen an Papille und Sehnerv zu erkennen sind [12, 17].

Risikofaktoren für die Entwicklung eines Offenwinkelglaukoms sind neben dem erhöhten Augeninnendruck u.a. eine positive Familienanamnese, steigendes Alter, eine höhergradige Myopie, eine dünne Hornhaut und Menschen afrikanischer Abstammung sind häufiger betroffen. Beim Engwinkelglaukom gelten Hyperopie und verschiedene okuläre Prädispositionen wie eine flache Vorderkammer oder ein geringer Hornhautdurchmesser als Risikofaktoren und es tritt bei Asiaten und bei Frauen gehäuft auf. Außerdem sind Migräne, Vasospasmen, nächtliche Hypotonie, Autoimmunerkrankungen und Vaskulopathien im Zusammenhang mit der Pathogenese des Glaukoms zu nennen [18, 19].

### **1.3 Bedeutung und Epidemiologie des Glaukoms**

Das Glaukom ist weltweit nach der Katarakt die zweithäufigste Erblindungsursache und sogar der häufigste Grund für eine irreversible Erblindung [20]. Im Jahre 2002 waren rund 37 Mio. Menschen erblindet, 12,3 % davon als Folge des grünen Stars [21]. In Deutschland gehen gegenwärtig etwa 15 % aller Erblindungen auf Glaukome zurück. D.h. jedes Jahr erblinden 1500 bis 2000 Menschen als Folge des grünen Stars [22]. Eine aktuelle Metaanalyse von

Tham *et al.* ging von rund 64 Mio. Glaukomkranken im Alter von 40 bis 80 Jahren im Jahr 2013 aus. Schätzungen für 2020 und 2040 sprechen von 80 Mio. bzw. über 100 Mio. Glaukompatienten weltweit [19, 23].

Für die Bevölkerung jenseits des 40. Lebensjahres beträgt die Prävalenz des Glaukoms weltweit 3,5 % [23]. In Europa liegt sie etwa bei 2 % und steigt mit zunehmendem Alter an [24]. Die Dunkelziffer ist hoch und es muss bedacht werden, dass die Diagnose oft erst erfolgt, wenn bereits irreversible Schäden eingetreten sind [25]. Weniger als die Hälfte aller Offenwinkelglaukome sind den Betroffenen in den Industrienationen bekannt. Aufgrund der demografischen Entwicklung in den Industrienationen ist damit zu rechnen, dass das Glaukom für die westliche Welt in Zukunft noch mehr an Bedeutung gewinnt.

#### **1.4 Retinale Ganglienzellen und ihre Eigenschaften**

Retinale Ganglienzellen (RGC) vermitteln als drittes Neuron der Netzhaut visuelle Impulse über den Sehnerv an das Gehirn. Schädigungen dieser Zellen sind eng verknüpft mit verschiedenen ophthalmologischen Krankheitsbildern wie z.B. der Optikusneuritis oder der erblichen Leber-Optikusneuropathie [26]. Vor allem aber spielt der Untergang der RGC beim Glaukom eine entscheidende Rolle (s. Kapitel 1.5).

RGC sind postmitotisch, d.h. sie teilen sich nicht mehr. Sie haben einen neuronalen Phänotyp, also einen runden Zellkörper mit vielen astartig verzweigten Dendriten. Sie gelten als sensitiv für Glutamat-Exzitotoxizität [27-29] und reagieren mit Zelltod wenn sie z.B. hydrostatischem Druck, hellem Licht oder oxydativem Stress ausgesetzt sind [30-34]. Weiterhin ist die Abhängigkeit von Neurotrophinen charakteristisch für RGC [35]. Sie exprimieren verschiedene Marker-Proteine, darunter die RGC-spezifischen Marker der Brn3-Familie [36], Thy-1 [37] und verschiedene neuronale Marker wie MAP-2, Tau, humanes Neurofilament (hNF) und  $\beta$ -III-Tubulin [38-40].

## 1.5 Pathophysiologie des Glaukoms

Wie unterschiedlich die Pathogenesewege des Glaukoms auch sein mögen, letztlich kommt es immer zur Schädigung der retinalen Ganglienzellen (RGC) und ihrer Axone und damit zur Optikusneuropathie und Gesichtsfeldverlusten.

### 1.5.1 Das 5-Stufen-Modell der Pathogenese

Wichtig für das Überleben der Ganglienzellen sind Neurotrophine wie z.B. BDNF, die in den höheren Zentren, z.B. im *Corpus geniculatum laterale*, produziert und über retrograden axonalen Transport zu den Zellkörpern der RGC transportiert werden [41-44]. Demgegenüber stehen verschiedene „Todessignale“ wie z.B. ein erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel [45], Übererregung durch extrazellulär vermehrtes Glutamat, die sogenannte Glutamat-Exzitotoxizität [28, 46-49], oder das Binden von Todesliganden wie beispielsweise TNF- $\alpha$  an Rezeptoren der Ganglienzellen [50-52]. Kommt es z.B. durch mechanische Irritation, gestörten axonalen Transport oder eine Störung der Homöostase des umgebenden Gewebes zum Ungleichgewicht zwischen solchen Überlebenssignalen und Todesfaktoren, beginnen verschiedene Zelltodkaskaden in den betroffenen Zellen. Bezogen auf den Ganglienzelluntergang beim Glaukom lässt sich dieser Prozess in fünf Stufen beschreiben [53].

Zuerst kommt es zur Gliaaktivierung. Durch den (relativ) zu hohen Augeninnendruck werden neben den Axonen der Ganglienzellen auch die Gliazellen an der *Lamina cribrosa* geschädigt, die verantwortlich für den Stoff- und Flüssigkeitstransport des Gewebes sind. Zusätzlich zur mechanischen Belastung der Ganglienzellaxone wird durch die Beeinträchtigung der Gliazellen so die Homöostase der Ganglienzellumgebung beeinträchtigt [54-56]. Wie genau sich dieser Umstand auf den axonalen Transport der RGC auswirkt, ist unklar. Diskutiert wird z.B. das Sezernieren von Stickstoffmonoxid [54, 57] und Vasokonstriktoren [54, 58] durch aktivierte Gliazellen, was zu direktem Schaden benachbarter Axone und indirekter Schädigung durch lokale Ischämie führen könnte.



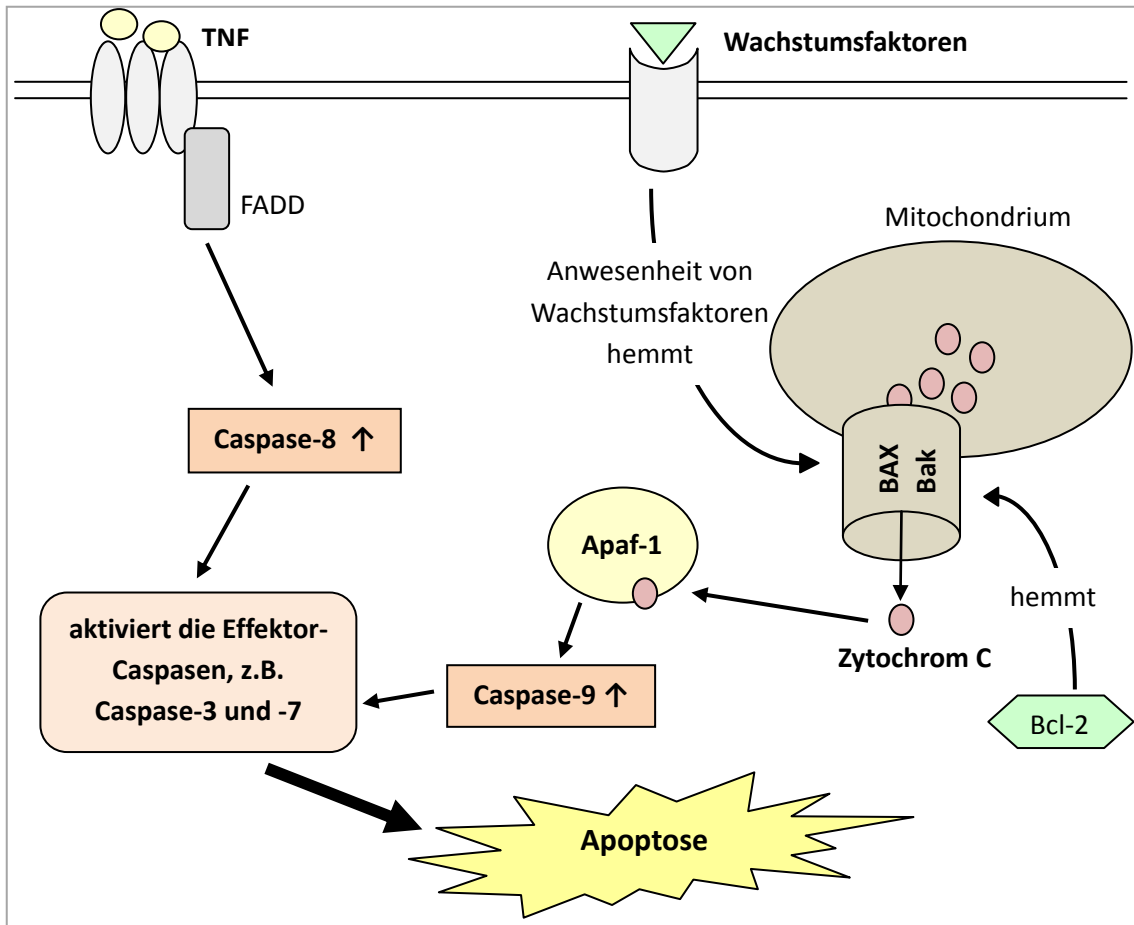
Aus mechanischer Belastung durch Druck und gestörter Gewebemöostase resultiert ein beeinträchtigter Membrantransport und eine energetische Minderversorgung der RGC weshalb das Kalzium in den Zellen ansteigt – ein starkes Signal für sie, mit der autonomen Degeneration des betroffenen Axons zu starten. Die zweite Stufe, das sogenannte „Rückwärtssterben der Axone“, beginnt. Es handelt sich um eine Kompartimentdegeneration der Zelle [53, 59]. Dabei stehen die Zerstörung der Mikrotubuli und der damit einhergehende Verlust des axonalen Transports im Vordergrund.

Infolge des gestörten axonalen Transports, der z.B. auch den Transport von Neurotrophinen mit einschließt [60], kommt es zum dritten pathophysiologischen Schritt auf dem Weg zum Glaukom: Die Zelle beginnt mit dem programmierten Zelltod, der primären Ganglienzellapoptose. Beim Untergang der RGC wird Glutamat freigesetzt. Die überschießende Glutamatausschüttung aus absterbenden Zellen führt bei den eigentlich noch gesunden benachbarten Ganglienzellen zur Apoptose. Glutamat bewirkt eine Daueröffnung der Kalziumkanäle und damit ein erhöhtes intrazelluläres Kalziumangebot. Das viele Glutamat kann nicht mehr ausreichend von den Gliazellen, in diesem Fall den Müller-Zellen, aufgenommen und abgebaut werden. Immer mehr Zellen beginnen den programmierten Zelltod. Man spricht bei dieser vierten Stufe der Pathogenese von sekundärer Ganglienzellapoptose [18, 54].

Im letzten Schritt bildet sich infolge des Ganglienzelluntergangs eine Glianarbe [53]. Bis erste Gesichtsfeldausfälle detektierbar sind, können bereits über die Hälfte der Nervenfasern degeneriert sein [54, 61].

### **1.5.2 Apoptose**

Der programmierte Zelltod oder auch Apoptose, ist ein zelleigenes „Suizid-Programm“, das zum Schrumpfen der Zelle, zur Kondensation des Chromatins mit nukleärer Fragmentierung und zur Vakuolisierung führt. Anschließend werden die apoptotischen Zellen durch Mikrogliazellen phagozytiert [62].



**Abbildung 1: Die Kaskade der Apoptose**

Die Abbildung zeigt einen Überblick über den Ablauf von intrinsischer und extrinsischer Apoptose. Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch die Bindung eines Todesliganden, beispielsweise TNF, an den entsprechenden Rezeptor aktiviert. Dies führt intrazellulär zur Anlagerung von Adaptermolekülen (hier FADD) und die Caspase-8 wird aktiviert. Sie aktiviert wiederum Effektor-Caspasen wie Caspase-3 und -7. Der intrinsische Weg ergibt sich aus einer für die Zelle ungünstigen Situation, wie z.B. dem Mangel an Wachstumsfaktoren. Er setzt die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium voraus. Cytochrom C bindet an Apaf-1, welcher die Caspase-9 aktiviert. Diese aktiviert wiederum durch limitierende Proteolyse die Effektor-Caspasen 3 und 7. Damit Cytochrom C das Mitochondrium verlassen kann, muss es dessen Membran passieren. Liegen die proapoptotischen Proteine Bax/Bak aktiviert als Heterodimer in der Membran vor, ist dies der Fall. Ob Bax/Bak aktiv sind, hängt von zahlreichen weiteren Proteinfaktoren ab. Modifiziert nach Löffler G., *et al.*, Biochemie und Pathobiochemie [157].

Damit in einer Zelle Apoptose ausgelöst wird, bedarf es bestimmter Signale, die sie entweder von außen erreichen oder die im Zellinneren entstehen. Im Zuge der intrinsischen Kaskade der Apoptose registriert die Zelle selbst, dass irreparable Schäden vorliegen und sie „überflüssig“ ist, was durch oxidativen Stress, intrazellulär erhöhtes Kalzium, einen gestörten pH-Wert sowie DNA-

Schäden ausgelöst werden kann [63]. Infolgedessen werden die Caspasen 1, 2, 4, 5, 9, 11 und 12 der intrinsischen Kaskade durch einen intrazellulären Komplex aktiviert, an dem Apaf-1, die Caspase-9 und Zytochrom C, das bei zellulären Mängelsituationen aus dem Mitochondrium ausgeschüttet wird, beteiligt sind [63-65].

Im Rahmen des extrinsischen Signalwegs erhält die Zelle proapoptotische Signale von außen, z.B. durch Entzug von Wachstums- bzw. Überlebensfaktoren oder Aktivierung durch sog. Todesliganden. Es werden bestimmte Caspasen mit einer „Todeseffektordomäne“, wie Caspase-8 und Caspase-10, durch die Interaktion mit der intrazellulären Domäne der Todesrezeptoren (z.B. Fas- oder TNF-Rezeptoren) aktiviert [63, 65].

Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg münden in der Aktivierung von Effektor-Caspasen, zu denen Caspase-3 und Caspase-7 gehören, welche die zelluläre Degradierung einleiten [66]. Es werden Proteinkinasen aktiviert, Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und auf diesem Wege proapoptotische Gene aktiviert [63].

Des Weiteren spielen die Proteine der Bcl-Familie eine Rolle bei der Steuerung der intrinsischen Kaskade der Apoptose [66]. Einige Mitglieder dieser Familie, wie Bcl-2 und Bcl-X wirken antiapoptotisch während andere wie Bax oder Bak proapoptotisch wirken [53, 67].

## **1.6 Die Etablierung und Bedeutung der RGC-5-Zelllinie**

RGC sind nur schwer aus humaner oder tierischer Retina zu gewinnen, die Zahl vitaler Zellen nimmt *in vitro* schnell ab und meist überleben sie nach Isolation maximal einige Tage [68]. Deshalb war die Etablierung der RGC-5-Ganglienzelllinie durch Krishnamoorthy *et al.* [69] ein durchschlagender Erfolg. Krishnamoorthy *et al.* beschrieben die Etablierung einer Zelllinie durch Transformation von retinalen Ganglienzellen aus postnatalen Ratten mit dem  $\psi$ 2E1A-Virus [69]. Auf diesem Wege konnte ein Klon aus einer retinalen Mischkultur ausfindig gemacht werden, der eindeutige neuronale Marker

exprimierte und Merkmal retinaler Ganglienzellen aufwies. Der Klon RGC-5 wurde positiv getestet auf Ganglienzell- und neuronale Marker wie Thy-1, Brn3a, Neurtin, NMDA-Rezeptoren, GABA-B-Rezeptoren, Synaptophysin und reagierte sensitiv auf Glutamat-Exzitotoxizität sowie Neurotropine. Die Kultivierung des RGC-5-Zellklons über fünfzig Passagen resultierte weder in der Abnahme der mitotischen Aktivität noch im Verlust von Thy-1. Die RGC-5-Zellen hatten ein spindelförmiges Aussehen mit kurzen Fortsätzen aber ohne Dendriten, wuchsen einschichtig und adhärent und teilten sich ca. alle 20 bis 24 Stunden [70]. Die Schlussfolgerung der Forscher: Eine Ratten-Ganglienzelllinie konnte etabliert werden, die das Potential zur *in vitro* Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie von RGC-abhängigen Prozessen in der Augenheilkunde vermuten ließ – ein Meilenstein in der Glaukomforschung. Heute berufen sich bereits über 250 wissenschaftliche Publikationen auf die RGC-5-Zelllinie, denn sie ist nach wie vor die einzig existierende retinale Ganglienzelllinie und damit insbesondere für die Glaukomforschung unabdingbar.

## 1.7 Entdifferenzierung der RGC-5-Zellen und Gegenmaßnahmen

Bedauerlicherweise gab es immer wieder Bedenken hinsichtlich der Funktionalität und Identität der RGC-5-Zellen. Es wurde angemerkt, dass die RGC-5-Zelllinie nach einigen Jahren ihre neuronalen und Ganglienzelleigenschaften eingebüßt habe [30, 39, 71-73]. Anfänglich konnte bei undifferenzierten und bei mit Succinyl-Concanavalin A differenzierten RGC-5-Zellen über Glutamat-Sensitivität berichtet werden [35, 69, 74]. Doch spätere Publikationen erwähnten eine zunehmende Resistenz gegenüber Glutamat-Exzitotoxizität [33, 34, 72]. Auch hinsichtlich der Expression neuronaler und ganglienzellspezifischer Marker gab es widersprüchliche Publikationen. Der Nachweis von Thy-1 und Brn3-Markern sowie NMDA-Rezeptoren und die Bestätigung der Wachstumsfaktor-Abhängigkeit gelang Krishnamoorthy *et al.* anfänglich sogar bei undifferenzierten RGC-5-Zellen [69]. Die Expression von RGC-Markern wurde auch durch nachfolgende Publikationen bestätigt [35, 45].

Andere Artikel bestreiten aber das Vorkommen von Ganglienzell-Marker bei undifferenzierten und differenzierten RGC-5-Zellen [39].

Durch Van Bergen *et al.* wurde 2009 ein Artikel publiziert, der besagt, dass RGC-5-Vorläuferzellen ursprünglich aus Mäuse- und nicht aus Rattenretina isoliert wurden und neuronale Marker wie  $\beta$ -III-Tubulin und Tau, nicht aber Ganglienzell-spezifische Marker wie bestimmte Neurofilamente oder Thy-1 exprimieren [72]. RGC-5-Zellen waren allerdings auch negativ für Marker weiterer retinaler Zellen wie Horizontalzellen (Calbindin), amakrine Zellen (Calretinin), On-Bipolarzellen (Proteinkinase-C $\alpha$ ) und Astrozyten (GFAP) [39]. Es konnte gezeigt werden, dass sie Nestin exprimieren, ein Intermediärfilament das typisch für neuronale Progenitorzellen ist [39, 75], sodass RGC-5-Zellen eine Art neuronale Vorläuferzellen sein könnten. Die Expression verschiedener neuronaler Marker wie Tau, MAP-2 und  $\beta$ -III-Tubulin [38, 39, 72, 76, 77] sowie das Vorkommen von Neurotrophinen (BDNF, NT3, NT4) und deren Rezeptoren (TrkA, TrkB, TrkC) wurde mehrfach bestätigt [35, 69].

In den letzten Jahren wurden in Reaktion auf die Entdifferenzierung und fragliche Identität der RGC-5-Zellen verschiedene Protokolle zur Redifferenzierung etabliert, mit dem Ziel, in den Zellen verlorene Eigenschaften retinaler Ganglienzellen zu reaktivieren und die Zelllinie dazu zu bringen, mehr Eigenschaften neuronaler Zellen bzw. Ganglienzell-Eigenschaften anzunehmen [39, 77, 78]. Differenzierung bedeutet in diesem Falle, die Mitoserate zu reduzieren, einen neuronalen Phänotyp zu induzieren und die Expression RGC-typischer und neuronaler Marker zu verstärken, mit dem Ziel, möglichst realitätsnahe Forschungsbedingungen zu schaffen. Es werden heute im Wesentlichen zwei Substanzen genutzt, um RGC-5-Zellen zu differenzieren: Trichostatin A und Staurosporin.

### **1.7.1 Differenzierung mit Trichostatin A**

Trichostatin A (TSA) ist ein aus *Streptomyces* sp. gewonnenes Antibiotikum und ein potenter Histon-Deacetylaseinhibitor [79]. Histone sind basische Proteine, um die der DNA-Doppelstrang des Eukaryonten-Genoms aufgewickelt ist,

sodass die Erbinformation im Zellkern eine möglichst kompakte Gestalt (Euchromatin) hat. Histone können u.a. durch Acetylierung modifiziert werden, was das Chromatingerüst insgesamt verändert und damit auch die Genexpression [80-82]. Die Acetylierung von Histonen setzt die Bindungsfähigkeit für die DNA herab und die Struktur des Chromatins lockert sich – eine wichtige Voraussetzung für die Transkription. Bestimmte Enzyme, die Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC), regulieren den Acetylierungszusand von Histonen [82].

Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) wie TSA verursachen eine Hyperacetylierung, was zu vermehrter bzw. veränderter Genexpression führt [80-82]. TSA fördert dadurch beispielsweise die Wirksamkeit von Krebsmedikamenten, die die DNA als Ziel haben [83]. Man geht außerdem davon aus, dass HDACi neuroprotektiv wirken [84-86]. Der HDACi Valproinsäure fördert z.B. das Überleben von RGC nach Verletzungen des Sehnervs [87]. Es gibt neuere Ansätze, wonach Histon-Deacetylierung eine zentrale Rolle in sterbenden RGC spielt und Hemmung durch HDACi wie TSA das frühe „*gene silencing*“ normaler Gene, das im Zuge der Apoptose auftritt, verhindern kann [88].

Besonders von Bedeutung für diese Arbeit ist, dass HDACi in der Lage sind, durch einen Switch im Transkriptionsprofil einige neuronale Zelltypen zu differenzieren [89, 90]. TSA induziert bei RGC-5-Zellen transkriptionsabhängig die Differenzierung zu einem neuronalen bzw. ganglienzellähnlichen Phänotyp [38, 39, 78].

Allerdings löst TSA in bestimmten Konzentrationen auch Apoptose in neuronalen Zellen und RGC aus [38, 91-93]. Schnichels *et. al* konnten 2012 [38] nachweisen, dass TSA in der für die Redifferenzierung der RGC-5-Zelllinie benötigten Konzentration von 500 nM und sogar bei geringeren Konzentrationen über einen Zeitraum von zwei Tagen zu Apoptose und Zelltod führt.

### **1.7.2 Differenzierung mit Staurosporin**

Staurosporin (STS) ist ebenfalls ein aus *Streptomyces* sp. isoliertes Antibiotikum und ein Proteinkinase-Inhibitor [94]. Es ist zellpermeabel und hemmt schon bei sehr niedrigen Konzentrationen unspezifisch verschiedene Kinasen. Dadurch ruft STS die unterschiedlichsten, teils zellspezifischen Effekte hervor: Induktion der Apoptose,  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung oder Genaktivierung. Außerdem hemmt es die Topoisomerase II durch Bindung im aktiven Zentrum [95].

Bei der Differenzierung der RGC-5-Zelllinie mittels 316 nM Staurosporin über 24 Stunden konnte das Neuritenwachstum induziert und eine Soma-Rundung erreicht werden, die Zellen änderten ihre Morphologie hin zu einem neuronalen Phänotyp und verloren ihre mitotische Aktivität [77]. Allerdings reagierten die Zellen anschließend weniger empfindlich auf Neurotropine als bei der Behandlung mit TSA [78]. Die Differenzierung der RGC-5-Zellen mittels Staurosporin erfolgt im Gegensatz zu TSA-vermittelten Veränderungen unabhängig von Transkription und Translation in den Zellen [78, 95]. Auch beim Einsatz von Staurosporin zur Redifferenzierung der RGC-5-Zellen konnte eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden [76].

### **1.7.3 Etablierte Differenzierungsprotokolle für RGC-5-Zellen**

Hinsichtlich der Differenzierung der RGC-5-Zelllinie mit TSA wurden seit 2007 drei wichtige Publikationen veröffentlicht, die sich unterschiedlichen Teilaspekten widmen.

Schwechter *et al.* [78] bauten auf dem Ansatz von Frassetto *et al.* [77] von 2006 für die Differenzierung mit STS auf, setzten aber erstmals TSA ein. Sie konnten für eine Konzentration von 500 nM TSA im Nährmedium der RGC-5-Zellen und Inkubation für 24 Stunden zeigen, dass die Expression von neuronalen Markern (MAP-2, Tau) sowie Ganglienzellmarkern (Brn3a/b), das Neuritenwachstum und die Neurotropin-Sensitivität der RGC-5-Zelllinie deutlich anstieg und die Zellen ihre mitotische Aktivität einbüßten.

Wood *et al.* [39] verglichen mehrere Differenzierungsmethoden (STS, TSA, sConA), um herauszufinden, wie diese u.a. die Expression neuronaler und Ganglienzellmarker sowie die Glutamat-Sensitivität beeinflussen. Dazu kultivierten sie RGC-5-Zellen zunächst 24 Stunden ohne Serum im Medium, um dadurch die Proliferation zu drosseln und gaben danach auch bedeutend weniger FKS (0, 1 %) zu als bei anderen Protokollen üblich (5 % FKS). Sie erweiterten außerdem den Inkubationszeitraum auf fünf Tage. Es wurde hierbei u.a. gezeigt, dass TSA die Expression von neuronalen Markern wie MAP-2, Tau und  $\beta$ -III-Tubulin bei RGC-5-Zellen positiv beeinflusst und die Glutamat-Sensitivität steigt. Diese Effekte traten v.a. nach Langzeitinkubation (drei bis fünf Tage) auf. Ein Einfluss auf die Expression von Ganglienzellmarkern konnte nicht gezeigt werden.

Schnichels *et al.* 2012 [38] untersuchten die Frage, inwiefern die gängige Differenzierung mit TSA mit der als optimal geltenden Konzentration von 500 nM über 24 Stunden zytotoxisch wirkt, indem sie neben der Differenzierung der RGC-5-Zellen auch Zellzahl, Vitalität, Apoptose und Zelltod betrachteten. Ihre Experimente basierten dabei auf der durch Schwechter *et al.* und Frassetto *et al.* beschriebenen Inkubation und umfassten einen Zeitraum von 48 Stunden. Es konnte gezeigt werden, dass TSA schon in geringen Konzentrationen, die noch nicht zu Differenzierung führen, Zelltod induziert.

Die im Rahmen des Wood-Protokolls beschriebene Langzeitdifferenzierung, welche einen eindeutig positiven Effekt auf die neuronale Differenzierung hat, scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein. Allerdings bleibt beispielsweise fraglich, ob die durch Schnichels *et al.* beschriebene Zytotoxizität auch bei längeren Inkubationszeiträumen bestehen bleibt. Deshalb soll es Aufgabe dieser Arbeit sein, die unterschiedlichen Differenzierungsmethoden mit TSA, die durch Schwechter und Wood vorbeschrieben sind, über einen Zeitraum von fünf Tagen und unter Berücksichtigung potentieller zytotoxischer Effekte vergleichend durchzuführen.



## 1.8 Die Aktuelle Forschung und Problematik

### 1.8.1 Die 661W-Zelllinie

Das menschliche Auge enthält ungefähr 127 Mio. Fotorezeptoren, davon 6 Mio. Zapfen, die in der zentralen Retina gelegen für das Tag- und Farbsehen verantwortlich sind [26]. Um ihr Verhalten *in vitro* erforschen zu können, wurde die 661W-Zapfen-Zelllinie aus retinalem Tumorgewebe einer transgenen Mauslinie geklont, welches das Simianvirus T-Antigen 40 enthielt [96]. Forschung auf zellulärer und molekularer Ebene ergaben, dass 661W-Zellen Zapfen-typische Marker wie blaues und grünes Zapfen-Pigment, Transducin und Zapfen-Arrestin so wie das SV40 T-Antigen aufwiesen [97]. Zu den Eigenschaften von 661W-Zellen gehört, dass sie auf Lichtstimuli reagieren und nach Exposition an helles Licht mit Apoptose reagieren [98]. Sie wachsen als Monolayer, teilen sich ca. alle 27 Stunden und ihr Zellkörper ist spindelförmig. 661W-Zellen können Fortsätze entwickeln und treten über diese mit Nachbarzellen in Verbindung [97].

### 1.8.2 Eine mögliche Kontamination der RGC-5-Zelllinie mit 661W-Zellen

Die 661W-Zelllinie fand zeitgleich zur Etablierung der RGC-5-Zellen im Labor der Forschungsgruppe um Krishnamoorthy Verwendung. Unglücklicherweise wurden einige Test zur Identifikation der damals isolierten RGC-5-Zellen nie durchgeführt, darunter die Überprüfung, ob die Zellen den verwendeten Transformationsvektor  $\psi$ 2E1A enthielten und tatsächlich ein Rattengenom aufwiesen [69, 70]. Es ist also theoretisch möglich, dass während des Etablierungsprozesses der RGC-5-Zellen eine Kontamination mit 661W-Zellen stattgefunden hat.

Interessanterweise reagieren RGC-5-Zellen auf exzessive Lichtexposition im blauen Spektrum (400-480 nm) mit sinkender Stoffwechselaktivität und Apoptose, v.a. wenn sie bereits durch Serum-Entzug vorgeschädigt sind [32, 99, 100]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass langfristige Lichtexposition alle Schichten der Retina angreift [101] und es ist bekannt, dass bestimmte RGC-Typen an sich fotosensitiv sind [102]. Kurzwelliges Licht führt bei RGC zum

Zelltod, wenn diese schon leicht in ihrer Homöostase z.B. durch Druck, Mangelversorgung oder Alterungsprozesse beeinträchtigt sind [103]. Neben der Reaktion auf Licht, konnten blaue Zapfen-Opsine in RGC-5-Zellen nachgewiesen werden [39, 104]. Die Expression von Opsinen und die Reaktion auf Licht könnte damit zusammen hängen, dass RGC neben der Weiterleitung und dem Verschalten visueller Informationen auch andere Aufgaben wie z.B. Kontrastverstärkung haben [102]. Aber auch die potentielle „Verwechslungszelllinie“ 661W exprimiert zapfentypische Opsine [97] und mit Apoptose auf exzessive Lichtexposition zu reagieren ist typisch für sie [98].

Eine kürzlich erschienene Publikation [70] greift die Behauptung auf, RGC-5-Zellen seien in Wahrheit aus Mäusen und nicht aus Ratten isoliert worden [72]. Auf DNA-Ebene wurde gezeigt, dass sie kein Ratten-spezifisches genetisches Muster aufweisen, dafür aber tatsächlich ihren Ursprung in Mauszellen zu haben scheinen. Weiterhin gelang es der Forschungsgruppe nicht, das in diesen Zellen erwartete  $\psi$ 2E1A-Virus-Transformationsprotein bzw. die entsprechende mRNA nachzuweisen.

Da folglich die Frage im Raum stand, ob es die Wissenschaft überhaupt mit einer Ganglienzelllinie zu tun hat oder mit einer Maus-Zelllinie unbekanntem Phänotyps, verglich man die RGC-5-Zellen mit der 661W-Zelllinie. Es konnte gezeigt werden, dass beide Zelllinien dasselbe Transformationsprotein (SV 40 large T-Antigen) exprimieren, 95 % ihrer genetischen Information identisch sind und sie einen ähnlichen Karyotyp aufweisen. Deshalb äußerten Krishnamoorthy *et al.* abschließend die Vermutung, dass es sich bei der RGC-5- und der 661W-Zelllinie um dieselbe Zelllinie handelt, die ihren Ursprung in der C57BL/6-Maus-Inzuchtlinie hat und durch Transformation mit dem Onkoprotein SV40 large T-Antigen entstand – also aktuell gar keine Ganglienzelllinie für Forschungszwecke existiert. Fraglich bleibt, warum die RGC-5-Zelllinie dann jemals Ganglienzellmarker exprimiert haben soll [35, 45, 69].

## 1.9 Das Ziel dieser Arbeit

Die moderne Glaukomforschung benötigt eine „funktionierende“ retinale Ganglienzelllinie, um *in vitro* die Möglichkeit zur Erforschung der genauen pathophysiologischen Mechanismen beim grünen Star und Untersuchung möglicherweise protektiver Ansätze zu haben. Deshalb ist es notwendig, bereits vorhandene Differenzierungsprotokolle für RGC-5-Zellen genauer zu betrachten bzw. zu ergänzen und gleichzeitig die aktuellen Erkenntnisse hinsichtlich einer möglichen Kontamination der RGC-5-Zelllinie nicht außer Acht zu lassen.

Vor diesem Hintergrund bearbeitet die vorliegende Arbeit zwei Fragestellungen:

- Im ersten Schritt geht es darum herauszufinden, inwiefern RGC-5- und 661W-Zellen unter Differenzierungsbedingungen mit 500 nM Trichostatin A und 300 nM Staurosporin ähnlich oder unterschiedlich reagieren.
- Der zweite Teil befasst sich mit dem Vergleich zweier etablierter Differenzierungsprotokolle für RGC-5-Zelllinie nach Schwechter *et al.* 2007 [78] und Wood *et al.* 2010 [39].

Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem Aspekt der Langzeitdifferenzierung mit TSA sowie dessen Effekte auf die neuronale Differenzierung und die Expression von Ganglienzellmarkern unter Berücksichtigung möglicher zytotoxischer Wirkungen.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zellen und Nährmedien

Die RGC-5-Zelllinie wurde von Prof. Neeraj Agarwal (UNT Health Science Center Fort Worth, TX, USA) zur Verfügung gestellt, die 661W-Zellen von Prof. Dr. Muayyad Al-Ubaidi (Department of Cell Biology, University of Oklahoma, OK, USA). Für die unterschiedlichen Differenzierungsprotokolle mit Trichostatin A bzw. Staurosporin nach Schwechter *et al.* 2007 und Wood *et al.* 2010 wurden die Standard-Medien jeweils um bestimmte Supplemente ergänzt.

Differenzierung nach Schwechter *et al.*, 2007: Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) ergänzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 % FKS

Differenzierung nach Wood *et al.*, 2010: Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) Low Glucose Without L-Glutamin ergänzt mit

- 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % fötalem Kälberserum (FKS) bzw.
- 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 0,1% fötalem Kälberserum (FKS) bzw.
- 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin, 2 mM L-Glutamin.

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM), GIBCO, # 31885-023
- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) Low Glucose Without L-Glutamin, PAA, # E15-005
- Fötales Kälberserum (FKS), GIBCO, # 10270
- Penicillin/Streptomycin, PAA, # P11-010
- L-Glutamin, Sigma, # G8415
- Dulbecco`s PBS, PAA, # H15-002
- Trypsin-EDTA 25 %, GIBCO, # 25200

- Trichostatin A Ready Made Solution, Sigma, # T1951
- Zellkulturflaschen Cellstar (250 ml), Greiner bio-one, # 658 170
- 6-, 24- u. 96-Well-Platten, Costar

### 2.1.3 Assays & Kits

- BrdU Cell Proliferation Assay Kit, Millipore (Calbiochem), # QIA58-1000TEST
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, # G3580
- Crystal Violet Solution, Sigma, # HT901-8FOZ
- Caspase-Glo® 3/7 Assay-Kit, Promega, # G8091
- Propidium Iodide 50 mg, EMD Millipore (Calbiochem), # 537059
- DAPI, Applichem, # A4099
- Triton X-100, Roth, # 3051.2
- Paraformaldehyd 4 % in PBS, Millipore, # 104005
- SDS ultra pure (Sodium dodecyl sulphate), Roth, # 2326.2
- Bovines Serumalbumin (BSA), Albumin bovin Fraction V, Serva, # 11930

### 2.1.4 Spezielle Materialien für Gelelektrophorese und Western Blot

- Polyacrylamidgele:

Bestandteile	Trenngel (22,5 ml)	Sammelgel (9 ml)
H <sub>2</sub> O	7,7 ml	5,1 ml
Acrylamide, Sigma, # A3699	9,0 ml	1,53 ml
Tris-HCl: 1,5 M mit pH 8,8	5,6 ml	
Tris-HCl: 0,5 M mit pH 6,8		2,25 ml
Sodium dodecyl sulfate (SDS), Roth # 2326.2, 10%ig	225 µl	90 µl
Ammoniumpersulfat (APS), Sigma, # A9164, 10%ig	225 µl	90 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED), Roth, # 2367	9 µl	9 µl

- PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific (Pierce), # 26616
- BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific (Pierce), # 23227
- Cell extraction buffer, Invitrogen, # FNN0011
- Running Buffer (auf ein Volumen von 500 ml H<sub>2</sub>O MilliQ):
  - 15,0 g TrisBase, Applichem, # A1086
  - 72,0 g Glycin, Roth, # 3908.2
  - 5 g SDS, Roth, # 2326.2
- 5x Sample Buffer/SDS Reducing Buffer (Stocklösung)
  - 31,25 ml 1M Tris-HCl pH 6,8
  - 50 ml Glycerin, Sigma, # G2289
  - 5 ml 1 % Bromphenolblau, Sigma, # B0126
  - 23,75 ml H<sub>2</sub>O MilliQ
- 1x Sample Buffer:
  - 400 µl 5x Sample Buffer/ SDS Reducing Buffer (s.o.)
  - 50 µl 20 % SDS Roth # 2326.2
  - 50 µl Mercaptoethanol, Roth, # 4227
- Towbin-Buffer/Transfer-Buffer (auf ein Volumen von 1Liter H<sub>2</sub>O):
  - 3 g TrisBase, Applichem, # A1086
  - 14,4 g Glycin, Roth # 3908.2
  - 0,005 % SDS, Roth # 2326.2
  - 200 ml Methanol, VWR # 20847.307
- 10x TBS:
  - 60,57 g TrisBase, Applichem, # A1086
  - 87,66 g NaCl, VWR #27810.295
  - auf 1000 ml auffüllen, pH überprüfen

} zu 900 ml H<sub>2</sub>O MilliQ,  
 dann mit 25 % HCl auf  
 pH 7,6 einstellen
- 1x TBST: 10x TBS 1:10 verdünnt mit 0,1 % Tween 20, Serva, # 39796.10
- Ammoniumpersulfat, Sigma # A9164
- Tetramethylethyldiamin (TEMED), Roth, # 2367
- Nitrocellulose Membrane Whatman™, Protran BA 83, GE Healthcare, # 10401396
- Entwickler: GBX developer, Sigma, # P7042-16A

- Fixierer: GBX fixer, Sigma, # P7167-16A
- Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, Product # 32106
- Amersham Hyperfilm ECL (18x24 cm), GE Healthcare, Product # 28906836

### 2.1.5 cDNA-Synthese und quantitative Real-Time-PCR

- MultiMACS cDNA Synthesis Kit, Miltenyi Biotec # 130-094-410: Verwendung nach Angabe des Herstellers
- Multi-8 Filter and Frame, Miltenyi Biotec # 130-092-548
- Master Mix for PCR SsoAdvanced Universal SYBER Green Supermix, Biorad #166-5009EDU
- Verwendet wurden Primer (5'-3'-Richtung) für folgende Gene: L32 (Haushalts-Gen), VEGF (Endothelzellwachstumsfaktor), Thy-1 (Marker für retinale Ganglienzellen), GFAP (Marker für Gliazellen)

**Tabelle I: Primer für die qRT-PCR und ihre Sequenzen**

Primer	Sequenz
<b>GFAP For3 R. n. 2482</b>	TTAGTGTACCCTCTCGGAAG
<b>GFAP Rev3 R. n. 2631</b>	AGGTTAGCAGAGGTGACAAG
<b>THY1 For3 R. n. 925</b>	AGCCAGATGCCTGAAAGAGA
<b>THY1 Rev3 R. n. 1117</b>	GGGCTGAGAATGACCTGGTA
<b>VEGF For3 R. n. 2325</b>	GCCCTGAGTCAAGAGGACAG
<b>VEGF Rev3 R. n. 2494</b>	CAGGCTCCTGATTCTTCCAG
<b>L32 For</b>	AACCGAAAAGCCATCGTAGAA
<b>L32 Rev</b>	CCTGGCGTTGGGATTGG

### 2.1.6 Antikörper

#### Immunhistochemie

- Primärantikörper:
  - o Anti-Tau, clone 5E2 (mouse monoclonal IgG<sub>1</sub>), Millipore, # 05-348
  - o Anti-Microtubule-Associated Protein 2 (MAP2) Antibody, Millipore, # AB5622

- Anti Human NF-H Antibody, R&D Systems, # AF3108
- Anti neuron-specific beta-III-tubulin, R&D Systems, # MAB1195
- Sekundärantikörper:
  - Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, Invitrogen, # A21202
  - Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody, Invitrogen, # A21206
  - Cy3 donky anti goat IgG (H+L), Jackson, # 705-165-147

## Western Blot

- Primärantikörper:
  - $\beta$ -Aktin (13E5) Rabbit mAb, Cell Signalling, #4970
  - Caspase 3 Antibody, Cell Signalling, #9662
  - Bax Antybody, Cell Signalling, #2772
  - Bcl-2 Antibody, Cell Signalling, #2876
  - Neuron-specific beta-III-tubulin mAb (Clone TuJ-1), R&D Systems, # MAB1195
- Sekundärantikörper:
  - Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate, Cell Signalling, #7076
  - Anti-Mouse IgG (H+L) HRP Conjugate, Cell Signalling, #7074

### 2.1.7 Gerätschaften

- Zellkulturschrank/CO<sub>2</sub>-Inkubator, Heraeus
- Mikroskop: Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Göttingen)
- Neubauer Zählkammer
- ELISA-Reader: Synergy HT, BioTek
- Western-Blot-Set (Wet/Tank Blotting System), BioRad
- Gelelektrophorese-Set, BioRad
- Filmkassette 18x24 cm, Dr. Goos Suprema
- MultiMACS M96thermo Separator, Miltenyi Biotec
- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Biorad



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivieren von RGC-5- und 661W-Zellen

Die Zellen wurden zunächst in Zellkulturflaschen mit Dulbecco`s Modified Eagle Medium, versetzt mit Penicillin/Streptomycin, fötalem Kälberserum und L-Glutamin (s. Kapitel 2.1.1) im Zellkulturschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Nach einmaligem Waschen mit 20 ml PBS und Absaugen des Puffers wurden die adhärenen Zellen durch 1 ml Trypsin und durch vorsichtiges Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Ob sich die Zellen vollständig gelöst hatten, wurde am Mikroskop kontrolliert. Schließlich wurden die Zellen mit 19 ml frischem Medium resuspendiert.

Mithilfe einer Neubauerzählkammer ließ sich die Konzentration der Zellen bestimmen, sodass anschließend je nach Zelldichte mit zusätzlichem Medium verdünnt und die gewünschte Zellkonzentration für die Aussaat erreicht werden konnte:

- 6-Well-Platte: 2 ml/Well,  $8,75 \times 10^4$  Zellen/ml,  $1,75 \times 10^5$  Zellen/Well
- 24-Well-Platte: 500 µl/Well,  $1,2 \times 10^5$  Zellen/ml,  $6 \times 10^4$  Zellen/Well
- 96-Well-Platte: 100 µl/Well,  $1 \times 10^5$  Zellen/ml,  $1 \times 10^4$  Zellen/Well

### 2.2.2 Die Behandlung mit Trichostatin A und Staurosporin

Nachdem die Zellen für die verschiedenen Versuche entsprechend ausgesät waren, erfolgte die Behandlung mit TSA basierend auf den Publikationen von Schwechter und Wood [39, 78].

Getestet wurden fünf unterschiedliche Inkubationszeiten mit Trichostatin A immer in 24stündigem Abstand, also nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden. Dabei wurden für jeden Zeitraum vier verschiedene Konzentrationen TSA untersucht, nämlich 40 nM, 150 nM, 500 nM, 2000 nM, einschließlich einer Kontrolle ohne die Zugabe von TSA.

**Tabelle II: Verwendete Differenzierungsprotokolle**

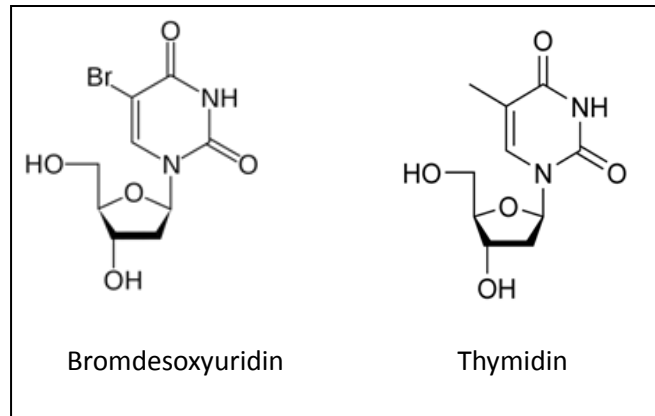
<i>Schwechter et al. 2007</i>	<i>Wood et al. 2010</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Aussaat der Zellen in Medium mit 5 % FKS</li><li>- Inkubation für vier Stunden im Zellkulturschrank</li><li>- Zugabe von 5 bis 10 µl TSA-Lösung (je nach Well-Größe), sodass die gewünschte Endkonzentration resultierte</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aussaat der Zellen in Medium mit 10 % FKS</li><li>- nach sechsstündiger Inkubation im Zellkulturschrank Wechsel zu Medium ohne FKS</li><li>- Inkubation für 24 Stunden im Zellkulturschrank</li><li>- Mediumwechsel zu frischem Medium mit 0,1 % FKS und der gewünschten TSA-Konzentration</li></ul>

Die Differenzierung der RGC-5-Zelllinie mittels Staurosporin (STS) erfolgte analog dem Schwechter-Protokoll für TSA. Nach Aussaat der Zellen und vierstündiger Wartezeit, in der sich die Zellen am Boden absetzen und anwachsen konnten, wurde Staurosporin verdünnt in Medium mit 5 % FKS direkt den einzelnen Wells zugeführt, sodass eine Endkonzentration von 300 nM Staurosporin resultierte. Hier wurde ebenfalls eine Kontrolle ohne Staurosporin belassen. Es folgte die Inkubation für 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden.

### **2.2.3 BrdU-Assay**

Bei diesem Test handelt es sich um eine labordiagnostische Methode zur Markierung proliferativer Zellen mittels Enzymimmunoassay.

Strukturchemisch betrachtet besteht Bromdesoxyuridin (BrdU) aus der Nukleinbase 5-Bromuracil, die über eine glykosidische Bindung mit der Pentose Desoxyribose verbunden ist. Damit ist es ein Analogon des Nukleosids Thymidin. BrdU kann von Zellen aufgenommen und in phosphorylierter Form während des Zellzyklus anstelle des Desoxythymidintriphosphat bei der Neusynthese der DNA verwendet werden.



**Abbildung 2: Strukturformeln von Bromdesoxyuridin und Thymidin**

Mittels spezifischer Antikörper gegen BrdU kann nach Denaturierung der DNA die erfolgte Replikation immunhistochemisch nachgewiesen werden [105]. Hierfür wird mit einem spezifischen Erstantikörper gegen BrdU inkubiert um dann mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper und Zugabe des entsprechenden Peroxidase-Substrats eine Farbreaktion zu erzeugen. Somit ist eine quantitative Bestimmung der Zellproliferation durch Photometrie möglich.

Im Folgenden wurde der BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Millipore, USA) zur Quantifizierung der Proliferation eingesetzt. Zur Durchführung des BrdU-Assays wurden die Zellen in 96-Well-Platten mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml zu je 100  $\mu$ l/Well ausgesät (entspricht  $1 \times 10^4$  Zellen/Well). Nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit wurde TSA in den vier unterschiedlichen Konzentrationen 40, 150, 500 und 2000 nM zugegeben. Für jeden Zeitpunkt (24, 48, 72, 96, 120 Stunden) wurde eine Kontrolle (nur Medium ohne TSA) und ein Background (gleiche Konzentrationen TSA aber ohne BrdU) festgelegt. Pro Zeitpunkt und Konzentration wurde der Assay sechsfach durchgeführt (n=6).

Immer 24 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit mit TSA erfolgte die Zugabe von 20  $\mu$ l BrdU pro Well (1:2000 mit Medium verdünnt), damit jede Platte genau 24 Stunden Inkubationszeit mit BrdU ausgesetzt war. Nach Ablauf der Inkubationszeit (im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit) und vorsichtigem Abklopfen des Mediums wurden die Zellen durch 200  $\mu$ l/Well der *Fixative/Denaturing Solution* fixiert. Nach 30minütiger

Inkubation bei Raumtemperatur und Entfernen der Lösung wurden 100 µl/Well des Anti-BrdU-Antikörpers dazu pipettiert um dann erneut eine Stunde bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe von Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG, dem Zweitantikörper, mit je 100 µl/Well. Nach einer weiteren halben Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen, dann vollständig mit H<sub>2</sub>O „geflutet“ und auf Papiertüchern abgeklopft. Nach Zugabe von 100 µl/Well der *Substrate Solution* und 30 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur konnten 100 µl/Well der *Stop Solution* zugegeben werden.

Anschließend wurde die Absorption bei 450 und 595 nm photometrisch am ELISA-Reader bestimmt. Aus den Werten mehrfacher Messungen zu einem Zeitpunkt und bei einer Konzentration (n=6) wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Kontrolle wurde als 1 definiert und die anderen Mittelwerte behandelten Zellen entsprechend dazu in Bezug gesetzt.

#### 2.2.4 MTS-Assay

Ziel des MTS-Assay ist es, die lebenden Zellen einer Kultur quantitativ zu erfassen bzw. dadurch indirekt den zytotoxischen Effekt einer Substanz durch den Verlust der Anzahl vitaler Zellen greifbar zu machen. Das Prinzip dieser kolorimetrischen Methode beruht auf der Umsetzung des Substrats MTS in stoffwechselaktiven Zellen [105]. Zur Versuchsdurchführung wurde hier ein Versuchs-Kit (The CellTiter 96® AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) verwendet.

Die im Versuchs-Kit enthaltene Reagenz beinhaltet u.a. das gelbe, wasserlösliche Salz 3-(4,5-Dimethyl-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-Tetrazol, kurz MTS, und den Elektronenakzeptor Phenazinethosulfat (PES). PES wird in den Zellen durch die Reduktionsäquivalente NADH oder NADPH reduziert und führt anschließend außerhalb der Zelle zur Reduktion von MTS. Wird dieses reduziert, entsteht das intensiv blau-violette Formazan mit einem Absorptionsmaximum bei 490 nm. Dieser Vorgang ist an mitochondriale und zytosolische Dehydrogenasen gebunden und prinzipiell

möglich, wenn Reduktionsäquivalente vorhanden sind, also bei intakter Atmungskette. Da dies nur in vitalen Zellen der Fall ist, ist die Menge des entstandenen Formazan, also der photometrisch bestimmte Farbumschlag, proportional zur Menge lebender Zellen. MTS wird unabhängig davon, ob die entsprechenden Zellen mitotisch aktiv sind, umgesetzt [105].

Um den MTS-Test durchzuführen, wurden die Zellen in 96-Well-Platten kultiviert. Dazu wurden je 100  $\mu\text{l}$ /Well mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml pipettiert. Es erfolgte die Zugabe der vier üblichen TSA-Konzentrationen bzw. von 300 nM STS und die Festlegung einer Kontrolle (nur Medium ohne TSA oder STS) jeweils in 6facher Ausführung ( $n = 6$ ). Die Platten wurden über die gewünschte Zeit bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Anschließend wurden nach 24, 48, 72, 96 bzw. 120 Stunden je 20  $\mu\text{l}$ /Well der MTS-Reagenz direkt zum Medium dazu gegeben und die Platten für 90 Minuten im Zellkulturschrank inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Absorption bei 490 und 690 nm im ELISA-Reader. Aus den Werten mehrfacher Messungen zu einem Zeitpunkt und bei einer Konzentration ( $n=6$ ) wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Kontrolle wurde als 1 definiert und alle anderen Mittelwerte der mit TSA bzw. STS inkubierten Zellen entsprechend dazu in Bezug gesetzt, sodass ein übergreifender Vergleich möglich war.

Um die Platten anschließend für den Kristallviolett-Test zu konservieren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 4%igem Paraformaldehyd (PfA) in PBS fixiert und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Alternativ konnte auch nach fünfzehnminütiger Inkubation mit PfA und anschließendem Waschen mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  direkt mit der Kristallviolettffärbung fortgefahren werden.

### **2.2.5 Kristallviolettffärbung**

Hierbei geht es um die Bestimmung der Zahl der vorhandenen Zellen. Der Kristallviolettffärbung eignet sich zur Bestimmung der Zellzahl bei adhärent wachsenden Zellen, da bei diesen Kulturen die toten Zellen die Fähigkeit der

Adhärenz einbüßen, sich vom Plattenboden lösen und ausgewaschen werden. Es werden alle in der Platte befindlichen Zellen unspezifisch angefärbt und das Ausmaß der Färbung wird nach Lyse der Zellen photometrisch bestimmt [106, 107].

Die Kristallviolett-Färbung wurde im Anschluss an den MTS-Assay durchgeführt. Dazu wurden zunächst die mit 4%igem Paraformaldehyd fixierten Zellen einmal mit 200 µl/Well destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wurde die Kristallviolett-Lösung zur Färbung der Zellen mit je 100 µl/Well zugegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal mit 200 µl destilliertem Wasser pro Well gespült, um den überschüssigen Farbstoff auszuwaschen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe von 1%igem Sodiumdodecylsulfat (SDS) lysiert (eine Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur) um den Farbstoff freizusetzen. Es folgte die Messung der Absorption bei 595 nm am ELISA-Reader. Aus den Werten mehrfacher Messungen zu einem Zeitpunkt und bei einer Konzentration (n=6) wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Kontrolle wurde als 100 % definiert und alle anderen Mittelwerte der mit TSA bzw. STS inkubierten Zellen entsprechend dazu in Bezug gesetzt.

### **2.2.6 Caspase-3/7-Assay**

Beim programmierten Zelltod spielen spezifische Cystein-Aspartat-Proteasen, sog. Caspasen, die wichtigste Rolle. Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg der Apoptose mündet in der Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, die die zelluläre Degradation in Gang setzen (s. Kapitel 1.5.2). Der Nachweis der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 geschah unter Zuhilfenahme des Caspase-Glo® 3/7 Assay-Kit (Promega, Madison, USA), dessen Reagenz die Zellen lysiert und optimale Bedingungen für Caspase- und Luziferase-Aktivität schafft.

Hauptbestandteil ist ein Substrat, das die DEVD-Sequenz enthält. Darunter versteht man ein Tetrapeptid mit der Aminosäuresequenz Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure. Diese Sequenz kommt innerhalb des

DNA-Reparaturenzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1 vor und wird während eine Zelle Apoptose unterläuft durch die Caspase-3 gespalten. Durch die Spaltung des in dem Reagenz enthaltenen Substrats wird Aminoluziferin freigesetzt, das wiederum durch die ebenfalls enthaltene Luziferase umgesetzt wird. Dabei entsteht Licht. Die Stärke der Biolumineszenz korreliert mit der Anzahl der aktiven Caspasen und damit mit dem Ausmaß der Apoptose.

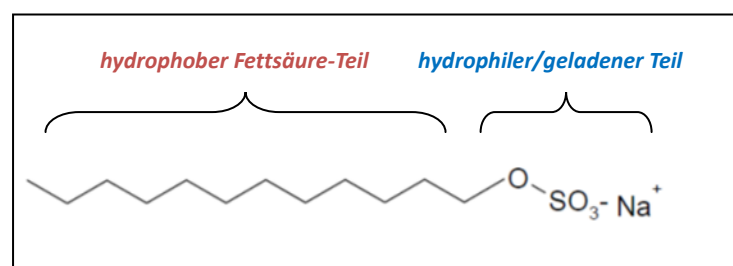
Für die Durchführung des Versuches wurden die Zellen in 96-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Well ausgesät. Pro Konzentration TSA sollten je sechs Wells (n=6) für die Caspase-Reaktion zur Verfügung stehen. Zusätzlich wurden sechs Wells nur mit Medium gefüllt, um später den sog. Blank-Wert der Caspase-Reagenz messen zu können. Die Zellen wurden zu den üblichen Konditionen mit TSA bzw. STS inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten mit wurden 100  $\mu$ l/Well der Caspase-Glo Reagent direkt in die Platten pipettiert, um dann bei Raumtemperatur für eine Stunde abgedunkelt zu inkubieren. So konnte anschließend die Lumineszenz bei verschiedenen Sensitivitäten (100, 125, 150, 175, 200) am ELISA-Reader gemessen werden. Die Auswertung erfolgte mit den Messwerten der Intensität, die alle Proben vollständig erfasste. Die Werte mehrfacher Messungen zu einem Zeitpunkt und bei einer Konzentration wurden gemittelt und verglichen. Die Kontrolle wurde als 1 definiert und alle anderen Mittelwerte der mit TSA bzw. STS inkubierten Zellen entsprechend dazu in Bezug gesetzt.

### **2.2.7 SDS-PAGE und Western Blot**

Mithilfe der Gelelektrophorese ist es möglich Proteine aus einem Gemisch nach bestimmten Kriterien aufzutrennen, sodass man anschließend einzelne Proteine nachweisen und auch semi-quantitativ erfassen kann. Da Proteine geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld, wobei die Art der Wanderung durch ihre Größe, Gestalt und Nettoladung bestimmt wird.

Ziel der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es, Proteine unabhängig von ihrer Ladung und dreidimensionalen Struktur nur nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen. Wie bei der gewöhnlichen

Gelelektrophorese wird ein Polyacrylamidgel von den Proteinen durchwandert, wobei diese abhängig von ihrer Größe früher (große Proteine) oder später (kleine Proteine) in den Maschen des Gels „hängen bleiben“. Treibende Kraft ist auch hier ein elektrisches Feld. Hier wird den Proteinproben nun zusätzlich Natriumdodecylsulfat (SDS) beigemischt. SDS ist als Sulfatester des Dodekanols ein stark negativ geladenes Detergens. Es lagert sich mit seinem hydrophoben Anteil an die Proteine an und überdeckt so deren Eigenladung. Im Durchschnitt bindet dabei ein SDS-Molekül pro 1,5 bis 2 Peptidbindungen, sodass die Ladung alle Proteine gleich ist. Zusätzlich stoßen sich die vielen negativen Ladungen ab, sodass sich die durch Kochen denaturierten Proteine linear ausrichten, also ihre dreidimensionale Struktur gänzlich verlieren. Zusätzlich wird oft ein reduzierender Stoff wie Mercaptoethanol, der Disulfidbindungen spaltet, in die Gelelektrophorese integriert. So werden auch durch Disulfidbrücken stabilisierte Konformationen in Proteinen zerstört und Proteinkomplexe aufgelöst. Damit ist gewährleistet, dass die Proteine alle zur Anode wandern und einzig nach ihrer Kettenlänge bzw. Molekülmasse aufgetrennt werden. Proteine mit geringer Molekülmasse kommen dabei nach Abschluss der Gelelektrophorese der positiven Elektrode am nächsten zu liegen [67].



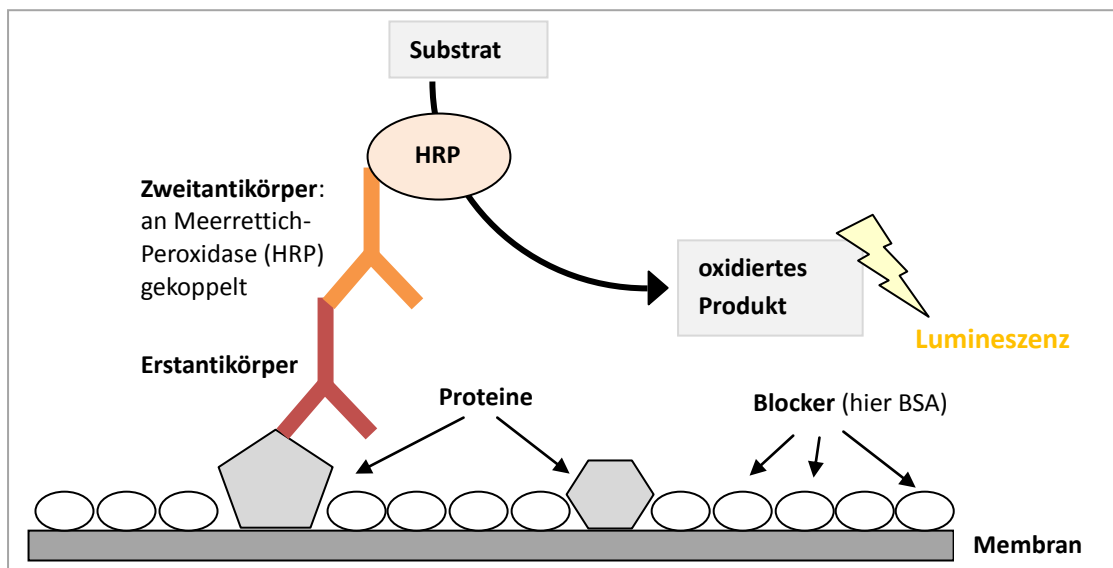
**Abbildung 3: Strukturformel des Natriumdodecylsulfat (SDS)**

Nach der Gelelektrophorese können die einzelnen Proteinbanden durch das Western-Blot-Verfahren auf eine Trägermembran übertragen werden. Dazu werden die Proteine vom Polyacrylamidgel mittels Elektrotransfer beispielsweise auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, d.h. es wird senkrecht zur ehemaligen Laufrichtung der Proteine eine Spannung angelegt, sodass die Proteine aus dem Gel zur Membran wandern. Auf der



Nitrozellulosemembran bleiben die Proteine durch ionische und polare Wechselwirkungen haften. Das gelelektrophoretische Auftrennungsmuster bleibt dabei erhalten. Ein derartiger „Abklatsch“ kann mit spezifischen Antikörpern inkubiert werden, wodurch die gezielte Identifikation bestimmter Proteine möglich ist.

So können bestimmte Proteine beispielsweise mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden. Dazu muss das gesuchte Protein mit einem spezifischen Erstantikörper detektiert werden. Ein an einen Zweitantikörper gekoppeltes Enzym ist in der Lage, durch Umsetzen eines Substrats Licht zu erzeugen, sodass die lumineszierende Bande auf einen Film übertragen und dort festgehalten werden kann [67] (s. Abbildung 4).



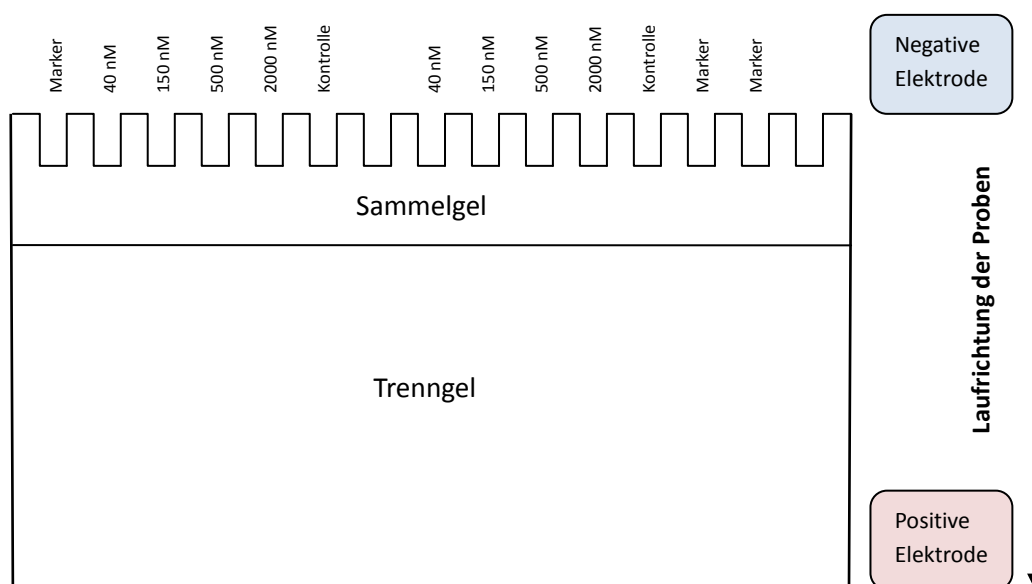
**Abbildung 4: Das Prinzip der Proteindetektion mittels Western Blot**

Nach Übertragung der Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran können bestimmte Proteine durch spezifische Erstantikörper markiert werden. Mithilfe eines enzymgekoppelten Zweitantikörpers kann anschließend lokal eine Chemolumineszenz erzeugt werden, sodass die Banden auf Röntgenfilme transferiert und sichtbar gemacht werden können. Modifiziert nach *Fluorescent Western Detection*, Produktbeschreibung der Firma Advansta [158].

Hier sollte die SDS-PAGE bzw. das Western-Blot-Verfahren dazu genutzt werden, das Vorhandensein von bestimmten Markern auf Proteinebene zu den verschiedenen Zeitpunkten bei den behandelten RGC-5-Zellen zu erfassen.

Dazu wurden die Zellen in 6-Well-Platten kultiviert, wobei je vier Well pro Zeitpunkt und Konzentration TSA angesetzt wurden (n=4). Nach Inkubation mit TSA zu den üblichen Konditionen erfolgte die Isolierung der Proteine. Dies geschah nach Entfernung des Mediums und Waschen mit PBS durch den Einsatz von 100  $\mu$ l *Cell Extraction Buffer* (Invitrogen, Germany) pro Well. So konnten die Zellen mittels *Cell Scraper* gelöst und in Eppendorf-Gefäße überführt werden, um dann Lysat und Zellen durch Zentrifugation über 20 Minuten bei 13.000 rpm und Abpipettieren des Überstandes zu trennen. Danach wurden die Proben bis zum weiteren Gebrauch bei - 20 °C eingefroren.

Das Lysat wurde anschließend auf seinen Proteingehalt getestet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte via BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce, Germany). Ziel war es, gleiche Mengen von genau 10  $\mu$ g Protein in jede Geltasche zu pipettieren. Je nach Proteingehalt wurden die Proben mit PBS auf eine Konzentration von 10  $\mu$ g/12  $\mu$ l verdünnt. Nach Zugabe von je 3  $\mu$ l *Sample Buffer* pro Probe ergab sich damit ein Volumen von 15  $\mu$ l je Tasche. Durch Kochen bei 95 °C für fünf Minuten wurden die Proteine denaturiert.



**Abbildung 5: Schema der Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die verwendeten Gele für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestanden aus einem Sammelgel und einem dichteren Trenngel, welches der Auftrennung der Proteine nach Molekülmasse diente. Jedes Gel wurde mit 15 Taschen gegossen. So war es möglich mit einem Gel für jeden Zeitpunkt und jede Konzentration TSA zwei Proben zu analysieren.

Für jeden Zeitpunkt wurden je zwei 1,5 mm dicke 12 % SDS-Gele à 15 Taschen benötigt, damit insgesamt für Marker sowie eine Vierfachkontrolle (n=4) für jeden untersuchten Zeitpunkt Platz war. Ein Gel bestand immer aus Trenn- und Sammelgel. Zunächst wurde das dichte Trenngel hergestellt und nach dessen Auspolymerisieren das weniger dichte Sammelgel oben drauf gegossen und mit einem Kamm für die Taschen versehen.

Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 Volt durchgeführt, bis sich die Banden des Marker nach ungefähr einer Stunde klar über das Gel aufgetrennt hatten. Für den Elektrotransfer der Proteinbanden auf die Nitrozellulosemembran wurde eine Stunde bei 300 mA im Rahmen eines nassen Transfers (Wet/Tank Blotting System, BioRad) „geblottet“. Im Folgenden konnte mit dem Wissen um die Molekülmasse der gesuchten Proteine und anhand der sichtbaren Markerbanden die Membran so zugeschnitten werden, dass sich der Teil mit der  $\beta$ -Actin-Bande getrennt von den anderen Banden (Bax, Bcl-2, Caspase,  $\beta$ -III-Tubulin) mit den entsprechenden Antikörpern inkubieren ließ. Dann wurde zunächst mit 5%igem bovinen Serumalbumin in TBST geblockt, um freie Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen zu überdecken, die nicht von Antikörpern erkannt werden können. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper bei 4 °C.

**Tabelle III: Ziele der spezifischen Primärantikörper beim Western Blot**

<b><math>\beta</math>-Actin</b>	Bezugsgröße zum Normalisieren, Haushaltsgen	45 kDa
<b>Caspase-3 &amp; Gespaltene Caspase-3</b>	Die Caspase-3 liegt in ihrer inaktiven Form als Procaspase-3 mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa vor. In apoptotischen Zellen wird dieses Protein in zwei Fragmente gespalten (gespaltene Caspase-3)	35 kDa 19 kDa 17 kDa
<b>Bax</b>	proapoptotisches Protein der Bcl-Familie	20 kDa
<b>Bcl-2</b>	antiapoptotisches Protein der Bcl-Familie	28 kDa
<b><math>\beta</math>-III-Tubulin</b>	Bestandteil der Mikrotubuli und spezifisch für Neurone. Wird nicht von Gliazellen exprimiert, sodass es der Unterscheidung von Gliazellen und Neuronen dient. Ganglienzell-spezifisch.	55 kDa

Verwendet wurden Erstantikörper gegen Caspase-3, Bcl-2, Bax und  $\beta$ -III-Tubulin sowie jeweils gegen  $\beta$ -Actin (Verdünnung von 1:1000). Das  $\beta$ -Actin

wurde nachgewiesen, um später auf eine gemeinsame Bezugsgröße normalisieren zu können. Es wird als so genanntes Haushaltsgen bezeichnet, bei dem zuvor überprüft wurde, dass es konstitutiv exprimiert wird. Am Folgetag erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBST die einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper: Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Conjugate, Verdünnung 1:10.000.

Zur Visualisierung der Banden wurde das *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific) genutzt. Das Luminol-basierte Substrat eignet sich zur Detektion der Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), die mit dem Zweitantikörper konjugiert war. Die HRP katalysiert eine Vielzahl von Reaktionen, weswegen sie gerne als Markerenzym eingesetzt wird. Hier vermittelte sie die Chemolumineszenzreaktion des Luminols. Durch Zugabe der Lösung entstand dort, wo ein Zweitantikörper gebunden hatte, ein lumineszierender Farbstoff.

Die Nitrocellulosemembran wurde für zwei Minuten mit *Detection Reagent* inkubiert. Die so behandelte Membran wurde anschließend in einer Filmkassette platziert und bei unterschiedlichen Belichtungszeiten wurden die gewünschten Banden in der Dunkelkammer auf Röntgenfilm übertragen.

Die Banden der einzelnen Marker konnten aufgrund ihres bekannten Molekulargewichts anhand der Marker-Bande identifiziert werden. Um die Ergebnisse nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ zu erfassen, wurde unter Zuhilfenahme der Bildbearbeitungssoftware ImageJ die Intensität der Banden erfasst. Alle untersuchten Marker wurden auf das Haushaltspotein  $\beta$ -Actin normalisiert, um die Basis für einen Vergleich zu schaffen. Aus den jeweils vier Proben zu einer Konzentration für einen Zeitpunkt ( $n=4$ ) konnten anschließend Mittelwert und Standardabweichung errechnet werden. Die wurde Kontrolle als 100 % definiert und alle anderen Werte dazu in Bezug gesetzt.

### **2.2.8 Phasenkontrastmikroskopie**

Zur Beurteilung der zellmorphologischen Veränderungen wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1,75 \times 10^5$  Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät. Mittels des Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Göttingen) wurden Phasenkontrastbilder bei 100facher Vergrößerung aufgenommen. Dabei wurden pro Konzentration und Inkubationszeitpunkt je vier Bilder aufgenommen ( $n=4$ ). Die Aufnahmen wurden anschließend rein qualitativ beurteilt und gegenübergestellt.

### **2.2.9 PI-Färbung**

Propidiumiodid ist ein stark basischer Nukleinsäureinterkalator und ein fluoreszierendes Molekül mit einem Emissionsmaximum bei 617 nm. Es kann die perforierte Zellmembran toter Zellen, nicht jedoch die intakte lebender Zellen überwinden, problemlos in den Zellkern eindringen und interagiert dann mit der DNA. Es markiert also tote Zellen, die anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie erkannt werden können [108].

Die Zellen wurden für die PI-Färbung in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1,75 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät. Pro Konzentration TSA wurden vier Wells ( $n=4$ ) vorgesehen. Es folgte die Zugabe von TSA in den gewohnten Konzentrationen unter Belassung einer Kontrolle ohne die Zugabe von TSA und die Inkubation über die üblichen Zeitpunkte.

Nun wurde 40  $\mu$ l Propidium-Iodid-Lösung pro Well hinzu pipettiert und die Platten für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden Fluoreszenz- und Phasenkontrastfotografien am Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Göttingen) bei 100facher Vergrößerung aufgenommen und qualitativ beurteilt.

### **2.2.10 Immunfluoreszenz**

Das Prinzip der Immunhistochemie ist es, bestimmte Strukturen, z.B. Proteine oder DNA, mithilfe von Farbstoff-gekoppelten Antikörpern sichtbar zu machen. Im Falle von fluoreszierenden Farbstoffen spricht man von Immunfluoreszenz.

Dies kann direkt, also mit einem spezifischen markierten Antikörper gegen eine bestimmte Struktur oder indirekt über einen spezifischen Erstantikörper und einen Farbstoff-gekoppelten Zweitantikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, erfolgen [109].

In diesem Fall wurde die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis bestimmter Ganglienzell- und neuronaler Marker verwendet. Außerdem wurde in jedem Fall zusätzlich eine Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt, um die Zellkerne sichtbar zu machen.

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich v.a. an die AT-reiche kleine Furche der DNA anlagert. Er wird deshalb gerne – wie auch hier – zur Kernfärbung gebraucht. DAPI emittiert im kurzwelligen (blauen) Bereich des Spektrums des sichtbaren Lichts (Emissionsmaximum bei 461 nm), weswegen gleichzeitig weitere Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise Alexa 488 mit langwelligeren Emissionsmaxima, verwendet werden können, ohne dass es zu Signalüberschneidungen kommt.

**Tabelle IV: Ziele der Primärantikörper in der Immunhistochemie**

<b>β-III-Tubulin</b>	β-Tubulin ist der Hauptbestandteil der Mikrotubuli. Die Isoform β-III-Tubulin ist spezifisch für Neurone. Die Expression von β-III-Tubulin ist vermutlich eines der frühesten Zeichen für eine neuronale Differenzierung.
<b>Tau</b>	Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das v.a. in Axonen von Neuronen vorkommt
<b>MAP-2</b>	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2, das der Stabilisierung der Mikrotubuli dient, indem es sie mit Intermediärfilamenten und anderen Mikrotubuli verbindet Bei Ratten/Mäusen: spezifisch für das Zytoskelett von Neuronen, wird in Dendriten zur Stabilisierung deren Struktur angereichert
<b>hNF</b>	humanes Neurofilament, Intermediärfilament, das spezifisch nur in Neuronen vorkommt

Es erfolgte die Aussaat der RGC-5-Zellen in 24-Well-Platten mit einer Dichte von  $6 \times 10^4$  Zellen/Well ( $1,2 \times 10^5$  Zellen/ml). Für jede Antikörperfärbung wurden pro Konzentration TSA zwei Wells ausgesät. Im Anschluss wurde bei den fünf

bekanntem Konzentrationen über die üblichen Zeiträume hinweg inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dann mit PBS dreimal für je fünf Minuten gewaschen. Durch Inkubation mit 0,1 % Triton-X wurden nun die Zellen permeabilisiert und dann mit 4%igem bovinem Serumalbumin für eine Stunde geblockt. Über Nacht wurde bei 4 °C mit dem Erstantikörper inkubiert.

**Tabelle V: Verdünnung der Erstantikörper (Immunhistochemie)**

<i><b>Antikörper</b></i>	<i><b>Herkunft</b></i>	<i><b>Verdünnung in 4 % BSA in PBS</b></i>
Brn3a	goat	1:250
β-III-Tubulin	mouse	1:100
Tau	mouse	1:100
MAP-2	rabbit	1:250
hNF	goat	1:100

Am nächsten Tag wurde der überschüssige Erstantikörper durch Absaugen und dreimaliges Waschen mit PBS für je fünf Minuten entfernt und es folgte die Inkubation mit dem korrespondierenden Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur.

**Tabelle VI: Verdünnung der Zweitantikörper (Immunhistochemie)**

<i><b>Zweitantikörper</b></i>	<i><b>Verdünnung in 4 % BSA in PBS</b></i>
Alexa 488 donky anti-mouse IgG	1:1000
Cy3 donky anti-goat	1:2000
Alexa 488 donky anti-rabbit IgG	1:1000

Nach Ablauf der Inkubationszeit und erneutem dreimaligem Waschen mit PBS konnten in jedes Well 500 µl DAPI-Reagenz (1µg/ml) zugegeben werden. Die DAPI-Reagenz wurde nach fünfminütiger Inkubationszeit abgezogen und die Platten zur mikroskopischen Betrachtung und zum Fotografieren mit PBS gefüllt, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen.

Von den so behandelten Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135) pro Zeitpunkt, Konzentration TSA und Antikörper vier Bilder (n=4) bei 200facher Vergrößerung aufgenommen – dabei jeweils eines für die DAPI-Kern-Färbung und ein korrespondierendes für die Antikörperfärbung. Für jede Färbung wurde immer auch eine Negativkontrolle betrachtet, bei der nur mit dem Zweit- aber ohne Erstantikörper inkubiert wurde. Auf diesem Wege wäre ein unspezifisches Bindeverhalten des sekundären Antikörpers ersichtlich gewesen.

### **2.2.11 cDNA-Synthese und quantitative Real-Time-PCR**

Die Mitte der 80er Jahre entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beschreibt ein Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren in vitro [110]. Ziel ist es, definierte DNA-Sequenzen mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) zu amplifizieren, um sie später beispielsweise mittels Southern Blot nachweisen zu können [111]. Auch RNA kann indirekt mittels PCR amplifiziert werden, nachdem sie in einem zusätzlich vorgeschalteten Schritt in cDNA umgeschrieben wurde [112]. Um eine PCR durchführen zu können, muss der Ansatz neben der zu untersuchenden Original-DNA-Sequenz, die Taq-Polymerase, für jeden DNA-Strang einen Primer, der den jeweiligen Beginn des Amplikons (in *Sense*- und *Antisense*-Richtung) markiert, sowie genügend DNA-Bausteine (Desoxyribonucleosidtriphosphate) enthalten. Es ist eine gepufferte Reaktionslösung, die auch das für die Polymerase essentielle Magnesium enthält, notwendig. Die Reaktion findet in einem Thermocycler statt, um für die einzelnen Reaktionsschritte die Temperatur optimal regeln zu können [111].

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) als Weiterentwicklung der einfachen PCR macht über Zusatz eines Fluoreszenzfarbstoffs zur Reaktionslösung zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen Nukleinsäuren möglich. Sie wird über eine Fluoreszenzmessung während eines PCR-Zyklus in Echtzeit durchgeführt [113]. Mit der Menge der amplifizierten Nukleinsäure-Produkte steigt auch die Fluoreszenz, sodass nach Ablauf mehrere Zyklen anhand von Fluoreszenzsignalen bzw. dem Signalanstieg in



der exponentiellen Phase (optimale Reaktionsbedingungen) direkt eine quantitative Aussage getroffen werden kann [114].

Für die qRT-PCR wurden die RGC-5-Zellen in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1,75 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät und zu den üblichen Konditionen mit TSA inkubiert. Im Anschluss an die TSA-Inkubation erfolgte das Lysieren der Zellen und die cDNA-Synthese mithilfe des MultiMACS cDNA Synthesis Kit (Miltenyi Biotec). Für bis zu  $10^7$  Zellen wurde 1 ml Lyse-Puffer pro Well zugegeben um die Zellen vom Plattenboden zu lösen und sie in ein Eppendorf-Gefäß überführen zu können. Die Proben wurden für drei Minuten mit dem Vortexmischer durchmischt und es wurde durch das mehrfache Aufziehen durch eine 25G-Kanüle Scherkräfte auf die DNA ausgeübt, um so die Viskosität des Lysats zu reduzieren. Schließlich wurden die Proben drei Minuten bei 6000 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in frische Eppendorf-Gefäße überführt und mit 30µl *Oligo(dT) MicroBeads* zur magnetischen Markierung der mRNA versetzt. Ein Multi-8 Filter wurde mit Lyse/Bindungs-Puffer befeuchtet, auf die entsprechende Säule positioniert und das Lysat auf den Filter gegeben. Es folgte das Waschen mit 2 x 200µl Lyse/Bindungs-Puffer und nach Entfernen des Filters das viermalige Waschen mit Wasch-Puffer und das zweimalige Waschen mit Äquilibrierungs/Wasch-Puffer. Auf diesem Wege, wurde die magnetisch markierte RNA in der Säule zurückgehalten. Anschließend wurde der Synthesemix angesetzt (Auflösen des Enzymmix in Resuspensions-Puffer) und es wurden je 20 µl davon auf die Säulen pipettiert. Die Synthese erfolgte bei 42°C über eine Stunde. Anschließend wurde zweimal mit Äquilibrierungs/Wasch-Puffer gewaschen und 20 µl *cDNA Release Solution* auf die Säule gegeben. Dann wurde das Programm erneut für 10 Minuten bei 42°C laufen gelassen. Im letzten Schritt wurde nach Zugabe von *cDNA Elution Buffer* eine 96-Well-Platte einsetzen und auf 70°C erhitzt. So konnte die gewonnene cDNA in die neu eingesetzte Platte überführt werden.

Nach Synthese der cDNA wurde die qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die spezifischen Primer für das Haushaltsgen L32, den Ganglienzellmarker Thy-1, den Gliazellmarker GFAP und für den Endothelwachstumsfaktor VEGF auf

1  $\mu\text{M}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. verdünnt (Primer-Stocklösung: 100  $\mu\text{M}$ ). Die cDNA wurde auf 1ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt. Für jedes Primerpaar wurde derselbe Reaktionsmix ange-setzt bestehend aus 1  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  mit 2  $\mu\text{l}$  Primer *for* und 2  $\mu\text{l}$  Primer *rev* sowie 10  $\mu\text{l}$  Mastermix (Biorad). Von diesem Reaktionsmix wurden 15  $\mu\text{l}$ /Well in eine 96-Well-Platte vorgelegt und 5  $\mu\text{l}$  cDNA pro Well dazu pipettiert. Nach Versiegeln der Platte mit selbstklebender Abdeckfolie wurde eine Minute zentrifugiert (5000 rpm). Dann konnte das Programm der qRT-PCR gestartet werden.

Die PCR lief über insgesamt 45 Zyklen nach folgendem Programm ab:

- Denaturierung über 15 Minuten bei 95°C: 1 Zyklus
- Amplifikation: 40 Zyklen
- *Annealing* bei 60°C für 30 Sekunden
- Schmelzkurve mit Hochheizen auf 95°C
- zwei Minuten konstant bei 60°C
- Hochheizen mit 0,1°C/Sekunde bis 95°C

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Biorad-Software (BioRadCFX Manager 2.0). Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression des Zielgens wurde nach dem Modell von Pfaffl [115] gearbeitet. Dabei bezieht man sich auf eine Kontrollprobe:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Cp}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Cp}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Die Effizienz der Primer wurde anhand einer cDNA-Verdünnungsreihe und anschließender qRT-PCR über eine Standardkurve ermittelt.

### 2.2.12 Statistische Analyse

Um die Ergebnisse aus den Assays und Western Blots statistisch zu überprüfen, folgte die Analyse mittels ANOVA und anschließender post Hoc Analyse mittels Tukey-Kramer- bzw. Dunnett-Test (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ )

mit der Statistiksoftware JMP (SAS). So konnte eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen (Tukey Kramer) und im Bezug zur Kontrolle (Dunnett) als zufällig oder signifikant unterschiedlich gewertet werden können. Dabei wurde von folgender gängiger Einteilung Gebrauch gemacht:  $p \leq 0,05$  = signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 %),  $p \leq 0,01$  = sehr signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 %),  $p \leq 0,001$  = höchst signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 ‰).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Systematik der Versuchsauswertung

Zunächst wurde die Frage, ob es sich bei RGC-5-Zellen und 661W-Zellen um dieselbe Zelllinie handelt oder Unterschiede bestehen, angegangen. Dazu wurden beide Zelllinien über 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden mit 500 nM TSA bzw. 300 nM STS, den als aktuell optimal geltenden Konzentrationen für die Differenzierung der RGC-5-Zellen [39, 77, 78], inkubiert. Anschließend wurde ihr Verhalten hinsichtlich Stoffwechselaktivität, Zellzahl und Apoptose sowie die Expression von bestimmten Markerproteinen wie  $\beta$ -III-Tubulin, Tau und MAP-2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle untersucht. In vielen Versuchen reagierten RGC-5- und 661W-Zellen ähnlich, unterschieden sich aber dennoch in einigen Punkten wesentlich, vor allem bei längeren Inkubationszeiten (s. Kapitel 3.2.8).

Mit der so gewonnenen Erkenntnis, dass sich die beiden Zelllinien zwar ähnlich sind aber sich nicht immer gleich verhalten, wurde versucht, die RGC-5-Zelllinie mithilfe zweier gängiger Differenzierungsprotokolle nach Schwechter *et al.* 2007 und Wood *et al.* 2010 über einen Zeitraum von fünf Tagen bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen TSA näher zu betrachten. Das Ziel war, herauszufinden, ob sich diese Zelllinie doch redifferenzieren lässt und damit für die Glaukomforschung weiter verwendbar bleibt.

### 3.2 RGC-5-Zellen vs. 661W-Zellen

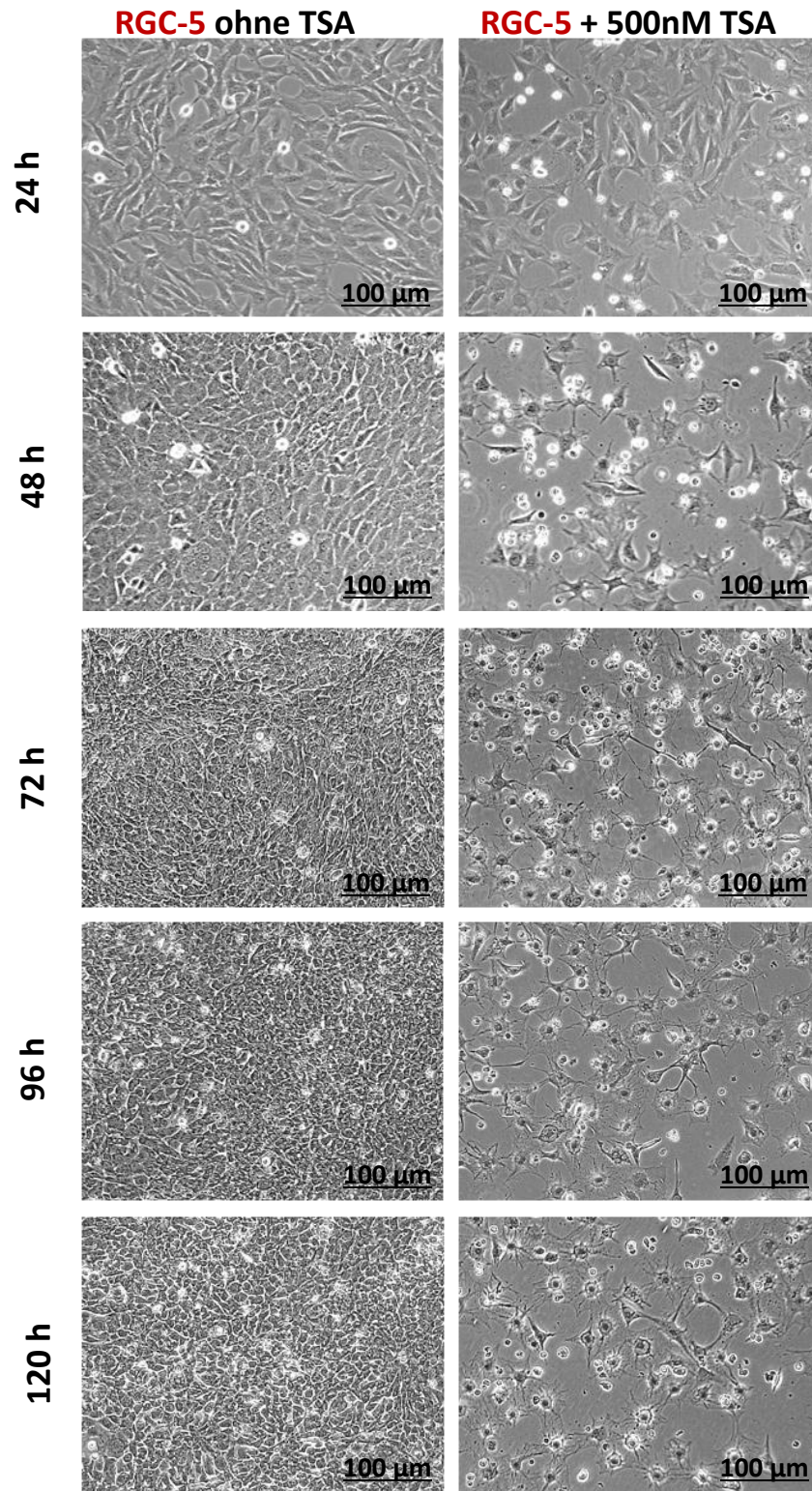
#### 3.2.1 Zellmorphologie (Phasenkontrastmikroskopie)

Unbehandelte RGC-5-Zellen wiesen einen eher länglichen, spindelförmigen Zellkörper auf wie es auch bei 661W-Zellen der Fall war. Bereits nach 48 Stunden hatten die Zellen allerdings so stark proliferiert, dass sie konfluieren und daher nicht mehr einzeln abgrenzbar und morphologisch zu beurteilen waren.

Bei Inkubation der RGC-5-Zellen mit 500 nM TSA nach dem Schwechter-Protokoll ließen sich bereits nach 24 Stunden solitär veränderte Zellen erkennen, deren Zellkörper runder erschien und die Neuriten ausbildeten. Diese Veränderungen hin zu einem eher neuronalen Phänotyp wurden mit zunehmender Inkubationszeit deutlicher und zeigten sich nach 96 und 120 Stunden besonders ausgeprägt. Ferner war eine deutliche Abnahme der Zellzahl unter TSA-Behandlung ersichtlich (s. Abbildung 6). 661W-Zellen reagierten ebenfalls mit morphologischen Veränderungen zu einem neuronalen Phänotyp unter längerfristiger Inkubation mit TSA, allerdings wesentlich schwächer. Die ausgebildeten Neuriten waren weniger und kürzer und insgesamt ließen sich offensichtlich weniger Zellen pro Gesichtsfeld differenzieren. Außerdem war der Zelluntergang unter Inkubation mit TSA so dominierend, dass bei Inkubation nach dem Schwechter-Protokoll über fünf Tage kaum lebende Zellen übrig waren (s. Abbildung 7).

Bei Differenzierung der RGC-5-Zellen nach Wood konnten zellmorphologische Veränderungen schlecht beurteilt werden, da die Zellen durch die 24stündige Vorbehandlung bereits so stark proliferierten, dass sie konfluieren. Es zeigte sich hier ein vermehrter Zelluntergang bei Kontrollzellen und auch bei TSA-behandelten RGC-5-Zellen nach 120 Stunden (s. Abbildung 8). Die Zellzahl der 661W-Zellen blieb bei Inkubation nach Wood bedingt durch die Vorbehandlung etwas höher als bei Inkubation nach Schwechter, knickte allerdings bei längeren Inkubationszeiten ebenfalls deutlich ein, sodass auch hier der Zelluntergang dominierte (s. Abbildungen 9).

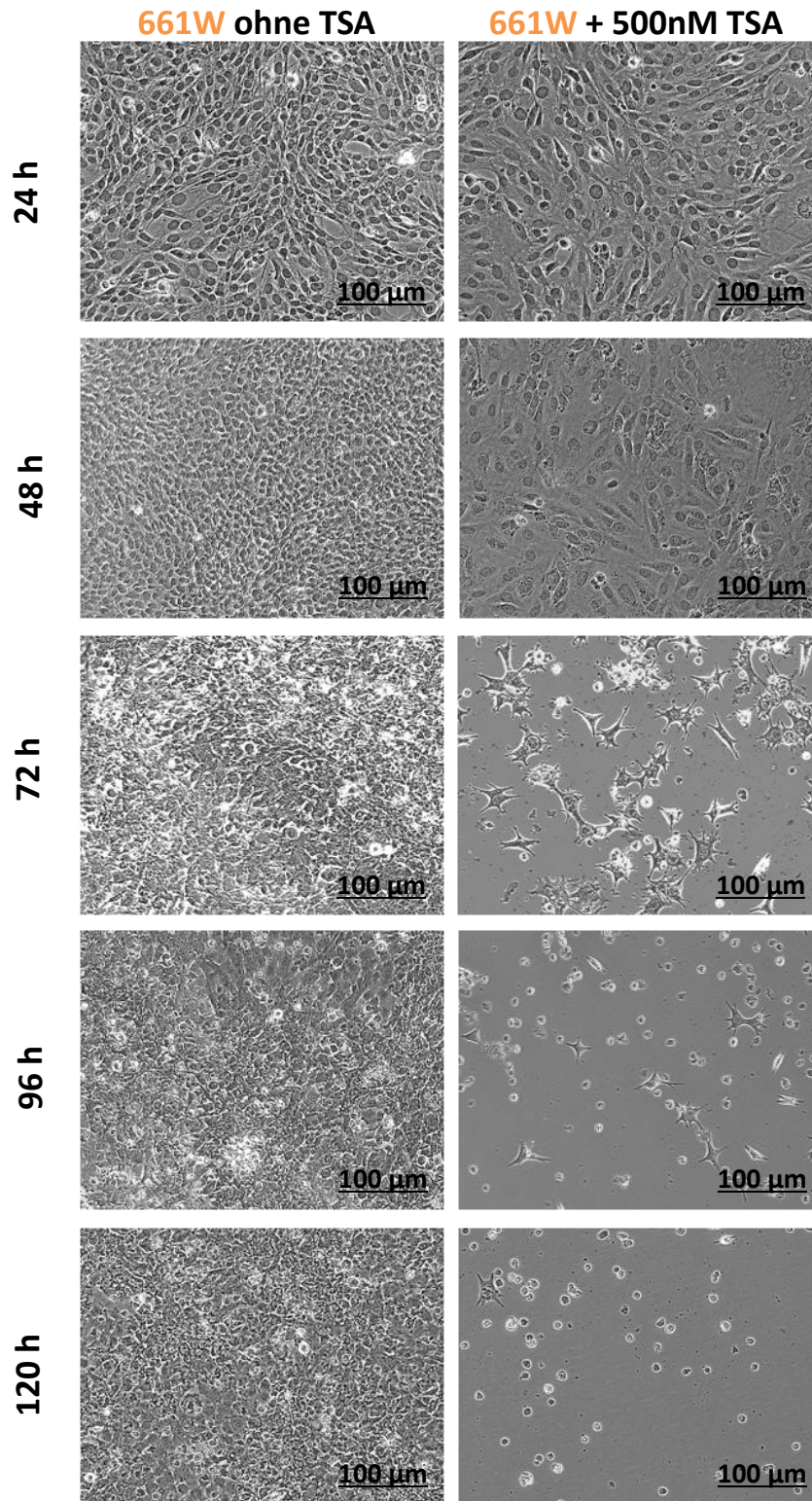
661W- und RGC-5-Zellen reagierten also tendenziell ähnlich auf Differenzierung mit TSA, unterscheiden sich aber v.a. nach längerfristiger Inkubation deutlich voneinander. Während RGC-5-Zellen eine vielversprechende neuronale Differenzierung nach vier bis fünf Tagen erkennen ließen, überwog bei 661W-Zellen zu diesen Zeitpunkten der Zelluntergang.



**Abbildung 6: Phasenkontrastmikroskopie bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter**

Gezeigt sind repräsentative Phasenkontrastbilder der Zellen bei 100facher Vergrößerung. Bei Behandlung der RGC-5-Zelllinie mit TSA nach Schwechter begann bereits nach 48 Stunden Inkubation eine deutliche Differenzierung hin zu einem neuronalen Phänotyp mit Entwicklung eines eher runden Zellkörpers und Ausbildung multipler, langer Neuriten. Besonders deutlich war diese Entwicklung nach 96 und 120 Stunden erkennbar.

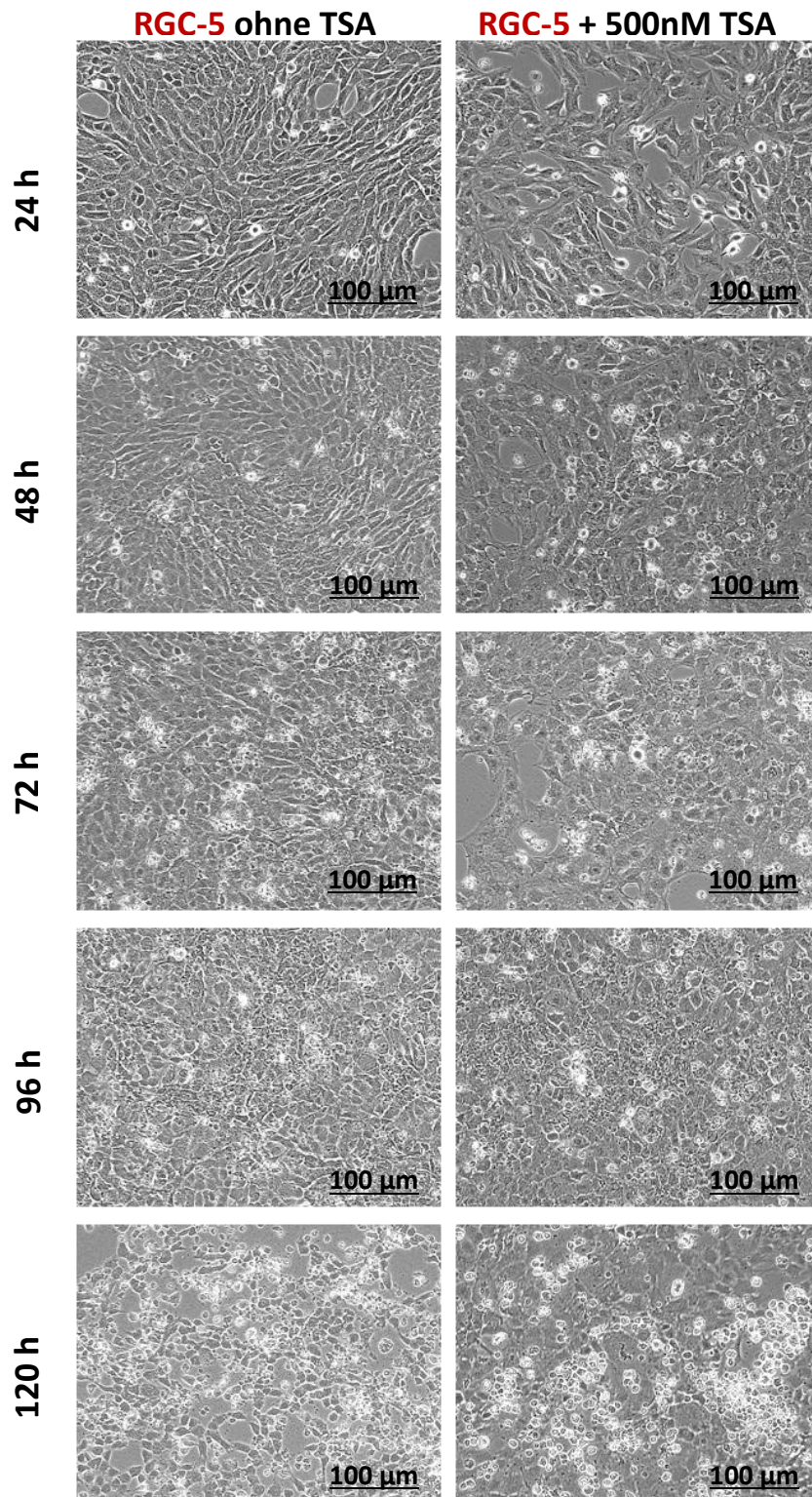




**Abbildung 7: Phasenkontrastmikroskopie bei 661W mit TSA nach Schwechter**

Gezeigt sind repräsentative Phasenkontrastaufnahmen der Zellen bei 100facher Vergrößerung. Bei Differenzierung der 661W-Zellen mit TSA nach Schwechter war anfänglich vereinzelt eine Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp erkennbar, allerdings überwog bei Inkubationszeiten über 72 Stunden der zytotoxische Effekt des TSA und es kam zu einem massivem Zelluntergang.

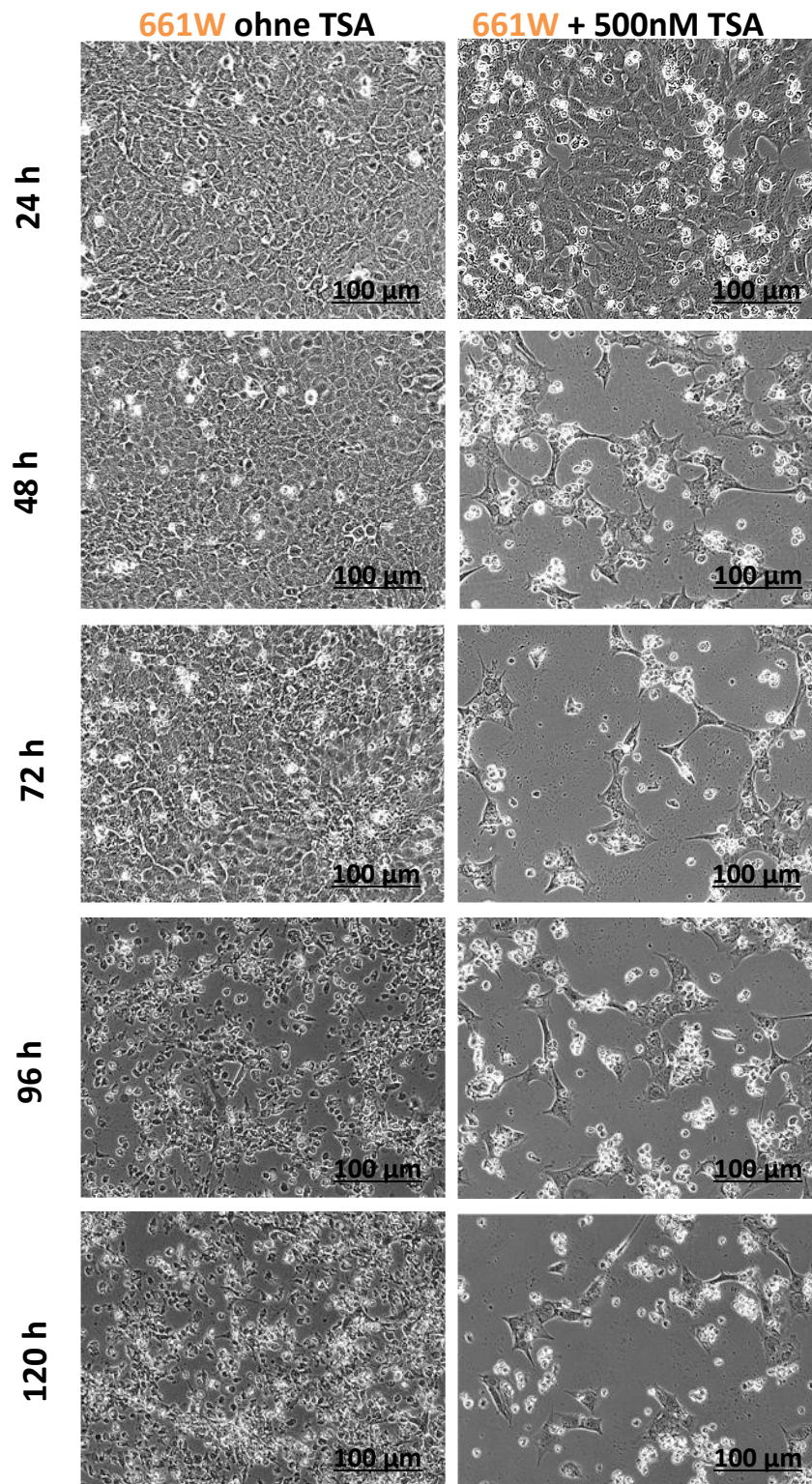




**Abbildung 8: Phasenkontrastmikroskopie bei RGC-5 mit TSA nach Wood**

Gezeigt sind repräsentative Phasenkontrastbilder der Zellen bei 100facher Vergrößerung. Wurden RGC-5-Zellen nach Wood mit TSA inkubiert, ließ sich aufgrund der starken Zellproliferation bedingt durch die eintägige Vorbehandlung kaum eine Aussage hinsichtlich der Zellmorphologie bei einzelnen Zellen machen. Insgesamt war aber eine neuronale Differenzierung erkennbar.





**Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskopie bei 661W mit TSA nach Wood**

Gezeigt sind repräsentative Phasenkontrastaufnahmen der Zellen bei 100facher Vergrößerung. Bei Inkubation der 661W-Zellen mit TSA nach Wood ließ sich nach 48 Stunden eine leichte Formveränderung im Sinne von Neuritenwachstum erkennen, die allerdings nicht zeitabhängig zunahm. Ferner erkannte man das eindeutige Zugrundegehen der Zellen unter TSA-Inkubation.

### 3.2.2 Expression von Thy-1, VEGF und GFAP (qRT-PCR)

Die Inkubation mit 500 nM TSA nach Schwechter über 120 Stunden zog bei beiden Zelllinien keinerlei Veränderungen hinsichtlich der Expression von Thy-1 nach sich. Durch 120stündige Differenzierung mit 500 nM TSA nach Wood verdoppelte sich allerdings die Thy-1-mRNA-Expression bei RGC-5-Zellen gegenüber der Kontrolle ( $p=0,0028$ ). Bei 661W-Zellen unterschied sich die Thy-1-Expression im Rahmen beider Protokolle nicht signifikant von der der Kontrollzellen (s. Abbildung 10). Die CT-Werte der qRT-PCR zeigten, dass der Ganglienzellmarker Thy-1 im Rahmen beider Differenzierungsprotokolle bei RGC-5-Zellen viel früher detektierbar war als bei 661W-Zellen (bei RGC-5-Zellen durchschnittlich bei CT-Werten von 30, bei 661W-Zellen bei CT-Werten von 35). Die relative VEGF-mRNA-Expression wurde durch Inkubation mit 500 nM nicht beeinflusst und der Gliazellmarker GFAP war bei RGC-5- und 661W-Zellen im Rahmen beider Protokolle negativ (Daten nicht gezeigt).

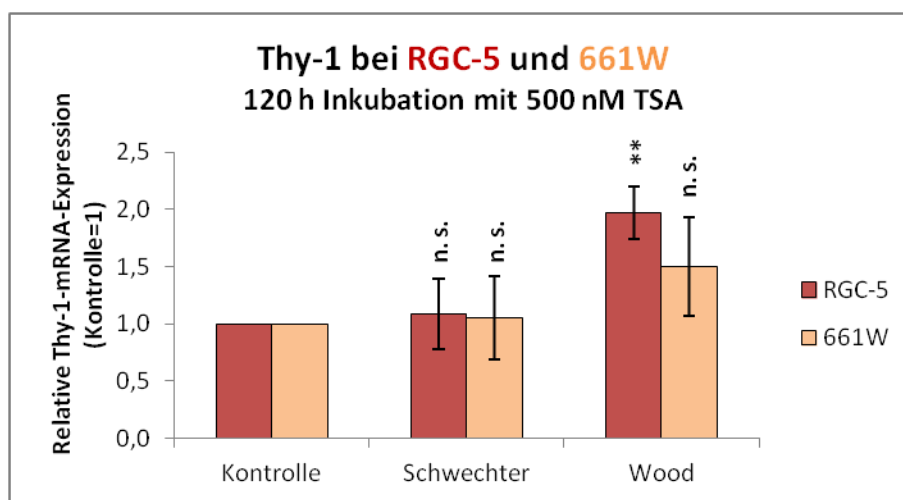


Abbildung 10: Relative mRNA-Expression von Thy-1 bei RGC-5 und 661W

Die Grafik zeigt die relative Expressionserhöhung bzw. -erniedrigung der Thy-1-mRNA bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle nach 120stündiger Inkubation mit 500 nM TSA im Rahmen beider Differenzierungsprotokolle. Mit Hilfe der Formel nach Pfaffl et al. 2001 ( $\Delta\Delta$  CT-Formel) wurden die CT-Werte des Markers in Relation zur Kontrolle gesetzt wobei als interner Standard das Haushaltsgen L32 diente. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben mit \*\* =  $p \leq 0,01$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Während sich bei Inkubation nach Schwechter keine Expressionserhöhung gegenüber der Kontrolle zeigte, stieg bei Behandlung nach Wood bei RGC-5-Zellen die Thy-1-Expression nach 120 Stunden signifikant um den Faktor 2 an ( $p=0,0028$ ). Bei 661W-Zellen war die relative Thy-1-mRNA-Expression nie signifikant erhöht.

### 3.2.3 $\beta$ -III-Tubulin-Expression

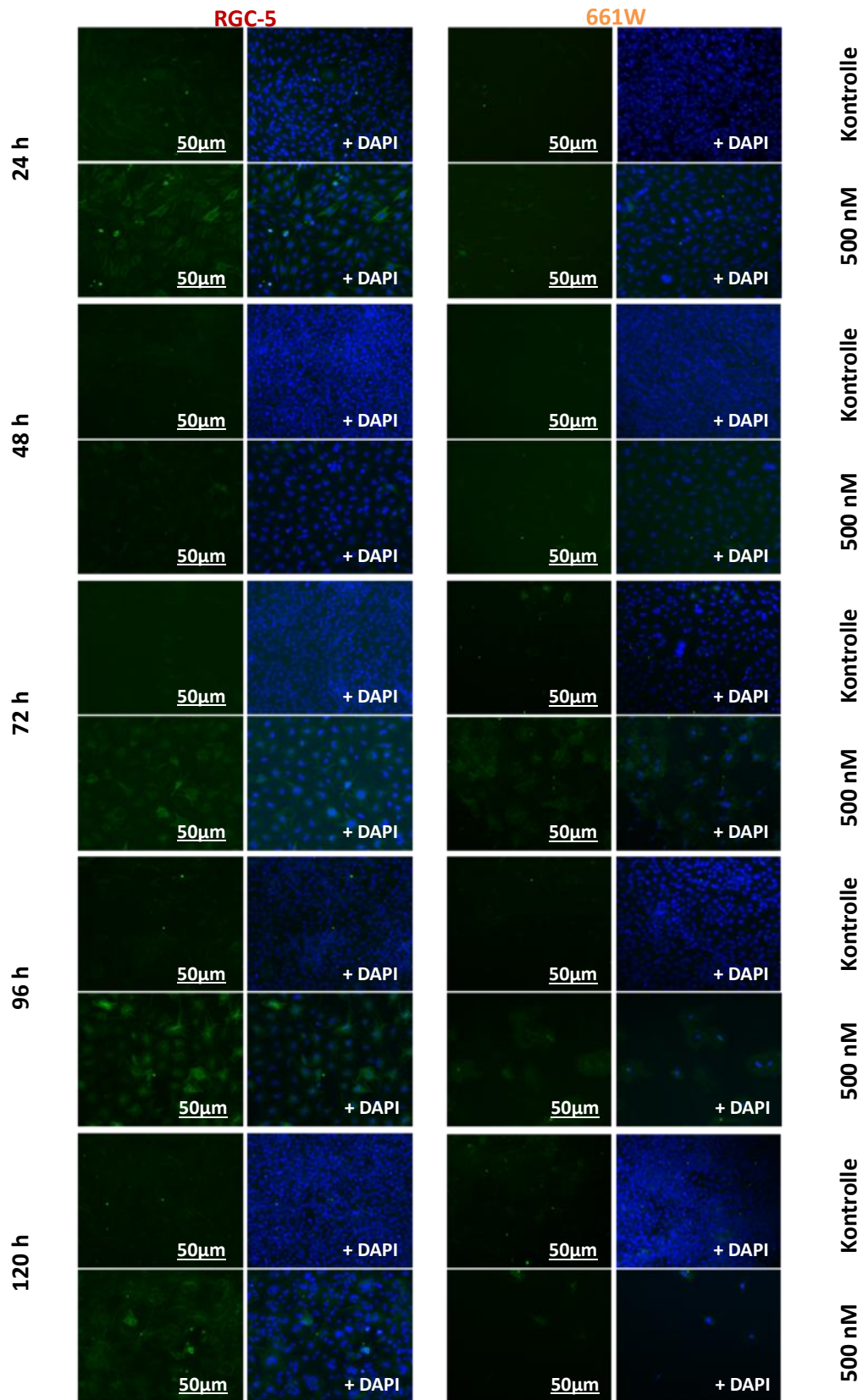
#### 3.2.3.1 Immunhistochemie

Unbehandelte 661W- und RGC-5-Zellen waren nur vereinzelt positiv für den neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin. Unter TSA-Behandlung zeigten RGC-5-Zellen im Rahmen des Schwechter-Protokolls stets eine vermehrte  $\beta$ -III-Tubulin-Expression, besonders nach 72 bis 120 Stunden. Auch bei Inkubation nach Wood waren v.a. nach Langzeitinkubation mehr Zellen positiv für  $\beta$ -III-Tubulin als bei den Kontrollzellen. Wurden 661W-Zellen mit 500 nM TSA behandelt, war im Rahmen des Schwechter-Protokolls eher bei kurzen Inkubationszeiten ein  $\beta$ -III-Tubulin-Anstieg erkennbar, während sich nach 120stündiger Inkubation kein Unterschied zur Kontrolle zeigte. Bei Inkubation nach Wood zeigten behandelte 661W-Zellen zu keinem Zeitpunkt eine vermehrte Expression (s. Abbildungen 11 und 12).

#### 3.2.3.2 Western Blot

Bei Inkubation nach Schwechter stieg bei RGC-5-Zellen die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression innerhalb der ersten Tage. Vor allem bei Inkubation über 96 und 120 Stunden war eine gesteigerte Expression zu messen bis zu einem Maximum nach 120 Stunden mit einer Steigerung um mehr als das Doppelte. Bei Inkubation nach Wood konnte ebenfalls ein zeitabhängiger Anstieg der Expression bis auf das 2,5fache nach 120 Stunden ( $p < 0,001$ ) beobachtet werden. Die 661W-Zellen verhielten sich anders. Bei Behandlung nach Schwechter zeigten sie nach einem anfänglichen Expressionsanstieg einen zeitabhängigen Abfall der  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bis sich behandelte Zellen nach 120 Stunden nicht mehr von der Kontrolle unterschieden. Bei Differenzierung nach Wood war die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression nur nach 24 Stunden schwach erhöht, lag zu allen anderen Zeitpunkten aber unter der Kontrolle oder unterschied sich nicht von dieser. Während also bei RGC-5-Zellen unter vier- bzw. fünftägiger TSA-Inkubation die Expression gegenüber der Kontrolle deutlich gesteigert werden konnte, blieb dieser Effekt bei 661W aus (s. Abbildung 13).





**Abbildung 11:  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 und 661W mit TSA nach Schwechter**

Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung sowie korrespondierende Aufnahmen mit der DAPI-Kernfärbung. Bei Behandlung der Zellen nach Schwechter zeigten RGC-5-Zellen immer eine vermehrte  $\beta$ -III-Tubulin-Expression, v.a. nach Langzeitinkubation. 661W-Zellen verstärkten ihre Expression zu Beginn leicht, unterschieden sich aber nach Langzeitinkubation nicht von Kontrollzellen.

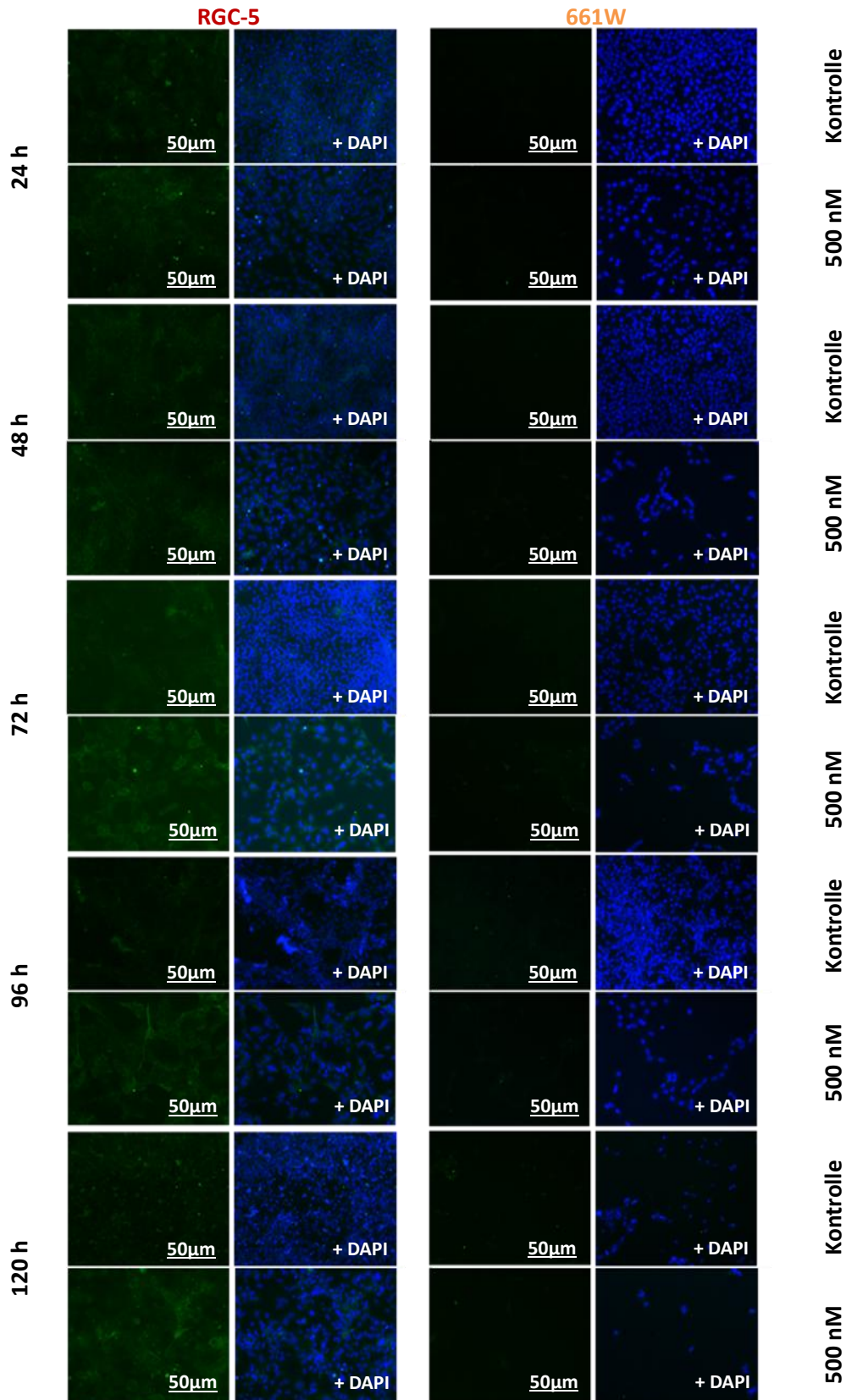
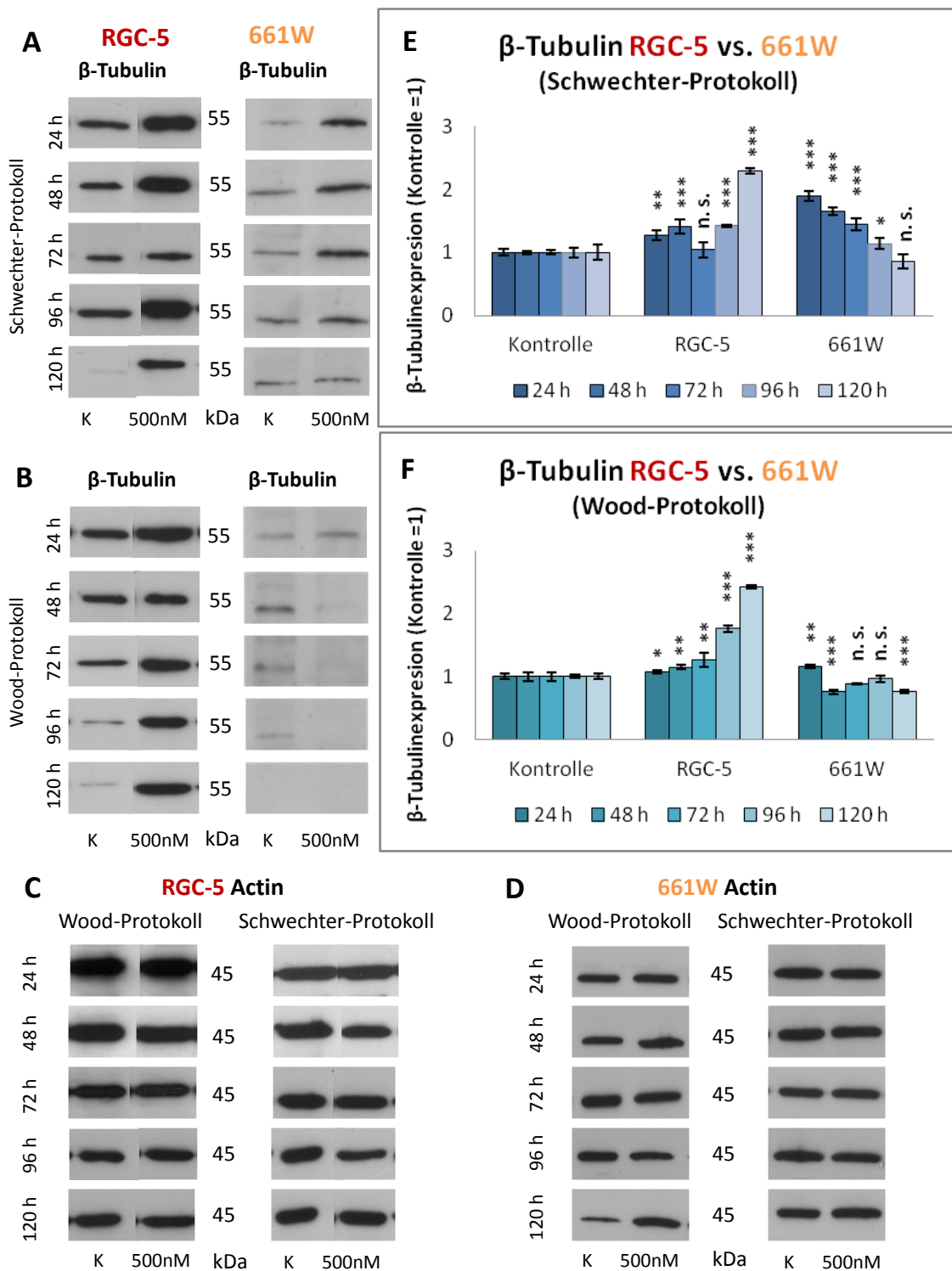


Abbildung 12:  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 und 661W mit TSA nach Wood

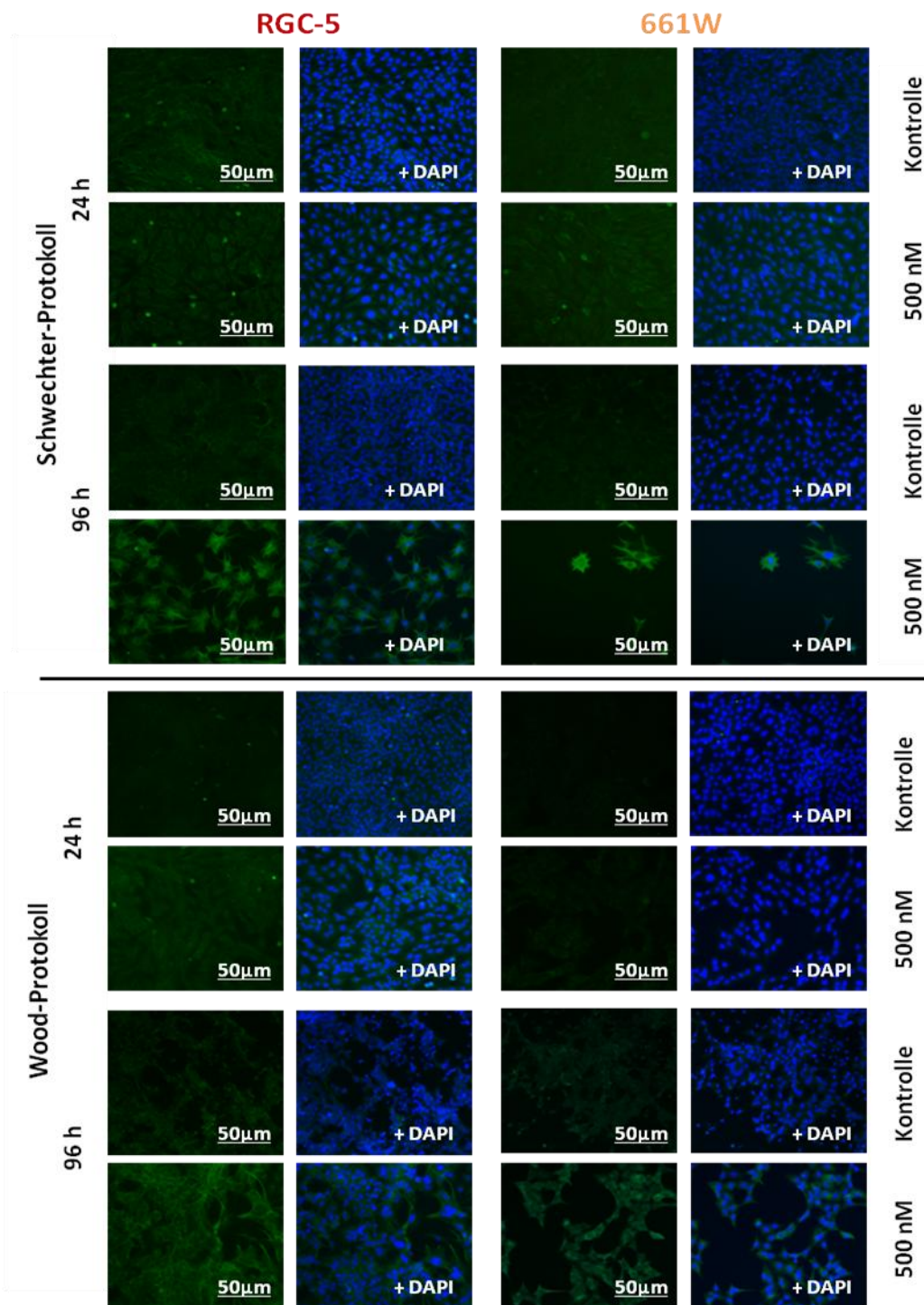
Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung sowie korrespondierende Aufnahmen mit der DAPI-Kernfärbung. Bei Inkubation nach Wood reagierten RGC-5-Zellen mit einer verstärkten  $\beta$ -III-Tubulin-Expression wenn sie länger als 72 Stunden inkubiert wurden, während bei 661W-Zellen zu keinem Zeitpunkt eine gesteigerte Expression erkenntlich war.



**Abbildung 13: β-III-Tubulin-Expression bei RGC-5 und 661W mit TSA**

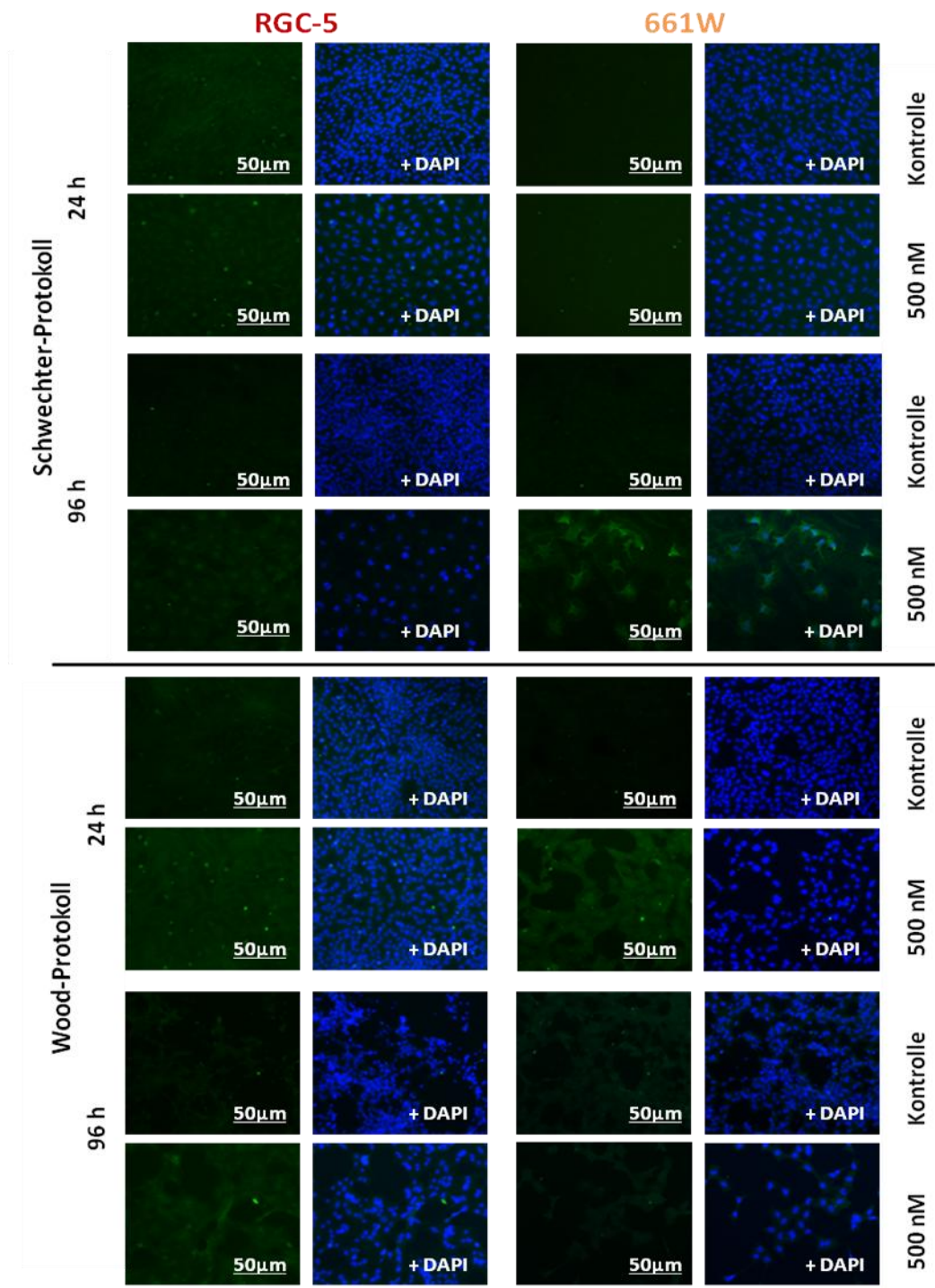
**A-D** zeigen repräsentative Western-Blot-Banden für β-III-Tubulin (55 kDa) und Actin (45 kDa) zu den jeweiligen Zeitpunkten. **E** und **F** bilden die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Jeder Versuch wurde vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Bei kurzer Inkubation nach Schwechter reagierten 661W-Zellen mit einer deutlich erhöhten β-III-Tubulin-Expression, RGC-5-Zellen nur mit einer mäßigen Erhöhung. Bei beiden Protokollen unterschieden sich 661W-Zellen nach Langzeitinkubation kaum von Kontrollzellen, während RGC-5-Zellen ihre Expression nach 120 Stunden mehr als verdoppelten.





**Abbildung 14: MAP-2-Expression bei RGC-5 und 661W nach Schwechter und Wood**

Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung für 24 und 96 Stunden Inkubationszeit sowie die korrespondierenden mit der DAPI-Kernfärbung aufgenommenen Bilder. Unbehandelte RGC-5- und 661W-Zellen waren nur schwach oder gar nicht positiv für MAP-2. Durch Inkubation mit 500 nM TSA nach Schwechter ließ sich v.a. nach 96 und 120 Stunden bei beiden Zelllinien die Expression steigern. Bei Inkubation nach Wood stieg die MAP-2-Expression bei RGC-5-Zellen durch Langzeitinkubation mit 500 nM TSA deutlich stärker als bei 661W-Zellen. Bei 661W-Zellen imponierte v.a. bei Differenzierung nach Schwechter der massive Zellzahlverlust nach längeren Inkubationszeiten.



**Abbildung 15: Tau-Expression bei RGC-5 und 661W nach Schwechter und Wood**

Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung für 24 und 96 Stunden Inkubationszeit sowie die korrespondierenden mit der DAPI-Kernfärbung aufgenommenen Bilder. Mit 500 nM differenzierte Zellen exprimierten zwar mehr Tau als entsprechende Kontrollzellen aber nach Langzeitinkubation nicht wesentlich mehr als nach 24 Stunden. Tendenziell ließen sich nach dem Schwechter-Protokoll inkubierte 661W-Zellen nach 96 Stunden etwas stärker anfärben als unter gleichen Bedingungen kultivierte RGC-5-Zellen. Bei 661W-Zellen dominierte nach 96 und 120 Stunden der Rückgang der Zellzahl.



### **3.2.4 Expression neuronaler Marker**

Das Expressionsprofil des neuronalen Markers MAP-2 unterschied sich bei beiden Zelllinien nicht wesentlich voneinander. Während unbehandelte RGC-5- und 661W-Zellen stets negativ waren, exprimierten behandelten Zellen v.a. nach 72 und 96 Stunden vermehrt MAP-2. RGC-5- und 661W-Zellen unterschieden sich nur hinsichtlich der Zellzahl. Bei 661W-Kulturen waren nach Langzeitinkubation mit TSA v.a. im Rahmen des Schwlechter-Protokolls kaum lebende Zellen übrig (s. Abbildung 14).

Bei der Expression des Tau-Proteins verhielt es sich ähnlich. Tendenziell ließen sich nach dem Schwlechter-Protokoll inkubierte 661W-Zellen nach 72 und 96 Stunden etwas stärker anfärben als unter gleichen Bedingungen kultivierte RGC-5-Zellen (s. Abbildung 15).

### **3.2.5 Programmierter Zelltod**

#### **3.2.5.1 Caspase-3/7-Assay nach Inkubation mit TSA**

Tendenziell entsprachen sich RGC-5-Zellen und 661W-Zellen in ihrem Apoptoseverhalten bei Behandlung mit 500 nM TSA. Bis zu einer Inkubationszeit von 48 Stunden überstieg die Caspase-3/7-Aktivität bei Behandlung mit TSA die der Kontrolle. Der Anstieg war bei der 661W-Zelllinie deutlich stärker als bei RGC-5-Zellen. Bei Langzeitinkubation war die Caspase-3/7-Aktivität sowohl bei RGC-5- als auch bei 661W-Zellen unter TSA-Behandlung gegenüber der Kontrolle deutlich erniedrigt, unabhängig vom angewendeten Protokoll. Die geringste apoptotische Aktivität war bei RGC-5-Zellen unter Anwendung des Schwlechter-Protokolls nach 96 und 120 Stunden Inkubation messbar (s. Abbildung 16).

Insgesamt reagierten RGC-5-Zellen in den ersten Inkubationstagen also nicht so stark mit Apoptose wie 661W-Zellen und unter Langzeitinkubation sank ihre Caspase-3/7-Aktivität deutlicher als bei 661W-Zellen.

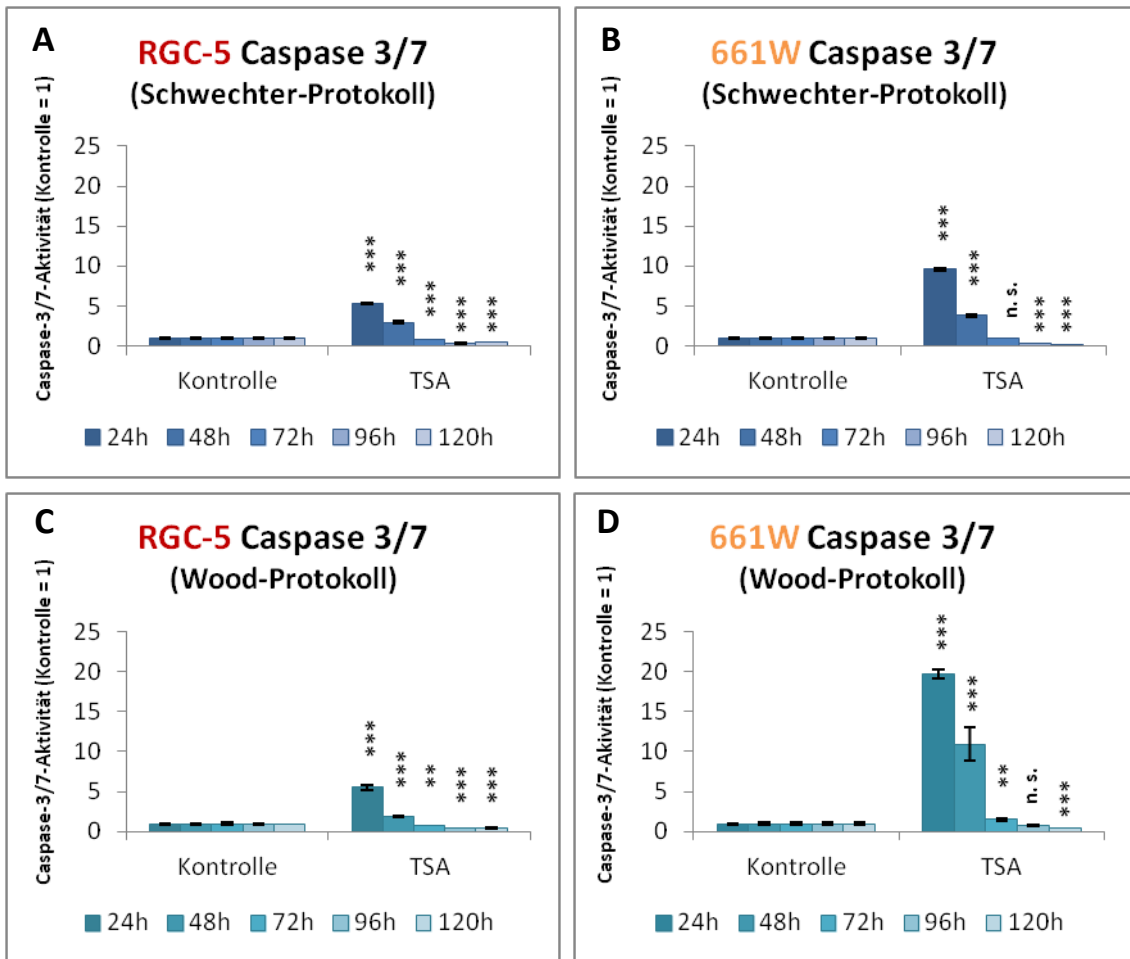


Abbildung 16: Caspase-3/7-Assay bei RGC-5 und 661W mit TSA

A-D zeigen die Caspase-3/7-Aktivitäten bei mit TSA differenzierten RGC-5- und 661W-Zellen im Verhältnis zu der der Kontrollzellen (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden sechsmal durchgeführt (n=6). RGC-5- und 661W-Zellen reagierten ähnlich auf Behandlung mit 500 nM TSA. Nach ein- bis zweitägiger Inkubation stieg die Caspase-3/7-Aktivität gegenüber der Kontrolle an, v.a. massiv bei 661W-Zellen bei denen das Wood-Protokoll angewandt wurde. Bei längeren Inkubationszeiten sank die Aktivität gegenüber der Kontrolle, besonders unter Differenzierung nach Schwechter.

### 3.2.5.2 Caspase-3/7-Assay nach Inkubation mit Staurosporin

Die Differenzierung mit 300 nM STS rief bei beiden Zelllinien einen ähnlichen Effekt hinsichtlich des Apoptoseverhaltens hervor wie die Behandlung mit 500 nM TSA: Ein Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität in der ersten zwei Inkubationstagen und ein Absinken gegenüber der Kontrollwerte bei längerer Inkubation. Minimale Caspase-3/7-Aktivitäten resultierten bei 661W-Zellen nach 120 Stunden Behandlung mit STS (Abfall auf 6 % der Kontrolle,  $p < 0,001$ ), bei

RGC-5-Zellen nach 96 Stunden (20 % der Kontrolle,  $p < 0,001$ ). Die gemessenen Werte der STS-behandelten Zellen lagen immer unter den korrespondierenden Werten der TSA-Zellen (s. Abbildung 17).

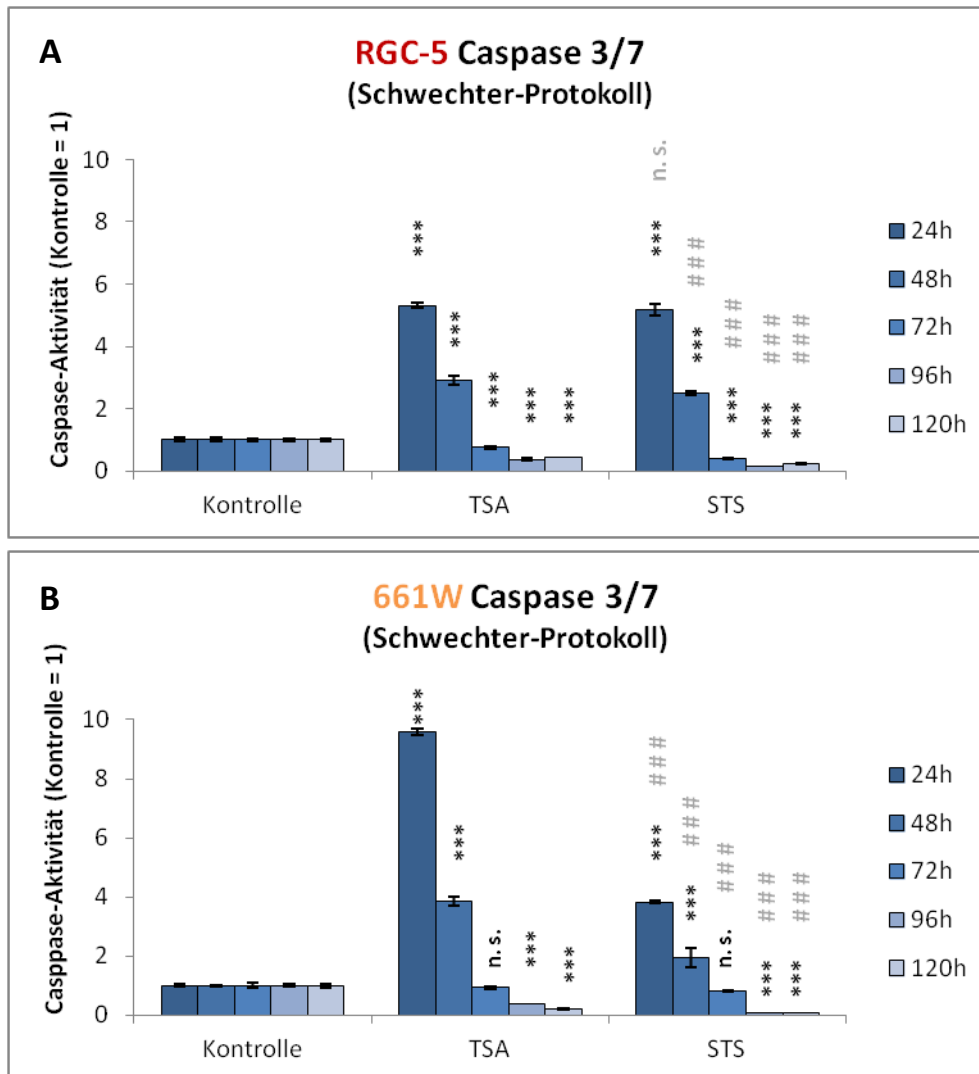


Abbildung 17: Caspase-3/7-Assay bei RGC-5 und 661W mit TSA und STS

**A** und **B** zeigen die Caspase-3/7-Aktivitäten bei mit TSA und mit STS differenzierten RGC-5- und 661W-Zellen im Verhältnis zu dem der Kontrollzellen (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle und #### =  $p \leq 0,001$  als signifikant unterschiedlich zu Behandlung mit TSA. Alle Versuche wurden sechsmal durchgeführt ( $n=6$ ). Innerhalb der ersten Inkubationstage reagierten vor allem 661W-Zellen auf TSA-Behandlung empfindlich mit vermehrter Caspase-3/7-Aktivität während bei RGC-5-Zellen zwar erhöhte Absorptionen bei inkubierten Zellen gemessen werden konnten, aber kein signifikanter Unterschied hinsichtlich TSA- und STS-Inkubation in diesem Zeitraum erkennbar war. Später sank die gemessene Absorption der behandelten Zellen relativ zur Kontrolle wobei mit STS inkubierte Zellen stets eine geringere Caspase-3/7-Aktivität aufwiesen als mit TSA behandelte Zellen.

### 3.2.5.3 *Gespaltene Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis*

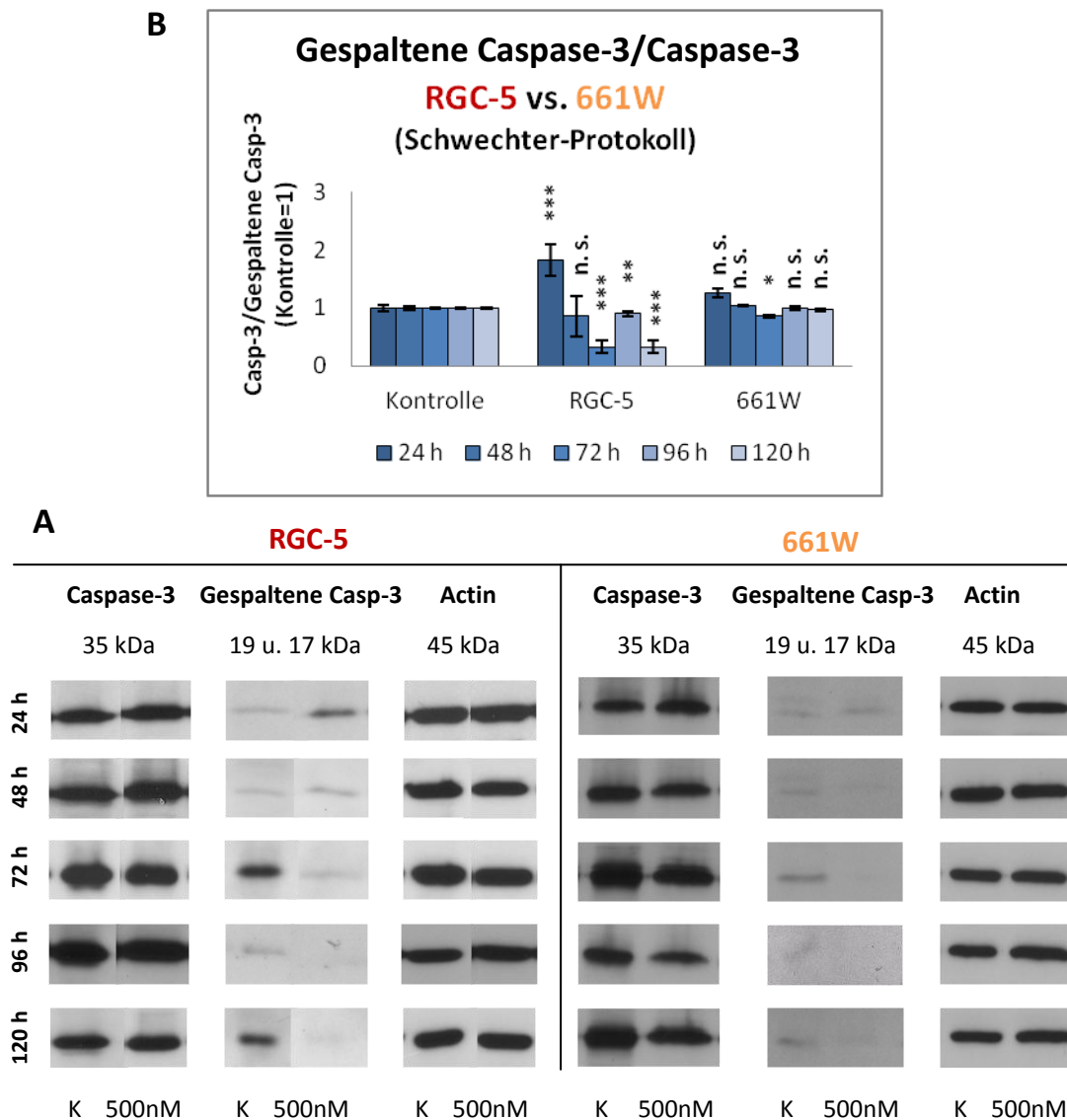
Wurden RGC-5-Zellen mit 500 nM nach Schwechter inkubiert, verdoppelte sich das Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnisses nach 24 Stunden, übertraf aber zu späteren Zeitpunkten nie das der Kontrollzellen. Am kleinsten war der Quotient nach 72 und 120 Stunden. Bei Inkubation der 661W-Zellen nach Schwechter zeigten sich meist keine Unterschiede zur Kontrolle.

Bei Inkubation nach Wood zeigten beide Zelllinien einen Anstieg des Quotienten in den ersten Behandlungstagen und einen Abfall nach Langzeitinkubation. Der Anstieg in den ersten 48 Stunden war bei RGC-5-Zellen deutlicher als bei 661W-Zellen (über 2fache Steigerung 24 Stunden,  $p < 0,001$ ), der Abfall unter Langzeitinkubation allerdings ebenfalls. Ein minimales Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnisses resultierte bei RGC-5-Zellen nach 120 Stunden (20 %,  $p < 0,001$ ). Die erfassten Veränderungen waren dabei immer durch verstärkte oder abgeschwächte Banden der gespaltenen Caspase-3 zu erklären (s. Abbildungen 18 und 19).

### 3.2.5.4 *Bax/Bcl-2-Verhältnis*

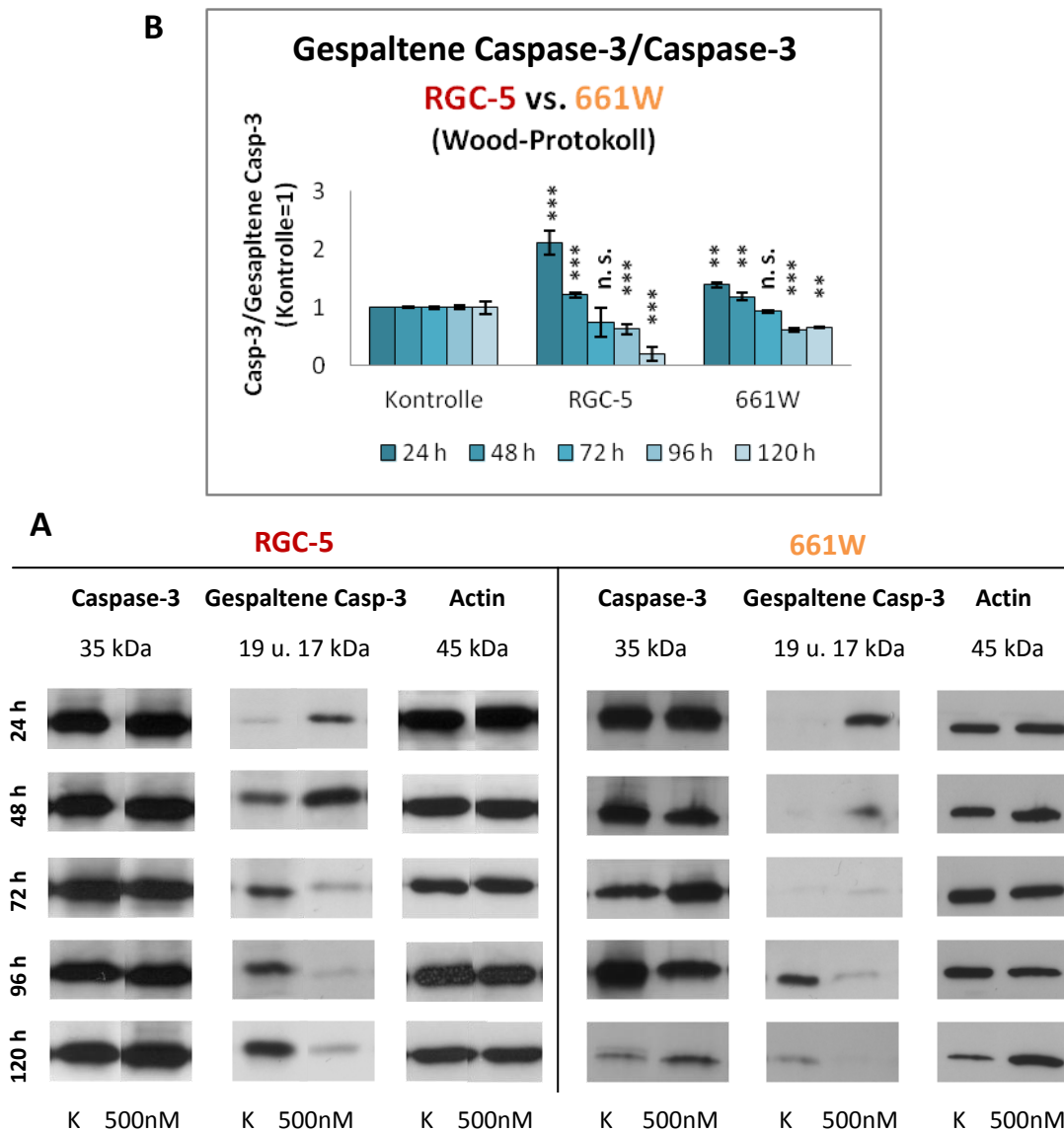
Nach Schwechter behandelte RGC-5-Zellen zeigten zeitabhängige Schwankungen des Bax/Bcl-2-Verhältnisses: Während sie sich nach 24 und 72 Stunden kaum von den Kontrollzellen unterschieden, stieg der Bax/Bcl-2-Quotient nach 48 Stunden auf knapp das 3,5fache und nach 96 und 120 Stunden auf das 1,3fache der Kontrolle. 661W-Zellen reagierten dezenter. Sie zeigten kaum Abweichungen von der Kontrolle, bis auf leicht erhöhte Werte nach 48 Stunden und leicht erniedrigte Werte nach 72.

Die RGC-5-Zellen reagierten bei Inkubation nach Wood nach 48 und 72 Stunden mit einem diskreten Anstieg des Quotienten um rund 20 % und nach 120 Stunden mit einem deutlichen Abfall auf 53 % ( $p < 0,001$ ). Bei 661W-Zellen zeigten sich bis auf einen leichten Abfall des Bax/Bcl-2-Verhältnisses nach 72 und 120 Stunden kaum Abweichungen von der Kontrolle. Veränderungen waren stets durch einen Abfall oder Anstieg des Bcl-2-Proteins bedingt (s. Abbildungen 20 und 21).



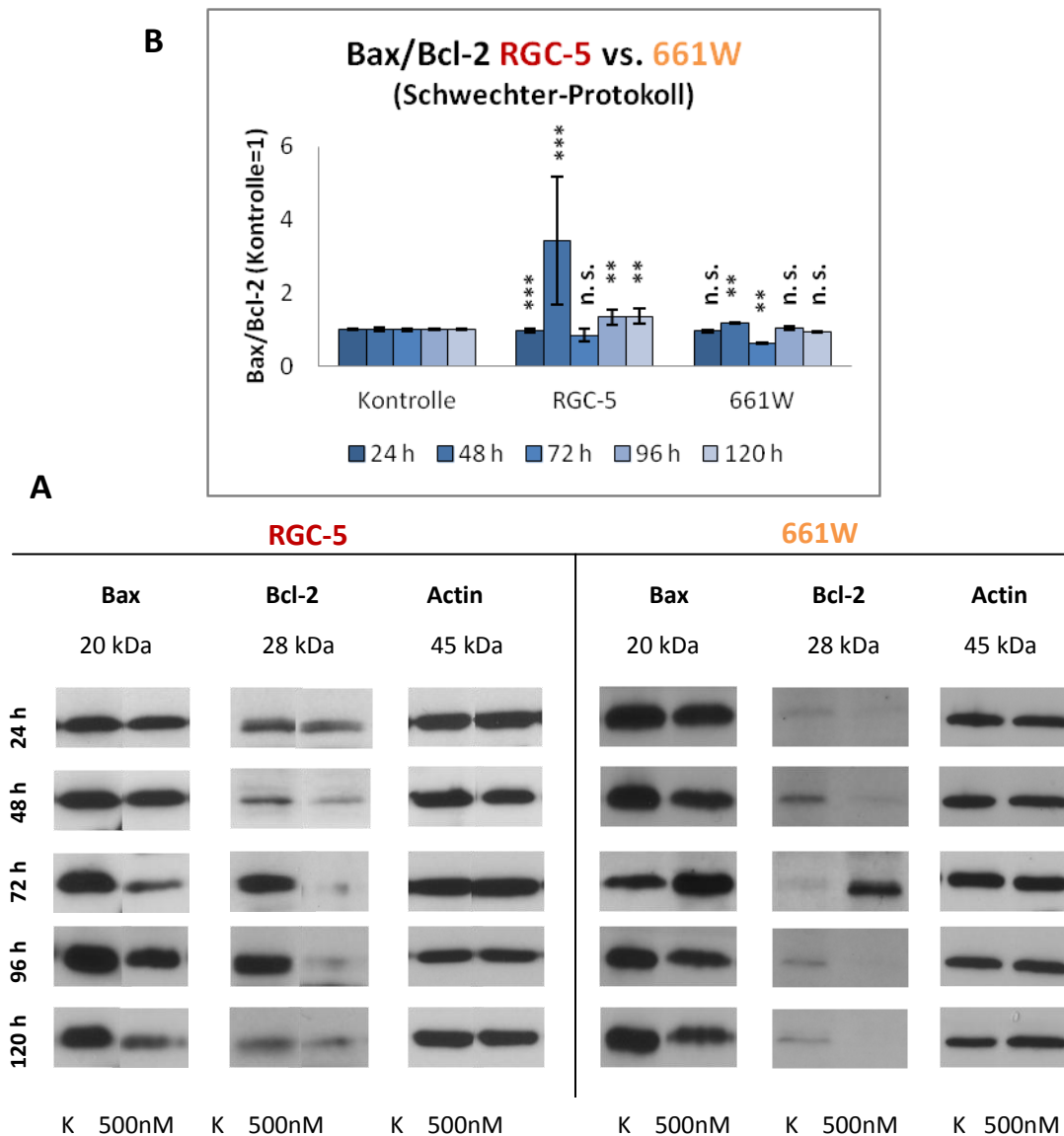
**Abbildung 18: Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis bei RGC-5 und 661W nach Schwechter**

**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für die Marker Caspase-3 (35 kDa) und gespaltene Caspase-3 (17 und 19 kDa) sowie für das Haushaltsprotein Actin (45 kDa). **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Im Rahmen des Schwechter-Protokolls stieg bei kurzen Inkubationszeiten (24 und 48 Stunden) bei RGC-5-Zellen zunächst das Verhältnis von gespalteener Caspase-3 zu Caspase-3 an, um dann nach 72, 96 und 120 Stunden relativ zum dem der Kontrolle zu fallen. 661W-Zellen unterschieden sich nicht von Kontrollzellen bis auf einen leichten Abfall des Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Quotienten nach 72 Stunden. Veränderungen waren auf eine sinkende oder steigende Gespaltene-Caspase-3-Expression zurückzuführen.



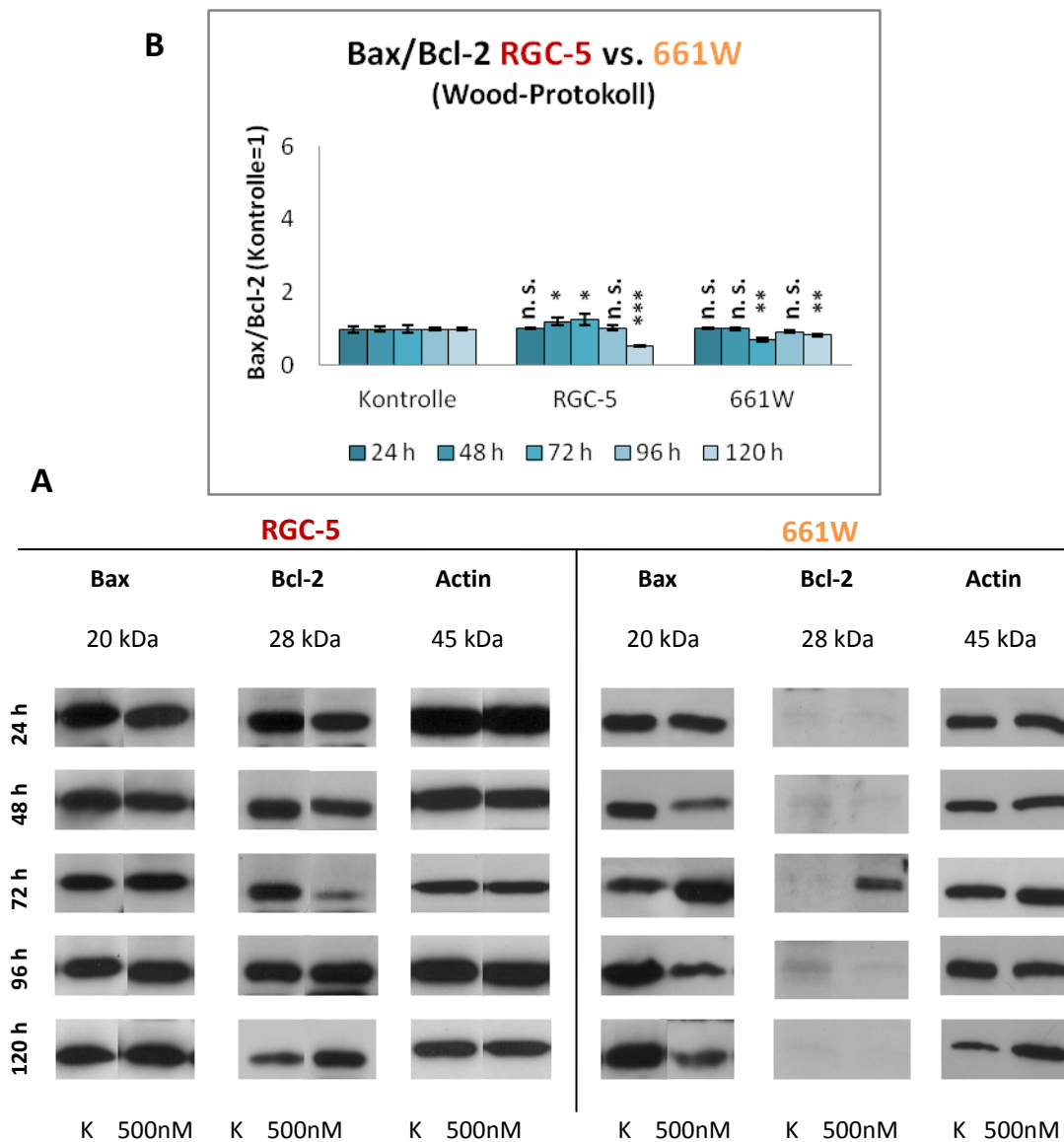
**Abbildung 19: Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis bei RGC-5 und 661W nach Wood**

**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für die Marker Caspase-3 (35 kDa) und gespaltene Caspase-3 (17 und 19 kDa) sowie für das Haushaltsprotein Actin (45 kDa). **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Bei 24 und 48 Stunden stieg bei Inkubation nach Wood bei beiden Zelllinien zunächst das Verhältnis von gespaltener Caspase-3 zu Caspase-3 an, nach 96 und 120 Stunden fiel es relativ zum dem der Kontrolle. Bei dreitägiger Inkubation bestand kein Unterschied zu den unbehandelten Zellen. Tendenziell reagierten RGC-5-Zellen stärker und eine Veränderung war immer auf eine sinkende oder steigende Gespaltene-Caspase-3-Expression zurückzuführen.



**Abbildung 20: Bax/Bcl-2-Verhältnis bei RGC-5 und 661W mit TSA nach Schwechter**

**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für die Marker Bax (20 kDa) und Bcl-2 (28 kDa) sowie für das Haushaltsprotein Actin (45 kDa). **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Bei Inkubation mit 500 nM TSA nach Schwechter zeigten RGC-5-Zellen ein erhöhtes Bax/Bcl-2-Verhältnis, außer bei 72stündiger Inkubation, bei der sie sich nicht von Kontrollzellen unterschieden. 661W-Zellen unterschieden sich nur nach 48 Stunden mit einem leichten Anstieg und nach 72 Stunden mit einem leichten Abfall des Bax/Bcl-2-Quotienten wesentlich von unbehandelten Zellen.



**Abbildung 21: Bax/Bcl-2-Verhältnis bei RGC-5 und 661W mit TSA nach Wood**

**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für die Marker Bax (20 kDa) und Bcl-2 (28 kDa) sowie für das Haushaltsprotein Actin (45 kDa). **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Bei RGC-5-Zellen, stieg das Bax/Bcl-2-Verhältnis nach zwei bzw. drei Tagen Inkubation nach Wood zunächst, um nach 120 Stunden stark auf nur noch 20 % der Kontrolle zu fallen. 661W-Zellen reagierten in den ersten Behandlungstagen nur schwach auf TSA, zeigten aber nach 72 und 120 Stunden Inkubationszeit ein sinkendes Bax/Bcl-2-Verhältnis auf bis zu 80 % der Kontrolle. Für Schwankungen verantwortlich war v.a. eine vermehrte oder verminderte Bcl-2-Expression.



### 3.2.6 Vitalität der Zellen (MTS-Test)

#### 3.2.6.1 Behandlung mit 500 nM TSA

Bei differenzierten RGC-5-Zellen lagen alle gemessenen Absorptionen etwa gleich weit unter den Kontrollwerten mit Ausnahme der 120-Stunden-Werte, die unter Anwendung beider Protokolle einen starken Anstieg gegenüber der Kontrolle zeigten. Bei 661W-Zellen blieb diese Vitalitätssteigerung nach Langzeitinkubation aus. Sie reagierten v.a. bei langer Inkubation nach dem Wood-Protokoll mit sinkender Stoffwechselaktivität (s. Abbildung 22).

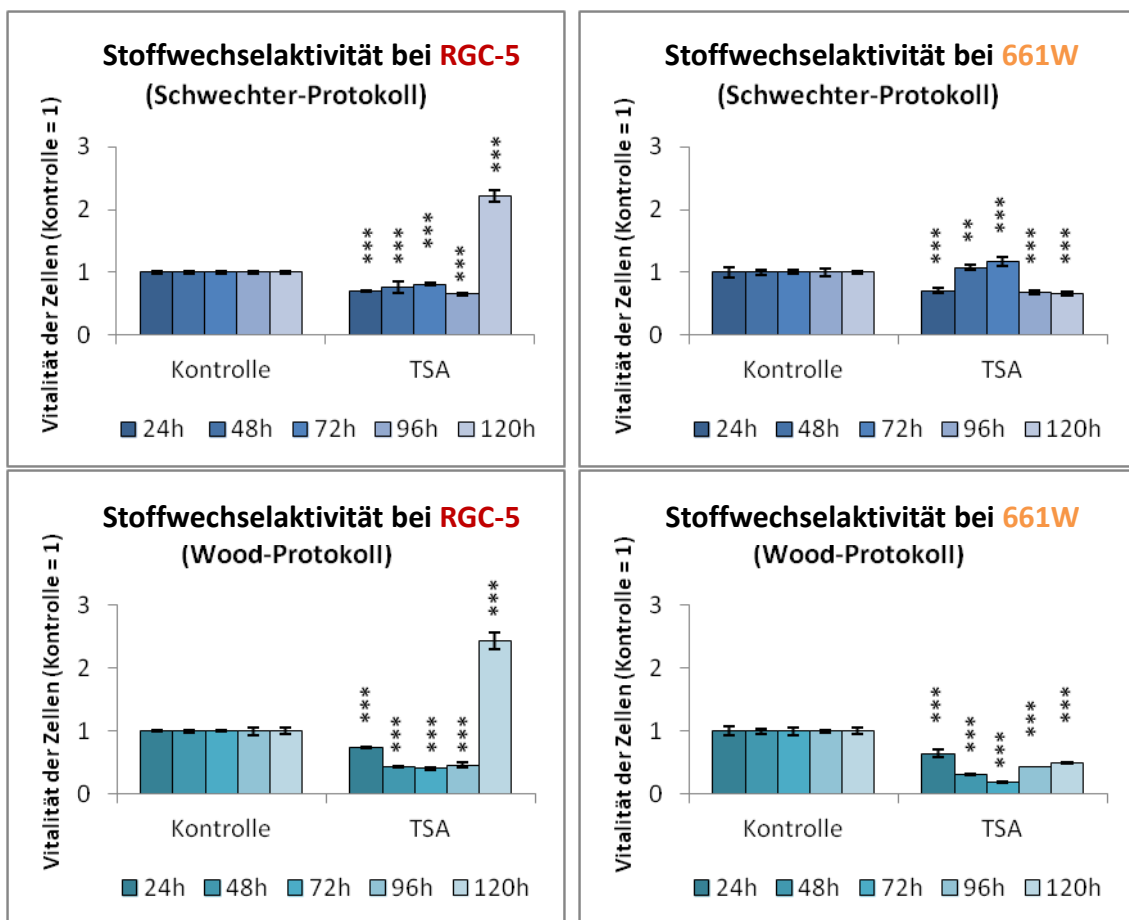


Abbildung 22: MTS-Test an RGC-5 und 661W mit TSA

A-D zeigen die Stoffwechselaktivität bei mit 500 nM TSA differenzierten RGC-5- und 661W-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden sechsmal durchgeführt (n=6). Differenzierte RGC-5-Zellen zeigten zuerst abfallende Werte. Nach 120 Stunden erreichen sie allerdings eine maximale Stoffwechselaktivität mit Steigerung um den Faktor 2,3 (Schwächer-Protokoll) bzw. 2,5 (Wood-Protokoll). Bei 661W-Zellen blieb dieser Anstieg der Stoffwechselaktivität aus. Sie reagierten empfindlich mit sinkenden Werten bei Langzeitinkubation nach dem Wood-Protokoll.

### 3.2.6.2 Behandlung mit 300 nM STS

Prinzipiell reagierten beide Zelllinien ähnlich auf 300 nM STS wie auf 500 nM TSA. Allerdings war die Stoffwechselaktivität stets etwas geringer als bei den TSA-behandelten Zellen und der bei RGC-5-Zellen beobachtete Vitalitätsanstieg nach 120 Stunden Inkubation blieb aus (s. Abbildung 23).

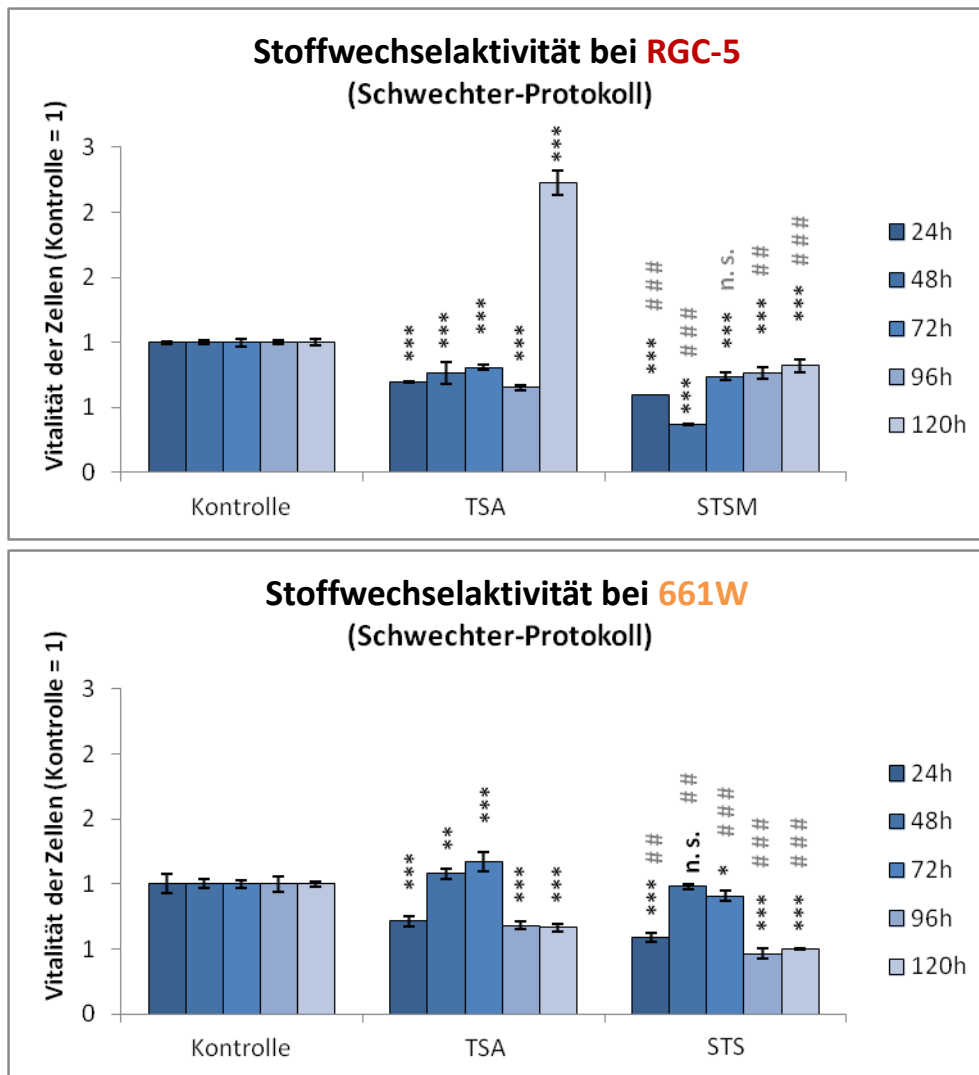


Abbildung 23: MTS-Test an RGC-5 und 661W mit TSA und STS

A und B zeigen die Stoffwechselaktivität bei mit TSA und STS differenzierten RGC-5- und 661W-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle und ### =  $p \leq 0,001$ , ## =  $p \leq 0,01$  signifikant unterschiedlich zur TSA-Behandlung. Die Versuche wurden sechsfach durchgeführt (n=6). Es kam grundsätzlich zu einer ähnlichen Reaktion unter Anwendung der zwei Agenzien. Allerdings wiesen mit STS differenzierte Zellen stärker fallende Absorptionen auf und der Vitalitätsanstieg nach 120 Stunden war nur bei mit TSA inkubierten RGC-5-Zellen erkennbar, nicht unter STS-Inkubation.

### 3.2.7 Zellzahl (Kristallviolettffärbung)

#### 3.2.7.1 Behandlung mit 500 nM TSA

Wurden die RGC-5-Zellen mit 500 nM TSA inkubiert, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Abfall der Kristallviolett-Absorption, der bei Langzeitinkubation und unter Einsatz des Schwetcher-Protokolls am deutlichsten war. Die 661W-Zellen verhielten sich im Vergleich ähnlich, der Zellanzahlverlust war jedoch bei längerer Inkubation ausgeprägter (s. Abbildung 24).

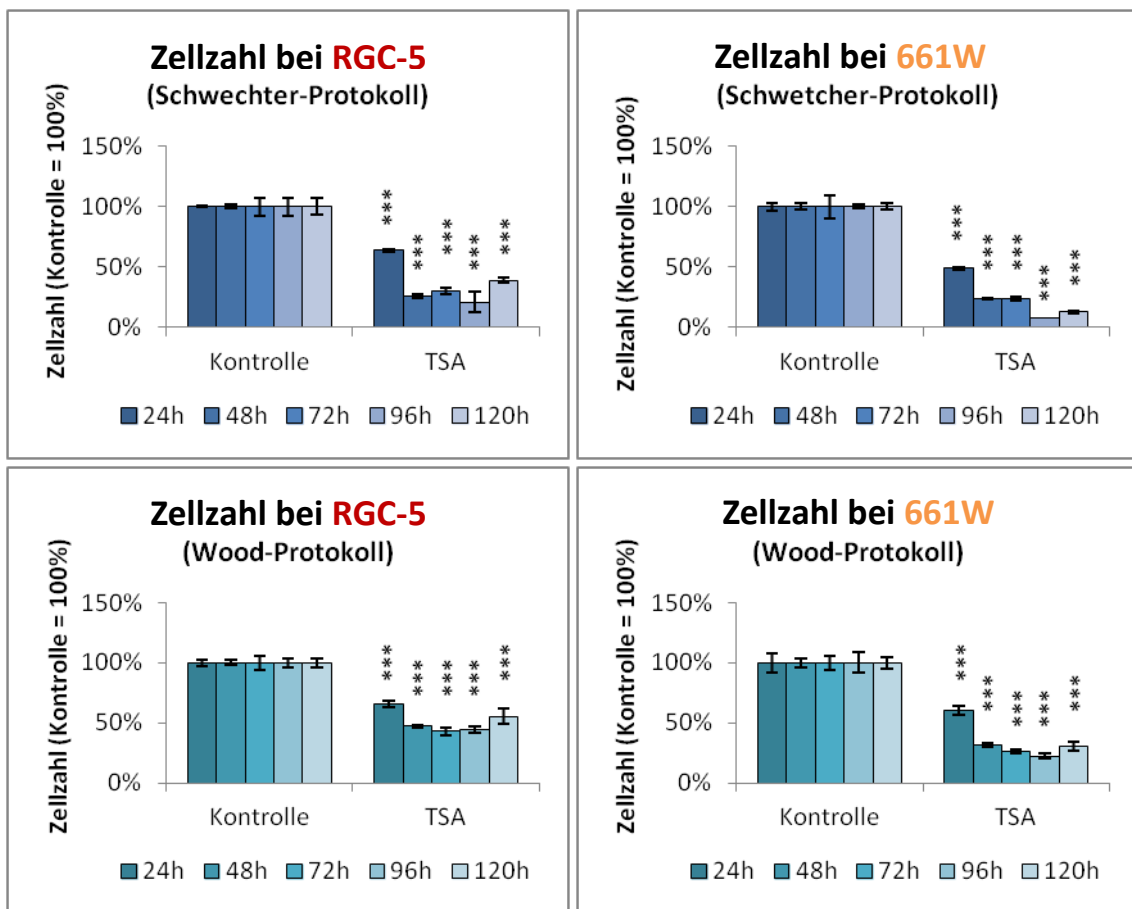


Abbildung 24: Kristallviolettffärbung bei RGC-5 und 661W mit TSA

A-D zeigen die durch Kristallviolettffärbung und anschließende Absorptionsmessung ermittelte Zellzahl bei mit TSA differenzierten RGC-5- und 661W-Zellen im Verhältnis zu der der Kontrolle (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden sechsfach durchgeführt ( $n=6$ ). Bei beiden Zelllinien kam es zu einem zeitabhängigen Abfall der Zellzahl. 661W-Zellen reagierten mit einem stärkeren Abfall der Zellanzahl als RGC-5-Zellen, v.a. bei längeren Inkubationszeiten und unter Einsatz des Schwetcher-Protokolls.

### 3.2.7.2 Behandlung mit 300 nM STS

Die Zellen reagierten ähnlich, wenn sie mit 300 nM Staurosporin statt mit 500 nM TSA inkubiert wurden. Nur nach 120 Stunden Inkubationszeit stieg die Zellzahl bei differenzierten RGC-5-Zellen gegenüber dem viertägigen Inkubationszeitraum wieder leicht an wenn mit TSA behandelt wurde, was bei STS-Behandlung nicht der Fall war (s. Abbildung 25).

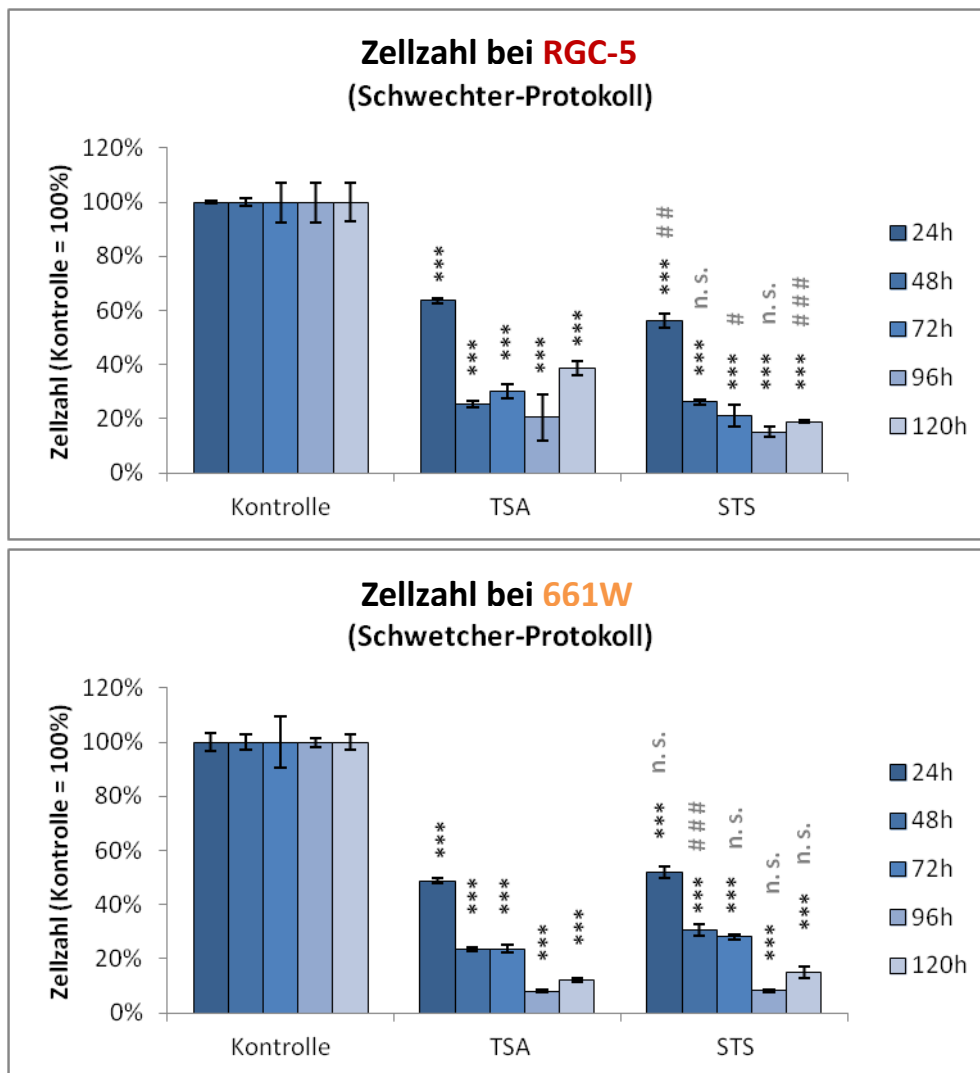


Abbildung 25: Kristallviolett färbung bei RGC-5 und 661W mit TSA und STS

**A** und **B** zeigen die Zellzahl bei mit TSA und STS differenzierten RGC-5- und 661W-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle und ### =  $p \leq 0,001$ , ## =  $p \leq 0,01$ , # =  $p \leq 0,05$  signifikant unterschiedlich zur TSA-Behandlung. Alle Versuche wurden sechsfach durchgeführt (n=6). 300 nM STS und 500 nM TSA wirkten sich tendenziell gleich auf die Zellanzahl aus. Unabhängig vom angewandten Protokoll sank unter Einsatz beider Agenzien mit steigender Inkubationszeit die Zellzahl.

### 3.2.8 Zusammenfassung der Unterschiede zwischen RGC-5 und 661W

RGC-5 und 661W-Zellen ähneln sich unter Differenzierungsbedingungen mit 500 nM TSA, unterscheiden sich allerdings auch in wesentlichen Punkten (s. Tabelle VII).

**Tabelle VII: Unterschiede zwischen RGC-5- und 661W-Zellen**

Zelllinie	RGC-5	661W
<b>Morphologie &amp; Zellzahl</b>	deutliche Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp v.a. bei Inkubation länger 72 Stunden  Konstante Zellzahlen bei Langzeitinkubation nach Wood	mäßige Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp bei Inkubation länger 72 Stunden  Zelluntergang bei langen Inkubationszeiten
<b>Vitalität</b>	prinzipiell Vitalitätsabfall, aber Steigerung der Vitalität um mehr als das Doppelte am 120-Stundenzeitpunkt	prinzipiell Vitalitätsabfall, bis auf einen leichten Anstieg nach 48 und 72 Stunden (Schwechter-Protokoll)
<b>Markerproteine</b>	relative Steigerung der mRNA-Expression von <u>Thy-1</u> nach 120 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA nach Wood  sehr starke zeitabhängige Steigerung der <u>β-III-Tubulin-Expression</u> mit Maxima bei 96 und 120 Stunden	die mRNA-Expression von <u>Thy-1</u> konnte durch Inkubation mit 500 nM TSA nicht signifikant gesteigert werden  nur minimale Steigerung der <u>β-III-Tubulin-Expression</u> innerhalb der ersten 48 Stunden, kein Anstieg nach Langzeitinkubation
<b>Apoptose</b>	<u>Caspase-3/7-Assay</u> : Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität innerhalb der ersten 48 Stunden, Abfall bei Langzeitinkubation	<u>Caspase-3/7-Assay</u> : Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität innerhalb der ersten 48 Stunden, Abfall bei längerer Inkubation. Weder Anstieg noch Abfall so ausgeprägt wie bei RGC-5-Zellen

Zelllinie	RGC-5	661W
<b>Apoptose</b>	<u>Gespaltene Caspase-3/Caspase-3</u> : in den ersten 48 Stunden Anstieg, nach 72 Stunden deutlicher Abfall  <u>Bax/Bcl-2</u> : Abfall nach 120 Stunden (Wood-Protokoll), sonst zeitabhängige Schwankungen	<u>Gespaltene Caspase-3/Caspase-3</u> : tendenziell wie RGC-5 aber nicht so deutlich, bei Differenzierung nach Schwächer sogar keine Veränderungen gegenüber Kontrollzellen  <u>Bax/Bcl-2</u> : Abfall nach 72 Stunden (beide Protokolle), sonst zeitabhängige Schwankungen

Wurde TSA durch 300 nM STS ersetzt, fiel die Reaktion beider Zelllinien ähnlich aus. Der Effekt auf die Zellzahl war vergleichbar aber die Caspase-3/7-Aktivität war unter STS-Behandlung etwas geringer. Der bei RGC-5-Zellen erzielte Vitalitätsanstieg nach 120 Stunden Inkubation konnte nur durch TSA-Behandlung erzielt werden.

### 3.3 Vergleich der Differenzierungsprotokolle

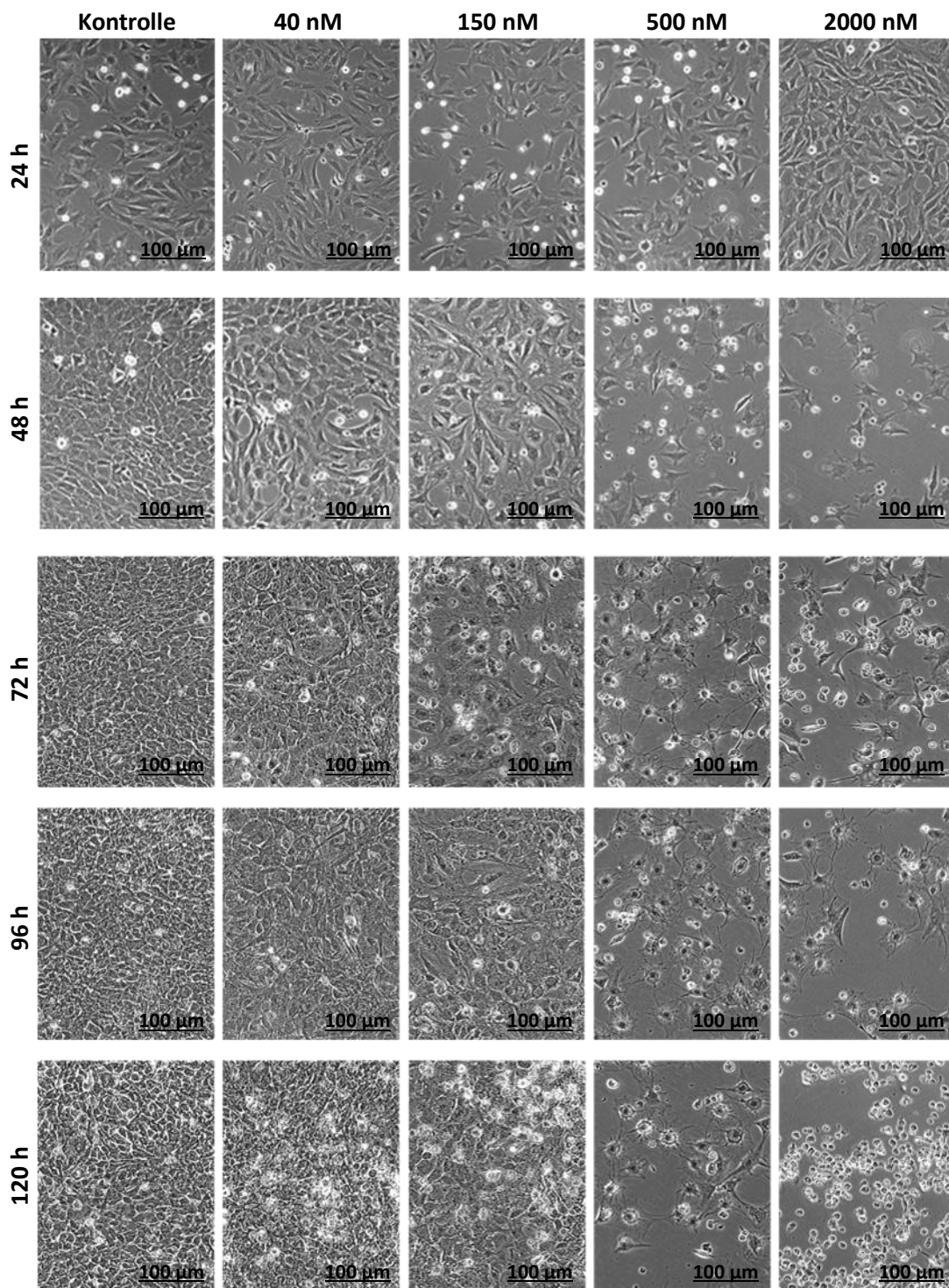
Infolge der Feststellung, dass RGC-5-Zellen unter Differenzierungsbedingungen anders reagieren als 661W-Zellen, wurde die Auswirkung der beiden Differenzierungsprotokolle nach Schwechter und Wood auf das Verhalten der RGC-5-Zellen bei TSA- Inkubation ausführlich untersucht.

#### 3.3.1 Zellmorphologie (*Phasenkontrastmikroskopie*)

Unbehandelte RGC-5-Zellen wiesen einen spindelförmigen Zellkörper auf und teilten sich ungefähr alle 20 Stunden, sodass sie nach spätestens 72 Stunden konfluieren, im Falle des Wood-Protokolls aufgrund der eintägigen Vorbehandlung sogar früher. Bei Differenzierung nach Schwechter veränderten sich RGC-5-Zellen bereits nach 24stündiger Inkubation bei allen Konzentrationen leicht. Ihr Soma begann sich abzurunden und einzelne Neuriten sprossen aus. Diese Formveränderung hin zu einem neuronalen Phänotyp war auch zu allen späteren Zeitpunkten zu beobachten, besonders bei Behandlung mit 500 oder 2000 nM. Neben diesen morphologischen Veränderungen war ein Abfall der Zellzahl über längere Inkubationszeiträume mit hohen TSA-Konzentrationen zu bemerken. Nach fünftägiger Inkubation mit 2000 nM TSA waren kaum lebende Zellen übrig. Nach 72 und 96 Stunden Differenzierung mit 500 nM waren alle Zellen neuronal differenziert und es gab deutlich weniger tote Zellen als bei Inkubation mit 2000 nM über gleiche Zeiträume. Bei Inkubation mit 40 und 150 nM konfluieren die Zellen ähnlich wie die Kontrollzellen, sodass eine Beurteilung der Zellmorphologie schwierig war.

Im Rahmen des Wood-Protokolls gestaltete sich eine genaue Betrachtung der morphologischen Veränderungen bedingt durch die eintägige Vorbehandlung schwierig, denn die Zellen waren ab dem zweiten Behandlungstag bei allen TSA-Konzentrationen mehr oder weniger konfluent. Dennoch war zu erkennen, dass sich bei Langzeitinkubation mit hohen TSA-Konzentrationen der Zellkörper abrundete und die Zellzahl geringer wurde. Ferner wurde deutlich, dass bei Inkubation über fünf Tage auch Kontrollzellen und Zellen unter 40nM-Inkubation untergingen (s. Abbildungen 26 und 27).

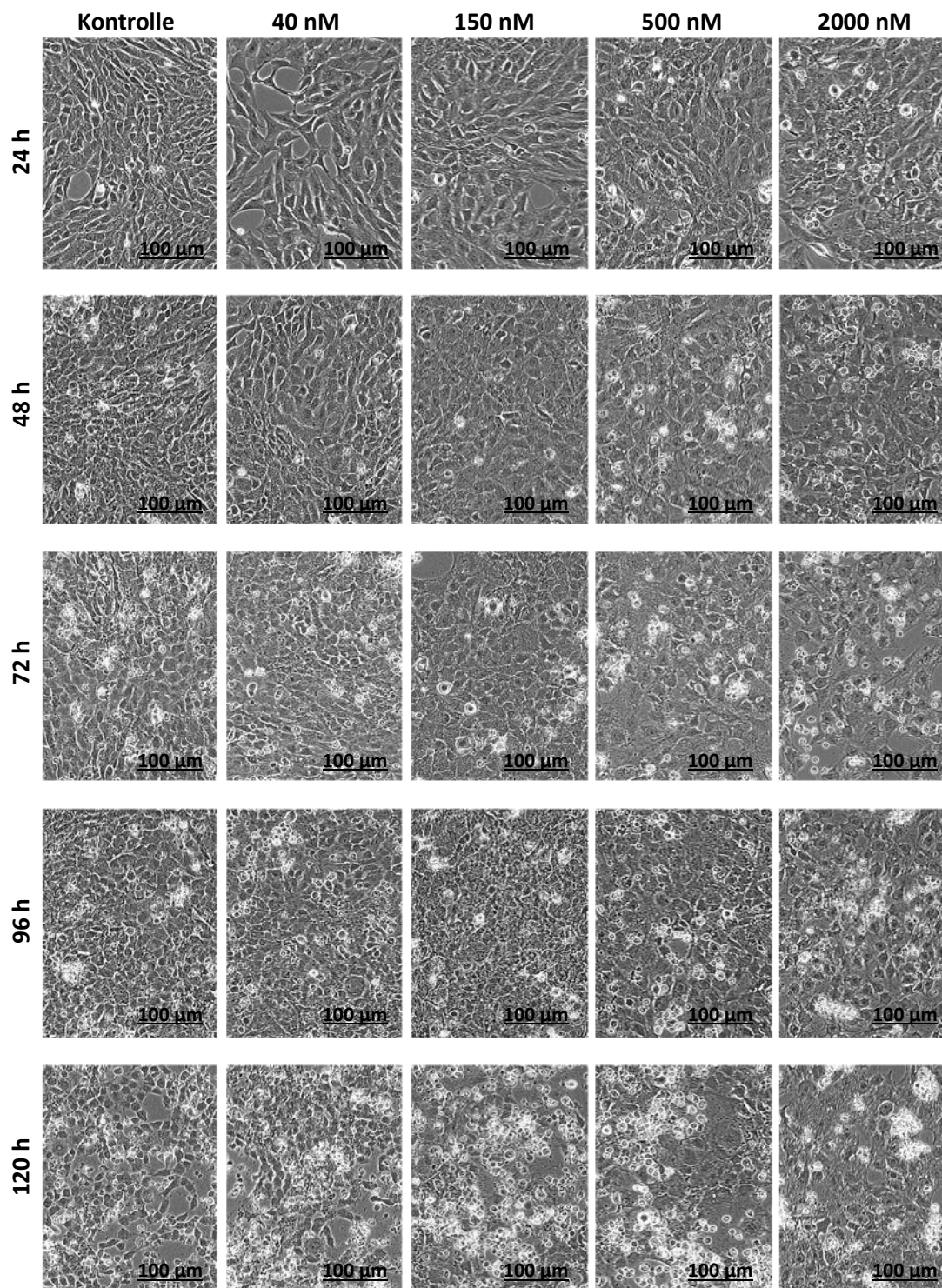




**Abbildung 26: Phasenkontrastmikroskopie bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter**

Gezeigt sind repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen in 100facher Vergrößerung. Unbehandelte RGC-5-Zellen hatten einen länglichen spindelförmigen Zellkörper und keine Dendriten. Im Rahmen des Schwechter-Protokolls entwickelten RGC-5-Zellen v.a. nach 96 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA einen neuronalen Phänotyp mit rundem Zellkörper und vermehrtem Neuritenwachstum. Bei Inkubation mit hohen TSA-Konzentrationen war ein Absinken der Zellzahl bemerkbar, v.a. bei Einsatz von 2000 nM nach 120 Stunden.





**Abbildung 27: Phasenkontrastmikroskopie bei RGC-5 mit TSA nach Wood**

Gezeigt sind repräsentative Phasenkontrast-Bilder der Zellen in 100facher Vergrößerung. Im Rahmen des Wood-Protokolls konfluieren die Zellen bereits nach 48 Stunden größtenteils, was eine detaillierte morphologische Betrachtung erschwerte. Dennoch war zu erkennen, dass sich bei Langzeitinkubation mit hohen TSA-Konzentrationen der Zellkörper rundete und die Zellzahl nahm ab. Nach fünftägiger Inkubation konnte sogar bei der Kontrollkultur und bei Behandlung mit 40 nM ein deutlicher Zelluntergang beobachtet werden.

### **3.3.2 Expression neuronaler Marker**

#### *3.3.2.1 $\beta$ -III-Tubulin-Expression in der Immunhistochemie*

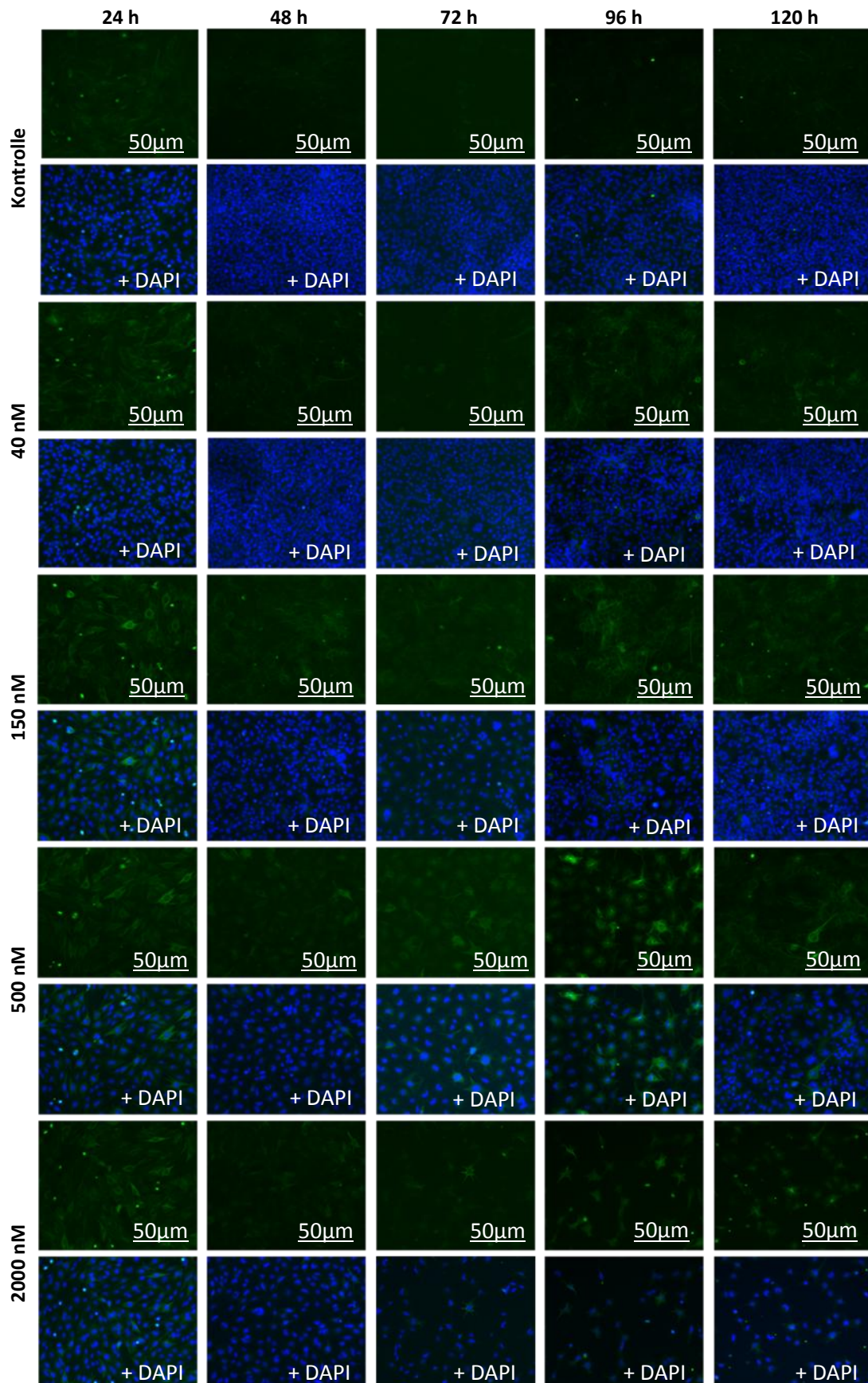
Bei Inkubation nach Schwechter war neben einem diskreten Anstieg der Expression am ersten Behandlungstag vor allem beim Einsatz von 500 nM TSA nach 96 und 120 Stunden eine deutlich gesteigerte  $\beta$ -III-Tubulin-Expression zu erkennen (s. Abbildung 28). Bei Differenzierung nach Wood war ebenfalls überwiegend bei hohen TSA-Konzentrationen und Langzeitinkubation die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression gesteigert. Besonders deutlich stieg die Expression bei Einsatz von 500 nM nach 96 und 120 Stunden Inkubation (s. Abbildung 29).

#### *3.3.2.2 $\beta$ -III-Tubulin-Expression im Western Blot*

Bei Inkubation nach Schwechter zeigte sich in den ersten 48 Stunden eine Erhöhung der  $\beta$ -III-Tubulin-Expression, nach 72 Stunden unterschieden sich behandelte Zellen nicht von unbehandelten und nach 96stündiger Inkubation exprimierten wieder alle behandelten Zellen mehr  $\beta$ -III-Tubulin als die Kontrolle. Bei Behandlung der Zellen über fünf Tage konnte bei Einsatz von 500 nM sogar mehr als eine Verdopplung der Expression gemessen werden. Die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei Behandlung nach Wood war ebenfalls innerhalb der ersten Inkubationstage bei allen TSA-behandelten Zellen geringfügig erhöht. Ab den vierten Inkubationstag war ein dosisabhängiger Anstieg der Expression bei behandelten Zellen zu erkennen. Am deutlichsten war der Expressionsanstieg bei Einsatz von 500 nM TSA, wobei es zu einer Steigerung um den Faktor 2,5 nach 120 Stunden kam. Im Rahmen beider Differenzierungsprotokolle ergab sich eine maximale  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei Langzeitinkubation mit 500 nM TSA. Bei Differenzierung nach Wood war der Expressionsanstieg im Vergleich zum Schwechter-Protokoll ausgeprägter (s. Abbildungen 30 und 31).

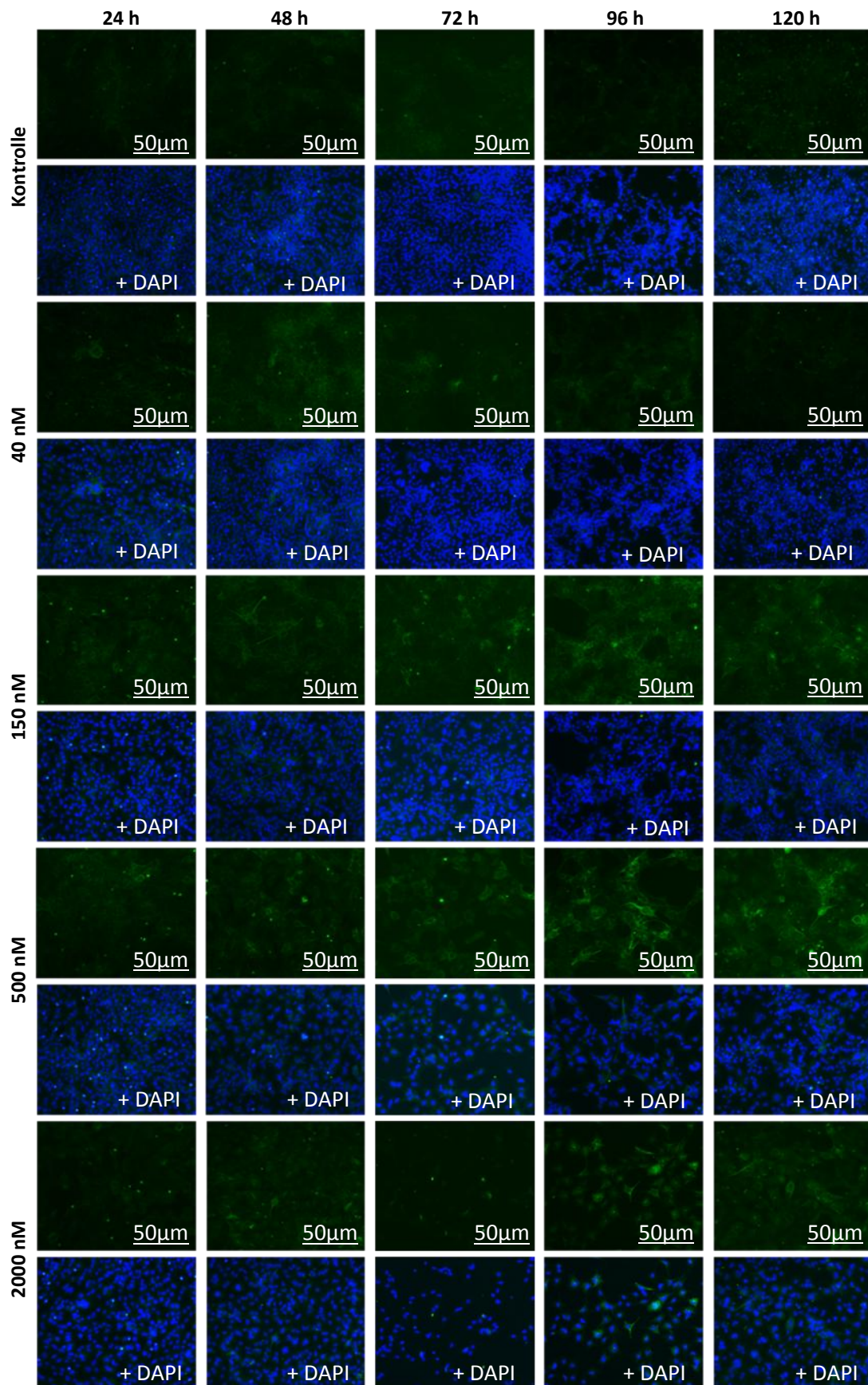
So bestätigte sich auch im Western Blot die positive Wirkung der Langzeitinkubation mit 500 nM TSA auf die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5-Zellen.





*Abbildung 28:  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter*

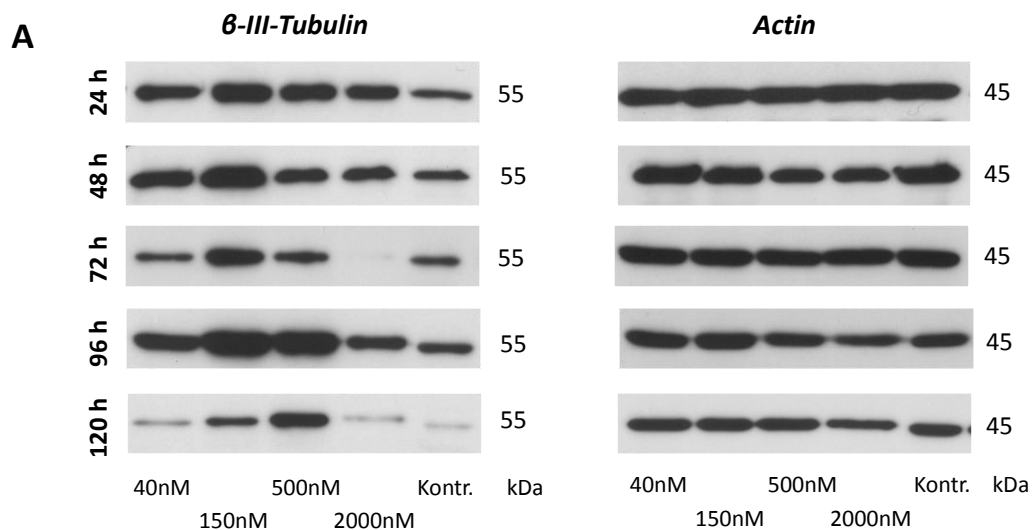
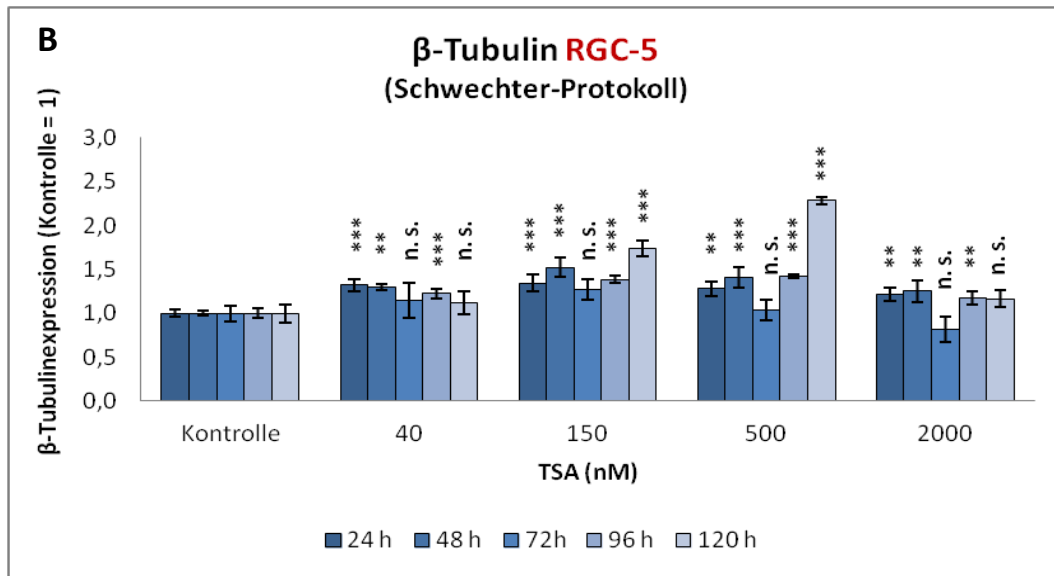
Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung sowie korrespondierende Aufnahmen mit der DAPI-Kernfärbung. Bei Behandlung nach Schwechter war v.a. beim Einsatz von 500 nM TSA nach Langzeitinkubation eine stark gesteigerte  $\beta$ -III-Tubulin-Expression erkennbar.



**Abbildung 29:  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 mit TSA nach Wood**

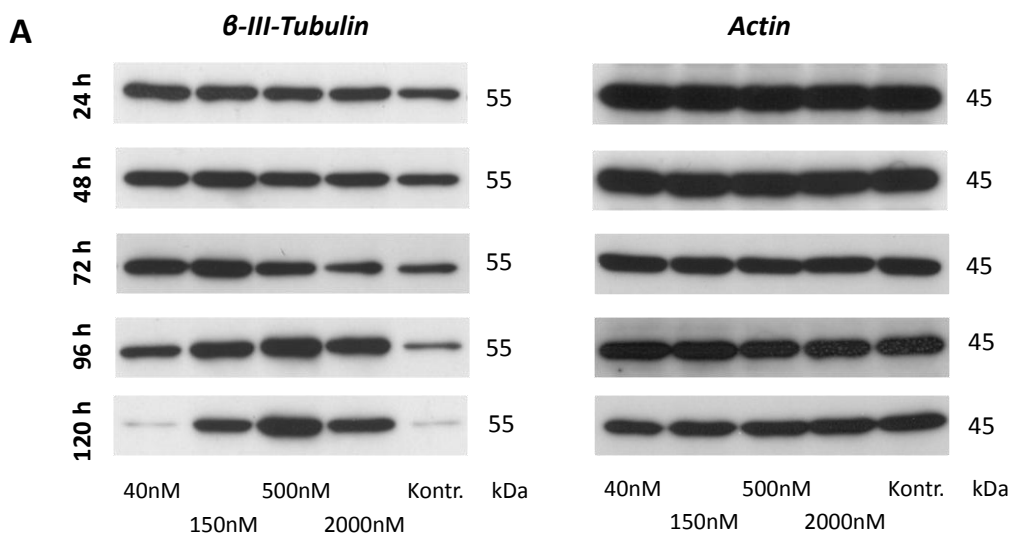
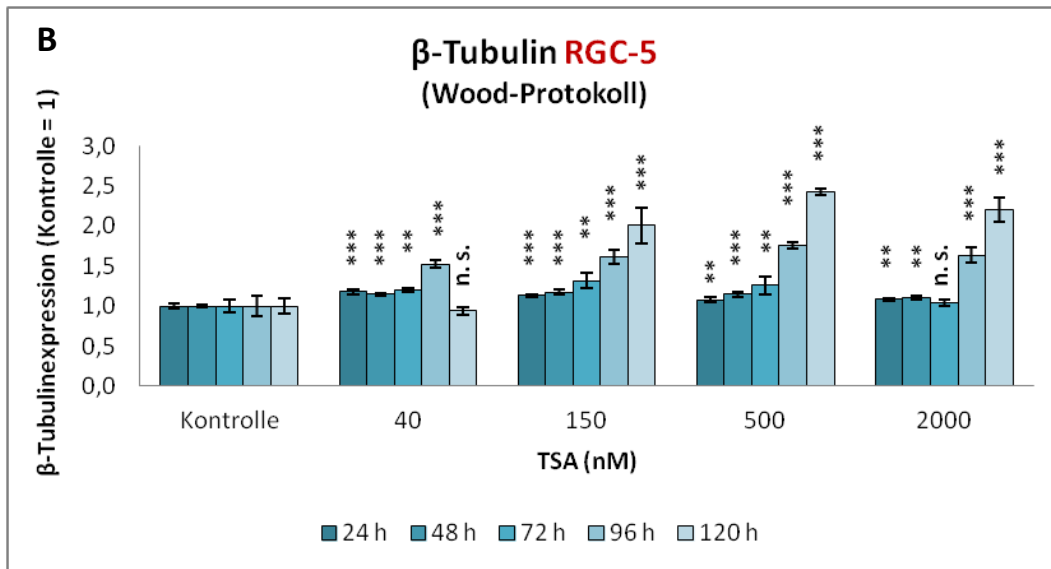
Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung sowie korrespondierende Aufnahmen mit der DAPI-Kernfärbung. Bei Inkubation nach Wood war überwiegend bei hohen TSA-Konzentrationen und Langzeitinkubation die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression gesteigert, v.a. bei Einsatz von 500 nM nach 96 und 120 Stunden.





**Abbildung 30:  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter**

**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für  $\beta$ -III-Tubulin (55 kDa) und das Haushaltsprotein Actin (45 kDa) für die jeweiligen Konzentrationen TSA zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Jeder Versuch wurde vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Bei Differenzierung der RGC-5-Zellen nach Schwechter stieg die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten stets an. Innerhalb der ersten drei Tage war die Expression v.a. bei Inkubation mit 150 nM TSA erhöht, bei Differenzierung über längere Zeiten bei Einsatz von 500 nM. Eine maximale  $\beta$ -III-Tubulin-Expression wurde mit einer Steigerung um den Faktor 2,3 ( $p < 0,001$ ) nach 120stündiger Inkubation mit 500 nM TSA erreicht.



**Abbildung 31:  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bei RGC-5 mit TSA nach Wood**

**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für  $\beta$ -III-Tubulin (55 kDa) und das Haushaltsprotein Actin (45 kDa) für die jeweiligen Konzentrationen TSA zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Jeder Versuch wurde vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Die nach Wood behandelten RGC-5-Zellen verhielten sich ähnlich wie nach Schwedter differenzierte. Innerhalb der ersten zwei Behandlungstage exprimierten die behandelten Zellen vor allem bei niedrigen TSA-Konzentrationen vermehrt  $\beta$ -III-Tubulin. Bei längeren Inkubationszeiten waren vor allem mit 500 nM TSA inkubierte Zellen der Kontrolle in ihrer  $\beta$ -III-Tubulin-Expression überlegen, besonders deutlich nach 120 Stunden Inkubation mit einer Erhöhung auf das 2,5fache ( $p < 0,001$ ).

### 3.3.2.3 Neuronale Marker: MAP-2, Tau, hNF (Immunhistochemie)

Im Rahmen beider Differenzierungsprotokolle ließ sich die Expression des neuronalen Markers MAP-2 durch Langzeitinkubation (96 und 120 Stunden) mit 500 und 2000 nM TSA steigern, wobei bei 2000 nM die Zellzahl stark einknickte, v.a. bei Inkubation nach Schwechter. Bei Behandlung nach Wood waren nach 120 Stunden sogar alle behandelten Zellen, also auch Kulturen mit geringeren TSA-Konzentrationen, stärker positiv (s. Abbildung 32).

Auch die Tau-Expression konnte durch Behandlung nach Schwechter und Wood nach 96 und 120 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA gesteigert werden (s. Abbildung 33).

Die Expression von humanem Neurofilament stieg zwar nur leicht mit zunehmender Inkubationszeit, war aber im Rahmen beider Protokolle nach 96 und 120 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA deutlich erhöht gegenüber Kontrollzellen und Zellen nach nur 24 Stunden Inkubation (s. Abbildung 34).

Die beiden Differenzierungsprotokolle unterschieden sich nicht wesentlich in ihrem Effekt auf die Expression neuronaler Marker.



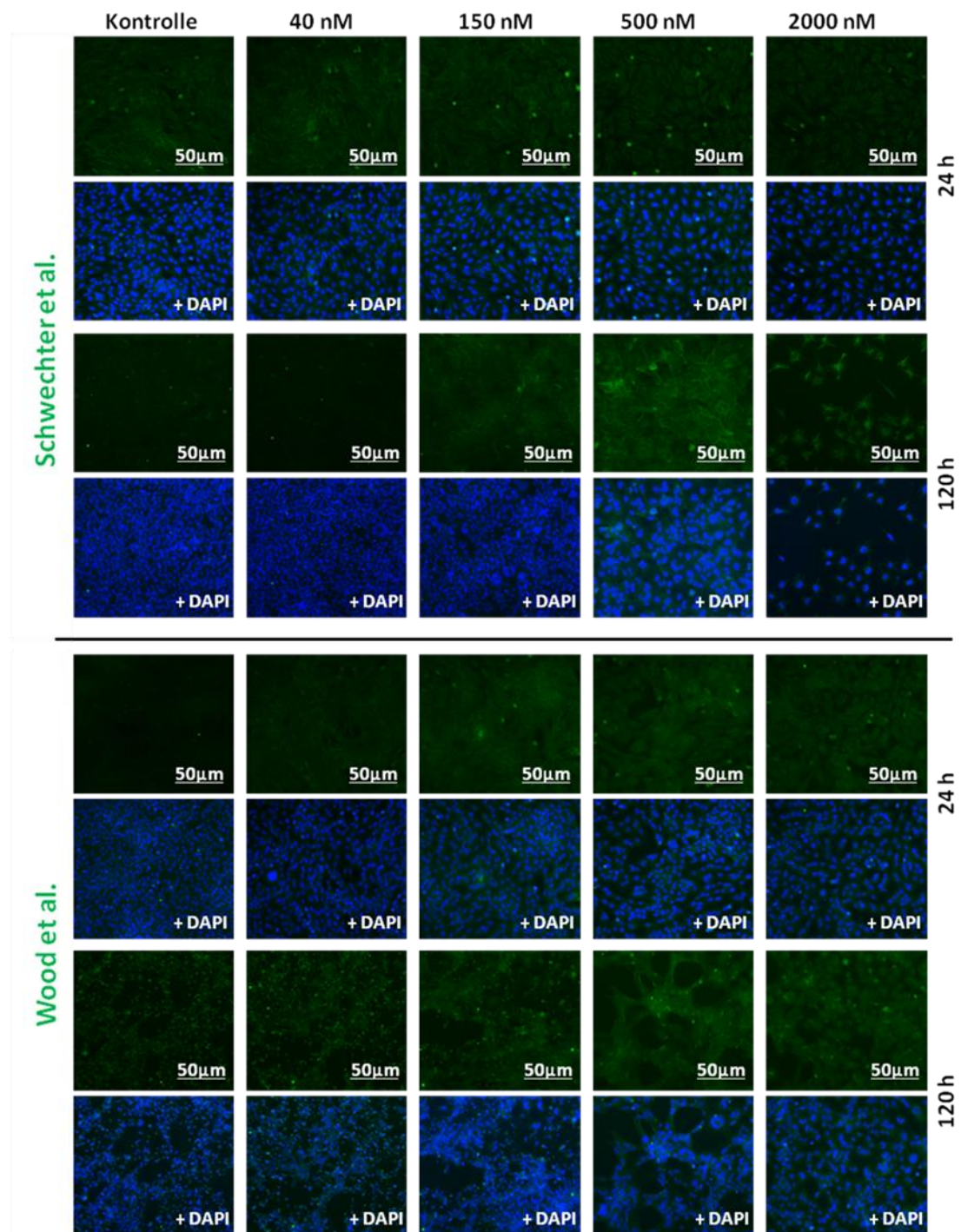
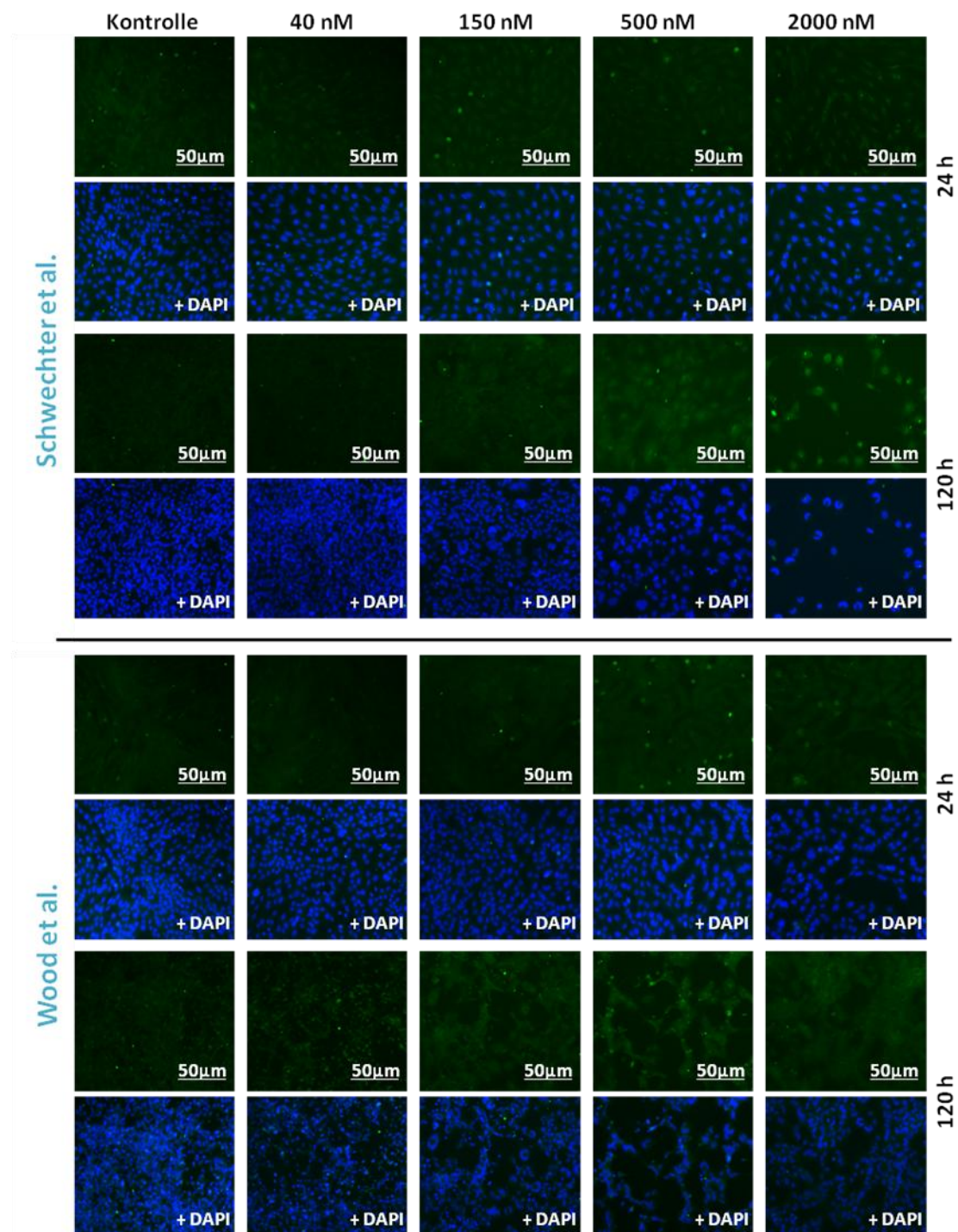


Abbildung 32: MAP-2-Expression bei RGC-5 nach Schechter und Wood

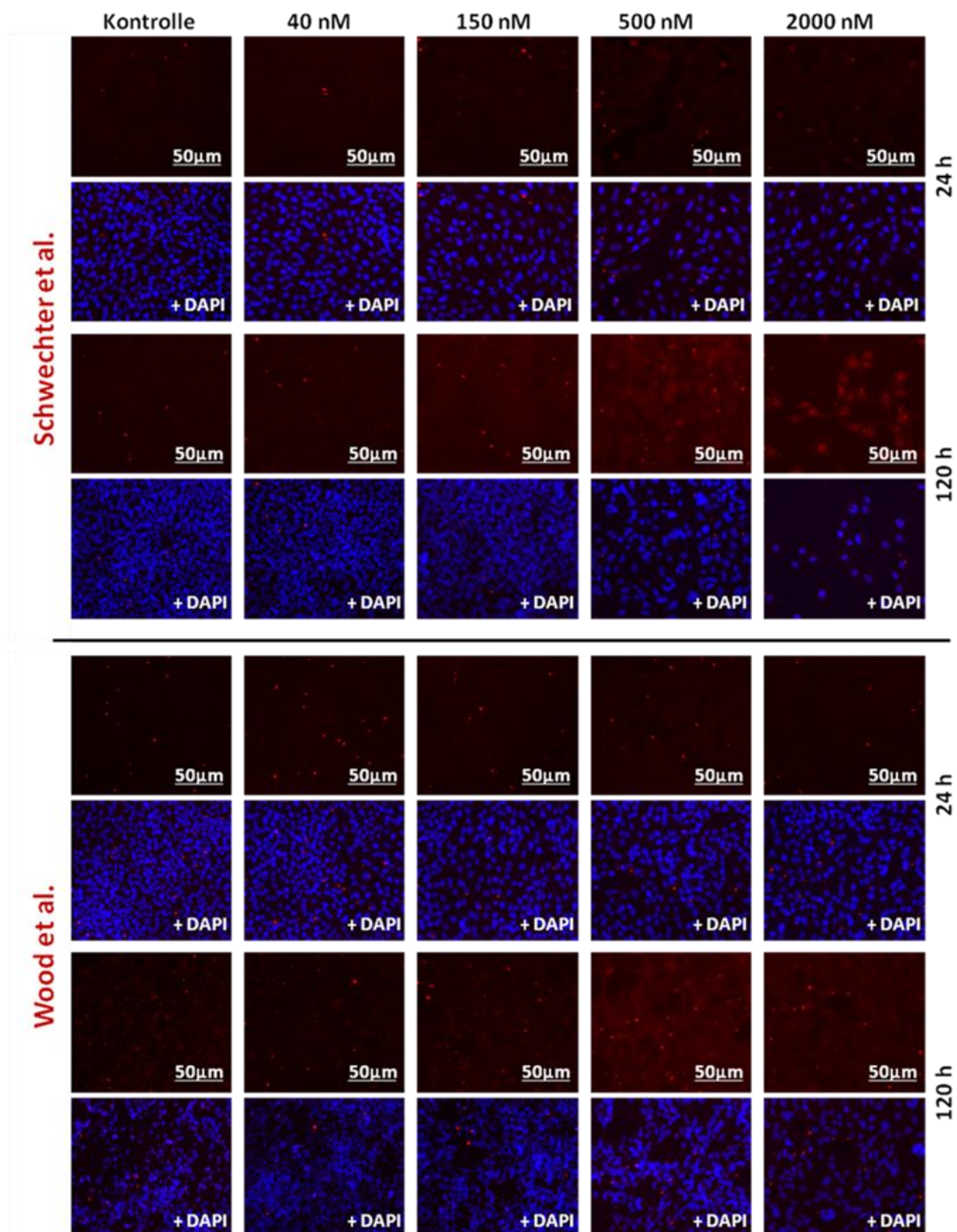
Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung nach 24 und 120 Stunden Inkubation mit 40, 150, 500 und 2000 nM TSA im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Es handelt sich jeweils um Fluoreszenzbilder von mit Antikörpern gegen MAP-2 angefärbte Zellen und die entsprechenden zusätzlich mit der DAPI-Kernfärbung aufgenommenen Bilder. Die MAP-2-Expression ließ sich bei RGC-5-Zellen im Rahmen beider Differenzierungsprotokolle bei Langzeitinkubation (96 und 120 Stunden) mit 500 nM TSA deutlich steigern. Wenn nach Wood inkubiert wurde waren nach 120 Stunden sogar alle behandelten Zellen, nicht nur die 500nM-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle stärker positiv.



**Abbildung 33: Tau-Expression bei RGC-5 nach Schechter und Wood**

Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung nach 24 und 120 Stunden Inkubation mit 40, 150, 500 und 2000 nM TSA im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Es handelt sich um Fluoreszenzbilder von mit Antikörpern gegen Tau angefärbten Zellen und die korrespondierenden mit der DAPI-Kernfärbung aufgenommenen Bilder. Die Expression des neuronalen Markers Tau konnte durch Behandlung nach Schwechter und Wood v.a. nach 96 und 120 Stunden und Inkubation mit 500 nM TSA steigert werden.





**Abbildung 34: hNF-Expression bei RGC-5 nach Schwechter und Wood**

Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200facher Vergrößerung nach 24 und 120 Stunden Inkubation mit 40, 150, 500 und 2000 nM TSA im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Es handelt sich jeweils um Fluoreszenzbilder von mit Antikörpern gegen hNF angefärbte Zellen und die entsprechenden zusätzlich mit der DAPI-Kernfärbung aufgenommenen Bilder. Die Expression von humanem Neurofilament (hNF) konnte zwar nur leicht mit zunehmender Inkubationszeit gesteigert werden, war aber im Rahmen beider Protokolle nach 96 und v.a. 120 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA deutlich erhöht gegenüber Kontrollzellen.

### 3.3.3 Apoptoseverhalten

#### 3.3.3.1 Caspase-3/7-Assay

In den ersten 48 Stunden zeigte sich ein Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität bei Inkubation mit TSA. Bei Langzeitinkubation sank die Caspase-3/7-Aktivität der behandelten Zellen oder war mit der der Kontrolle vergleichbar. Es war ein zeitabhängiger und weitestgehend auch dosisabhängiger Abfall zu beobachten. Am geringsten war die Aktivität bei Einsatz von 500 nM TSA während sie bei 2000 nM oft wieder leicht anstiegen. Am stärksten reagierten RGC-5-Zellen also bei kurzer Inkubationszeit und hohen TSA-Konzentrationen mit Apoptose. Langzeitinkubation führen hingegen zu einer Reduktion der Apoptose mit einer minimalen Caspase-3/7-Aktivität nach 96 Stunden Inkubation nach dem Schwlechter-Protokoll und einem Abfall auf 22 % der Kontrolle ( $p < 0,001$ ) und nach 120 Stunden Inkubation im Rahmen des Wood-Protokolls mit einem Abfall auf 45 % der Kontrolle ( $p < 0,001$ ). Diese Veränderungen zeigten sich im Rahmen beider Differenzierungsprotokolle. Der Aktivitätsanstieg bei Inkubation nach Wood war deutlicher und der Abfall geringer. (s. Abbildung 35).

#### 3.3.3.2 Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis

Bei Differenzierung nach Schwlechter zeigte sich nach 24 Stunden bei hohen TSA-Konzentrationen ein signifikanter Anstieg des Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnisses. Zu späteren Zeitpunkten übertraf der Quotient der behandelten Zellen nie den der Kontrollzellen. Nach 72 und 120 Stunden Inkubation war bei höheren TSA-Konzentrationen ein Abfall des Quotienten zu beobachten (s. Abbildung 36). Wurden RGC-5-Zellen nach Wood differenziert, stiegen die Werte des Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnisses in den ersten zwei Tagen dosisabhängig. Am vierten Behandlungstag fiel das Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis beim Einsatz von 500 nM TSA ab. Nach 120 Stunden entsprachen nur noch mit 40 nM behandelte Zellen der Kontrolle bei allen anderen Kulturen fiel der Quotient auf ca. 20 % ab (s. Abbildung 37). Die Unterschiede zwischen den Protokollen waren gering. Unter Differenzierung nach Wood war der Apoptose-Anstieg am ersten Tag deutlicher und auch am zweiten Tag noch nachvollziehbar. Im Rahmen des Schwlechter-

Protokolls konnte bereits nach 72 Stunden ein sinkendes Gesapltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis unter TSA-Behandlung beobachtet werden. Minimale Werte ergaben sich nach 120 Stunden Differenzierung mit 500 und 150 nM nach Wood.

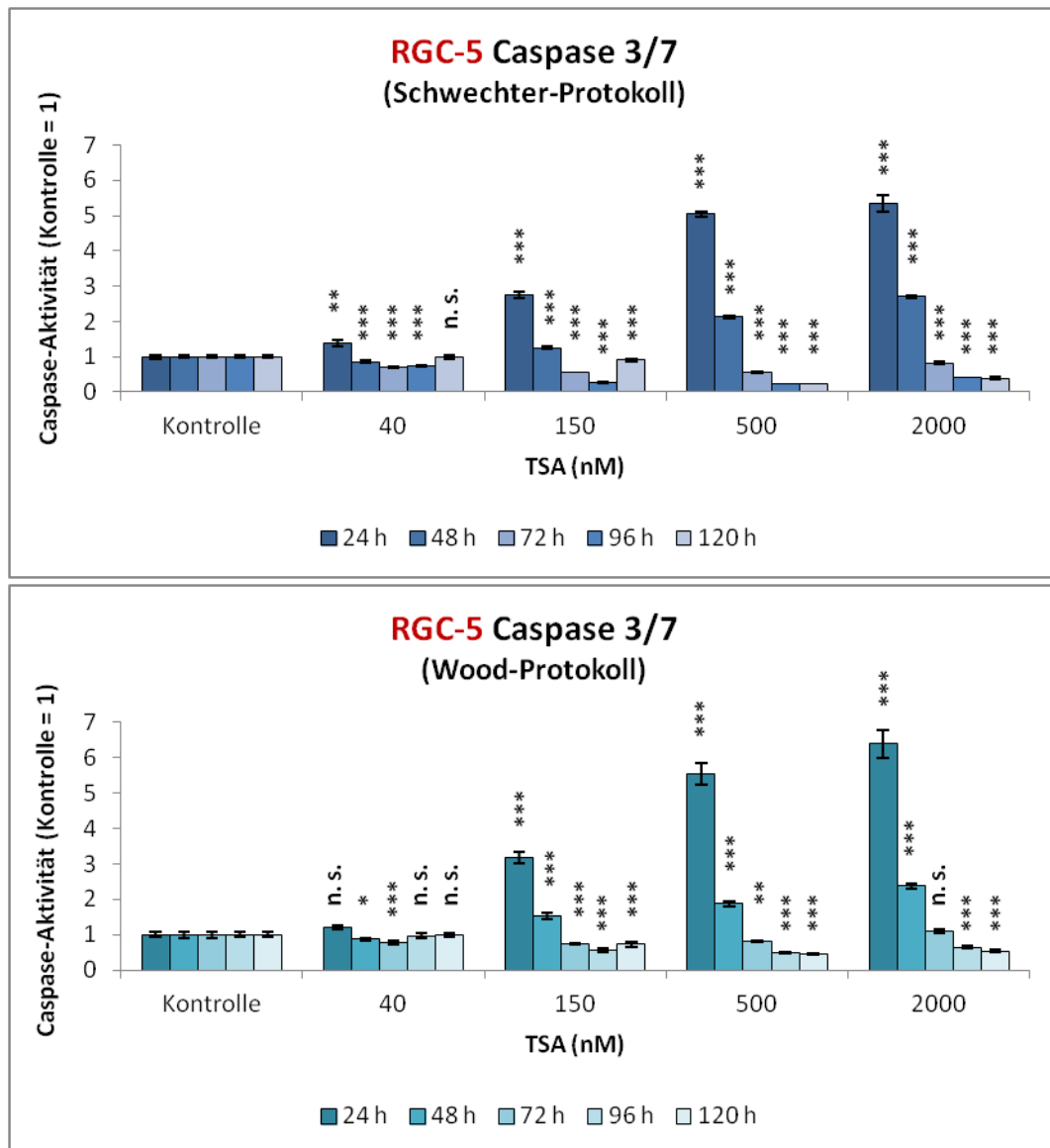
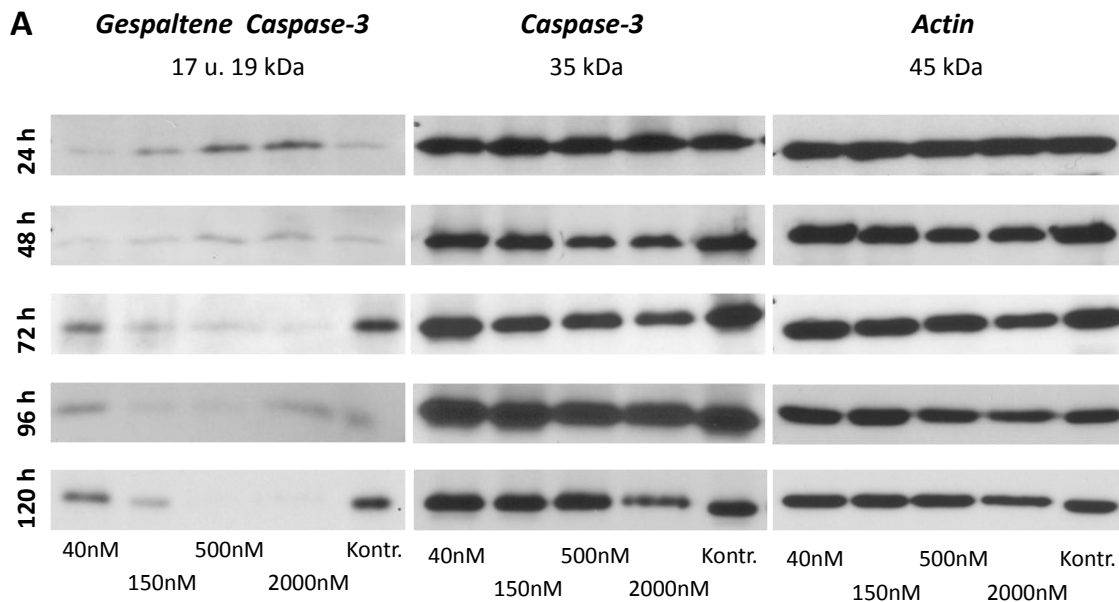
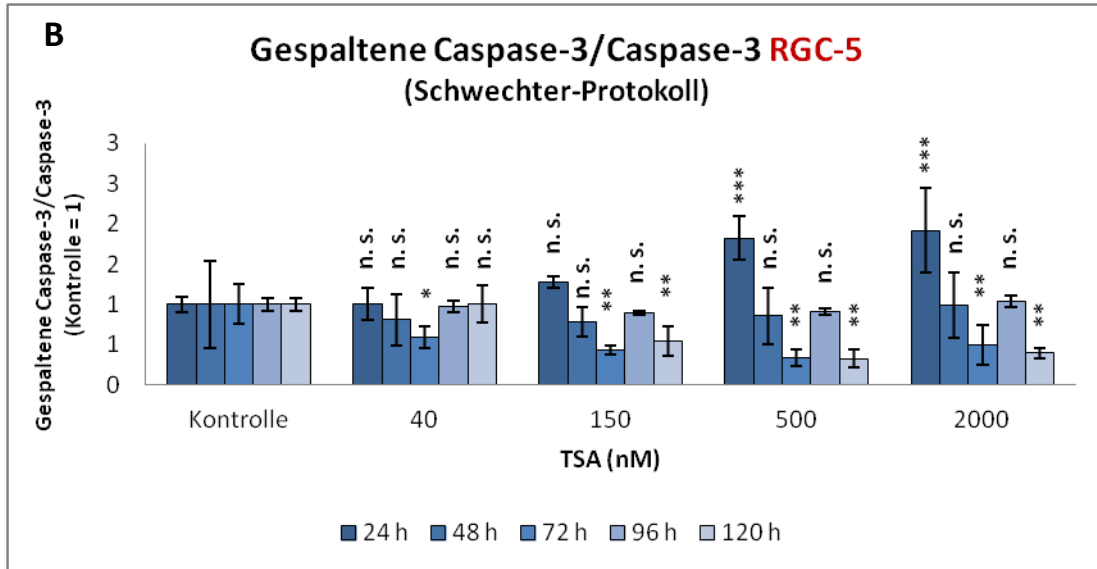


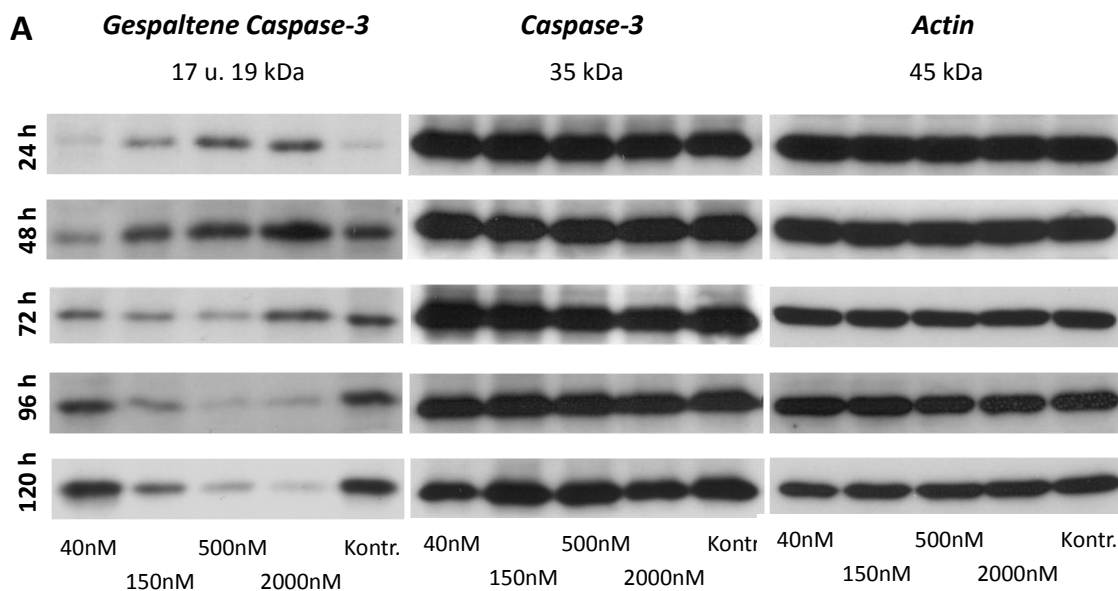
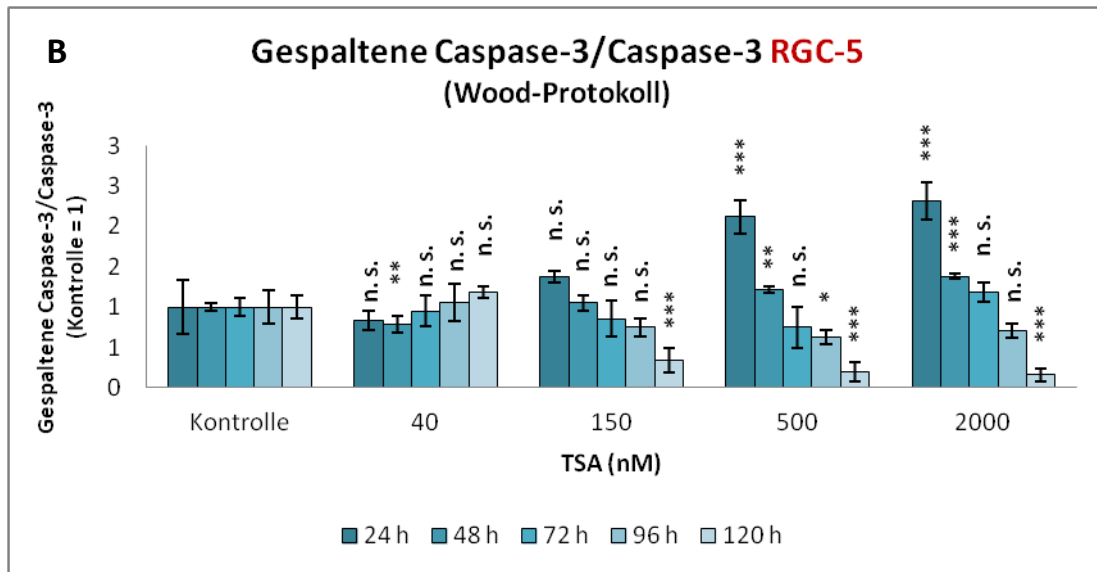
Abbildung 35: Caspase-3/7-Aktivität bei RGC-5 mit TSA nach Schwlechter und Wood

**A** und **B** zeigen die Caspase-3/7-Aktivität bei mit TSA differenzierten RGC-5-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Die Versuche wurden sechsfach durchgeführt ( $n=6$ ). Die Caspase-3/7-Aktivität TSA-inkubierter Zellen stieg in den ersten Tagen an. Nach Langzeitinkubation fiel sie bei beiden Protokollen unter die der Kontrolle, wobei ein maximaler Abfall nach 96stündiger Inkubation mit 500 nM TSA nach Schwlechter erreicht wurde (22 % der Kontrolle). Beim Wood-Protokoll war der Aktivitätsanstieg ausgeprägter, der Abfall schwächer als bei Differenzierung nach Schwlechter.



**Abbildung 36: Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3 bei RGC-5 nach Schwechter**

**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für die Marker Caspase-3 (35 kDa) und gespaltene Caspase-3 (17 und 19 kDa) sowie für das Haushaltsprotein Actin (45 kDa). **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Bei Differenzierung nach Schwechter stieg nach 24 Stunden Inkubation mit hohen TSA-Konzentrationen das Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis an, nach 48 Stunden unterschied es sich nicht von dem der Kontrolle. Ab dem dritten Inkubationstag fiel der Quotient unter TSA-Behandlung ab, am stärksten bei Einsatz von 500 nM TSA nach 72 und 120 Stunden mit einem Abfall auf rund 30 % der Kontrolle. Für Veränderungen war meist ein Anstieg oder Abfall der gespaltenen Caspase-3 verantwortlich.



**Abbildung 37: Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3 bei RGC-5 nach Wood**

**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für die Marker Caspase-3 (35 kDa) und gespaltene Caspase-3 (17 und 19 kDa) sowie für das Haushaltsprotein Actin (45 kDa). **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Bei Differenzierung nach Wood kam es innerhalb der ersten zwei Inkubationstage zu einer Erhöhung des Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnisses bei Inkubation mit 500 und 2000 nM TSA. Ab dem vierten Inkubationstag sank das Verhältnis unter Einsatz höherer TSA-Konzentrationen. Ein Minimum wurde nach 120 Stunden Inkubation mit 500 nM und einem Abfall auf 20 % der Kontrolle erreicht. Für etwaige Veränderungen war immer der Anstieg oder Abfall der gespaltenen Caspase-3 verantwortlich.



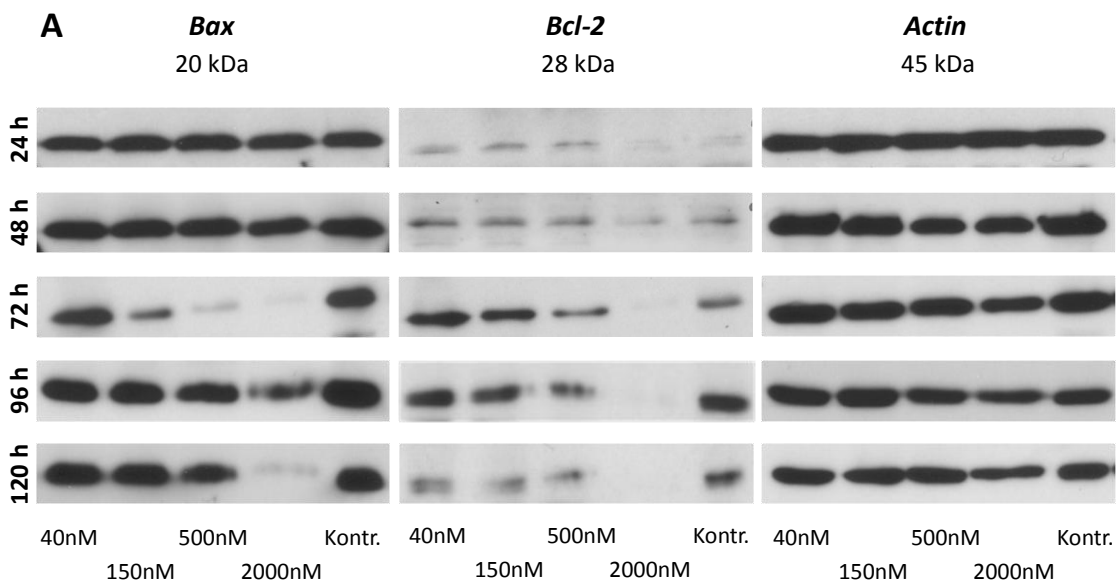
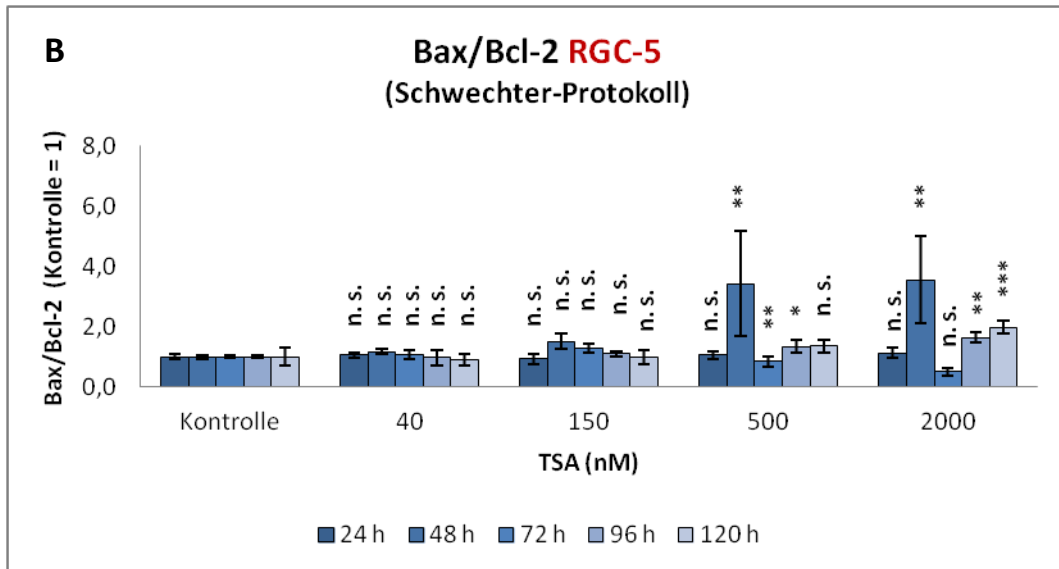
### 3.3.3.3 Bax/Bcl-2-Verhältnis

Bei Differenzierung nach Schwechter hatte die Inkubation mit niedrigen TSA-Konzentrationen keinen Effekt auf das Bax/Bcl-2-Verhältnis. Wurden 500 nM TSA eingesetzt, war nach 48 und 96 Stunden ein Anstieg des Quotienten zu erkennen. Auch bei Einsatz von 2000 nM TSA kam es zum Anstieg des Verhältnisses ab dem zweiten Inkubationstag mit einem Maximum nach 120 Stunden. Nur nach 72stündiger Inkubation mit 500 nM TSA sank der Quotient (s. Abbildung 38). Im Rahmen des Wood-Protokolls kam es unter Einsatz von 40, 150 und 500 nM TSA nicht zu wesentlichen Veränderungen des Bax/Bcl-2-Verhältnisses, nur nach 120 Stunden Inkubation mit 40 nM TSA stieg der Quotient stark an. Wurde mit 2000 nM TSA inkubiert, war ein näherungsweise zeitabhängiger Anstieg des Verhältnisses zu beobachten bis hin zu einer maximalen Steigerung um den Faktor 4,5 nach 120 Stunden (s. Abbildung 39).

Sowohl unter Behandlung nach Wood als auch nach Schwechter wirkten sich niedrige TSA-Konzentrationen nicht auf das Bax/Bcl-2-Verhältnis aus. Höhere Dosen führten zu schwankenden Werten und tendenziell eher zu einem Anstieg des Bax/Bcl-2-Quotienten. Ursächlich für eine Veränderung des Quotienten war meist eine veränderte Bcl-2-Expression.

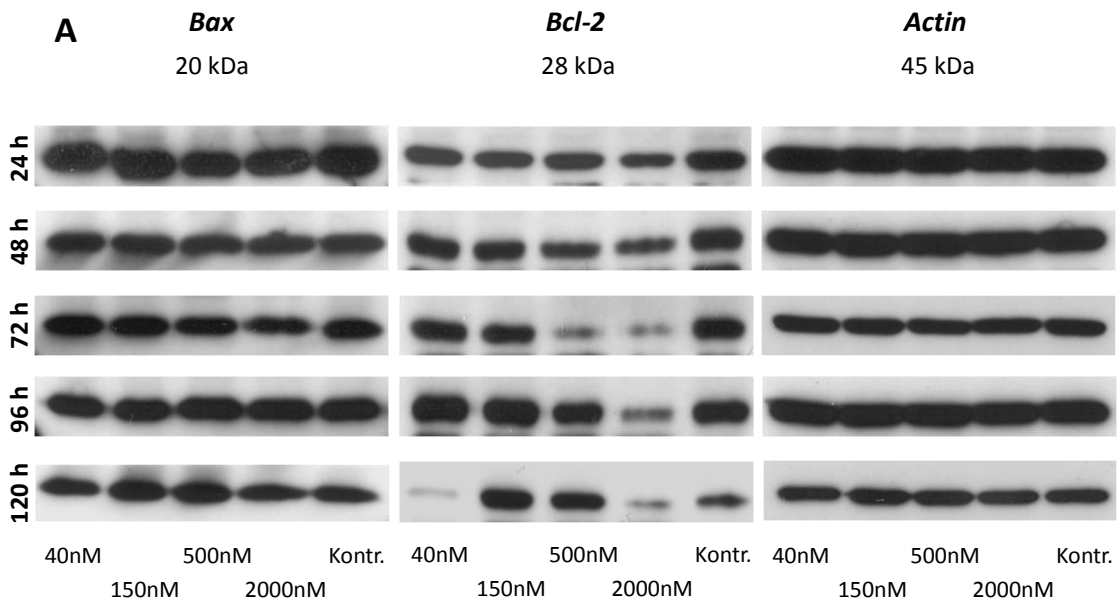
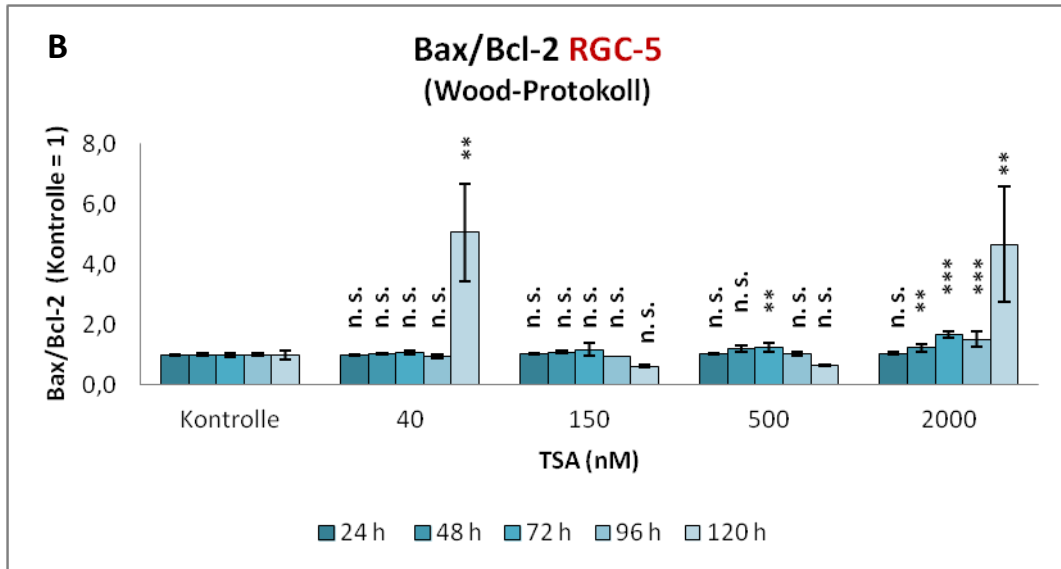
### 3.3.4 Zelltod (PI-Färbung)

Bei Inkubation nach Schwechter waren in den ersten drei Inkubationstagen mit steigender TSA-Dosis vermehrt PI-positive Zellen sichtbar. Nach 96 und 120 Stunden konnte v.a. bei Behandlung mit 40 und 150 nM TSA ein Absterben der Zellen beobachtet werden, während bei Differenzierung mit 500 nM TSA deutlich weniger PI-positive Zellen zu erkennen waren. Bei Differenzierung nach Wood verhielt es sich ähnlich, allerdings waren in den ersten Inkubationstagen weniger PI-positive Zellen sichtbar als bei Inkubation nach Schwechter. Nach vier und fünf Tagen waren deutlich mehr Zellen unter Behandlung mit 40 und 150 nM TSA abgestorben, ebenso bei den Kontrollzellen. Tote Zellen lösten sich vom Plattenboden, erschienen weißlich und schwammen frei im Medium (s. Abbildungen 40 und 41).



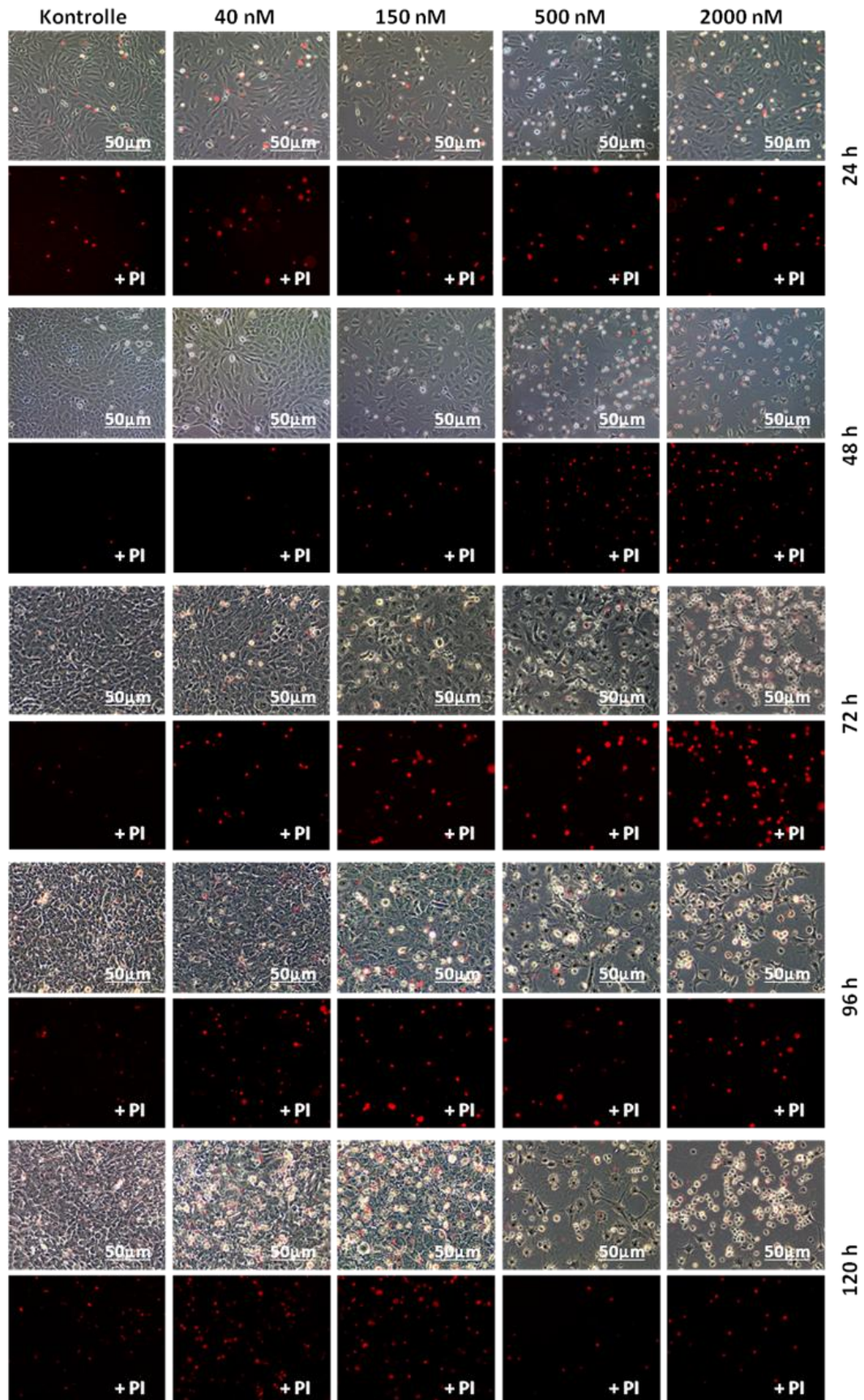
**Abbildung 38: Bax/Bcl-2-Verhältnis bei RGC-5 nach Schwechter**

**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für die Marker Bax (20 kDa) und Bcl-2 (28 kDa) sowie für das Haushaltprotein Actin (45 kDa). **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Bei Inkubation nach Schwechter zeigte sich unter Behandlung mit 40 und 150 nM TSA zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zur Kontrolle. Bei Einsatz von 500 und 2000 nM TSA reagierten die RGC-5-Zellen nach 48 Stunden mit einem deutlichen Anstieg des Bax/Bcl-2-Verhältnisses auf das 3,5fache. Nach 72 Stunden war bei 500 nM TSA ein Absinken des Verhältnisses zu erkennen. Nach 96 und 120 Stunden stieg der Quotient bei höheren TSA-Konzentrationen wieder leicht an.



**Abbildung 39: Bax/Bcl-2-Verhältniss bei RGC-5 nach Wood**

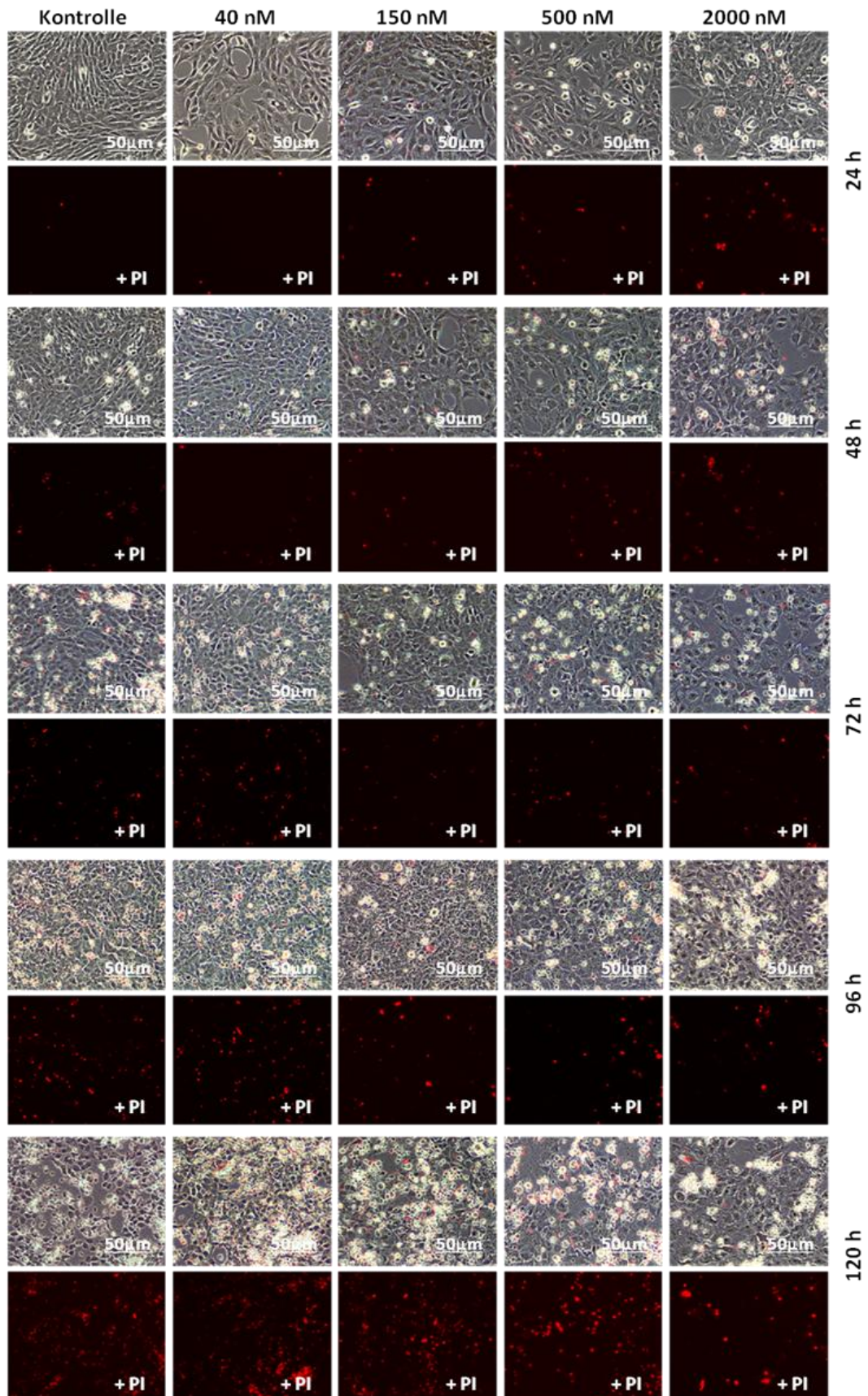
**A** zeigt repräsentative Western-Blot-Banden für die Marker Bax (20 kDa) und Bcl-2 (28 kDa) sowie für das Haushaltsprotein Actin (45 kDa). **B** bildet die daraus errechnete Expression quantitativ ab, wobei die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben sind, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden vierfach durchgeführt ( $n=4$ ). Auch bei Inkubation nach Wood war bei niedrigen TSA-Konzentrationen bis auf eine Ausnahme ( $> 5$ fache Steigerung bei 120 Stunden Inkubation mit 40 nM TSA) kein Effekt zu erkennen. Das war auch bei Inkubation mit 500 nM TSA größtenteils der Fall. Bei Einsatz von 2000 nM TSA war ein dosisabhängiger Anstieg des Verhältnisses zu erkennen mit einer maximalen Steigerung nach 120stündiger Inkubation auf über das 4,5fache der Kontrolle ( $p=0,0036$ ). Veränderungen waren hauptsächlich durch Zu- oder Abnahme der Bcl-2-Expression bedingt.



*Abbildung 40: PI-Färbung bei RGC-5 mit TSA nach Schwechter*

Gezeigt sind repräsentative Phasenkontrastaufnahmen und Fluoreszenzaufnahmen bei 100facher Vergrößerung. Bei Behandlung nach Schwechter war in den ersten Inkubationstagen ein konzentrationsabhängiger Anstieg der PI-positiven Zellen erkennbar. Nach 96 und 120 Stunden waren jedoch mit 500 nM behandelte RGC-5-Zellen nur noch selten positiv.





**Abbildung 41: PI-Färbung bei RGC-5 mit TSA nach Wood**

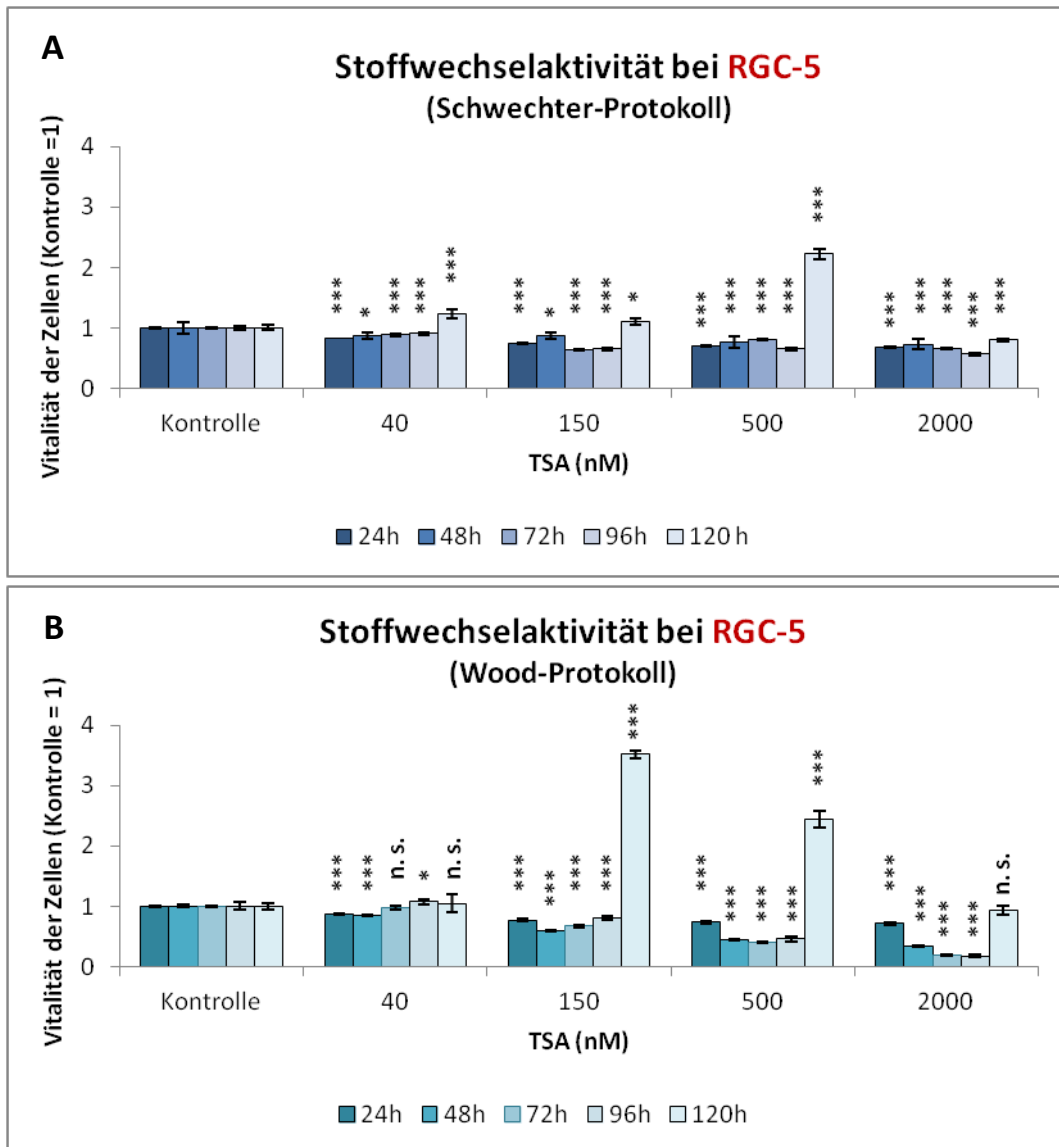
Gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen und Fluoreszenzaufnahmen bei 100facher Vergrößerung. Zuerst waren nur unter Einsatz hoher TSA-Konzentrationen PI-positive Zellen zu erkennen. Nach Langzeitinkubation starben v.a. mit 40 und 150 nM TSA inkubierte Zellen und Kontrollzellen ab während der Zelluntergang nach 96 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA noch moderat war.

### **3.3.5 Vitalität (MTS-Assay)**

Bei Differenzierung nach Schwechter lagen bereits nach 24 Stunden alle gemessenen Absorptionen behandelter Zellen unter den Kontrollwerten. Ab dem zweiten Inkubationstag konnte ein näherungsweise dosisabhängiger Abfall der Vitalität beobachtet werden. Nach 120 Stunden Inkubationszeit ergaben sich jedoch völlig andere Messwerte: Ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Stoffwechselaktivität bis hin zu einer Verdopplung bei 500 nM TSA und dann ein Abfall bei 2000 nM TSA auf 80 % der Kontrolle. Im Rahmen des Wood-Protokolls kam es in den ersten vier Behandlungstagen ebenfalls zu einem Vitalitätsabfall mit steigender TSA-Konzentration. Doch auch hier stieg die Stoffwechselaktivität nach 120 Stunden. Bei Behandlung mit 150 nM TSA kam es zu einer Verdreifachung und bei Inkubation mit 500 nM TSA zu einer Verdopplung der Stoffwechselaktivität. Sowohl der Vitalitätsabfall bei Kurzzeitinkubation als auch der Anstieg bei Langzeitinkubation waren bei Differenzierung nach Wood ausgeprägter (s. Abbildung 42).

### **3.3.6 Zellzahl (Kristallviolett-Färbung)**

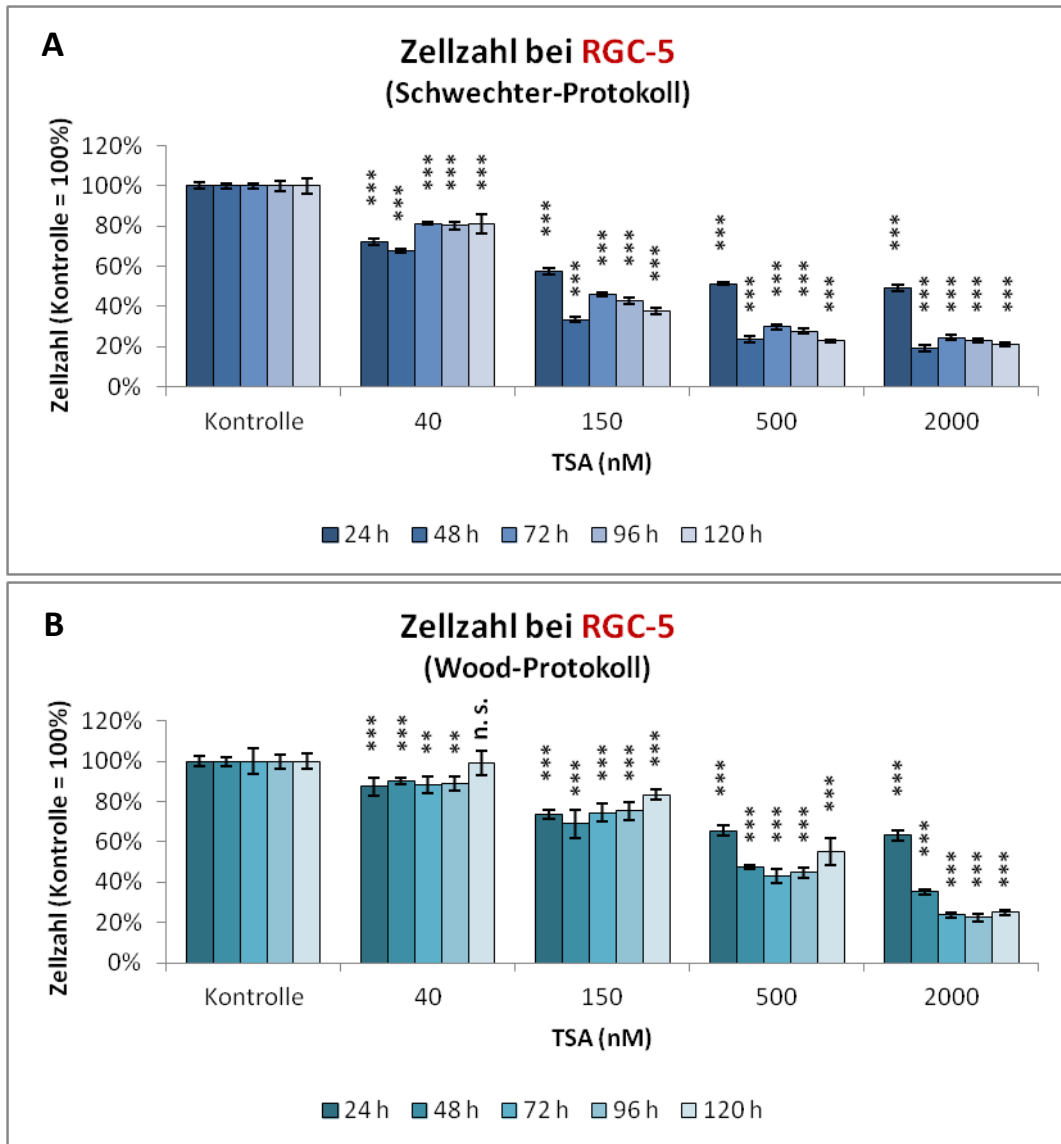
Sowohl bei Differenzierung der RGC-5-Zellen nach Wood als auch nach Schwechter konnte ein dosisabhängiger Abfall der Zellzahl beobachtet werden. Die Zellzahl der behandelten Zellen lag zu jeder Zeit und bei jeder eingesetzten Konzentration TSA signifikant unterhalb der korrespondierenden Kontrollwerte. Während unter Behandlung mit 40 und 150 nM TSA der Faktor Zeit keine entscheidende Rolle zu spielen schien, war bei höheren Konzentrationen ein deutlicher Unterschied zwischen 24stündiger Inkubation und den längeren Inkubationszeiten zu erkennen (Schwechter-Protokoll). Insgesamt sank die Zellzahl unter Anwendung des Wood-Protokolls verglichen zur Kontrolle bei den niedrigeren TSA-Konzentrationen (40 und 150 nM) weniger stark als bei Differenzierung nach Schwechter (s. Abbildung 43).



**Abbildung 42: MTS-Test bei RGC-5 mit TSA nach Schwachter und Wood**

**A** und **B** zeigen die Stoffwechselaktivität bei mit TSA differenzierten RGC-5-Zellen im Verhältnis zu Stoffwechselaktivität der Kontrollzellen (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden sechsmal durchgeführt ( $n=6$ ). Innerhalb der ersten Inkubationstage kam es bei Inkubation der RGC-5-Zellen mit TSA im Rahmen beider Protokolle zum Absinken der Stoffwechselaktivität. Völlig anders verhielt es sich nach 120 Stunden, wo v.a. die Werte der mit 150 und 500 nM TSA differenzierten Zellen die Kontrolle eindeutig übertrafen. Hier schienen TSA-behandelte Zellen wesentlich stoffwechselaktiver zu sein als unbehandelte Kontrollzellen. Dieser Effekt war besonders deutlich bei Differenzierung nach Wood.





**Abbildung 43: Kristallviolett-Färbung bei RGC-5 mit TSA nach Schwlechter und Wood**

**A** und **B** zeigen die Zellzahl bei mit TSA differenzierten RGC-5-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden sechsmal durchgeführt ( $n=6$ ). Im Rahmen beider Protokolle war nach jeder Inkubationszeit ein dosisabhängiger Rückgang der Zellzahl erkennbar. Im Rahmen des Schwlechter-Protokolls war der Zellzahlabfall deutlicher als bei Inkubation nach Wood.

### 3.3.6.1 Absolute Zellzahlen bei RGC-5-Zellen mit 500 nM TSA und ohne TSA

Um den TSA-Effekt auf die RGC-5-Zellzahlen besser beurteilen zu können, wurden exemplarisch für eine Konzentration von 500 nM TSA die Absolutwerte der Kristallviolett-Absorption verglichen und nicht nur die zur Kontrolle in Bezug gesetzten Ergebnisse betrachtet. Bei Differenzierung nach Schwechter ging die Zellzahl sowohl bei TSA-inkubierten Zellen als auch bei Kontrollzellen unter Langzeitinkubation linear zurück, wobei die Kontrolle durch einen anfänglichen Zellzahlanstieg immer um ca. 20 % höher lag. Bei Behandlung nach Wood stieg die Zahl der Kontrollzellen um ungefähr 50 % und blieb konstant erhöht. Behandelte Zellen zeigten beinahe gleichbleibende Werte über den gesamten Inkubationszeitraum. Der relativ zur Kontrolle beobachtete Zellzahlverlust (s. Kapitel 3.3.6) ist folglich auf den Anstieg der Kontrollzellzahl zurückzuführen.

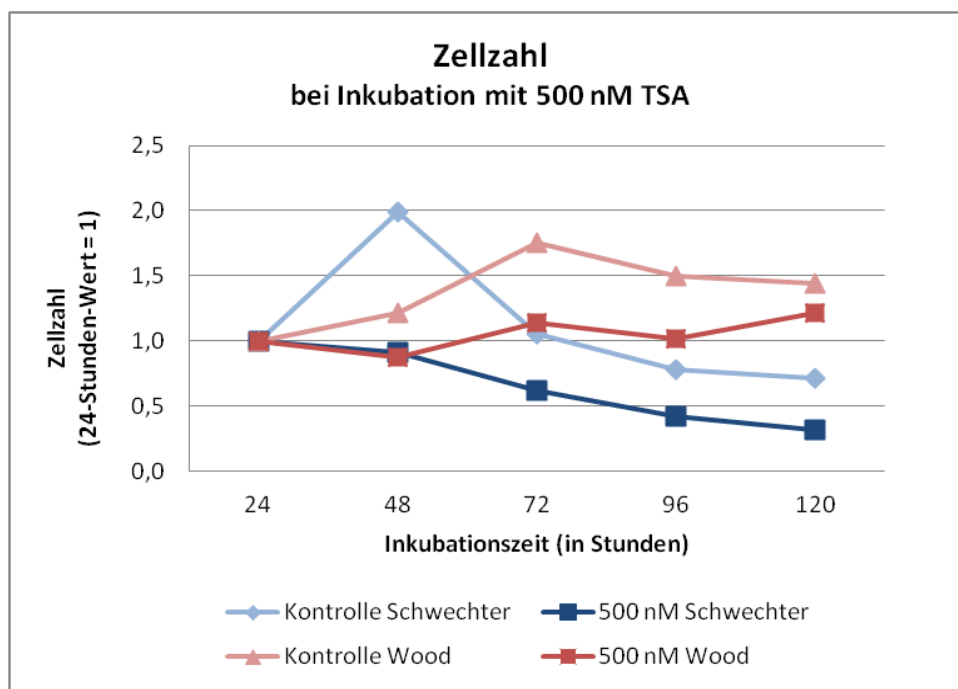
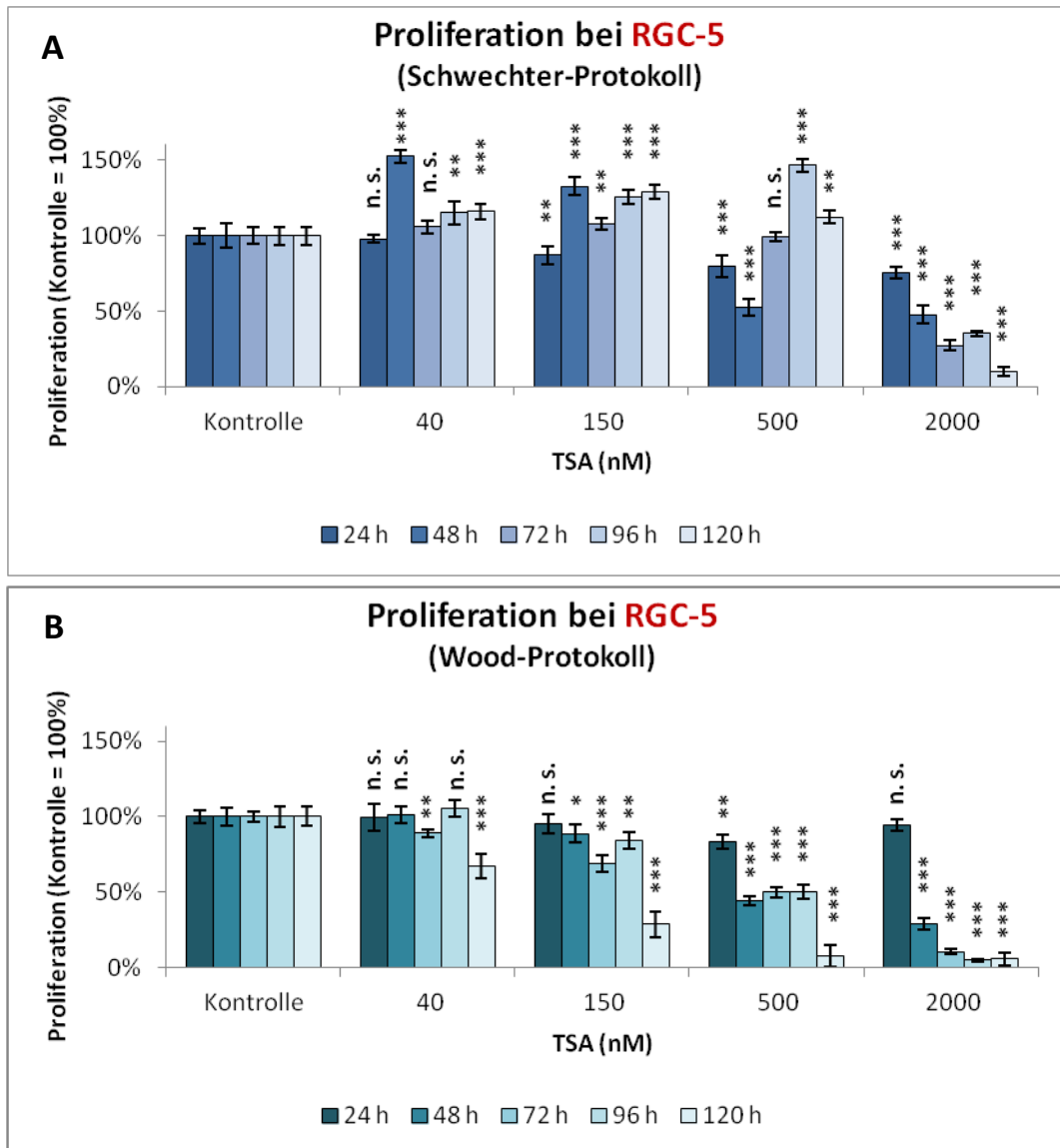


Abbildung 44: Absolute Zellzahl bei RGC-5 mit 500 nM TSA nach Schwechter und Wood

Die Abbildung zeigt exemplarisch für eine TSA-Konzentration von 500 nM die Veränderung der Zellzahl über einen Inkubationszeitraum von 120 Stunden sowie die entsprechenden Kontrollen. Um einen Vergleich zu ermöglichen wurden die 24-Stunden-Werte gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte dazu in Bezug gesetzt. Die Daten sind als Mittelwert angegeben, wobei alle Versuche sechsmal durchgeführt wurden (n=6). Bei Inkubation nach Schwechter sanken unter Langzeitinkubation sowohl die Zellzahlen der Kontrolle als auch die der TSA-behandelten Zellen. Im Rahmen des Wood Protokolls stieg bei Kontrollzellen die Zellzahl auf das 1,5fache und pendelte sich dort ein während bei TSA-behandelten Zellen ungefähr gleichbleibende Werte über den gesamten Inkubationszeitraum messbar waren.

### 3.3.7 Proliferation (BrdU-Assay)

Bei Differenzierung nach Schwechter war nach 24stündiger Inkubation zunächst ein dosisabhängiger Rückgang der Proliferation zu erkennen. Nach zweitägiger Inkubation stiegen die Werte bei niedrigen TSA-Konzentrationen und sanken bei höheren Dosen. Ab dem vierten Behandlungstag übertrafen die gemessenen Absorptionen der behandelten Zellen bis zu einer Konzentration von 500 nM TSA die Werte der Kontrolle und knickten erst bei 2000 nM TSA deutlich ein. Bei Differenzierung nach Wood waren die Werte der behandelten Zellen nie höher als die der unbehandelten Kontrolle. Ab dem zweiten Inkubationstag zeigte sich ein dosisabhängiges Absinken mit einem deutlichen Abfall der Proliferation bei Inkubation mit 500 und 2000 nM TSA. Nach 96 bzw. 120 Stunden Inkubationszeit tendierte die Teilungsaktivität bei diesen Konzentrationen sogar gegen null. Gemeinsam war beiden Protokollen eine minimale Aktivität bei Einsatz von 2000 nM TSA ab dem zweiten Inkubationstag (s. Abbildung 45).



**Abbildung 45: BrdU-Assay bei RGC-5 mit TSA nach Schwlechter und Wood**

**A** und **B** zeigen die Proliferation bei mit TSA differenzierten RGC-5-Zellen im Verhältnis zu Proliferation der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle=1). Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, mit \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Alle Versuche wurden sechsmal durchgeführt (n=6). Bei Differenzierung nach Schwlechter kam es unter Einsatz von 2000 nM TSA immer zu einer Reduktion der Proliferation, unter Einsatz von 500 nM nur innerhalb der ersten 48 Stunden. Unter Anwendung des Wood-Protokolls erzielten stets die Kontrollzellen die höchste relative Proliferation und es war eine dosisabhängige und bei höheren Konzentrationen auch eine zeitabhängige Abnahme der Teilungsaktivität zu beobachten.

### 3.3.8 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Differenzierungsprotokolle

Tabelle VIII: Gegenüberstellung der Differenzierungsprotokolle

Protokoll	Schwechter	Wood
<b>Morphologie</b>	Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp nach Langzeitinkubation mit 500 nM TSA, bei 2000 nM TSA überwiegend Zelltod.	Ähnliche Tendenz wie beim Schwechter-Protokoll nur schwerer beurteilbar wegen höherer Zelldichte bedingt durch Vorbehandlung.
<b>Markerproteine</b>	<p><u>Thy-1</u>: keine Veränderung der relativen mRNA-Expression nach 120 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA.</p> <p><u>β-III-Tubulin</u>: Im Western Blot und in der Immunhistochemie maximale Werte nach Langzeitinkubation mit 500 nM TSA. Stärkste Expression mit einer Steigerung auf das 2,3fach nach 120 Stunden.</p> <p><u>MAP-2, Tau, hNF</u>: Die Expression stieg durch Langzeitinkubation mit 500 nM TSA.</p>	<p><u>Thy-1</u>: mRNA-Expression nach 120 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA relativ zur Kontrolle verdoppelt.</p> <p><u>β-III-Tubulin</u>: Maximale Expression nach Langzeitinkubation mit 500 nM TSA. Expressionsanstieg stärker als bei Behandlung nach Schwechter. Stärkster Anstieg nach 120 Stunden auf das 2,5fache.</p> <p><u>MAP-2, Tau, hNF</u>: Die Expression stieg durch Langzeitinkubation mit 500 nM TSA.</p>
<b>Apoptose</b>	<p><u>Caspase-3/7-Assay</u>: Aktivitätsanstieg in den ersten Tagen, Abfall unter Langzeitinkubation. Minimale Aktivität nach 96 Stunden und 500 nM TSA (22 % der Kontrolle).</p> <p><u>Gespaltene Caspase-3/Caspase-3</u>: Anstieg bei hohen Konzentrationen und kurzer Inkubation, Abfall nach 72 und 120 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA.</p>	<p><u>Caspase-3/7-Assay</u>: Selbe Tendenz wie bei Schwechter-Protokoll. Aktivitätsanstieg zu Beginn stärker und Abfall nach 96 und 120 Stunden schwächer.</p> <p><u>Gespaltene Caspase-3/Caspase-3</u>: Anstieg bei hohen Konzentrationen und kurzer Inkubation, Abfall bei 96 und 120 Stunden Inkubation mit 500 und 2000 nM TSA.</p>

Protokoll	Schwechter	Wood
<b>Apoptose</b>	<u>Bax/Bcl-2</u> : Bei 500 und 2000 nM TSA Erhöhung des Quotienten, nur nach 72 Stunden Inkubation mit 500 nM TSA leichter Abfall des Quotienten.	<u>Bax/Bcl-2</u> : Kein Effekt bei niedrigen TSA-Konzentrationen, nur bei 2000 nM TSA zeitabhängiger Anstieg des Quotienten.
<b>Vitalität</b>	Deutlicher Vitalitätsabfall in den ersten Inkubationstagen bei allen angewandten Konzentrationen. Steigerung der Stoffwechselaktivität nach 120 Stunden Inkubation beim Einsatz von 500 nM TSA auf das Doppelte.	Deutlicher Vitalitätsabfall in den ersten Inkubationstagen. Steigerung der Stoffwechselaktivität nach 120 Stunden Inkubation v.a. beim Einsatz von 150 nM (Verdreifachung) und 500 nM TSA (Verdopplung). Sowohl Vitalitätsabfall als auch Vitalitätsanstieg deutlicher als bei Differenzierung nach Schwechter.
<b>Proliferation</b>	Minimale Proliferation nach Langzeitinkubation mit 2000 nM TSA. Bei Einsatz von 500 nM TSA zwar innerhalb von 48 Stunden Proliferationsrückgang auf bis zu 50 % der Kontrolle, unter Langzeitinkubation aber Anstieg gegenüber der Kontrolle.	Kontrollzellen weisen stets die höchste Proliferation auf, dosis- und zeitabhängige Abnahme des Teilungsverhaltens bei hohen TSA-Konzentrationen mit minimaler Proliferation nach 120 Stunden Inkubation mit 500 bzw. 2000 nM TSA.
<b>Zellzahl</b>	Dosisabhängiges Sinken der Zellzahl bereits bei niedrigen TSA-Konzentrationen. Niedrigste Zellzahlen (< 30 % der Kontrolle) ab dem zweiten Inkubationstag bei Einsatz von 2000 nM TSA.	Dosisabhängiger Abfall der Zellzahl, v.a. bei niedrigen Konzentrationen weniger stark ausgeprägt als bei Inkubation nach dem Schwechter-Protokoll.
<b>Zelltod</b>	In den ersten Inkubationstagen konzentrationsabhängig vermehrt PI-positive Zellen; bei Langzeitinkubation v.a. bei niedrigen TSA-Konzentrationen Zelluntergang, nicht bei 500 nM TSA.	Ähnlich wie bei Inkubation nach Schwechter aber in den ersten Behandlungstagen kaum tote Zellen; nach Langzeitinkubation starkes Absterben der Zellen bei niedrigen Konzentrationen TSA.



## 4. Diskussion

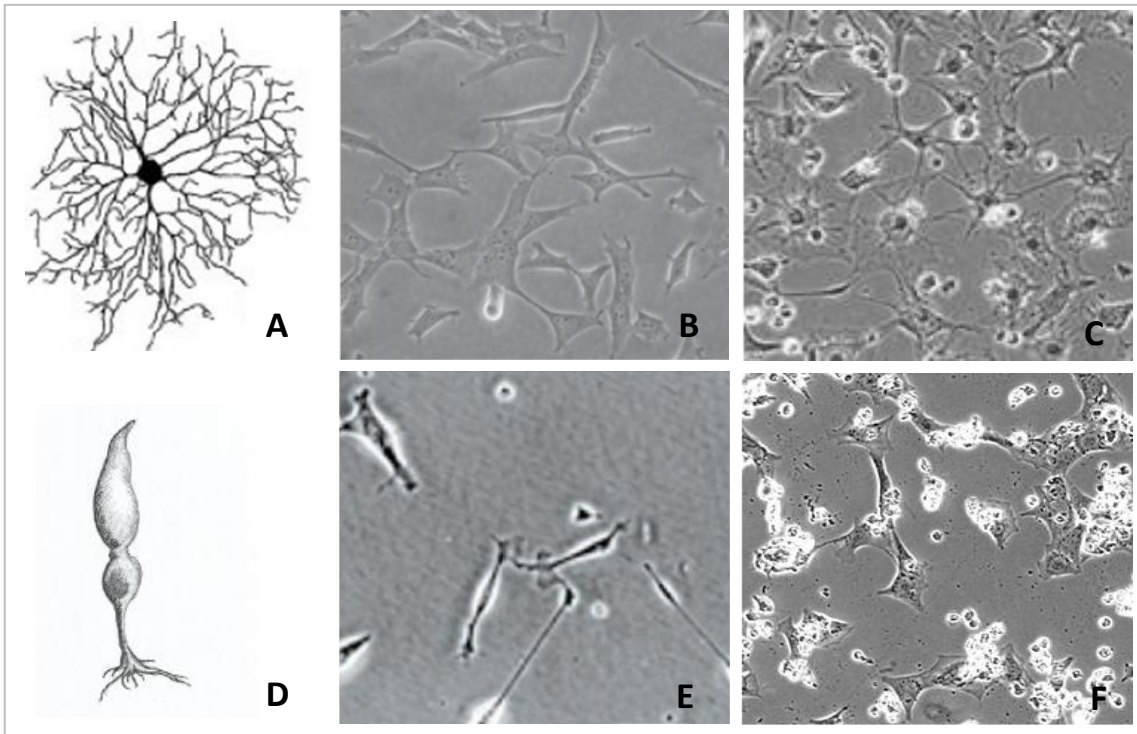
### 4.1 Das Resultat dieser Arbeit

#### 4.1.1 RGC-5-Zellen unterscheiden sich von 661W-Zellen

Die RGC-5- und 661W-Zelllinie verhalten sich unter Differenzierung mit Trichostatin A (TSA) und Staurosporin (STS) unterschiedlich. 661W-Zellen reagieren besonders bei Langzeitinkubation empfindlicher auf die zytotoxischen Effekte von TSA und STS. Die Zellanzahl sinkt bei 661W-Zellen unter Langzeitinkubation beispielsweise doppelt so stark wie bei RGC-5-Zellen (s. Kapitel 3.2.7) und die Stoffwechselaktivität geht um über 50 % zurück statt sich, wie bei RGC-5-Zellen, nach 120 Stunden zu verdoppeln (s. Kapitel 3.2.6). Bei RGC-5-Zellen tritt nach längeren Inkubationszeiten hingegen die Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp in den Vordergrund. Besonders deutlich wird der Unterschied zwischen beiden Zelllinien hinsichtlich der Expression neuronaler Marker (s. Kapitel 3.2.3). Während bei RGC-5-Zellen unter Langzeitinkubation mit 500 nM TSA die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression bis auf das 2,3fache (Schwechter-Protokoll) bzw. 2,5fache (Wood-Protokoll) gesteigert werden kann, bleibt dieser Effekt bei 661W-Zellen aus. Es konnte außerdem mittels qRT-PCR gezeigt werden, dass RGC-5-Zellen unter Langzeitinkubation mit 500 nM TSA die relative mRNA-Expression des Ganglienzellmarkers Thy-1 signifikant steigern, was bei 661W-Zellen nicht der Fall ist (s. Kapitel 3.2.2).

Spätestens seit Van Bergen *et al.* 2009 den Verdacht äußerten, die RGC-5-Zelllinie sei keine Ganglienzelllinie sondern eine Mäusezelllinie unbekanntes Ursprungs [72], wird die Herkunft und Identität der RGC-5-Zellen immer wieder hinterfragt. Wood *et al.* fanden 2010 heraus, dass sich RGC-5-Zellen mit Hilfe von TSA und STS zwar neuronal differenzieren lassen, sich aber nicht hin zu einem ganglienzelltypischem Verhalten entwickeln und dass sie Zapfentypische Opsine exprimieren [39]. Nachdem Krishnamoorthy *et al.* einräumten, dass eine Kontamination der RGC-5-Zelllinie mit der Maus-Fotorezeptor-Zelllinie 661W möglich sei [70], stellt sich die Frage, ob RGC-5-Zellen aktuell

noch zu Forschungszwecken verwendet werden können oder ob sie identisch mit 661W-Zellen sind. Doch obwohl beide Zelllinien scheinbar aus der C57BL/6-Mauslinie isoliert wurden, das gleiche Transformations-Gen aufweisen und 95 % ihrer genetischen Information identisch ist [70], verhalten sie sich zumindest unter Differenzierung mit TSA und STS unterschiedlich.



**Abbildung 46: Morphologie von RGC und Zapfen sowie ihren potentiellen Zelllinien**

**A)** Schemazeichnung einer retinalen Ganglienzelle, modifiziert nach Kolb H., *Morphology and Circuitry of Ganglion Cells* [159]; **B)** Phasenkontrastmikroskopie undifferenzierter RGC-5-Zellen in Kultur; aus Sippel et al. [147]; **C)** RGC-5-Zellen nach 96 Stunden Differenzierung mit 500 nM TSA nach Schwächter; **D)** Schemazeichnung eines Zapfens; modifiziert nach Greeff R., *Die mikroskopische Anatomie des Sehnerven und der Retina*. [160]; **E)** unbehandelte 661W-Zellen in Kultur kurz nach Aussähen; aus Sippel et al. [147]; **F)** 661W-Zellen 96 Stunden Differenzierung mit 500 nM TSA nach Schwächter

#### **4.1.2 Das optimale Differenzierungsprotokoll für RGC-5-Zellen**

Unter Verwendung des Schwächter-Protokolls [78] kristallisierten sich 500 nM als optimale TSA-Konzentration für die Differenzierung der RGC-5-Zellen heraus. Nach Langzeitinkubation mit 500 nM TSA wurde eine maximale Differenzierung der RGC-5-Zellen zu einem neuronalen Phänotyp erreicht (s. Kapitel 3.3.1), die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression konnte gesteigert werden (s. Kapitel

3.3.2) und die Caspase-Aktivität war gleichzeitig am geringsten (s. Kapitel 3.3.3). Auch der MTS-Versuch zur Vitalität der Zellen zeigte maximale Werte bei Langzeitinkubation mit 500 nM TSA (s. Kapitel 3.3.5). Zu bemerken war allerdings auch ein Absinken der Zellanzahl mit steigender Inkubationszeit und TSA-Konzentration (s. Kapitel 3.3.4). Differenzierte RGC-5-Zellen proliferierten unter Behandlung nach Schwlechter meist stärker als undifferenzierte. Nur bei Einsatz von 500 nM TSA und kurzer Inkubation sank die Proliferation, stieg aber nach 96 und 120 Stunden wieder an (s. Kapitel 3.3.7). Beim Einsatz von 2000 nM TSA ließen sich ähnlich gute Ergebnisse hinsichtlich der Differenzierung erreichen wie beim Einsatz von 500 nM, allerdings war der Zellzahlverlust hier deutlich stärker. Mit 2000 nM TSA differenzierte RGC-5-Zellen waren nach Langzeitinkubation kaum mehr teilungsaktiv.

Oben beschriebene positive Effekte auf die Differenzierung traten erst bei Langzeitinkubation auf. Bei Inkubation über 96 Stunden mit 500 nM TSA ließ sich bei minimaler Apoptose-Aktivität eine maximale Differenzierung erreichen, allerdings bei einer auf ca. 20 % reduzierten Zellzahl. Nach 120 Stunden konnte die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression noch weiter gesteigert werden aber die Zellzahl sank stark und die Caspase-Aktivität stieg wieder leicht.

Zusammenfassend kann also bei Behandlung nach Schwlechter durch Inkubation über vier bis fünf Tage mit 500 nM TSA die gewünschte Differenzierung, mit Ausnahme eines Proliferationsstopps, erreicht werden.

Bei Differenzierung nach Wood [39] reagierten RGC-5-Zellen ähnlich wie bei Anwendung des Schwlechter-Protokolls. Bedingt durch die eintägige Vorbehandlung, d.h. das Kultivieren der Zellen für 24 Stunden in Nährmedium ohne FKS, verdoppelt sich die Zellzahl pro Well allerdings. Die Behauptung, RGC-5-Zellen würden in „Hunger-Medium“ ohne FKS weniger bzw. langsamer proliferieren [39], konnte im Rahmen dieser Arbeit zumindest bei 24stündiger Vorbehandlung nicht bestätigt werden.

Bei morphologischer Betrachtung machte es die erhöhte Zellzahl schwer, detailliert Veränderungen zu studieren, da die Kontrollzellen sowie die mit

niedrigen TSA-Konzentrationen behandelten Zellen sehr dicht waren. Insgesamt konnte jedoch auch hier eine neuronale Differenzierung bei 500 nM TSA und Langzeitinkubation beobachtet werden (s. Kapitel 3.3.1). Die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression stieg bei Inkubation mit 500 nM TSA ebenfalls zeitabhängig bis auf ein Maximum nach 120 Stunden an (s. Kapitel 3.3.2) und die relative mRNA-Expression des Ganglienzellmarkers Thy-1 konnte durch Langzeitinkubation gesteigert werden (s. Kapitel 3.2.2). Hinsichtlich des Apoptoseverhaltens reagierten nach Wood behandelte RGC-5-Zellen stärker mit einem Aktivitätsanstieg in den ersten Inkubationstagen und der Abfall bei Langzeitinkubation war schwächer (s. Kapitel 3.3.3). Der Vitalitätsanstieg war hier ebenfalls bei Langzeitinkubation (120 Stunden) zu erkennen, allerdings stärker ausgeprägt bei Einsatz von 150 nM als bei Inkubation mit 500 nM TSA (s. Kapitel 3.3.5). Die Zellzahl sank bei Differenzierung mit 500 nM TSA nach Wood zwar relativ zur proliferierenden Kontrolle, bleibt aber bei Betrachtung der Absolutwerte konstant (s. Kapitel 3.3.6.1). TSA-behandelte RGC-5-Zellen zeigten nie eine erhöhte Proliferation gegenüber undifferenzierten Zellen. Bei fünftägiger Inkubation mit 500 und 2000 nM TSA tendierte die Teilungsaktivität gegen Null (s. Kapitel 3.3.7).

Es ergibt sich auch bei Differenzierung nach Wood ein optimaler Inkubationszeitraum von fünf Tagen bei einer Konzentration von 500 nM TSA. Die Apoptose lässt sich durch Langzeitbehandlung nicht so stark reduzieren wie bei Inkubation nach Schwechter, die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression ist allerdings stärker. Es kommt zur gesteigerten Thy-1-Expression und die differenzierten Zellen hören auf zu proliferieren, sind vitaler und der Zellzahlverlust ist geringer.

## **4.2 Die Ergebnisse im Kontext der aktuellen Forschung**

### ***4.2.1 Die Eigenschaften und das Expressionsprofil der RGC-5-Zellen***

Nachdem anfänglich über die Expression neuronaler und auch ganglienzellspezifischer Marker bei RGC-5-Zellen berichtet wurde [35, 69, 77], konnten später weder auf mRNA- noch auf Proteinebene RGC-typische Marker wie Thy-1 oder die Transkriptionsfaktoren der Brn3-Familie nachgewiesen

werden [39, 72], was eine Entdifferenzierung der Zelllinie impliziert oder andere Ursprungszellen vermuten lässt. Laut der aktuellen Forschung sind RGC-5-Zellen also nicht positiv für RGC-typische, wohl aber für neuronale Marker. Eine Übersicht über die bei RGC-5-Zellen im Rahmen dieser Dissertation entdeckten und in der Literatur beschriebenen Marker ist in Tabelle IX zu finden.

**Tabelle IX: Nachgewiesene Marker bei RGC-5-Zellen (Literatur)**

<i>Marker</i>		<i>bestätigt</i>	<i>nicht bestätigt</i>
<b>Marker bei undifferenzierten RGC-5-Zellen</b>			
<b>RGC-Marker</b>	Brn3	Krishnamoorthy <i>et al.</i> 2001 Harper <i>et al.</i> 2009 Schwechter <i>et al.</i> 2007 und zwei weitere Publikationen	Wood <i>et al.</i> 2010
	Thy-1	Krishnamoorthy <i>et al.</i> 2001 Frassetto <i>et al.</i> 2006 Agarwal <i>et al.</i> 2007 Harper <i>et al.</i> 2009 und vier weitere Publikationen	Van Bergen <i>et al.</i> 2009 Wood <i>et al.</i> 2010
<b>Neuronale Marker</b>	β-III-Tubulin MAP-2 Tau hNF	Frassetto <i>et al.</i> 2006 Wood <i>et al.</i> 2010 Schnichels <i>et al.</i> 2012 Schultheiss <i>et al.</i> 2012 Sippl <i>et al.</i> 2011 Van Bergen <i>et al.</i> 2009 → s. Kapitel 3.3.2	
<b>Marker bei mit TSA (1), STS (2) und sConA (3) differenzierten RGC-5-Zellen</b>			
<b>RGC-Marker</b>	Brn3	Schwechter <i>et al.</i> 2007 (1↑,2↓) Harper <i>et al.</i> 2009 (2↑)	Wood <i>et al.</i> 2010 (1, 2, 3)
	Thy-1	Frassetto <i>et al.</i> 2006 (2↑) Harper <i>et al.</i> 2009 (2↑) Ganapathy <i>et al.</i> 2010 (2↑) Sippl <i>et al.</i> 2011 (2) → s. Kapitel 3.2.2 (1↑)	Van Bergen <i>et al.</i> 2009 (3) Wood <i>et al.</i> 2010 (1, 2, 3)
<b>Neuronale Marker</b>	β-III-Tubulin MAP-2 Tau hNF	Frassetto <i>et al.</i> 2006 (2↑) Lieven <i>et al.</i> 2007 (2↑) Van Bergen <i>et al.</i> 2009 (3) Schultheiss <i>et al.</i> 2012 (2↑) Schnichels <i>et al.</i> 2012 (1↑) Wood <i>et al.</i> 2010 (1↑, 2, 3) Sippl <i>et al.</i> 2011 (2↑) → s. Kapitel 3.3.2 (1↑)	

Gezeigt ist eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen neuronalen Marker und Ganglienzellmarker bei undifferenzierten und differenzierten RGC-5-Zellen. **1**= Differenzierung mit Trichostatin A (TSA); **2** = Differenzierung mit Staurosporin (STS); **3** = Differenzierung mit Succinyl-Concanavalin-A (sConA); **↑** = gesteigert durch Inkubation mit dem Agens; **↓** = reduziert durch Inkubation mit dem Agens; steht ausschließlich die Ziffer in Klammern, war der Marker nachweisbar konnte aber durch Differenzierung nicht gesteigert/reduziert werden.

Das neuronale Expressionsprofil der RGC-5-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden und die Expression von Markern wie  $\beta$ -III-Tubulin, MAP-2 und Tau ließ sich v.a. nach Langzeitinkubation mit TSA deutlich steigern, was auch mit den Erkenntnissen von Wood *et al.* 2010 übereinstimmt [39]. Im Rahmen der qRT-PCR konnte außerdem ein relativer Expressionsanstieg der Thy-1-mRNA bei RGC-5-Zellen unter Langzeitdifferenzierung nach Wood gemessen werden.

Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge, lassen sich RGC-5-Zellen neuronal differenzieren und die Thy-1-Expression kann zumindest auf mRNA-Ebene detektiert und gesteigert werden. Es wäre ein interessanter Ansatz, die im Rahmen dieser Arbeit durch Langzeitinkubation mit 500 nM TSA differenzierten RGC-5-Zellen auf RGC-typische Eigenschaften wie Glutamat-Exzitotoxizität, Abhängigkeit von Neurotrophinen und die Expression von hier nicht untersuchten Markern wie beispielsweise Brn3a zu überprüfen. So könnte in Folgestudien herausgefunden werden, ob sich die RGC-5-Zellen durch 120stündige Inkubation mit 500 nM TSA nach Wood tatsächlich zu einem vollständigen Ganglienzell-Phänotyp hin differenzieren lassen. Es stellt sich hinsichtlich der kontroversen Debatte der Literatur zu diesem Thema nämlich die Frage, weshalb RGC-5-Zellen jemals RGC-Marker exprimiert haben sollen, wenn es sich, wie behauptet [39, 70, 72], gar nicht um eine Ganglienzelllinie handelt.

#### **4.2.2 Die Auswirkungen der TSA-Inkubation auf RGC-5-Zellen**

##### **4.2.2.1 Induktion des Proliferationsstopps**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei hohen TSA-Konzentrationen (500 und 2000 nM) und Langzeitinkubation (länger als 72 Stunden mit 2000 nM) v.a. im Rahmen des Wood-Protokolls die Proliferation der RGC-5-Zellen stark sinkt bzw. ganz sistiert. TSA ist dafür bekannt, den Zellzyklus in der G1- oder in höheren Dosen auch in der G2-Phase zu stoppen [116], wobei der genaue molekulare Mechanismus nur teilweise verstanden ist. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Aktivität von Cyclin D1 über Sequestration im Zytoplasma und Abbau reguliert wird [117], was wiederum

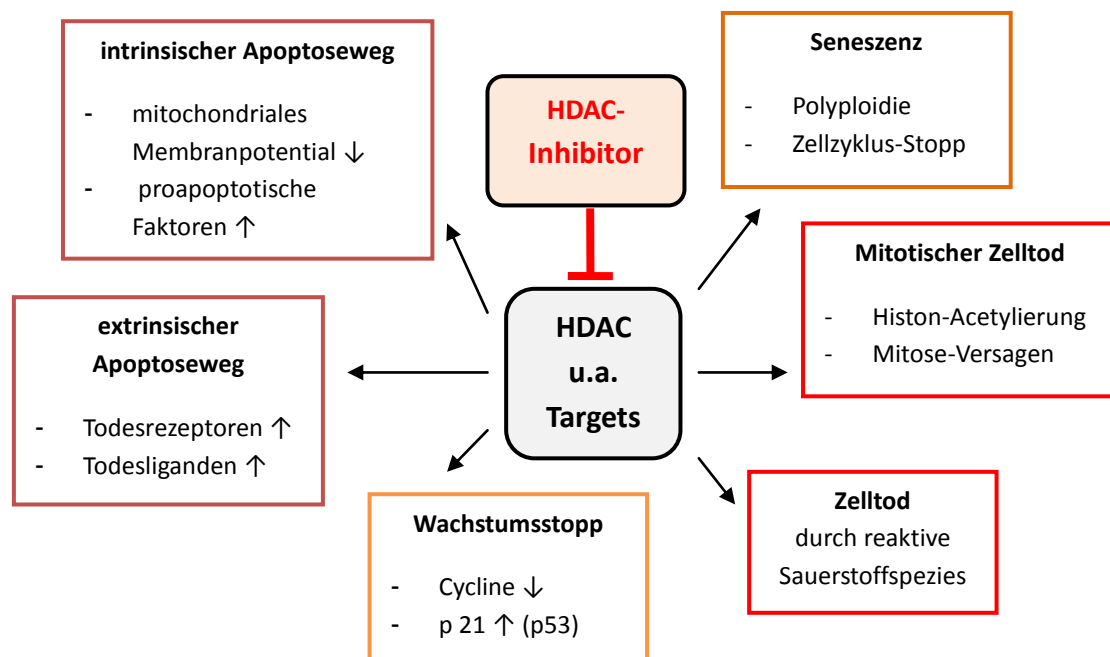


durch TSA beeinflusst werden kann. Cyclin D1 reguliert den Übergang von G1- zu S-Phase des Zellzyklus und fungiert als Kofaktor für mehrere Transkriptionsfaktoren. Exklusion aus dem Zellkern und Abbau von Cyclin D1 kann durch TSA induziert werden, was zum Proliferationsstopp führt [118-120], um nur einen möglichen Mechanismus des TSA-induzierten Zellzyklusstopps zu nennen.

#### *4.2.2.2 Differenzierung der RGC-5-Zellen*

Neben einem Stopp der Proliferation ist bei Langzeitinkubation mit 500 nM TSA die Expression neuronaler Marker bei RGC-5-Zellen deutlich gesteigert. Das könnte dadurch zu erklären sein, dass TSA neben dem Proliferationsstopp mitotisch aktiver Zellen bei postmitotischen Zellen die Genexpression über verschiedene Ansatzpunkte reguliert.

Neben Histonen haben Histon-Deacetylaseinhibitoren (HDACi) nämlich viele andere Proteine und Transkriptionsfaktoren als Ziel, die durch die Interaktion entweder aktiviert oder inaktiviert werden, sodass sie die Transkription der Zelle und damit deren Phänotyp mit beeinflussen [121-123]. HDACi sind aufgrund ihrer Eigenschaften (s. Abbildung 47) auch in der Tumorthherapie ein interessantes Forschungsthema [124], was nicht zuletzt daran liegt, dass sie unterschiedlich auf proliferative Tumorzellen und auf postmitotische, differenzierte Zellen wirken [125]. Sie können bei transformierten Zellen eine terminale Differenzierung hervorrufen und einen Wachstumsstopp herbeiführen. Normale Zellen bzw. differenzierte Zellen sind hingegen relativ resistent gegenüber HDACi-induziertem Zelltod [126-128]. Es wird eine Art „Histon-Code“ diskutiert [129-132], wonach das Expressionsprofil einer Zelle u.a. vom Zusammenspiel der Acetylierung und Deacetylierung von Histonen abhängt. Es ist bekannt, dass die Differenzierung von Vorläuferzellen durch Transkriptionsprogramme koordiniert ist, die durch epigenetische Einflüsse gesteuert werden, sodass es zu einem Switch im Expressionsprofil der Zellen kommt [133-136]. Für HDACi konnte gezeigt werden, dass sie zu einer Ausdifferenzierung bei neuronalen Zellen beitragen [137, 138].



**Abbildung 47: Die HDACi-vermittelten Effekte auf Zellzyklus und Zelluntergang**

Die Abbildung zeigt mögliche Auswirkungen der HDAC-Hemmung. Histon-Deacetylase-inhibitoren (HDACi) beeinflussen neben der Acetylierung von Histonen auch die vieler anderer Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Chaperone und Strukturproteine. Dadurch haben sie unterschiedliche Effekte auf die Zelle: Sie aktivieren die intrinsische und extrinsische Apoptosekaskade, stoppen das Zellwachstum (Arrest in G1- oder/und G2-Phase), induzieren einen mitotischen Zelltod bzw. einen Proliferationsstopp und führen über Generierung reaktiver Sauerstoffspezies zum Zelltod. Modifiziert nach Xu *et al.* 2007 [125].

Verglichen mit RGC-5-Zellen ist die neuronale Differenzierung bei 661W-Zellen morphologisch nur schwach ausgeprägt und hinsichtlich neuronaler Marker nicht vorhanden. In Bezug auf die Stäbchen und Zapfen der Retina scheint TSA bzw. die damit verbundene Hyperacetylierung auch laut aktueller Literatur einen gegenläufigen Effekt zu haben. So fanden Chen *et al.* heraus, dass HDACi wie TSA die Differenzierung von Fotorezeptorzellen hemmen [139]. An 661W-Zellen konnte gezeigt werden, dass Inhibition der HDAC durch TSA Apoptose induziert, indem die Expression von Apaf-1, einem proapoptischen Gen, hoch reguliert wird [140]. Es würde also ins Bild passen, dass TSA RGC-5-Zellen differenziert, bei 661W-Zellen aber eher apoptotisch wirkt.

Untersucht wurde im Rahmen der publizierten Differenzierungsversuche [38, 39, 69, 76-78] wie auch in dieser Arbeit bei der Inkubation der RGC-5-Zellen ein Zeitraum von fünf Tagen, wobei die erwünschten Effekte tendenziell unter Langzeitinkubation auftraten. Das könnte damit zusammen hängen, dass bei RGC-5-Zellen zuerst der Zellzyklus sistierte, was ca. nach 96 Stunden der Fall war, bevor TSA wesentlichen Einfluss auf die Genexpression und damit den Phänotyp nehmen konnte.

#### *4.2.2.3 TSA und seine Wirkung auf Zellzahl, Stoffwechselaktivität und Apoptose*

Die Zellzahl sank bei TSA-behandelten Zellen im Rahmen des Schwlechter-Protokolls relativ zur Kontrolle konzentrations- und zeitabhängig, bei 661W-Zellen etwas stärker als bei RGC-5-Zellen. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um ein Zusammenspiel aus Proliferationsstopp, Apoptose und Zelltod. Sinkende Zellzahlen unter TSA-Inkubation wurden bereits in früheren Publikationen erwähnt [38, 39, 78].

Die Stoffwechselaktivität der RGC-5-Zellen sank bei Inkubation mit TSA im Rahmen beider Protokolle dosisabhängig und bei höheren TSA-Dosen auch zeitabhängig, was mit der Literatur zu diesem Thema im Einklang steht [38, 39]. Eine Ausnahme bildet die stark gesteigerte Stoffwechselaktivität nach fünftägiger TSA-Inkubation v.a. bei Einsatz von 150 nM nach dem Wood-Protokoll und 500 nM nach Langzeitinkubation im Rahmen des Schwlechter-Protokolls. Im Kontext der anderen Versuchsergebnisse zeigt dies, dass trotz gleichbleibender bzw. sinkender Zellzahlen und Proliferationsstopp die Stoffwechselaktivität der Zellen steigt. Ob dieser Umstand dem Switch im Expressionsprofil und dem daraus resultierenden Mehrbedarf an Energie geschuldet ist oder andere Gründe hat, ist unklar.

Die durch TSA und STS induzierte Apoptose und der Zelltod bei RGC-5-Zellen wurde bisher nur für kurze Inkubationszeiträume und „Standard-Bedingungen“, wie sie auch im Schwlechter-Protokoll angewendet werden, gezeigt [38, 76], nicht aber für Langzeitinkubation und für differenziertere Behandlung wie beispielsweise nach Wood. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden,

dass die Caspase-Aktivität v.a. unter Inkubationsbedingungen nach Wood (weniger FKS im Medium) innerhalb der ersten 48 Stunden konzentrationsabhängig steigt. Das passt mit der in der Literatur beschriebenen Induktion von Apoptose durch HDAC-Inhibitoren wie TSA zusammen [84, 138, 139, 141]. Spezifisch für RGC-5-Zellen ist beschrieben, dass TSA sogar in Konzentrationen, die zu gering sind um eine Differenzierung zu verursachen, Apoptose induziert [38], was ebenfalls in dieser Arbeit für beide Protokolle und einen Zeitraum von zwei Tagen bestätigt wurde. Wurden RGC-5-Zellen aber länger als 48 Stunden mit TSA inkubiert, sank die Apoptose relativ zur Kontrolle sogar auf ein Minimum nach 96 und 120 Stunden bei 500 nM TSA ab.

Das Gespaltene-Caspase-3/Caspase-3-Verhältnis ergab zumindest bei Inkubation nach Wood eine ähnliche Tendenz mit konzentrationsabhängig steigenden Werten in den ersten zwei Inkubationstagen und sinkenden Werten bei Langzeitinkubation und hohen TSA-Dosen (500 und 2000 nM). Das Bax/Bcl-2-Verhältnis unterschied sich selten von dem der Kontrolle, stieg aber nach 24 Stunden Inkubation nach Schwechter konzentrationsabhängig und war bei Einsatz von 2000 nM TSA und Inkubation nach Wood fast immer erhöht. Das könnte damit zusammen hängen, dass Bax und Bcl-2 zum intrinsischen Weg der Apoptose gehören, während die Caspase-3 sowohl am intrinsischen als auch am extrinsischen Apoptoseweg beteiligt ist [66] und zu bestimmten Zeitpunkten des programmierten Zelltodes verschiedene Teile der apoptotischen Kaskade aktiviert werden.

#### *4.2.2.4 Vergleich: 500 nM Trichostatin vs. 300 nM Staurosporin*

Staurosporin-differenzierte Zellen reagierten bis auf kleine Unterschiede ähnlich wie TSA-behandelte. Die Caspase-Aktivität war unter STS-Inkubation fast immer geringer, ebenso die Stoffwechselaktivität bei 661W- und die Zellzahl bei RGC-5-Zellen. Der durch TSA-Inkubation ausgelöste Vitalitätsanstieg nach 120 Stunden bei RGC-5-Zellen ließ sich bei STS-Inkubation nicht reproduzieren. Auch Schnichels *et al.* und Schultheiss *et al.* [38, 76] beschreiben für einen Zeitraum von 48 Stunden, dass Zellzahl und Vitalität unter STS-Behandlung stärker sinken als bei TSA-Inkubation, was mit den hier vorliegenden

Ergebnissen übereinstimmt. Bei ihnen war die Apoptose unter STS-Differenzierung aber ausgeprägter. Ferner konnte eine schnellere und deutlichere neuronale Differenzierung mit STS erreicht werden.

STS ist mehrfach als Mittel der Differenzierung für RGC-5-Zellen vorbeschrieben [40, 73, 76-78, 95]. Frassetto *et al.* [77] postulierten erstmals die Differenzierung der RGC-5-Zelllinie hin zu postmitotischen Zellen mit einem neuronalen Phänotyp durch Einsatz von Staurosporin. Vergleichende Untersuchungen zur Zellmorphologie nach Differenzierung mit STS statt TSA unternahm Schwlechter *et al.* [78]. Sie fanden heraus, dass in einem Zeitraum von fünf Tagen unter STS-Differenzierung mehr RGC-5-Zellen einen neuronalen Phänotyp entwickelten, wobei sich das Erscheinungsbild der differenzierten Zellen ähnelte. Für Differenzierung mit 316 nM STS über 24 Stunden konnten Ganapathy *et al.* [73] zeigen, dass RGC-5-Zellen Neuriten ausbilden und Ganglienzellmarker exprimieren (Thy-1). Lieven *et al.* [40] wiesen eine Hochregulation von Tau und verschiedenen MAP-2-Isoformen nach und damit die Ausbildung von Axon- und Dendriten-ähnlichen Fortsätzen unter STS-Inkubation. Wood *et al.* [39] konnten allerdings zeigen, dass unter Langzeitinkubation mit TSA die Expression neuronaler Marker (MAP-2, Tau) stark steigt und Zellen sensitiv für Glutamat-Exzitotoxizität werden, was bei STS-Differenzierung nicht zu beobachten ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte im Zuge der STS-Differenzierung das Gewicht auf dem Vergleich der RGC-5- mit der 661W-Zelllinie liegen. Die Differenzierung der Zellen wurde nicht detailliert untersucht. Die oben genannten, bereits erschienenen Untersuchungen zur Langzeitinkubation [39] geben dazu auch keinen Anlass.

### **4.2.3 Mögliche Einflussfaktoren beim Kultivieren der RGC-5-Zellen**

#### **4.2.3.1 Der Einfluss vom Serumgehalt im Medium**

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Serum-Deprivation auf die RGC-5-Zellen nicht gezielt untersucht werden. Allerdings wurden RGC-5-Zellen bei Differenzierung nach Wood erst nach 24 Stunden Serumentzug mit TSA bzw.

STS inkubiert und im Folgenden auch unter wesentlich serumärmeren Bedingungen (0,1 % FKS im Medium) als bei Behandlung nach Schwlechter (5 % FKS im Medium) kultiviert.

Der Entzug von Wachstumsfaktoren und Serum wird als möglicher primärer Grund für den Ganglienzelltod beim Glaukom angenommen [41-44]. Laut Krishnamorthy *et al.* [69] reagieren auch RGC-5-Zellen auf den Entzug von Serum mit programmiertem Zelltod, wenn sie mindestens zwei Tage unter „Hunger-Bedingungen“ (0 % FKS im Medium, Abwesenheit von Neurotropinen) kultiviert werden. Charles *et al.* konnten zeigen, dass bereits nach zwei Tagen Serum-Entzug 50 % der RGC-5-Zellen durch Apoptose über den mitochondrialen Pathway zugrunde gehen [142]. Wood *et al.* beschreiben ebenfalls die Abhängigkeit der RGC-5-Zellen vom Serumgehalt im Medium. Wurde 10 % FKS dem Nährmedium zugesetzt, teilten sich RGC-5-Zellen alle 20 Stunden, bei 0,1 % FKS im Medium nur alle 100 Stunden [39].

In dieser Arbeit zeigte sich, dass nach Wood differenzierte RGC-5-Zellen stärker mit Apoptose reagierten und unter TSA-Behandlung tendenziell weniger proliferierten als nach Schwlechter differenzierte Zellen. Die Erkenntnis, dass RGC-5-Zellen sensibel mit sinkender Zellzahl und vermehrter Apoptose auf Serum-Deprivation reagieren, passt zum bereits in anderen Studien beobachteten Verhalten und auch zum Charakter der RGC.

#### 4.2.3.2 Die Zelldichte und deren Einfluss auf die Differenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen mit einer Dichte von 180 Zellen/mm<sup>2</sup> (6-Well-Platte) bis 300 Zellen/mm<sup>2</sup> (24- und 96-Well-Platte) ausgesät. Im Rahmen des Schwlechter-Protokolls führte das bei unbehandelten RGC-5-Zellen zum vollständigen Konfluieren der Zellen nach 72 Stunden (s. Kapitel 3.3.1).

Bereits Schwlechter *et al.* beschrieben die Abhängigkeit der TSA-induzierten Differenzierung von der Zelldichte pro Well. Sie fanden heraus, dass sich wesentlich mehr Zellen differenzieren ließen, wenn mit einer Dichte von 80 Zellen/mm<sup>2</sup> und 100 µl Medium pro Well gearbeitet wurde als bei niedrigeren



bzw. höheren Zelldichten oder mehr bzw. weniger Medium [78]. Das würde bedeuten, dass evtl. eine noch deutlichere Differenzierung möglich wäre, wenn die Zellen weniger dicht ausgesät würden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf verzichtet, die Zellen weniger dicht zu kultivieren, denn für viele Versuche waren größere Zellmengen notwendig (z.B. Proteinisolierung für den Western Blot) und eine Reduktion der initialen Zellzahl pro Well hätte bei hohen TSA-Konzentrationen und langen Inkubationszeiten v.a. im Rahmen des Schwlechter-Protokolls zu einem zu starken Zellzahlverlust geführt.

#### **4.2.4 Verwechslungen von Zelllinien in der Forschung**

Zelllinien sind in der aktuellen Forschung ein wertvolles Werkzeug, um realitätsnahe Versuchsbedingungen *in vitro* schnell und ohne den Aufwand der Isolierung von Zellen zu schaffen und Tierversuche zu umgehen. Allerdings ist auch die Kontamination und die Fehlidentifikation von Zelllinien ein bekanntes Problem, das rund 45 Jahre zurückzuverfolgen ist [143]. Man geht davon aus, dass auf fehlerhaft charakterisierten bzw. kontaminierten Zelllinien basierende Publikationen ungefähr 15-20 % der Fälle ausmachen [144], weshalb immer wieder nach verschärften Regeln für die Veröffentlichung entsprechender Arbeiten verlangt wird [145, 146].

Im Falle der RGC-5-Zelllinie könnte die Forschung Opfer einer falsch identifizierten oder kontaminierten Zelllinie geworden sein. Spätestens seit Van Bergen *et al.* entdeckten, dass RGC-5-Zellen aus Mäusen und nicht wie beschrieben aus Ratten isoliert wurden [72], typische RGC-Marker nicht einmal unter Differenzierungsbedingungen detektierbar waren [39, 72] und die Koautoren des ursprünglichen Etablierungspapers der Zelllinie einlenkten, dass eine Kontamination mit 661W-Fotorezeptorzellen wahrscheinlich sei [70], ist die immer wieder lautwerdende Kritik [147-150] am Gebrauch der RGC-5-Zelllinie für RGC-spezifische Forschungsprojekte berechtigt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Identität und Herkunft der RGC-5-Zelllinie nicht definitiv geklärt werden und sie lässt sich auch in der Literatur nicht mehr konsequent nachvollziehen [70, 147-150]. Aufgrund der durch TSA-Inkubation

steigerbaren Thy-1-mRNA-Expression ist aber anzunehmen, dass es sich um eine Ganglienzelllinie handelt. Außerdem wird deutlich, dass sie sich eindeutig von der 661W-Zelllinie unterscheidet und sich neuronal differenzieren lässt. Auch in der Literatur finden sich weitere Hinweise, dass RGC-5- und 661W-Zellen nicht identisch sind [151-153], wengleich Arbeiten, die beide Zelllinien gezielt vergleichend betrachten bzw. unter selben Bedingungen kultivieren, nicht vorhanden sind.

Schnichels *et al.* [151] untersuchten beispielsweise in einem anderen Kontext über einen Zeitraum von 72 Stunden die Wirkung von Aflibercept, Ranibizumab und Bevacizumab auf 661W- und RGC-5-Kulturen. Auch sie entdeckten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien. Während bei RGC-5-Zellen meist schon nach einer Stunde Inkubation mit den drei Medikamenten Änderungen hinsichtlich Zelldichte, Vitalität und Apoptose erkennbar waren, zeigten 661W-Zellen zu diesem Zeitpunkt kaum Reaktionen. Nach 72 Stunden waren alle behandelten 661W-Zellen aber deutlich stoffwechselaktiver und nach 48 und 72 Stunden stieg bei inkubierten Zellen die Caspase-3/7-Aktivität signifikant, ebenso die Proliferation nach 48 Stunden und teilweise auch nach 72 Stunden. Tsuruma *et al.* [152] fanden im Zuge einer Toxizitätstestung heraus, dass N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff bei der 661W-Zelllinie die Bildung radikaler Sauerstoffspezies (ROS) und darüber den Zelluntergang induziert, nicht aber in RGC-5-Zellen. Diese zwei Studien zeigen, dass die beiden Zelllinien, die unter gleichen Bedingungen behandelt wurden, um modellhaft Teile der Retina abzubilden, unterschiedlich reagieren.

Obwohl RGC-5-Zellen also offenbar nicht mit 661W-Zellen identisch sind, bedarf es weiterer Studien zur definitiven Identitätsklärung. Es könnte sich bei ihnen entweder um neuronale Vorläuferzellen unbekanntes Ursprungs handeln oder, was durch die Thy-1-mRNA-Expressionssteigerung bereits angedeutet wird, tatsächlich um retinale Ganglienzellen. Weitere Untersuchungen auf Ganglienzelleigenschaften auf genetischer Ebene oder hinsichtlich typischer RGC-Markermoleküle sind nötig.

Kontamination von Zellen bzw. deren Verwechslung mit anderen Zelllinien kann seit der Etablierung genetischer Marker 1967 kenntlich gemacht werden [154]. Aktuell wird von ersten Herausgebern, darunter z.B. das Journal of Cancer, bereits eine Validierung der Zelllinie verlangt, die momentan in den meisten Fällen via Profiling der *short tandem repeats* erfolgt [154-156]. Damit schlägt die Forschung einen zwar aufwendigen aber sicher sinnvollen Weg ein, der in Zukunft fehlerhafte Interpretation von Forschungsergebnissen und viel unnötigen Arbeitsaufwand vermeiden könnte. Wenn man bedenkt, dass trotz den offensichtlichen Hinweise auf die unklare Identität der RGC-5-Zelllinie, die spätestens seit 2009 durch die Publikation von Van Bergen *et al.* im Raum stehen, weiter rund 150 Publikationen erschienen sind, die RGC-5-Zellen als *in vitro* Modell einsetzen, sollte eine genetische Überprüfung auch hier unbedingt erfolgen. Denn das Bewusstsein für diese Problematik scheint nicht in allen Labors vorhanden zu sein.

### 4.3 Fazit

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich RGC-5- und 661W-Zellen unter Differenzierungsbedingungen unterscheiden und die Möglichkeit besteht, RGC-5-Zellen durch fünftägige Inkubation mit 500 nM TSA nach Wood *et al.* neuronal zu differenzieren sowie ihre Thy-1-Expression zu steigern. Alternativ ist die vier- bis fünftägige Inkubation bei 500 nM nach Schwechter *et al.* möglich, wobei hier die Zellen weiter mitotisch aktiv sind und kein Einfluss auf die Thy-1-mRNA besteht. Der genaue Mechanismus der TSA-induzierten neuronalen Differenzierung bleibt unklar und detaillierte Untersuchungen zu diesem Thema wären sinnvoll. Fraglich bleibt, ob RGC-5-Zellen nach 96 bzw. 120 Stunden Inkubation mit 500nM TSA auch RGC-typisch auf Glutamat-Exzitotoxizität und Serum-Deprivation bzw. Wachstumsfaktor-Entzug reagieren.

Die RGC-5-Zelllinie bleibt vor dem Hintergrund dieser Arbeit eine zweifelhafte Zelllinie, die zwar neuronale Eigenschaften aufweist aber trotz Re-differenzierung kaum Ganglienzelleigenschaften entwickelt. Sicher könnten Versuche hinsichtlich weiterer Marker wie Brn3a oder Ganglienzell-

eigenschaften bei den langzeitdifferenzierten RGC-5-Zellen unternommen werden, mit dem Ziel, sie für die Ganglienzellforschung zu erhalten. Allerdings wäre, den Ergebnissen dieser Arbeit und dem Stand der aktuellen Forschung zufolge, die Entwicklung einer neuen retinalen Ganglienzelllinie wünschenswert.

## 5. Zusammenfassung

Die aktuelle Glaukomforschung ist geprägt von Diskussionen um die Herkunft, die Eigenschaften und die Differenzierungsmöglichkeiten der einzigen existierenden retinalen Ganglienzelllinie RGC-5, die seit ihrer Etablierung wichtige Ganglienzell-Eigenschaften eingebüßt hat. Sogar eine Kontamination mit der 661W-Fotorezeptor-Zelllinie wird vermutet [70, 72]. Diese Arbeit befasste sich mit der Frage, ob die RGC-5- und die 661W-Zelllinie unter Differenzierungsbedingungen unterschiedlich reagieren und wenn ja, inwiefern sich RGC-5-Zellen noch redifferenzieren lassen.

Die Arbeit gliederte sich in zwei Teilprojekte. Zuerst sollte herausgefunden werden, ob RGC-5- und 661W-Zellen unter Differenzierung mit 500 nM Trichostatin A und 300 nM Staurosporin gleich oder unterschiedlich reagieren, um dann im zweiten Schritt gängige Differenzierungsprotokolle von Schwechter *et al.* [78] und Wood *et al.* [39] unter gleichen Bedingungen zu evaluieren. Dazu wurden RGC-5-Zellen und 661W-Zellen mit vier verschiedene TSA-Konzentrationen (40, 150, 500 und 2000 nM) über 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden behandelt und anschließend mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Untersucht wurden die Expression der neuronalen Marker MAP-2, Tau,  $\beta$ -III-Tubulin und hNF, die relative mRNA-Expression von Thy-1, GFAP und VEGF sowie morphologische Veränderungen, Stoffwechselaktivität, Zellzahl, Proliferation und Apoptoseverhalten.

Trotz der Behauptung, RGC-5-Zellen seien mit 661W-Fotorezeptorzellen kontaminiert worden und möglicherweise mit ihnen identisch [70, 72], verhalten sich die beiden Zelllinien unter Differenzierung mit 500 TSA und 300 nM STS unterschiedlich. 661W-Zellen scheinen empfindlicher hinsichtlich der zytotoxischen Effekte von TSA zu sein. Die Caspase-Aktivität steigt in den ersten 48 Stunden stärker und fällt bei Langzeitinkubation weniger deutlich ab als bei RGC-5-Zellen und die Zellzahl sinkt stärker bei langen Inkubationszeiträumen. Während bei RGC-5-Zellen die morphologische Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp und die Expression neuronaler

Marker wie  $\beta$ -III-Tubulin bei Langzeitinkubation im Vordergrund steht, dominiert bei 661W-Zellen die sinkende Zellzahl und das Absterben. 661W-Zellen reagieren bei Langzeitinkubation und Behandlung nach dem Wood-Protokoll mit sinkender Stoffwechselaktivität während RGC-5-Zellen nach 120 Stunden ihre Vitalität um das 2,3 bis 2,5fache ( $p < 0.001$ ) bei Behandlung nach Schwechter bzw. Wood steigern. Während bei RGC-5-Zellen durch 120stündige Differenzierung mit 500nM TSA nach Wood die relative Thy-1-mRNA-Expression gesteigert werden kann, ist dies bei 661W-Zellen nicht der Fall.

Im Vergleich der Differenzierungsprotokolle zeigt die Inkubation nach Wood deutliche Vorteile. Es ergibt sich ein optimaler Inkubationszeitraum von vier bis fünf Tagen bei Einsatz von 500 nM TSA. Zwar lässt sich insgesamt die Apoptose nicht so stark reduzieren wie bei Inkubation nach Schwechter, aber nach Langzeitbehandlung mit 500 nM TSA ist die  $\beta$ -III-Tubulin-Expression stärker, die relative mRNA-Expression von Thy-1 kann gesteigert werden und es kommt zum Proliferationsstopp bei konstant bleibenden Zellzahlen. Bei Behandlung nach Schwechter kann durch Inkubation über vier bis fünf Tage mit 500 nM TSA zwar eine neuronale Differenzierung erreicht werden, allerdings kommt es zu Zellzahlverlusten bis auf 20 % der Kontrolle, die Zellen proliferieren weiter und die Thy-1-Expression kann nicht gesteigert werden.

Die Kernaussage dieser Dissertation ist, dass sich RGC-5- und 661W-Zellen unter Differenzierung mit TSA unterscheiden und die Möglichkeit besteht, die RGC-5-Zelllinie durch Langzeitinkubation mit 500 nM TSA nach Wood zumindest neuronal zu differenzieren sowie die Expression von spezifischen RGC-Markern zu steigern.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Tsatsos, M. and D. Broadway, *Controversies in the history of glaucoma: is it all a load of old Greek?* Br J Ophthalmol, 2007. 91(11): p. 1561-2.
2. Grewe, R., *[The history of glaucoma]*. Klin Monbl Augenheilkd, 1986. 188(2): p. 167-9.
3. Pearce, J.M., *The ophthalmoscope: Helmholtz's Augenspiegel*. Eur Neurol, 2009. 61(4): p. 244-9.
4. Draeger, J., *Meßprinzipien der Tonometrie von der Zeit Albrecht von Graefes bis zur D2-Mission und Selbsttonometrie*. Klin Monatsbl Augenheilkd, 1993. 202(01): p. 2-7.
5. Zimmer, M., *History of anaesthesia: early forms of local anaesthesia*. Eur J Anaesthesiol, 2014. 31(1): p. 1-12.
6. Draeger, J., *[A history of tonometry; physical principles, methodical development and clinical use]*. Bibl Ophthalmol, 1961. 56: p. 1-131.
7. Razeghinejad, M.R. and G.L. Spaeth, *A history of the surgical management of glaucoma*. Optom Vis Sci, 2011. 88(1): p. E39-47.
8. Komatsu, Y., *[A history of the development of eye drops used to treat glaucoma]*. Yakushigaku Zasshi, 2007. 42(1): p. 7-16.
9. Casson, R.J., et al., *Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts*. Clin Experiment Ophthalmol, 2012. 40(4): p. 341-9.
10. Bagnis, A., et al., *Current and emerging medical therapies in the treatment of glaucoma*. Expert Opin Emerg Drugs, 2011. 16(2): p. 293-307.
11. Hoyng, P.F. and L.M. van Beek, *Pharmacological therapy for glaucoma: a review*. Drugs, 2000. 59(3): p. 411-34.
12. Gesellschaft, B.d.A.D.D.O., *Leitlinie Nr. 15 a: Primäres chronisches Offenwinkelglaukom, Normaldruckglaukom und okuläre Hypertension* Leitlinien der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Bundesverbands für Augenärzte Deutschland, 2006.
13. Weinreb, R.N., T. Aung, and F.A. Medeiros, *The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review*. Jama, 2014. 311(18): p. 1901-11.
14. Actis, A.G., et al., *An internal medicine perspective review of risk factors for assessing and progression of primary open angle glaucoma*. Minerva Med, 2013. 104(4): p. 471-85.
15. Mills, D., *The glaucomas - a review*. Can Fam Physician, 1972. 18(11): p. 63-6.
16. Kroese, M. and H. Burton, *Primary open angle glaucoma. The need for a consensus case definition*. J Epidemiol Community Health, 2003. 57(9): p. 752-4.
17. Shields, M.B., *Normal-tension glaucoma: is it different from primary open-angle glaucoma?* Curr Opin Ophthalmol, 2008. 19(2): p. 85-8.
18. Dietlein, K., Wiedemann, *Glaukom und Makula 2010*. 2011: Springer Medizin Verlag Heidelberg. 154.
19. Franz Grehn MD, R.S.M., *Glaucoma: Essentials in Ophthalmology*, ed. M. Günter K. Krieglstein. 2009: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 126.
20. Kingman, S., *Glaucoma is second leading cause of blindness globally*. Bull World Health Organ, 2004. 82(11): p. 887-8.
21. Resnikoff, S., et al., *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bull World Health Organ, 2004. 82(11): p. 844-51.
22. Gesellschaft, B.d.A.D.D.O., *Leitlinie Nr. 15 c: Detektion des primären Offenwinkelglaukoms (POWG); Glaukom-Screening von Risikogruppen*,

- Glaukomverdacht, Glaukomdiagnose. Leitlinien der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Bundesverbands für Augenärzte Deutschland, 2006.*
23. Tham, Y.C., et al., *Global Prevalence of Glaucoma and Projections of Glaucoma Burden through 2040: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Ophthalmology, 2014.
  24. Quigley, H.A. and A.T. Broman, *The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020*. Br J Ophthalmol, 2006. 90(3): p. 262-7.
  25. Hennis, A., et al., *Awareness of incident open-angle glaucoma in a population study: the Barbados Eye Studies*. Ophthalmology, 2007. 114(10): p. 1816-21.
  26. Franz Grehn, M., *Augenheilkunde*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006. 29: p. 549.
  27. Olney, J.W., *Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion*. J Neuropathol Exp Neurol, 1969. 28(3): p. 455-74.
  28. Vorwerk, C.K., et al., *Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. 37(8): p. 1618-24.
  29. Vorwerk, C.K., et al., *Systemic L-kynurenine administration partially protects against NMDA, but not kainate-induced degeneration of retinal ganglion cells, and reduces visual discrimination deficits in adult rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. 37(12): p. 2382-92.
  30. Harper, M.M., et al., *Brain-derived neurotrophic factor released from engineered mesenchymal stem cells attenuates glutamate- and hydrogen peroxide-mediated death of staurosporine-differentiated RGC-5 cells*. Exp Eye Res, 2009. 89(4): p. 538-48.
  31. Ju, W.K., et al., *Elevated hydrostatic pressure triggers mitochondrial fission and decreases cellular ATP in differentiated RGC-5 cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. 48(5): p. 2145-51.
  32. Wood, J.P., et al., *The influence of visible light exposure on cultured RGC-5 cells*. Mol Vis, 2007. 14: p. 334-44.
  33. Maher, P. and A. Hanneken, *Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. 46(12): p. 4796-803.
  34. Maher, P. and A. Hanneken, *The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. 46(2): p. 749-57.
  35. Agarwal, N., et al., *Comparison of expression profile of neurotrophins and their receptors in primary and transformed rat retinal ganglion cells*. Mol Vis, 2007. 13: p. 1311-8.
  36. Xiang, M., et al., *The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons*. J Neurosci, 1995. 15(7 Pt 1): p. 4762-85.
  37. Beale, R. and N.N. Osborne, *Localization of the Thy-1 antigen to the surfaces of rat retinal ganglion cells*. Neurochem Int, 1982. 4(6): p. 587-95.
  38. Schnichels, S., et al., *Trichostatin A induces cell death at the concentration recommended to differentiate the RGC-5 cell line*. Neurochem Int, 2012. 60(6): p. 581-91.
  39. Wood, J.P., et al., *A comparison of differentiation protocols for RGC-5 cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. 51(7): p. 3774-83.
  40. Lieven, C.J., et al., *Induction of axon and dendrite formation during early RGC-5 cell differentiation*. Exp Eye Res, 2007. 85(5): p. 678-83.
  41. Chen, S.D., L. Wang, and X.L. Zhang, *Neuroprotection in glaucoma: present and future*. Chin Med J (Engl), 2013. 126(8): p. 1567-77.

42. Johnson, T.V., N.D. Bull, and K.R. Martin, *Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma*. *Exp Eye Res*, 2011. 93(2): p. 196-203.
43. Johnson, E.C., et al., *Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models*. *Exp Eye Res*, 2009. 88(4): p. 808-15.
44. Osborne, N.N., et al., *The potential of neuroprotection in glaucoma treatment*. *Curr Opin Ophthalmol*, 1999. 10(2): p. 82-92.
45. Nieto, P.S., et al., *Differential responses of the mammalian retinal ganglion cell line RGC-5 to physiological stimuli and trophic factors*. *Neurochem Int*, 2010. 57(3): p. 216-26.
46. Kitano, S., J. Morgan, and J. Caprioli, *Hypoxic and excitotoxic damage to cultured rat retinal ganglion cells*. *Exp Eye Res*, 1996. 63(1): p. 105-12.
47. Li, Y., et al., *p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate*. *Mol Vis*, 2002. 8: p. 341-50.
48. Casson, R.J., *Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma*. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2006. 34(1): p. 54-63.
49. Bai, N., et al., *NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina*. *Mol Brain*, 2013. 6: p. 34.
50. Dvorientchikova, G. and D. Ivanov, *Tumor necrosis factor-alpha mediates activation of NF-kappaB and JNK signaling cascades in retinal ganglion cells and astrocytes in opposite ways*. *Eur J Neurosci*, 2014.
51. Tezel, G., *TNF-alpha signaling in glaucomatous neurodegeneration*. *Prog Brain Res*, 2008. 173: p. 409-21.
52. Tezel, G. and X. Yang, *Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. 45(11): p. 4049-59.
53. Nickells, R.W., *From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma*. *Can J Ophthalmol*, 2007. 42(2): p. 278-87.
54. Nickells, R.W., *The cell and molecular biology of glaucoma: mechanisms of retinal ganglion cell death*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012. 53(5): p. 2476-81.
55. Ebnetter, A., et al., *Microglial activation in the visual pathway in experimental glaucoma: spatiotemporal characterization and correlation with axonal injury*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. 51(12): p. 6448-60.
56. Johnson, E.C. and J.C. Morrison, *Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma*. *J Glaucoma*, 2009. 18(5): p. 341-53.
57. Liu, B. and A.H. Neufeld, *Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head*. *Glia*, 2000. 30(2): p. 178-86.
58. Mulligan, S.J. and B.A. MacVicar, *Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions*. *Nature*, 2004. 431(7005): p. 195-9.
59. Whitmore, A.V., R.T. Libby, and S.W. John, *Glaucoma: thinking in new ways-a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes?* *Prog Retin Eye Res*, 2005. 24(6): p. 639-62.
60. Quigley, H.A., et al., *Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000. 41(11): p. 3460-6.
61. Harwerth, R.S., et al., *Linking structure and function in glaucoma*. *Prog Retin Eye Res*, 2010. 29(4): p. 249-71.
62. Nickells, R.W. and D.J. Zack, *Apoptosis in ocular disease: a molecular overview*. *Ophthalmic Genet*, 1996. 17(4): p. 145-65.
63. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. 35(4): p. 495-516.

64. Yuan, S., et al., *The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3*. Structure, 2011. 19(8): p. 1084-96.
65. Qu, J., D. Wang, and C.L. Grosskreutz, *Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma*. Exp Eye Res, 2010. 91(1): p. 48-53.
66. Kermer, P., et al., *Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application*. Neurodegener Dis, 2004. 1(1): p. 9-19.
67. Georg Löffler, P.E.P., Peter C. Heinrich *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 8. 2007, Heidelberg: Springer Medizin Verlag. p. 62-64.
68. Grozdanov, V., et al., *A method for preparing primary retinal cell cultures for evaluating the neuroprotective and neuritogenic effect of factors on axotomized mature CNS neurons*. Curr Protoc Neurosci, 2010. Chapter 3: p. Unit3.22.
69. Krishnamoorthy, R.R., et al., *Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. 86(1-2): p. 1-12.
70. Krishnamoorthy, R.R., et al., *A Forensic Path to RGC-5 Cell Line Identification: Lessons Learned*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. 54(8): p. 5712-9.
71. Fan, W., N. Agarwal, and N.G. Cooper, *The role of CaMKII in BDNF-mediated neuroprotection of retinal ganglion cells (RGC-5)*. Brain Res, 2006. 1067(1): p. 48-57.
72. Van Bergen, N.J., et al., *Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. 50(9): p. 4267-72.
73. Ganapathy, P.S., et al., *Sensitivity of staurosporine-induced differentiated RGC-5 cells to homocysteine*. Curr Eye Res, 2010. 35(1): p. 80-90.
74. Aoun, P., J.W. Simpkins, and N. Agarwal, *Role of PPAR-gamma ligands in neuroprotection against glutamate-induced cytotoxicity in retinal ganglion cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. 44(7): p. 2999-3004.
75. Wiese, C., et al., *Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?* Cell Mol Life Sci, 2004. 61(19-20): p. 2510-22.
76. Schultheiss, M., et al., *Staurosporine-induced differentiation of the RGC-5 cell line leads to apoptosis and cell death at the lowest differentiating concentration*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012. 250(8): p. 1221-9.
77. Frassetto, L.J., et al., *Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. 47(1): p. 427-38.
78. Schwechter, B.R., L.E. Millet, and L.A. Levin, *Histone deacetylase inhibition-mediated differentiation of RGC-5 cells and interaction with survival*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. 48(6): p. 2845-57.
79. Yoshida, M., et al., *Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A*. J Biol Chem, 1990. 265(28): p. 17174-9.
80. Kuo, M.H. and C.D. Allis, *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. Bioessays, 1998. 20(8): p. 615-26.
81. Mersfelder, E.L. and M.R. Parthun, *The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure*. Nucleic Acids Res, 2006. 34(9): p. 2653-62.
82. Bartova, E., et al., *Histone modifications and nuclear architecture: a review*. J Histochem Cytochem, 2008. 56(8): p. 711-21.
83. Marks, P.A., V.M. Richon, and R.A. Rifkind, *Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells*. J Natl Cancer Inst, 2000. 92(15): p. 1210-6.
84. Biermann, J., et al., *Histone deacetylase inhibitors sodium butyrate and valproic acid delay spontaneous cell death in purified rat retinal ganglion cells*. Mol Vis, 2011. 17: p. 395-403.

85. Kanai, H., et al., *Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons*. Pharmacogenomics J, 2004. 4(5): p. 336-44.
86. Rekling, J.C., *Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation*. Neurosci Lett, 2003. 335(3): p. 167-70.
87. Zhang, Z.Z., et al., *Valproate promotes survival of retinal ganglion cells in a rat model of optic nerve crush*. Neuroscience, 2012. 224: p. 282-93.
88. Pelzel, H.R., C.L. Schlamp, and R.W. Nickells, *Histone H4 deacetylation plays a critical role in early gene silencing during neuronal apoptosis*. BMC Neurosci, 2010. 11: p. 62.
89. Liu, H., et al., *Inhibition of class II histone deacetylase blocks proliferation and promotes neuronal differentiation of the embryonic rat neural progenitor cells*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2012. 72(4): p. 365-76.
90. Hsieh, J., et al., *Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(47): p. 16659-64.
91. Wang, Y., et al., *HDAC inhibitor trichostatin A-inhibited survival of dopaminergic neuronal cells*. Neurosci Lett, 2009. 467(3): p. 212-6.
92. Chen, P.S., et al., *Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity*. Neuroscience, 2007. 149(1): p. 203-12.
93. Salminen, A., et al., *Neuronal apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. 61(1-2): p. 203-6.
94. Tamaoki, T., et al., *Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>dependent protein kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. 135(2): p. 397-402.
95. Thompson, A.F. and L.A. Levin, *Neuronal differentiation by analogs of staurosporine*. Neurochem Int, 2010. 56(4): p. 554-60.
96. al-Ubaidi, M.R., et al., *Bilateral retinal and brain tumors in transgenic mice expressing simian virus 40 large T antigen under control of the human interphotoreceptor retinoid-binding protein promoter*. J Cell Biol, 1992. 119(6): p. 1681-7.
97. Tan, E., et al., *Expression of cone-photoreceptor-specific antigens in a cell line derived from retinal tumors in transgenic mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(3): p. 764-8.
98. Kanan, Y., et al., *Light induces programmed cell death by activating multiple independent proteases in a cone photoreceptor cell line*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. 48(1): p. 40-51.
99. Huang, C., et al., *Long-term blue light exposure induces RGC-5 cell death in vitro: involvement of mitochondria-dependent apoptosis, oxidative stress, and MAPK signaling pathways*. Apoptosis, 2014. 19(6): p. 922-32.
100. Osborne, N.N., et al., *Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies*. J Neurochem, 2008. 105(5): p. 2013-28.
101. Garcia-Ayuso, D., et al., *Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration*. Mol Vis, 2011. 17: p. 1716-33.
102. Schmidt, T.M., et al., *A role for melanopsin in alpha retinal ganglion cells and contrast detection*. Neuron, 2014. 82(4): p. 781-8.
103. Osborne, N.N., C. Nunez-Alvarez, and S. Del Olmo-Aguado, *The effect of visual blue light on mitochondrial function associated with retinal ganglions cells*. Exp Eye Res, 2014.

104. Nieto, P.S., et al., *Expression of novel opsins and intrinsic light responses in the mammalian retinal ganglion cell line RGC-5. Presence of OPN5 in the rat retina.* PLoS One, 2011. 6(10): p. e26417.
105. Gerhard Gstraunthaler, T.L., *Zell- und Gewebekultur.* Vol. 7. Auflage. 2013. 331.
106. Chiba, K., K. Kawakami, and K. Tohyama, *Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells.* Toxicol In Vitro, 1998. 12(3): p. 251-8.
107. Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton, *Determination of cell number in monolayer cultures.* Anal Biochem, 1986. 159(1): p. 109-13.
108. Riccardi, C. and I. Nicoletti, *Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.* Nat Protoc, 2006. 1(3): p. 1458-61.
109. Lang, G., *Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.* Vol. 2. 2013: Springer-Verlag/Wien.
110. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. 51 Pt 1: p. 263-73.
111. Theophilus, B.M., *Principles and Medical Applications of the Polymerase Chain Reaction,* in *Medical Biomethods Handbook,* J. Walker and R. Rapley, Editors. 2005, Humana Press. p. 63-72.
112. Mo, Y., R. Wan, and Q. Zhang, *Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research.* Methods Mol Biol, 2012. 926: p. 99-112.
113. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR.* Expert Rev Mol Diagn, 2005. 5(2): p. 209-19.
114. Peirson, S.N. and J.N. Butler, *Quantitative polymerase chain reaction.* Methods Mol Biol, 2007. 362: p. 349-62.
115. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.
116. Richon, V.M., et al., *Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(18): p. 10014-9.
117. Sumrejkanchanakij, P., et al., *Role of cyclin D1 cytoplasmic sequestration in the survival of postmitotic neurons.* Oncogene, 2003. 22(54): p. 8723-30.
118. Alao, J.P., et al., *The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines.* Mol Cancer, 2006. 5: p. 7.
119. Alao, J.P., et al., *Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines.* Clin Cancer Res, 2004. 10(23): p. 8094-104.
120. Zhang, Z.K., et al., *Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5.* Mol Cell Biol, 2002. 22(16): p. 5975-88.
121. Glozak, M.A., et al., *Acetylation and deacetylation of non-histone proteins.* Gene, 2005. 363: p. 15-23.
122. Quivy, V. and C. Van Lint, *Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation.* Biochem Pharmacol, 2004. 68(6): p. 1221-9.
123. Ryu, H., et al., *Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(7): p. 4281-6.
124. Hrabeta, J., et al., *Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review.* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2014. 158(2): p. 161-9.
125. Xu, W.S., R.B. Parmigiani, and P.A. Marks, *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action.* Oncogene, 2007. 26(37): p. 5541-52.



126. Ungerstedt, J.S., et al., *Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(3): p. 673-8.
127. Insinga, A., et al., *Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway*. Nat Med, 2005. 11(1): p. 71-6.
128. Burgess, A., et al., *Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells*. Oncogene, 2004. 23(40): p. 6693-701.
129. Thiagalingam, S., et al., *Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 983: p. 84-100.
130. Rothbart, S.B. and B.D. Strahl, *Interpreting the language of histone and DNA modifications*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1839(8): p. 627-43.
131. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. 293(5532): p. 1074-80.
132. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. 403(6765): p. 41-5.
133. Kiyama, T., et al., *Overlapping spatiotemporal patterns of regulatory gene expression are required for neuronal progenitors to specify retinal ganglion cell fate*. Vision Res, 2011. 51(2): p. 251-9.
134. Mu, X., et al., *Gene regulation logic in retinal ganglion cell development: Isl1 defines a critical branch distinct from but overlapping with Pou4f2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(19): p. 6942-7.
135. Yao, J., et al., *Math5 promotes retinal ganglion cell expression patterns in retinal progenitor cells*. Mol Vis, 2007. 13: p. 1066-72.
136. Mariani, L., et al., *Transcriptional control networks of cell differentiation: insights from helper T lymphocytes*. Prog Biophys Mol Biol, 2004. 86(1): p. 45-76.
137. Kretsovali, A., C. Hadjimichael, and N. Charmpilas, *Histone deacetylase inhibitors in cell pluripotency, differentiation, and reprogramming*. Stem Cells Int, 2012. 2012: p. 184154.
138. Gaub, P., et al., *HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation*. Cell Death Differ, 2010. 17(9): p. 1392-408.
139. Chen, B. and C.L. Cepko, *Requirement of histone deacetylase activity for the expression of critical photoreceptor genes*. BMC Dev Biol, 2007. 7: p. 78.
140. Wallace, D.M. and T.G. Cotter, *Histone deacetylase activity in conjunction with E2F-1 and p53 regulates Apaf-1 expression in 661W cells and the retina*. J Neurosci Res, 2009. 87(4): p. 887-905.
141. Wallace, D.M., M. Donovan, and T.G. Cotter, *Histone deacetylase activity regulates apaf-1 and caspase 3 expression in the developing mouse retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. 47(7): p. 2765-72.
142. Charles, I., et al., *Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. 46(4): p. 1330-8.
143. ASN-0002, A.T.C.C.S.D.O.W., *Cell line misidentification: the beginning of the end*. Nat Rev Cancer, 2010. 10(6): p. 441-8.
144. MacLeod, R.A., et al., *Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source*. Int J Cancer, 1999. 83(4): p. 555-63.
145. Nardone, R.M., *Curbing rampant cross-contamination and misidentification of cell lines*. Biotechniques, 2008. 45(3): p. 221-7.
146. Nardone, R.M., *Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action*. Cell Biol Toxicol, 2007. 23(6): p. 367-72.

147. Sippl, C. and E.R. Tamm, *What is the nature of the RGC-5 cell line?* Adv Exp Med Biol, 2014. 801: p. 145-54.
148. Al-Ubaidi, M.R., *RGC-5: are they really 661W? The saga continues.* Exp Eye Res, 2014. 119: p. 115.
149. Agarwal, N., *RGC-5 cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. 54(13).
150. Clark, A., et al., *On the use of immortalized ocular cell lines in vision research: the unfortunate story of RGC-5.* Exp Eye Res, 2013. 116: p. 433.
151. Schnichels, S., et al., *Comparative toxicity and proliferation testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells.* Br J Ophthalmol, 2013. 97(7): p. 917-23.
152. Tsuruma, K., et al., *Role of oxidative stress in retinal photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated mice.* J Pharmacol Sci, 2012. 118(3): p. 351-62.
153. Mackey, A.M., et al., *Redox survival signalling in retina-derived 661W cells.* Cell Death Differ, 2008. 15(8): p. 1291-303.
154. Masters, J.R., et al., *Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(14): p. 8012-7.
155. Eltonsy, N., et al., *Detection algorithm for the validation of human cell lines.* Int J Cancer, 2012. 131(6): p. E1024-30.
156. Barallon, R., et al., *Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues.* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. 46(9): p. 727-32.
157. Georg Löffler, P.E.P., Peter C. Heinrich *Biochemie und Pathobiochemie.* Vol. 8. 2007, Springer Medizin Verlag Heidelberg. p 227.
158. Chemiluminescent Western Detection. Produktdatenblatt der Firma Advansta, California.
159. Kolb, H., et al., *Morphology and Circuitry of Ganglion Cells.* Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. 1995.
160. Greeff R., et al., *Die mikroskopische Anatomie des Sehnerven und der Retina.* Leipzig 1900.

## 7. Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit,

1. dass ich bisher keine Promotions- oder entsprechende Prüfungsverfahren abgebrochen oder abgeschlossen habe.
2. dass die vorgelegte Dissertation noch nie ganz oder teilweise als Dissertation oder sonstige Prüfungsarbeit eingereicht worden ist.
3. dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel *„Ist die einzige reginale Ganglienzelllinie wirklich nutzlos? – Der Vergleich der RGC-5- mit der 661W-Zelllinie unter Differenzierungsbedingungen und die Gegenüberstellung zweier Differenzierungsprotokolle für RGC-5-Zellen.“* selbstständig erarbeitet und verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Herr Prof. Spitzer und Herr Dr. Schnichels waren an der Konzeption der Forschungsarbeiten und Fragestellungen beteiligt und haben die Arbeit betreut. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass eine falsche eidesstattliche Versicherung mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe bestraft wird.
4. dass ich bisher weder strafrechtlich verurteilt, noch Disziplinarmaßnahmen und anhängigen Straf- und Disziplinarverfahren unterzogen worden bin.

Tübingen, den 12.07.2016

.....

(Unterschrift)

## 8. Veröffentlichungen

Poster-Präsentation auf dem Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Leipzig 2014.

**The RGC-5 vs. the 661W cell line: similarities, differences and remaining opportunities – is the only existing retinal ganglion cell line really useless?**

Attrodt G, Hofmann J, Frößl K, Bartz-Schmidt K.U., Spitzer M, Schnichels S. Department für Augenheilkunde, Universitäts-Augenklinik, Tübingen, Germany.

Purpose: The RGC-5 cell line is widely used in retinal ganglion cell (RGC) research even though it is known to have been dedifferentiated over the years and recent reports raised questions about their origin. The photoreceptor 661W cell line is sharing several similarities and the option, that the RGC-5 cell line was contaminated with the 661W cell line exists. Over the last years different ways of redifferentiation were pronounced including treating the RGC-5 cells with Trichostatin A (TSA). The aim of this study was to clarify if the cell lines are the same, if both are handled under the exactly same conditions.

Methods: RGC-5 and 661W cells were treated for 24, 48, 72, 96 and 120 h with TSA according to 2 published protocols (Schwechter 2007, Wood 2010) to cause redifferentiation. Cell morphology was investigated with phase contrast microscopy. Cell viability was analyzed by an MTS assay. To investigate apoptosis Caspase 3/7-Assays were performed and the ratio of cleaved caspase 3/caspase 3 and BAX/Bcl-2 was analyzed via Western Blot (WB). The expression profile of neuronal and RGC markers such as MAP-2, tau and  $\beta$ III-tubulin was analyzed via immunostaining (IS) and  $\beta$ -tubulin expression was detected via WB.

Results: RGC-5 treated cells in general appeared with round somata and various neuritic outgrowths while 661W cells remained long shaped with less neuritis. Cell viability of TSA treated RGC-5 cells reached a peak after 120 h of

incubation. In contrast, 661W did not show this reaction. 661W cells reacted more sensitive concerning caspase 3/7 activity and mostly showed higher caspase 3/7 activity than RGC-5 cells. In contrast the cleaved caspase 3/caspase 3 ratio of the 661W cells did not react as strong as RGC-5 cells but in the same manner. The expression of  $\beta$ -III-tubulin detected via WB increased especially in RGC-5 cells after longterm incubation with TSA whereas  $\beta$ -III-tubulin expression of 661W cells did not differ from untreated controls. This finding was confirmed by IS against  $\beta$ -III-tubulin.

Conclusion: Although the 661W and RGC-5 cell line reacted quite similar with a few methods, with the majority of the methods the reaction differed. Especially the higher expression of the RGC specific marker  $\beta$ -III-tubulin in the RGC-5 cells, shown by protein quantification and IS shows that these cell lines are not the same. In conclusion, there is a slight chance that the RGC-5 cells can still be used – under limited conditions – and with a good differentiation protocol.

## Danksagung

Ich möchte meiner Familie von ganzem Herzen danken, allen voran meinem Vater, der sich geduldig der Aufgabe des Korrekturlesens widmete und meiner Mutter, die mich menschlich vor allem in den Tiefen dieser Arbeit aufgefangen und unterstützt hat.

Diese Arbeit wäre nicht das geworden was sie ist, wenn es nicht Sven Schnichels, meinen tatkräftigen und kritischen Betreuer gäbe, der mir vorgelebt hat, was es heißt, mit Herz und Seele zu forschen und mir beigebracht hat, nie mit dem Hinterfragen aufzuhören. Auch meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Spitzer gilt ganz besonderer Dank, da er für mich immer erreichbar war, sich Zeit für mich genommen hat und meine Begeisterung, trotz Doktorarbeit zu reisen und Famulaturen im Ausland zu absolvieren, immer unterstützte.

Johanna Hofmann, die mich einarbeitete, bei meinen Experimenten unterstützte und mir aus der Patsche half, wenn es mal nicht klappte, an dieser Stelle ein dickes Dankeschön. Auch Katharina Frößl und José Hurst vielen Dank für ihre Hilfe und aktive Unterstützung.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die Akzeptanz und Geduld bedanken, die sie mir entgegen gebracht haben.

All den vielen Menschen, die die mich in den letzten Jahren begleitet haben und mich unterstützten und die ich hier nicht alle namentlich nennen kann, möchte ich trotzdem kurz danken. Sie wissen, was es mir bedeutet hat, sie an meiner Seite zu haben.



# Lebenslauf

## Schulbildung und universitäre Laufbahn

04. Mai 2016	M3: Drittes Staatsexamen Humanmedizin
16. April 2015	M2: Zweites Staatsexamen Humanmedizin
25. - 28. September 2014	Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft in Leipzig: Posterpräsentation mit dem Titel „Is the only existing retinal ganglion cell line really useless?“ Kongressstipendium als beste Studierende des Faches Augenheilkunde der Universität Tübingen
September 2012 - Januar 2016	Forschungsarbeit im Rahmen meiner Doktorarbeit im Labor des Breuningerbaus am Department für Augenheilkunde der Universitätsklinik Tübingen, inklusive Urlaubssemester zur Vertiefung der Laborarbeit (Wintersemester 12/13)
September 2011	M1: Erstes Staatsexamen Humanmedizin
Oktober 2009 - Mai 2016	Medizinstudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Juli 2009	Abitur
September 1996 - Juli 2009	Freie Waldorfschule Schopfheim

## Famulaturen und Arbeitserfahrung

Mai 2015 - April 2016	Praktisches Jahr des Medizinstudiums
Februar - März 2014	Famulatur im Queen Elizabeth Central Hospital in Blantyre, Malawi, Inneren Medizin
September - Oktober 2013	Famulatur an der Universitätsaugenklinik Tübingen
Februar - März 2013	Famulatur im Pasam Trust Health Care Centre, Südindien, Allgemeinmedizin und Augenheilkunde
September 2012	Famulatur im Kreiskrankenhaus Eckernförde, Innere Medizin
April 2012 - Oktober 2014	Anstellung als studentische Hilfskraft (OP-Assistenz) an der Universitätsfrauenklinik Tübingen.
Februar - März 2012	Famulatur an der Universitätsfrauenklinik Tübingen