

# **Eisen und Eisenproteine in Neuronen mit perineuronalem Netz**

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie  
der Universität Leipzig  
genehmigte

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

**Dr. rer. nat.**

vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Anja Fiedler**

geboren am 29.05.1981 in Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Matthias Müller

Gutachter:

Prof. Dr. med. T. Arendt

Prof. Dr. rer. nat. R. Dringen

Prof. Dr. rer. nat. R. Rübsamen

Tag der Verteidigung: 09.01.2009







# Bibliographische Beschreibung

Fiedler, Anja

## Eisen und Eisenproteine in Neuronen mit perineuronalem Netz

Universität Leipzig, Dissertation

154 Seiten, 398 Literaturzitate, 41 Abbildungen, 7 Tabellen

---

### Zusammenfassung:

In der vorliegenden Dissertation wurden Neurone untersucht, die von einer speziellen Form der extrazellulären Matrix, dem perineuronalen Netz (PN), umgeben sind. Neurone mit einem PN zeichnen sich durch eine geringe Vulnerabilität bei neurodegenerativen Erkrankungen aus. Da das PN mit hoher Affinität Eisen bindet, war zu klären, ob das PN den Eisenhaushalt der Neurone beeinflusst und diese mit einer protektiven Eigenschaft gegenüber Eisen-induzierten oxidativen Stress ausstattet.

Es wurde die Eisenkonzentration und der Gehalt an Eisentransport- und Eisenspeicherproteinen von Neuronen mit PN und Neuronen ohne PN in der Ratte untersucht. Dabei kamen quantitative Methoden wie die orts aufgelöste Ionenstrahlmikroskopie und die Objektträger-basierte Laser Scanning Zytometrie sowie Western Blot Analysen und quantitative Real-Time-PCR zum Einsatz.

Die Untersuchungen zeigen, daß Neurone, die mit einem PN umgeben sind, eine höhere Konzentration an Eisen sowie Eisentransport- und Eisenspeicherproteinen besitzen als Neurone ohne ein PN. Das PN könnte so den Eisenhaushalt der Neurone beeinflussen und diese mit einer protektiven Eigenschaft gegenüber Eisen-induziertem oxidativen Stress ausstatten.



*Gewidmet meinen lieben Ellis und meinem lieben Freund.  
In Erinnerung an Karla.*



‘Gold is for the mistress - silver for the maid -  
Copper for the craftsman cunning at his trade.’  
‘Good!’ said the Baron, sitting in his hall,  
‘But IRON - Cold IRON - is master of them all.’

*Rudyard Kipling (1865-1936)*



# Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung	v
Inhaltsverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xv
<b>1 Einleitung</b>	<b>17</b>
1.1 Perineuronale Netze (PNs)	17
1.1.1 Aufbau	17
1.1.2 Vorkommen	19
1.1.3 Potentielle Funktionen	22
1.1.4 Protektive Eigenschaft bei neurodegenerativen Erkrankungen	23
1.2 Eisen im Gehirn	25
1.2.1 Die Redoxaktivität und Toxizität von Eisen	25
1.2.2 Die Rolle des Eisens bei neurodegenerativen Erkrankungen	27
1.2.3 Transport und Speicherung von Eisen in Neuronen	28
1.3 Beziehung von perineuronalen Netzen und Eisen im Gehirn	31
1.3.1 Aufgabenstellung	33
1.4 Methodische Einleitung	33
1.4.1 Ionenstrahlmikroskopie	33
1.4.2 Objektträger-basierte Laser-Scanning-Zytometrie	34
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>37</b>
2.1 Ionenstrahlmikroskopie	37
2.1.1 Hochenergie-Ionen-Nanosonde <i>LIPSION</i>	37
2.1.2 Particle-Induced X-Ray Emission-Spektrometrie	38
2.1.3 Rutherford-Backscattering-Spektrometrie	39
2.1.4 Probenvorbereitung	40
2.1.5 Messung und Auswertung anhand von Element-Maps	42
2.1.6 Subzelluläre Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation	43
2.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	44
2.2.1 Präparation und Homogenisierung von Hirngewebe	44
2.2.2 RNA-Isolation, Reverse Transkription und qRT-PCR	45
2.3 Western Blot	47
2.3.1 Präparation und Homogenisierung von Hirngewebe	47
2.3.2 SDS-PAGE	47

2.3.3	Western Blot . . . . .	48
2.3.4	Membran-gebundene Immundarstellung der Proteine . . . . .	49
2.4	Immunhistochemische Markierung . . . . .	49
2.5	Laser Scanning Zytometrie . . . . .	52
2.5.1	Gerät und technisches Prinzip . . . . .	52
2.5.2	Fluoreszenz: Auswahl und Kompensation . . . . .	52
2.5.3	Triggern und Analyse . . . . .	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1	Ionenstrahlmikroskopie: Zellulärer Eisengehalt . . . . .	57
3.1.1	Markierung der PNs . . . . .	57
3.1.2	Ortsaufgelöste Elementdarstellung von PN-positiven und PN-negativen Neuronen . . . . .	58
3.1.3	Eisenkonzentration PN-positiver und PN-negativer Neurone . .	60
3.1.4	Zelluläre Eisenverteilung anhand eines Element-Map-Querschnitts	61
3.1.5	Ortsaufgelöste Darstellung des Eisens in Zellkompartimenten . .	61
3.1.6	Elementgehalt subzellulärer Fraktionen . . . . .	63
3.1.7	Eisenkonzentration von Oligodendrozyten und Astrozyten . . .	63
3.2	qRT-PCR: mRNA-Expression in PN-reichen Hirnregionen . . . . .	65
3.2.1	qRT-PCR-Produkte . . . . .	65
3.2.2	Quantifizierung der Eisenprotein-spezifischen mRNA . . . . .	67
3.3	Western Blot: Protein-Expression in PN-reichen Hirnregionen . . . . .	68
3.3.1	Eisenprotein-Expression . . . . .	68
3.3.2	Regionale CSPG-Expression . . . . .	69
3.4	Immunhistochemie: Darstellung der zellulären Eisenprotein-Expression	71
3.4.1	Immunhistochemische Markierung der Eisenproteine . . . . .	71
3.4.2	Kolokalisation von Eisenproteinen und Eisen . . . . .	74
3.5	Laser Scanning Zytometrie: Quantifizierung der zellulären Eisenproteine	75
3.5.1	Daten-Analyse . . . . .	75
3.5.2	Auswertung der Daten . . . . .	78
3.5.3	Bestimmung der Anzahl PN-positiver Neurone . . . . .	78
3.5.4	Quantifizierung der neuronalen Eisenprotein-Expression . . . . .	79
3.6	Kurzzusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	80
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
4.1	Diskussion der Methoden . . . . .	83
4.1.1	Ionenstrahlmikroskopie . . . . .	83
4.1.2	Western Blot und qRT-PCR . . . . .	85
4.1.3	Laser Scanning Zytometrie . . . . .	86
4.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	89
4.2.1	Höhere Eisenkonzentration in PN-positiven Neuronen . . . . .	89
4.2.2	Eisenkonzentration von Oligodendrozyten & Astrozyten . . . . .	90
4.2.3	Regionale Aggrecan-Expression . . . . .	91
4.2.4	Ko-Lokalisation von Eisen und Eisenproteinen . . . . .	92
4.2.5	Eisenprotein- und mRNA-Expression . . . . .	93
4.2.6	Eisenproteine vs. Neurodegeneration . . . . .	98

---

4.2.7	Einfluß des PN auf den zellulären Eisenhaushalt . . . . .	99
4.2.8	Ausblick . . . . .	102
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>109</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>147</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>149</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>151</b>



# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
<i>AD</i>	Alzheimersche Erkrankung
<i>Ak</i>	Antikörper
<i>cDNA</i>	copy-Desoxyribonukeinsäure
<i>CS – GAG</i>	Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykan
<i>CSPG</i>	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
<i>Cy2</i>	Carbocyanin
<i>Cy3</i>	Indocarbocyanin
<i>Cy5</i>	Indodicarbocyanin
<i>DAB</i>	Diaminobenzidin
<i>DAPI</i>	4',6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochlorid
<i>DcytB</i>	Duodenales Zytochrom B
<i>DMT1</i>	Divalentes Metalltransportprotein 1
<i>EK</i>	entorhinaler Kortex
<i>EZM</i>	extrazelluläre Matrix
<i>GABA</i>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<i>GAG</i>	Glykosaminoglykane
<i>GalNAc</i>	N-Acetylgalactosamin
<i>GFAP</i>	saures fibrilläres Gliaprotein
<i>GSH</i>	Glutathion
<i>Ig</i>	Immunglobulin
<i>KI</i>	Konfidenzintervall

<i>LIP</i>	labiler Eisenpool
<i>LSZ</i>	Laser-Scanning-Zytometrie
<i>MFI</i>	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
<i>mRNA</i>	messenger-Ribonukleinsäure
<i>MTP1</i>	Metalltransportprotein 1
<i>MW</i>	Mittelwert
<i>NeuN</i>	Neuronales Kernprotein
<i>NR</i>	Nucleus ruber
<i>OSP</i>	Oligodendrozyten-spezifisches Protein
<i>PD</i>	Parkinsonsche Erkrankung
<i>PIXE</i>	Particle-Induced X-Ray Emission
<i>PK</i>	parietaler Kortex
<i>PMT</i>	Photomultiplier
<i>PN</i>	perineuronales Netz
<i>PNs</i>	perineuronale Netze
<i>qRT – PCR</i>	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
<i>RBS</i>	Rutherford-Backscattering-Spectrometry
<i>ROS</i>	reaktive Sauerstoffspezies
<i>sbLSZ</i>	Objektträger-basierte Laser-Scanning-Zytometrie
<i>SDS – PAGE</i>	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
<i>SE</i>	Standardfehler
<i>SN</i>	Substantia nigra
<i>SR – XRF</i>	Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence Spectroscopy
<i>SUB</i>	Subiculum
<i>Tf</i>	Transferrin
<i>TfR</i>	Transferrin-Rezeptor
<i>WFA</i>	<i>Wisteria floribunda</i> -Agglutinin
<i>ZNS</i>	Zentrales Nervensystem

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Perineuronale Netze (PNs)

Die extrazelluläre Matrix (EZM) des ZNS ist in Zusammensetzung und Organisation einmalig. Die in anderen Geweben üblicherweise vorkommenden Faserproteine wie Fibronektin oder Kollagen sind kein Bestandteil des ZNS, hingegen kommen viele Glykosaminoglykane (GAG) vor [RUO96, YAM00, NOV00, GAL07]. Die EZM (ca. 15-25% des adulten Hirnvolumens) kommt zum einen diffus im Gehirn vor oder, als spezialisierte Form der EZM, kondensiert als perineuronales Netz (PN) [BRÜ94B, BRÜ96, DEE06]. Das PN umgibt als maschenartige Struktur das Soma, die Dendriten und das Axoninitialsegment bestimmter Neurone sowie internierende präsynaptische Boutons (“Netzlöcher”) auf der Zelloberfläche (Abb. 1.1) [CEL94, BRÜ94B, BRÜ00, BRÜ06B]. Entdeckt wurden die PNs 1882 von Camillo Golgi [GOL82], der sie 1893 als “perizelluläre Netze” beschrieb [GOL98]. In den folgenden Jahren gingen Wissenschaftler wie Ramón y Cajal (1897), Meyer (1897), Bethe (1900), Held (1902), Alzheimer (1910) und Besta (1911) der Frage nach, was ein PN sei, aus was es besteht, welche Zelltypen es ausbilden, wie es sich bei pathologischen Erkrankungen verhält und welche möglichen Funktionen es haben könnte [VIT98, CEL98]. Nachdem das Interesse zunächst verloren ging, wurde das PN 100 Jahre nach dessen Erstbeschreibung von Brauer [BRA82] und Delpech [DEL82] “wiederentdeckt” und ist seitdem Gegenstand der aktuellen Forschung.

#### 1.1.1 Aufbau

Das PN ist ein Aggregat aus: 1) den GAG-haltigen Chondroitinsulfat-Proteoglykanen (CSPG) Aggrecan, Versican, Brevican, Neurocan und Phosphacan, 2) der Hyaluronsäure und 3) dem Tenascin-R (Abb. 1.2) [ASH95, BRÜ00, YAM00, CAR07, GAL07]. CS-GAG sind lange, unverzweigte Polymere aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten [BAN00]. Aggrecan und Versican kommen auch in anderen Bindegeweben vor, Neurocan und Brevican dagegen ausschließlich im Nervengewebe [MEY95, RHO04]. Aggrecan ist das Hauptproteoglykan der PNs [DIT06, GAL08B]. Phosphacan gehört zur Proteoglykan-Familie der Rezeptor-ähnlichen Protein-Tyrosinphosphatasen RPTP $\beta$  und besitzt keine GAG [MAU94, BAN00]. Tenascin-R kann im PN-Komplex

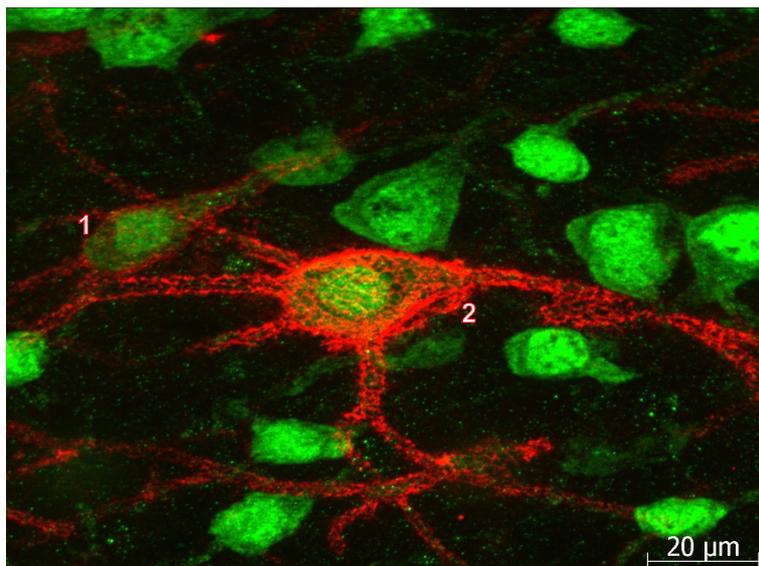


Abb. 1.1: Das **peri-neuronale Netz** (WFA) umgibt wabenförmig Zellkörper und Dendriten des **Neurons** (NeuN). 1 Interneuron mit schwachem PN, 2 Interneuron mit starkem PN. Parietaler Kortex.

als Mono-, Di- und Trimer vorkommen [RUO96]. Die Bindung der Proteoglykane mit Tenascin-R erfolgt über Lektin-ähnliche Domänen am C-Terminus (G3-Domäne) und über eine Fibronectin-Typ-III homologe Domäne des Tenascin-R [ASP97, BAN00]. An die Hyaluronsäure binden die Proteoglykane mit dem N-Terminus (G1-Domäne), wobei die Bindung über ein Link-Protein (CRTL1, BRAL1-3) ermöglicht wird [BAN00, GAL07]. Phosphacan kann nicht an die Hyaluronsäure binden.

Die Proteoglykane Brevican, Neurocan und Phosphacan werden von Neuronen als auch von Gliazellen gebildet, Versican hingegen ausschließlich von Gliazellen (zusammengefasst in [BAN00]). Aggrecan wird in Säugetieren nachweislich von Neuronen exprimiert [BAN00, MAT02, CAR06, GAL08B]. Zwar wird am Hühnerembryo auch eine regionale Überlappung von Aggrecan mit dem frühen Gliamarker (GLAST) gezeigt [DOM08]. Allerdings ist nach eigenen neusten Arbeiten am Vogelhirn (*Gallus domesticus*) anzunehmen, daß die Aggrecanproteine von Vögeln und Säugetieren nicht identisch sind [MOR08B]. Einen Erklärungsansatz liefert die phylogenetische Distanz beider Klassen.

Die Hyaluronsäure ist glialen und neuronalen Ursprungs und wird vermutlich über den CD44-Rezeptor (Gliazelle) und von der Hyaluronsynthetase vom Typ 2 und 3 (Neuron) in der Zelle verankert, wobei zusätzlich neuronale Zelladhäsionsmoleküle (NCAM) und Integrine eine Rolle spielen [COU98, NOV00, CAR06, DIT06]. Tenascin-R wird von glialen und neuronalen Zellen synthetisiert [CAR06].

PNs entstehen postnatal im kurzen Zeitfenster der ZNS-Entwicklung während der Synaptogenese und der Myelogenese [BAN00, SCH04, BRÜ04, GAL07]. Die Bildung der PNs, deren Entwicklungsgradient in gewissem Umfang die regionale Hirnreifung reflektiert, ist am 21. bis 35. Postnatal-Tag mit adulter physiologischer Neuronen-Aktivität abgeschlossen [MUR95, KÖP97, BRÜ00, BRÜ04, CAR07, GAL07].

Durch die aufgeführten Bestandteile, aus denen das PN besteht, bedingt sich die für diese Arbeit wichtigste Eigenschaft des PN: es ist negativ geladen! Der dadurch polyanionische Charakter des PN ist Grundlage für die in 1.3 postulierte Funktion des PN.

Die komplexe Struktur der PNs wird durch den Anteil der verschiedenen Komponenten bestimmt und resultiert in einer molekularen und chemischen Heterogenität der PNs [HOC83, FUJ89, MCK82, OJI98, HÄR95, BRÜ94B, BRÜ96, MAT02, ALP06]. Die Komponenten, die die negative Ladung der PNs verursachen, sind vor allem das Chondroitinsulfat, aber auch die Hyaluronsäure. Deren Anteil bestimmt maßgeblich die Stärke der negativen Ladung des PN.

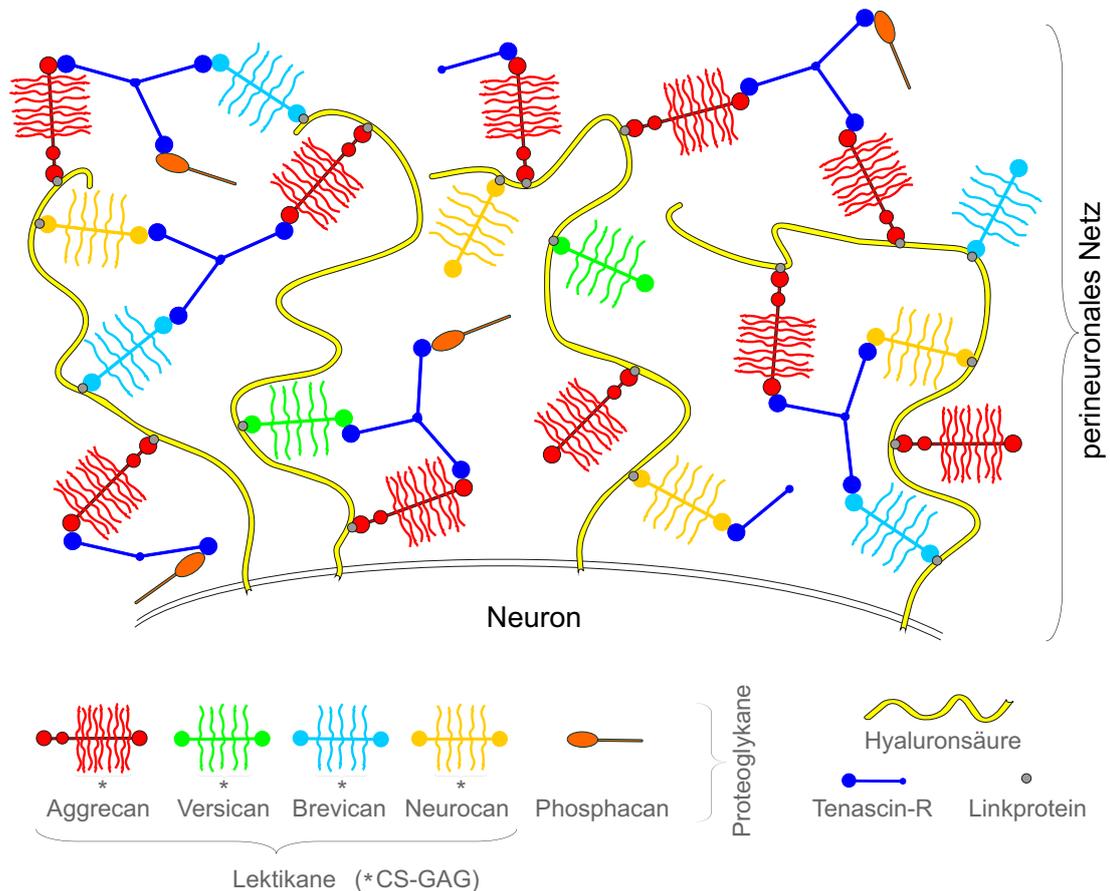


Abb. 1.2: Schema der molekularen Organisation eines perineuronalen Netzes. Die CSPG sind die Hauptkomponenten des PN. Sie bestehen aus den Lektikanen Aggrecan, Versican, Brevican und Neurocan mit CS-GAG-Seitenketten, sowie aus dem Phosphacan. Die Proteoglykane sind über Linkproteine an Hyaluronsäure gebunden und bilden zusammen mit Tenascin-R einen tertiären Komplex. Einzelheiten im Text.

### 1.1.2 Vorkommen

PNs kommen im Gehirn vieler Vertebraten vor: in Fischen (Peitschenmesseraal (*Apteronotus leptorhynchus*) [MOR04A], Schwertfisch (*Plecoglossus altivelis*), Karpfen (*Cyprinus carpio*) [MUR94]), in Amphibien (Ochsenfrosch (*Rana catesbeiana*), Teichmolch (*Triturus vulgaris*) [MUR94]), in Reptilien (Asiatischer Hausgecko (*Hemidactylus frenatus*), Japanische Sumpfschildkröte (*Clemmys japonica*) [MUR94]), in Vögeln (Wachtel (*Coturnix coturnix*), Sittich (*Psittacidae spec.*) [MUR94], Huhn (*Gallus domesticus*) [MOR08B]) und in einer Vielzahl verschiedener Spezies in Säugetieren (Rat-

te (*Rattus norvegicus*) [BRA82, LAF84, STE88, BRÜ93, BRÜ94B, BRÜ96, ALP06, BER96, BRÜ04, CAR06, DEE06, DER96, KÖP97, HOB98, HAG99, HÄR01A, SCH02, FIE07, GAL08B], Chilenische Zwergbeutelratte (*Thylamys elegans*) [BRÜ06A], Haus-Spitzmausbeutelratte (*Monodelphis domestica*) [BRÜ98B], Mongolische Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) [BRÜ94B], Meerschwein (*Cavia porcellus*) [OJI98], Kleiner Igeltenrek (*Echinops telfairi*) [MOR08C], Maus (*Mus musculus*) [BRÜ00, HAU00, BRÜ03, DIT07, REI07A], Katze (*Felis catus*) [BEN99], Hund (*Canis lupus forma familiaris*) [BES11], Schaf (*Ovis orientalis aries*) [VID06A], Kuh (*Bos taurus*) [MUR94], Bison (*Bison bison*) [HÄR01B], Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) [HÄR95, HIL07], Makake (*Macaca fascicularis*) [DEY90] und Mensch (*Homo sapiens sapiens*) [BER90, BER91, HOC90B, YAS94, HAU96, MOR04B, MEI06, BRÜ08, PAN06, PAN08]). Das Vorkommen und die Zelldichte der PN-tragenden Neurone sowie die Intensität der PN-Markierung oder der diffusen EZM des Neuropils variiert in der gleichen Region von Art zu Art (z.B. Mongolische Wüstenrennmaus vs. Ratte [BRÜ94B]). Die nachfolgenden Angaben beziehen sich schwerpunktmäßig auf Beobachtungen in Säugetieren.

## Hirnregionen

PNs kommen mit unterschiedlicher Häufigkeit, Stärke und chemischer Zusammensetzung in nahezu jeder Hirnregion vor (zur Übersicht siehe [SEE94]). Die wenigen Regionen, die einen sehr geringen Anteil PN-tragender Neurone (folgend auch als PN-positiv bezeichnet) aufweisen, sind u.a. der entorhinale Kortex, das Striatum, der Hypothalamus, die medialen Thalamuskern und der olfaktorische Bulbus. Die in dieser Arbeit untersuchten Hirnregionen werden unter 1.1.2 nochmals aufgegriffen.

## Zelltypen

Auch wenn einzelne PN-Komponenten von Gliazellen sezerniert werden (1.1.1), umgeben PNs ausschließlich Neurone. Häufig werden die kortikalen PN-tragenden Neurone als schnell-feuernde, Parvalbumin- und Kv3.1b-positive, GABAerge Interneurone beschrieben [KOS89, DRA91, HÄR92, MOR92A, CEL93B, HÄR94, YAS94, DU96, HÄR99, BRÜ94B, MUR95, MOR00, ALP06]. Parvalbumin, ein Calcium-bindendes Protein, und Kv3.1b, eine Untereinheit (UE) spannungsabhängiger Kalium-Kanäle, unterstützen die schnelle Repolarisation und gewährleisten damit eine hohe Rate an Aktionspotenzialen, so daß sie mit schnell-feuernden Neuronen korreliert zu sein scheinen [HÄR99, DIT06, CAR06].

Die genannten allgemeinen Charakteristika mögen zwar für den Großteil der PN-tragenden Interneurone des Neokortex zutreffen, haben aber keineswegs universelle Gültigkeit [BRÜ94A, OHY97, OJI98, BRÜ99, WEG03, PAN06]. So tragen z.B. nicht alle kortikalen Parvalbumin-positiven Neurone ein PN und umgekehrt [YAS94]. Bereits im Kortex sind drei verschiedene PN-tragende Neuronenpopulationen anzutreffen: 1) die erwähnten nichtpyramidalen, GABAergen, Parvalbumin- und teilweise Calbindin-positiven Neurone mit starkem PN, 2) die glutamatergen Pyramidenzellen mit dünnem PN und 3) glutamaterge als auch gleichzeitig GABA<sub>A</sub>-Rezeptorpositive Neurone mit starkem, diffusem PN (1.1.2) [WEG03]. Im Hippocampus tragen Interneurone der CA1–4, als auch glutamaterge Pyramidenzellen der CA2-Region

ein PN [DRA91, CEL93A, DU96, SCH02, BRÜ03]. In den zentralen auditorischen Hirnregionen wie dem medialen Nukleus des Trapezkörpers (MNTB) kommen weitere Subklassen PN-tragender Neurone vor: glycinerge Octopus- und Prinzipalzellen sowie die Parvalbumin- und Calbindin-positiven aspartatergen Zellen [FRI00, HÄR01A]. Die PN-tragenden Motorneurone des okulomotorischen und trochlearen Nukleus sind cholinerg, die Motorneurone des Nucleus ruber hingegen vorwiegend glutamaterg. Desweiteren kommen Parvalbumin-positiv, inhibitorische, glycinerge Neurone im RIP (Nucleus raphe interpositus) sowie Parvalbumin-positiv, exzitatorische, glutamaterge und/oder aspartaterge Neurone im rostralen interstitialen Nukleus des medialen longitudinalen Faszikels vor [HOR03]. Zu den Neuronen, die nicht von einem PN umgeben sind (folgend auch als PN-negativ bezeichnet), gehören cholinerge Neurone im basalen Vorderhirn, dopaminerge Neurone in der Substantia nigra pars compacta, serotinerge Neurone in den Raphekernen und catecholaminerge Neurone im Locus coeruleus [HOB98, BRÜ04, BRÜ06A].

Es gibt Hinweise, daß PN-tragende Neurone metabolisch sehr aktiv sind (siehe Abschnitt 4.2.8 auf S. 102), da sie eine hohe Zytochromoxidase-Aktivität besitzen können [HOC90B, BLÜ92, HOR03]. Generell aber zeigen die genannten Beispiele der verschiedenen PN-positiven Neuronentypen, daß keine offensichtliche Beziehung zwischen PN-Ausbildung und Neurotransmitter-Typ (GABA, Glutamat, Aspartat, Acetylcholin, Glycin), Erregungs-Status (inhibitorisch oder exzitatorisch), Calcium-bindendem Protein (Parvalbumin, Calbindin) oder Zellgröße besteht. Die Vielfalt der Neuronentypen beeinflusst die in 1.1.1 erwähnte molekulare/chemische Heterogenität der PNs.

### PN-positive Neurone der verwendeten Hirnregionen

**Parietaler Kortex (PK)** Im sechsschichtigen parietalen Assoziationskortex (parietaler Kortex PK) gibt es bei der Ratte drei Typen von PNs: 1) starke, scharf konturierte PNs um nichtpyramidale Neurone; 2) schwache, dünne PNs um Pyramidenzellen und 3) diffuse PNs um Neurone vorwiegend in der Schicht VIb angrenzend an die Weiße Substanz [WEG03]. Dabei sind von allen PNs 67% nichtpyramidal, 29% pyramidal und 4% diffus. Die nichtpyramidalen PN-assoziierten Neurone, hauptsächlich Interneurone der Schichten II/III bis VI, sind GABAerg. Sie exprimieren zum Großteil die Calcium-bindenden Proteine Parvalbumin und Calbindin und/oder die UE Kv3.1b der spannungsabhängigen Kaliumkanäle [KOS89, CEL93B, HÄR92, HAU00, BRÜ94B, HÄR94, VID06A, HÄR99, BRÜ04]. Die pyramidalen Neurone in den Schichten II/III und V sind glutamaterg [BRÜ94B, WEG03]. Pyramidenzellen exprimieren Calcium-bindende Proteine [GRI03, THO03]. Die wenigen Neurone mit diffusem PN sind wahrscheinlich modifizierte glutamaterge Pyramidenzellen, die aber auch den GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptor exprimieren, der typischerweise auf inhibitorischen Interneuronen vorkommt. Sie exprimieren weder Parvalbumin noch Kv3.1b und könnten auch intrakortikale Projektionsneurone sein [ZHA97, WEG03].

**Subiculum (SUB)** Das dreischichtige Subiculum (SUB) besteht aus glutamatergen Pyramidenzellen und kleineren, vorwiegend GABAergen Interneuronen, die kaum in der Molekular-, aber in der Pyramiden- und fusiformen Zellschicht vorkommen [PAX04, STA05]. Brückner et al. [BRÜ03] konnten mit WFA (*Wisteria floribunda*)

*bunda*-Agglutinin) ausschließlich nicht-pyramidale Neurone markieren, Drake et al. [DRA91] fanden zudem VVA<sup>1</sup>-markierte Neurone, die elektrophysiologisch Pyramidenzellen ähnelten. Dennoch ist die Mehrzahl VVA-markierter Zellen GABAerg und Parvalbumin-positiv, aber nie Calbindin-positiv, wobei nur ein Drittel der GABAergen bzw. Parvalbumin-positiven VVA-markierten Neurone ein PN trägt [DRA91, YAS94]. Im SUB exprimiert der Großteil der Parvalbumin-positiven Neurone Kv3.1b [DU96]. Die PNs im SUB sind kräftig markiert.

**Nucleus ruber (NR)** Der Nucleus ruber (NR) ist eine der am intensivsten WFA-gefärbten Regionen mit einem großen Anteil an PNs in ausgeprägter, maschenartiger Form [HOB98, BER96, KÖP97]. Besonders auffällig sind, neben den kleineren und mittelgroßen Neuronen (<20-25µm) im parvozellulären Teil, die großen Motorneurone (>40µm) im magnozellularen Teil [REI75, PAX04]. Ein Teil der parvozellulären Neurone ist GABAerg und Parvalbumin-positiv; die magnozellularen Neurone sind überwiegend glutamaterg [BJÖ84, ULF01].

**Substantia nigra (SN)** Die Substantia nigra (SN) pars reticulata (sowie die SN pars lateralis) besitzt GABAerge, PN-tragende Neurone [SEE94, GON00]. Ein Großteil der (PN-tragenden) Neurone der SNpr ist Parvalbumin-positiv [HÄR92, YAS94, GON00], aber im Gegensatz zu denen in der pars compacta (pc), fast ausschließlich Calretinin- und Calbindin-negativ [SEE94, GON00]. Der pars reticulata Part der SN ist eisenreich [FRA81, HIL84, SEE94]. Die SN pc besteht hauptsächlich aus kleinen, dopaminergen Neuronen, die kein PN tragen [ADA01, HOB98, BRA93, BRÜ04, BRÜ08].

**Entorhinaler Kortex (EK)** Der entorhinale Kortex (EK) besteht wie der PK hauptsächlich aus GABAergen Interneuronen und Pyramidenzellen. Im Gegensatz zum PK besitzt der EK nur sehr wenige PN-tragende Neurone, die sich vorwiegend in den Schichten II und VI befinden [SEE94, BRÜ94B, BRÜ03]. Aufgrund der geringen Anzahl PN-tragender Neurone wurde der EK in dieser Arbeit als Referenzregion verwendet.

### 1.1.3 Potentielle Funktionen

Die Funktion des PN ist noch weitestgehend ungeklärt. Potentiell könnte das PN eine Rolle bei der neuronalen Plastizität spielen und zur Stabilisierung der Synapsen im postnatalen und adulten Gehirn beitragen [HOC90A, BRÜ03, GAL07]. Dies wird wahrscheinlich mit der Interaktion von Adhäsionsmolekülen gefördert [GRU96]. Die extrazelluläre synaptische Stabilisierung limitiert allerdings auch die synaptische Plastizität und die Ausbildung weiterer synaptischer Kontakte. Dies ist besonders bei Hirnverletzungen nachteilig, bei denen "Narben" aus exzessiver EZM (eher glialen Ursprungs) die Neuronenregeneration behindern [ASH02, RHO04, SIL04, BUS07]. Entfernt man nach einer neuronalen Läsion/Disruption Komponenten des PN durch enzymatischen Verdau mit Chondroitinase oder Hyaluronidase, wird das Neuritenwachstum gefördert [PIZ02, RHO04, GAL07, MAS08, KAA08, DOM08]. Durch den Chondroitinase-Verdau wird allerdings auch das LTP und LTD (long term potentiation/depression) im Hippo-

---

<sup>1</sup> *Vicia villosa*-Agglutinin

campus verringert (gezeigt an Mäuse-Slice-Kulturen von [SAG01, BUK01]). Ein weiteres Beispiel ist die wiederhergestellte synaptische Plastizität nach Augen-Deprivation im adulten Tier durch Chondroitinaseverdau im visuellen Kortex [FOX02]. Andererseits bewirkt eine sensorische Deprivation selbst (Trimmen der Barthaare der Maus) eine Abnahme der PNs in den kortikalen Barrelefelds [MCR07]. Die Neuronen-assoziierte PN-Bildung scheint nach langanhaltender, neuronaler Schädigung ebenfalls gestört zu sein, da nach einem Arterienverschluß<sup>2</sup> als Simulation eines Schlaganfalls die PN-Anzahl in der Periinfarktzone längerfristig sinkt [HOB05]. Die regulatorische Wirkung der PNs auf die neuronale Plastizität könnte auch der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung entgegenwirken, bei der besonders Hirnregionen mit einer relativ hohen neuronalen Plastizität von pathologischen, neurofibrillären Tangles und Neurodegeneration betroffen sind [ARE04] (näheres siehe 1.1.4).

Aufgrund des polyanionischen Charakters des PN ist eine weitere potentielle Funktion die Regulation des perineuronalen Mikromilieus. Da kortikale PNs häufig um hoch-aktive, schnell-feuernde Neurone (Parvalbumin- und Kv3.1b-positiv) vorkommen, könnten sie als schneller, lokaler Puffer für überschüssige Kationen (z.B. Ca, K, Na) regulatorisch auf die Ionenhomeostase wirken [BRÜ93, BRÜ94B, BRÜ06A, HÄR99, HÄR01A]. Auch die Wirkung in der Art eines Reservoirs für verschiedene Moleküle wie Wachstumsfaktoren oder für Wasser ist möglich [CEL94, GAL07]. Die für diese Arbeit relevanteste potentielle Funktion ist die Neuroprotektion [BRÜ99, SCH02, MOR04B] und wird im folgenden Abschnitt 1.1.4 näher erläutert.

#### 1.1.4 Protektive Eigenschaft bei neurodegenerativen Erkrankungen

Bereits 1911 wurde von C. Besta beobachtet, daß bei akuten und chronischen Läsionen selbst schwer betroffener Neurone die PNs intakt bleiben [BES11]. Auch bei der Alzheimerschen Erkrankung (AD) scheinen die PN-tragenden Neurone weniger vulnerabel zu sein. Die AD, erstmals 1906 von Alois Alzheimer beschrieben [ALZ06], ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung (~15 Mio. weltweit), die makroskopisch durch einen Neuronenverlust-bedingte Atrophie im fronto- und parietotemporalen Kortex, im Hippocampus und im entorhinalen Kortex charakterisiert ist [BRÜ81]. Zelluläre pathologische Merkmale sind senile Plaques aus  $\beta$ -Amyloid, neurofibrilläre Tangles (NFT) aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein und ein ausgeprägter Neuronenverlust in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen [ARE01].

Brückner et al. [BRÜ99] und Morawski et al. [MOR08D] untersuchten den Zusammenhang von PNs und pathologischen Erscheinungen bei AD in kortikalen Bereichen. Die Ergebnisse zeigten, daß kortikale Neurone, die von einem PN umgeben sind, nahezu nie von einem NFT betroffen sind (beispielhafte Abb. siehe 1.3). Regionen mit senilen Plaques überlappten zwar, aber ohne Übereinstimmung mit den extrazellulären CSPG. Diese negativen Korrelationen scheinen die relative Resistenz der motorischen und primär sensorischen Hirnregionen zu bedingen, wo PNs besonders zahlreich vorkommen [BRÜ99]. Die regionale Korrelation ist auch gegensätzlich gültig und bei der AD in pathologisch frühzeitig und schwerwiegend betroffenen Gebie-

<sup>2</sup>middle cerebral artery occlusion (MCAO)

ten (wie dem entorhinalen Kortex) auffällig wenig PN-tragende Neurone vorkommen [SEE94]. Auch Yasuhara et al. [YAS94] zeigten für verschiedene kortikale Bereiche sowie den retikulären thalamischen Kern, daß PN-tragende Neurone nicht von NFT oder senilen Plaques betroffen sind und somit resistent gegenüber den pathologischen Prozessen zu sein scheinen. Baig et al. [BAI05] beobachteten ebenfalls keine Korrelation von PNs mit den pathologischen Merkmalen von AD im Kortex. Sie beschreiben eine Reduktion der endständigen N-Acetylgalactosamin (GalNAc)-Komponenten der GAG-Seitenketten der PNs (WFA-markiert) bei AD. Aktuelle Arbeiten zeigen, daß zwar die endständigen Zucker bei neurodegenerativen Prozessen bis auf die "Stubs" [BRÜ98A, GLA98] abgebaut werden, die PN-Kernproteine aber ausdrücklich bestehen bleiben [MOR08A]. Härtig et al. [HÄR01A] untersuchten die Gehirne älterer Bisons nach hyperphosphoryliertem Tau (Bestandteil der NFT) und zeigten, daß diese Tau-Form auf PN-negative Neurone beschränkt ist. Daß PNs auch vor der Toxizität des  $\beta$ -Amyloid-Proteins schützen, wurde ebenso an kortikalen Neuronen in Zellkultur [MIY07] und in Hirnschnitten des transgenen AD-Mausmodels Tg2576 [MOR08D] gezeigt.

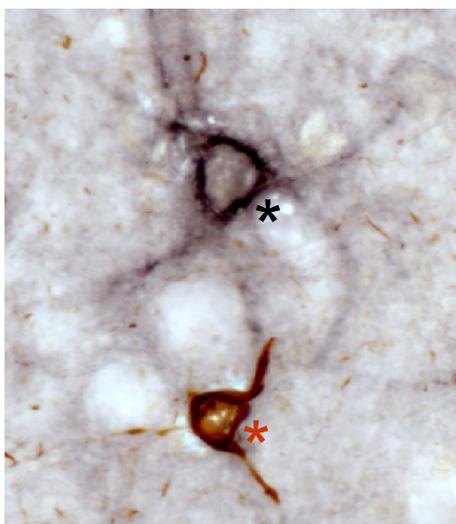


Abb. 1.3: Beispielhafte Darstellung der Protektion PN-tragender Neurone (\*) gegenüber Neurofibrillären Tangles (\*), pathologisches Merkmal der Alzheimerschen Erkrankung. Zerebraler Kortex des Menschen. (Mit freundlicher Genehmigung von M. Morawski.)

Weitere Erkrankungen mit einhergehender Neurodegeneration sind die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung und die HIV-Enzephalopathie (HIV human immunodeficient virus). Für beide Erkrankungen wurde ein Verlust der PNs beim Menschen beobachtet, den die Autoren auf die Freisetzung von Substanzen Virus-infizierter Mikroglia zurückführten [BEL97, BEL99]. Das gleiche wurde auch bei SIV-infizierten (SIV simian immunodeficient virus) Makaken festgestellt [MED04]. Von Vidal et al. wurden Gehirne von Rindern mit BSE (bovine spongiforme Encephalopathie) [VID06B] und Schafen mit Scrapie [VID06A] untersucht. Hier wurden allerdings bei beiden Krankheitsformen keine Veränderungen der PNs festgestellt. Auch Schüppel et al. [SCH02] erhielten gegensätzliche Ergebnisse zur Mikroglia-induzierten Degradation der PNs im Hippocampus und Gyrus dentatus der Ratte. Bei einer Trimethyltin-induzierten Mikrogliaaktivierung blieben die PNs als auch deren umgebenen Neurone intakt. Daraus wurde geschlussfolgert, daß die PNs eine protektive Eigenschaft aufweisen und die Neurone vor dem Zelltod bewahren [SCH02]. Die verschiedenen Ergebnisse der Mikroglia-

induzierten Degradation der PNs könnte in der unterschiedlichen Art der Mikrogliaaktivierung (viral, prional, chemisch) oder den verschiedenen Species (Mensch/Makake, Rind/Schaf/Ratte) begründet sein.

PNs scheinen auch eine wichtige Rolle bei der Parkinsonschen Erkrankung (PD) zu spielen. Die PD ist eine chronische, progressive, zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung mit ungeklärter Ursache, bei der es zu einem langsamen, selektiven Verlust der dopaminergen Neurone in der SN pars compacta und des Locus coeruleus kommt [DAM99, BRA03, ISE04, EBA05, CHI05]. PD-Patienten leiden je nach Stadium der Erkrankung unterschiedlich stark an Brady-, Hypo- oder Akinese, Tremor, Muskelstarre, Gleichgewichts- und Haltungsstörungen sowie Schluck- und Sprechstörungen. Als pathologisches Merkmal treten neben dem nigrostriatalen Neuronenverlust intraneuronale, zytoplasmatische Proteineinlagerungen aus aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein (Lewy-Körperchen) auf [RIE92, SPI98, BRA00, DAU03]. Die dopaminergen Neurone sind interessanterweise nie von einem PN umgeben und möglicherweise aus diesem Grund nicht vor der Degeneration geschützt [BRÜ08]. Zudem ist bei der Parkinsonschen Erkrankung der Eisengehalt der SN pars compacta erhöht. Die Verknüpfung von Eisen und der protektiven Eigenschaft der PNs wird unter 1.2.2 und 1.3 näher erläutert.

## 1.2 Eisen im Gehirn

Eisen ist das am häufigsten vorkommende Metall im menschlichen Körper (3–5 g) [HAR96] und, wie für nahezu jedes Lebewesen, essentiell. Im Gehirn ist Eisen meist als Kofaktor vieler Enzyme (Häm-, Nicht-Häm-, Fe-S-Proteine [ROU05]) für dessen Funktionalität notwendig [QUE08]. Es ist an der ATP-Produktion als Komponente der Succinatdehydrogenase und der Aconitase des Zitronensäurezyklus, des Zytochrom c, der Zytochromoxidase und der Fe-S-Komplexe in der mitochondrialen Atmungskette beteiligt [THO01, ATA04]. Eisen ist auch für die Lipid- und Cholesterol-Biosynthese notwendig und nimmt daher eine besondere Rolle bei der oligodendrozytären Myelinisierung der Axone und bei der Zellteilung ein [QIA98]. Des Weiteren wird Eisen als Kofaktor der Ribonukleosidreduktase für die DNA-Synthese benötigt [WIG88]. Bei der Synthese von Neurotransmittern hat Eisen ebenfalls eine entscheidende Funktion: es wirkt als Kofaktor bei der Bildung von Dopamin (Reduktion bei der Parkinsonschen Erkrankung), Noradrenalin und Serotonin [THO01]. Zudem gibt es Hinweise auf eine Beziehung zwischen einem hohem Eisengehalt und Hirnregionen, die GABAerge Innervationen erhalten [HIL85]. Ein Eisenmangel führt folglich, insbesondere während der Entwicklung, zu systemischen, neurologischen Störungen [BEA03].

### 1.2.1 Die Redoxaktivität und Toxizität von Eisen

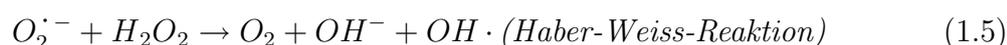
Eisen ist, trotz seiner Essentialität, potentiell toxisch und induziert oxidativen Stress [GÖT94, EIS00]. Die Toxizität des Eisens hängt von seinem Oxidationszustand ab:  $\text{Fe}^{3+}$  ist meist fest gebunden und kaum toxisch, das "freie"  $\text{Fe}^{2+}$  hingegen ist durch seine labile Bindung reaktiv und toxisch.  $\text{Fe}^{2+}$  oxidiert unter Reaktion mit Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu  $\text{Fe}^{3+}$  (Fenton-Reaktion, Formel 1.1). Dabei entsteht neben einem Hydroxydanion ( $\text{OH}^-$ ) das hoch reaktive Hydroxylradikal ( $\text{OH}\cdot$ ) [TEM02].

$Fe^{2+}$  hat intra- und extrazellulär auch die Fähigkeit, molekularen Sauerstoff zum Superoxidradikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) zu reduzieren (Formel 1.2) [VAL05]. Diese Reaktion läuft recht langsam und reversibel ab [AMB01].  $O_2^{\cdot-}$  wiederum generiert, entweder spontan oder unter katalytischer Wirkung der Superoxiddismutase (SOD),  $H_2O_2$  (Formel 1.3). Im Gehirn wird  $H_2O_2$  auch bei der katalysierten Oxidation von Monoaminen (Dopamin, Serotonin, Adrenalin, Noradrenalin, Melatonin) durch die Monoaminoxidase (MAO) gebildet.

$O_2^{\cdot-}$  kann durch die Reduktion von  $Fe^{3+}$  detoxifiziert werden (Formel 1.4) [VAL05]. Allerdings kann das recycelte  $Fe^{2+}$  wieder in die Fenton-Reaktion eintreten [FAT08].

Von der nicht Eisen-vermittelten Haber-Weiss-Reaktion (Netto-Gleichung der Reaktionen 1.1 & 1.4, Formel 1.5) geht keine Toxizität aus, sie läuft unkatalysiert nicht in biologischen Systemen ab [KEH00, KOP01].

Die wahrscheinlich wichtigste Quelle von  $O_2^{\cdot-}$  und  $H_2O_2$  stellt das Mitochondrium dar (NADH-Dehydrogenase, Autooxidation des reduzierten Ubiquinons) [KEH00]. Schätzungsweise 2% des in der mitochondrialen Atmungskette verbrauchten Sauerstoffs resultieren in reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wobei in gesundem Gewebe mit intakten Mitochondrien die ROS-Produktion höchstwahrscheinlich deutlich geringer als 2%, wenn nicht nahezu 0% ist [KEH00].



Die Fenton-Reaktion wird verhindert, indem die zelluläre Konzentration von  $H_2O_2$  durch detoxifizierende Antioxidantien und Enzyme (u.a. Glutathion (GSH), GSH-Peroxidase, Katalase) gering gehalten wird und reaktives Eisen durch Speicherung im Ferritinmolekül (siehe 1.2.3) an der Reaktion mit  $H_2O_2$  gehindert wird [DRI05]. Diese Prozesse sind insbesondere für das Gehirn wichtig, da es mit nur 2% des Körpergewichts 20–25% des gesamten Sauerstoffs im Körper verbraucht [THO01, DRI03]. Auch extrazellulär ist die Zelle  $H_2O_2$  ausgesetzt, insbesondere durch den “respiratory burst” der Mikroglia. Allerdings kommen in der Regel extrazellulär keine antioxidativen Enzyme vor, so daß die Zelle vor oxidativen Stress geschützt wird, indem das freie Eisen fest an z.B. Transferrin gebunden wird. Transferrin besitzt ein sehr negatives Reduktionspotential und ist daher effektiver Protektor gegen Eisen-katalysierte Zellschädigung [TEM02].

Das in der Eisen-induzierten Fenton-Reaktion generierte Hydroxylradikal ist besonders reaktionsfreudig und somit sehr toxisch. Es schädigt Lipide, Proteine, Kohlenhydrate und DNA (hier kann es sogar zur Radikal-modulierten Genexpression kommen)

[QIA98, KEH00, VAL05, FAT08]. Der Eisen-induzierte oxidative Stress ist daher zelltoxisch und führt zur Degeneration der Neurone, wie es bei neurodegenerativen Erkrankungen der Fall ist (siehe 1.2.2). Der oxidative Stress könnte direkt aus einem exzessiven Eisenüberschuss und/oder aus einer verringerten Anzahl bzw. Effektivität antioxidativer Schutzmechanismen resultieren [ZEC04, MOL07].

### 1.2.2 Die Rolle des Eisens bei neurodegenerativen Erkrankungen

Oxidativer Stress ist kennzeichnend für neurodegenerative Erkrankungen [PAN04, FAT08]. Insbesondere für die Alzheimersche und die Parkinsonsche Erkrankung gibt es Arbeiten, die dies belegen [JEN91, SMI97, RET98, HIR99, CHR00, CAS04, DRI05]. Der oxidative Stress wird durch Eisen induziert und durch das Auftreten einer abnormal hohen Eisenkonzentration oder durch Eisenakkumulationen im Gehirn bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen belegt [GOR95, QIA98, QIA01]. Die Eisenablagerungen sind dabei in den von der Degeneration betroffenen Gebieten und an den typischen, pathologischen Strukturen vorzufinden.

Bei der Parkinsonschen Erkrankung (PD) (oder bei MPTP<sup>3</sup>-induziertem Parkinsonismus) findet man einen erhöhten Eisengehalt und Eisenablagerungen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) [DEX89, GER94, HE96, THO99B, REN01, HE03, BUR03, PAN04, MOR05A]. Dopaminerge Neurone menschlicher Gehirne enthalten das bei der Oxidation von Dopamin entstehende Pigment Neuromelanin. Neuromelanin bindet 10–20% des Gesamteisens [MOO04] und wirkt möglicherweise als endogenes Eisenspeichermolekül, das den oxidativen Stress fördert [DOU02, DOU03, FED05]. Allerdings wird dies konträr diskutiert und Neuromelanin auch eine potentiell protektive Eigenschaft zugeschrieben, indem es durch seine Eisen-akkumulierende Eigenschaft freie Ionen bindet und den oxidativen Stress reduziert [ZEC01, ZEC03]. Ein Hinweis dafür ist die Abnahme des Neuromelanins in der Substantia nigra bei der PD [ZEC01]. Die Freisetzung des gebundenen Eisens beim Absterben der dopaminergen Neurone würde dann allerdings wieder zum Eisenüberschuss und oxidativen Stress führen. Es ist daher kein starrer Prozess anzunehmen. Ähnlich verhält es sich mit einem weiteren pathologischen Merkmal bei der PD, den intraneuronalen Lewy-Körperchen [BRA00] (siehe auch 1.1.4). Sie bestehen nicht nur aus Lipiden und aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein, sondern auch aus Eisen, das möglicherweise an der Aggregation der Lewy-Körperchen beteiligt ist [CAS00, BRA00, MAN04, KAU04]. Auch hier wäre es aber möglich, daß die Lewy-Körperchen primär nicht toxisch, sondern eher protektiv wirken, indem sie freies Eisen binden [CAS00].

Bei der Alzheimerschen Erkrankung (AD) sind ebenfalls Eisenablagerungen im Gehirn zu finden. Diese korrelieren mit den pathologischen Merkmalen der AD, den intrazellulären neurofibrillären Tangles (NFT) und den extrazellulären senilen Plaques aus  $\beta$ -Amyloid (1.1.4) [SMI97, MAK99, THO01, BUR03, CAS07]. Da beide Strukturen potentiell redoxaktives Eisen enthalten, unterstützen sie möglicherweise den Eisen-induzierten oxidativen Stress und den progressiven Verlauf der AD [SAY00, PAN04, KHA06, RAJ05].  $\beta$ -Amyloid aggregiert womöglich auch erst durch den Eisen-

---

<sup>3</sup>1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetra-Hydro-Pyridin [DAU03]

induzierten oxidativen Stress und verstärkt den Prozess durch die Ansammlung weiteren potentiell reaktiven Eisens [SCH95, CHR00]. Die trophische und toxische Fähigkeit des  $\beta$ -Amyloid ist auch in [ATW03] veranschaulicht.

Weitere neurodegenerative/neurologische Erkrankungen mit Eisen-assoziiierter Pathologie sind: Neurodegeneration mit Eisenablagerung (obsolent Hallervorden-Spatz-Syndrom), Multisystem-Atrophie, Lewy-Körperchen-Demenz, Progressive Supranukleäre Blickparese, Multiple Sklerose, Restless-Legs-Syndrom, Pick-Krankheit, Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, Friedreich-Ataxie, Chorea-Huntington, Down-Syndrom, Epilepsie, Hämochromatose und Neuroferritinopathie [CON92, THO01, CUR01, TEM02, CON03, BUR03, DOR04]. Ein eiseninduzierter oxidativer Stress wurde auch an bei Scrapie-infizierten Zellen festgestellt [FER05]. Neben der Erhöhungen des Eisengehaltes im Gehirn bei neurodegenerativen Erkrankungen ist, möglicherweise wegen der sinkenden Menge bzw. Effektivität der Antioxidantien, eine generelle Eisenzunahme im Gehirn auch im Alter (beginnend beim Menschen ab 40 Jahre [CON01]) zu beobachten [HEB99, REN01, ZEC04]. Männer haben im Gehirn einen höheren Eisengehalt als Frauen, was möglicherweise mit der größeren Anfälligkeit der Männer für frühe neurodegenerative Erkrankungen im Zusammenhang steht [BAR07].

Meist geht mit einer Abnormalität des Eisens auch eine veränderte Eisenprotein-Expression im Gehirn einher. Deren Erfassung ist durch die Variabilität zwischen den verschiedenen Erkrankungen als auch zwischen den jeweiligen Hirnregionen und den verwendeten Antikörpern nicht einfach. Auszugsweise findet man in der SN, neben anderweitig veränderten Expressionen [GRÜ04], eine Abnahme von Ferritin bei der PD [GAL04, DEX90, DEX91] als auch beim Restless-Legs-Syndrom [CON03], wohingegen bei der Progressiven Supranukleären Blickparese als auch bei der Multisystem-Atrophie eine Zunahme von Ferritin beobachtet wird [DEX91]. Bei der AD ist regional u.a. der Gehalt an Ferritin erhöht und an Transferrin gesenkt [CON92, GER94].

### 1.2.3 Transport und Speicherung von Eisen in Neuronen

Um den potentiellen, toxischen Effekt von Eisen zu minimieren, sind spezifische Mechanismen und Proteine zur Bereitstellung, dem Transport und der Speicherung des Eisens in einer löslichen, nicht-toxischen Form beteiligt und gewährleisten den Bedarf als auch die Homöostase des Eisens in der Zelle [LIE01] (für eine ausführliche Beschreibung siehe auch [TEM02]). Die in Neuronen relevanten Eisentransport- und Eisenspeicherproteine und die jeweiligen Oxidationsformen des Eisens ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) sind in der Abbildung 1.4 schematisch dargestellt.

#### Speicherung von Eisen

30% [BRA97] bis 90% [DOU98A, WIL03] des Eisens im Gehirn sind in einer nicht-toxischen Form ( $\text{Fe}^{3+}$ ) fest an Ferritin gebunden. Ferritin ist ein intrazelluläres, globuläres Eisenspeicherprotein in Form einer Hohlkugel das maximal 4500 Eisenatome als Ferrihydrit im Moleküllern binden kann (durchschnittlich 2500, im Gehirn nur 1000–2000) [AND92, HAR96, BRA97, CHA99, TEM02]. Es besteht aus 24 UE von zwei Typen von Polypeptidketten, H (heavy/heart, 21 kDa) und L (light/liver,

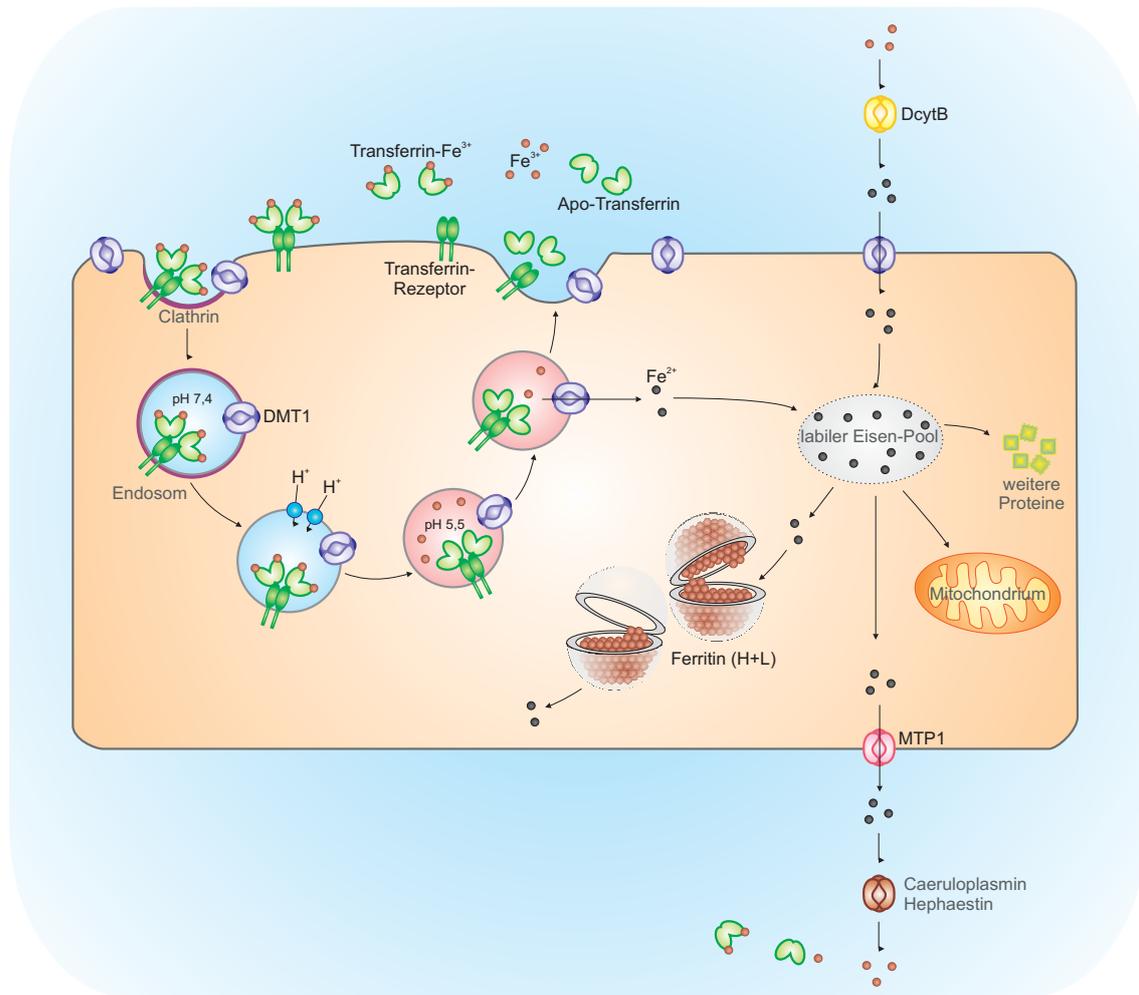


Abb. 1.4: Eisentransport- und Eisenspeicherproteine des Neurons. Nähere Erläuterung im Text.

19 kDa), die *in vivo* als Heteropolymer regional und zelltypspezifisch variabel vorkommen [EIS00, THO01]. Ferritin H ist eine Ferroxidase ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) zur schnellen Aufnahme des Eisens (partiell geleitet durch einen negativen chemischen Gradienten [DOU98B]) in das Ferritinmolekül, Ferritin L ist am Aufbau des Ferritinkerns beteiligt und dient vorwiegend als Langzeitspeicher [EIS00]. Das Verhältnis der H- und L-Ketten im Ferritinmolekül beeinflusst dessen Oxidaseaktivität [HAR96]. Die in Säugetieren hoch konservierten (80%) H- und L-Ketten werden auf verschiedenen Chromosomen codiert und sind zu 50% homolog [TEM02].

Unter eisenreichen Bedingungen findet man im Gehirn noch ein weiteres Eisenspeicherprotein, das Hämosiderin. Es wird vermutet, daß Ferritin von Lysosomen (Siderosomen) aufgenommen und teilweise in unlösliches Hämosiderin degradiert wird [HAR96]. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß Siderosomen von  $\alpha$ -Ferritin-Antikörpern erkannt werden, allerdings eine deutlich schwächere Immunreaktivität zeigen.

## Transport von Eisen

Der Import von Eisen erfolgt über zwei verschiedene Wege: 1) über *Transferrin* (Tf) und den *Transferrin-Rezeptor* (TfR) und 2) über das *Divalente Metalltransportprotein 1* (DMT1). Tf ist ein Einzelstrang-Polypeptid mit einer Molekularmasse von 80 kDa. Das Apotransferrin bindet mit hoher Affinität zwei  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen ( $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ =Holotransferrin). Der TfR ist ein Transmembranprotein und Dimer aus zwei Glykoprotein-Monomeren von je 95 kDa. Der TfR besitzt zwei Bindungsstellen für Holotransferrin-Moleküle, die er mit hoher Affinität bindet. Tf-Rezeptoren besitzen die Fähigkeit, zu Proteopartikeln aus 6–12 Rezeptordimere zu aggregieren, was womöglich die Vesikelintegration stabilisiert [TEM02]. Erkennt und bindet der TfR das Tf, wird der Tf-TfR-Komplex über Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle internalisiert. Nach der Fusion mit anderen Vesikeln zum Endosom wird über membranständige ATP-abhängige Protonenpumpen der intraendosomale pH-Wert von 7,4 auf 5,5 gesenkt. Dadurch löst sich das Eisen vom Tf und wird ins Innere des Endosoms entlassen. Über das membranständige DMT1 (siehe unten) wird das Eisen aus dem Vesikel in das Zytoplasma transportiert, wo es für weitere Interaktionspartner zur Verfügung steht. DMT1 kann Eisen allerdings nur als  $\text{Fe}^{2+}$  transportieren, so daß das  $\text{Fe}^{3+}$  zuvor durch eine Ferrireduktase reduziert werden muß. Der Tf-TfR-Komplex gelangt über Exozytose des Endosoms zurück zur Zelloberfläche, wo der TfR in der Zellmembran verbleibt und das Apotransferrin in den extrazellulären Raum zur neuen Bindung von  $\text{Fe}^{3+}$  entlässt. Dieser Transportzyklus dauert 2-3 min und wird in der Lebensdauer des Tf-Moleküls 100–200 Mal durchlaufen [AIS01, TEM02].

Das Membrantransportprotein DMT1, auch als DCT1 (Divalenter Kation-Transporter 1) oder Nramp2 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein 2) bezeichnet, kommt im ZNS insbesondere in Neuronen als auch in Astro- und Mikrogliazellen vor, nicht aber in Oligodendrozyten [GUN97, JEO03, MOO04, LIS04, SON07]. Es transportiert  $\text{Fe}^{2+}$  nicht nur aus dem Endosom in das Zytoplasma, sondern auch in die Zelle hinein. Dieser Import ist unabhängig vom Tf-TfR-Weg und stellt somit einen zweiten Weg des Eisenimports in die Zelle dar. DMT1 ist ein Protonensymporter (1  $\text{Fe}^{2+}$ :1  $\text{H}^+$ ) und transportiert nicht nur Eisen, sondern auch andere zweiwertige Metallionen [AIS01, GAR03].

$\text{Fe}^{3+}$  wird dem DMT1-Transportweg zugänglich gemacht, indem es durch die Ferrireduktase DcytB (*Duodenales Zytochrom B*) zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird. DcytB ist ein Homolog des Transmembranproteins Zytochrom b561 [MCK01]. Es kommt vor allem in der Mucosa und in der Bürstensaummembran des Duodenums vor, wo es durch die Reduktion von Eisen dessen Absorption aus der Nahrung ermöglicht [ROY01, VAR03, GLE05]. Die mRNA von DcytB wurde in der Maus auch in der Milz, der Leber und im Gehirn nachgewiesen [MCK01].

Das *Metalltransportprotein 1* (MTP1), auch als Ferroportin 1 oder IREG1 bezeichnet, ist das einzige bekannte Eisenexport-Protein im Gehirn. Es kommt in verschiedenen Geweben, u.a. auch im Gehirn in Neuronen, Astro- und Oligodendrozyten vor [ABB00, BUR01, WU04]. MTP1 besitzt eine gewisse Homologie zu DMT1 und beide Proteine haben die gleiche Molekularmasse ( $\sim 62$  kDa) sowie transportieren  $\text{Fe}^{2+}$ , nicht aber  $\text{Fe}^{3+}$  aus der Zelle [ABB00]. Das vom MTP1 exportierte  $\text{Fe}^{2+}$  wird durch die membranverankerte Ferroxidase *Hephaestin* oder durch das zirkulierende *Caerulo-*

*plasmin* zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert [GAR03]. Das  $\text{Fe}^{3+}$  kann nun wieder von Tf gebunden und in die Zelle transportiert werden.

### Posttranskriptionelle Regulation von Ferritin, TfR, DMT1 und MTP1

Zellen können ihr Level an Ferritin und TfR über zytosolische, Eisen-regulatorische Proteine (IRP1 und IRP2) posttranskriptionell anpassen [ZEC04, HE07]. Bei Eisenmangel binden die IRP an die Eisen-reaktiven Elemente (IRE) am 5'-Ende (Ferritin) bzw. 3'-Ende (TfR) der jeweiligen mRNAs. Dies verhindert die Synthese von Ferritin bzw. den Abbau der TfR-mRNA durch RNasen. Folglich kommt es bei einem Eisenmangel zu einer Abnahme des Eisenspeicherproteins Ferritin und zu einer Zunahme des am Eisentransport beteiligten TfR. Bei einem Eisenüberschuss in der Zelle wird IRP1 durch ein Fe-S-Cluster geblockt und an der Bindung des IRE gehindert, IRP2 wird proteosomal degradiert. So wird bei Eisenüberschuss Ferritin synthetisiert, die TfR-mRNA hingegen enzymatisch zerstört.

Nicht so eindeutig nachweisbar ist die Regulation von MTP1 und DMT1. Die mRNAs beider Proteine besitzen am 5'- bzw. 3'-Ende ein IRE (bei DMT1 nur zwei der vier Isoformen) [ROT03]. Einige Autoren beobachteten bei Eisenmangel einen Anstieg des mRNA-Levels von DMT1 und, in der Leber gezeigt, eine Abnahme von MTP1 [TEM02, EIS03]. Ke et al. [KE05] wiederum konnten im Rattenhirn bei Eisenmangel oder Eisenüberschuss keine Änderung im Gehalt der DMT1-mRNA mit und ohne dem IRE feststellen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten u.a. aus der verschiedenen Sensitivität der Hirnregionen gegenüber einem veränderten Eisenhaushalt resultieren [BEA03].

### Der labile Eisenpool

Der labile Eisenpool (LIP) beschreibt intrazelluläres, nicht Protein gebundenes Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ ), das an kleine Anionen ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , Ziträt), Polypeptide und Oberflächenkomponenten von Membranen (z.B. Phospholipid-Kopfgruppen) labil gebunden ist [QUE08]. Der LIP wird u.a. durch die Ferroxidase-Aktivität des Ferritin-H reguliert. So befinden sich 3–5% des zellulären Eisens (0,2–0,5 mmol) im LIP [KAK02, KRU03, VAL05]. Das Eisen liegt dabei vorwiegend als  $\text{Fe}^{2+}$  vor. Der LIP ist daher die "Quelle" des toxischen, reaktiven Eisens und speist die Fenton-Reaktion.

## 1.3 Beziehung von perineuronalen Netzen und Eisen im Gehirn

Eine mögliche Beziehung zwischen Eisen und PNs zeigt sich bereits auf regionaler Ebene durch die Korrelation von eisenreichen Hirngebieten und dem Vorkommen von PNs. Viele der eisenreichen Gebiete wie die Substantia nigra pars reticulata, das ventrale Pallidum, der Nucleus ruber, der ventrale Thalamus und die cerebellaren Kerne [HIL84, BEN93, KOE95, ERB96, FOC97, BUR99, BEA03, GÖT04] besitzen eine hohe Anzahl PN-tragender Neurone [SEE94].

Die PNs sind aufgrund ihres polyanionischen Charakters (siehe 1.1.1) in der Lage, große Mengen Eisen mit hoher Affinität zu binden. Dies wurde mit Eisenchlorid ( $\text{FeCl}_3$ ) [MOR04C, MOR06] und mit kolloidalem Eisenhydroxid (CIH, siehe Abb. 1.5) [BRÜ93, MUR95, REI03] nachgewiesen. Die Eisenbindungskapazität wird durch den Anteil der negativ geladenen Komponenten, vor allem von Chondroitinsulfat, aber auch von Hyaluronsäure, bestimmt. WFA bindet die GalNAc-Komponenten der Chondroitinsulfat-Proteoglykane und stellt daher höchstwahrscheinlich die polyanionischen, Eisen-bindenden PNs dar.

PNs könnten so auch als Puffer für extrazelluläres, potentiell toxisches Eisen wirken, indem es freie, reaktive Eisenionen bindet [REI03, MOR04B, FIE07]. Folglich würde sich der lokale oxidative Stress im Mikromilieu der PN-tragenden Zelle reduzieren und das Neuron vor der Eisen-induzierten Degeneration schützen.

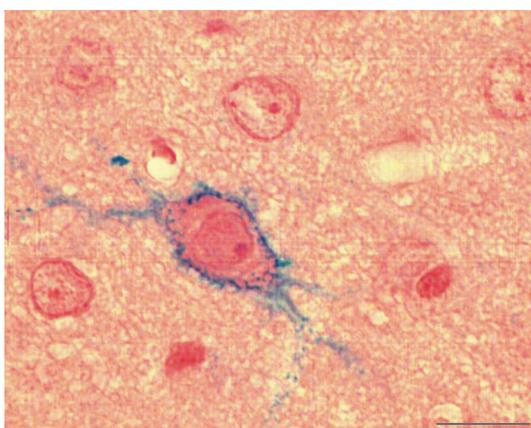


Abb. 1.5: Das polyanionische PN bindet mit hoher Affinität Eisen. Eisenbindungsreaktion mit kolloidalem Eisenhydroxid (CIH, modifiziert nach [GRA58]) im PK der Ratte. Das Eisen wurden anschließend nach Perl gefärbt [PER67], das Zytoplasma mit Eosin. Balken: 20 $\mu\text{m}$ . (Mit freundlicher Genehmigung von M. Morawski.)

Unterstützt wird die Hypothese durch die Lipofuszin-Antikorrelation: Lipofuszin kommt im Alter und bei AD 52%–74% seltener in PN-tragenden Neuronen als in PN-negativen Neuronen im Kortex vor [MOR04B] (Abb. 1.6). Lipofuszin ist ein intraneuronales, intralysosomales Pigment aus akkumulierten Proteinen und Lipiden, was durch Eisen-katalysierte Oxidation entsteht [BRU92, BRU02, TER04]. Lipofuszin ist daher ein Indikator für lokale oxidative Prozesse, die potentiell zelltoxisch sind [SOH89]. Da im alternden Gehirn Lipofuszin-Akkumulationen hauptsächlich in den kortikalen Hirnregionen auftreten, die bei der AD frühzeitig eine NFT-Pathologie ausbilden, sind sie charakteristisches Anzeichen für die Vulnerabilität gegenüber neurofibrillärer Degeneration [BRA00]. Morawski et al. [MOR04B, MOR06] vermuten, daß die PNs vor Lipofuszin-Ablagerungen durch Reduktion des oxidativen Stresses schützen und vermerken, daß Neurone mit einem starken PN (kortikale Interneurone) fast ausschließlich frei von Lipofuszin sind, Neurone mit nur einem schwachem PN (kortikale Pyramidenzellen) durchaus intrazelluläres Lipofuszin aufweisen können. Es ist daher auch eine Zellspezifität für Lipofuszin oder eine Abhängigkeit von der PN-Stärke denkbar.

Des weiteren wurde festgestellt, daß EZM-Komponenten wie Glykosamino- und Proteoglykane protektive Eigenschaften gegenüber Eisen-induzierten oxidativen Prozessen aufweisen [ALB00]. Campo et al. [CAM04] zeigten an Eisen-exponierten Zellkulturen, daß Hyaluronsäure und Chondroitin-4-sulfat die durch oxidativen Stress induzierte Lipidperoxidation begrenzen. Wu et al. [WU05] zeigten in Zellkulturen einen protektiven Effekt von Versican gegenüber durch oxidativen Stress induzierter Apoptose.

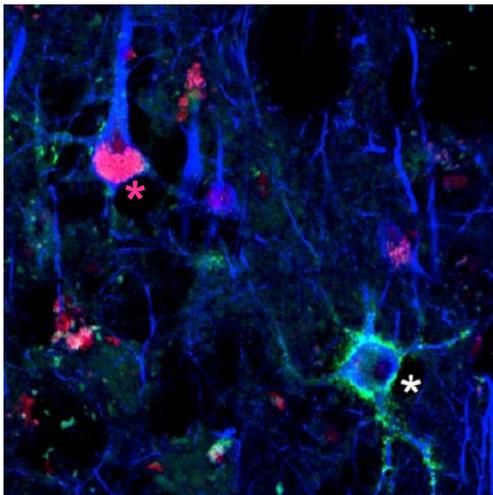


Abb. 1.6: Beispielhafte Darstellung der Protektion PN-tragender Neurone (\*weiß,  $\alpha$ -CSPG) gegenüber Lipofuszin-Ablagerungen bei AD (\*pink, Autofluoreszenz) als Indikator für Eisenkatalysierten oxidativen Stress. Neuronenmarker: SMI311 (blau). Zerebraler Kortex des Menschen. [MOR04B].

### 1.3.1 Aufgabenstellung

Die geringere Vulnerabilität der PN-tragenden Neurone könnte dadurch bedingt sein, daß das PN extrazelluläre, reaktive Eisenionen bindet und so den lokalen, oxidativen Stress reduziert. Eine Interaktion mit dem Eisen müsste sich im Eisengehalt des PN oder der Zelle widerspiegeln. Durch die Interaktion von PN und Zelle würde dies wahrscheinlich auch den Eisenhaushalt des Neurons beeinflussen.

Aufgabenstellung war daher die Quantifizierung des intrazellulären Eisens und der Eisentransport- und Eisenspeicherproteine von PN-positiven und PN-negativen Neuronen. Es sollte untersucht werden, ob sich die potentielle Protektion gegenüber dem Eisen-induzierten oxidativen Stress mit einem veränderten Eisenhaushalt belegen lässt.

## 1.4 Methodische Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei neuartige Methoden so optimiert, daß sie für die Analyse des zellulären Eisens und der zellulären Eisenproteine physiologischer Konzentrationen angewandt werden konnten: die Ionenstrahlmikroskopie (1.4.1) und die Objektträger-basierte Laser Scanning Zytometrie (1.4.2). Beide Techniken besitzen nicht nur Vorteile gegenüber bisher üblichen angewandten Nachweismethoden, sondern bieten zudem neue Möglichkeiten der orts aufgelösten Quantifizierung an biologischem Material.

### 1.4.1 Ionenstrahlmikroskopie

Viele der Nachweismethoden für Eisen beruhen auf der Zugabe von Chelatoren. So kann  $\text{Fe}^{3+}$  beispielweise durch Kaliumferrozyanid (Berliner-Blau-Reaktion nach Perl [PER67]) und Desferrioxamin, und  $\text{Fe}^{2+}$  durch Kaliumferrizyanid (Reaktion nach Turnbull) und Ferrozin nachgewiesen werden [ESP02, RIE04]. Die Chelatoren binden dabei freies Eisen oder lösen schwach gebundenes Eisen aus seiner Verbindung und bilden einen Komplex. Fest an Proteine gebundenes Eisen muß dem Chelator durch mechanische, chemische oder enzymatische Behandlung vermittelt werden. In wässriger Lösung

kann es zur Bildung von unlöslichen Eisensalzen kommen, die sich der Detektion entziehen. Chelator-basierte Methoden sind daher anfällig für Artefakte, zumal die Effektivität von der Spezifität und der Affinität des Chelators zum Eisen abhängt. Der Nachweis des chelatierten Eisens erfolgt kolorimetrisch am Schnitt, üblicherweise aber am Homogenat/Lysat mittels Spektrophotometrie sowie HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Ohne Chelator kann Eisen in Homogenaten durch Massenspektrometrie, ESR (Elektronenspinresonanz)-Spektroskopie und AAS (Atomabsorptionsspektroskopie) quantifiziert werden [SAV99, ESP02, HOE04].

Der Eisengehalt von lebenden Zellen kann in Echtzeit mit Fluoreszenzsonden bestimmt werden [THO99A, PET02, ESP02] (Review siehe [QUE08]). Dabei wird Eisen über Metall-sensitive Moleküle wie z.B. Calcein oder Phen Green SK nachgewiesen, deren Fluoreszenzemission durch die Bindung von Eisen gequentscht wird. Diese sensitive Methode (Detektionslimit 0,01  $\mu\text{g/g}$  [ORT05]) hat sich zum semiquantitativen Nachweis von freiem Eisen bewährt, erfährt jedoch beim Nachweis gebundenen Eisens ähnliche Nachteile wie die Anwendung von Chelatoren.

Die Quantifizierung von Eisen, die unabhängig von der Zugabe von Chelatoren oder Sonden ist und orts aufgelöst an einzelnen Zellen durchgeführt werden kann, bleibt nur wenigen, physikalischen Methoden vorbehalten: Particle-Induced X-Ray Emission (PIXE), Secondary Ion Mass Spectroscopy (nanoSIMS), Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence Spectroscopy (SR-XRF) gekoppelt mit X-Ray Absorption Near Edge Structure Spektroskopie (XANES) zur Spezifikation. Die Techniken zeichnen sich entweder durch ein niedriges Detektionslimit aus (einige Atome (nanoSIMS) [QUI06] bis 0,01  $\mu\text{g/g}$  (SR-XRF) [ISH02]), durch eine Sensitivität für den Oxidationsstatus (XANES) [LOB06] oder durch eine extrem hohe Ortsauflösung von 50-300 nm (SR-XRF [ORT07]; nanoSIMS [ORT05, GUE05] (allerdings bei einer geringen und daher für die Quantifizierung wenig geeigneten Informationstiefe von 100 nm)).

Die derzeit besten Voraussetzungen für eine *orts aufgelöste Quantifizierung von Elementen auf subzellulärer Ebene* bietet die PIXE-Technik. In Hinblick auf neurowissenschaftliche Fragestellungen wurde sie zur Untersuchung der grauen und weißen Substanz im murinen Cerebellum und Corpus callosum [SER05], der Substantia nigra und weiteren Hirnregionen [LIE97, HEB99, THO99B, REN03, HE03, MOR05A, MEI06], von Neuromelanin [REI07B], von  $\beta$ -Amyloid-Plaques [MAK99, RAJ05], von neurofibrilären Tangles [WAT95, MAK98, MAK99], der Retina [YEF00, YEF02] und von dopaminergen Neuronen in Zellkultur [ORT07] angewandt.

Das Ionenstrahlmikroskop des Instituts für Experimentelle Physik II der Universität Leipzig erzielt überdurchschnittlich gute PIXE-Ergebnisse: es werden Ortsauflösungen von  $< 1 \mu\text{m}$  und eine weit unter dem physiologischen Gehalt der Zelle ( $\sim 0,5 \text{ mmol/l}$ ) liegende Nachweisgrenze für Eisen von  $< 4 \mu\text{mol/l}$  ( $\sim 25 \mu\text{g/g}$ ) erreicht [FIE07] (zitiert in [QUE08]). Ein Teil der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur orts aufgelösten Quantifizierung des intrazellulären Eisens in PN-tragenden Neuronen wurde bereits in Fiedler et al. [FIE07] veröffentlicht.

### 1.4.2 Objektträger-basierte Laser-Scanning-Zytometrie

Die Laser-Scanning-Zytometrie (LSZ) wurde 1991 von Kamensky et al. [KAM91] etabliert und vereinigt die multiparametrische Fluoreszenzanalyse der Durchflusszytome-

trie mit der morphologischen Analyse und Dokumentation der Immunhistochemie. Im Gegensatz zum Durchflusszytometer können neben Zellsuspensionen auch frische oder fixierte Gewebeschnitte oder Zellkulturen direkt auf dem Objektträger (slide-based, sb) analysiert werden. Somit wird eine Darstellung und Quantifizierung individueller Zellen direkt im Gewebeverband mit der ursprünglichen anatomischen und morphologischen Struktur ermöglicht [TÁR02, HAR07, PET08].

Im Durchflusszytometer ist eine Differenzierung zwischen Neuronen mit und ohne PN nicht möglich, da bei der Präparation die EZM entfernt wird und bisher kein spezifischer intrazellulärer Marker für PN-positive/-negative Neurone bekannt ist. Bei der sbLSZ bleiben nicht nur die PNs erhalten, sondern auch die Zellstrukturen und zytoplasmatischen Proteine, die besonders für die morphologische Diskriminierung der verschiedenen Zelltypen im Gehirn notwendig sind [MOS06].

Für jedes Ereignis werden die genauen x-y-Koordinaten aufgenommen, was nicht nur die Zählung der Zellen, sondern auch deren Relokalisation und Reanalyse ermöglicht [CLA97, DAR99, LAF06]. Da die Art der Datenverarbeitung und die Zellzählung mittels LSZ sehr effizient und schnell geschieht, war die Methode bisher vor allem für klinische Anwendungen interessant [TÁR02, GER04, GER05]. Im Vordergrund stand dabei insbesondere die Quantifizierung von DNA, die Zellzyklusanalyse, die Apoptosedetektion, die Phänotypisierung von Immunzellen, die Enzymkinetik, die Translokation von Molekülen und die Morphologieanalyse [BUT05A, GER00, CLA98, GER05, GAL08A, MOS06, SAC04, KAM99, BOC06, ZHA08, TSU08, MOR07, HOL07, BED99, DAR99, PET08].

Zum Vergleich von PN-positiven und PN-negativen Neuronen wurde im Rahmen der vorgelegten Promotionsarbeit *erstmalig* eine *quantitative Analyse der Proteinexpression von Zellen* an einem sbLSZ-Gerät (*iCys*, CompuCyte) durchgeführt. Dabei wurde, neben intrazellulären Markern, erstmalig auch die extrazelluläre Mikroanatomie des Neurons, das PN, für die Differenzierung der Zellen verwendet.



# Kapitel 2

## Materialien und Methoden

Für alle Untersuchungen wurden männliche, adulte (Alter 2–4 Monate) Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus domestica*, var. albinos) verwendet. Die Untersuchungen wurden gemäß § 4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes durchgeführt und beim Regierungspräsidium Leipzig angezeigt. Die Tiere wurden mit CO<sub>2</sub> narkotisiert. Die Tötung der Tiere erfolgte für die Ionenstrahlmikroskopie, mit Ausnahme der Kontroll-Kryoschnitte (2.1.4), durch Perfusion (2.1.4), für die qRT-PCR (2.2.1) und für die Western Blot-Analysen (2.3.1) durch Dekapitation.

Für die Untersuchungen wurden folgende Hirnregionen gewählt, die sich vorrangig durch eine große Anzahl PN-tragender Neurone auszeichnen [SEE94]: parietaler Kortex (PK, ~Bregma -4,1), Subiculum (SUB), Nucleus ruber (NR), Substantia nigra (SN) (~Bregma -5,8) [PAX98]. Als Referenzregion mit einer geringen Zahl an PN-positiven Neuronen [SEE94, BRÜ94B] wurde der entorhinale Kortex (EK, ~Bregma -6,3) verwendet. Damit ist zum einen eine breite Auswahl an morphologisch und chemisch heterogenen Neuronen und PNs gegeben, zum anderen sind die Regionen unterschiedlich stark bei neurodegenerativen Erkrankungen betroffen (siehe Einleitung 1.1.4).

### 2.1 Ionenstrahlmikroskopie

Um die Elementverteilung, speziell von Eisen, von PN-positiven und PN-negativen Neuronen orts aufgelöst und quantitativ zu analysieren, wurde die Ionenstrahlmikroskopie (Nuklearmikroskopie) angewandt. Die dazu verwendete PIXE-Methode wurde an der Hochenergie-Ionen-Nanosonde *LIPSION* der Fakultät für Physik und Geowissenschaften der Universität Leipzig durchgeführt.

#### 2.1.1 Hochenergie-Ionen-Nanosonde *LIPSION*

Die Hochenergie-Ionen-Nanosonde *LIPSION* [BUT00] ist ein Ionenstrahlmikroskop, das zur quantitativen, orts aufgelösten Elementanalyse verwendet wird. Die Nanosonde *LIPSION* wurde bereits zur Analyse biologischer Proben angewandt [REI04, FIE07, BUT05B, MEN04], u.a. von Hirnregionen [MOR05B, MOR05A, MEI06], Neuromelanin [REI07B] und Eisen-beladenen PNs [REI03, MOR04C].

Die Abbildung 2.1 zeigt einen Blick in das Nanosonden-Labor mit Ionenstrahlmikro-

skop. Das Mikroskop ähnelt im Prinzip dem eines Elektronenmikroskops, verwendet aber zur Analyse anstelle eines Elektronenstrahls einen fokussierten Ionenstrahl. Protonen ( $H^+$ -Ionen) zeigen eine besonders gute Signalausbeute mit wenig Untergrundsignal und eignen sich daher gut zur Elementanalyse. Für die Messungen wurden Protonen mit einer Energie von 2,25 MeV verwendet, die von einem Ionenbeschleuniger (3 MeV Singletron<sup>TM</sup>, High Voltage Engineering Europa, Amersfoort) erzeugt werden. Die Protonen werden in der Nanosonde im Vakuum zu einem Protonenstrahl fokussiert [BUT00], der in die Probenkammer geleitet und durch Ablenkspulen über die Probe gescannt wird. Der fokussierte Protonenstrahl mit einem Strom von bis zu 1000 pA ermöglicht eine PIXE- und RBS-basierte (2.1.2 & 2.1.3) Ortsauflösung der Elemente von ca. 1  $\mu m$  bei einer Nachweisgrenze von  $\sim 4 \mu mol/l$  (Fe) bis 60  $\mu mol/l$  (P).

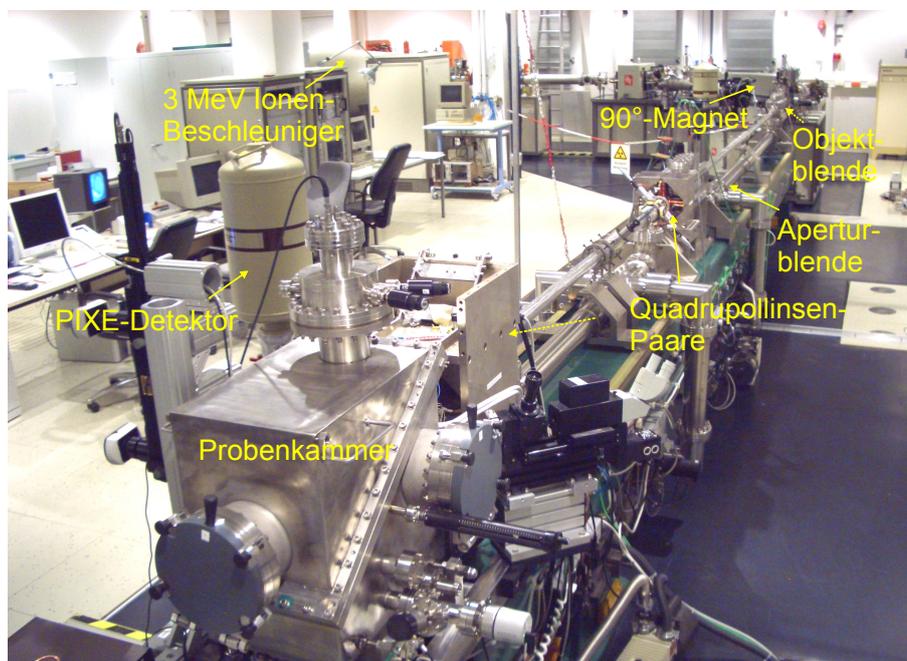


Abb. 2.1: Nanosonden-Labor mit Ionenstrahlmikroskop *LIPSION*.

### 2.1.2 Particle-Induced X-Ray Emission-Spektrometrie

Die ortsauflöste Quantifizierung der Elemente basiert auf der PIXE-Spektrometrie (Particle-Induced X-Ray Emission) [JOH95]. Trifft der Protonenstrahl auf die Probe, werden in dieser Elektronen aus den Elektronenschalen der tiefsten Energieniveaus (K- und auch L- Schale) energetisch so weit angehoben, daß sie diese verlassen. Das entstehende „Loch“ wird von einem Elektron aus einer höherenergetischen Elektronenschale aufgefüllt. Dabei wird Röntgenfluoreszenzlicht mit einer Element-charakteristischen Energie emittiert und von einem PIXE-Detektor (HPGe-Röntgen-Detektor IgleT-X, Ortec) detektiert. Die charakteristische Energie der Röntgenstrahlen für Eisen ist 6,4 keV ( $K_{\alpha}$ ,  $M^{e^{-}} \rightarrow K$ ) bzw. 7,1 keV ( $K_{\beta}$ ,  $L^{e^{-}} \rightarrow K$ ). Die Menge der emittierten Röntgenfluoreszenzstrahlung ist der Menge des in der Probe enthaltenen Elements proportional.

Die Ereignisse können für die gesamte Schnittdicke ( $5\ \mu\text{m}$ , 2.1.4) erfasst und im PIXE-Spektrum (Abb. 2.3 B) dargestellt werden. Mittels PIXE können am *LIPSION* alle Elemente mit einer charakteristischen Röntgenenergie größer  $1,5\ \text{keV}$  ( $\geq$  Ordnungszahl 13) wie z.B. die Spuren- und Nebenelemente Al, P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu und Zn quantifiziert werden. Die im Hirnschnitt und Eindeckmedium enthaltenen Hauptelemente (H), C, N und O sowie die Schnittmassendicke werden über RBS quantifiziert (siehe 2.1.3).

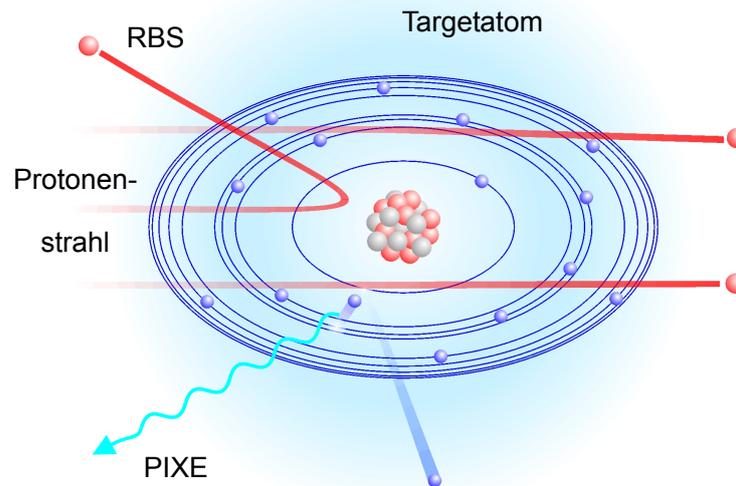


Abb. 2.2: Schematisiertes Prinzip von PIXE und RBS. [REI01]

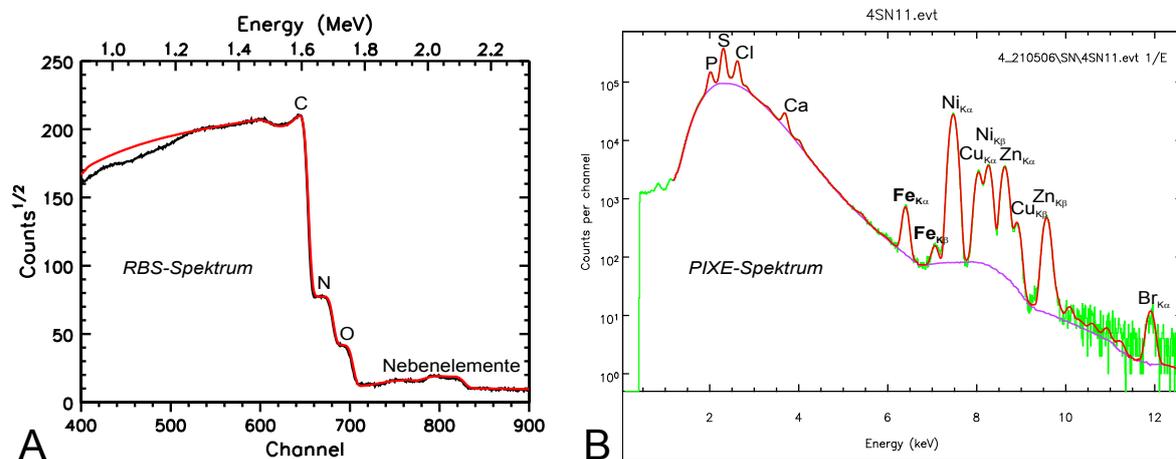


Abb. 2.3: Typisch gemessene Spektren von RBS (A) und PIXE (B) eines WFA-DAB-Ni-gefärbten Hirnschnitts. Rote Linie: zugehörige Simulationsanpassung zur Analyse.

### 2.1.3 Rutherford-Backscattering-Spektrometrie

Die Matrixkomponenten (H), C, N und O werden durch RBS (Rutherford-Backscattering-Spektrometrie) ermittelt [RUT11]. Bei dieser Art der Spektrometrie nutzt man

aus, daß ein Teil der auf die Probe applizierten Ionen durch Streuung an dem Potential der Atomkerne in einem bestimmten Winkel ( $>90^\circ$ ) zurückgestreut werden (Abb. 2.2). Die zurückgestreuten Protonen werden von einem RBS-Detektor (PIPS-Ringdetektor<sup>1</sup>) detektiert. Da die Rückstreuung mit einer bekannten Wahrscheinlichkeit erfolgt, ist die Anzahl der Atome direkt quantifizierbar. Die Energie der rückgestreuten Ionen ist von der Masse des getroffenen Atomkerns und von der Probentiefe abhängig. Mittels des Simulationsprogramms *RUMP* (Rutherford Universal Manipulation Program) wird ein simuliertes RBS-Spektrum (Abb. 2.3 A, rote Linie) auf das experimentelle RBS-Spektrum (Abb. 2.3 A, schwarze Linie) angepasst, wobei eine simulierte Matrixzusammensetzung von  $C_8H_{10}N_{0,8}O_{0,3}$  dem Massenspektrum entspricht. Dadurch erhält man neben der Schnittmassendicke (Anzahl und Art der Atome) die auf die Probe applizierte Ladung. Diese Daten benötigt man für die quantitative Auswertung der PIXE-Daten (siehe 2.1.5).

## 2.1.4 Probenvorbereitung

### Anfertigung von Histowax-Schnitten

Alle folgenden Reagenzien wurden frisch (gegebenfalls mit Aqua<sub>MilliQ</sub>) angesetzt. Es wurden Glas- und Plastikgefäße sowie Instrumente aus inertem Metall verwendet, die zuvor mit Aqua<sub>MilliQ</sub> gespült wurden.

Zwei Ratten wurden für 3 min mit 100 ml Heparin-versetzter (1:1000, Merk) physiologischer NaCl-Lösung (0,9%, Roth) und anschließend für 30 min mit 450 ml Fixierlösung (4% Paraformaldehyd (Merck), 0,1% Glutaraldehyd (Merck) in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)) perfundiert. Das Gehirn wurde herauspräpariert, frontal dreigeteilt und für 24 h in 4% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert. Die Gehirnteile wurden für 30 min in Aqua<sub>MilliQ</sub> überführt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 2×85%, 2×96%, 100% Ethanol + 100% Isopropanol) für jeweils 2 h entwässert. Zum Ausspülen des Alkohols wurden die Gehirne 3× bis zum jeweiligen Absinken auf den Gefäßboden in Methylbenzoat gegeben, gefolgt von einem 1:1-Gemisch aus Methylbenzoat und Histowax (Leica) T<sub>M</sub><sup>2</sup>44°C (2 h), Histowax T<sub>M</sub>57°C (2 h) und Histowax T<sub>M</sub>57°C (über Nacht, üN). Die Gehirnstücke wurden in flüssigem Histowax T<sub>M</sub>57°C ausgebettet und in kaltem Wasser ausgehärtet. Am Mikrotom wurden 5 µm dicke Frontalschnitte angefertigt und auf SuperFrostPlus-Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen und getrocknet.

### Lektin histochemische Färbung

Um in der Ionen-Nanosonde die PN-tragenden Neurone identifizieren zu können, wurden diese im Hirnschnitt mit dem Pflanzenlektin *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA, Sigma) markiert. WFA ist ein etablierter N-Acetylgalactosamin (GalNAc)-bindender PN-Marker [HÄR92, AJM08]. Die Färbung wurde mit DAB-Ni verstärkt, um die immunhistochemisch markierten Strukturen (PNs) mittels der Element-Markierung (Ni) im Ionenstrahlmikroskop sichtbar zu machen [MOR05B]. Durch die Ni-verstärkte

<sup>1</sup>Passivated Implanted Planar Silicon

<sup>2</sup>T<sub>M</sub>=Schmelztemperatur

Färbemethode werden keine anderen quantifizierbaren Elemente außer Ni eingetragen [MOR05B].

Die Hirnschnitte wurden in absteigender Alkoholreihe ( $3 \times 10$  min Xylol, je 4 min 100%,  $2 \times 96\%$ , 85%, 70% Ethanol) entparaffiniert, für 30 sec in AquaMilliQ gewässert und für 1 h in 2% BSA (Rinderserumalbumin, Serva) in PBS-T (PBS-Tween, pH 7,4) geblockt. Es folgte die Inkubation (1:250 in 1% BSA in PBS-T) mit biotinyliertem WFA über Nacht bei 4°C. Eine Kontrolle ohne WFA wurde parallel mitgeführt. Nach  $3 \times$  Spülen mit PBS-T wurde der Schnitt für 1 h mit Peroxidase-konjugiertem ExtrAvidin (Sigma) 1:1000 in PBS-T inkubiert und  $3 \times$  mit PBS-T und  $1 \times$  mit Tris-HCl (pH 8) gespült. Unter Sichtkontrolle ( $\sim 3-4$  min) wurde die Inkubation in frischer Ni-DAB-Lösung durchgeführt (5 ml Tris-HCl + 20 mg 99,999% Nickelammoniumsulfat (Sigma) + 100  $\mu$ l DAB (2 mg/100  $\mu$ l, Sigma) + 2,5  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Roth)). Die Farbreaktion wurde durch Spülen in Tris-HCl abgebrochen und der Schnitt nochmals  $3 \times$  in PBS-T gewaschen. Nach kurzem Wässern folgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und die Einbettung in DePeX (Serva). DePeX besteht nur aus den Komponenten C, H und O und ist für eine analytische Auswertung als Eindeckmedium unbedenklich. Abschließend wurden die WFA-DAB-Ni-gefärbten Hirnschnitte (Abb. 2.4 B) mikroskopiert (Olympus BX51) und die für die Messung in den jeweiligen Regionen (PK, SUB, SN) vorgesehenen Zellen dokumentiert (AnalySIS ColorView Soft Imaging System).

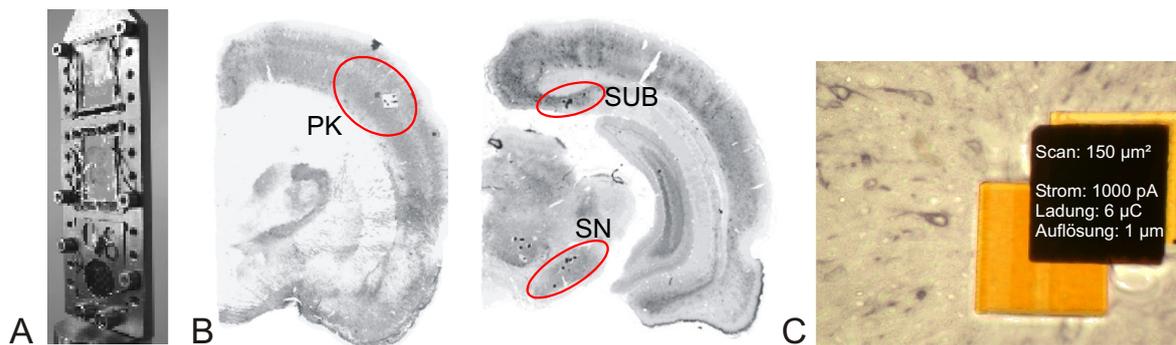


Abb. 2.4: A: Probenhalter mit in DePeX eingebetteten Hirnschnitten. B: WFA-DAB-Ni-Färbung am Hirnschnitt. Die markierten Hirnregionen wurden untersucht. C: Drei gescannte Flächen mit entsprechend der Scandauer ausgeprägter „Karamelisierung“ des Kohlenstoffs. Wichtige Scanparameter sind angegeben.

### Kontroll-Kryoschnitte

Neben den Histowax-Schnitten wurden für Ionenstrahlanalytische Kontrollmessungen 15  $\mu$ m dicke Kryoschnitte (HM 500 O, Microm) angefertigt. Die Ratten wurden dazu dekapitiert und das Gehirn nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ein Teil der Schnitte wurde auf Objektträgern aufgezogen, luftgetrocknet, kurz in 70% Ethanol fixiert und bis zur DePeX-Einbettung und Messung bei -80°C aufbewahrt. Andere Schnitte wurden direkt zwischen zwei Schichten Formvar (Serva) gespannt und getrocknet.

### 2.1.5 Messung und Auswertung anhand von Element-Maps

Zur Messung wurden die in DePeX eingebetteten Hirnschnitte vom Objektträger abgezogen, auf einem Aluminiumrahmen befestigt und dieser in die Probenhalterung (Abb. 2.4 A) vertikal zum eintreffenden Protonenstrahl eingefasst. Die Probenkammer wurde verschlossen und ein Vakuum erzeugt. Mittels einer automatisierten Verfahrenseinheit in x-, y- und z-Richtung wurde unter mikroskopischer Kontrolle die Probe positioniert, wobei die lichtmikroskopischen Bilder der Orientierung dienen. Die Größe der Scanfläche, die der Protonenstrahl nach Start der Messung abscannt, wird über das Selektieren der Windungszahlen der Scanspulen vor der Probenkammer und über die Datenerfassungssoftware *Mpsys* (MARCO, Melbourne) definiert. Die Messung wird gestoppt, wenn die Ausbeute der vom PIXE-Detektor erfassten Röntgenstrahlen ausreichend für eine hochauflösende Darstellung ist. Durch einen höheren Strom wird in der gleichen Messzeit mehr Ladung appliziert und dadurch eine größere Sensitivität erzielt. Bei einem Strom von 1000 pA wurde zur Erhöhung der Sensitivität für ein Scanfeld von  $150 \times 150 \mu\text{m}^2$  mit einer Auflösung von  $500 \times 500$  Pixel (1 Pixel  $\sim 1 \mu\text{m}$ ) eine Ladung von  $\sim 6 \mu\text{C}$  (Dauer ca. 90 min) appliziert (Abb. 2.4 C). Analysiertes Gewebe wird in Abhängigkeit der Ladungsmenge pro Fläche braun bis schwarz, was durch die „Karamelisierung“ des Kohlenstoffs zustande kommt (Abb. 2.4 C). Während der Messung werden *Mpsys*-generierte Spektren und elementspezifische Pixel-Maps erstellt, die der Kontrolle der Messereignisse als auch der Eingabe einer neuen Probenposition dienen.

Die Auswertung der PIXE-Daten erfolgte, unter der Berücksichtigung der Daten der RBS-Auswertung (2.1.3), mit *GeoPIXE II* (CSIRO, AUS, [RYA01]). Die Verteilung jedes Elements wird quantitativ in einem orts aufgelösten Element-Map dargestellt (Abb. 2.5). In denen werden die Regionen, von denen eine Konzentrationsangabe erwünscht ist (ROI (regions of interest): Soma, Zellkern, Nukleolus, PN, Neuropil), manuell umrandet. Bei der Auswertung PN-positiver und -negativer Neurone wurden nur die mit einem voll angeschnittenen Zellkern berücksichtigt. Die Konzentration der Elemente wird zunächst in ppm (parts per million= $\mu\text{g}/\text{g}$ ) ausgegeben, was in mmol/l umgerechnet werden kann.

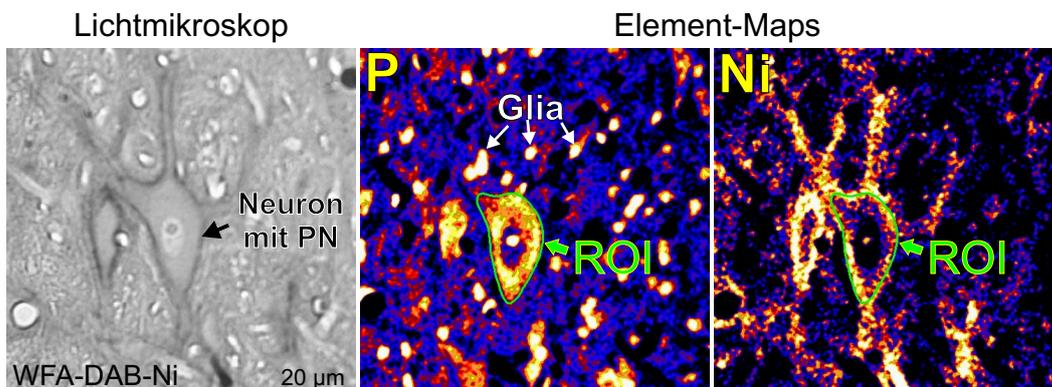


Abb. 2.5: Festlegung der ROI (region of interest) mittels *GeoPIXE II* in den Element-Maps zur Auswahl einzelner Zellen am Beispiel eines cerebellaren Neurons. P: Zellsomata der Neurone und Gliazellen, Ni: verstärkte PN-Färbung. Zur Kontrolle wird mit dem LM-Bild abgeglichen.

### 2.1.6 Subzelluläre Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation

Als additive Methodik zur zusätzlichen Auftrennung und Isolation der subzellulären Kompartimente in Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion wurde eine subzelluläre Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Bigl [BIG65, BIG70] durchgeführt. Auf Eis wurde dazu frisches 10%iges Gesamtkortex-Homogenat in 0,25 M Saccharoselösung mittels Dounce-Homogenisator hergestellt. 2 ml des unfixierten Homogenats wurden im Saccharosegradienten (0,8 M, 1 M, 1,2 M, 1,4 M) durch verschiedene Zentrifugationsschritte (Sorvall Combi Plus, DuPont, USA) aufgetrennt (Abb. 2.6). Die Pellets wurden in 0,25 M Saccharoselösung aufgenommen und die Fraktionen 1 und 2 dabei zusammengeführt. Jeweils 5  $\mu\text{l}$  der Suspension wurden auf  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Fenstern ( $2 \times 2 \text{ mm}^2$ , 200 nm dick, Silicon, USA) aufgebracht, luftgetrocknet und deren Elementgehalt im Ionenstrahlmikroskop wie für die Hirnschnitte beschrieben quantifiziert.

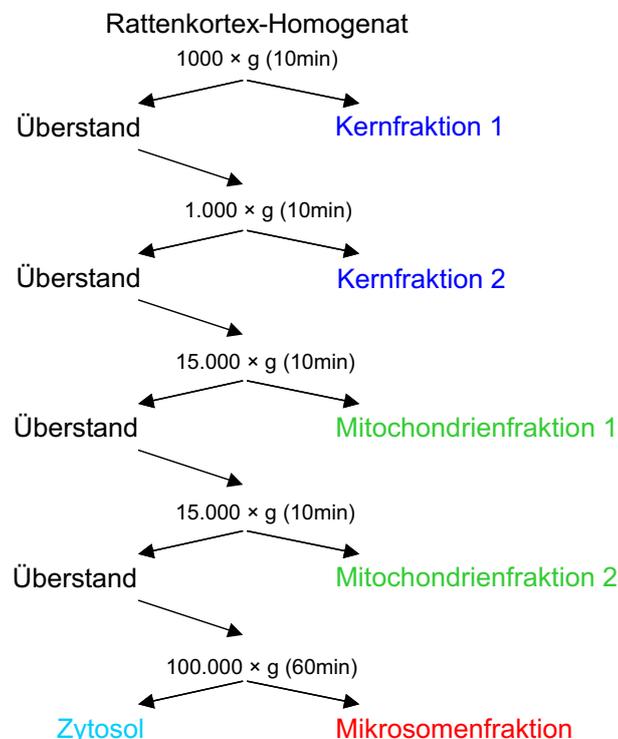


Abb. 2.6: Gewinnung subzellulärer Fraktionen mittels Dichtegradientenzentrifugation. Nach [BIG65].

### Elektronenmikroskopie

Zur zusätzlichen Beurteilung der einzelnen Fraktionen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, Zeiss EM 912 Omega) wurden 10  $\mu\text{l}$  der durch Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Suspensionen mit 90  $\mu\text{l}$  Fixierlösung (4% Paraformaldehyd, 1% Glutaraldehyd) versetzt. Davon wurden 3  $\mu\text{l}$  mit 3%igem Agar (Serva) homogenisiert und zur Herstellung eines Semidünnschnitts (0,5  $\mu\text{m}$ ) verwendet. Die Fixierung erfolgte dabei mit 1%igem Osmiumtetroxid (Merck), die Kontrastierung mit 1%igem

Uranylacetat (Serva) und die Einbettung in Durcupan (Fluka) nach Standardprotokoll<sup>3</sup>. Die Schnitte wurden für die TEM anschließend auf mit Formvar beschichtete Athene-Grids aufgebracht.

## 2.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zum Vergleich des Eisenprotein- und Aggrecan-spezifischen mRNA-Gehalts von Hirnregionen mit viel PN-positiven Neuronen (PK, SUB, NR, SN) und mit wenigen PN-positiven Neuronen (EK) wurde die RNA der entsprechenden Gebiete isoliert. Anschließend wurde diese durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) am *Rotor-Gene 2000* (Corbett Research, AUS) amplifiziert und quantifiziert.

### 2.2.1 Präparation und Homogenisierung von Hirngewebe

Die Rattenhirne wurden nach Dekapitation entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur sofortigen Weiterverarbeitung auf Trockeneis deponiert. Die Gehirne wurden zunächst auf Eis mittels einer Rasierklingenkonstruktion (Abb. 2.7) frontal in ca. 2 mm dicke Scheiben portioniert. Anschließend erfolgte auf Trockeneis unter dem Binokular per Skalpell die Isolation der einzelnen Hirngebiete. Die von der rechten und linken Hirnhälfte isolierten Gewebstücke eines jeweiligen Gebietes wurden in einem zuvor abgewogenen 2 ml-Tube zusammengeführt und in flüssigem Stickstoff mittels eines Stößels pulverisiert. Anschließend wurden die Proben gewogen und mit soviel RLT-Puffer (QIAGEN) homogenisiert, daß eine für die RNA-bindenden Säulen (MinElute Spin Columns, QIAGEN) maximale Endgewebsmenge von 5 mg ( $\sim 4 \mu\text{g}$  RNA) in 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer (0,3  $\mu\text{g}$  RNA/ $\mu\text{l}$ ) vorlag (entsprechend weniger bei weniger Material). Dem Homogenat wurden 4 ng/ $\mu\text{l}$  Carrier-RNA (QIAGEN) zugesetzt. Eine abschließende Homogenisierung erfolgte mittels Pipettierens und Zentrifugierens.

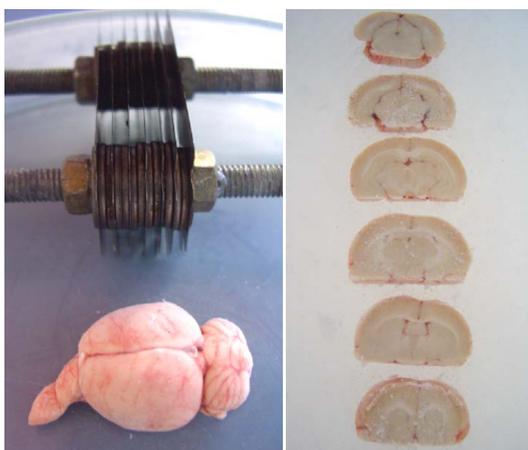


Abb. 2.7: Rasierklingenkonstruktion zum Präparieren 2 mm dicker Hirnscheiben zur anschließenden Isolation von Hirngebieten per Skalpell auf Eis.

<sup>3</sup>Arbeitsschritt nicht selbständig durchgeführt

### 2.2.2 RNA-Isolation, Reverse Transkription und qRT-PCR

Arbeitsschritte, die hier nicht näher protokolliert sind, wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA-Isolation erfolgte über RNA-bindende Säulen mittels des RNeasy Mikro Kits (QIAGEN). Jeweils 6  $\mu\text{l}$  der isolierten RNA wurden mittels SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis Super-Mix for qRT-PCR (Molecular Probes, invitrogen) in cDNA revers transkribiert. Die umgeschriebene cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR [HIG92] spezifisch amplifiziert, bei der durch den Einbau eines interkalierenden Reporterfarbstoffs die Detektion des PCR-Produktes erfolgt (Abb. 2.8 A). Im qRT-PCR-Ansatz von 20  $\mu\text{l}$  wurden 4  $\mu\text{l}$  der umgeschriebenen cDNA mit 10  $\mu\text{l}$  HotStarTaq Mix (QIAGEN), 2  $\mu\text{l}$  Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green I (Molecular Probes, invitrogen) und jeweils 2  $\mu\text{l}$  des Forward- und Reverse-Primers (Tab. 2.1) versetzt. Die PCR wurde an zwei Tieren zweimal im Doppelansatz durchgeführt (n=2 $\times$ 4).

	5'-Primer <sub>forward</sub> -3'	5'-Primer <sub>reverse</sub> -3'	Größe
Tf	AGATGGAGGTGGAGATGTGG	GAGAGCCGAACAGTTGGAAG	312 bp
TfR	CCTGAGGGTTATGTGGCATT	ATGGGGGAAACTGAGTATGG	286 bp
Ferritin H	CCTGGAGTTGTATGCCTCCT	GTGCACACTCCATTGCATTC	236 bp
DMT1	CTCCACCATGACTGGAACCT	CAGCCTATTCCGTTGGAGAA	273 bp
MTP1	GGGTGGATAAGAATGCCAGA	TGCTCCTGTTTTCTCCTGCT	261 bp
DcytB	GTCATGGGCATGATCTTCCT	GGTGGCACCAAAAGTGT	228 bp
Aggrecan	CCATCTCTCCAGGTGCAGTT	TGTCCTTGTCACCCACACAT	267 bp
$\beta$ -Actin	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	280 bp

Tab. 2.1: Die für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer (metabion, D) zur spezifischen Amplifikation von Eisenprotein-Sequenzen. Zusätzlich wurde die Sequenz von Aggrecan (PN-Bestandteil) und  $\beta$ -Actin (Housekeeping-Gen) amplifiziert. Produktgrösse in [bp]. Designed mit NCBI und Primer3.

Die PCR, deren Reaktionsbedingungen im Vorfeld auf ihre Annealing-Temperatur und ihre Primer-Konzentration hin optimiert wurde, erfolgte nach Protokoll 2.2. Die Bildung eines spezifischen Produktes wurde mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse von 50°C bis 99°C im Anschluss an den PCR-Lauf überprüft (Abb. 2.8 B). Dabei lassen sich unspezifische Produkte wie Artefakte oder Primerdimere erkennen, welche eine geringe Schmelztemperatur besitzen.

Als zusätzliche Kontrolle wurden die amplifizierten Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt, um die Transkriptlängen zu überprüfen (Abb. 2.8 D). Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  Probe mit 2  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (50% Glycerol (Sigma) / 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Sigma) / 0,25% Bromphenolblau (Fluka) / 0,25% Xylencyanol (Sigma)) versetzt und bei 6 V/cm Gellänge in 2%iger Agarose im TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, pH 8,3) in einer Horizontalelektrophoresekammer (BioRad) aufgetrennt. Die Negativkontrollen des PCR-Laufs und ein Grössenstandard (SmartLadder (SF), Eurogentec) wurden ebenfalls mitgeführt. Nach 15 min Färbung des Gels im Ethidiumbromidbad (0,5 mg/l, Sigma) schloss sich die Detektion bei 312 nm im UV-Transilluminator (Biometra GmbH) an.

Die Quantifizierung der PCR-Ergebnisse erfolgte mithilfe der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Formel (Formel 2.3, nach [RAW05] und [KUB06]). Zunächst wird mittels des Software-Programms

initiale Denaturierung	95°C, 15 min
Denaturierung*	94°C, 30 sec
Annealing und Extension*	58°C, 30 sec
Aufnahme des Fluoreszenzsignals A*	72°C, 30 sec
Aufnahme des Fluoreszenzsignals B*	84°C, 5 sec
finale Extension	72°C, 10 min
Denaturierung der Produkte	50°C, 5 min
Aufschmelzen der Produkte	50°C-99°C (2°C/min)
Lagerung	4°C

Tab. 2.2: Amplifikationsprogramm der qRT-PCR. \*=45 Zyklen

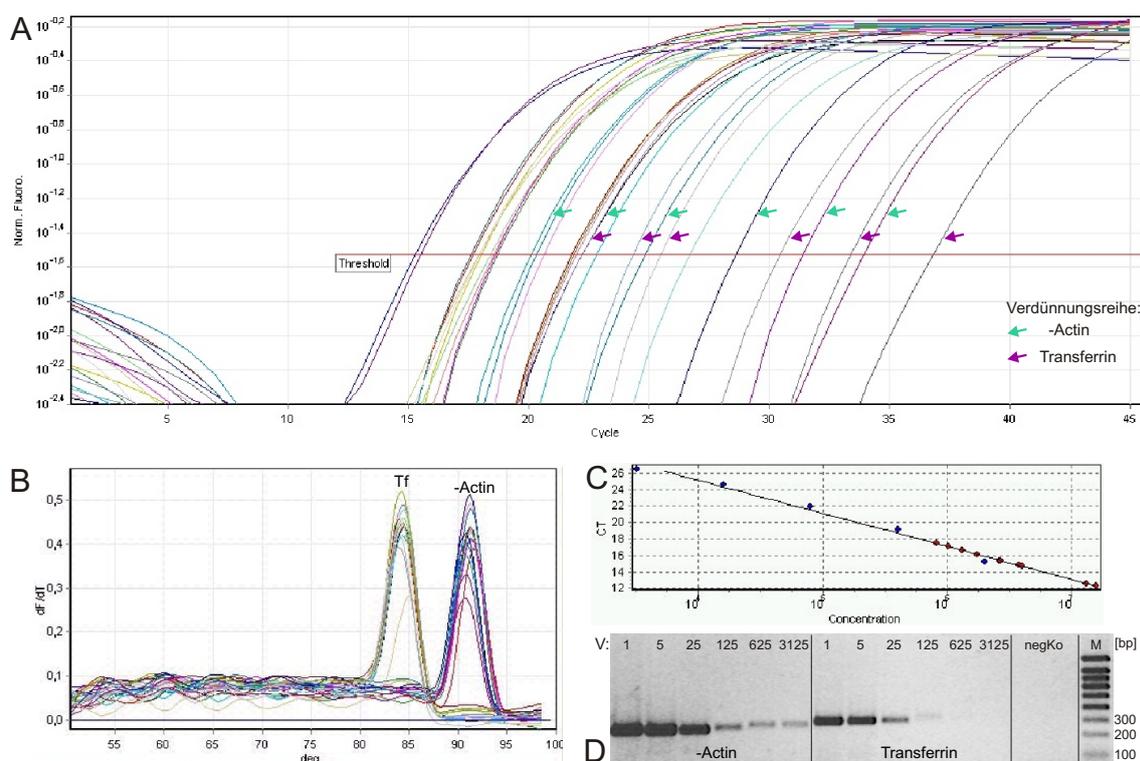


Abb. 2.8: (A) Fluoreszenzsignale von PCR-Proben in Abhängigkeit von der Zyklanzahl in logarithmischer Darstellung. Pro PCR-Lauf wurde im Doppelansatz mittels Threshold separat der Fluoreszenz-Schwellenwert (CT-Wert) für die Eisenprotein- (hier Tf) und  $\beta$ -Actin-Sequenz ermittelt. Im selben PCR-Lauf wurde für beide Sequenzen eine Verdünnungsreihe der Proben (Pfeile) mitgeführt. (B) Schmelzkurven-Analyse zur Kontrolle der Spezifität der Produkte. Spezifische Produkte schmelzen mit einem steilen Peak ab 80°C, unspezifische Produkte wie Primer-Dimere (hier keine vorhanden) darunter. (C) Standardkurve zur Ermittlung der PCR-Effizienz. Sie wird separat für beide Verdünnungsreihen des PCR-Laufs (Tf+ $\beta$ -Actin) erstellt. (D) Anschließende Auftrennung der PCR-Ansätze im Agarosegel zur nochmaligen Kontrolle der richtigen Produktgröße. Hier gezeigt: Verdünnungsreihe (V=Verdünnungsfaktor der Ausgangsprobe). M=Marker (Größenstandard SmartLadder SF)

*Rotorgene 4.6* (Corbett Research, AUS) durch das Setzen des Thresholds in der exponentiellen Phase der logarithmischen Darstellung (2.8 A) der CT-Wert ermittelt

(CT=Cycle of Threshold (PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt)). In jedem PCR-Lauf wird neben den eigentlichen Proben für jeden Primer-Ansatz eine aus sechs Werten bestehende serielle Verdünnungsreihe (1:5) des Start-Templates mitgeführt (2.8 A, D). Aus dieser wird eine Standardkurve (Abb. 2.8 C) erstellt, aus deren Anstieg die Effizienz  $E$  berechnet wird (Formel 2.1). Die PCR-Effizienz ist ausschlaggebend für die quantitativen Berechnungen, da sie für die verschiedenen Primeransätze unterschiedlich ist. Die Annahme einer Effizienz von 100% (Verdopplung der Molekülanzahl pro Amplifikationszyklus) ist falsch [KUB06]. Es wird zunächst jedes Zielgen ZG (Eisenprotein-Gen) intern auf das Housekeeping-Gen HG ( $\beta$ -Actin-Gen) normiert ( $\Delta$ , Formel 2.2 für ungleiche Effizienzen). Somit erhält man ein Verhältnis der Start-Kopienanzahl  $n(0)$  des Zielgens ZG zum Housekeeping-Gen HG. Anschließend wird die Zielregion ZR (PK, SUB, NR, SN) relativ mit der Kalibratorregion KR (EK) quantifiziert (Formel 2.3). Als zusätzliches Zielgen wurde Aggrecan als PN-Bestandteil analysiert.

$$m = -\frac{1}{\log(1 + E)} \quad (2.1)$$

$$\Delta = \frac{n_{ZG}(0)}{n_{HG}(0)} = \frac{T_{ZG} \cdot \frac{1}{(1+E_{ZG})^{CT_{ZG}}}}{T_{HG} \cdot \frac{1}{(1+E_{HG})^{CT_{HG}}}} \quad (2.2)$$

$$\Delta\Delta = \frac{\Delta_{ZR}}{\Delta_{KR}} \quad (2.3)$$

## 2.3 Western Blot

Zum regionalen Vergleich der Expression von Eisenproteinen und CSPG von PN-reichen (PK, SUB, NR, SN) vs. PN-armen (EK) Hirnregionen wurde eine semiquantitative Analyse mittels Western Blot nach Auftrennung im Gradientengel durchgeführt.

### 2.3.1 Präparation und Homogenisierung von Hirngewebe

Die Isolation der Hirnregionen erfolgte wie unter 2.2.1. Die entsprechenden Hirnregionen der rechten und linken Hirnhälfte wurden aliquotiert, gewogen und in Proteinextraktionspuffer B (Tab. 2.3, 1 mg Protein/100  $\mu$ l Puffer) in einem 2 ml-Tube auf Eis mittels Ultra-Turrax (IKA-Werke, D) homogenisiert. Die Homogenate wurden zentrifugiert (50,000 $\times$ g, 30 min, 4°C, 3K30 Sigma) und die Überstände in ein neues Tube überführt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach Bradford [BRA76] mit einer BSA-Standardreihe bestimmt und mit Aqua<sub>dest</sub> für alle Proben gleich eingestellt (20  $\mu$ g Protein/ $\mu$ l).

### 2.3.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) im Gradientengel (4%-15%). Das Gradientengel wurde

**Proteinextraktionspuffer B:**

20 mM Tris<sup>1</sup>-HCl, pH 7,2  
 150 mM NaCl<sup>1</sup>  
 2 mM MgCl<sub>2</sub><sup>2</sup>  
 2 mM EDTA<sup>2</sup> (Ethylendiamintetraessigsäure)  
 2 mM EGTA<sup>2</sup> (Ethylenglycoltetraessigsäure)  
 1% NP40<sup>3</sup> (Nonidet P40)  
 5 mM NaF<sup>2</sup> (Natriumfluorid)  
 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub><sup>2</sup> (Natriumorthovanadat)  
 5% Glycerol<sup>2</sup>  
 1 mM PMSF<sup>2</sup> (Phenylmethylsulfonylfluorid)  
 1 µg Leupeptin<sup>4</sup>  
 Complete Protease-Inhibitor-Cocktail<sup>5,6</sup>

**Probenpuffer (Laemmli):**

1,4 ml Aqua<sub>dest</sub>  
 1 ml 1 M Tris<sup>1</sup>-HCl, pH 6,8  
 1,6 ml Glycerol<sup>2</sup>  
 3,2 ml 10%iges SDS<sup>1</sup>  
 0,8 ml β-ME<sup>2</sup> (Mercaptoethanol)  
 Krümel Bromphenolblau<sup>3</sup>

**ECL-Lösung A:**

500 ml 0,1 M Tris<sup>1</sup>-HCl, pH 8,6  
 100 mg Luminol<sup>3</sup>

**ECL-Lösung B:**

100 ml DMSO<sup>2</sup> (Dimethylsulfoxid)  
 110 mg p-Cumarsäure<sup>3</sup>

Tab. 2.3: <sup>1</sup> Roth <sup>2</sup> Sigma <sup>3</sup> Fluka <sup>4</sup> Calbiochem <sup>5</sup> Roche <sup>6</sup> nach Angaben des Herstellers

durch kontinuierliches Zusammenführen von je 4,2 ml der zwei verschiedenen prozentigen Trenngele hergestellt (4%iges Gel: 7,28 ml Aqua<sub>bidest</sub> / 3 ml Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 / 1,6 ml 30%iges Acrylamid (Roth) / 120 µl 10%iges SDS (Roth); 15%iges Gel: 2 ml 60%ige Saccharose / 0,88 ml Aqua<sub>bidest</sub> / 3 ml Tris-HCl / 6 ml 30%iges Acrylamid / 120 µl 10%iges SDS / Krümel Bromphenolblau (Fluka) zur Sichtung), die zum Start der Polymerisation mit 25 µl/20 µl 10%igem APS (Ammoniumpersulfat, Roth) und 2,5 µl/2 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin, Roth) versetzt wurden. Nach Aushärtung des Trenngels unter Luftabschluß mit Isopropanol wurde dieses mit 4,3%igem Sammelgel (4,41 ml Aqua<sub>bidest</sub> / 0,75 ml Tris pH 6,8 / 0,78 ml 30%iges Acrylamid / 0,06 ml 10%iges SDS / 0,06 ml 10%iges APS / 0,006 ml TEMED) überschichtet. Die zu analysierenden Proben wurden 1:1 in Probenpuffer (Laemmli, [LAE70], Tab. 2.3) aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert (die Auftrennung von CSPG erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen ohne β-ME im Probenpuffer). Je 15 µl des Homogenats sowie 5 µl Proteinmarker (Broad Range, New England Biolabs) wurden mittels Hamilton-Mikroliterspritze in die Geltaschen eingefüllt. Der Lauf erfolgte zunächst bei 120 V, ab dem Erreichen des Trenngels bei 180 V in Laufpuffer (192 mM Glycin (Sigma) / 25 mM Tris (Roth) / 0,1 % SDS) in einer vertikalen Gelelektrophoreskammer (biostep).

### 2.3.3 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in Blotpuffer (Bjerrum und Schäfer-Nielson [BJE86], 48 mM Tris / 39 mM Glycin / 0,004% 10%iges SDS / 20% Methanol (Baker)) gespült. Zwischenzeitlich wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (PerkinElmer, USA) mit Methanol benetzt und dann ebenso wie das Filterpapier (Gel Blotting Paper, Schleicher & Schuell) für 5 min in Blotpuffer äquilibriert. Als Blotting-Sandwich (2× Filterpapier-Membran-Gel-2× Filterpapier) wurden die Proteine in eisgekühltem Blotpuffer im Tank Blot (Biostep) bei 120 mA üN übertragen.

### 2.3.4 Membran-gebundene Immundarstellung der Proteine

Die für die Immundarstellung verwendeten Antikörper sind in Tab. 2.4 aufgeführt. Die auf die PVDF-Membran geblotteten Proteine wurden 3× in PBS gespült und 1 h in 2% BSA in TBS-T (Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween20 (Sigma)) geblockt, bevor die Inkubation mit dem primären Antikörper in 2% BSA ün bei 4°C erfolgte. Nach 3× Waschen in TBS-T wurde mit dem sekundären Antikörper (in 1% BSA) für 1 h bei RT inkubiert. Die Membranen wurden abschließend mit TBS-T und 2× mit PBS gespült. Die Immunreaktivität wurde mittels ECL-Lösung (Enhanced Chemoluminescence-Lösung: 5 ml Lösung A (Tab. 2.3) / 500 µl Lösung B (Tab. 2.3) / 1,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Roth), zu 10% mit SuperSignal West Femto (Pierce) angereichert) an der Kodak Image Station 2000R unter Verwendung der Kodak Molecular Imaging Software Version 4.0 entwickelt. Die densitometrische Auswertung der Banden mittels der Software *TINA 2.09g* erfolgte für ein spezifisches Eisenprotein und β-Actin an derselben PVDF-Membran, um auf β-Actin der selben Probe des selben Laufs und des selben Blots relativen zu können. Nach der Eisenprotein-Auswertung wurden deshalb die auf der Membran gebundenen Antikörper mit Stripping-Puffer (10 ml Stripping-Lösung (63 mM Tris-HCl pH 6,7 / 2% SDS) + 70 µl β-ME; 2 h RT ) entfernt und nach Waschen und Blocken nochmals eine Immundarstellung von β-Actin durchgeführt.

	<b>Antigen</b>	<b>Wirt (Ig)</b>	<b>Verd.</b>	<b>kDa</b>
1	<sup>a</sup> Human-Transferrin (Plasmaprotein)	Huhn (IgY pk)	1:500	80
2	<sup>b</sup> Ratten-Tf-Rezeptor (CD71 AA 461-760)	Maus (IgG mk)	1:500	95
3	<sup>b</sup> Human-Ferritin H (Y16, 11q13 N-Term.)	Ziege (IgG pk)	1:500	21
4	<sup>b</sup> Human-Ferritin L (C20, 19q13.3-4 inter. Pep.)	Ziege (IgG pk)	1:500	19
5	<sup>c</sup> Ratten-DMT1 +IRE (17 AA Peptid C-Term.)	Kaninchen (IgG pk)	1:500	62
6	<sup>c</sup> Maus-MTP1 (19 AA Peptid C-Term.)	Kaninchen (IgG pk)	1:500	62
7	<sup>c</sup> Maus-DcytB (20 AA Peptide C-Term.)	Kaninchen (IgG pk)	1:500	33
8	<sup>d</sup> Katzen-CSPG (Hirn-Proteoglykan)	Maus (IgM mk)	1:5000	680
9	<sup>e</sup> β-Actin (β-zytoplasm. N-Term.)	Maus (IgG mk)	1:20000	42
	<b>Sekundär-Antikörper (POD-konj.)</b>	<b>Host</b>	<b>Verd.</b>	<b>+</b>
10	<sup>e</sup> Huhn-IgY	Kaninchen (IgG pk)	1:10000	1
11	<sup>f</sup> Ziege	Kaninchen (IgG pk)	1:10000	6/7
12	<sup>g</sup> Maus	Ziege (IgG pk)	1:10000	2/8/9
13	<sup>g</sup> Kaninchen	Ziege (IgG pk)	1:10000	3/4/5

Tab. 2.4: Die für den Western Blot verwendeten Antikörper (Referenzen siehe Tabelle 2.5). + kombiniert mit. POD Peroxidase. AA Aminosäure. Klonogenität: mk monoklonal, pk polyklonal. <sup>a</sup>biomol, <sup>b</sup>SantaCruz, <sup>c</sup>adi, <sup>d</sup>Chemicon, <sup>e</sup>Sigma, <sup>f</sup>Dako, <sup>g</sup>Pierce

## 2.4 Immunhistochemische Markierung

Für die immunhistochemische Darstellung (und teilweise die Quantifizierung per sbLSZ (2.5)) der Eisenproteine, PNs, Neurone und Gliazellen wurden die in Tab. 2.5 aufgeführten Antikörper und Farbstoffe in jeweiliger Verdünnung verwendet. Dazu wurden die Ratten wie unter 2.1.4 perfundiert und deren dreigeteilte, fixierte Gehirne in 30%

Saccharose (Roth) und 0,1% Natriumazid (Merck) in PBS gelagert. Die Hirnstücke wurden mittels Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe, NI) auf das Gefriermikrotom (Mikrotom Reichert-Jung mit Frigomobil Gefriereinheit (Leica)) arretiert und auf  $\sim -20^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Es wurden 30  $\mu\text{m}$ -Gefrierschnitte angefertigt, diese in PBS überführt und als freischwimmende Schnitte weiterbehandelt. Nach 1 h Blocken mit 2% BSA in PBS-T folgte die Inkubation mit den in Tab. 2.5 aufgeführten primären Antikörpern/Markern als Cocktail  $\ddot{u}\text{N}$  bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Nach  $3\times$  Waschen mit PBS-T wurden die Schnitte im Dunkeln für 1 h bei RT mit den sekundären Antikörpern (oder Fluoro-Nissl) (Tab. 2.5) im Cocktail inkubiert. Bei biotinylierten Sekundärantikörpern schloss sich eine Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem ExtrAvidin für 1 h bei RT und die Verstärkung mittels DAB-Ni an (siehe 2.1.4 + Blocken der endogenen Peroxidase mit 100% Methanol für 30 min bei RT zwischen der Behandlung mit 100% und 96% Ethanol). Im Falle einer Kernfärbung mit DAPI wurde diese nach der immunhistochemischen Färbung im Dunkeln für 20 min bei RT durchgeführt. Nach drei abschließenden Waschschritten in PBS-T wurden die Hirnschnitte in PBS auf SuperFrostPlus-Objektträger aufgezogen, nach 2.1.4 entwässert und in DePeX eingebettet.

	<i>Antigen / Marker</i>	<i>Wirt (Ig)</i>	<i>Verd.</i>	<i>Referenz / +</i>	
Primär-Reaktion	<b>Eisenproteine</b>				
	1★	<sup>a</sup> Human-Transferrin (Plasmaprotein)	Huhn (IgY pk)	1:250	[CON90]
	2★	<sup>b</sup> Ratten-Transferrin-Rezeptor (CD71 AA 461-760)	Maus (IgG mk)	1:150	[YEF00, Moo02B]
	3★	<sup>b</sup> Human-Ferritin H (Y16, 11q13, N-terminales Peptid)	Ziege (IgG pk)	1:200	[INF07]
	4★	<sup>b</sup> Human-Ferritin L (C20, 19q13.3-4, intern. Peptid)	Ziege (IgG pk)	1:200	[CON90]
	5★	<sup>c</sup> Ratten-DMT1 +IRE (17 AA Peptid, C-Terminus)	Kaninchen (IgG pk)	1:150	[DOM07]
	6★	<sup>c</sup> Maus-MTP1 (19 AA Peptid, C-Terminus)	Kaninchen (IgG pk)	1:150	[DOM07]
	7	<sup>c</sup> Maus-DcytB (20 AA Peptide, C-Terminus)	Kaninchen (IgG pk)	1:150	[MCK01]
	<b>PN-Marker</b>				
	8★	<sup>d</sup> GalNAc	<i>Wisteria floribunda</i> (Biotin-konj.)	1:300	[HÄR92, AJM08]
	9	<sup>e</sup> Katzen-CSPG (Hirn-Proteoglykan)	Maus (IgM mk)	1:2500	[LAN98]
	10	<sup>e</sup> Maus-Aggrecan (GST-Fusionsprotein AA 1177-1326)	Kaninchen (IgG pk)	1:50 <sup>ZK</sup>	[KAB04, REI07A]
	<b>Zell-Marker</b>				
	11★	<sup>e</sup> Maus-Neuronales Kernprotein (NeuN)	Maus (IgG mk)	1:150	
	12	<sup>f</sup> OSP (15 AA Peptid, synth. C-Terminus)	Kaninchen (IgG pk)	1:200	
13	<sup>g</sup> Human-saures fibrilläres Gliaprotein (GFAP)	Kaninchen (IgG pk)	1:1000		
14★	<sup>h</sup> NeuroTrace green Fluorescent Nissl Stain		1:1000		
15	<sup>h</sup> DAPI		1:15000 <sup>1</sup>		
Sekundär-Reaktion	16★	<sup>i</sup> Ziege	Esel (IgG pk, Cy5)	1:200	3/4
	17★	<sup>i</sup> Kaninchen	Esel (IgG pk, Cy5)	1:200	5/6/7
	18	<sup>i</sup> Kaninchen	Esel (IgG pk, Cy3)	1:300	5/6/7
	19	<sup>i</sup> Kaninchen	Esel (IgG pk, Cy2)	1:250	10
	20	<sup>f</sup> Huhn-IgY	Ziege (IgG pk, Cy3)	1:350	1
	21★	<sup>i</sup> Huhn-IgY	Esel (IgG pk, Cy2)	1:400	1
	22★	<sup>i</sup> Maus	Esel (IgG pk, Cy5)	1:200	2/11
	23	<sup>i</sup> Maus	Esel (IgM pk, Cy5)	1:200	9
	24	<sup>i</sup> Maus	Esel (IgG pk, Cy3)	1:300	2
	25★	<sup>i</sup> Maus	Esel (IgG pk, Cy2)	1:250	11
	26	<sup>i</sup> Maus	Esel (IgM pk, Cy2)	1:300	9
	27★	<sup>i</sup> Biotin	<i>Streptomyces avidinii</i> (Streptavidin, Cy3)	1:250	8
	28	<sup>i</sup> Kaninchen	Esel (Biotin-SP, + E)	1:1000	12/13
	E	<sup>d</sup> Biotin	Huhn (ExtrAvidin, Peroxidase-konj.)	1:1000	28

Tab. 2.5: Für die (immun)histochemische Darstellung & Quantifizierung am *iCys*(★) verwendeten Ak/Zellmarker. + kombiniert mit. Klonogenität: mk monoklonal, pk polyklonal. <sup>ZK</sup>Zellkulturüberstand (Ak preinkubiert auf Zellkultur). <sup>1</sup>SL 100µmol. AA Aminosäure. GST Glutathione-S-Transferase.

<sup>a</sup>biomol, <sup>b</sup>SantaCruz, <sup>c</sup>adi, <sup>d</sup>Sigma, <sup>e</sup>Chemicon, <sup>f</sup>abcam, <sup>g</sup>Dako, <sup>h</sup>invitrogen, <sup>i</sup>JacksonImmunoRes.

## 2.5 Laser Scanning Zytometrie

### 2.5.1 Gerät und technisches Prinzip

Die LSZ-basierte Quantifizierung der Eisenproteine wurde am *iCys* Research Imaging Cytometer (CompuCyte Corporation, Cambridge, USA) des Herzzentrums Leipzig (Klinik für Kinderkardiologie, Prof. Dr. A. Tárnok) durchgeführt. Das *iCys* besitzt ein aufrechtes Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX-71) mit motorisiertem Objektstisch in x-y-Richtung. Zur Anregung stehen am *iCys* drei Laser zur Verfügung, für die Anregung der verwendeten Fluorochrome wurden zwei verwendet. Der Argon-Ionen-Laser (488 nm) diente zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe Cy2/green-Fluoro-Nissl und Cy3, der Helium-Neon-Laser (633 nm) zur Anregung von Cy5. Über Spiegel und Linsen gelenkt, scannen die Laserstrahlen alternierend in Längsstreifen über das zu analysierende Objekt. Mit dem kollimierten Laserstrahl können Informationen der gesamten Schnittdicke detektiert werden [HAR07]. Das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht gelangt in rückwärtiger Richtung zu Filtern, die das Spektrum in die entsprechenden Wellenlängenbereiche (Kanäle) trennen und eine Unterscheidung der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen. Die Analyse von Cy2/green-Fluoro-Nissl erfolgt mit dem dichroischen Bandpassfilter 530/30 (grün), die Analyse von Cy3 mit dem dichroischen Bandpassfilter 580/30 (orange) und von Cy5 mit dem Langpassfilter 650/LP (long red). Die den Filtern nachgeschalteten Photomultiplier (PMT) generieren ein elektrisches Signal, das in Echtzeit in ein digitales Pixel-Bild (14 bit, Fluoreszenz<sub>Max</sub>: 16384 Einheiten) umgewandelt wird und analysiert werden kann.

### 2.5.2 Fluoreszenz: Auswahl und Kompensation

Die LSZ wurde zur Quantifizierung der intrazellulären Eisenproteine von PN-positiven und PN-negativen Neuronen verwendet. Dafür wurden Gefrierschnitte in einer Dreifachmarkierung (siehe 2.4) für jeweils ein Eisenprotein, einen Zellmarker und dem PN-Marker (Marker siehe Tab. 2.5) gefärbt (Abb. 2.10 und Abb. 2.11). Als Schnittdicke wurden 30  $\mu\text{m}$  gewählt, um wenig angeschnittene als auch überlagerte Zellen zu erhalten.

Die Kombination der Fluoreszenzfarbstoffe musste für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität so erfolgen, daß ein Spillover-Signal in den zu quantifizierenden Kanal und somit ein falsch-positives Ergebnis ausgeschlossen werden konnte. Dazu wurden die Anregungsspektren der Laser, die Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe und die Filterspektren so gewählt, daß alles Berücksichtigung fand (dargestellt in Abb. 2.10). Bei den Einzelfluoreszenzmessungen der multiparametrischen Analyse zeigte sich ein Spillover vom Cy2-Kanal in den Orange-Kanal. Durch eine Kompensation können Fluoreszenzintensitäten für eine korrekte Interpretation der Daten bereinigt werden [ROE01, PAR06]. Daher wurde das Spillover-Signal des Grün-Kanals (Cy2/Nissl) quantifiziert und vom Orange-Kanal (Cy3) abgezogen. Das Signal des virtuell angelegten Kanals Cy3mod wurde somit vom störenden grünen (Cy2) Spillover-Signal bereinigt, so daß das reine Cy3-Signal analysiert werden konnte. Dennoch erfolgte im Cy3mod-Kanal nicht die Quantifizierung, sondern bewusst die Darstellung WFA-Cy3-markierter PNs (zusätzlich siehe 2.11 B), da neben der Spillover-Kompensation

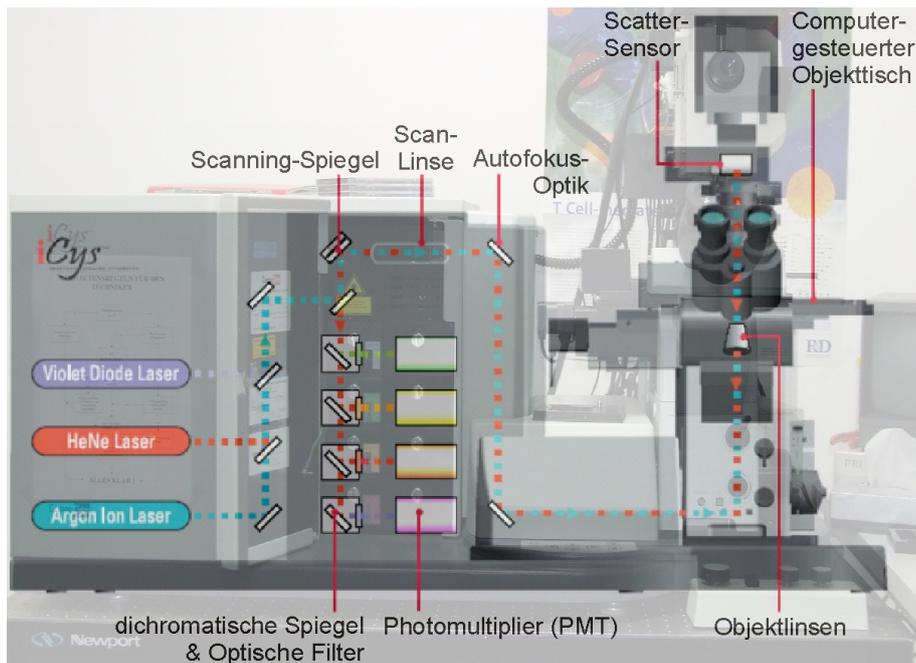


Abb. 2.9: Laser Scanning Zytometrie am *iCys* Research Imaging Cytometer (CompuCyte, USA). Das Laserlicht von zwei der drei Laser (blau: Argon-Ionen-Laser, rot: Helium-Neon-Laser) wird über Spiegel und Linsen auf die auf dem Objektisch aufgebrachte Probe geleitet. Das emittierte Licht der angeregten Fluorochrome wird über den gleiche Weg zurückgeleitet und durch drei (grün, orange, long red) der vier aufeinander folgenden Filter in die jeweiligen Wellenlängenbereiche aufgetrennt. Die Fluoreszenzsignale werden mittels der nachfolgenden Photomultiplier detektiert. (Schema modifiziert nach <http://www.compuCyte.com/icys.htm>)

der Cy3-Farbstoff ebenfalls nicht optimal mit dem Argon-Laser angeregt werden konnte, was allerdings bei der Intensität des Netz-Signals keine Rolle spielte.

Ein Spillover vom Cy3mod- in den Cy5-Kanal konnte nachweislich ausgeschlossen werden. Daher erfolgte die Quantifizierung der Eisenproteine (TfR, Ferritin H, Ferritin L, MTP1, DMT1) im Cy5-Kanal, da Cy5 separat und optimal mit dem Helium-Neon-Laser angeregt werden kann. Das einzige mit Cy2 quantifizierte Eisenprotein war Tf, da zu diesem Zeitpunkt noch kein guter Cy5-anti-Huhn-Antikörper zur Verfügung stand. Ein Spillover vom Orange- in den Cy2-Kanal kann ausgeschlossen werden, da die Cy3-Emissionswellenlänge nicht in den Bereich des Grünbandfilters reicht. Grundsätzlich erfolgte die Zellerkennung (Abb. 2.11) über eine Markierung mit Cy2/green-Fluoro-Nissl (Cy5 bei Tf). Die verwendeten SuperFrostPlus-Objektträger zeigen, wie unbeschichtete Objektträger auch, keine Streuung des Fluoreszenzsignals [MOS07].

### 2.5.3 Triggern und Analyse

Das *iCys* gehört nicht nur durch seinen zusätzlichen dritten Laser, sondern insbesondere durch seine vielfältige Analysesoftware *iCys Cytometric Analysis Software 3.2.5* zur neuesten LSZ-Generation. Was die Software als ein relevantes Ereignis (Zelle) erkennen soll, wird bereits während der Messung durch ein Triggersignal (Triggern=Erkennen) festgelegt. Für die LSZ-basierte Zellerkennung wird als Triggersignal üblicherweise ein

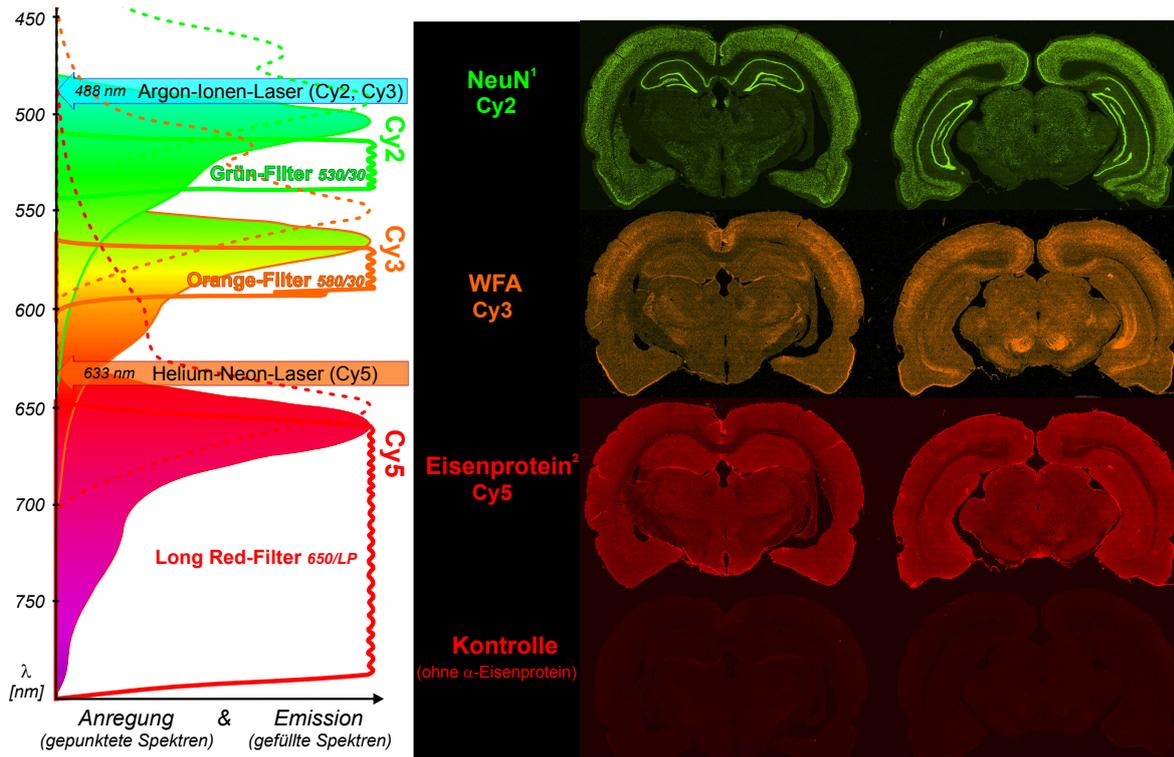


Abb. 2.10: Dreifachmarkierung der Hirnschnitte für die Objektträger-basierte Laser Scanning Zytometrie. Die Anregung erfolgte mittels zweier Laser. NeuN-Cy2 (<sup>1</sup> green-Fluoro-Nissl beim TfR) war Triggersignal zur Software-unterstützten Zellerkennung. PN-tragende Zellen (WFA) wurden anhand ihrer Cy3-Signalintensität ermittelt. Beide Emissionssignale wurden durch Anregung des Argon-Ionen-Lasers erzeugt und hintereinander mit unterschiedlichen Filtern (Cy2: Grün, Cy3: Orange) aufgenommen. Die Quantifizierung der Cy5-markierten Eisenproteine erfolgte mittels der Anregung durch den Helium-Neon-Laser im Infrarot-Spektrum (Cy5: Long Red). (<sup>2</sup> Ausnahme: Transferrin wurde mit Cy2- und NeuN parallel mit Cy5-Sekundärantikörpern markiert). Die spezifische Auswahl der Anregungsspektren, Filter und Emissionsspektren ermöglicht die Quantifizierung aller Eisenproteine unbeeinflusst von Spillover-Signalen anderer Kanäle.

DNA-bindender Zellkernfarbstoff wie DAPI, PI (Propidiumiodid) oder Hoechst verwendet [TÁR02, GER04, PRU05, BUT05A, MOS06, HAR07, HOL07]. Da allerdings die gesamte intrazelluläre Eisenproteinexpression bestimmt werden sollte, war ein DNA-Farbstoff als Triggersignal auszuschließen, zumal DNA-Farbstoffe neuronale und gliale DNA unspezifisch färben. Es musste daher ein Marker verwendet werden, der spezifisch Neurone und, damit vom *iCys* als Zelle erkannt, nur das Soma, nicht aber die Dendriten und Axone färbt. Alle Voraussetzungen für eine zuverlässige Zellerkennung wurden, neben anderen getesteten Neuronenmarkern wie SMI311 (Sternberger Monoclonals Inc., USA), am besten vom neuronalen Kernprotein NeuN (siehe Tab. 2.5) erfüllt. Es wurde daher NeuN als Parameter für die Zellerkennung bei den Analysen verwendet. Bei der Quantifizierung des TfR konnte NeuN nicht verwendet werden, da eine kombinierte Markierung mit dem ebenfalls monoklonalen  $\alpha$ -CD71-Antikörper (Tab. 2.5) nicht möglich war. Hier wurde anstelle NeuN Nissl-Substanz/RNA-markierendes, grünes Fluoro-Nissl [SCH82, QUI95] verwendet. Es färbt das Soma von Neuronen und Gliazellen. Die Gliazellen ließen sich aber vom Datensatz weitestgehend ausschließen,

indem für die in die Auswertung eingehenden Ereignisse eine Minimalgröße von  $40 \times 0,5$  Pixel ( $10 \mu\text{m}$ ) festgesetzt wurde. Gliazellen konnten zusätzlich über deren stärkere Intensität der Pixel (MaxPixel) aussortiert werden.

Als generelle Einstellung wurde zur besseren Segmentierung dicht gepackter Zellen und damit Verhinderung von Dubletten die beim *iCys* neuartige „Watershed“-Funktion zugeschaltet. Ein Ereignis wird dennoch nur als solches von der Software erkannt und mit einer Triggerkontur (Abb. 2.11) versehen, wenn sich dessen Signal ausreichend vom Hintergrundsignal abhebt. Dieser zu erreichende Schwellwert (Threshold) wird manuell festgelegt. Außerhalb der Triggerkontur wurde mit einem Abstand von zwei Pixeln die eigentliche Analysekontur (Abb. 2.11) festgelegt. In dieser befand sich neben dem gesamten Soma der Zelle auch ein ausreichender Anteil des extrazellulären PN, dessen Cy3-Signal für die Selektivierung der PN-positiven Neurone diente (ein selektiver intrazellulärer Marker für PN-tragende Zellen ist nicht verfügbar). Innerhalb der Analysekontur wurden für jedes Objekt und für jeden Kanal folgende für die weitere Auswertung relevanten Informationen erfasst:

Integral (Summe der Fluoreszenzintensitäten aller Pixel)

Area (Fläche der Kontur)

MaxPixel (Fluoreszenzintensität des hellsten Pixels)

X- und Y-Position (des Fluoreszenzereignisses auf dem Objektträger)

Anzahl der getriggerten Ereignisse

Um lokale Inhomogenitäten der Gewebeschnittfärbung zu kompensieren, wurden um die Analysekontur herum in acht Pixeln Abstand zwei weitere Konturen (2 Pixel voneinander entfernt) eine Hintergrundkontur (Abb. 2.11) festgelegt. Innerhalb dieser wurde die Fluoreszenzintensität des Hintergrunds bestimmt und mit dem Fluoreszenzwert innerhalb der Analysekontur verrechnet [DAR99]. Für den Cy3mod-Kanal wurde die Hintergrundkorrektur nicht verrechnet, da darin das PN teilweise noch enthalten sein kann und durch eine Korrektur dessen Information verloren gehen würde. Zusätzlich wurden zur Sicherung der spezifischen Immunreaktion und Anregung der Fluorochrome Kontrollmessungen der jeweiligen Gebiete im Folgeschnitt (ohne primäre  $\alpha$ -Eisenproteine-Inkubation) durchgeführt, dessen Werte mit denen der eigentlichen Messung verrechnet wurden (Formel 3.1 und 3.2 auf S.78).

Von dem auf dem Objektträger aufgebrauchten Hirnschnitt wurde zunächst ein Übersichtsscan (Pixelgröße  $20 \times 20 \mu\text{m}$ ) unter Verwendung des  $20\times$ -Objektives erstellt. Der Übersichtsscan dient zur manuellen Festsetzung der zu messenden Hirnregion. Vor dem eigentlichen Scan der ausgewählten Schnittregion wurden in einem Testscan separat alle Parameter optimal eingestellt, da diese in den verschiedenen Schnitten und Proteinfärbungen von Region zu Region variieren. Dies beinhaltete die Kontrolle des Autofokus, die Festsetzung des Thresholds und die angepasste Verstärkung des PMT-Signals (Spannung [%] und Offset [V] pro Kanal). Die Regionen in den Kontrollschnitten der jeweiligen Ratte wurden mit identischen Parametern gemessen.

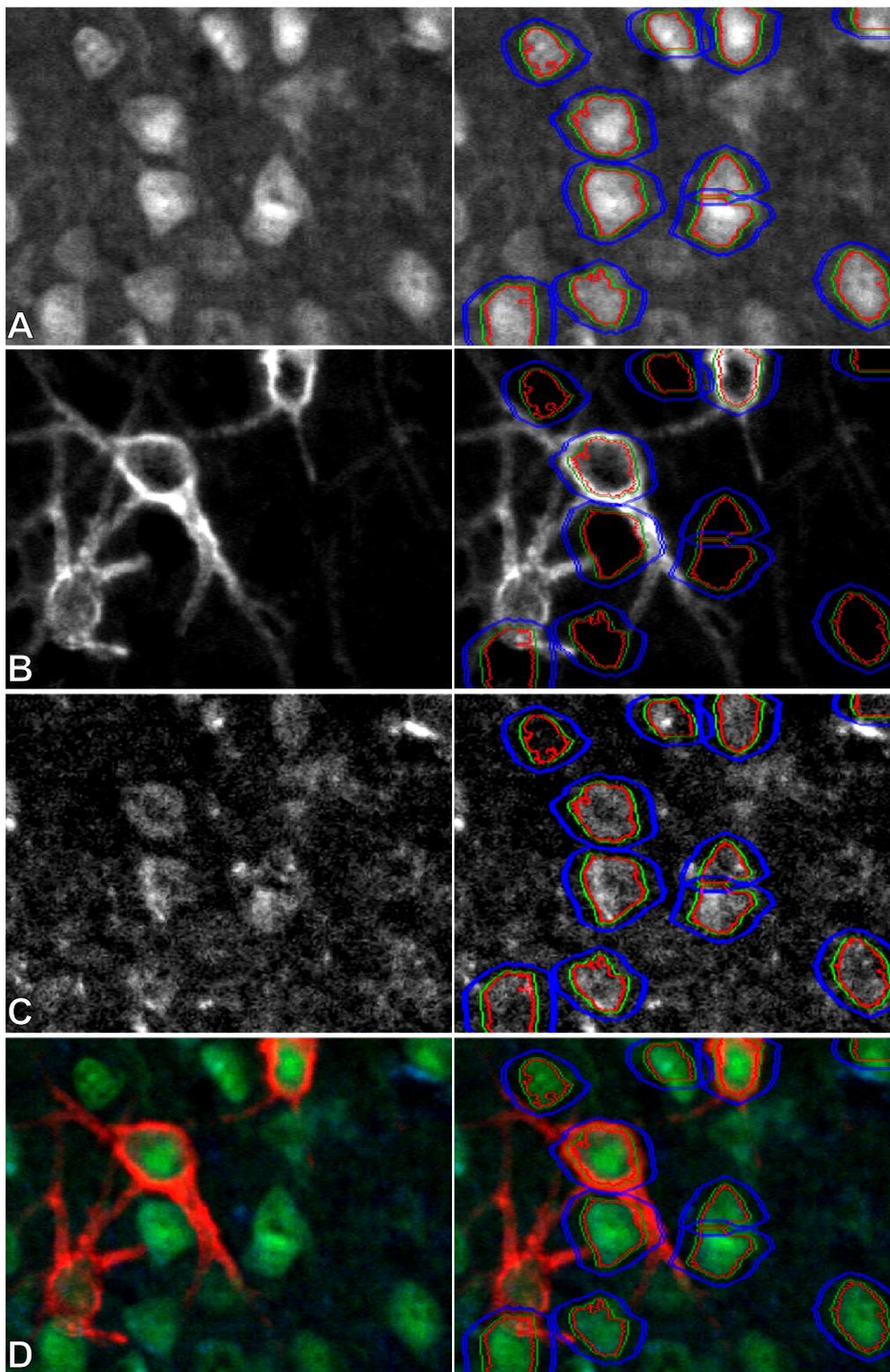


Abb. 2.11: Zellerkennung mittels *iCys* gezeigt an PMT-generierten Bilder. Als Triggersignal dient der Zellmarker NeuN (TfR: green-Fluoro-Nissl), dargestellt im Cy2(Tf: Cy5)-Kanal (A). Die erkannte Zelle wird von einer **Triggerkontur** umgeben. Dieser wird im Abstand von zwei Pixeln die eigentliche **Analysekontur** aufgelegt. Die zwei Pixel breite **Hintergrundkontur** befindet sich acht Pixel außerhalb der Zelle. WFA-markierte PNs werden im Cy3mod-Kanal visualisiert (B) und Eisenproteine über den Cy5(Tf: Cy2)-Kanal quantifiziert (C). Alle Kanäle können überlagert werden (D). Objektiv: 40 $\times$ .

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Ionenstrahlmikroskopie: Zellulärer Eisengehalt

#### 3.1.1 Markierung der PNs

Um die PN-positiven Neurone per Ionenstrahlmikroskopie (PIXE) identifizieren zu können, ist eine Markierung der PNs notwendig, die anschließend mit Ni-DAB verstärkt und so für die PIXE-Analyse sensitiv gemacht wird (siehe 2.1.4). Es wurden verschiedene PN-Marker getestet (WFA, Cat-315,  $\alpha$ -Aggrecan). In der Abb. 3.1 sind die lektin-/immunhistochemischen Färbungen gegenübergestellt.

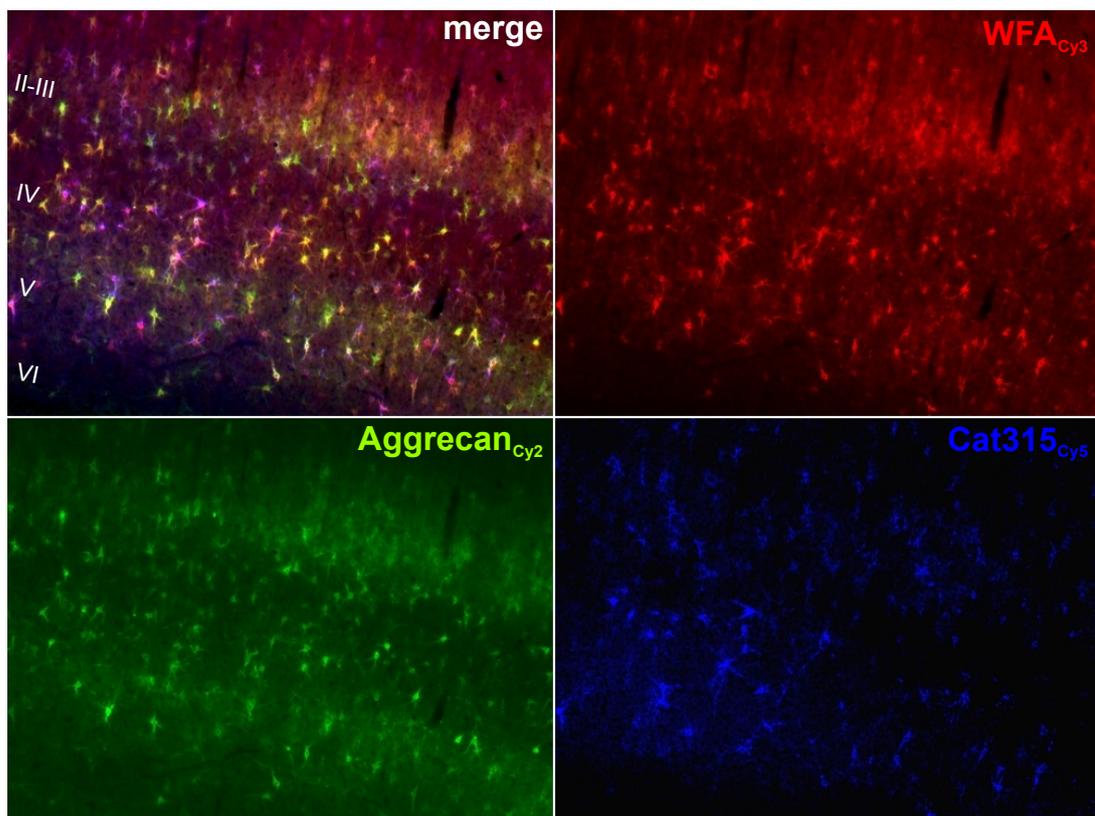


Abb. 3.1: Eine immun-/lektin histochemische Markierung mit verschiedenen PN-Markern zeigt die chemische Heterogenität der PNs. WFA stellt eine große Anzahl PN-tragender Zellen dar (merge: WFA+Aggrecan=gelb, WFA+Cat-315=violett). PK, Vergrößerung: 100 $\times$ .

Für die molekular/chemisch heterogenen PNs (siehe 1.1.1 S.17 und 1.3 S.31) bestätigte sich WFA als etablierter Marker [HÄR92, AJM08] und erzielte eine große Ausbeute an markierten PNs. WFA-bindende PNs binden höchstwahrscheinlich auch Eisen [MOR08A]. Zusätzlich lässt WFA als Lektin in Hinblick auf die immunhistochemische Dreifachmarkierung (siehe 2.4 S.49 & 3.4 S.71) mehr Möglichkeiten bei der Antikörperkombination zu.

### 3.1.2 Ortsaufgelöste Elementdarstellung von PN-positiven und PN-negativen Neuronen

Die Ionenstrahlmikroskopisch generierten Element-Maps stellen quantitativ die ortsaufgelöste Verteilung der verschiedenen Elemente dar (Abb. 3.2). Unter Abgleich der Lichtmikroskopischen Bilder sind durch den hohen intrazellulären Phosphorgehalt die Soma der Zellen gut erkennbar, so daß die Auswahl der zu analysierenden Regionen (ROI, regions of interest, siehe Abb. 2.5) im P-Map erfolgt (Abb. 3.2 P). Kleine Zellen mit einem hohen Phosphorgehalt (nicht zu verwechseln mit den intrazellulären P-reichen Nukleoli) sind höchstwahrscheinlich Gliazellen, können aber nur durch eine spezifische Färbung charakterisiert und analysiert werden (siehe 3.1.7). Die PN-tragenden Zellen werden anhand ihrer WFA-DAB-Ni-markierten PNs identifiziert (Abb. 3.2 Ni), die sich durch ihre konzentrierten Chondroitinsulfat-Komponenten leicht auch im Schwefel-Map von der ubiquitären extrazellulären Matrix abheben (Abb. 3.2 S). Die geringe Konzentration von Eisen erschwert dessen visualisierte Verteilung im Fe-Map (Abb. 3.2 Fe). Für eine kombinierte Darstellung von drei Elementen (P, Ni, Fe) werden deren Einzel-Maps zu einem 3-Element-Map in Falschfarbendarstellung überlagert.

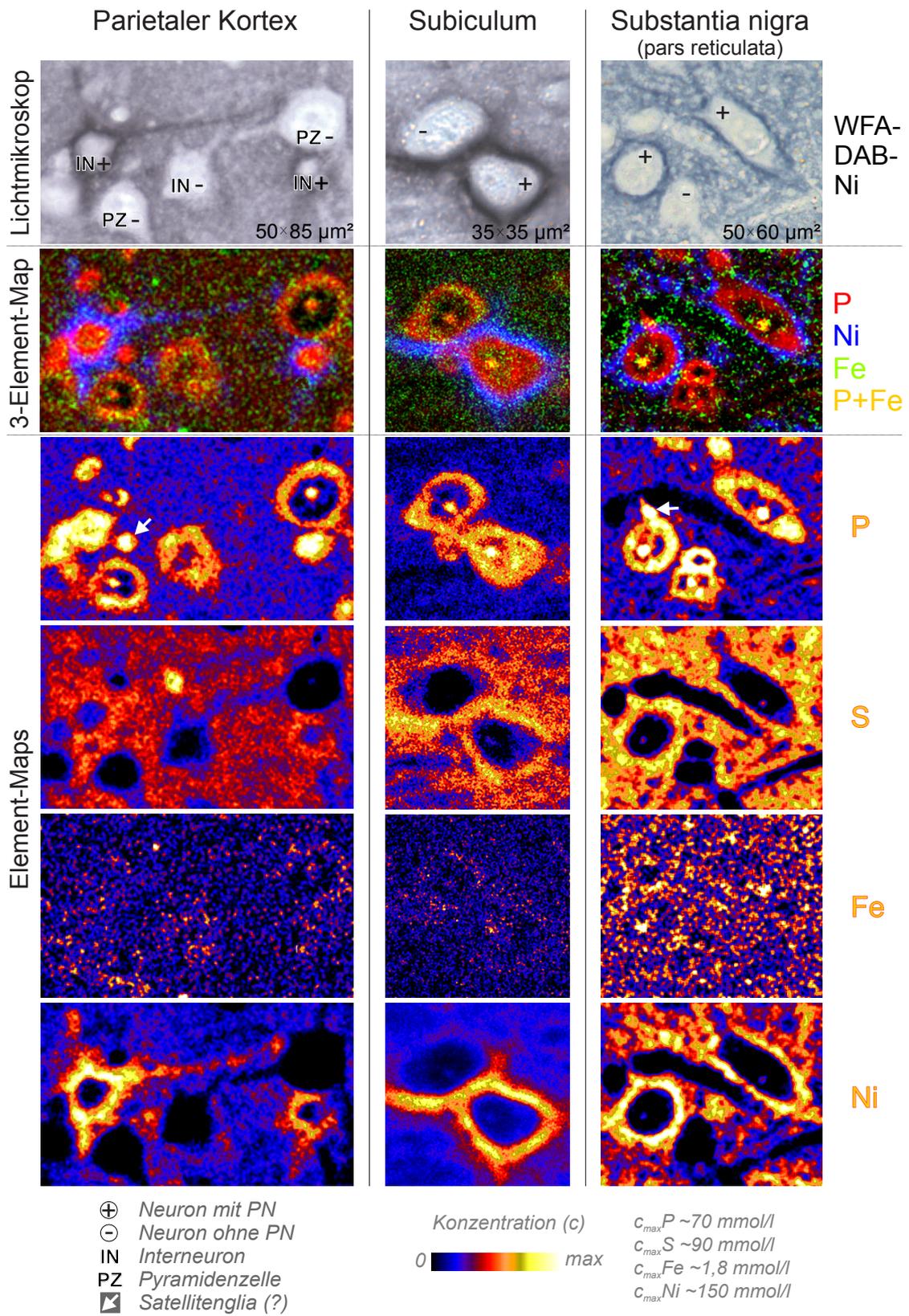


Abb. 3.2: Ortsaufgelöste Darstellung der Elemente in Element-PIXE-Maps (Falschfarbendarstellung). Beispiel-Scans der analysierten Regionen PK, SN und SUB.

### 3.1.3 Eisenkonzentration PN-positiver und PN-negativer Neurone

Anhand der ortsaufgelösten Element-Maps (Abb. 3.1.2) wurde das intrazelluläre Eisen einzelner PN-positiver und PN-negativer Neurone im parietalen Kortex (PK), Subiculum (SUB) und der Substantia nigra (SN) quantifiziert (teilweise in [FIE07] veröffentlicht). Die Ergebnisse sind in der Graphik 3.3 zusammengefasst. Die Anzahl der jeweils analysierten Neurone ist als n angegeben.

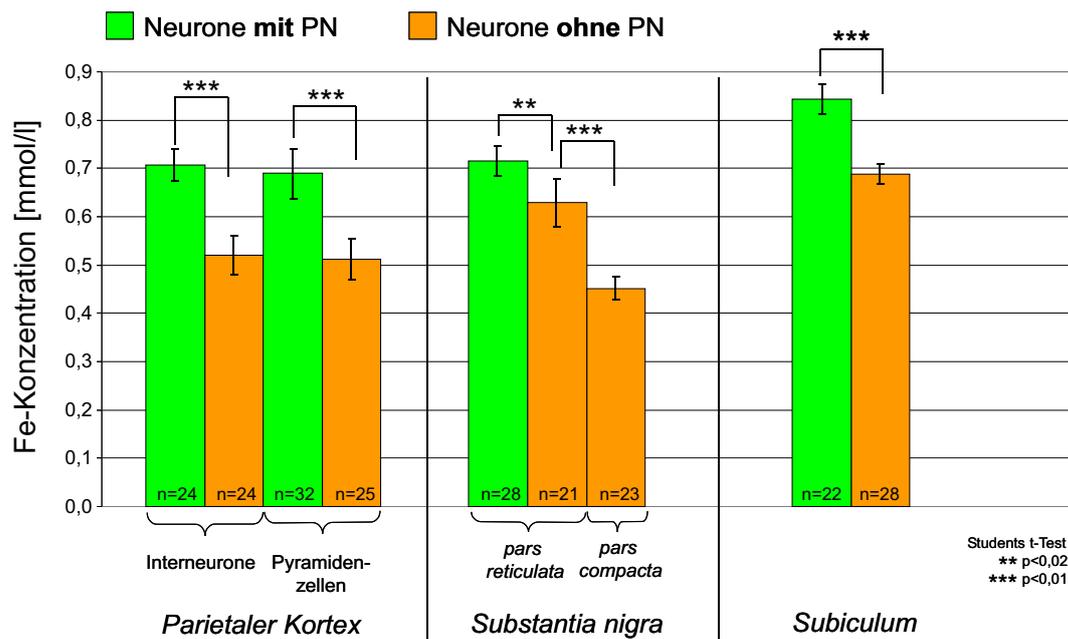


Abb. 3.3: Intrazelluläre Eisenkonzentration PN-positiver und PN-negativer Neurone im PK (Interneurone, Pyramidenzellen), der SN (pr, pc) und dem SUB. n=Zellanzahl. Fehlerbalken=SE.

Die Eisenkonzentration des umgebenden Neuropils war zwischen den untersuchten Regionen ähnlich und betrug durchschnittlich 0,45 mmol/l.

Im PK wurde morphologisch zwischen Interneuronen (Schicht II/III-VI) und Pyramidenzellen (Schicht II/III und V) differenziert [BRÜ94B]. Interneurone sind von einem ausgeprägten, scharf konturierten PN umgeben, Pyramidenzellen dagegen von einem dünnen, schwachen PN [WEG03]. Dennoch unterscheiden sich beide Neuronentypen nicht in ihrem Eisengehalt: Interneurone als auch Pyramidenzellen zeigen in den PN-positiven Neuronen eine ~30% höhere Eisenkonzentration gegenüber PN-negativen Neuronen (~ 0,7 mmol/l vs. ~ 0,5 mmol/l;  $p < 0,01$ ).

In der SN wurde zwischen der pars reticulata (pr) und der pars compacta (pc) differenziert. Die SNpc enthält hauptsächlich dopaminerge und damit keine PN-tragenden Neurone [ADA01, HOB98, BRA93, BRÜ04, BRÜ08]. Die PN-positiven Neurone in der SNpr wurden mit PN-negativen Neuronen der SNpr und der SNpc verglichen. In der SNpr haben die PN-positiven Neurone 12% mehr intrazelluläres Eisen als die PN-negativen Neurone (0,71 mmol/l vs. 0,63 mmol/l;  $p < 0,02$ ). Gegenüber den Neuronen in der SNpc (0,45 mmol/l) ist der Eisengehalt sogar um 37% höher ( $p < 0,01$ ). Die ge-

ringe Eisenkonzentration der Neurone der SNpc entspricht als einzige Ausnahme der geringen Konzentration des Neuropils (0,45 mmol/l).

Im SUB ist die Eisenkonzentration der PN-tragenden Neurone gegenüber den PN-negativen Neuronen um 18% erhöht (0,84 mmol/l vs. 0,69 mmol/l;  $p < 0,01$ ). Der Eisengrundgehalt ist im SUB um  $\sim 20\%$  höher als im PK und in der SN.

Die durchschnittliche Eisenkonzentration (PK, SN, SUB) der PN-negativen Neurone beträgt 0,56 mmol/l, die der PN-positiven Neurone 0,75 mmol/l. Die Neurone, die von einem PN umgeben sind, besitzen somit  $\sim 32\%$  mehr Eisen, als Neurone ohne PN (hoch signifikant,  $p < 0,01$ ).

Es wurde ebenfalls das Eisen der PNs quantifiziert (ROI im Ni-Map). Die Konzentration glich dabei der intrazellulären Konzentration der jeweiligen PN-tragenden Zelle selbst. Das am PN gebundene Eisen ist somit um so viel erhöht, wie es das PN-tragende Neuron gegenüber eines PN-negativen Neurons ist. Ein exzessiv erhöhter Eisengehalt speziell am PN wird also nicht beobachtet, sondern die Eisenkonzentration verhält sich der intrazellulären Konzentration gegenüber eher unauffällig (siehe auch 3.4).

### 3.1.4 Zelluläre Eisenverteilung anhand eines Element-Map-Querschnitts

In einem Element-Map kann die ROI auch so gewählt werden, daß man eine Traverse durch das Map erhält. So kann die Konzentration mehrerer Elemente entlang des Querschnittsprofils angezeigt werden (Beispiel siehe Abb. 3.4). Das Zytoplasma des Neurons wird durch einen Anstieg des Phosphorgehalts (rot) charakterisiert, ist aber in diesem Querschnitt durch den großen, phosphorarmen Zellkern sehr schmal. Das Ni-markierte PN des Neurons ist anhand des starken Anstiegs der Nickelkonzentration (blau) und zusätzlich durch einen extrazellulären Anstieg der Schwefelkonzentration (oliv) sichtbar. Die Eisenkonzentration (grün) der Zelle und des PN (Ni, blau) ist nur leicht erhöht. Dies visualisiert (wie in 3.1.3 beschrieben), daß das PN nicht mehr gebundenes Eisen als die umgebene Zelle besitzt. Desweiteren kann damit ausgeschlossen werden, daß durch die spezifische WFA-DAB-Ni-Färbung des PNs Eisen eingetragen wird, da parallel zur Ni-Markierung keine Eisenerhöhung am PN nachgewiesen werden kann (auch von [MOR05B] belegt). Eine auffällig Erhöhung aller in Abb. 3.4 dargestellten Elemente ist im Nukleolus zu beobachten, der als dicht gepackte Struktur (P-reich) besondere Eigenschaften zu haben scheint (weiteres siehe 3.1.5).

### 3.1.5 Ortsaufgelöste Darstellung des Eisens in Zellkompartimenten

Anhand der Element-Maps wurde nicht nur die Eisenkonzentration gesamter Zellen, sondern auch von Zellkompartimenten bestimmt, um den Eisenanteil in den subzellulären Strukturen zu ermitteln. Es wurde dabei das Eisen im Zytoplasma, Karyoplasma und Nukleolus in kortikalen Neuronen quantifiziert. Die Ergebnisse sind repräsentativ in der schematischen Abbildung 3.5 dargestellt.

Die einzelnen Zellkompartimente weisen, wie bereits in 3.1.4 angesprochen, unterschiedliche Eisenkonzentrationen (Abb. 3.5 rot) auf. Wenn man die Eisenkonzentration

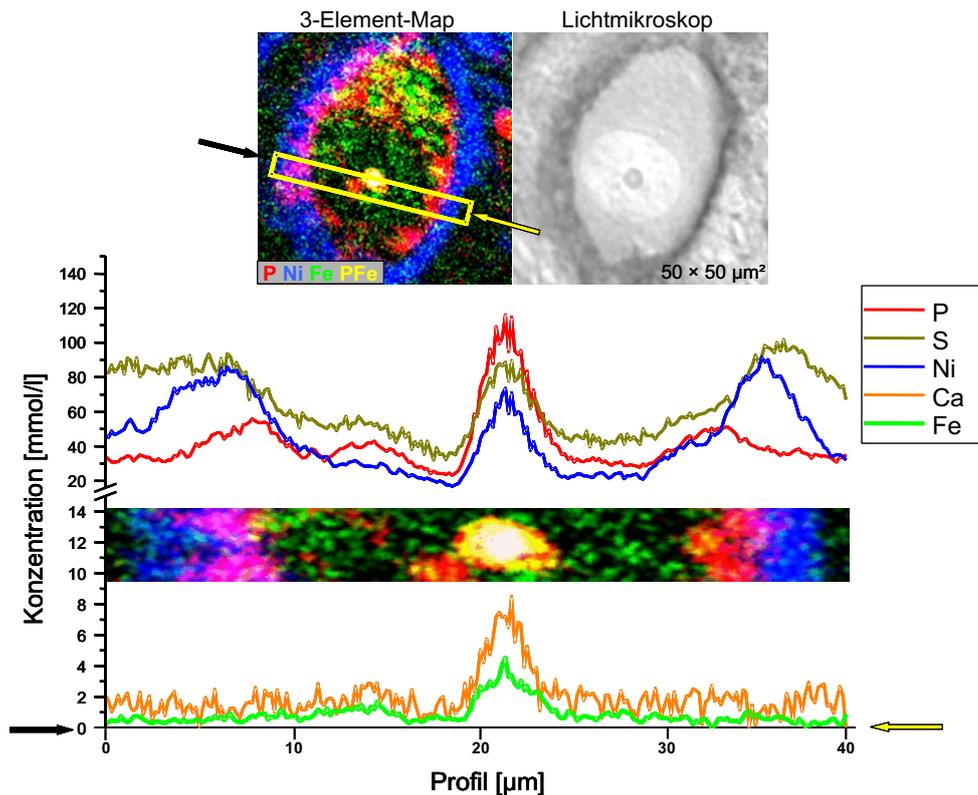


Abb. 3.4: Elementprofil eines PN-tragenden Neurons\* (WFA-DAB-Ni-gefärbt) durch den Zellkern. Die intrazelluläre Eisenkonzentration (grün) im Zytoplasma und am PN (Ni, blau) ist nur leicht erhöht. Es ist kein simultaner Eisenanstieg zur spezifischen Ni-Markierung des PN's vorhanden (=kein Eintrag von Eisen durch die WFA-DAB-Ni-Färbung). Der Nukleolus zeigt eine hohe Konzentration aller Elemente. \*Nucleus vestibularis superior Breg.-10,8 mm.

der gesamten Zelle als 100% definiert, ist dabei folgendes Verhältnis zu beobachten: Nukleolus (121%) > Zytoplasma (112%) > Karyoplasma (73%). Die Konzentration scheint äquivalent der optischen Dichte der Kompartimente zu sein (siehe Abb. 3.4). Diese ist größtenteils abhängig vom Gehalt der Proteine und Organellen, wobei der Nukleolus als Ort der rRNA-Synthese eine gesonderte Struktur darstellt.

Letztlich aber wird der Beitrag der jeweiligen Kompartimente zum Gesamteisen durch deren Volumenanteil an der Zelle bestimmt (Abb. 3.5 gelb). Somit beträgt der Eisenanteil des Zytoplasmas ~ 84%, der des Zellkerns 15% und der des Nukleolus aufgrund seines geringen Volumens nur ~ 1%.

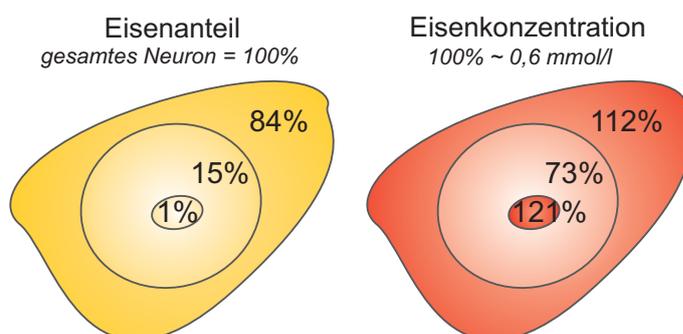


Abb. 3.5: Modellhafte Darstellung des Eisenanteils und der Eisenkonzentration in den Zellkompartimenten Zytoplasma, Karyoplasma und Nukleolus im kortikalen Neuron.

Die Eisenverteilung innerhalb der Kompartimente ist nicht immer homogen. Im Zytoplasma sind gelegentlich z.B. große, regionale Eisenansammlungen vorzufinden (Abb. 3.6). Des weiteren erscheint das Eisen in den Element-Maps generell als punktuelle Spots. Es ist demnach weniger fein, sondern eher granulär verteilt.

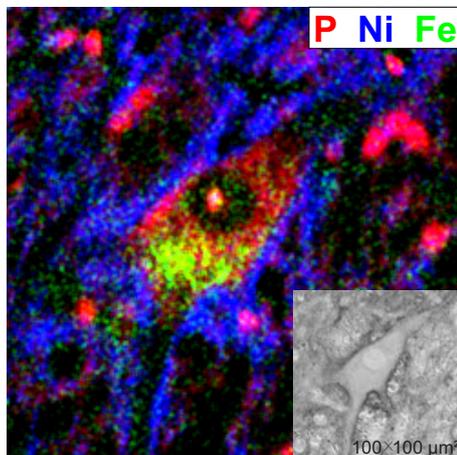


Abb. 3.6: Regional inhomogene Eisenansammlung im Zytoplasma eines Neurons\*, dargestellt im 3-Element-PIXE-Map (P, Ni, Fe). Scangröße:  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ . \**Nucleus vestibularis lateralis* Breg.-10,8 mm.

### 3.1.6 Elementgehalt subzellulärer Fraktionen

Eine andere Art der Auftrennung und Isolation der subzellulären Kompartimente wurde durch Dichtegradientenzentrifugation eines Gesamthirnhomogenats im Saccharosegradienten [BIG65] durchgeführt. Es konnte so eine Kernfraktion (Zellkerne, Myelinfragmente), Mitochondrienfraktion (Mitochondrien, Golgi, Lysosomen, Synaptosomen) und Mikrosomenfraktion (Ribosomen, endoplasmatisches Retikulum, Vesikel) gewonnen werden. Die Fraktionen wurden im Elektronenmikroskop auf die angereicherten Strukturen hin kontrolliert und im Ionenstrahlmikroskop analysiert.

Der Elementgehalt der Fraktionen ist als PIXE-Intensität im PIXE-Spektrum dargestellt (Abb. 3.7). Die spezifische Energie der Röntgenfluoreszenz  $E_X$  des Eisens (Fe) liegt bei 6,4 keV ( $K_\alpha$ ) bzw. 7,1 keV ( $K_\beta$ ).

Die Kernfraktion (blau) und die Mitochondrienfraktion (grün) besitzen eine ähnliche Eisenkonzentration (PIXE-Intensität  $\sim 100$ ). Die Mikrosomenfraktion enthält eine über siebenfach höhere Eisenkonzentration (PIXE-Intensität  $\sim 800$ ).

### 3.1.7 Eisenkonzentration von Oligodendrozyten und Astrozyten

Mittels histochemischer Färbemethoden wie der Berliner-Blau-Reaktion nach Perl [PER67] kann Eisen im Schnitt semiquantitativ dargestellt werden (Abb. 3.8). Dabei zeigen die Oligodendrozyten, neben den Tanyzyten als modifizierte Gliazellen am dritten Ventrikel, eine starke Reaktion. Neben kolorimetrischen Bestimmungen an Homogenaten beruhen auf diesen histologischen Beobachtungen bisweilen die meisten Aussagen über den Eisengehalt der Gliazellen. Demnach sollen die Oligodendrozyten der Säugtiere, höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit der Myelinbildung, einen sehr hohen Eisengehalt besitzen [HIL84, GER89, MOR92B, CON90, CON92, BEN93, CON95A,

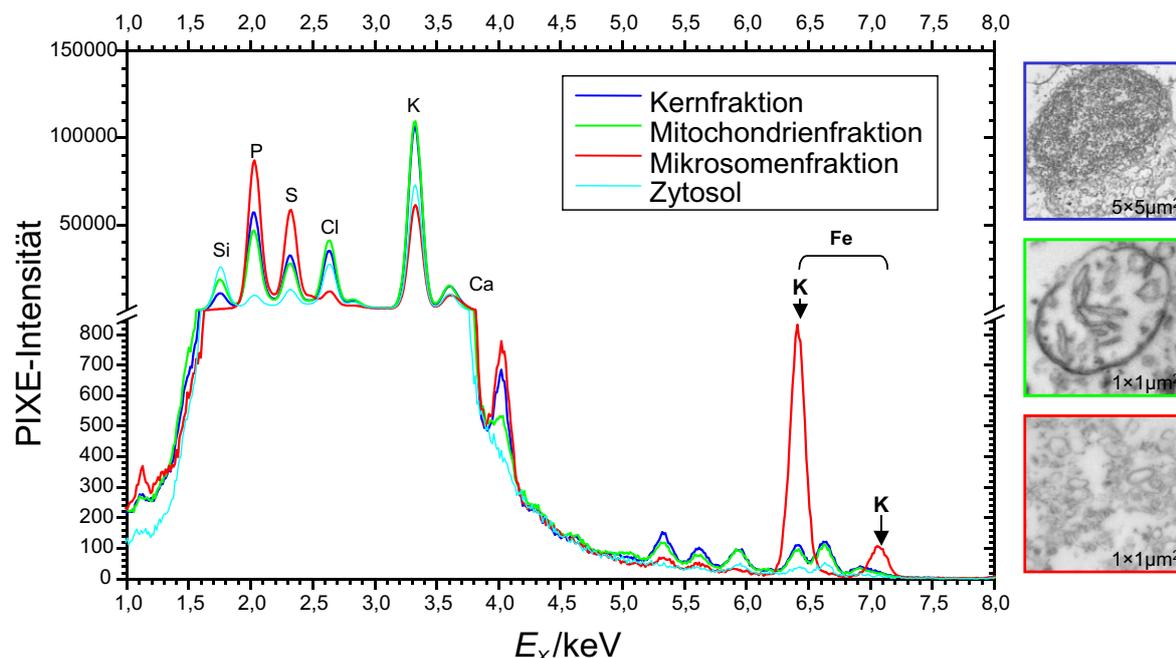


Abb. 3.7: Ionenstrahlanalytische Elementquantifizierung subzellulärer Fragmente, gewonnen durch Dichtegradientenzentrifugation eines Gesamthirnhomogenats. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die in der Fraktion angereicherten Zellbestandteile. Der Eisengehalt der **Mikrosomenfraktion** ist wesentlich höher als in der **Kern-**, **Mitochondrien-** und **Zytosolfraktion**.

CON95B, DIC95, ERB96, CON01, CON96, BUR99, CON01, MOO00, ZUC06]. Auch Astrozyten, denen eine Beteiligung an der Aufnahme von Eisen und dessen Verteilung im Gehirn zugesprochen wird, und Mikrogliazellen sind eisenhaltig [CON90, CON95B, BEN93, BUR99, HAN02, BEA03, HOE04, RIE04, MOO07, DRI07].

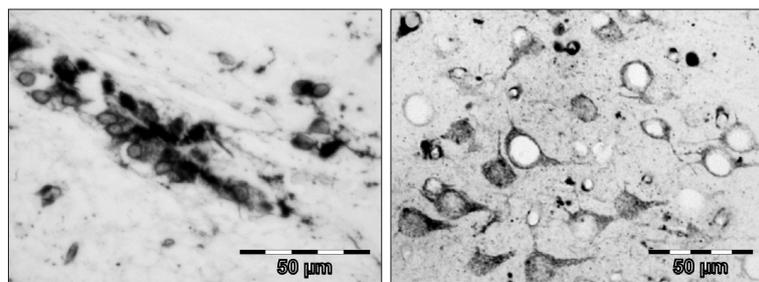


Abb. 3.8: Histochemische Färbung von  $Fe^{3+}$  in morphologisch charakterisierten Oligodendrozyten (li) und Neuronen (re) nach Perfusion mit Perl-Reagenz (Methodenprotokoll nach [ASA06]). Breg.-3,5.

Um die literarischen Angaben der oft zitierten, älteren Arbeiten mit der neuartigen PIXE-Methode zu prüfen und erstmals quantitative Angaben über den glialen Eisengehalt machen zu können, wurde die Ionenstrahlmikroskopie nicht nur an Neuronen (3.1.3), sondern auch an Gliazellen angewandt. Beispielhaft wurden dafür in jeweils separaten Schnitten Oligodendrozyten mit einem Ak gegen Oligodendrozyten-spezifisches Protein (OSP) [BR096] und Astrozyten mit einem Ak gegen saures fibrilläres Glioprotein (GFAP) markiert und die Färbung mit Ni-DAB verstärkt [MOR05B]. Da die Ionenstrahlanalyse von Gliazellen zusätzlich und nur an einer Auswahl von Zellen ( $n=16$ ) erfolgte, wurden kräftig markierte Oligodendrozyten und Astrozyten im retrosplenialen Kortex mikroskopiert (Abb. 3.9).

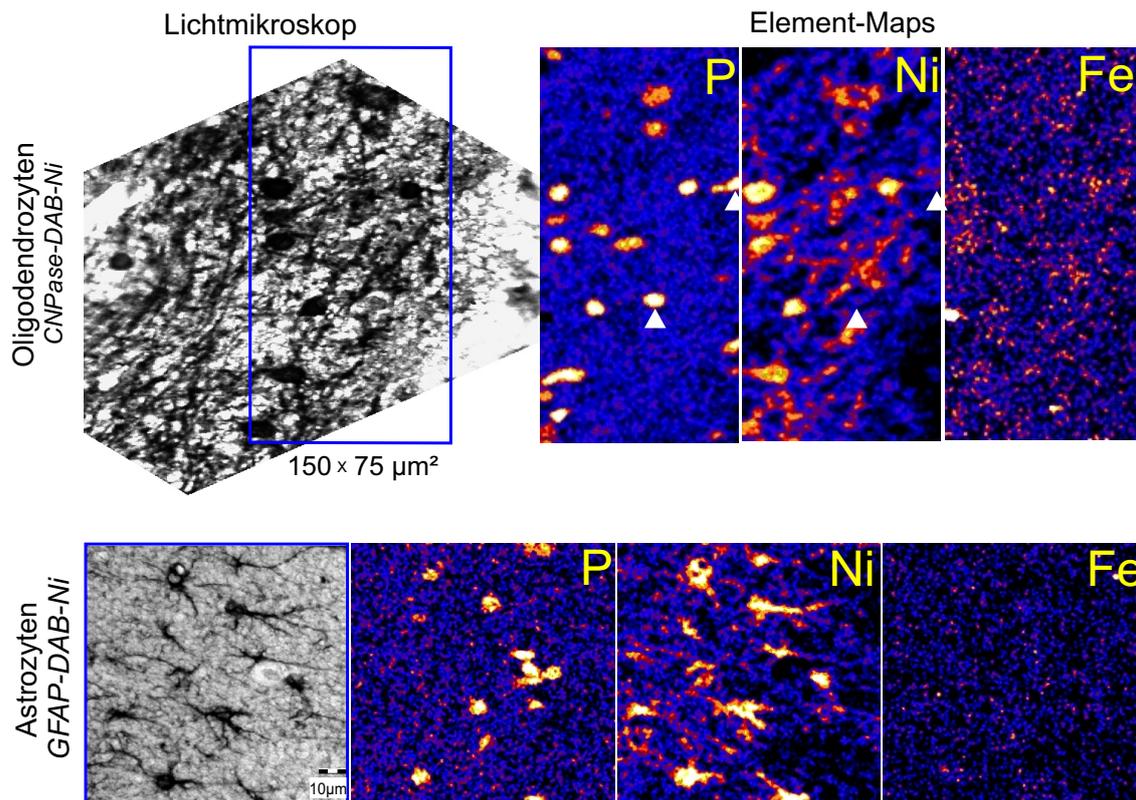


Abb. 3.9: P-, Ni-, und Fe-Map von Oligodendrozyten (OSP-Ni-markiert) und Astrozyten (GFAP-Ni-markiert) im retrosplenialen Kortex der Ratte. Pfeilspitze in den Maps der Oligodendrozyten: Somata anderer neuraler Zellen (P-reich, aber Ni-negativ).

In der Abbildung 3.10 ist die zum umgebenden Neuropil relativierte intrazelluläre Eisenkonzentration der Gliazellen als auch der PN-positiven und PN-negativen Neurone (gepoolt aus PK, SUB und SN von 3.1.3) zusammengefasst. Die intrazelluläre Eisenkonzentration der untersuchten Oligodendrozyten beträgt  $\sim 0,95$  mmol/l. Sie ist gegenüber PN-negativen Neuronen um 58% und gegenüber PN-positiven Neuronen um 28% signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ).

Die Eisenkonzentration der Astrozyten war mit  $\sim 0,7$  mmol/l der Konzentration der PN-positiven Neurone ( $\sim 0,75$  mmol/l) ähnlich, gegenüber den PN-negativen Neuronen aber um 25% erhöht ( $p < 0,05$ ). Bezüglich der Eisenkonzentration reihen sich somit die analysierten Astrozyten wie auch die PN-tragenden Neurone zwischen die PN-negativen Neurone und die Oligodendrozyten ein.

## 3.2 qRT-PCR: mRNA-Expression in PN-reichen Hirnregionen

### 3.2.1 qRT-PCR-Produkte

Die quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) ist eine etablierte, sensitive Methode [HEI96, KUB06] mit der die durch Reverse Transkription erhaltene cDNA spezifisch

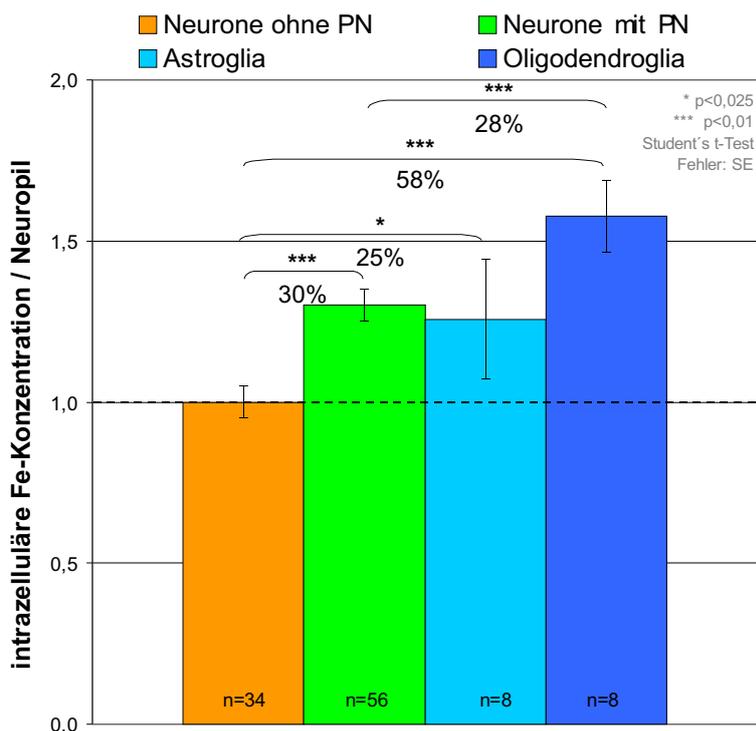


Abb. 3.10: Intrazelluläre Eisenkonzentration von OSP-positiven Oligodendrozyten und GFAP-positiven Astrozyten im retrosplenialen Kortex sowie PN-positiven und PN-negativen (gestrichelte Linie) Neuronen relativiert zum Neuropil. n=Zellanzahl.

amplifiziert und rückwirkend der mRNA-Gehalt ermittelt wurde. Die qRT-PCR wurde für folgende Eisenprotein-spezifische cDNAs durchgeführt:  $\beta$ -Actin, Aggrecan, Transferrin (Tf), Transferrin-Rezeptor (TfR), Ferritin H, DMT1, MTP1, DcytB. Der jeweilige mRNA-Gehalt in den PN-reichen Hirnregionen PK, SUB, NR, SN [SEE94, BRÜ94B] wurde mit dem in der PN-armen Hirnregion EK verglichen (3.2.2).

Mit allen verwendeten Primern wurde in jeder Region ein elektrophoretisch nachweisbares PCR-Produkt mit der erwarteten Größe (siehe Tabelle 2.1) erhalten (siehe Abb. 3.11). Der Gehalt der verschiedenen cDNAs war dabei quantitativ verschieden, was sich, die Effizienz berücksichtigend, in der bis zum Beginn der exponentiellen Phase benötigten PCR-Zyklenanzahl zeigte.

Die exponentielle Phase des ubiquitären Housekeeping-Gens  $\beta$ -Actin wurde im PCR-Lauf stets als erstes erreicht ( $<$  Zyklus 30), dies entspricht einer hohen DNA-Kopienzahl im Start-Template ( $>$  10.000 [QIAGEN HotStarTaq PCR Handbuch]). Dies spiegelt sich auch in den seriellen Verdünnungsreihen wieder, bei denen, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Sequenzen, selbst bei einer Verdünnung des Start-Templates von 1:3125 ein gut detektierbares Signal erlangt wurde (siehe Kapitel 2.2.2 Abb. 2.8 A, D). Die Ansätze von Aggrecan, Tf, TfR und Ferritin H erreichten vor dem 35. PCR-Zyklus ihre exponentielle Phase und bis zum Ende der PCR ihre Plateauphase ( $>$  10-100 DNA-Kopien im Start-Template,  $>$  360 pg genomische DNA [QIAGEN HotStarTaq PCR Handbuch]). Die Plateauphase der Ansätze von DMT1, MTP1 und DcytB hingegen wurden nicht kontinuierlich bis zum Ende der PCR erreicht. Es wurde daher von der Quantifizierung der cDNA von DMT1, MTP1 und DcytB ab-

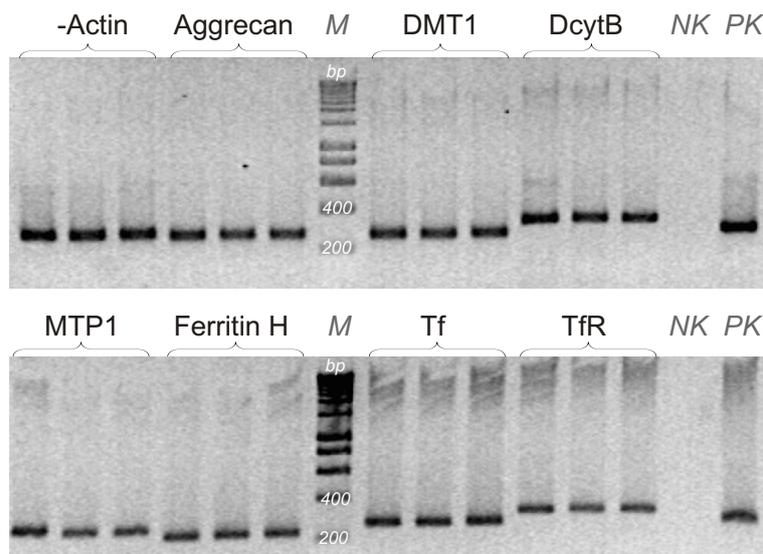


Abb. 3.11: Elektrophoretisch nachweisbare qRT-PCR-Produkte mit der richtigen Amplifikat-Größe [bp]. Dreifach-Ansatz eines Substantia nigra-Pools. M=bp-Marker. NK=Negativkontrolle (*Aqua<sub>dest.</sub>*). PK=Positivkontrolle (Gesamthirnhomogenat).

gesehen und sich auf die “Standard”-Eisenproteine Tf, TfR und Ferritin H sowie auf Aggrecan beschränkt (siehe 3.2.2).

### 3.2.2 Quantifizierung der Eisenprotein-spezifischen mRNA

Mittels der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wurde nach interner Normierung auf  $\beta$ -Actin das Verhältnis des mRNA-Gehalts der PN-reichen Hirnregionen PK, SUB, NR und SN zur PN-armen Kalibratorregion EK bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.12 zusammengefasst. Die gestrichelte Linie entspricht dem Level des EK (Verhältnis=1).

Abgesehen vom PK (grün), der als einzige Ausnahme keine Veränderung der PCR-Produkte gegenüber dem EK zeigte, wurde in den PN-reichen Hirnregionen eine generelle Erhöhung des mRNA-Gehalts festgestellt (oberhalb dem Verhältnis von 1 zum EK). Aggrecan als Komponente des PN war, gegenüber des PN-armen EK, im SUB (blau), dem NR (rot) und der SN (grau) signifikant erhöht (95% Konfidenzintervall=KI). Im NR, dem Gebiet mit den meisten PN-tragenden Neuronen, wurde ein nahezu dreifach höherer Aggrecan-mRNA-Gehalt nachgewiesen.

Der Eisenprotein-spezifische mRNA-Gehalt für Transferrin war am auffälligsten. Er war signifikant um das dreifache (SUB, SN) bis fast vierfache (NR) erhöht. Auch im PK deutete sich eine Erhöhung des TF-mRNA-Gehalts an.

Beim TfR-mRNA-Gehalt zeigte ebenfalls der NR eine signifikante (95% KI), die SN eine tendenzielle (90% KI), Erhöhung gegenüber dem EK um  $\sim 100\%$  (Verhältnis=2). Der mRNA-Gehalt an Ferritin H war im NR und der SN signifikant erhöht (um  $\sim 50\text{--}65\%$ ). Wie im PK wurde hier auch im SUB kein signifikanter Unterschied im Ferritin H-mRNA-Gehalt beobachtet.

Durchschnittlich (MW der Regionen, gelb) war der mRNA-Gehalt aller untersuchten Endpunkte (Aggrecan, Tf, TfR, Ferritin H) in den PN-reichen Hirnregionen signifikant

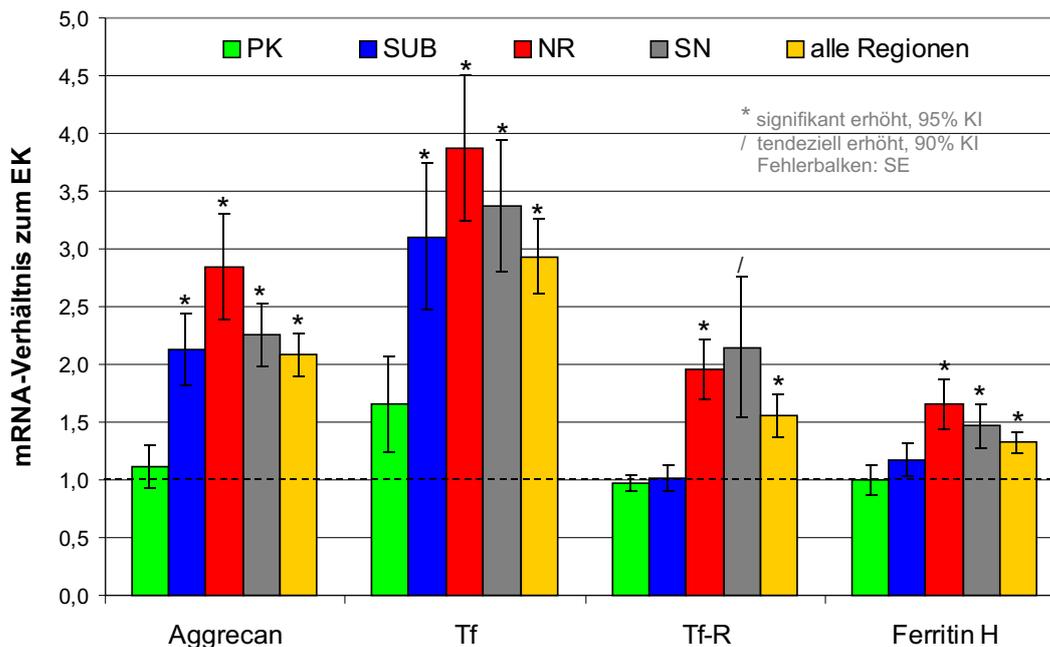


Abb. 3.12: Quantitative RT-PCR. Verhältnis des mRNA-Gehalts (normiert auf  $\beta$ -Actin) PN-reicher Hirnregionen vs. EK (Kalibratorregion). Verhältnis von 1 (gestrichelte Linie) entspricht dem EK-Level (keine Erhöhung).

höher (95% KI) als in der PN-armen Hirnregion. Der mRNA-Gehalt von Aggrecan ist somit durchschnittlich um 100% (Verhältnis=2), von Tf um 200% (Verhältnis=3), vom TfR um  $\sim$ 50% und vom Ferritin H um  $\sim$ 35% erhöht.

### 3.3 Western Blot: Protein-Expression in PN-reichen Hirnregionen

#### 3.3.1 Eisenprotein-Expression

Zum Vergleich des Eisenproteingehalts der PN-reichen Hirnregionen PK, SUB, NR und SN gegenüber des PN-armen EK wurden die Hirnhomogenate im SDS-PAGE/Western Blot aufbereitet. Die Blots wurden jeweils mit Antikörpern gegen Tf, TfR, Ferritin H, Ferritin L, DMT1, MTP1 und DcytB inkubiert. Nach kolorimetrischer Auswertung erfolgte am gleichen Blot die Quantifizierung des  $\beta$ -Actins (siehe 2.3.4).

Alle Antikörper markierten eine spezifische Proteinbande des erwarteten Molekulargewichts (siehe Bsp. in Abb. 3.13). Die Markierung von DcytB zeigte dabei allerdings ein sehr geringes Signal. Da ein anderer DcytB-Antikörper kommerziell noch nicht verfügbar ist, wurde von der quantitativen Auswertung des DcytB-Proteins abgesehen.

Alle anderen Eisenproteine wurden semiquantitativ durch die Relativierung auf  $\beta$ -Actin der selben Bande ausgewertet. Die Ergebnisse sind im Diagramm 3.14 dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen dabei den Datenbereich (min, max) an. Eine Erhöhung (+) wurde durch eine mindestens 15% höhere Proteinexpression als im EK definiert. Die EK-zugehörige Punktlinie verdeutlicht das Level der PN-armen Referenzregion.

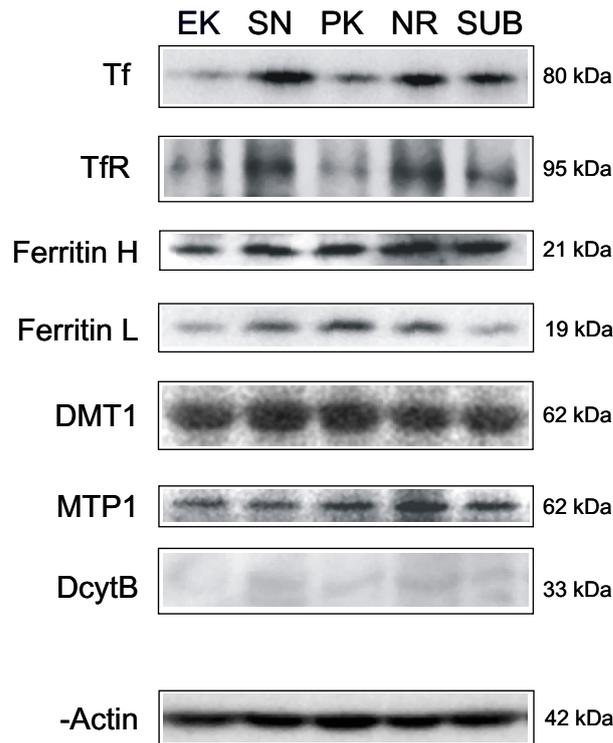


Abb. 3.13: Western Blot. Auswahl von den Expressionsbanden der untersuchten Eisenproteine sowie  $\beta$ -Actin in den verschiedenen Hirnregionen.

Generell zeigte die Immunreaktion von Tf und Ferritin L im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin den größten Proteingehalt (Tf/ $\beta$ -Actin  $\sim 1$ – $2,5$ , Ferritin L/ $\beta$ -Actin  $\sim 5$ – $10$  im Gegensatz zu TfR/Ferritin-H/DMT1 vs.  $\beta$ -Actin  $\sim 0,25$ – $0,75$ ).

Mit Ausnahme des DMT1 wurde für jedes Eisenprotein eine Erhöhung in den PN-reichen Hirnregionen gegenüber dem EK (dunkelblau) festgestellt. Der Gehalt an Tf war um  $\sim 30\%$  (SUB, blau) bis  $\sim 150\%$  (NR, rot) erhöht. Der TfR und das Ferritin H waren in allen PN-reichen Regionen etwa verdoppelt. Ferritin L war um ca.  $35\%$  (SUB) bis ca.  $125\%$  (NR) erhöht. MTP1 wurde im PK als leicht erhöht ( $\sim 17\%$ ) und im NR als ca. doppelt so hoch ermittelt. SUB und SN (grau) zeigten für MTP1 keine Veränderung.

Im Durchschnitt (MW der untersuchten Regionen, gelb) wurde für die Proteine Tf, TfR, Ferritin H, Ferritin L und MTP1, nicht aber für DMT1 eine um mindestens  $15\%$  höhere Expression in den PN-reichen Hirngebieten festgestellt. Die durchschnittliche Erhöhung gegenüber der PN-armen Referenzregion beträgt für MTP1  $\sim 25\%$ , für Ferritin L  $\sim 80\%$  und für Tf, TfR bzw. Ferritin H ca.  $100\%$ .

### 3.3.2 Regionale CSPG-Expression

Analog zu den Eisenproteinen wurde in den isolierten Hirnregionen zusätzlich die Expression der Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG) mittels Western Blot untersucht. Aufgrund der höheren Anzahl PN-tragender Neurone wurde in den Regionen PK, SUB, NR und SN ein höherer CSPG-Gehalt als im PN-armen EK erwartet. CSPG, spezifisch Aggrecan [MAT02], wurde mittels des Antikörpers MAB1581 (Cat-315) detektiert.

Lander et al. [LAN98] und Matthews et al. [MAT02] beschrieben für den verwendeten Antikörper eine erhöhte Effektivität nach Deglykosylierung der Proteine. Dieser Nachweis der Antikörper-Spezifität konnte durch den Verdau mit Chondroitinase ABC

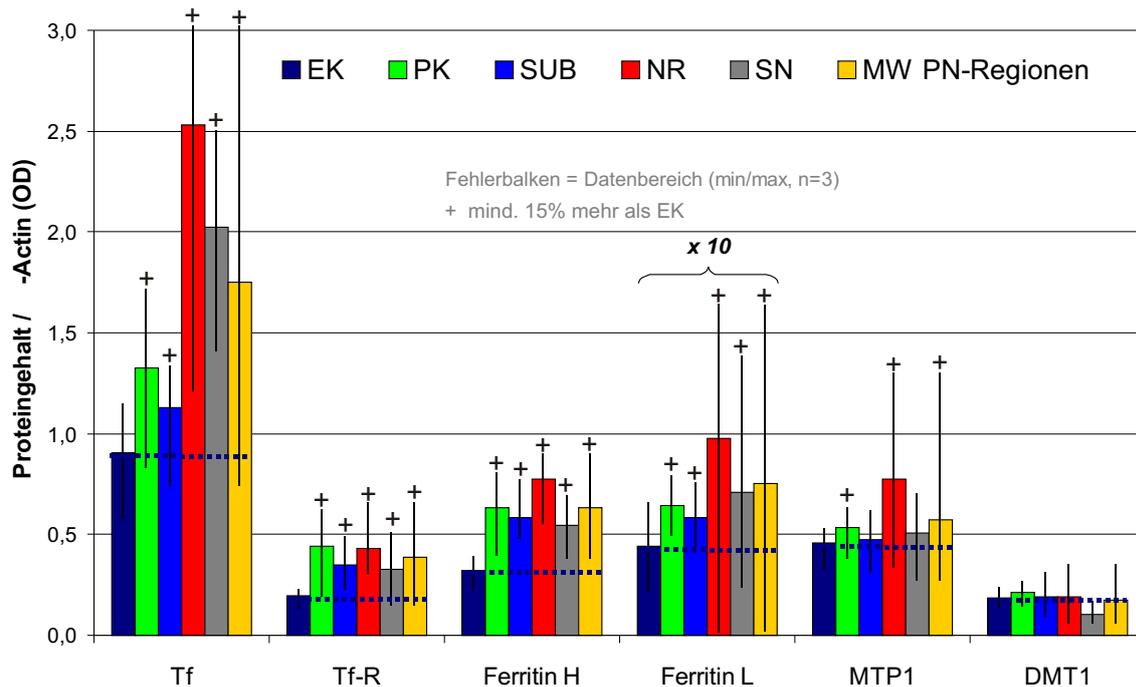


Abb. 3.14: Western Blot. Proteingehalt/ $\beta$ -Actin PN-reicher Hirnregionen in Gegenüberstellung zum EK (Referenzregion, Markierungslinie).

(Sigma, 1  $\mu$ l/20 $\mu$ l Hirnhomogenat, SL: 0,5 U/ml) für 3h bei 37°C erbracht werden. Abb. 3.15 A zeigt, daß das Signal der markierten Banden durch den Verdau deutlich verstärkt wurde. Eine detektierbare Verschiebung der Banden wurde nicht beobachtet.

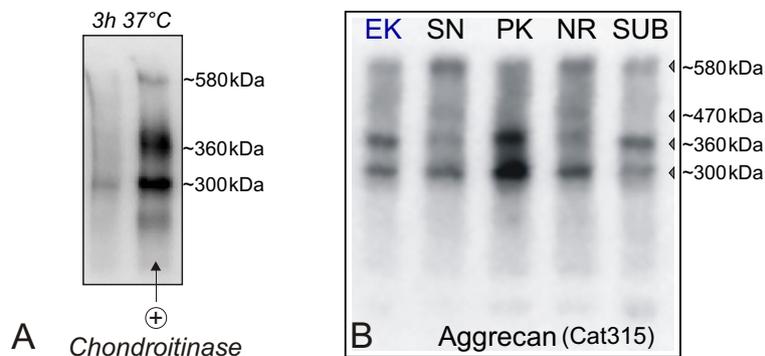


Abb. 3.15: Western Blot. A: Durch den Verdau der Proteine mit Chondroitinase ABC erhöht sich die Ausbeute an Cat-315-reaktiven CSPG und bestätigt die Spezifität des Antikörpers. Kortexhomogenat. B: Für die verschiedenen Hirnregionen wurden 3–4 Cat-315-markierte Banden unterschiedlichen Molekulargewichts und variabler Intensität erhalten. Auch im PN-armen EK wird CSPG detektiert.

Der Cat-315-Ak erzeugt laut Datenblatt (Chemicon) eine Bande bei  $\sim$ 680 kDa. Bei den Untersuchungen wurden anstatt nur einer Bande allerdings drei bis vier markierte Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht ( $\sim$ 300, 360, 470, 580 kDa) erhalten (siehe Abb. 3.15 B). Ähnliche Befunde wurde auch von Matthews et al. [MAT02] beschrieben. Die Signalintensität der Banden variiert zwischen den verschiedenen Hirnregionen. Eine systematische Kontinuität wurde allerdings nicht festgestellt.

Auch im EK mit einer geringen Anzahl an PN-tragenden Neuronen wurde im Western Blot CSPG nachgewiesen (siehe Abb. 3.15 B, EK). Allerdings wurde weder für eine der vier Banden noch für das Gesamttagrecan (Summe aller Banden) ein signifikanter Unterschied zwischen den PN-reichen und der PN-armen Region festgestellt.

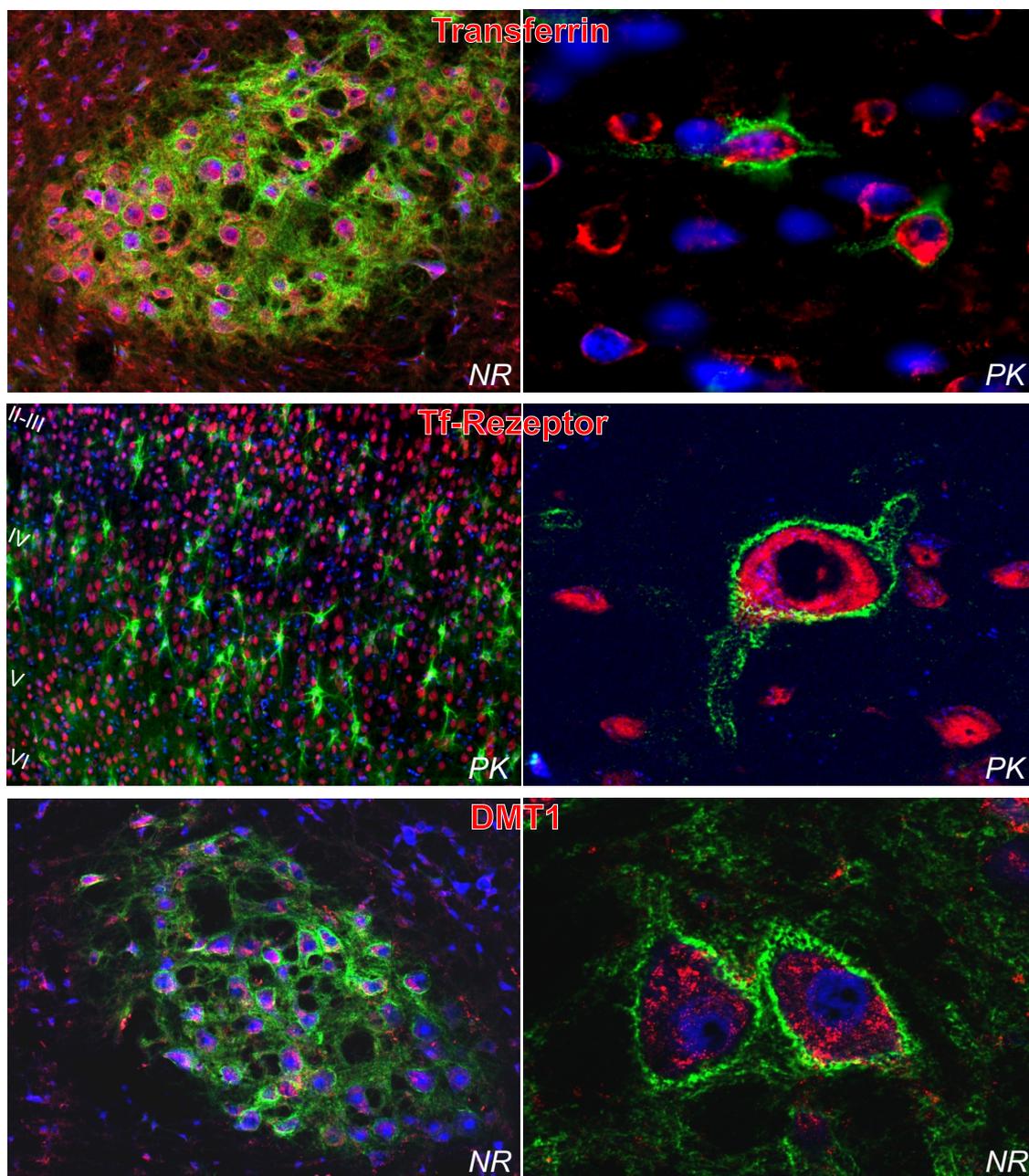
## 3.4 Immunhistochemie: Darstellung der zellulären Eisenprotein-Expression

### 3.4.1 Immunhistochemische Markierung der Eisenproteine

In den dreifach markierten (Eisenprotein+Zellmarker+PN) Hirnschnitten wurde in allen untersuchten Hirnregionen eine gute Immunreaktion erzielt. Alleinige Ausnahme war das DcytB-Protein, was mit dem einzigen kommerziell erhältlichen  $\alpha$ -DcytB-Antikörper bereits im Western Blot (Abb. 3.14) und auch in der Immunhistochemie ein schwaches Signal zeigte. DcytB wurde daher von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Im PK wurden PNs in den Schichten II-III bis VI visualisiert (siehe Abb. 3.16 TfR & 3.17 MTP1). Es wurden sehr dünne, schwache PNs um die großen Pyramidenzellen in Schicht V dargestellt, die meisten und auffälligsten WFA-reaktiven PNs befanden sich allerdings in den Interneuron-reichen Schichten IV und VI (entspricht den Angaben von Brückner et al. [BRÜ94B]). Alle NeuN-markierten Neurone zeigten eine Immunreaktion für die untersuchten Eisenproteine (Bsp. für Tf, TfR und DMT1 siehe Abb. 3.16, Bsp. für MTP1, Ferritin H und Ferritin L siehe Abb. 3.17).

Obwohl Ferritin L vorwiegend glial und Ferritin H eher neuronal lokalisiert sein soll [BEA93, CON94, CON01, MOO02A], ließen sich die Neurone ohne (optisch!) erkennbare Prävalenz für beide Ferritin-Subtypen gut anfärben. Entgegen der Beobachtung, daß Ferritin L nur Pyramidenzellen anfärbt [CON94], wurden mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper eindeutig auch andere Neuronentypen wie kortikale Interneurone angefärbt (siehe 3.17 Ferritin L). Tatsächlich aber wurden einzelne Gliazellen morphologisch anhand ihrer Ferritin L-Färbung als Oligodendrozyten identifiziert (Abb. 3.17 Ferritin L, Info), was anhand der Ferritin H-Färbung nicht möglich war.



**anti-Eisenprotein<sub>Cy3</sub> + WFA<sub>Cy2</sub> + NeuN<sub>Cy5</sub> (TfR=DAPI)**

Abb. 3.16: Immunhistochemische Darstellung der Eisenproteine Tf, TfR und DMT1 (Cy3) sowie der PNs (WFA, Cy2) und der Neurone (NeuN, Cy5) bzw. in der TfR-Färbung aller Zellkerne (DAPI). Schnittdicke: 30µm. Vergrößerung: li 100×, re 630×.

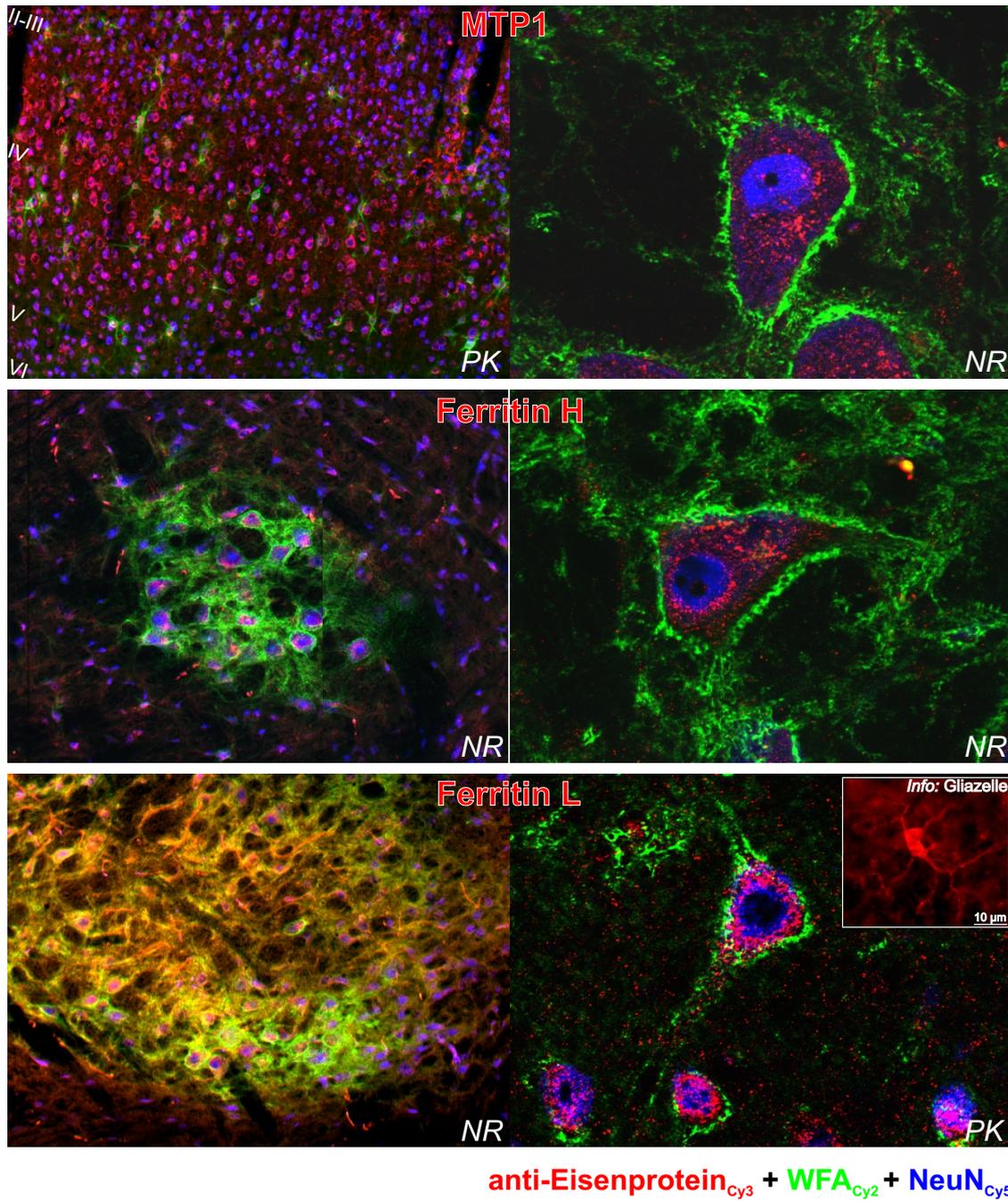


Abb. 3.17: Immunhistochemische Darstellung der Eisenproteine MTP1, Ferritin H und Ferritin L (Cy3) sowie der PNs (WFA, Cy2) und der Neurone (NeuN, Cy5). Schnittdicke: 30µm. Vergrößerung: li 100×, re 630×.

### 3.4.2 Kolokalisation von Eisenproteinen und Eisen

Alle Eisenproteine sind, wie auf der rechten Seite der Abb. 3.16 & 3.17 zu sehen, dominant im Zytoplasma der Neurone und wenig im Zellkern lokalisiert. Darauf wurde bereits in 3.1.5 eingegangen. Zum direkten Vergleich der zellulären Lokalisation von Eisenprotein und Eisen wurde nun beispielhaft Laser Scanning Mikroskopie (LSM) und Ionenstrahlmikroskopie kombiniert. Wie unter 3.4.1 wurde eine immunhistochemische Färbung für Ferritin H (Cy3-markiert) am Hirnschnitt durchgeführt. Mittels LSM wurde die Ferritin H-Färbung eines Neurons dargestellt (Abb. 3.18 LSM). Anschließend wurde das selbe Neuron im P-Map (da im Gegensatz zu 3.1.2 nicht mit DAB-Ni verstärkt) morphologisch im Ionenstrahlmikroskop identifiziert (Abb. 3.18 Element-Maps). Das Eisen wurde orts aufgelöst dargestellt und dessen Konzentration für die verschiedenen Zellkompartimente quantifiziert (Abb. 3.18 Fe-Konzentration).

Die Lokalisation des Cy3-markierten Ferritin H im LSM-Bild entspricht der höchsten Eisenkonzentration im Element-Map: beide sind vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Die Eisenkonzentration des Zytoplasmas beträgt in diesem Neuron 0,93 mmol/l. Der (auch mit Zytoplasma gefüllte) Dendrit und der Zellkern haben eine geringere Eisenkonzentration (0,43 mmol/l bzw. 0,51 mmol/l). Das Neuropil enthält weniger Eisen als alle intraneuronalen Kompartimente (0,31 mmol/l).

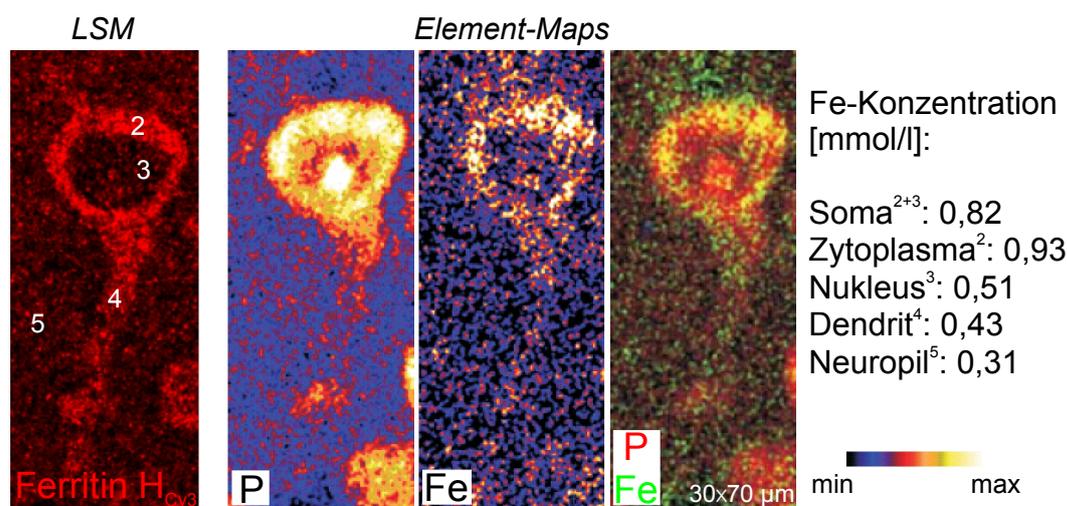


Abb. 3.18: Ähnliche zelluläre Verteilung von Ferritin H (Cy3-markiert, LSM-Aufnahme) und Eisen (orts aufgelöste Element-Maps (P, Fe, P+Fe)) in einem kortikalen Neuron. Die quantifizierte Eisenkonzentration verschiedener Zellkompartimente ist in mmol/l angegeben.

In der LSM-Abbildung in 3.18 ist zusätzlich zu erkennen, daß das Ferritin H nicht fein homogen, sondern granulär lokalisiert ist. Dies stimmt mit der granulären Eisenverteilung in den Element-Maps in der Abb. 3.18 und der histologischen Eisenfärbungen in Abb. 3.8 überein (ebenfalls beschrieben von Burdo et al. [BUR99]). Die fein granuläre Verteilung des Ferritin H und des Eisens könnte deren direkte Akkumulation anzeigen. Eine Ausnahme ist der Nukleolus, in dem viel Eisen (siehe 3.1.4 & 3.1.5), aber wenig Eisenproteine (Abb. 3.16 & 3.17) nachgewiesen werden konnten.

## 3.5 Laser Scanning Zytometrie: Quantifizierung der zellulären Eisenproteine

Für die Objektträger-basierte Laser Scanning Zytometrie (sbLSZ) sind bisher noch keine Arbeiten veröffentlicht, die eine Anwendung zur Quantifizierung von Proteinen oder die Anwendung eines extrazellulären (PN) Triggersignals beschreiben (1.4.2 & 2.5). Die Quantifizierung der immunhistochemisch markierten Eisenproteine mittels sbLSZ stellte daher eine neuartige Herausforderung dar.

### 3.5.1 Daten-Analyse

Die Datenanalyse am *iCys* ist in Abb. 3.19 dargestellt. Ein Übersichtsbild der auf dem Objektträger aufgetragenen Hirnschnitte dient zur Festlegung der zu analysierenden Regionen (3.19 A). Jede auserwählte Hirnregion wird mit dem 40×-Objektiv gescannt und die als Ereignis erkannten und mit einer Analysekontur versehenen Objekte als PMT-generiertes Bild ausgegeben (3.19 B). Von jedem detektierten Ereignis werden die x- und y-Koordinaten im Dot Plot als Punktwolke dargestellt (3.19 C). In diesem zeichnet sich die analysierte Hirnregion und die regionale Verteilung der Zellen ab. Das Dot Plot dient gleichzeitig zur Kontrolle einer optimalen, homogenen Zellerkennung und der Sichtung von Artefakten.

Es erfolgt eine komplette oder lokale Auswahl der Ereignisse, deren Integral des Cy2-NeuN-Signals (TfR: Cy5, Tf: Fluoro-Nissl) gegenüber der Area aufgetragen wird (3.19 D). In diesem Dot-Plot werden ergänzend zu der festgesetzten Mindestgröße von 10 µm Zelltrümmer oder angeschnittene Zellen als auch Zelldoubletten und Zellhaufen von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Bei der TfR-Färbung, bei welcher green-Fluoro-Nissl als Zellmarker verwendet werden musste, sind Gliazellen von den Neuronen zusätzlich über ihre größere maximale Pixel-Intensität zu verwerfen (3.19 E). Die Auswahl wird dabei stets über die bildliche Ausgabe der im Auswahlfenster gesetzten Ereignisse (PMT-generiertes Galeriebild) kontrolliert.

Von der verbleibenden Ereignisauswahl wird anschließend das Cy3mod-Signal gegenüber der Anzahl der Ereignisse in einem Histogramm dargestellt (3.19 F). PN-positive Neurone (rot markierte Zellen im Histogramm F) können anhand des hohen Cy3-Signals (WFA) von den PN-negativen Zellen (grün markierte Zellen im Histogramm F) unterschieden werden. Üblicherweise erfolgt die Differenzierung automatisch über die Festlegung eines Thresholds in einem Cy3-negativen Gebiet. Dies erwies sich allerdings als unzuverlässig, so daß das Gating der PN-positiven und der PN-negativen Population manuell anhand des Cy3mod-Signals im Histogramm (3.19 F) unter visueller Kontrolle der gespeicherten Bilder erfolgte. Es wurden so die starken gut konturierten und diffusen PNs als auch die schwachen, dünnen PNs detektiert.

Wenn auch selten, wurden vereinzelt Zellen als PN-positiv erkannt, imitierten jedoch nur ein positives Cy3-Signal durch ihre direkte Lokalisierung an einer Cy3-positiv markierten Zelle oder deren Ausläufer. Es stellte sich heraus, daß diese Neurone dadurch allerdings eine größere Fläche aufweisen und so über das Histogramm von der Analyse ausgeschlossen werden konnten (schwarz markierte Zellen im Histogramm G). Die einzelnen Zellen der jeweils selektierten Populationen wurden im Galeriebild kontrolliert

(3.19 H, I) und die Histogramme (das Galeriebild lässt leider keinen Auswahlausschluß zu) so angepasst, daß die finale Zuordnung der PN-positiven und PN-negativen Neurone korrekt vorlag.

Die endgültig selektierten PN-positiven (rot markierte Zellen im Histogramm J) und PN-negativen (grün markierte Zellen im Histogramm J) Neurone wurden für die Analyse der Eisenproteine anhand des Cy5-Fluoreszenzsignals (Tf: Cy2) herangezogen (3.19 J). Dabei umfassen die für die Quantifizierung verwendeten Informationen das Integral des Fluoreszenzsignals innerhalb der Analysekontur und die Fläche des Objektes für jeden gemessenen Kanal. Für die Quantifizierung wurde daraus das Integral/Area hergeleitet. Die Messdaten wurden als Mittelwert mit Variationskoeffizient (CV [%]) und Standardabweichung ausgegeben.

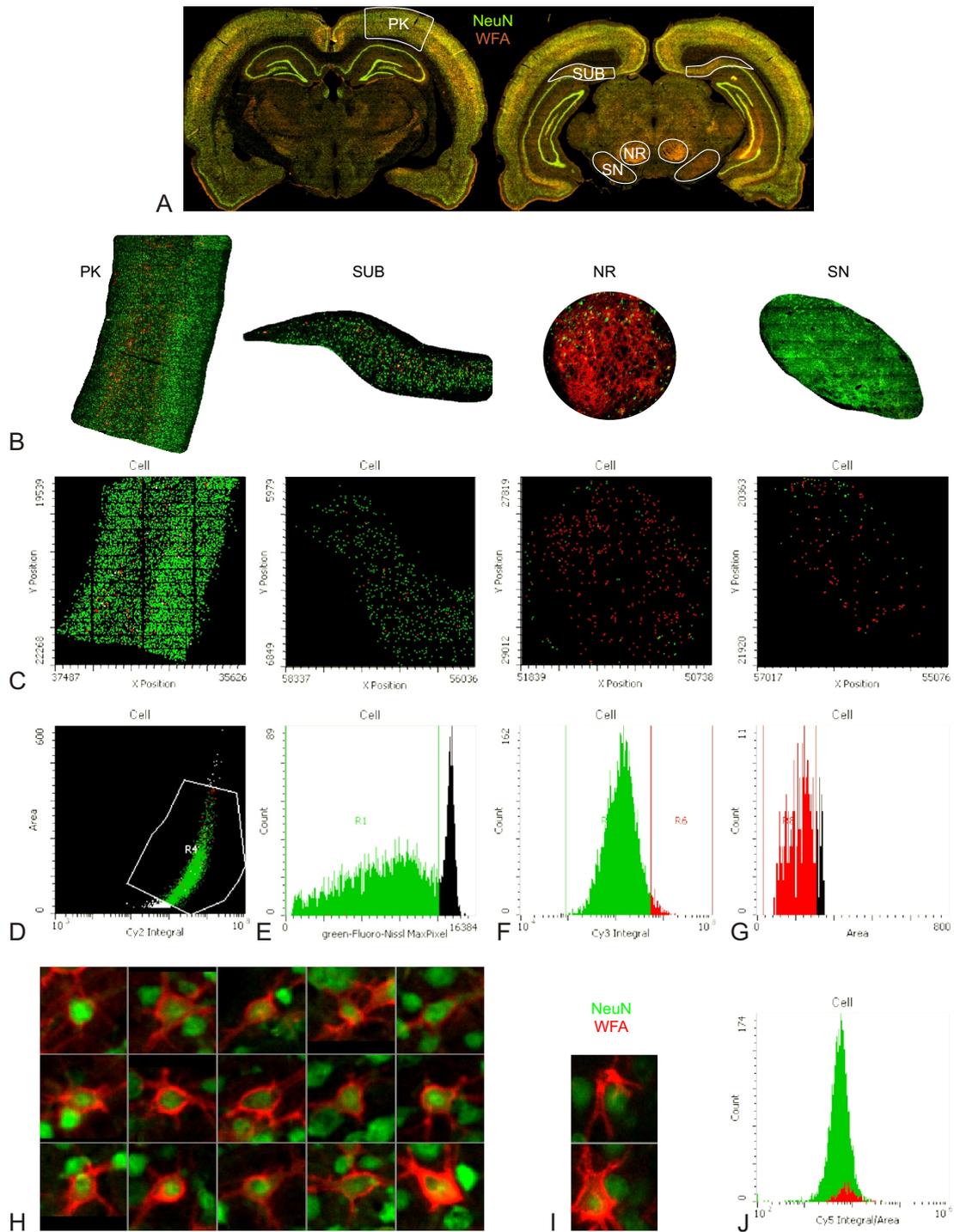


Abb. 3.19: Chronologische *iCys*-Datenanalyse über PMT-generierte Bilder (A, B, H, I), Dot-Plots (C) und Histogramme (D-G, J). (A) Übersichtsbild der Hirnschnitte. Festlegung der zu analysierenden Regionen. (B) Fluoreszenzereignisse (Zellen ohne PN, Zellen mit PN) jeder gescannten Hirnregion. (C) Gating der *x*- und *y*-Koordinaten jedes detektierten Ereignisses. (D) Zellfragmente/-haufen werden über ihre Größe aussortiert. (E) Zusätzlich bei der TfR-Färbung (green-Fluoro-Nissl): Gliazellen (schwarz) werden von den Neuronen über MaxPixel-Intensität verworfen. (F) Integral der Cy3-Fluoreszenz (PNs) aller ausgewählten Neurone. Selektion der PN-negativen und PN-positiven Neurone. Die Grenze zwischen beiden Populationen wird durch Ausgeben der einzelnen Zellen im Galeriebild (H, I) gesetzt. (G) Falsch WFA-positiv detektierte Neurone (schwarz) werden über ihre Area von der Auswertung ausgeschlossen. (H) Galeriebild der nach angepasster Analyse detektierten PN-positiven-/NeuN/green-Fluoro-Nissl-markierten Neurone (jeweilige Bildmitte). (I) Galeriebild der in H aussortierten falsch-positiven Neurone angrenzend an eine PN-tragende Zelle. (J) Abgeleitete Integral/Area-Information der Cy5-(Tf: Cy2)-Eisenprotein-Fluoreszenz der PN-negativen und PN-positiven Neurone.

### 3.5.2 Auswertung der Daten

Die vom Cy5-/Cy2-konjugierten Sekundärantikörper emittierte Fluoreszenz entspricht der Menge des vom Primärantikörper gebundenen Eisenproteins. Somit ist eine semi-quantitative Bestimmung des intrazellulären Eisenproteingehalts der PN-positiven ( $_{\text{PN}}$ ) und der PN-negativen ( $_{\# \text{PN}}$ ) Neurone möglich.

Aus allen mit einer Analysekontur erfassten Zellen erhält man einen Mittelwert des Fluoreszenzintegrals und der Fläche. Um einen Effekt durch unterschiedliche Zellgröße oder Anschnittfläche auszuschließen, wurde die Fluoreszenzintensität auf die Fläche normiert (Integral/Area,  $I$ ). Von  $I$  der eigentlichen Messung wurde  $I$  der zugehörigen Kontrolle  $_{\text{K}}$  (Folgeschnitte ohne  $\alpha$ -Eisenprotein-Ak) der selben Region abgezogen. Anschließend wurden die normierten Mittelwerte beider Subpopulationen innerhalb der selben Analyseregion relativ miteinander verglichen.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Zellanzahl  $n$  wurde zunächst der gewichtete Standardfehler  $SE$  aus den Standardfehlern  $\sigma$  aller vier Populationen ( $_{\text{PN}}$  und  $_{\# \text{PN}}$  der gefärbten Probe und  $_{\text{PN}^{\text{K}}}$  und  $_{\# \text{PN}^{\text{K}}}$  der Kontrolle) nach der Formel 3.1 errechnet (erstellt nach [SAC69]).  $SE$  und  $n$  berücksichtigend wurde mit Abzug des Fluoreszenzsignals  $I$  der Kontrollpopulationen von den eigentlichen Messungen der  $t$ -Wert  $t$  für die relative Differenz zwischen PN-positiven und PN-negativen Neuronen berechnet (3.2, erstellt aus [SAC69]). Mit dem  $t$ -Wert wurde das Konfidenzintervall KI zur statistischen Aussage ermittelt. Ist das KI größer 95% ist das Ergebnis signifikant. Bei dem Vergleich von  $I$  von PN-positiven und PN-negativen Neuronen wurde im Falle einer statistisch signifikanten Differenz ein KI von 99% erzielt (hoch signifikant). Da beide Ratten für die jeweiligen Regionen beider Hirnhälften stets das gleiche Ergebnis aufzeigten, wurden diese für die endgültige Darstellung als Mittelwert zusammengeführt.

$$SE = \sqrt{\frac{(n_{\# \text{PN}}^{\text{K}} - 1) \cdot (\sigma_{\# \text{PN}}^{\text{K}})^2 + (n_{\text{PN}}^{\text{K}} - 1) \cdot (\sigma_{\text{PN}}^{\text{K}})^2 + (n_{\# \text{PN}} - 1) \cdot (\sigma_{\# \text{PN}})^2 + (n_{\text{PN}} - 1) \cdot (\sigma_{\text{PN}})^2}{n_{\# \text{PN}}^{\text{K}} + n_{\text{PN}}^{\text{K}} + n_{\# \text{PN}} + n_{\text{PN}} - 4}} \quad (3.1)$$

$$t = \sqrt{\frac{n_{\text{PN}} \cdot n_{\# \text{PN}}}{n_{\text{PN}} + n_{\# \text{PN}}}} \cdot \frac{(I_{\text{PN}} - I_{\text{PN}}^{\text{K}}) - (I_{\# \text{PN}} - I_{\# \text{PN}}^{\text{K}})}{SE} \quad (3.2)$$

### 3.5.3 Bestimmung der Anzahl PN-positiver Neurone

Da jedem erkannten Ereignis die x- und y-Koordinaten auf dem Objektträger zugeordnet werden, war eine Zählung der ausgewerteten Neuronen möglich. In Tabelle 3.1 ist die pro Eisenprotein durchschnittlich analysierte Neuronenanzahl  $n$  für die untersuchten Hirnregionen dargestellt. In den jeweiligen Regionen umfasst diese 76 (SUB) bis 371 (NR) PN-positive Neurone und 113 (NR) bis 6307 (PK) PN-negative Neurone. Fasst man die untersuchten Regionen zusammen (MW), wurden pro Eisenprotein durchschnittlich 890 PN-positive und 8410 PN-negative Neurone quantifiziert.

Durch die automatische Zählung der erkannten Ereignisse lies sich somit auch der prozentuale Anteil WFA-positiver Neurone in den untersuchten Hirnregionen ermitteln (Tab. 3.1 Anteil PN-Neurone). Der NR besteht zum Großteil aus WFA-markierten

Neuronen (70%), in der SN sind es 55%. Im PK und SUB beträgt der Anteil WFA-positiver Neurone nur 5%. Durchschnittlich besaßen in den untersuchten Hirnregionen 10% der Neurone ein WFA-positives PN.

	<i>PK</i>	<i>SUB</i>	<i>NR</i>	<i>SN</i>	<i>MW</i>
<i>n</i> PN-negative Neurone	6307	1713	113	267	8410
<i>n</i> PN-positive Neurone	295	76	371	149	890
~ Anteil PN-Neurone	5%	5%	70%	55%	10%

Tab. 3.1: Am *iCys* pro Eisenprotein durchschnittlich analysierte Neuronenanzahl *n* und der daraus ermittelte Anteil WFA-positiver Zellen in den analysierten Regionen.

### 3.5.4 Quantifizierung der neuronalen Eisenprotein-Expression

Da die Menge der Eisenproteine mit der emittierten Fluoreszenz der gebundenen, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper korreliert, kann deren Gehalt durch die Quantifizierung der Immunfluoreszenz bestimmt werden. Die Quantifizierung der intrazellulären Eisenprotein-Expression von PN-positiven Neuronen (identifiziert über deren WFA-Cy3-Signal) und PN-negativen Neuronen erfolgte erstmals mittels sbLSZ. Durch die automatisierte Zellerkennung am *iCys* wurden die Neurone über den Zellmarker NeuN (TfR: Fluoro-Nissl) erkannt und innerhalb dieser Triggerkontur die Fluoreszenz quantifiziert. Beide Populationen wurden innerhalb des selben Hirnschnitts und der selben Region direkt miteinander verglichen.

Der ermittelte Eisenproteingehalt PN-tragender Neurone ist im Verhältnis zu PN-negativen Neuronen im Diagramm 3.20 dargestellt. Wurde in den PN-positiven Neuronen eine Erhöhung festgestellt (Verhältnis  $>1$ , gestrichelte Linie), war diese entweder hoch signifikant (99% KI) oder tendenziell (85% KI). In keinem Fall wurde eine Erniedrigung der Eisen-spezifischen Proteine in den PN-positiven Neuronen detektiert. In den PN-positiven Neuronen war Tf und TfR in allen untersuchten Hirnregionen (PK (grün), SUB (blau), NR (rot), SN (grau)) signifikant höher. Die Erhöhung betrug für Tf  $\sim 20\%$  (SN) bis  $\sim 50\%$  (PK) und für den TfR  $\sim 20\%$  (PK) bis  $\sim 55\%$  (SUB). Für Ferritin H wurde eine signifikant höhere Expression im PK um  $\sim 12\%$  und eine tendenziell höhere Expression in der SN um  $\sim 15\%$  in den PN-tragenden Neuronen festgestellt.

Signifikant mehr Ferritin L wurde in den PN-positiven Neuronen im PK und SUB detektiert ( $\sim 35\%$  bzw.  $\sim 45\%$ ). Die Neurone in der SN zeigten einen tendenziell um  $\sim 50\%$  höheren Gehalt an Ferritin L.

Die PN-tragenden Neuronen im PK, SUB und der SN wiesen eine um ca. 35–50% signifikant höhere MTP1-Expression auf, im NR war diese tendenziell um  $\sim 25\%$  höher. Für DMT1 zeigten PN-tragende Neurone im PK und SUB ebenfalls einen signifikant höheren Gehalt um ca. 35–50%. Für die SN und den NR wurde keine signifikante Änderung im DMT1-Level festgestellt.

Durchschnittlich (MW aller Regionen, gelb) exprimierten die PN-positiven Neurone im Verhältnis zu den PN-negativen Neuronen  $\sim 35\text{--}40\%$  signifikant mehr Tf-, TfR-, Ferritin L- und MTP1-Protein. Der Ferritin H- und DMT1-Gehalt war zwar in einzelnen Regionen, nicht aber in deren MW signifikant höher.

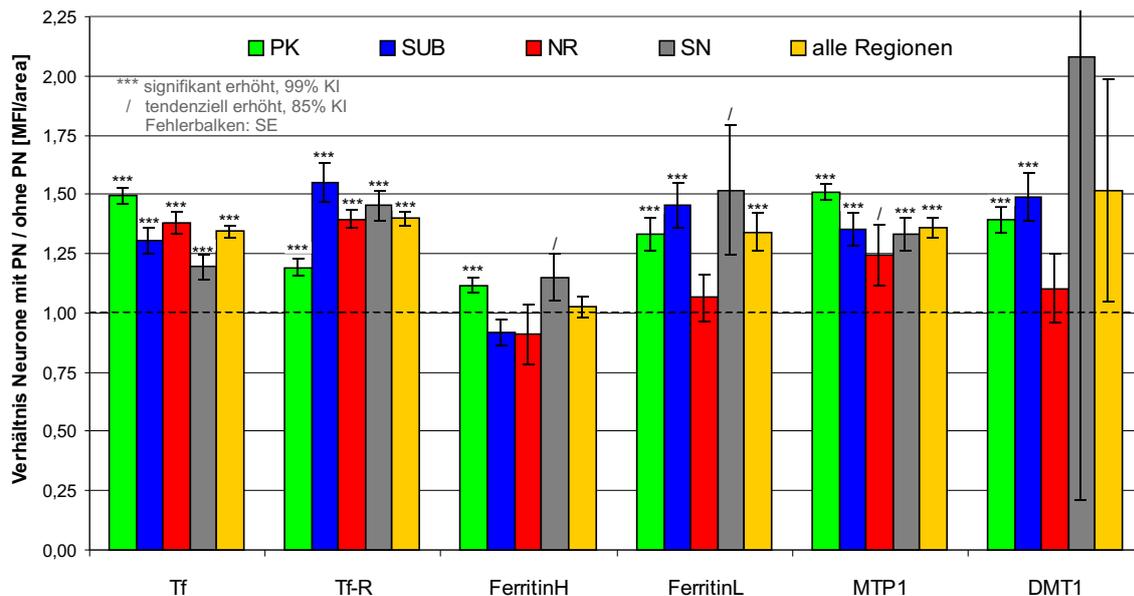


Abb. 3.20: Verhältnis der Eisenprotein-Expression von PN-positiven Neuronen im Verhältnis zu PN-negativen Neuronen. Die Quantifizierung der Immunfluoreszenz-markierten Proteine erfolgte mittels sbLSZ.

### 3.6 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse

**IONENSTRAHLMIKROSKOPIE:** PN-positive Neurone der untersuchten Gebiete PK, SN und SUB haben eine um durchschnittlich 32% höhere intrazelluläre Eisenkonzentration als Neurone ohne PN (0,74 vs. 0,56 mmol Fe/l,  $p < 0,01$ ). Pyramidenzellen und Interneurone des PK unterscheiden sich nicht in ihrem Eisengehalt. Die PN-losen Neurone der SN pars compacta besitzen die geringste, dem Neuropil entsprechende Eisenkonzentration ( $\sim 0,45$  mmol/l). Die Eisenkonzentration des PN ähnelt der Gesamtkonzentration der PN-tragenden Zelle und ist damit nur gegenüber PN-losen Neuronen erhöht. Am eisenreichsten sind die Neurone des SUB. Das neuronale Zytoplasma weist generell den höchsten Eisenanteil auf ( $\sim 84\%$ ). Die Eisenkonzentration der Oligodendrozyten ist mit  $\sim 0,95$  mmol/l am höchsten, die der Astrozyten gleicht mit  $\sim 0,7$  mmol/l den PN-positiven Neuronen.

**qRT-PCR:** Die an PN-tragenden Neuronen-reichen Hirngebiete SUB, NR und SN besitzen gegenüber des PN-armen EK ein erhöhtes mRNA-Level für Tf, TfR und/oder Ferritin H (95% KI). Dabei zeigt Tf mit einer fast dreifachen Erhöhung des mRNA-Levels im NR den auffälligsten Unterschied. Für die Regionen SUB, NR und SN wurde auch ein erhöhter Gehalt an Aggrecan-mRNA ermittelt.

**WESTERN BLOT:** Die PN-reichen Hirnregionen PK, SUB, NR und SN besitzen einen um mindestens 15% höheren Proteingehalt an Tf, TfR, Ferritin H und Ferritin L als der EK. MTP1 ist im PK, NR und als MW über alle Regionen erhöht. DMT1 ist in den Gebieten unverändert. Es werden bis zu vier verschiedene Proteinbanden von Aggrecan, auch im PN-armen EK, detektiert.

**IMMUNHISTOCHEMIE/sbLSZ:** Die Eisenproteine sind vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Außer DcytB konnten alle untersuchten Eisenproteine in NeuN-markierten Neuronen auf Einzelzellebene quantifiziert werden. Tf, TfR und MTP1 sind in den PN-

tragenden Neuronen aller Regionen erhöht (99% KI, NR MTP1 85% KI). Ferritin L und DMT1 ist im PK und SUB erhöht, Ferritin H nur im PK. Zusammenfassend wird für die PN-tragenden Neurone in PK, SUB, NR und SN meist eine signifikante Erhöhung der Eisenproteine um bis über 50% festgestellt. Ferritin H zeigt dabei allgemein die geringste Veränderung. Der zusätzlich ermittelte Anteil PN-tragender Zellen beträgt im PK und SUB ~5%, in der SN 55% und im NR 70%.

Die angewandten Techniken dienen durch ihre verschiedenen Endpunkte auf unterschiedliche Weise der Quantifizierung des Eisens und der Eisenproteine PN-tragender Neuronen. Zur Übersicht wurden die entsprechenden Ergebnisse tabellarisch in 3.2 zusammengetragen.

	<b>Eisen</b>		
	PK	SUB	SN
PIXE	↑*	↑*	↑*

	<b>Tf</b>				<b>TfR</b>			
	PK	SUB	NR	SN	PK	SUB	NR	SN
qRT-PCR	~	↑*	↑*	↑*	~	~	↑*	↑*
Western Blot	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
LSZ	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*

	<b>Ferritin H</b>				<b>Ferritin L</b>			
	PK	SUB	NR	SN	PK	SUB	NR	SN
qRT-PCR	~	~	↑*	↑*				
Western Blot	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
LSZ	↑*	~	~	↑	↑*	↑*	~	↑

	<b>MTP1</b>				<b>DMT1</b>			
	PK	SUB	NR	SN	PK	SUB	NR	SN
qRT-PCR								
Western Blot	↑	~	↑	~	~	~	~	~
LSZ	↑*	↑*	↑	↑*	↑*	↑*	~	~

<b>Methode</b>	<b>Endpunkt</b>	<b>Bestimmung</b>	↑*	↑
PIXE	Eisen	zellulär	p<0,02	
qRT-PCR	mRNA	regional	KI 95%	KI 90%
Western Blot	Protein	regional		>15%↑
LSZ	Protein	zellulär	KI 99%	KI 85%

Tab. 3.2: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aller angewandten Techniken. ↑\* signifikant erhöht. ↑ tendenziell erhöht. ~ unverändert. Die qRT-PCR wurde bei Ferritin L, MTP1 und DMT1 nicht angewandt (leeres Feld).



# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methoden

#### 4.1.1 Ionenstrahlmikroskopie

Die PIXE-Spektrometrie (Particle-Induced X-Ray Emission, [JOH95]) am Ionenstrahlmikroskop *LIPSION* ermöglicht eine orts aufgelöste Quantifizierung von Elementen auf subzellulärer Ebene. Damit konnte die intrazelluläre Eisenverteilung von (PN-positiven und PN-negativen) Neuronen und Gliazellen dargestellt und quantifiziert werden. Folgende Vorteile gegenüber anderen Methoden (u.a. Chelator-/Fluoreszenzsonden-basierten, densitometrischen Analysen; 1.4.1 S.33) können zusammengefasst werden:

Simultan-Analyse aller Elemente mit charakteristischer  $E_X$ <sup>1</sup> ab 1,5 keV ( $\geq$  Al)  
nicht-disruptiv  
subzelluläre Ortsauflösung von  $\sim 1 \mu\text{m}$   
quantitativ ( $\mu\text{g/g}$ ,  $\text{mmol/l}$ )  
sehr sensitiv (Detektionslimit für Eisen  $< 4 \mu\text{mol/l}$ )  
selektive Element-verstärkte Färbung identifizierbar  
individuelle ROIs<sup>2</sup> im Element-Map analysierbar

Durch die Verstärkung spezifischer immun-/lektin histochemischer Markierungen mit einzelnen Elementen wie Ni, Co, Cd, Ag oder Au können Strukturen direkt im PIXE-Map visualisiert werden [MOR05B]. Bei der Präparation und Färbung der Histowax-Rattenhirnschnitte war die Reinheit der verwendeten Materialien (eisenfrei!) zu prüfen, da Verunreinigungen durch die hohe Sensitivität der PIXE-Methode detektiert werden. Zur Visualisierung der WFA-markierten PNs [HÄR92, AJM08] im Ionenstrahlmikroskop wurde die Färbung mit Ni-DAB verstärkt (siehe 2.1.4 S.40). Das (99,999% reine) Nickel und somit die PN-tragenden Zellen können im Ionenstrahlmikroskop eindeutig identifiziert werden [MOR05B, FIE07]. Daß durch die Färbemethode keine anderen quantifizierbaren Elemente außer Ni eingetragen werden [MOR05B], wurde anhand von Querschnittsanalysen WFA-Ni-DAB-markierter Neurone im Element-

---

<sup>1</sup>Röntgenenergie

<sup>2</sup>regions of interest

Map belegt (Abb. 3.4 S.62). Zusätzlich wurden Kontrollmessungen an unbehandelten Histowax- und Kryo-Schnitten durchgeführt, die den gleichen Eisengehalt wie die zur Analyse verwendeten Histowax-Schnitte aufwiesen. Die für die quantitative Ionenstrahlmikroskopie vorausgesetzte saubere Fixier- und Färbetechnik wurde somit nachweislich erbracht.

Durch die Präparation der Proben werden ungebundene Elemente aus den Schnittpräparaten ausgewaschen. Dies trifft vor allem für Na, K, Mg und Ca mit einer relativ hohen Konzentration an freien Ionen ( $10\text{--}0,01\text{ mmol/l}$ ) zu (Abb. 4.1). In nur sehr geringer Konzentration ( $<0,1\text{--}10^{-10}\text{ }\mu\text{mol/l}$ ) sind freie Ionen von Fe, Cu und Zn in der Zelle vorhanden. Eine quantitative Auswertung am Ionenstrahlmikroskop wurde nur für Eisen durchgeführt. Eisen liegt in der Zelle über 95% gebunden vor [KAK02]. Der im Ionenstrahlmikroskop nicht detektierte Anteil kann daher für eine repräsentative Quantifizierung vernachlässigt werden.

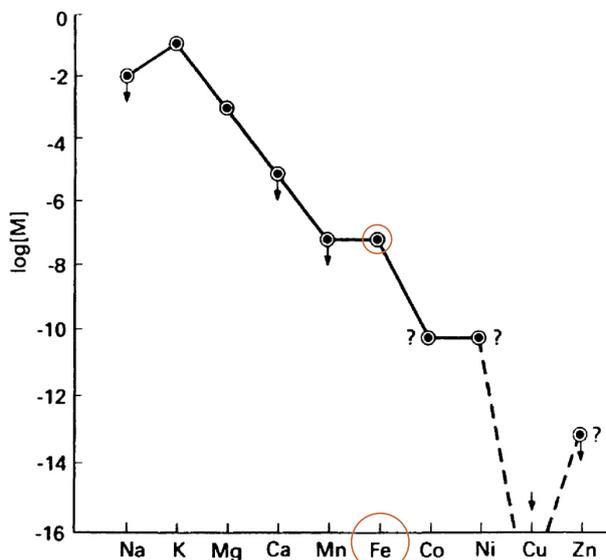


Abb. 4.1: Durchschnittliche Konzentration freier Metallionen im Zytoplasma einer Zelle (nach [WIL03]).

### Qualität der Quantität

Am Ionenstrahlmikroskop *LIPSION* wurden mittels PIXE für Neurone physiologische Eisenkonzentrationen von  $\sim 0,4\text{--}1\text{ mmol/l}$  ermittelt. Um die Übereinstimmung mit quantitativen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zu prüfen, stehen generell sehr wenige und fast ausschließlich regionale Analysen zur Verfügung. Morawski et al. [MOR05A] untersuchten mit PIXE die menschliche Substantia nigra und erhielten Konzentrationen von  $\sim 10,7\text{ mmol/l}$  (SNpr) und  $\sim 7,8\text{ mmol/l}$  (SNpc). Meinecke et al. [MEI06] ermittelten mit PIXE für die Substantia nigra der Ratte eine Konzentration von  $0,86\text{ mmol/l}$  (SN pars reticulata (pr)) bzw.  $0,4\text{ mmol/l}$  (SN pars compacta (pc)). Die Ergebnisse sind ein direkter Hinweis, daß die Eisenkonzentration im Menschen höher als in der Ratte ist.

Weitere quantitative Ergebnisse, die zum Vergleich herangezogen werden können, sind in  $\mu\text{g/g}$  angegeben [LIE97, YEF00, WIL03, SER06B, SER06A], was im Grunde keine Konzentration, sondern ein Verhältnis zur Matrixmasse darstellt, die oft

nicht angegeben wird. Die in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen entsprechen im Durchschnitt 50  $\mu\text{g/g}$ . Dies entspricht der gleichen Größenordnung der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen: für das Maus-/Rattenhirn 100  $\mu\text{g/g}$  (Tg2576 Maus-Neuropil, PIXE) [RAJ05], 50–180  $\mu\text{g/g}$  (Ratte-Retina, PIXE) [YEF00], 30–100  $\mu\text{g/g}$  (Ratte-Hirnregionen, SR-XRF) [SER06B, SER06A] und für das menschliche Gehirn (wie oben angesprochen auch mit einer höheren Eisenkonzentration) 167–250  $\mu\text{g/g}$  (graue und weiße Substanz, PIXE) [LIE97], 100  $\mu\text{g/g}$  bis (im Alter) 500  $\mu\text{g/g}$  (PIXE) [HEB99].

Eine aktuelle Arbeit mit quantitativer Analyse des zellulären Elementgehalts wurde von Ortega et al. [ORT07] mittels SR-XRF an kultivierten, dopaminproduzierenden Rattenzellen (Pheochromocytoma PC12) durchgeführt. Sie ermittelten für kryofixierte, gefriergetrocknete Zellen einen Eisengehalt von etwa 10  $\text{ng/cm}^2$ . Damit lässt sich die in der eigenen Arbeit erhaltene Elementkonzentration durch Umrechnung von  $\text{mmol/l}$  in  $\text{ng/cm}^2$  direkt vergleichen. Demnach entspricht die Eisenkonzentration der beispielsweise PN-negativen Neurone von durchschnittlich 0,5  $\text{mmol/l}$  15  $\text{ng/cm}^2$ . Diese erstaunlich gute Übereinstimmung der beiden unabhängigen, mit unterschiedlichen Präparations- und Quantifizierungstechniken erhaltenen Ergebnisse sichert die eigenen Befunde in hohem Maße.

### 4.1.2 Western Blot und qRT-PCR

Die Western Blot-Technik ist eine seit Jahren etablierte, biochemische Methode zur Auftrennung und Quantifizierung von Proteinen [BUR81]. Auf die verwendeten Antikörper wird unter 4.1.3 auf S.86 eingegangen.

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) stellt ein relativ neues, grundlegendes Werkzeug der modernen Molekularbiologie zur Amplifikation von DNA dar [HIG92]. Die Anwendungsbereiche dieser schnellen, sensitiven Methode sind vielfältig [HEI96, KUB06]. Bei der qRT-PCR wird ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt, dessen Fluoreszenz proportional zur Produktmenge ansteigt. Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellwertes (CT-Wert) in der exponentiellen Phase. Durch das für jede Probe im selben PCR-Lauf simultan amplifizierte Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin wurde innerhalb der selben Region die relative Menge der DNA und somit der ursprünglich revers transkribierten RNA ermittelt (siehe  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Formel 2.3, nach [RAW05, KUB06]). Die dafür notwendige PCR-Effizienz wurde durch eine Verdünnungsreihe der Probe berechnet (Abb. 2.8 S.46 & Formel 2.1 S.47).

Die Western Blot- und qRT-PCR-Analysen wurden nicht an einzelnen Zellen, sondern am Homogenat isolierter Hirnregionen durchgeführt. Neben Neuronen sind daher auch Gliazellen, Myelin, EZM, Blutgefäße und Endothelzellen enthalten, so daß die quantifizierten Eisenproteine/mRNAs nicht ausschließlich neuronalen Ursprungs sind. Dies ist ein wichtiger Aspekt für die vorliegenden Protein- und mRNA-Untersuchungen, denn auch Gliazellen exprimieren in unterschiedlichem Maße Tf, TfR, Ferritin, DMT1, MTP1 und DcytB [MON88, DWO88, PAP98, GER89, CON90, BEN93, CON95A, CHE98, BUR99, HAN99, MOO00, BUR01, THO01, MCK01, WAN02, HAN02, JEO03, HOE04, LIS04, WU04, KE05, MOO06, MOO07, SON07]. Zudem können Eisenproteine wie das Apo-Transferrin auch in den Interzellularraum diffundieren, welcher ca. 35% des Volumens der grauen Substanz ausmacht [BLI68].

Für das Säugerhirn wird ein allgemeines Verhältnis der Anzahl der Gliazellen zu Neuronen von 10:1 angenommen [STE96], für das menschliche Gehirn soll die Zahl der Gliazellen sogar 10–50 mal größer sein und damit ca. 50% der Gehirnmasse betragen [<http://de.wikipedia.org/wiki/Gliazelle> am 24.07.08]. Stereologische [GAB87] und nicht-stereologische [HER05, HER06] Quantifizierungen am Rattenhirn zeigen eine andere Verteilung. Demnach beträgt das Verhältnis von Neuronen zur Gesamtzellzahl ca. 60% [HER06]. Beim volumenmäßigen Anteil von Neuronen zu Gliazellen in der Ratte verschiebt sich das Verhältnis noch mehr zugunsten der Neurone (ca. 80%, 60000 Neurone zu 49000 Gliazellen pro mm<sup>3</sup>) [GAB87]. Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen verhalten sich dabei etwa 6:3:1 [GAB87]. Den zellulären und volumenmäßigen Hauptanteil im Rattenhirn machen folglich die Neurone und nicht die Gliazellen aus [HER05].

Ein weiterer Aspekt bei der Quantifizierung an Homogenaten ist die relative Reduktion der Konzentration des zu analysierenden, neuronalen Proteins/mRNA gegenüber dem Gesamtproteingehalt. Im ungünstigen Fall liegt der zu detektierende Unterschied nahe der Fehlergrenze der verwendeten Methode. Dieser Fall wird von Burdo et al. [BUR01] dokumentiert, die mit gleichen Antikörpern immunhistochemisch eine Abnahme der Eisenproteine DMT1 und MTP1 in DMT1-defizienten Belgrad-Ratten detektierten, nicht aber am Hirnhomogenat im Western Blot. In der vorliegenden Arbeit wurde der beschriebene Effekt reduziert, indem der relative Beitrag der PN-tragenden Neurone durch die Isolation auserwählter, PN-reicher Hirnregionen erhöht wurde. Mit den genannten Einschränkungen stellen Western Blot und qRT-PCR ergänzende Methoden zur zellulären Analyse mittels Laser Scanning Zytometrie dar.

### 4.1.3 Laser Scanning Zytometrie

Die Objektträger-basierte Laser-Scanning-Zytometrie (sbLSZ, [KAM91]) ist eine neue Methode, die die Vorteile der Durchflusszytometrie und Immunhistochemie vereint und so qualitative und quantitative Informationen über die Proteinexpression einzelner Zellen direkt am Gewebeschnitt ermöglicht (1.4.2 S.34) [TÁR02, MOS06, HAR07, PET08]. Da die Menge der immunhistochemisch markierten Eisenproteine mit dem spezifischen Fluoreszenzsignal korrelieren, war deren Konzentration über das Fluoreszenzintegral innerhalb der Analysekontur quantifizierbar (2.5.2 S.52 & 3.5 S.75).

#### Immunreaktion

Für die Markierung der Eisenproteine wurden Antikörper ausgewählt, die entweder direkt oder kreuzreaktiv spezifisch gegen Ratte gerichtet sind (siehe Tabelle 2.5 auf S. 51 mit Bezugsquelle und additiver Referenz). Ein Restrisiko einer partiellen unspezifischen Bindung besteht bei Immunreaktionen dennoch. Der Kaninchen- $\alpha$ -Maus-DcytB-Ak ist der einzige verwendete (und kommerziell erhältliche) Antikörper, für den bisher nur die Spezifität gegen Mensch und Maus beschrieben wurde.

Im Western Blot, mit welchem die Spezifität aller Ak über das Molekulargewicht der Proteinbande nachgewiesen werden konnte, wurde nur mit dem DcytB-Ak ein unzureichendes Signal erhalten (Abb. 3.13 S.69). Auch die immunhistochemische Färbung von DcytB an Hirnschnitten zeigte nur eine schwache Reaktion. DcytB wurde daher

von der Quantifizierung am *iCys* ausgeschlossen. Es ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu klären, ob der Ak unspezifisch ist, ob das DcytB-Protein für die angewandten Methoden in zu geringen Mengen im Gehirn vorliegt oder ob im Rattenhirn möglicherweise eine (proteolytische Spalt-, Splice-) Variante vorhanden ist, die der gegen das ursprüngliche duodenale DcytB [GLE05] gerichtete Ak nicht erkennt. Mittels qRT-PCR wurde in dieser Arbeit allerdings eindeutig nachgewiesen, daß DcytB-spezifische mRNA im Rattenhirn exprimiert wird (3.2 S.65 & Abb. 3.11 S.67).

Die anderen immunhistochemisch gefärbten Eisenproteine zeigten ein deutliches Signal und nur geringe unspezifische Hintergrundfärbung. Sie wurden mittels sbLSZ quantifiziert. Deren jeweilige Expression wurde zwischen den Neuronen mit und den Neuronen ohne PN verglichen (Differenz, Verhältnis). Ein Vergleich zwischen verschiedenen Eisenproteinen (z.B. Tf vs. Ferritin H) kann nicht durchgeführt werden, da die Immunreaktionen für die spezifischen Antigen-Ak<sub>prim</sub>-Ak<sub>sek</sub>-Bindungen in unterschiedlichen, unbekanntenen Verhältnissen ablaufen. Ein direkter Vergleich wäre nur mit einem direkt markierenden Primärantikörper möglich. Zur Bestimmung der Anzahl der gebundenen Antikörper könnten, bei gleichen Messparametern, z.B. Proteinstandards oder Beads<sup>3</sup> verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt bei der Fluorochrom-basierten LSZ-Quantifizierung ist die Kombination der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Ein Spillover in den zu quantifizierenden Kanal (hier: Eisenproteine) ist nachweislich auszuschließen (2.5.2 S.52).

## Analyse

Die Differenzierung zwischen PN-positiven und PN-negativen Neuronen am *iCys* erfolgte nicht wie regulär über einen intrazellulären Marker [DAR99, MOS06], sondern über das PN selbst. Die Analysekontur um die Zelle erfasste auch einen Teil der WFA-Cy3-gekoppelten Fluoreszenz des PN, die zur Identifizierung der PN-positiven Neurone ausreichte (3.5 S.75). Ein empfindlicher und für die weitere Analyse ausschlaggebender Schritt ist die Trennung der PN-positiven von den PN-negativen Neuronen im selben Cy3-Histogramm (Abb. 3.19 F S.77). Der Übergang zwischen beiden Populationen erfolgt nahezu kontinuierlich, so daß die Auswahl der Zellen im PMT-generierten Galeriebild (Abb. 3.19 H S.77) genau kontrolliert werden muß.

Am *iCys* wurde eine optimale Zellerkennung erzielt (2.5.3 S.53). Dies setzt allerdings eine kontrollierte Festsetzung des Schwellwertes voraus. Als Triggersignal für die Erkennung des gesamten Somas der Neurone wurde NeuN [MUL92, WOL96, LIN05] verwendet. Die wenigen zelltypspezifischen Ausnahmen im Cerebellum, olfaktorischen Bulbus und der Retina sowie in der SN pars reticulata der Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*), die keine NeuN-Reaktivität zeigen [MUL92, WEY03, KUM07], sind für die analysierten Hirnregionen an der Ratte nicht relevant. Dennoch wurden regionale als auch zelluläre Unterschiede der NeuN-Intensität beobachtet, die bei den Einstellungen berücksichtigt werden mussten. Generell zeigten manche Neurone, unabhängig von der PN-Expression, eine geringe NeuN-Intensität. Der Schwellwert des Triggersignals ist daher für den jeweiligen Messbereich so zu wählen, daß möglichst auch die "dunklen" Neurone, nicht aber schon Zelldubletten intensiv gefärbter Neurone erkannt

<sup>3</sup>Polymerkügelchen mit einer bestimmten Größe und Anzahl an fluoreszierenden Quantumdots

werden. In der Substantia nigra waren die Neurone weniger stark NeuN-reaktiv als in den anderen Regionen und hoben sich weniger deutlich vom Untergrund ab. Im Nucleus ruber erschwerte die innerhalb der magnozellulären Neurone heterogene NeuN-Färbung das Setzen des Schwellwertes. In beiden Gebieten bedurfte es bei der Festlegung des Schwellwertes daher besonderer Feinfühligkeit.

Aufgrund der regional verschiedenen Fluoreszenzsignale war für die Auswertung der “spezifischen Färbung” zu beachten, daß die selbe Region im Kontrollschnitt (Folgeschnitt ohne  $\alpha$ -Eisenprotein-Ak) mit den selben Parametern am *iCys* aufgenommen und die Intensität von der eigentlichen Messung abgezogen wurde (3.5.2 S.78). Lokale Hintergrundunterschiede innerhalb einer Region wurden bereits während der Messung durch die Verrechnung der Hintergrundkontur um jede einzelne Zelle korrigiert (2.5.3 S.53).

Mit diesen an die Fragestellung angepassten Parametern erwies sich die sbLSZ am Hirnschnitt als eine schnelle und für die Quantifizierung der Proteinexpression von Zellen geeignete Methode.

Wie Menschen können auch Ratten geschlechtsspezifische Unterschiede (auch im Eisenhaushalt) aufweisen [DIA87, BEA03, BAR07]. Um zumindest zyklische Schwankungen zu vermeiden, wurden für alle Untersuchungen männliche Ratten verwendet. Quantitative Konzentrationsangaben können daher beim anderen Geschlecht abweichen. Relative Angaben dürften davon weniger betroffen sein.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Höhere Eisenkonzentration in PN-positiven Neuronen

#### Regionaler Vergleich der neuronalen Eisenkonzentration

Nach den allgemeinen, histochemischen Befunden sind die menschliche SN [SPA22, HAL58, BEA93] und die SN pars reticulata der Ratte [FRA81, HIL84] eisenreiche Regionen. Die eigenen ionenmikroskopischen Arbeiten an Ratten zeigen allgemein für die Substantia nigra keine auffällige Eisenerhöhung gegenüber dem PK oder dem SUB (Abb. 3.3 S.60). Auch atomabsorptionsspektroskopische Untersuchungen an der SN juveniler Ratten zeigen einen unauffälligen Eisengehalt [ERI97, PIN00]. Diese Differenz ergibt sich möglicherweise daraus, daß die Untersuchungen am Menschen meist an älteren Verstorbenen durchgeführt werden, bei denen sich im Alter der Eisengehalt im Gehirn, insbesondere in der SN, bereits erhöht haben kann [HEB99, ZEC04]. Ratten akkumulieren im Alter ebenfalls Eisen im Gehirn [KOE95], die in den eigenen Untersuchungen zwar adult, aber jüngeren Alters waren (2-4 Monate). Auch die Gliazellen können zu einer stärkeren Eisenfärbung beitragen [CON90], die aber in der vorliegenden Arbeit nur für den retrosplenialen Kortex untersucht wurden (siehe 3.1.7 S.63 & 4.2.2 S.90). Des weiteren ist beim Vergleich der Eisenkonzentration von Mensch und Ratte zu bedenken, daß das eisenreiche Neuromelanin in den dopaminergen Neuronen der SN pars compacta nur beim Menschen, nicht aber bei der Ratte vorkommt.

Innerhalb der SN wurde mittels Ionenstrahlmikroskopie eine unterschiedliche neuronale Eisenkonzentration ermittelt: die Neurone der SN pars compacta enthalten, in Übereinstimmung mit den tendenziellen quantitativen Befunden von [MEI06], signifikant weniger Eisen als die Neurone der SN pars reticulata (Abb. 3.3 S.60), wobei das Neuropil (aller untersuchten Regionen) einen homogen geringen Eisengehalt aufwies.

Es lassen sich demnach die histochemischen Beobachtungen für die Ratte insofern bestätigen, daß die Neurone der SN pars reticulata gegenüber denen der pars compacta eisenreich sind [FRA81, HIL84], nicht aber wesentlich eisenhaltiger als die des PK oder des SUB. Alternativ könnten die Neurone der SN pars compacta als eisenarm bezeichnet werden.

#### Zellulärer Vergleich der neuronalen Eisenkonzentration

In jeder der untersuchten Regionen enthalten die PN-tragenden Neurone signifikant mehr Eisen als die PN-negativen Neurone (3.1.3 S.60), durchschnittlich ca. 30% mehr. Dabei weicht die relative (18–30%) und absolute (0,15–0,2 mmol/l) Differenz in den verschiedenen Regionen wenig voneinander ab. Die Erhöhung ist somit nicht regionalen, sondern zellulären Charakters und nach einleitender Beschreibung unter 1.1.2 auf S.20 unabhängig vom PN-Typ (kräftiges, dünnes PN), Zelltyp (Interneuron, Pyramidenzelle, Motorneuron), Transmitter (GABA, Glutamat), Calcium-bindenden Protein (Parvalbumin, Calbindin, ohne) und Kaliumkanal (mit, ohne Kv3.1b). Es ist daher für die Eisenerhöhung zum heutigen Zeitpunkt keine andere Korrelation festzustellen, als das Vorhandensein eines PN um das Neuron.

Da auch das PN gegenüber PN-negativen Zellen eine erhöhte, der PN-tragenden Zelle entsprechende Eisenkonzentration besitzt, scheint es direkt am Eisenhaushalt

der PN-tragenden Zelle beteiligt zu sein. Die erhöhte intrazelluläre Eisenkonzentration ist somit unwahrscheinlich eine grundsätzliche Eigenschaft der Zelle selbst, die nur "zufällig" ein PN ausbildet, sondern Zelle und PN stehen vermutlich in enger Beziehung.

Wie unter 1.2.1 auf S.25 und 1.2.2 auf S.27 erläutert, ist Eisen potentiell toxisch, wenn es in ungebundener Form vorliegt. Da in der PN-tragenden Zelle der Eisengehalt erhöht, das Neuron aber gegenüber degenerativen Prozessen weniger vulnerabel ist (1.1.4 S.23), muß das Eisen in einer unschädlichen Form vorliegen. Daß dies vermutlich durch Eisen-spezifische Proteine gewährleistet wird, wird in 4.2.4 auf S.92 diskutiert.

## 4.2.2 Eisenkonzentration von Oligodendrozyten & Astrozyten

Bisherige Angaben über den Eisengehalt von Gliazellen beruhen auf semiquantitativen Analysen (1.4.1 S.33). Meinecke et al. [MEI06] quantifizierten zwar mittels Ionenstrahlmikroskopie den Eisengehalt der Neurone und Gliazellen in der SN der Ratte. Sie differenzierten allerdings nur anhand der Größe zwischen Neuronen und Gliazellen im Phosphor-Map. Sie stellten keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Populationen fest. In der vorliegenden Arbeit wurden Oligodendrozyten und Astrozyten immunhistochemisch gefärbt und mit Ni-DAB markiert, so daß beispielhaft ausgewählte Zellen im retrosplenialen Kortex<sup>4</sup> erstmals spezifisch und ortsaufgelöst quantifiziert werden konnten (3.1.7 S.63).

In den als eisenreich beschriebenen Oligodendrozyten [CON95B, BEA03] wurde eine ~60% höhere Eisenkonzentration als in den PN-negativen Neuronen ermittelt (~ 0,95 mmol/l). Es kann somit ein hoher, aber nicht extrem hoher Eisengehalt, welcher aufgrund der starken Reaktion in histochemischen Eisenfärbungen (Bsp. [CON95B] oder Abb. 3.8 S.64) anzunehmen ist, bestätigt werden. Es wird vermutet, daß das Eisen in den Oligodendrozyten zur Myelinsynthese benötigt wird [CON95B]. Weitere Funktionen wie zur Versorgung des Neurons sind aber denkbar, da Gliazellen evolutionär viel früher auftraten als myelinisierte Nervenfasern [MAX03, WIL03].

Die ionenstrahlmikroskopisch ermittelte Eisenkonzentration der beispielhaft ausgewählten GFAP-positiven Astrozyten im retrosplenialen Kortex beträgt ~ 0,7 mmol/l (3.1.7 S.63). Mittels Ferrozin-basierter Kolorimetrie und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) erhalten Höpken et al. [HOE04] und Riemer et al. [RIE04] für kultivierte Ratten-Astrozyten einen relativen Eisengehalt von ~10 nmol pro mg Protein. Nimmt man eine Größe der Astrozyten von (5 µm)<sup>3</sup> und eine Proteinmasse der Zelle von 10% [HOL08] an, entsprechen 10 nmol Fe/mg Protein einer Konzentration von 1 mmol/l. Demnach stimmen beide Ergebnisse der Eisenbestimmung (Ionenstrahlmikroskopie und Kolorimetrie/AAS) für Astrozyten überein. Erb et al. [ERB96] untersuchten den Eisengehalt im Gehirn von Maus, Ratte, Huhn, Frosch, Fisch und Fliege und konnten mit histochemischer Eisenfärbung in keiner der Species eisenhaltige Astrozyten nachweisen. Sie diskutieren dazu, daß histochemische Nachweismethoden ausgereifte Fixier- und Färbetechniken erfordern.

Die im Ionenstrahlmikroskop analysierten Astrozyten besitzen interessanterweise eine ähnliche durchschnittliche Eisenkonzentration wie die PN-tragenden Neurone (3.1.7

---

<sup>4</sup>Der retrospleniale Kortex ist reich an PN-positiven Neuronen.

S.63 & Abb. 3.10 S.66). Auch wenn die glialen Ergebnisse nur für einzelne Zellen im retrosplenialen Kortex vorliegen und dies noch keine umfassende Studie darstellt, ist folglich eine enge Interaktion von Astroglia und PN-positiven Neuronen denkbar. Daß Astrozyten an der Bildung des PN beteiligt sind, liegt durch deren Synthese von Proteoglykanen (siehe 1.1.1 S.17; [PAN08]), insbesondere nach regionaler Läsion [HAA99, THO00], und durch die das PN penetrierenden Zellfortsätze nahe [GAL87, BRÜ93, ASH95, RHO04]. Die gleiche Eisenkonzentration der WFA-positiven Neurone und der Astrozyten lässt vermuten, daß sich die Interaktion nicht nur auf die Bildung des extrazellulären PN beschränkt, sondern auch auf den intrazellulären Metabolismus beziehen könnte. Astrozyten regulieren den Transport von Eisen zu anderen Nervenzellen [DRI07], möglicherweise insbesondere zu den PN-tragenden Neuronen (siehe unter 4.2.5 S.95 und 4.2.7 S.99).

### 4.2.3 Regionale Aggrecan-Expression

Aggrecan ist das Hauptproteoglykan der PNs [DIT06, GAL08B]. Beim Vergleich der exprimierten Aggrecan-mRNA mittels qRT-PCR (2.2 S.44) und der Aggrecan-Proteinsynthese mittels Western Blot (2.3 S.47) wurde ein Unterschied zwischen der PN-armen und den PN-reichen Hirnregionen erwartet.

Mittels der sensitiven qRT-PCR (4.1.2 S.85) wurde, mit Ausnahme vom PK (siehe unten), diese Annahme bestätigt und eine mindestens doppelt so hohe Aggrecan-mRNA-Expression in den PN-reichen Hirnregionen gegenüber der PN-armen Region festgestellt. Die spezifische DNA wurde somit ausreichend amplifiziert und die PN-abhängige Genexpression des Aggrecans nachgewiesen.

Im Western Blot wurde die CSPG-Expression mittels des Antikörpers Maus- $\alpha$ -CSPG (Cat-315) (2.3.4 S.49) detektiert. Der Antikörper wurde von Matthews et al. [MAT02] als spezifischer Antikörper gegen Kernprotein-ständige Kohlenhydrat-“Stubs” von Aggrecan beschrieben. In Anlehnung an Matthews et al. [MAT02] und Lander et al. [LAN98] wurde die Spezifität des  $\alpha$ -CSPG-Antikörpers durch den Verdau der Hirnhomogenate mit Chondroitinase ABC im Western Blot nachgewiesen (3.3.2 S.69). Die Entfernung der Seitenketten des Aggrecanmoleküls durch die Deglykosylierung mit Chondroitinase verbessert vermutlich die Zugänglichkeit des Antikörpers zum Antigen, was in einer Verstärkung der Western Blot-Bande resultiert.

Mittels des Cat-315-Ak wurden vier Western-Blot-Banden unterschiedlichen Molekulargewichts erhalten ( $\sim 300$ – $580$  kDa). Auch Matthews et al. [MAT02] und Deepa et al. [DEE06] erhielten mit diesem Ak bis zu fünf Banden mit einem Molekulargewicht von  $\sim 200$  bis  $>500$  kDa. Durch eine Deglykosylierung des Aggrecans verstärken sich nicht nur die Banden, sie zeigen auch eine leichte Verschiebung in den niedermolekularen Bereich [MAT02]. Der Shift ist allerdings zu gering, als daß die Banden verschiedene Glykosylierungsformen darstellen könnten. Verschiedene Splicevarianten sind ebenfalls unwahrscheinlich, da die bisher einzig bekannte Splicevariante des Aggrecans weniger als 5% der Aggrecan-mRNA im Ratten-ZNS ausmacht und daher einen zu geringen Beitrag liefert [MAT02]. Am wahrscheinlichsten sind die vier Banden proteolytische Spaltprodukte des Aggrecanproteins [MAT02]. Verschiedene Spaltprodukte des Aggrecans wurden bereits im Gehirn und im Rückenmark nachgewiesen [DEE06]. Als spaltende Enzyme kommen dafür insbesondere Metalloproteinasen in Betracht [YAM00].

Wider Erwarten wurde weder für eine der vier Banden noch für das Gesamttaggre-can ein signifikanter Unterschied zwischen den PN-reichen und der PN-armen Region festgestellt (3.3.2 S.69). Wie später mittels LSZ ermittelt wurde (Tab. 3.1 S.78), beträgt der Anteil der WFA-positiven Neurone in den untersuchten PN-reichen Regionen durchschnittlich nur 10%. Zwar ist der Anteil WFA-reaktiver PNs im NR besonders groß ( $\sim 70\%$ ), allerdings sind die PNs generell chemisch bzw. molekular heterogen [HOC83, FUJ89, MCK82, OJI98, HÄR95, BRÜ94B, BRÜ96, MAT02, ALP06]. Die Subpopulation der immunhistochemisch WFA-reaktiven PNs in den untersuchten Regionen war größer als die zur Western Blot-Analyse verwendete CSPG-reaktive Subpopulation (siehe beispielhaft Abb. 3.1 S.57). Möglicherweise ist dieser Anteil im Hirnhomogenat zu gering, um einen Aggrecanprotein-Unterschied zwischen PN-reichen und der PN-armen Hirnregion im Western Blot zu detektieren, denn EZM-Komponenten kommen diffus auch im Neuropil der grauen Substanz und in der weißen Substanz zwischen myelinisierten Nervenfasern und kondensiert an Ranvierschen Schnürringen vor [BRÜ94B, DEE06]. Der Effekt der kondensierten PNs liegt deshalb möglicherweise unterhalb der Fehlergrenze des Western Blots (die unter 4.1.2 auf S.85 diskutierte Problematik). Für weiterführende quantitative Western Blot-Analysen wird daher ein Antikörper vorgeschlagen, der eine größere Subpopulation an PNs detektiert (z.B. Kaninchen- $\alpha$ -Maus-Aggrecan, Chemicon; WFA ist trotz hervorragender Resultate in der Lektinhistochemie für Western Blot-Analysen ungeeignet [MOR08A]).

Bei der qRT-PCR wurde für Aggrecan nur im PK kein Unterschied gegenüber der PN-armen Region detektiert (Abb. 3.12 S.68). Da der PK neben dem SUB die geringste Anzahl WFA-reaktiver Neurone enthält ( $\sim 5\%$ , Tab. 3.1 S.79) und die Anzahl an PNs höchstwahrscheinlich mit der Aggrecan-Expression korreliert, war möglicherweise, auch wenn selbst geringe DNA-Mengen amplifiziert werden, die Aggrecan-spezifische DNA(mRNA)-Ausgangsmenge auch hier zu gering. Es ist zwar nicht auszuschließen, daß die Aggrecan-Expression regional abweicht und diese nach Ausbildung der PNs insbesondere im PK herab reguliert wird. Aber weil im PK nicht nur für Aggrecan, sondern auch für die Eisenprotein-spezifische DNA kein Unterschied festzustellen war, scheint dies ein systematisches Nachweisproblem aufgrund einer geringer Ausgangsmenge in dieser Region zu sein.

#### 4.2.4 Ko-Lokalisation von Eisen und Eisenproteinen

Eisen und Eisenproteine korrelieren bezüglich ihres subzellulären Vorkommens im Neuron (siehe 3.4.2 S.74). Über 80% des zellulären Eisens wurden im Zytoplasma detektiert, der Zellkern hingegen enthielt wenig Eisen (3.1.5 S.61, Abb. 3.5 S.62). Auch Ortega et al. [ORT07], die kultivierte, dopaminproduzierende Rattenzellen nach Kryofixierung und Gefriertrocknung mittels SR-XRF analysierten, wiesen Eisen nur im Zytoplasma und nicht im Zellkern nach. Dies bestätigt auf quantitativer Ebene ältere Befunde, die Eisen im Perikaryon und den Neuriten histochemisch darstellten [HIL84].

Auch die untersuchten Eisenproteine sind überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert (siehe Abb. 3.16 S.72 & 3.17 S.73). Die Kolokalisation von Eisen und Eisen-spezifischen Proteinen wurde anhand des Ferritins in der Abb. 3.18 auf S.74 repräsentativ dargestellt und lässt deren direkte Assoziation vermuten. Arosio et al. [ARO02] beschreiben Ferritin, in Übereinstimmung mit [SUR04] und [THO02], als ein hauptsächlich zytoplas-

matisches Protein, daß das gespeicherte Eisen vom Zellkern und anderen Organellen separiert. Da bis zu 90% des Eisens in Ferritin gebunden sind (siehe 1.2.3 S.28), wird es als das Protein mit dem größten Beitrag zum zellulären Eisengehalt angenommen. Diese Aussage bestätigt sich durch die Ionenstrahlanalytische Eisenquantifizierung subzellulärer Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation (3.1.6 S.63, Abb. 3.7 S.64). Die eisenhaltigen Mitochondrien (siehe 1.2 S.25), die in großer Anzahl im Zytoplasma der Zelle vorkommen können ( $\sim 2500$  pro Zelle im cerebralen Kortex [BL168]), zeigten einen geringen Beitrag zum Eisengehalt des Gesamthirnhomogenats. Der Hauptteil des Eisens war deutlich in der Mikrosomenfraktion enthalten. In dieser ist interessanterweise auch Eisen-beladenes Ferritin angereichert [AUS06].

Bei der Ionenstrahlmikroskopie und der Immunhistochemie wurde weniger eine homogene als eine granuläre Verteilung des Eisens und der Eisenproteine beobachtet (3.4.2 S.74; Abb. 3.18 S.74; Abb. 3.6 S.63; ebenfalls u.a. in [BEN93, MOO00, ORT07]). Mögliche Erklärungen sind die Internalisierung membrangebundener Eisenproteine in Vesikel (Tf, TfR, DMT1; Abb. 1.4 S.29), die zum größeren Endosom fusionieren, die Selbstassoziation von Proteinen oder die bevorzugte Bindung an bestimmte Strukturen.

Eine gesonderte Struktur stellte der Nukleolus dar. Auch wenn er durch sein geringes Volumen letztlich nur 1% zum Gesamtzeleisen beiträgt, besitzt er eine höhere Eisenkonzentration als das Zytoplasma (Abb. 3.5 S.61). Eisen-spezifische Proteine hingegen kommen nur wenig im Nukleolus vor (Abb. 3.16 S.72, Abb. 3.17 S.73), so daß das Eisen vermutlich an andere Strukturen bindet. Der Nukleolus ist Ort der ribosomalen RNA-Synthese (rRNA) und des Ribosomenzusammenbaus und besitzt neben DNA eine besonders hohe Konzentration an RNA und Proteinen [STE59, ALB95]. Er ist nicht von einer Membran umgeben, sondern wird durch die spezifische Bindung von Ribosomen-Vorläufern zu einem fibrillären, granulären Netzwerk geformt [ALB95, BOI07, SIR08]. Durch die dichte Struktur des Nukleolus (siehe auch lichtmikroskopisches Bild in Abb. 3.4 auf S.62) sind die Elemente besonders konzentriert, so daß neben Eisen auch andere Elemente (u.a. P, S, Ca) im Nukleolus angereichert sind (3.1.4 S.61, Abb. 3.4 S.62). Aufgrund der vielen Proteine im Nukleolus, von denen 700 identifiziert, aber funktionell zum Teil noch unbekannt sind [AND02, LAM05, BOI07], könnte insbesondere Eisen essenzieller Bestandteil von Proteinen sein (z.B. von rRNA-/Ribosomensynthese-Enzymen, extramitochondrialen Fe-S-Proteinen wie DNA-Reparaturproteine [YAR05, ROU05]). Eisen bindet auch an RNA, wobei rRNA eine höhere Eisenbindungskapazität als mRNA oder tRNA besitzt [HON05]. Dies trägt vermutlich zur hohen Eisenkonzentration explizit im Nukleolus bei. Das zur Markierung des PN verwendete Nickel bindet ebenfalls an spezifische Strukturen im Nukleolus (unbekannterweise vielleicht auch an rRNA). Ein Protein kommt dafür nicht in Betracht, da die Färbung an fixiertem Gewebe durchgeführt wurde. Zudem ist kein humanes Gen für ein Nickel-bindendes Protein bekannt [WIL03].

## 4.2.5 Eisenprotein- und mRNA-Expression

### Zusammenführung der methodischen Ergebnisse

Um die Homologie der Endpunkte der Eisenprotein-Expression zu beurteilen, wurde in Ergänzung zur zusammenfassenden Tabelle im Ergebniskapitel (Tab. 3.2 S.81) die Ab-

bildung 4.2 erstellt. In dieser sind die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Art und der Anzahl der Techniken dargestellt, die eine Eisenprotein-erhöhung in den PN-tragenden Zellen verifizieren. Tf, TfR und Ferritin H wurden mit qRT-PCR, Western Blot und sbLSZ untersucht, Ferritin L, MTP1 und DMT1 mit Western Blot und sbLSZ. Western Blot und qRT-PCR erfolgten am Homogenat und sind daher eher ergänzende Techniken zum sbLSZ-ermittelten zellulären Eisenproteingehalt der PN-positiven Neurone.

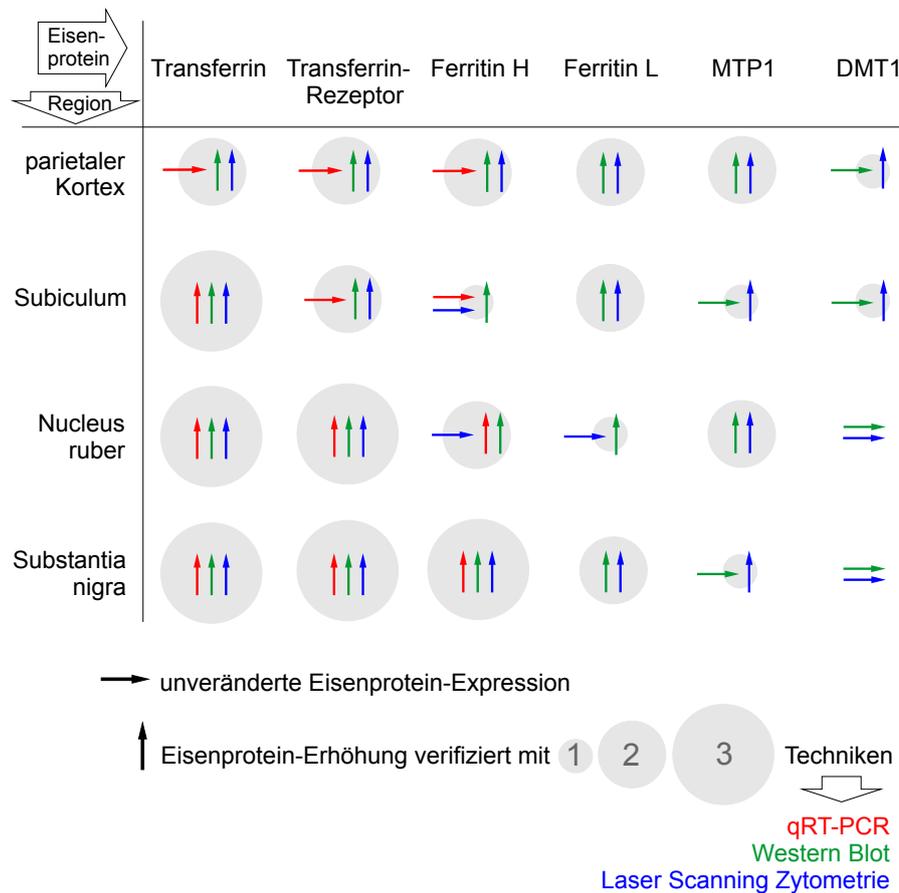


Abb. 4.2: Art (qRT-PCR, Western Blot, Laser Scanning Zytometrie) und Anzahl (Flächengröße) der angewandten Techniken, die eine erhöhte Eisenproteinexpression in den PN-tragenden Neuronen in den untersuchten Hirnregionen verifizieren.

Die Abb. 4.2 zeigt deutlich, daß in PN-positiven Neuronen bzw. PN-reichen Hirnregionen die Eisenprotein-/mRNA-Expression erhöht ist. Nur im Einzelfall (DMT1: NR, SN) gibt es keine Veränderung. Eine Abnahme der Eisenproteine/mRNA in PN-positiven Neuronen bzw. PN-reichen Hirnregionen wurde nie beobachtet.

In der Abbildung sind auch regionale Unterschiede anhand der unterlegten Flächengröße erkennbar. Dabei verhalten sich die Ergebnisse für den PK homogen (Erhöhung der Eisenproteine mit jeweils zwei Techniken (DMT1 eine Technik) verifiziert), die für den NR und die SN dagegen schwanken zwischen einer markanten Erhöhung von Tf und TfR (mit drei Techniken belegt) und keiner Veränderung von DMT1. Eisenproteine, die mit allen oder den meisten angewandten Techniken eine Erhöhung zeigen, sind in PN-positiven Neuronen (in der jeweiligen Region) vermutlich auffällig erhöht und

besitzen zu den PN-negativen Neuronen eine für die Detektion ausreichende Konzentrationsdifferenz.

### Transferrin und Transferrin-Rezeptor

Alle drei angewandte Techniken (3.2 S.65, 3.3.1 S.68, 3.5.4 S.79) zeigen eine auffällige PN-assoziierte Erhöhung von Tf und TfR (Abb. 4.2 S.94). Da über den Tf-TfR-vermittelten Endozytoseweg Eisen in die Zelle transportiert wird (1.2.3 S.30, Abb. 1.4 S.29), sollte der Eisenimport der PN-tragenden Neurone größer als der der PN-negativen Neurone sein. Durch den höheren mRNA-Gehalt wird eine hohe Syntheserate und ein hoher Nachschub an Proteinen angezeigt, welche in ihrer Lebensdauer 100–200 Zyklen durchlaufen [TEM02]. Der Tf-TfR-Weg stellt vermutlich nicht nur die Haupteisenversorgung der Neurone allgemein [ROU06], sondern insbesondere der eisenreichen PN-tragenden Neurone dar. Das Tf wird wahrscheinlich weniger von den Neuronen selbst, als zum Großteil (~90%) von Oligodendrozyten synthetisiert und anschließend von den Neuronen als Tf-Fe-Komplex internalisiert [CON90, BRA97, MOO00, BEA05, QUE08]. Die Internalisierung des Tf muß direkt nach dessen Synthese vonstatten gehen, da der erhöhte regionale Tf-Gehalt (3.2.2 S.67, 3.3.1 S.68), bei dem Oligodendrozyten nicht ausgeschlossen sind, mit einem erhöhten Tf-Gehalt in den Neuronen bestätigt wurde (3.5.4 S.79) und Tf immunhistochemisch eindeutig in Neuronen lokalisiert war (3.16 S.72, 3.17 S.73). Der TfR und das am Tf-TfR-Weg beteiligte DMT1 wird von den Neuronen selbst synthetisiert [MOO96, ROU06].

Tf ist ein sehr wirkungsvoller Eisenchelator ( $K_a^5 \approx 10^{22} \text{ M}^{-1}$ ) [TEM02]. Der erhöhte Gehalt an Tf in den PN-positiven Neuronen mindert so die Eisen-induzierte Toxizität freier Radikale (siehe 1.2.1 S.25). Aufgrund der erhöhten Eisenkonzentration in den PN-tragenden Zellen ist anzunehmen, daß zusätzlich mehr Tf-Moleküle als durchschnittlich 30% [AIS01] mit Eisen beladen sind und über den TfR in die Zelle transportiert werden, was die protektive Wirkung des Tf gegenüber Eisen-induzierten oxidativen Stress noch effektiver macht.

Tf bindet ausschließlich  $\text{Fe}^{3+}$ . In 4.2.2 auf S. 90 wurde bereits die potentielle, intensive Interaktion von Astrozyten und PN-tragenden Neuronen diskutiert, die möglicherweise an dieser Stelle den Tf-TfR-Weg unterstützt. Astrozytenfortsätze exprimieren die Ferroxidase Caeruloplasmin, die extrazelluläres  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert [ROU06]. Das Caeruloplasmin kann über GPI<sup>6</sup> in der Membran verankert sein und zu Nachbarzellen transferieren [JEO03]. Dem Tf würde so mehr  $\text{Fe}^{3+}$  zur Bindung bereit stehen, welches anschließend in das Neuron importiert werden kann. Bei Patienten mit Acaeruloplasminämie fehlt die Ferroxidase-Aktivität des Caeruloplasmins aufgrund einer Genmutation, so daß Eisen u.a. im Gehirn, auch in den Astrozytenfortsätzen (in sog. grumose foamy spheroid bodies), akkumuliert [JEO03].

### Ferritin H und Ferritin L

Durchschnittlich wurde ein höherer Gehalt an Ferritin H und Ferritin L in PN-reichen Regionen / PN-tragenden Neuronen festgestellt (Abb. 4.2 S.94). Die regionalen Ergeb-

---

<sup>5</sup>Assoziationskonstante

<sup>6</sup>engl.: glycoposphosinositide

nisse der Techniken waren nicht so kontinuierlich einheitlich wie für Tf und den TfR. Im Western Blot wurde ein höherer Proteingehalt von Ferritin H und L in allen untersuchten PN-reichen Regionen festgestellt (Abb. 3.13 S.69), bei der zellulären Analyse mittels sbLSZ hingegen zeigte z.B. der PN-reiche NR keine Änderung im Ferritingehalt (Abb. 3.20 S.80). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß Gliazellen auf den Eisenhaushalt des eisenreichen NR [ROS94, WIL03, SEE94] Einfluß nehmen und die PN-tragenden Neurone durch dieses Umfeld nicht selbst den Ferritingehalt durch posttranskriptionelle Regulation erhöhen (siehe 1.2.3 S.31). Han et al. [HAN02] allerdings fanden Ferritin-mRNA im Gegensatz zum Protein nur in Neuronen und vermuten, daß das Ferritinprotein nach der Synthese in andere Zellen transportiert werden kann. Möglicherweise richtet sich die Translokation nach dem Bedarf.

Wahrscheinlicher aber ist die Heterogenität des dennoch eindeutig höheren PN-assoziierten Gehalts an Ferritin H und Ferritin L damit zu erklären, daß zur Speicherung von mehr Eisen nicht unbedingt eine größere Anzahl von Ferritinmolekülen nötig ist. Das Ferritinmolekül kann bis zu 4500 Eisenionen binden, ist im Gehirn durchschnittlich aber nur zu 20% gesättigt [CRI01] (siehe 1.2.3 S.28). Bei einer erhöhten Eisenspeicherung würden womöglich nicht gleich mehr Ferritinmoleküle synthetisiert, sondern die vorhandenen mit Eisen voll beladen werden. Erst bei Sättigung der Ferritinmoleküle würde dann eine vermehrte Synthese (über postsynaptische Regulation) einsetzen und diese messbar sein. Mehlhase et al. [MEH05] untersuchten den Ferritingehalt kultivierter Mikrogliazellen bei Eisen-induziertem oxidativen Stress. Sie stellten eine Halbwertszeit des Ferritinmoleküls von 3–3,5 h fest, die sich bei oxidativem Stress reduziert. Eine Erhöhung des Ferritingehalts wurde aber nicht beobachtet, so daß sie vermuten, daß eine erhöhte Eisenspeicherkapazität allein durch die Ferritinsättigung erreicht und so der oxidative Stress kompensiert wurde.

Ferritin speichert  $\text{Fe}^{3+}$  sehr effektiv. Im Vergleich zum Tf-Molekül beträgt die Konzentration von Tf zu Ferritin im menschlichen Gehirn 1 zu 10 und die Bindungskapazität 1 zu 1500 [CON90, CON92, BRA97]. Folglich ist das meiste Eisen im Gehirn an Ferritin gebunden (siehe 1.2.3 S.28). Ferritin kann durch seine Ferroxidaseaktivität toxisches  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  umwandeln und es in dieser Form binden und speichern. Ferritin wirkt daher gegenüber Eisen-induzierten oxidativen Stress protektiv [HAR96, TEM02]. Eine Überexpression von Ferritin reduziert den labilen Eisenpool (LIP), die Anzahl reaktiver Sauerstoffradikale und den oxidativen Stress [EPS99, COZ00, ORI01]. Ferritin, insbesondere Ferritin H, kann neben dem traditionellen Vorkommen im Zytoplasma auch im Zellkern vorkommen, wo es vermutlich zum Schutz der DNA durch die Reduktion des reaktiven Eisens dient [THO02, SUR04]. Die höhere Ferritinkonzentration der PN-tragenden Neurone gegenüber den PN-negativen Neuronen würde einen besseren Schutz vor oxidativem Stress bieten.

Ferritin H besitzt Ferroxidaseaktivität, Ferritin L dient eher als Eisenlangzeitspeicher (siehe 1.2.3 S.28). Daß Ferritin H mehr in Neuronen und Ferritin L mehr in Gliazellen lokalisiert ist (siehe 3.4.1 S.71), läßt sich mit den angewandten Methoden nicht zeigen. Die Neurone exprimierten ohne optisch erkennbare Prävalenz beide Proteine (Abb. 3.17 S.73). Vereinzelt Gliazellen waren allerdings anhand ihrer Ferritin L-Färbung morphologisch identifizierbar, nicht aber in der Ferritin H-Färbung.

Es wird beschrieben, daß im Gehirn der Anteil an Ferritin H höher als an Ferritin L

ist [BRA97, HAN02]. Han et al. [HAN00] nennen ein Verhältnis von Ferritin H zu Ferritin L im Rattenhirn von ca. 45:1 (Protein) bzw. 6:1 (mRNA). Im Western Blot wurde zwar, relativiert auf  $\beta$ -Actin, ein 10-fach höheres Signal für Ferritin L als für Ferritin H erhalten, allerdings sind beide Ferritinproteine nicht direkt miteinander vergleichbar (siehe 4.1.3 S.86) und eine Aussage daher nicht möglich. Bei der zellulären Analyse allerdings zeigte das Ferritin L eine auffälligere Änderung in den verschiedenen Regionen als Ferritin H, was darauf hindeuten könnte, daß insbesondere der Gehalt der L-Ketten verändert ist. In den PN-tragenden Neuronen wäre demzufolge allgemein nicht nur die Konzentration an Ferritin H und Ferritin L höher als in den PN-negativen Neuronen, sondern es wäre möglicherweise auch der relative Anteil von Ferritin L erhöht. PN-positive Neurone könnten damit nicht nur mehr  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidieren, sondern selbst oxidiertes oder bereits in der  $\text{Fe}^{3+}$ -Form vorhandenes Eisen langfristig speichern und den oxidativen Stress reduzieren. Eine vermehrte Speicherung des Eisens für metabolische Funktionen ist ebenfalls möglich.

### DMT1 und MTP1

Im Western Blot wurde für MTP1 partiell regional und durchschnittlich ein PN-assoziiertes höheres Proteingehalt ermittelt, für DMT1 hingegen wurde keine Änderung festgestellt (Abb. 3.14 S.70). Bei der Western Blot-Analyse lagen manche Unterschiede womöglich an der Fehlergrenze (siehe 4.1.2 S.85), denn bei der zellulären Analyse fielen die Ergebnisse eindeutiger aus (Abb. 3.20 S.80). Der MTP1-Gehalt war in den PN-tragenden Neuronen kontinuierlich höher, der DMT1-Gehalt zumindest im PK und dem SUB erhöht. Die regionalen Unterschiede im DMT1-Gehalt könnten von der unterschiedlichen Sensitivität der Hirnregionen gegenüber dem Eisenhaushalt abhängig sein [BEA03]. Erikson et al. [ERI97] zeigten, daß bei einer Eisenmangeldiät manche Hirnregionen (SN, Thalamus) ihr Eisen behalten und andere (Kortex, Hippocampus) es verlieren. Die DMT1-Expression im grundsätzlich eisenreichen NR verhält sich womöglich weniger sensitiv.

Im Gegensatz zum Tf und TfR (4.2.5 S.95) war die PN-assoziierte Erhöhung von DMT1 generell nicht ganz so stark ausgeprägt. DMT1 ist in den Tf-TfR-Weg involviert, indem es  $\text{Fe}^{2+}$  aus dem Endosom in das Zytoplasma transportiert (1.2.3 S.30). Möglicherweise aber hat der Tf-TfR-vermittelte Eisenimport eine größere Bedeutung für die (PN-tragenden) Neurone, als der Tf-TfR-unabhängige Eisenimport in die Zelle über DMT1. Würde DMT1 exzessiv  $\text{Fe}^{2+}$  importieren, bestünde die Gefahr der vermehrten Radikalbildung über die Fenton-Reaktion [TEM02] (siehe 1.2.1 S.25).

Von DMT1 sind vier Proteinisoformen bekannt, von denen zwei das Eisen-reaktive Element (IRE) besitzen (DMT1 IRE+), die anderen zwei nicht (DMT1 IRE-) [ROT03]. Der verwendete Antikörper richtet sich gegen das DMT1 IRE+, das wie beobachtet (Abb. 3.16 S.72) vorwiegend im Zytoplasma, im Gegensatz zu DMT1 IRE- aber nicht im Zellkern exprimiert wird [GAR03]. Das DMT1 IRE- könnte demnach zusätzlich zum DMT1 IRE+ in den PN-tragenden Neuronen verändert sein. Die posttranskriptionelle Regulation von DMT1 und MTP1 wurde trotz vorhandener IREs noch nicht nachgewiesen (1.2.3 S.31).

Der PN-assoziierte höhere MTP1-Gehalt lässt schlussfolgern, daß nicht nur der Eisenimport, sondern auch der Eisenexport der PN-tragenden Neuronen höher als der

PN-negativen Neuronen ist. Höchstwahrscheinlich wird überschüssiges intrazelluläres Eisen als  $\text{Fe}^{2+}$  aus der Zelle heraus transportiert. Dies kann zuvor gebundenes  $\text{Fe}^{3+}$  sein, was (durch DcytB) zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wurde. Möglicherweise wird aber auch ein Großteil freies oder nur schwach gebundenes  $\text{Fe}^{2+}$  aus dem labilen Eisenpool (1.2.3 S.31) aus der Zelle transportiert und so der intrazelluläre oxidative Stress reduziert. Das exportierte  $\text{Fe}^{2+}$  wird vermutlich sofort zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert, da der Eisenexport über MTP1 von der, bereits beim Tf/TfR (4.2.5 S.95) erwähnten, Ferroxidase GPI-Caeruloplasmin abhängig zu sein scheint [JEO03]. Ist der MTP1-Export gestört, z.B. durch eine Mutation wie bei der hereditären Hämochromatose [JEO03, DOM07] oder durch den Knockout des an IRE bindenden Eisen-regulatorischen Proteins (IRP, 1.2.3 S.31) [ROT03], kommt es zu Eisenablagerungen und neurodegenerativen Fehlfunktionen ähnlich wie bei PD [ROT03].

Einige Autoren stellen bei Eisenmangel einen Anstieg des mRNA-Gehalts von DMT1 und eine Abnahme von MTP1 fest (siehe 1.2.3 S.31 [TEM02, EIS03]). Andere finden bei Eisenüberschuß/-mangel keine veränderte Gen- und Proteinexpression von MTP1 [WU04] und DMT1 [KE05]. Möglicherweise läuft die Eisenregulation bei einem akut und chronisch veränderten Eisenhaushalt unterschiedlich ab. Der erhöhten Eisenkonzentration in den PN-tragenden Neuronen (Abb. 3.3 S.60) wird vermutlich ein kontinuierlicher und weniger akuter Prozess zugrunde liegen.

#### 4.2.6 Eisenproteine vs. Neurodegeneration

Wie unter 1.2.1 auf S.25 erläutert, ist Eisen in freier, ungebundener Form toxisch, da es reaktive Sauerstoffradikale und somit oxidativen Stress induzieren und Zellkomponenten schädigen und zur Degeneration führen kann. In den gegenüber degenerativen Prozessen weniger vulnerablen PN-tragenden Neuronen wurde eine erhöhte intrazelluläre Eisenkonzentration festgestellt (3.1.3 S.60). Wie in 4.2.1 auf S.89 bereits vermutet, muß das Eisen in einer nicht-toxischen Form in den PN-positiven Neuronen vorhanden sein. Mit der in 4.2.5 auf S.93 diskutierten Erhöhung der Eisen-spezifischen Proteine/mRNA in den PN-tragenden Neuronen lässt sich diese Vermutung belegen. Es ist der Import (Tf, TfR, DMT1), die Speicherung (Ferritin H, Ferritin L) und der Export (MTP1) von Eisen in den PN-positiven Neuronen gegenüber den PN-negativen Neuronen erhöht. Es wird angenommen, daß ein ausgeglichener, kontrollierter Eisenhaushalt in den Neuronen vorherrscht, da neben der Eisenspeicherung ein vermehrter Import und zugleich ein vermehrter Export eine Regulation erfordern. Tf und Ferritin spielen zusammen bei der Eisenhomöostase vermutlich die entscheidende Rolle [QUE08]. So erhöht sich im gesunden Alter die Konzentration von Ferritin im Gehirn [ROS94, CON95A] und kompensiert vermutlich den vermehrten, oxidativen Stress. Eine unregulierte Freisetzung des Eisens vom Ferritin hingegen führt wiederum zu oxidativen Stress [HAR96]. Dieses Gleichgewicht des Schutzmechanismus ist bei neurodegenerativen Erkrankungen offensichtlich gestört (siehe 1.2.2 S.27).

Eisenproteine sind Antioxidantien, die durch die Chelation des freien Eisens ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und dessen Umwandlung in den Redoxstatus  $\text{Fe}^{3+}$  die Reaktion mit Sauerstoffradikalen oder Peroxyden vermindern [VAL05, DRI05]. Durch den hohen Gehalt an Eisenbindenden Proteinen reduziert sich somit für die Subpopulation der PN-tragenden Neurone der oxidative Stress und die Zellen zeigen keine oder verspätet Anzeichen einer

Degeneration oder neuropathologische Merkmale (1.1.4 S.23, 1.3 S.31). Ein gestörter Eisenproteinhaushalt wird bei neurodegenerativen Erkrankungen wie AD und PD in den betroffenen Hirnregionen beobachtet (siehe Einleitung 1.2.2 S.27 & [ROS94, CON95A, BUR03]).

Neben der protektiven Funktion des erhöhten Eisenproteingehalts gegenüber Eisen-induziertem oxidativen Stress (1.2.1 S.25) könnten die Eisenproteine auch eine ausreichende Versorgung mit Eisen gewährleisten und einem Eisenmangel vorbeugen. Das Gehirn kann Eisen gut konservieren, so daß nach einer Eisenmangeldiät die Konzentration des Eisens nur leicht sinkt [ROU06]. Diese Fähigkeit ist bei den PN-tragenden Neuronen mit ihrem hohen Gehalt an Eisen-spezifischen Proteinen möglicherweise besonders ausgeprägt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die PN-positiven Neurone grundsätzlich einen hohen Bedarf an Eisen haben könnten und deshalb mehr Eisenproteine als die PN-negativen Neurone exprimieren. Dieser Ansatz wird in 4.2.8 auf S.102 diskutiert.

### 4.2.7 Einfluß des PN auf den zellulären Eisenhaushalt

Eisenbindungsstudien zeigten, daß das PN aufgrund seiner negativen Ladung bis zu viermal mehr Eisen bindet als andere Strukturen im Hirnschnitt [REI03]. Das am PN gebundene Eisen liegt dabei vorwiegend als  $\text{Fe}^{3+}$  in einer chemischen Verbindung vor, wie sie u.a. für Ferritin typisch ist [MOR04C]. Das PN könnte demnach extrazelluläres freies Eisen in einer nicht-toxischen Form ähnlich Ferritin oder Transferrin binden und die Fenton-Reaktion (1.2.1 S.25), extrazellulär insbesondere die Lipidperoxidation, verhindern. Das PN hätte demzufolge eine potentiell protektive Funktion (siehe 1.3 S.31, [REI03, MOR04B, FIE07]).

Die mittels Ionenstrahlmikroskopie ermittelte physiologische Eisenkonzentration am PN entspricht der des umgebenen Neurons (3.1.3 S.60). Es wird demnach nicht exzessiv Eisen am PN gespeichert, sondern das (extrazelluläre) Eisen vermutlich eher kurz gebunden ("gepuffert"), was der losen Eisenbindung an der EZM, z.B. an Glykane und Sulfonate, nach Esposito et al. [ESP02] entspricht. Eisenproteine wie Tf sind nicht am PN gebunden, sondern nur intrazellulär lokalisiert (4.2.4 S.92). Der erhöhte intrazelluläre Gehalt an Eisentransport- und Eisenspeicherproteinen spricht für einen anschließenden Transport des Eisens vom PN in die Zelle. Da das PN und das Neuron den gleichen Eisengehalt aufweisen und womöglich eng interagieren, könnte das PN als extrazelluläre Struktur das "Zellvolumen vergrößern" und den zellulären Eisenhaushalt durch seine zusätzliche Eisenbindungskapazität beeinflussen. Der lokale Eisen-induzierte oxidative Stress würde durch das Eisen-bindende PN reduziert werden und das Neuron, wie für die PN-tragenden Zellen beschrieben (1.1.4 S.23, 1.3 S.31), weniger vulnerabel gegenüber einer Degeneration sein. Der erhöhte Gehalt an intrazellulärem Eisen und Eisenproteinen der PN-positiven Neurone gegenüber den PN-negativen Neuronen unterstützt somit die potentiell protektive Funktion (siehe 1.1.3 S.22) des PN gegenüber Eisen-induziertem oxidativen Stress.

Die Eisenbindungskapazität und somit der protektive Effekt ist möglicherweise größer, je kräftiger das PN ist. PN-tragende Neurone weisen zwar generell seltener Lipofuszin (Indikator für Eisen-katalysierten oxidativen Stress 1.3 S.31) als PN-negative Neurone auf und Pyramidenzellen und Interneurone unterscheiden sich nicht in ihrer intrazellulären Eisenkonzentration. Dennoch lagern die mit einem dünnen PN ausge-

statteten Pyramidenzellen häufiger Lipofuszin als Interneurone mit einem dicken PN ein [MOR04B]. Zur negativen Ladung der PNs trägt vermutlich insbesondere das Chondroitinsulfat bei, aber auch andere Komponenten wie die Hyaluronsäure. Da sich PNs nicht nur morphologisch unterscheiden, sondern auch chemisch heterogen sind, ist eine unterschiedliche Eisenbindungskapazität auch für die verschiedenen Subpopulationen der PN-tragenden Neurone denkbar.

Morawski et al. [MOR06] schlägt ein Schema vor, in welchem das am PN gebundene  $\text{Fe}^{3+}$  durch eine Ferrireduktase zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert und über DMT1 in die Zelle transportiert wird. In Ergänzung zu diesem Schema zeigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß neben dem DMT1 der Tf-TfR-vermittelte Import des (PN-gebundenen) Eisens eine entscheidende Rolle einnimmt. Dieser Transportweg bedarf zum Import keiner Reduktion des Eisens. DMT1 ist beim späteren Transport des Eisens aus dem Endosom ins Zytoplasma, und bei diesem Schritt auch eine Ferrireduktase, notwendig. In der Zelle kann das Eisen als  $\text{Fe}^{3+}$  in Ferritin gespeichert oder von anderen Proteinen gebunden werden (siehe Abb. 1.4 S.29). Das PN könnte auch als Kurzzeitspeicher für exportiertes Eisen dienen. Das bisher einzig bekannte Exportprotein MTP1 transportiert nur zweiwertiges Eisen, welches nach dem Export durch eine Ferroxidase wie potentiell zirkulierendes Caeruloplasmin oder membranständiges Hephaestin (1.2.3 S.30, Abb. 1.4 S.29) oxidiert wird.

Eine membranverankerte Form des Caeruloplasmins (GPI-Caeruloplasmin, 4.2.5 S.95) exprimieren die Astrozyten [ROU06]. Zwischen den Astrozyten und den PN-tragenden Neuronen wird, wie in 4.2.2 auf S.90 näher beschrieben, eine enge Interaktion vermutet [DER96]. Die Fortsätze der Astrozyten, die das PN penetrieren, unterstützen womöglich durch die GPI-Caeruloplasmin-vermittelte Oxidation des im Mikromilieu vorhandenen oder vom Neuron exportierten  $\text{Fe}^{2+}$ . Das nicht-toxische  $\text{Fe}^{3+}$  kann nun an Tf oder an das PN binden. Die astrozytären Ausläufer kommen dennoch nicht nur an Neuronen mit PN, sondern auch an Neuronen ohne PN vor [BLÜ95]. Es wird angenommen, daß das PN Synapsen stabilisiert (1.1.3 S.22, [HOC90A, BRÜ03, GAL07]). Die enge Beziehung von PN-tragendem Neuron und Astrozyt läßt spekulieren, daß das PN eine weitere potentielle Funktion hat: die Stabilisierung der Astrozytenfüße. Durch den stabilisierten engen Kontakt wäre eine permanent gute Versorgung mit Ferroxidasen anzunehmen, die dem PN-tragenden Neuron Vorteile für dessen Eisenhomöostase verschafft. Da Astrozyten keinen TfR exprimieren [MOO07], könnte der Astrozyt auch das vom Neuron exportierte oder am PN-gebundene Eisen importieren. Die hypothetische Interaktion zwischen PN-tragendem Neuron und Astrozyt wäre wahrscheinlich eine regulierte Wechselbeziehung zur Herstellung eines Gleichgewichts, die den Eisenhaushalt beider Zelltypen berücksichtigt. Für die Vorteile eines PN-stabilisierten Kontakts zum Astrozyten spricht ein weiterer Aspekt, der die Reduktion des oxidativen Stresses betrifft. Glutathion (GSH) ist ein essenzielles, zelluläres Antioxidans, das eine Schlüsselrolle bei der Reduktion des oxidativen Stresses einnimmt (siehe 1.2.1 S.25). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie PD, AD und Chorea-Huntington als auch bei Schizophrenie und Epilepsie wird eine Reduktion des GSH-Gehalts im Gehirn beobachtet [DRI03]. GSH wird von keinem anderen neuronalen Zelltyp in solch einer substantiellen Menge freigesetzt wie von den Astrozyten (in 1 h  $\sim 10\%$  ihres intrazellulären GSH) [DRI03]. Das sezernierte GSH wird direkt oder dessen Bausteine Cystein und

Glycin von den benachbarten Neuronen aufgenommen, wo es als Quelle für intraneuronales GSH dient (Schema siehe [DRI03]). Astrozyten spielen somit eine essentielle Rolle für den GSH-Metabolismus der Neurone [DRI03, DRI05]. Eine Stabilisierung der Astrozytenfortsätze durch das PN könnte die Effizienz dieses Mechanismus erhöhen und das PN-tragende Neuron noch besser mit GSH versorgen und vor oxidativem Stress schützen.

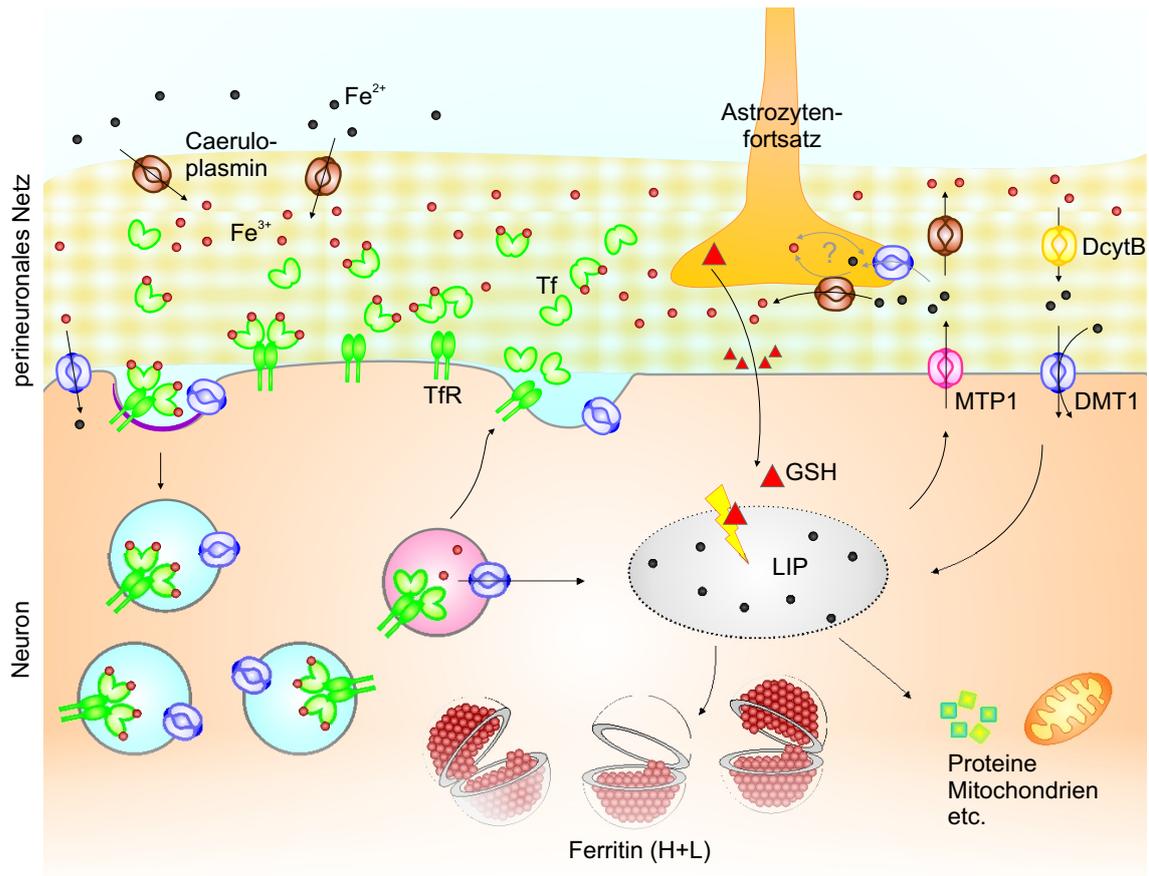


Abb. 4.3: Hypothetisches Model zum Eisentransport und zur Eisenspeicherung eines PN-tragenden Neurons (im Vergleich zur allgemeinen Abb. 1.4 auf S.29). Extrazelluläres, freies  $\text{Fe}^{2+}$  wird (vermutlich durch Caeruloplasmin) zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert und vom PN gebunden. Ein Großteil des Eisens wird anschließend über den Tf-TfR-Weg in das Neuron transportiert, ein geringerer Teil wird direkt durch DMT1 (event. nach Reduktion durch DcytB) importiert. Im Neuron wird das meiste Eisen als unschädliches  $\text{Fe}^{3+}$  in Ferritin gespeichert. Die Ferritinmoleküle sind dabei mit überdurchschnittlich viel Eisen beladen und minimieren den labilen Eisenpool (LIP). Überschüssiges Eisen kann von MTP1 exportiert werden. An der Oxidation des vom Neuron exportierten  $\text{Fe}^{2+}$  ist das membran-gebundene Caeruloplasmin der PN-stabilisierten Astrozytenfortsätze beteiligt. Das Eisen kann z.T. von den Astrozytenfortsätzen aufgenommen werden oder bindet als  $\text{Fe}^{3+}$  wieder an Tf oder am PN. Die Astrozytenfortsätze entlassen zudem das Antioxidans Glutathion (GSH), dessen Bestandteile das PN-tragende Neuron für die eigene GSH-Synthese nutzt und den oxidativen Stress (gelber Blitz) reduziert.

## Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde für alle untersuchten Regionen (PK, SUB, NR, SN) festgestellt, *daß* die Konzentration an Eisen und Eisen-spezifischen Proteinen in den PN-tragenden Neuronen höher als in den PN-negativen Neuronen ist. Die potentiell protektive Funktion des PN gegenüber Eisen-induziertem oxidativen Stress wird durch die Ergebnisse unterstützt. In der Diskussion wurden hypothetische Ansätze gesucht, die erklären, *warum* die Eisenkonzentration und der Eisenproteingehalt in den PN-tragenden Neuronen erhöht ist. Das PN und das Neuron könnten Eisen binden und speichern, weil es für die Zelle potentiell toxisch ist (protektive Funktion) und/oder, weil das PN-tragende Neuron, z.B. durch eine hohe metabolische Aktivität, einen grundsätzlich höheren Eisenbedarf hat (metabolische Funktion, siehe Ausblick 4.2.8 S.102). Aufgrund der speziellen extrazellulären Matrix und des hohen Eisenproteingehalts wird vermutet, daß PN-tragende Neurone einen Eisen-induzierten oxidativen Stress und eine Änderung im Eisenhaushalt besser kompensieren können als Neurone ohne PN. Dies trägt zur anfänglich geschilderten (1.1.4 S.23, 1.3 S.31) geringen Vulnerabilität der PN-tragenden Neurone bei neurodegenerativen Erkrankungen bei.

### 4.2.8 Ausblick

Unter 4.2.7 auf S.102 wurde angesprochen, daß ein grundsätzlich hoher Bedarf an Eisen und somit Gehalt an Eisen-spezifischen Proteinen der PN-tragenden Neurone nicht ausgeschlossen werden kann. Ursache eines hohen Bedarfs an Eisens, welches essentiell für viele zelluläre Prozesse ist (siehe 1.2 S.25), könnte eine hohe metabolische Aktivität der Zelle sein [FIE07]. Die Zytochromoxidase-Aktivität ist Indikator für Zellen mit hohem metabolischen Energieumsatz [WON89]. Daß die Aktivität und nicht zwangsläufig die Menge des Enzyms entscheidend ist, wird am Beispiel der AD deutlich, bei der die Zytochrom-C-Oxidase-Aktivität, nicht aber das Enzym selbst reduziert ist [CHR00]. Da es Hinweise auf eine starke Zytochromoxidase-Aktivität der PN-tragenden Neurone gibt (siehe 1.1.2 S.20), wurde als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen die Aktivität der ZytochromC-Oxidase, Enzym der mitochondrialen Atmungskette, histochemisch in einer Doppelmarkierung mit den PNs dargestellt (Abb. 4.4).

Auf regionaler Ebene in PN-reichen Hirnregionen (Abb. 4.4 A) sowie auf zellulärer Ebene (Abb. 4.4 B) wurde unabhängig vom Neuronentyp eine auffällig starke Reaktion in den PN-tragenden Zellen gefunden. PN-positive Neurone scheinen somit einen hohen Energiemetabolismus und möglicherweise auch einen dadurch bedingten hohen Bedarf an Eisen zu besitzen. Allerdings gibt es vereinzelt Neurone, die eine auffällige ZytochromC-Oxidase-Aktivität besitzen, aber kein WFA-bindendes PN tragen. Somit besteht für die hohe metabolische Aktivität eines WFA-positiven Neurons, wie auch für die häufige Korrelation einer schnellen, neuronalen Aktivität und dem Vorhandensein eines PN (1.1.2 S.20), keine universelle Gültigkeit. Auch Horn et al. [HOR03] fanden PN-tragende Neurone mit einer auffällig starken Zytochromoxidase-Aktivität, vermerken dies aber als keine einheitliche Markierung von PN-tragenden Zellen. Der Einfluß der chemischen Heterogenität der PNs wäre zu prüfen.

Eine hohe metabolische Rate würde generell eine ausreichende Energie-Produktion durch die Mitochondrien voraussetzen. In weiteren Untersuchungen könnte man da-

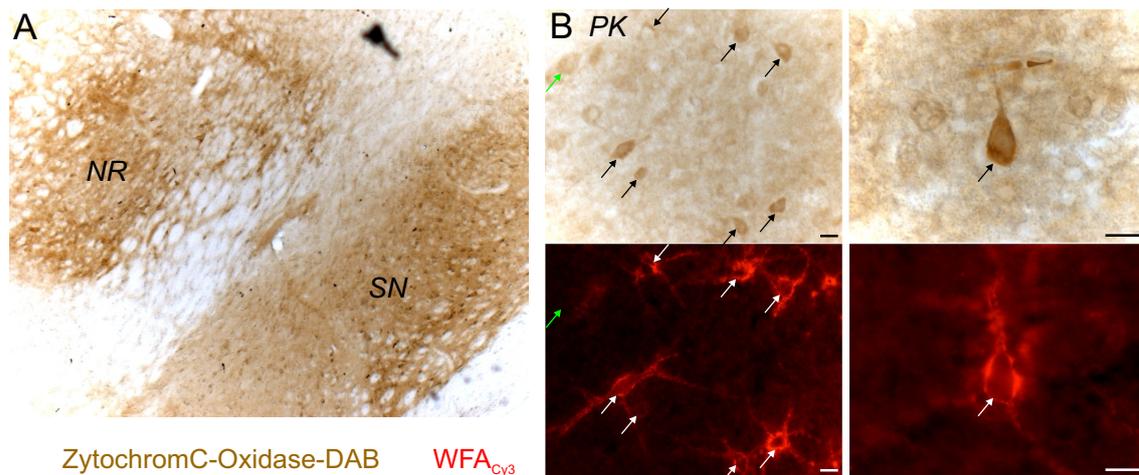


Abb. 4.4: Enzymaktivität der ZytocromC-Oxidase als Maß der Metabolismusrate in verschiedenen Regionen. PN-reiche Hirnregionen (A) sowie PN-tragende Zellen innerhalb eines Gebietes (B, schwarze und weiße Pfeile) zeigen eine starke Reaktion. Dies ist nicht auf einen bestimmten Neuronentyp beschränkt (B, li: Interneurone, re: Pyramidenzelle). Einzelne Zellen allerdings zeigen ebenso eine starke ZytocromC-Oxidase-Aktivität, tragen aber kein WFA-positives PN (B, grüner Pfeil). Substrat: Zytocrom C (Sigma-Aldrich), Färbung nach [Div95], DAB-verstärkt. Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

her z.B. die Mitochondrien und deren Eisen quantifizieren. Durch eine hohe ATP-Synthese besteht wiederum die Gefahr der vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (1.2.1 S.25). Möglicherweise ist die metabolische Aktivität vieler PN-tragenden Neurone hoch, da sie dem entgegen vermehrt Reparaturproteine und antioxidative Enzyme synthetisieren, die wiederum aber auch ATP benötigen. Es wird ersichtlich, daß durch die Komplexität der Zelle mehrere Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen möglich sind. Eine grundsätzliche Fragestellung könnte sein, ob der hohe Zellmetabolismus Anteil und Ursache am Eisengehalt des PN-tragenden Neuron hat und welche Funktion er besitzt.

Mittels der Ionenstrahlmikroskopie wurde das intrazelluläre, gebundene Eisen WFA-positiver Zellen quantifiziert. Da aufgrund der chemischen Heterogenität der PNs eine unterschiedliche Eisenbindungskapazität möglich ist, könnte eine Eisenkonzentrationsbestimmung für weitere PN-Subtypen mit anderen PN-Markern erfolgen. Das freie oder schwach gebundene Eisen im labilen Eisenpool könnte mit Fluoreszenzsonden quantifiziert werden (siehe 1.4.1 S.33). Des weiteren könnten die vorliegenden Ergebnisse durch die Analyse der untersuchten Eisenproteine (auch zusätzlicher Eisenproteine wie z.B. Caeruloplasmin) mittels zellulärer *in situ*-Hybridisierung und sbLSZ-basierter RNA- und DNA-Quantifizierung vervollständigt werden. Ein weiterer interessanter Ausblick für fortlaufende Untersuchungen mit verschiedenen möglichen Ansatzpunkten ist eine umfassende Studie zum Eisengehalt der Gliazellen und die Prüfung der hypothetischen Beziehung von PN-tragenden Neuronen und Astrozyten.

Diese grundlegenden Ansätze tragen, wie die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auch, zur (hoffentlich) endgültigen Klärung der Funktion des PN bei, das vor mehr als 125 Jahren entdeckt und wegen seiner potentiell protektiven Eigenschaft auf die Neurone im degenerierenden Gehirn, Schwerpunkt der aktuellen Forschung ist.



# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Das perineuronale Netz (PN) ist eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix, das eine heterogene Subpopulation von Neuronen umgibt. Das PN ist negativ geladen und bindet mit hoher Affinität Eisen [REI03, MOR04C]. Eisen hat insbesondere als Kofaktor vieler Enzyme eine essentielle Funktion. Andererseits ist Eisen potentiell toxisch, da besonders freies  $\text{Fe}^{2+}$  über die Fenton-Reaktion reaktive Sauerstoffradikale generieren und oxidativen Stress induzieren kann. Dem Eisen-induzierten oxidativen Stress wird daher ein Beitrag zur Neurodegeneration, wie z.B. bei der Alzheimerschen und Parkinsonschen Erkrankung, zugeschrieben. Nun zeichnen sich gerade die PN-tragenden Neurone durch eine geringe Vulnerabilität bei neurodegenerativen Erkrankungen aus. Es wird daher vermutet, daß das PN eine potentiell protektive Funktion für das Neuron besitzt [MOR04B].

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Eisenhaushalts der PN-tragenden Neurone, der auf eine Protektion gegenüber Eisen-induziertem oxidativen Stress hinweisen könnte. Es wurde die Konzentration an Eisen und Eisenproteinen von Neuronen mit PN und Neuronen ohne PN in Hirnregionen mit vielen WFA<sup>1</sup>-positiven Neuronen (parietaler Kortex, Subiculum, Nucleus ruber, Substantia nigra) der Ratte untersucht. Dabei kamen quantitative Methoden wie die orts aufgelöste Ionenstrahlmikroskopie und die Objektträger-basierte Laser Scanning Zytometrie sowie Western Blot Analysen und quantitative Real-Time-PCR zum Einsatz. Die Ergebnisse sind nachfolgend zusammengefasst.

### Ionenstrahlmikroskopie

- Es wurde erstmals der intrazelluläre Eisengehalt von Zellen im Hirnschnitt orts aufgelöst quantifiziert und unterschiedliche Zellpopulationen direkt miteinander verglichen.
- Beim Vergleich von PN-tragenden Neuronen mit PN-freien Neuronen wurde eine durchschnittlich 30% höhere Eisenkonzentration in den PN-tragenden Neuronen festgestellt ( $\sim 0,74$  mmol/l).
- Die Eisenkonzentration des PN ähnelt der intrazellulären Eisenkonzentration des PN-tragenden Neurons.

---

<sup>1</sup> *Wisteria floribunda*-Agglutinin

- Pyramidenzellen und Interneurone des parietalen Kortex unterscheiden sich nicht in ihrem Eisengehalt.
- Die PN-losen Neurone der Substantia nigra pars compacta besitzen eine geringe, dem Neuropil entsprechende Eisenkonzentration ( $\sim 0,45$  mmol/l).
- Das meiste Eisen, ca. 84%, ist im Zytoplasma lokalisiert. Den höchsten lokalen Gehalt an Eisen (und anderen Elementen) besitzt der dichte Nukleolus.
- Es wurde zusätzlich die Eisenkonzentration ausgewählter Gliazellen im PN-haltigen retrosplenialen Kortex bestimmt. Die Oligodendrozyten besitzen eine ca. 30% höhere Eisenkonzentration ( $\sim 0,95$  mmol/l) als PN-tragende Neurone. Die GFAP-positiven Astrozyten haben eine den PN-tragenden Neuronen ähnliche Eisenkonzentration ( $\sim 0,7$  mmol/l).

### Quantitative RT-PCR / Western Blot

- Auf regionaler Ebene ist der Protein-/mRNA-Gehalt der untersuchten Eisenimportproteine (Transferrin, Transferrin-Rezeptor), Eisenspeicherproteine (Ferritin H, Ferritin L) und Eisenexportproteins (Metalltransportprotein 1, MTP1) in PN-reichen Hirnregionen höher als in einer PN-armen Referenzregion (entorhinaler Kortex).

### Objektträger-basierte Laser Scanning Zytometrie

- Die hier gezeigten Arbeiten belegen den erstmaligen, erfolgreichen Einsatz der Objektträger-basierten Laser Scanning Zytometrie für die Proteinquantifizierung in Zellen im fluoreszenzmarkierten Hirnschnitt.
- Die Eisenproteine sind, wie das Eisen, vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert.
- Die PN-tragenden Neurone besitzen gegenüber PN-negativen Neuronen einen bis über 50% höheren Gehalt an Eisenimportproteinen (Transferrin, Transferrin-Rezeptor, Divalentes Metalltransportprotein 1 (DMT1)), Eisenspeicherproteinen (Ferritin H, Ferritin L) und Eisenexportprotein (MTP1).
- Der relative Anteil WFA-positiver Zellen beträgt im parietalen Kortex und Subiculum ca. 5%, in der Substantia nigra 55% und im Nucleus ruber 70%.

Alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen, daß die Konzentration an Eisen (siehe Abb. 3.3 S. 60) und Eisen-spezifischen Proteinen (siehe Abb. 4.2 S. 94) in den PN-tragenden Neuronen höher als in den PN-freien Neuronen ist. Eisenproteine reduzieren durch die Bindung von Eisen die Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale und wirken somit antioxidativ. Insbesondere Transferrin und Ferritin scheinen die entscheidende Rolle zu spielen. Durch den erhöhten Gehalt an Eisenproteinen sind PN-tragende Neurone besser vor oxidativem Stress geschützt als PN-negative Neurone.

Es besteht die Möglichkeit, daß das PN extrazelluläres freies Eisen bevorzugt bindet und dadurch der Fenton-Reaktion entzieht. Das Eisen wird anschließend kontrolliert

in die Zelle transportiert und in einer nicht-toxischen Form vorwiegend in Ferritin gespeichert. Überschüssiges Eisen kann wiederum aus der Zelle heraustransportiert und vom PN gepuffert werden.

Aufgrund der ähnlichen Eisenkonzentration der PN-tragenden Neurone und der analysierten Astrozyten wird eine enge Interaktion zwischen beiden vermutet. Das PN könnte die Funktion der PN-penetrierenden Astrozytenausläufer unterstützen und die astrozytären Eisenprotein- und Antioxidationsseffekte auf das Neuron verstärken.

Die Annahme einer potentiell protektiven Funktion des PN wird durch die Ergebnisse unterstützt. Des weiteren könnte das PN eine metabolische Funktion besitzen und eine ausreichende Versorgung des (erhöhten) Eisenbedarfs des Neurons garantieren [FIE07]. Aufgrund des PN und des hohen Eisenproteingehalts wird vermutet, daß PN-tragende Neurone einen Eisen-induzierten oxidativen Stress und eine Änderung im Eisenhaushalt besser kompensieren können als Neurone ohne PN. Dies trägt zur geringen Vulnerabilität der PN-tragenden Neurone bei neurodegenerativen Erkrankungen bei.



# Kapitel 6

## Summary

The perineuronal net (PN) is a specialized form of the extracellular matrix that surrounds a heterogeneous subpopulation of neurons. The PN is negatively charged and binds iron with a high affinity [REI03, MOR04C]. Iron is, besides its essential function, potentially toxic. Especially free  $\text{Fe}^{2+}$  can generate reactive oxygen radicals via the Fenton reaction which results in oxidative stress. The iron induced oxidative stress contributes to neurodegeneration, like e.g. Alzheimer's and Parkinson's disease. Interestingly, just the PN bearing neurons show a less vulnerability in neurodegenerative diseases. Therefore, it is presumed that the PN might have a protective function for the neuron [MOR04B].

The aim of this work was the analysis of the iron household of the PN-bearing neurons, which might indicate a protection against iron induced oxidative stress. The subject of investigation was the concentration of iron and iron proteins of neurons with a PN and without a PN in brain regions with many PN-ensheathed neurons (parietal cortex, subiculum, red nucleus, substantia nigra) in the rat. Thereby, quantitative methods like spatially resolved ion beam microscopy and the slide-based laser scanning cytometry as well as western blotting and quantitative real-time PCR were applied. The results are shortly summarized.

### Ion beam microscopy

- For the first time the intracellular iron content of several cell populations in brain slices were quantified with emphasis on spatial resolution and directly compared to each other.
- Comparing the PN-bearing neurons and PN-negative neurons, the iron concentration was approximately 30% higher in PN-bearing neurons ( $\sim 0,74$  mmol/l).
- The iron concentration of the PN corresponds to the intracellular iron concentration of its associated neuron.
- Pyramid cells and interneurons of the parietal cortex do not differ in their iron content.

- The PN-missing neurons in the substantia nigra pars compacta possess a low iron concentration comparable to that of the neuropil ( $\sim 0,45$  mmol/l).
- Most of the iron, approximately 84%, is localized in the cytoplasm. The dense packed nucleolus possess the highest local content of iron (and other elements).
- Additionally, the iron concentration of selected glia cells in the retrosplenial cortex was measured. The oligodendrocytes have a ca. 30% higher iron concentration ( $\sim 0,95$  mmol/l) than PN-bearing neurons. The astrocytes have an iron concentration that is equal to the iron concentration of the PN-bearing neurons ( $\sim 0,7$  mmol/l).

### Quantitative real-time PCR / Western blotting

- At the regional level the protein/mRNA content of the investigated iron import proteins (transferrin, transferrin receptor), iron storage proteins (ferritin H, ferritin L) and iron export protein (metal transport protein 1, MTP1) in PN-rich brain regions is higher compared with a PN-poor reference region (entorhinal cortex).

### Slide-based laser scanning cytometry

- The presented work showed for the first time that slide-based laser scanning cytometry is a suitable method to analyze cellular fluorescence marked brain slices.
- Like the iron the iron proteins are predominantly localized in the cytoplasm.
- PN-bearing neurons have an up to 50% higher content in iron import proteins (transferrin, transferrin receptor, divalent metal transport protein 1 (DMT1)), iron storage proteins (ferritin H, ferritin L) and iron export protein (MTP1) than PN-negative neurons.
- The relative number of neurons bearing a PN<sup>1</sup> is approximately 5% in the parietal cortex and subiculum, 55% in the substantia nigra and 70% in the red nucleus.

All analyses of the presented work confirm that the concentration of iron (see fig. 3.3 p. 60) and iron specific proteins (see fig. 4.2 p. 94) in the PN-bearing neurons is higher compared to the PN-negative neurons. Iron proteins reduce the generation of reactive oxygen species by binding the iron. Thus, they function as antioxidatives. In particular transferrin and ferritin seem to play an important role. Due to the higher content in iron proteins the PN-ensheathed neurons are better protected against oxidative stress than PN-negative neurons.

It is possible that preferentially the PN binds free iron and consequently subducts the iron from the Fenton reaction. Under controlled conditions the iron is subsequently transported into the cell and be stored mainly in ferritin in a non-toxic form. In turn, excessive iron can be transported out of the cell and is again buffered by the PN.

---

<sup>1</sup>labelled with *Wisteria floribunda* agglutinin

Due to the equal iron concentration of the PN-bearing neuron and the astrocyte, a close interaction between both is assumed. The PN might support the function of the PN penetrating astrocyte branches and enhance the effects of the astrocytic iron proteins and antioxidatives in the vicinity of the neuron.

The results support the hypothesis of a potential function of the PN against iron induced oxidative stress. Furthermore, the PN could have a metabolic function and ensures a sufficient supply of the (enhanced) iron requirements of the neuron [FIE07]. Because of the PN and the high iron protein content it is suggested that neurons which are surrounded by a PN can better compensate the iron induced oxidative stress and a change in the iron household than neurons without a PN. This results in a lower vulnerability of the PN-bearing neurons in neurodegenerative diseases.



# Literaturverzeichnis

- [ABB00] S. ABBOUD, D. J. HAILE. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* **275**, 19906–19912 (2000).
- [ADA01] I. ADAMS, K. BRAUER, C. ARELIN, W. HÄRTIG, A. FINE, M. MADER, T. ARENDT, G. BRÜCKNER. Perineuronal nets in the rhesus monkey and human basal forebrain including basal ganglia. *Neuroscience* **108**, 285–298 (2001).
- [AIS01] AISEN, P. AND ENNS, C. AND WESSLING-RESNICK, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**, 940–959 (2001).
- [AJM08] J. M. AJMO, A. K. EAKIN, M. G. HAMEL, P. E. GOTTSCHALL. Discordant localization of WFA reactivity and brevican/ADAMTS-derived fragment in rodent brain. *BMC Neurosci* **9:14.**, 14 (2008).
- [ALB95] B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, WATSON, J. D. *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim, 3 Ausgabe (1995).
- [ALB00] R. ALBERTINI, A. PASSI, P. M. ABUJA, G. DE LUCA. The effect of glycosaminoglycans and proteoglycans on lipid peroxidation. *International journal of molecular medicine* **6** (2), 129–136 (2000).
- [ALP06] A. ALPÁR, U. GÄRTNER, W. HÄRTIG, G. BRÜCKNER. Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Res* **1120**, 13–22 (2006).
- [ALZ06] A. ALZHEIMER. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurobl. Cbl.* **23**, 1129–1136 (1906).
- [AMB01] H. B. AMBROZ, T. K. BRADSHAW, T. J. KEMP, E. M. KORNACKA, G. K. PRZYBYTNIAK. Role of iron ions in damage to DNA: influence of ionising radiation, UV light and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **142**, 9–18 (2001).
- [AND92] S. C. ANDREWS, P. M. HARRISON, S. J. YEWDALL, P. AROSIO, S. LEVI, W. BOTTKE, M. VON DARL, J. F. BRIAT, J. P. LAULHERE, S. LOBREAUX. Structure, function, and evolution of ferritins. *Journal of Inorganic Biochemistry* **47**, 161–174 (1992).

- [AND02] JENS S. ANDERSEN, CAROL E. LYON, ARCHA H. FOX, ANTHONY K L LEUNG, YUN WAH LAM, HANNO STEEN, MATTHIAS MANN, ANGUS I. LAMOND. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Current biology : CB* **12** (1), 1–11 (2002).
- [ARE01] T. ARENDT. Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization. *Neuroscience* **102**, 723–765 (2001).
- [ARE04] T. ARENDT. Neurodegeneration and plasticity. *International Journal of Developmental Neuroscience* **22**, 507–514 (2004).
- [ARO02] P. AROSIO, S. LEVI. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 457–463 (2002).
- [ASA06] Y. ASANO, R. MEGURO, S. ODAGIRI, C. LI, H. IWATSUKI, K. SHOUMURA. Visualization of non-heme ferric and ferrous iron by highly sensitive non-heme iron histochemistry in the stress-induced acute gastric lesions in the rat. *Histochem Cell Biol* **125**, 515–525 (2006).
- [ASH95] R. A. ASHER, R. J. SCHEIBE, H. D. KEISER, A. BIGNAMI. On the existence of a cartilage-like proteoglycan and link proteins in the central nervous system. *Glia* **13**, 294–308 (1995).
- [ASH02] RICHARD A. ASHER, DANIEL A. MORGENSTERN, MORVEN C. SHEARER, KATHRYN H. ADCOCK, PENKA PESHEVA, JAMES W. FAWCETT. Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22** (6), 2225–2236 (2002).
- [ASP97] A. ASPBERG, R. MIURA, S. BOURDOULOUS, M. SHIMONAKA, D. HEINEGARD, M. SCHACHNER, E. RUOSLAHTI, Y. YAMAGUCHI. The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94** (19), 10116–11021 (1997).
- [ATA04] H. ATAMNA. Heme, iron, and the mitochondrial decay of ageing. *Ageing Research Reviews* **3**, 303–318 (2004).
- [ATW03] C. S. ATWOOD, M. E. OBRENOVICH, T. LIU, H. CHAN, G. PERRY, M. A. SMITH, R. N. MARTINS. Amyloid- $\beta$ : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- $\beta$ . *Brain Research Reviews* **43**, 1–16 (2003).
- [AUS06] D. S. AUST, USA (SDAUST@CC.USU.EDU) UTAH STATE UNIVERSITY. *Ferritin in microsomal fraction after gradient centrifugation: persönliche Mitteilung (Email vom 04.04.2006)*, (2006).
- [BAI05] SHABNAM BAIG, GORDON K. WILCOCK, SETH LOVE. Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* **110** (4), 393–401 (2005).

- [BAN00] C. E. BANDTLOW, ZIMMERMANN. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* **80**, 1267–1290 (2000).
- [BAR07] GEORGE BARTZOKIS, TODD A. TISHLER, PO H. LU, PABLO VILLABLANCA, LORI L. ALTSHULER, MICHELE CARTER, DANNY HUANG, NANCY EDWARDS, JIM MINTZ. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging* **28** (3), 414–423 (2007).
- [BEA93] J. L. BEARD, J. D. CONNOR, B. C. JONES. Brain iron: location and function. *Prog Food Nutr Sci* **17**, 183–221 (1993).
- [BEA03] J. L. BEARD, J. R. CONNOR. Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr* **23**, 41–58 (2003).
- [BEA05] J. L. BEARD, J. A. WIESINGER, N. LI, J. R. CONNOR. Brain iron uptake in hypotransferrinemic mice: influence of systemic iron status. *J Neurosci Res* **79**, 254–261 (2005).
- [BED99] E. BEDNER, X. LI, W. GORCZYCA, MELAMED, Z. DARZYNKIEWICZ. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* **35**, 181–195 (1999).
- [BEL97] PAVEL V. BELICHENKO, JUDITH MIKLOSSY, MARCO R. CELIO. HIV-I Induced Destruction of Neocortical Extracellular Matrix Components in AIDS Victims. *Neurobiology of Disease* **4** (3–4), 301–310 (1997).
- [BEL99] PAVEL V. BELICHENKO, JUDITH MIKLOSSY, BRIGITTE BELSER, HERBERT BUDKA, MARCO R. CELIO. Early Destruction of the Extracellular Matrix around Parvalbumin-Immunoreactive Interneurons in Creutzfeldt-Jakob Disease. *Neurobiology of Disease* **6** (4), 269–279 (1999).
- [BEN93] S. A. BENKOVIC, J. R. CONNOR. Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J Comp Neurol* **338**, 97–113 (1993).
- [BEN99] M. BENEYTO, J. RUEDA, J. A. MERCHAN, J. J. PRIETO. Specific staining of nonpyramidal cell populations of the cerebral cortex by lectin cytochemistry on semithin sections. *Brain Research Bulletin* **49**, 251–262 (1999).
- [BER90] A. BERTOLOTTO, G. ROCCA, D. SCHIFFER. Chondroitin 4-sulfate proteoglycan forms an extracellular network in human and rat central nervous system. *J Neurol Sci* **100**, 113–123 (1990).
- [BER91] A. BERTOLOTTO, G. ROCCA, G. CANAVESE, A. MIGHELI, D. SCHIFFER. Chondroitin sulfate proteoglycan surrounds a subset of human and rat CNS neurons. *J Neurosci Res* **29**, 225–234 (1991).
- [BER96] A. BERTOLOTTO, E. MANZARDO, R. GUGLIELMONE. Immunohistochemical mapping of perineuronal nets containing chondroitin unsulfated proteoglycan in the rat central nervous system. *Cell Tissue Res* **283**, 283–295 (1996).

- [BES11] C. BESTA. Sul modo di comportarsi del reticolo pericellulare in alcuni processi patologici del tessuto nervoso. *Riv. Patol. Nerv. Ment.* **16**, 604–620 (1911).
- [BIG65] V. BIGL. *Die Verteilung ATP-spaltender Fermente in Fraktionen subzellulärer Partikel von Hirngewebe: Dissertationsschrift.* Leipzig (1965).
- [BIG70] V. BIGL, D. BIESOLD. Isolation subzellulärer Partikelfraktionen aus Hirngewebe und verteilung ATP-spaltender Enzyme. *Acta biol. med. germ.* **25** (1), 1–18 (1970).
- [BJE86] BJERRUM, O. J. AND SCHÄFER-NIELSEN, C. Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. *Electrophoresis* **86** (86), 315–327 (1986).
- [BJÖ84] A. BJÖRKLUND, T. HÖKFELT, M. J. KUCHAR. *Handbook of Chemical Neuroanatomy-Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS. Part II*, vol. Vol. 3. Elsevier Academic Press, Amsterdam (1984).
- [BLI68] S. M. BLINKOV, I. I. GLEZER. *Das Zentralnervensystem in Zahlen und Tabellen.* VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1968).
- [BLÜ92] I. BLÜMCKE, M. R. CELIO. Parvalbumin and calbindin d-28k immunoreactivities coexist within cytochrome oxidase-rich compartments of squirrel monkey area 18. *Exp. Brain Res.* (92), 39–45 (1992).
- [BLÜ95] I. BLÜMCKE, P. EGGLI, M. R. CELIO. Relationship between astrocytic processes and "perineuronal nets" in rat neocortex. *Glia* **15** (2), 131–140 (1995).
- [BOC06] J. BOCSI, D. LENZ, A. MITTAG, V. S. VARGA, B. MOLNAR, Z. TULASAY, U. SACK, A. TÁRNOK. Automated four-color analysis of leukocytes by scanning fluorescence microscopy using quantum dots. *Cytometry A* **69**, 131–134 (2006).
- [BOI07] F. M. BOISVERT, S. VAN KONINGSBRUGGEN, J. NAVASCUES, A. I. LAMOND. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8** (7), 574–585 (2007).
- [BRA76] M. M. BRADFORD. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254 (1976).
- [BRA82] K. BRAUER, L. WERNER, L. LEIBNITZ. Perineuronal nets of glia. *J Hirnforsch* **23**, 701–708 (1982).
- [BRA93] K. BRAUER, W. HÄRTIG, V. BIGL, G. BRÜCKNER. Distribution of parvalbumin-containing neurons and lectin-binding perineuronal nets in the rat basal forebrain. *Brain Research* **631**, 167–170 (1993).

- [BRA97] M. W. BRADBURY. Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *Journal of neurochemistry* **69** (2), 443–454 (1997).
- [BRA00] H. BRAAK, E. BRAAK. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *Journal of neurology* **247** (2), 3–10 (2000).
- [BRA03] H. BRAAK, TREDICI K. DEL, U. RUB, R. A. DE VOS, STEUR E. N. JANSEN, E. BRAAK. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **24**, 197–211 (2003).
- [BRO96] J. M. BRONSTEIN, P. POPPER, P. E. MICEVYCH, D. B. FARBER. Isolation and characterization of a novel oligodendrocyte-specific protein. *Neurology* **47**, 772–778 (1996).
- [BRU81] A. BRUN, E. ENGLUND. Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading. *Histopathology* **5** (5), 549–564 (1981).
- [BRU92] U. T. BRUNK, C. B. JONES, R. S. SOHAL. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutation research* **275** (3–6), 395–403 (1992).
- [BRÜ93] G. BRÜCKNER, K. BRAUER, W. HÄRTIG, [JR] WOLFF, M. J. RICKMANN, A. DEROUICHE, B. DELPECH, N. GIRARD, W. H. OERTEL, A. REICHENBACH. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* **8**, 183–200 (1993).
- [BRÜ94A] G. BRÜCKNER, A. SCHUTZ, W. HÄRTIG, K. BRAUER, B. R. PAULKE, V. BIGL. Projection of non-cholinergic basal forebrain neurons ensheathed with perineuronal nets to rat mesocortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **8**, 11–18 (1994).
- [BRÜ94B] G. BRÜCKNER, G. SEEGER, K. BRAUER, W. HÄRTIG, J. KACZA, V. BIGL. Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglycan components and parvalbumin in the Mongolian gerbil and rat. *Brain Res* **658**, 67–86 (1994).
- [BRÜ96] G. BRÜCKNER, A. BRINGMANN, G. KÖPPE, W. HÄRTIG, K. BRAUER. In vivo and in vitro labelling of perineuronal nets in rat brain. *Brain Research* **720**, 84–92 (1996).
- [BRÜ98A] G. BRÜCKNER, A. BRINGMANN, W. HÄRTIG, G. KÖPPE, B. DELPECH, K. BRAUER. Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* **121** (3), 300–310 (1998).

- [BRÜ98B] G. BRÜCKNER, W. HÄRTIG, J. SEEGER, R. RÜBSAMEN, K. REIMER, K. BRAUER. Cortical perineuronal nets in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*): a distribution pattern contrasting with that shown in placental mammals. *Anatomy and embryology* **197** (4), 249–262 (1998).
- [BRÜ99] G. BRÜCKNER, D. HAUSEN, W. HÄRTIG, M. DRLICEK, T. ARENDT, K. BRAUER. Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **92**, 791–805 (1999).
- [BRÜ00] G. BRÜCKNER, J. GROSCHE, S. SCHMIDT, W. HÄRTIG, R. U. MARGOLIS, B. DELPECH, C. I. SEIDENBECHER, R. CZANIERA, M. SCHACHNER. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol* **428**, 616–629 (2000).
- [BRU02] ULF T. BRUNK, ALEXEI TERMAN. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology and Medicine* **33** (5), 611–619 (2002).
- [BRÜ03] G. BRÜCKNER, J. GROSCHE, M. HARTLAGE-RÜBSAMEN, S. SCHMIDT, M. SCHACHNER. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J Chem Neuroanat* **26**, 37–50 (2003).
- [BRÜ04] G. BRÜCKNER, J. KACZA, J. GROSCHE. Perineuronal nets characterized by vital labelling, confocal and electron microscopy in organotypic slice cultures of rat parietal cortex and hippocampus. *J Mol Histol* **35**, 115–122 (2004).
- [BRÜ06A] G. BRÜCKNER, S. PAVLICA, M. MORAWSKI, A. G. PALACIOS, A. REICHENBACH. Organization of brain extracellular matrix in the Chilean fat-tailed mouse opossum *Thylamys elegans* (Waterhouse, 1839). *J Chem Neuroanat* **32**, 143–158 (2006).
- [BRÜ06B] G. BRÜCKNER, S. SZEÖKE, S. PAVLICA, J. GROSCHE, J. KACZA. Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience* **138** (2), 365–375 (2006).
- [BRÜ08] G. BRÜCKNER, M. MORAWSKI, T. ARENDT. Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience* **151**, 489–504 (2008).
- [BUK01] O. BUKALO, M. SCHACHNER, A. DITYATEV. Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* **104** (2), 359–369 (2001).
- [BUR81] W. N. BURNETTE. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* **112** (2), 195–203 (1981).

- [BUR99] J. R. BURDO, J. MARTIN, S. L. MENZIES, K. G. DOLAN, M. A. ROMANO, R. J. FLETCHER, M. D. GARRICK, L. M. GARRICK, J. R. CONNOR. Cellular distribution of iron in the brain of the Belgrade rat. *Neuroscience* **93**, 1189–1196 (1999).
- [BUR01] J. R. BURDO, S. L. MENZIES, I. A. SIMPSON, L. M. GARRICK, M. D. GARRICK, K. G. DOLAN, D. J. HAILE, J. L. BEARD, J. R. CONNOR. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res* **66**, 1198–1207 (2001).
- [BUR03] J. R. BURDO, J. R. CONNOR. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals* **16**, 63–75 (2003).
- [BUS07] SARAH A. BUSCH, JERRY SILVER. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Current opinion in neurobiology* **17** (1), 120–127 (2007).
- [BUT00] T. BUTZ, R. FLAGMEYER, J. HEITMANN, D. N. JAMIESON, G. J.F. LEGGE, D. LEHMANN, U. REIBETANZ, T. REINERT, A. SAINT, D. SPEMANN, R. SZYMANSKI, W. TROGER, J. VOGT, J. ZHU. The Leipzig high-energy ion nanoprobe: A report on first results. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **161–163**, 323–327 (2000).
- [BUT05A] O. I. BUTT, P. KRISHNAN, S. S. KULKARNI, L. MOLDOVAN, N. I. MOLDOVAN. Quantification and functional analysis of chemotaxis by laser scanning cytometry. *Cytometry A* **64**, 10–15 (2005).
- [BUT05B] T. BUTZ, C. MEINECKE, M. MORAWSKI, T. REINERT, M. SCHWERTNER, D. SPEMANN, J. VOGT. Morphological and elemental characterisation with the high-energy ion-nanoprobe LIPSION. *Applied Surface Science* **252**, 43–48 (2005).
- [CAM04] GIUSEPPE M. CAMPO, ANGELA AVENOSO, SALVATORE CAMPO, ANGELA D'ASCOLA, ALIDA M. FERLAZZO, ALBERTO CALATRONI. Reduction of DNA fragmentation and hydroxyl radical production by hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in iron plus ascorbate-induced oxidative stress in fibroblast cultures. *Free radical research* **38** (6), 601–611 (2004).
- [CAR06] D. CARULLI, K. E. RHODES, D. J. BROWN, T. P. BONNERT, S. J. POLLACK, K. OLIVER, P. STRATA, J. W. FAWCETT. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol* **494**, 559–577 (2006).
- [CAR07] D. CARULLI, K. E. RHODES, J. W. FAWCETT. Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J Comp Neurol* **501**, 83–94 (2007).
- [CAS00] R. J. CASTELLANI, S. L. SIEDLAK, G. PERRY, M. A. SMITH. Sequestration of iron by Lewy bodies in Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* **100** (2), 111–114 (2000).

- [CAS04] R. J. CASTELLANI, K. HONDA, X. ZHU, A. D. CASH, A. NUNOMURA, G. PERRY, M. A. SMITH. Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing Res Rev* **3**, 319–326 (2004).
- [CAS07] R. J. CASTELLANI, P. I. MOREIRA, G. LIU, J. DOBSON, G. PERRY, M. A. SMITH, X. ZHU. Iron: the Redox-active center of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurochem Res* **32**, 1640–1645 (2007).
- [CEL93A] M. R. CELIO. Perineuronal nets of extracellular matrix around parvalbumin-containing neurons of the hippocampus. *Hippocampus*. **3 Spec**, 55–60 (1993).
- [CEL93B] CELIO, M. R. AND CHIQUET-EHRISMANN, R. 'Perineuronal nets' around cortical interneurons expressing parvalbumin are rich in tenascin. *Neuroscience Letters* **162**, 137–140 (1993).
- [CEL94] M. R. CELIO, I. BLÜMCKE. Perineuronal nets – a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Research Reviews* **19**, 128–145 (1994).
- [CEL98] CELIO, M. R. AND SPREAFICO, R. AND BIASI, S. DE AND VITELLARO-ZUCCARELLO, L. Perineuronal nets: past and present. *Trends in Neurosciences* **21**, 510–515 (1998).
- [CHA99] N. D. CHASTEEN, P. M. HARRISON. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol* **126**, 182–194 (1999).
- [CHE98] P. CHEEPSUNTHORN, C. PALMER, J. R. CONNOR. Cellular distribution of ferritin subunits in postnatal rat brain. *J Comp Neurol* **400**, 73–86 (1998).
- [CHI05] S. J. CHINTA, J. K. ANDERSEN. Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**, 942–946 (2005).
- [CHR00] YVES CHRISTEN. Oxidative stress and Alzheimer disease1. *Am J Clin Nutr* **71** (2), 621s–629 (2000).
- [CLA97] R. J. CLATCH, J. L. WALLOCH. Multiparameter immunophenotypic analysis of fine needle aspiration biopsies and other hematologic specimens by laser scanning cytometry. *Acta Cytol* **14**, 109–122 (1997).
- [CLA98] R. J. CLATCH, J. R. FOREMAN, J. L. WALLOCH. Simplified immunophenotypic analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry* **34**, 3–16 (1998).
- [CON90] J. R. CONNOR, S. L. MENZIES, MARTIN S. M. ST, E. J. MUFSON. Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* **27**, 595–611 (1990).
- [CON92] J. R. CONNOR, S. A. BENKOVIC. Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Ann Neurol* **32**, 51–61 (1992).

- [CON94] J. R. CONNOR, K. L. BOESHORE, S. A. BENKOVIC, S. L. MENZIES. Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain. *J Neurosci Res* **37**, 461–465 (1994).
- [CON95A] J. R. CONNOR, S. L. MENZIES. Cellular management of iron in the brain. *Journal of the Neurological Sciences* **134**, 33–44 (1995).
- [CON95B] J. R. CONNOR, G. PAVLICK, D. KARLI, S. L. MENZIES, C. PALMER. A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol* **355**, 111–123 (1995).
- [CON96] J. R. CONNOR, S. L. MENZIES. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia* **17**, 83–93 (1996).
- [CON01] J. R. CONNOR, S. L. MENZIES, [JR] BURDO, P. J. BOYER. Iron and iron management proteins in neurobiology. *Pediatr Neurol* **25**, 118–129 (2001).
- [CON03] J. R. CONNOR, P. J. BOYER, S. L. MENZIES, B. DELLINGER, R. P. ALLEN, W. G. ONDO, C. J. EARLEY. Neuropathological examination suggests impaired brain iron acquisition in restless legs syndrome. *Neurology* **61**, 304–309 (2003).
- [COU98] M. N. COUREL, S. MARRET, N. GIRARD, C. CHAUZY, A. OLIVIER, P. BERTRAND, A. DELPECH, A. LAQUERRIERE, H. ASOU, B. DELPECH. Hyaluronectin is produced by oligodendrocytes and Schwann cells in vitro. *J Neurocytol.* **27** (1), 27–32 (1998).
- [COZ00] A. COZZI, B. CORSI, S. LEVI, P. SANTAMBROGIO, A. ALBERTINI, P. AROSIO. Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *The Journal of biological chemistry* **275** (33), 122–129 (2000).
- [CRI01] R. R. CRICHTON. *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*. Wiley, New York, 2 Ausgabe (2001).
- [CUR01] A. R. CURTIS, C. FEY, C. M. MORRIS, L. A. BINDOFF, P. G. INCE, P. F. CHINNERY, A. COULTHARD, M. J. JACKSON, A. P. JACKSON, D. P. MCHALE, D. HAY, W. A. BARKER, A. F. MARKHAM, D. BATES, A. CURTIS, J. BURN. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet.* **28** (4), 350–354 (2001).
- [DAM99] P. DAMIER, E. C. HIRSCH, Y. AGID, A. M. GRAYBIEL. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* **122**, 1437–1448 (1999).
- [DAR99] Z. DARZYNKIEWICZ, E. BEDNER, X. LI, W. GORCZYCA, MELAMED. Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. *Exp Cell Res* **249**, 1–12 (1999).

- [DAU03] W. DAUER, S. PRZEDBORSKI. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
- [DEE06] S. S. DEEPA, D. CARULLI, C. GALTREY, K. RHODES, J. FUKUDA, T. MIKAMI, K. SUGAHARA, J. W. FAWCETT. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem* **281**, 17789–17800 (2006).
- [DEL82] A. DELPECH, N. GIRARD, B. DELPECH. Localization of hyaluronectin in the nervous system. *Brain Res* **245**, 251–257 (1982).
- [DER96] A. DEROUICHE, W. HÄRTIG, K. BRAUER, G. BRÜCKNER. Spatial relationship of lectin-labelled extracellular matrix and glutamine synthetase-immunoreactive astrocytes in rat cortical forebrain regions. *J Anat* **189**, 363–372 (1996).
- [DEX89] D. T. DEXTER, F. R. WELLS, A. J. LEES, F. AGID, Y. AGID, P. JENNER, C. D. MARSDEN. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* **52**, 1830–1836 (1989).
- [DEX90] D. T. DEXTER, A. CARAYON, M. VIDAILHET, M. RUBERG, F. AGID, Y. AGID, A. J. LEES, F. R. WELLS, P. JENNER, C. D. MARSDEN. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* **55**, 16–20 (1990).
- [DEX91] DEXTER, D. T. AND CARAYON, A. AND JAVOY-AGID, F. AND AGID, Y. AND WELLS, F. R. AND DANIEL, S. E. AND LEES, A. J. AND JENNER, P. AND MARSDEN, C. D. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* **114**, 1953–1975 (1991).
- [DEY90] E. A. DEYOE, S. HOCKFIELD, H. GARREN, D. C. VAN ESSEN. Antibody labeling of functional subdivisions in visual cortex: Cat-301 immunoreactivity in striate and extrastriate cortex of the macaque monkey. *Vis Neurosci.* **5** (1), 67–81 (1990).
- [DIA87] M. C. DIAMOND. Sex differences in the rat forebrain. *Brain Res* **434**, 235–240 (1987).
- [DIC95] T. K. DICKINSON, J. R. CONNOR. Cellular distribution of iron, transferrin, and ferritin in the hypotransferrinemic (Hp) mouse brain. *J Comp Neurol* **355**, 67–80 (1995).
- [DIT06] A. DITYATEV, M. SCHACHNER. The extracellular matrix and synapses. *Cell Tissue Res* **326**, 647–654 (2006).
- [DIT07] A. DITYATEV, G. BRÜCKNER, G. DITYATEVA, J. GROSCHE, R. KLEENE, M. SCHACHNER. Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol* **67**, 570–588 (2007).

- [DIV95] DIVAC, I. AND MOJSILOVIC-PETROVIC, J. AND LÓPEZ-FIGUEROA, M. O. AND PETROVIC-MINIC, B. AND MØLLER, M. Improved contrast in histochemical detection of cytochrome oxidase: metallic ions protocol. *J Neurosci Methods* **56**, 105–113 (1995).
- [DOM07] IVANA DE DOMENICO, DIANE McVEY WARD, GIOVANNI MUSCI, JERRY KAPLAN. Evidence for the multimeric structure of ferroportin. *Blood* **109** (5), 2205–2209 (2007).
- [DOM08] M. S. DOMOWICZ, T. A. SANDERS, C. W. RAGSDALE, N. B. SCHWARTZ. Aggrecan is expressed by embryonic brain glia and regulates astrocyte development. *Developmental Biology* **315** (1), 114–124 (2008).
- [DOR04] P. M. DORAISWAMY, A. E. FINEFROCK. Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *The Lancet Neurology* **3**, 431–434 (2004).
- [DOU98A] K. L. DOUBLE, M. MAYWALD, M. SCHMITTEL, P. RIEDERER, M. GERLACH. In vitro studies of ferritin iron release and neurotoxicity. *J Neurochem* **70**, 2492–2499 (1998).
- [DOU98B] T. DOUGLAS, D. R. RIPOLL. Calculated electrostatic gradients in recombinant human H-chain ferritin. *Protein Sci.* **7** (5), 1083–1091 (1998).
- [DOU02] K. L. DOUBLE, SHACHAR D. BEN, M. B.H. YODIM, L. ZECCA, P. RIEDERER, M. GERLACH. Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicology and Teratology* **24**, 621–628 (2002).
- [DOU03] K. L. DOUBLE, M. GERLACH, V. SCHUNEMANN, A. X. TRAUTWEIN, L. ZECCA, M. GALLORINI, M. B.H. YODIM, P. RIEDERER, SHACHAR D. BEN. Iron-binding characteristics of neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochemical Pharmacology* **66**, 489–494 (2003).
- [DRA91] C. T. DRAKE, K. A. MULLIGAN, T. L. WIMPEY, A. HENDRICKSON, C. CHAVKIN. Characterization of *Vicia villosa* agglutinin-labeled GABAergic interneurons in the hippocampal formation and in acutely dissociated hippocampus. *Brain Res* **19** (554), 176–185 (1991).
- [DRI03] R. DRINGEN, J. HIRRLINGER. Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem.* **384** (4), 505–516 (2003).
- [DRI05] RALF DRINGEN, PETRA G. PAWLOWSKI, JOHANNES HIRRLINGER. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of neuroscience research* **79** (1–2), 157–165 (2005).
- [DRI07] R. DRINGEN, G. M. BISHOP, M. KOEPPE, T. N. DANG, S. R. ROBINSON. The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain. *Neurochem Res* **32**, 1884–1890 (2007).

- [DU96] J. DU, L. ZHANG, M. WEISER, B. RUDY, C. J. MCBAIN. Developmental expression and functional characterization of the potassium-channel subunit Kv3.1b in parvalbumin-containing interneurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* **16**, 506–518 (1996).
- [DWO88] A. J. DWORK, E. A. SCHON, J. HERBERT. Nonidentical distribution of transferrin and ferric iron in human brain. *Neuroscience* **27**, 333–345 (1988).
- [EBA05] M. EBADI, R. F. PFEIFFER. *Parkinsons Disease*. CRC Press, Washington, D.C. (2005).
- [EIS00] R. S. EISENSTEIN. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* **20**, 627–662 (2000).
- [EIS03] R. S. EISENSTEIN, K. L. ROSS. Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *J Nutr* **133**, 1510S–1516S (2003).
- [EPS99] S. EPSZTEJN, H. GLICKSTEIN, V. PICARD, I. N. SLOTKI, W. BREUER, C. BEAUMONT, Z. I. CABANTCHIK. H-ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood*. **94** (10), 3593–3603 (1999).
- [ERB96] G. L. ERB, D. L. OSTERBUR, S. M. LEVINE. The distribution of iron in the brain: a phylogenetic analysis using iron histochemistry. *Brain research. Developmental brain research* **93** (1–2), 120–128 (1996).
- [ERI97] ERIKSON, K. M. AND PIÑERO, D. J. AND CONNOR, J. R. AND BEARD, J. L. Regional brain iron, ferritin and transferrin concentrations during iron deficiency and iron repletion in developing rats. *J Nutr* **127**, 2030–2038 (1997).
- [ESP02] B. P. ESPOSITO, S. EPSZTEJN, W. BREUER, Z. I. CABANTCHIK. A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. *Analytical Biochemistry* **304**, 1–18 (2002).
- [FAT08] A. A. FATOKUN, T. W. STONE, R. A. SMITH. Oxidative stress in neurodegeneration and available means of protection. *Front Biosci*. **13**, 3288–3311 (2008).
- [FED05] H. FEDOROW, F. TRIBL, G. HALLIDAY, M. GERLACH, P. RIEDERER, K. L. DOUBLE. Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* **75**, 109–124 (2005).
- [FER05] S. FERNAEUS, K. REIS, K. BEDECS, T. LAND. Increased susceptibility to oxidative stress in scrapie-infected neuroblastoma cells is associated with intracellular iron status. *Neuroscience Letters* **389**, 133–136 (2005).

- [FIE07] A. FIEDLER, T. REINERT, M. MORAWSKI, G. BRÜCKNER, T. ARENDT, T. BUTZ. Intracellular iron concentration of neurons with and without perineuronal nets. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **260**, 153–158 (2007).
- [FOC97] S. J. FOCHT, B. S. SNYDER, J. L. BEARD, W. VAN GELDER, L. R. WILLIAMS, [JR] CONNOR. Regional distribution of iron, transferrin, ferritin, and oxidatively-modified proteins in young and aged Fischer 344 rat brains. *Neuroscience* **79**, 255–261 (1997).
- [FOX02] K. FOX, B. CATERSON. Neuroscience. Freeing the brain from the perineuronal net. *Science* **298**, 1187–1189 (2002).
- [FRA81] FRANCOIS, C. AND NGUYEN-LEGROS, J. AND PERCHERON, G. Topographical and cytological localization of iron in rat and monkey brains. *Brain Res* **215**, 317–322 (1981).
- [FRI00] E. FRIAUF. Development of chondroitin sulfate proteoglycans in the central auditory system of rats correlates with acquisition of mature properties. *Audiol Neurootol.* **5** (5), 251–262 (2000).
- [FUJ89] S. C. FUJITA, Y. TADA, F. MURAKAMI, M. HAYASHI, M. MATSUMURA. Glycosaminoglycan-related epitopes surrounding different subsets of mammalian central neurons. *Neurosci Res* **7**, 117–130 (1989).
- [GAB87] P. L. GABBOTT, M. G. STEWART. Distribution of neurons and glia in the visual cortex (area 17) of the adult albino rat: a quantitative description. *Neuroscience* **21**, 833–845 (1987).
- [GAL87] V. GALLO, A. BERTOLOTTO, G. LEVI. The proteoglycan chondroitin sulfate is present in a subpopulation of cultured astrocytes and in their precursors. *Dev Biol* **123**, 282–285 (1987).
- [GAL04] GALAZKA-FRIEDMAN, J. AND BAUMINGER, E. R. AND KOZIOROWSKI, D. AND FRIEDMAN, A. Mossbauer spectroscopy and ELISA studies reveal differences between Parkinson's disease and control substantia nigra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease* **1688**, 130–136 (2004).
- [GAL07] C. M. GALTREY, J. W. FAWCETT. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* **54**, 1–18 (2007).
- [GAL08A] S. GALBAVY, P. KULIFFAY. Laser scanning cytometry (LSC) in pathology—a perspective tool for the future? *Bratisl Lek Listy* **109**, 3–7 (2008).
- [GAL08B] C. M. GALTREY, J. C. KWOK, D. CARULLI, K. E. RHODES, J. W. FAWCETT. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **27**, 1373–1390 (2008).

- [GAR03] M. D. GARRICK, K. G. DOLAN, C. HORBINSKI, A. J. GHIO, D. HIGGINS, M. PORUBCIN, E. G. MOORE, L. N. HAINSWORTH, J. N. UMBREIT, M. E. CONRAD, L. FENG, A. LIS, J. A. ROTH, S. SINGLETON, L. M. GARRICK. DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. *Biometals* **16**, 41–54 (2003).
- [GER89] GERBER, J. R. CONNOR. Do oligodendrocytes mediate iron regulation in the human brain? *Ann Neurol* **26**, 95–98 (1989).
- [GER94] M. GERLACH, SHACHAR D. BEN, P. RIEDERER, M. B. YODIM. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* **63**, 793–807 (1994).
- [GER00] A. GERSTNER, W. LAFFERS, F. BOOTZ, A. TÁRNOK. Immunophenotyping of peripheral blood leukocytes by laser scanning cytometry. *J Immunol Methods* **246**, 175–185 (2000).
- [GER04] GERSTNER, A. O. AND TRUMPFHELLER, C. AND RACZ, P. AND OSMANCIK, P. AND TENNER-RACZ, K. AND TÁRNOK, A. Quantitative histology by multicolor slide-based cytometry. *Cytometry A* **59**, 210–219 (2004).
- [GER05] A. O. GERSTNER, A. TÁRNOK, F. BOOTZ. Slide-based multi-parametric cytometry in ENT. Perspectives for the clinic and research. *HNO* **53**, 134–141 (2005).
- [GLA98] GLANT, T. T. AND BUZÁS, E. I. AND FINNEGAN, A. AND NEGROIU, G. AND CS-SZABÓ, G. AND MIKECZ, K. Critical roles of glycosaminoglycan side chains of cartilage proteoglycan (aggrecan) in antigen recognition and presentation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **160** (8), 3812–3819 (1998).
- [GLE05] F. GLEESON, E. RYAN, S. BARRETT, J. RUSSELL, B. KELLEHER, J. CROWE. Duodenal Dcytb and hephaestin mRNA expression are not significantly modulated by variations in body iron homeostasis. *Blood Cells Mol Dis* **35**, 303–308 (2005).
- [GOL82] C. GOLGI. Chapter Sistema Nervoso. *Enciclopedia Medica* (1882).
- [GOL98] C. GOLGI. Intorno alla struttura delle cellule nervose. *Bolletino della società medico - chirurgica di Pavia* (1898).
- [GON00] GONZALEZ-HERNANDEZ, T. AND RODRIGUEZ, M. Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol* **421**, 107–135 (2000).
- [GOR95] J. M. GORELL, R. J. ORDIDGE, G. G. BROWN, J. C. DENIAU, N. M. BUDERER, J. A. HELPERN. Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurology* **45** (6), 1138–1143 (1995).

- [GÖT94] M. E. GÖTZ, G. KUNIG, P. RIEDERER, M. B.H. YODIM. Oxidative stress: Free radical production in neural degeneration. *Pharmacology & Therapeutics* **63**, 37–122 (1994).
- [GÖT04] M. E. GÖTZ, K. DOUBLE, M. GERLACH, M. B. YODIM, P. RIEDERER. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* **1012**, 193–208 (2004).
- [GRA58] W. GRAUMANN, S. W. CLAUSS. Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion. *Acta histochem.* **6**, 1–7 (1958).
- [GRI03] I. GRITTI, I. D. MANNS, L. MAINVILLE, B. E. JONES. Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat. *J Comp Neurol* **458**, 11–31 (2003).
- [GRU96] M. GRUMET, FRIEDLANDER, T. SAKURAI. Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect Dev Neurobiol* **3**, 319–330 (1996).
- [GRÜ04] E. GRÜNBLATT, S. MANDEL, J. JACOB HIRSCH, S. ZELIGSON, N. AMARIGLO, G. RECHAVI, J. LI, R. RAVID, W. ROGGENDORF, P. RIEDERER, M. B. YODIM. Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J Neural Transm* **111**, 1543–1573 (2004).
- [GUE05] GUERQUIN-KERN, J. L. AND WU, T. D. AND QUINTANA, C. AND CROISSY, A. Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Biochim Biophys Acta* **1724**, 228–238 (2005).
- [GUN97] H. GUNSHIN, B. MACKENZIE, U. V. BERGER, Y. GUNSHIN, M. F. ROMERO, W. F. BORON, S. NUSSBERGER, J. L. GOLLAN, M. A. HEDIGER. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388** (6641), 482–488 (1997).
- [HAA99] C. A. HAAS, U. RAUCH, N. THON, T. MERTEN, T. DELLER. Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J Neurosci* **19**, 9953–9963 (1999).
- [HAG99] K. HAGIHARA, R. MIURA, R. KOSAKI, E. BERGLUND, B. RANSCHT, Y. YAMAGUCHI. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol* **410**, 256–264 (1999).
- [HAL58] B. HALLGREN, P. SOURANDER. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem* **3**, 41–51 (1958).

- [HAN99] T. M. HANSEN, H. NIELSEN, N. BERNTH, T. MOOS. Expression of ferritin protein and subunit mRNAs in normal and iron deficient rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **65**, 186–197 (1999).
- [HAN00] J. HAN, J. R. DAY, K. THOMSON, J. R. CONNOR, J. L. BEARD. Iron deficiency alters H- and L-ferritin expression in rat brain. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* **46**, 517–528 (2000).
- [HAN02] J. HAN, J. R. DAY, J. R. CONNOR, J. L. BEARD. H and L ferritin subunit mRNA expression differs in brains of control and iron-deficient rats. *J Nutr* **132**, 2769–2774 (2002).
- [HÄR92] W. HÄRTIG, K. BRAUER, G. BRÜCKNER. Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* **3**, 869–872 (1992).
- [HÄR94] W. HÄRTIG, K. BRAUER, V. BIGL, G. BRÜCKNER. Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Research* **635**, 307–311 (1994).
- [HÄR95] W. HÄRTIG, G. BRÜCKNER, K. BRAUER, C. SCHMIDT, V. BIGL. Allocation of perineuronal nets and parvalbumin-, calbindin-D28k- and glutamic acid decarboxylase-immunoreactivity in the amygdala of the rhesus monkey. *Brain Res* **698**, 265–269 (1995).
- [HAR96] P. M. HARRISON, P. AROSIO. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Bioenergetics* **1275** (3), 161–203 (1996).
- [HÄR99] W. HÄRTIG, A. DEROUICHE, K. WELT, K. BRAUER, J. GROSCHE, M. MADER, A. REICHENBACH, G. BRÜCKNER. Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Research* **842**, 15–29 (1999).
- [HÄR01A] W. HÄRTIG, C. KLEIN, K. BRAUER, K. F. SCHUPPEL, T. ARENDT, V. BIGL, G. BRÜCKNER. Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison\*. *Neurobiology of Aging* **22**, 25–33 (2001).
- [HÄR01B] W. HÄRTIG, A. SINGER, J. GROSCHE, K. BRAUER, O. P. OTTERSEN, G. BRÜCKNER. Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Research* **899**, 123–133 (2001).
- [HAR07] M. M. HARNETT. Laser scanning cytometry: understanding the immune system in situ. *Nat Rev Immunol* **7**, 897–904 (2007).

- [HAU96] D. HAUSEN, G. BRÜCKNER, M. DRLICEK, W. HÄRTIG, K. BRAUER, V. BIGL. Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex. *Neuroreport* **7**, 1725–1729 (1996).
- [HAU00] A. HAUNSØ, M. IBRAHIM, U. BARTSCH, M. LETIEMBRE, CELIO, P. A. MENOUD. Morphology of perineuronal nets in tenascin-R and parvalbumin single and double knockout mice. *Brain Research* **864**, 142–145 (2000).
- [HE96] Y. HE, P. S.P. THONG, T. LEE, S. K. LEONG, C. Y. SHI, P. T.H. WONG, S. Y. YUAN, F. WATT. Increased iron in the substantia nigra of 6-OHDA induced parkinsonian rats: a nuclear microscopy study. *Brain Research* **735**, 149–153 (1996).
- [HE03] Y. HE, P. S. THONG, T. LEE, S. K. LEONG, B. Y. MAO, F. DONG, F. WATT. Dopaminergic cell death precedes iron elevation in MPTP-injected monkeys. *Free Radic Biol Med* **35**, 540–547 (2003).
- [HE07] X. HE, P. HAHN, J. IACOVELLI, R. WONG, C. KING, R. BHISITKUL, M. MASSARO GIORDANO, J. L. DUNAIEF. Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* **26** (6), 649–673 (2007).
- [HEB99] G. HEBBRECHT, W. MAENHAUT, J. D. REUCK. Brain trace elements and aging. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **150**, 208–213 (1999).
- [HEI96] C. A. HEID, J. STEVENS, K. J. LIVAK, P. M. WILLIAMS. Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 986–994 (1996).
- [HER05] HERCULANO-HOUZEL, S. AND LENT, R. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *J Neurosci* **25**, 2518–2521 (2005).
- [HER06] HERCULANO-HOUZEL, S. AND MOTA, B. AND LENT, R. Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12138–12143 (2006).
- [HIG92] R. HIGUCHI, G. DOLLINGER, P. S. WALSH, R. GRIFFITH. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**, 413–417 (1992).
- [HIL84] J. M. HILL, R. C. SWITZER. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience* **11**, 595–603 (1984).
- [HIL85] J. M. HILL. Iron concentration reduced in ventral pallidum, globus pallidus, and substantia nigra by GABA-transaminase inhibitor,.. *Brain Research* **342** (1), 18–25 (1985).
- [HIL07] H. HILBIG, S. NOWACK, K. BOECKLER, H. J. BIDMON, K. ZILLES. Characterization of neuronal subsets surrounded by perineuronal nets in the rhesus auditory brainstem. *J Anat* **210**, 507–517 (2007).

- [HIR99] E. C. HIRSCH. Mechanism and consequences of nerve cell death in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* **56**, 127–137 (1999).
- [HOB98] C. HOB OHM, W. HÄRTIG, K. BRAUER, G. BRÜCKNER. Low expression of extracellular matrix components in rat brain stem regions containing modulatory aminergic neurons. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **15**, 135–142 (1998).
- [HOB05] C. HOB OHM, A. GÜNTHER, J. GROSCHE, S. ROSSNER, D. SCHNEIDER, G. BRÜCKNER. Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Res.* **80** (4), 539–548 (2005).
- [HOC83] S. HOCKFIELD, R. D. MCKAY. A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 5758–5761 (1983).
- [HOC90A] S. HOCKFIELD, R. G. KALB, S. ZAREMBA, H. FRYER. Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **55**, 505–514 (1990).
- [HOC90B] S. HOCKFIELD, R. B. TOOTELL, S. ZAREMBA. Molecular differences among neurons reveal an organization of human visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87** (8), 3027–3031 (1990).
- [HOE04] H. H. HOEPKEN, T. KORTEN, S. R. ROBINSON, R. DRINGEN. Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate. *J Neurochem* **88**, 1194–1202 (2004).
- [HOL07] A. L. HOLME, S. K. YADAV, S. PERVAIZ. Automated laser scanning cytometry: a powerful tool for multi-parameter analysis of drug-induced apoptosis. *Cytometry A* **71**, 80–86 (2007).
- [HOL08] M. HOLZER, J. STIELER. *Proteingehalt einer neuronalen Zelle.: persönliche Mitteilung (mündlich)*, (2008).
- [HON05] K. HONDA, M. A. SMITH, X. ZHU, D. BAUS, W. C. MERRICK, AM TARTAKOFF, T. HATTIER, P. L. HARRIS, S. L. SIEDLAK, H. FUJIOKA, Q. LIU, P. I. MOREIRA, F. P. MILLER, A. NUNOMURA, S. SHIMOHAMA, G. PERRY. Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. *J Biol Chem* **280**, 20978–20986 (2005).
- [HOR03] A. K. HORN, G. BRÜCKNER, W. HÄRTIG, A. MESSOUDI. Saccadic omnipause and burst neurons in monkey and human are ensheathed by perineuronal nets but differ in their expression of calcium-binding proteins. *J Comp Neurol* **455** (3), 341–352 (2003).

- [INF07] INFANTE, ANTHONY A. AND INFANTE, DZINTRA AND CHAN, MUH-CHUN AND HOW, POH-CHOO AND KUTSCHERA, WALTRAUD AND LINHARTOVÁ, IRENA AND MÜLLNER, ERNST W. AND WICHE, GERHARD AND PROPST, FRIEDRICH. Ferritin associates with marginal band microtubules. *Experimental Cell Research* **313** (8), 1602–1614 (2007).
- [ISE04] E. ISEKI. Dementia with Lewy bodies: reclassification of pathological subtypes and boundary with Parkinson's disease or Alzheimer's disease. *Neuropathology* **24**, 72–78 (2004).
- [ISH02] ISHIHARA, R. AND IDE-EKTESSABI, A. AND IKEDA, K. AND MIZUNO, Y. AND FUJISAWA, S. AND TAKEUCHI, T. AND OHTA, T. Investigation of cellular metallic elements in single neurons of human brain tissues. *Neuroreport* **13**, 1817–1820 (2002).
- [JEN91] P. JENNER. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* **136**, 6–15 (1991).
- [JEO03] SUH YOUNG JEONG, SAMUEL DAVID. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Ceruloplasmin Is Required for Iron Efflux from Cells in the Central Nervous System. *J. Biol. Chem.* **278** (29), 27144–27148 (2003).
- [JOH95] S. A. E. JOHANSSON, J. L. CAMPBELL, K. G. MALMQVIST. *Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE). Monographs on Analytical Chemistry and Its Application*. Wiley, New York (1995).
- [KAA08] J. H. KAAS, H. X. QI, M. J. BURISH, O. A. GHARBAWIE, S. M. ONIFER, J. M. MASSEY. Cortical and subcortical plasticity in the brains of humans, primates, and rats after damage to sensory afferents in the dorsal columns of the spinal cord. *Experimental Neurology* **209** (2), 407–416 (2008).
- [KAB04] PETER KABOS, HARRY MATUNDAN, MANDANA ZANDIAN, CRISTINA BERTOLOTTI, MICHAEL L. ROBINSON, BRIAN E. DAVY, JOHN S. YU, RICHARD C. KRUEGER. Neural precursors express multiple chondroitin sulfate proteoglycans, including the lectican family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **318** (4), 955–963 (2004).
- [KAK02] O. KAKHLON, Z. I. CABANTCHIK. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 1037–1046 (2002).
- [KAM91] L. A. KAMENSKY, L. D. KAMENSKY. Microscope-based multiparameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data. *Cytometry* **12** (5), 381–387 (1991).
- [KAM99] N. KAMIYA, T. YOKOSE, Y. KIYOMATSU, M. T. FAHEY, T. KODAMA, K. MUKAI. Assessment of DNA content in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of lung cancer by laser scanning cytometer. *Pathol Int* **49**, 695–701 (1999).

- [KAU04] D. KAUR, J. ANDERSEN. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Research Reviews* **3**, 327–343 (2004).
- [KE05] Y. KE, Y. Z. CHANG, X. L. DUAN, J. R. DU, L. ZHU, K. WANG, X. D. YANG, K. P. HO, Z. M. QIAN. Age-dependent and iron-independent expression of two mRNA isoforms of divalent metal transporter 1 in rat brain. *Neurobiol Aging* **26**, 739–748 (2005).
- [KEH00] J. P. KEHRER. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149** (1), 43–50 (2000).
- [KHA06] A. KHAN, J. P. DOBSON, C. EXLEY. Redox cycling of iron by A $\beta$ 42. *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 557–569 (2006).
- [KOE95] A. H. KOEPPEN. The history of iron in the brain. *Journal of the Neurological Sciences* **134**, 1–9 (1995).
- [KÖP97] G. KÖPPE, G. BRÜCKNER, W. HÄRTIG, B. DELPECH, V. BIGL. Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *Histochem J* **29**, 11–20 (1997).
- [KOP01] W. H. KOPPENOL. The Haber-Weiss-cycle – 70 years later. *Redox Report* **6** (4), 229–234 (2001).
- [KOS89] T. KOSAKA, C. W. HEIZMANN. Selective staining of a population of parvalbumin-containing GABAergic neurons in the rat cerebral cortex by lectins with specific affinity for terminal N-acetylgalactosamine. *Brain Res* **483**, 158–163 (1989).
- [KRU03] M. KRUSZEWSKI. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **531** (1), 81–92 (2003).
- [KUB06] M. KUBISTA, J. M. ANDRADE, M. BENGTSSON, A. FOROOTAN, J. JONAK, K. LIND, R. SINDELKA, R. SJOBACK, B. SJOGREEN, L. STROMBOM, A. STAHLBERG, N. ZORIC. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**, 95–125 (2006).
- [KUM07] S. S. KUMAR, P. S. BUCKMASTER. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* **1142**, 54–60 (2007).
- [LAE70] U. K. LAEMMLI. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- [LAF84] M. LAFARGA, M. T. BERCIANO, M. BLANCO. The perineuronal net in the fastigial nucleus of the rat cerebellum. A Golgi and quantitative study. *Anat Embryol (Berl)* **170**, 79–85 (1984).

- [LAF06] W. LAFFERS, A. MITTAG, D. LENZ, A. TÁRNOK, A. O. GERSTNER. Iterative restaining as a pivotal tool for n-color immunophenotyping by slide-based cytometry. *Cytometry A* **69**, 127–130 (2006).
- [LAM05] LAM, Y. W. AND TRINKLE-MULCAHY, L. AND LAMOND, A. I. The nucleolus. *J Cell Sci.* **118** (Pt 7), 1335–1337 (2005).
- [LAN98] C. LANDER, H. ZHANG, S. HOCKFIELD. Neurons produce a neuronal cell surface-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* **18**, 174–183 (1998).
- [LIE97] S. VAN LIERDE, W. MAENHAUT, J. DE REUCK, R. D. VIS. Nuclear microprobe analysis of brain tissue: Quantitative aspects and concentration variability of minor and trace elements. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **130**, 444–448 (1997).
- [LIE01] P. T. LIEU, M. HEISKALA, P. A. PETERSON, Y. YANG. The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* **22**, 1–87 (2001).
- [LIN05] D. LIND, S. FRANKEN, J. KAPPLER, J. JANKOWSKI, K. SCHILLING. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* **79**, 295–302 (2005).
- [LIS04] A. LIS, T. A. BARONE, P. N. PARADKAR, R. J. PLUNKETT, J. A. ROTH. Expression and localization of different forms of DMT1 in normal and tumor astroglial cells. *Brain Res Mol Brain Res* **122**, 62–70 (2004).
- [LOB06] R. LOBINSKI, C. MOULIN, R. ORTEGA. Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie* **88**, 1591–1604 (2006).
- [MAK98] MAKJANIC, J. AND McDONALD, B. AND LI-HSIAN, CHEN C. P. AND WATT, F. Absence of aluminium in neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease. *Neuroscience Letters* **240**, 123–126 (1998).
- [MAK99] J. MAKJANIC, F. WATT. Nuclear microscopy in Alzheimer’s disease. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **150**, 167–172 (1999).
- [MAN04] S. MANDEL, G. MAOR, M. B. YODIM. Iron and  $\alpha$ -synuclein in the substantia nigra of MPTP-treated mice: effect of neuroprotective drugs R-apomorphine and green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Mol Neurosci* **24**, 401–416 (2004).
- [MAS08] J. M. MASSEY, J. AMPS, M. S. VIAPIANO, R. T. MATTHEWS, M. R. WAGONER, C. M. WHITAKER, W. ALILAIN, A. L. YONKOF, A. KHALYFA, N. G. F. COOPER. Increased chondroitin sulfate proteoglycan expression in denervated brainstem targets following spinal cord injury.. *Experimental Neurology* **209** (2), 426–445 (2008).

- [MAT02] R. T. MATTHEWS, G. M. KELLY, C. A. ZERILLO, G. GRAY, M. TIE-MEYER, S. HOCKFIELD. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci* **22**, 7536–7547 (2002).
- [MAU94] P. MAUREL, U. RAUCH, M. FLAD, R. K. MARGOLIS, R. U. MARGOLIS. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91** (7), 2512–2516 (1994).
- [MAX03] MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT. Kabelschaden im Gehirn: SCHWERpunkt: Zwischen Labor und Klinik. *MaxPlanckForschung 1/2003* **1**, 43–47 (2003).
- [McK82] R. D. MCKAY, S. J. HOCKFIELD. Monoclonal antibodies distinguish antigenically discrete neuronal types in the vertebrate central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6747–6751 (1982).
- [McK01] MCKIE, A. T. AND BARROW, D. AND LATUNDE-DADA, G. O. AND ROLFS, A. AND SAGER, G. AND MUDALY, E. AND MUDALY, M. AND RICHARDSON, C. AND BARLOW, D. AND BOMFORD, A. AND PETERS, T. J. AND RAJA, K. B. AND SHIRALI, S. AND HEDIGER, M. A. AND FARZANEH, F. AND SIMPSON, R. J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**, 1755–1759 (2001).
- [MCR07] PAULETTE A. MCRAE, MARY M. ROCCO, GAIL KELLY, JOSHUA C. BRUMBERG, RUSSELL T. MATTHEWS. Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27** (20), 5405–5413 (2007).
- [MED04] MEDINA-FLORES, R. AND WANG, G. AND BISSEL, S. J. AND MURPHEY-CORB, M. AND WILEY, C. A. Destruction of extracellular matrix proteoglycans is pervasive in simian retroviral neuroinfection. *Neurobiology of Disease* **16**, 604–616 (2004).
- [MEH05] JANA MEHLHASE, GRIT SANDIG, KOSTAS PANTOPOULOS, TILMAN GRUNE. Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Radical Biology and Medicine* **38** (2), 276–285 (2005).
- [MEI06] C. MEINECKE, M. MORAWSKI, T. REINERT, T. ARENDT, T. BUTZ. Cellular distribution and localisation of iron in adult rat brain (substantia nigra). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **249**, 688–691 (2006).
- [MEN04] F. MENZEL, T. REINERT, J. VOGT, T. BUTZ. Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **219–220**, 82–86 (2004).

- [MEY95] MEYER-PUTTLITZ, B. AND MILEV, P. AND JUNKER, E. AND ZIMMER, I. AND MARGOLIS, R. U. AND MARGOLIS, R. K. Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissue: developmental changes of neurocan and phosphacan. *J Neurochem* **65**, 2327–2337 (1995).
- [MIY07] S. MIYATA, Y. NISHIMURA, T. NAKASHIMA. Perineuronal nets protect against amyloid  $\beta$ -protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res* **1150**, 200–206 (2007).
- [MOL07] MOLINA-HOLGADO, FRANCISCO AND HIDER, ROBERT C. AND GAETA, ALESSANDRA AND WILLIAMS, ROBERT AND FRANCIS, PAUL. Metals ions and neurodegeneration. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **20** (3–4), 639–654 (2007).
- [MON88] A. ESPINOSA DE LOS MONTEROS, F. CHIAPELLI, R. S. FISHER, J. DE VELLIS. Transferrin: an early marker of oligodendrocytes in culture. *Int J Dev Neurosci* **6**, 167–175 (1988).
- [MOO96] T. MOOS. Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *J Comp Neurol* **375**, 675–692 (1996).
- [MOO00] T. MOOS, E. H. MORGAN. Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 77–95 (2000).
- [MOO02A] T. MOOS. Brain iron homeostasis. *Dan Med Bull* **49**, 279–301 (2002).
- [MOO02B] T. MOOS, E. H. MORGAN. A morphological study of the developmentally regulated transport of iron into the brain. *Dev Neurosci* **24**, 99–105 (2002).
- [MOO04] T. MOOS, E. H. MORGAN. The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. *Ann N Y Acad Sci* **1012**, 14–26 (2004).
- [MOO06] T. MOOS, N. T. ROSENGREN. Ferroportin in the postnatal rat brain: implications for axonal transport and neuronal export of iron. *Semin Pediatr Neurol* **13**, 149–157 (2006).
- [MOO07] T. MOOS, N. T. ROSENGREN, T. SKJORRINGE, E. H. MORGAN. Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem* **103**, 1730–1740 (2007).
- [MOR92A] MORINO-WANNIER, P. AND FUJITA, S. C. AND JONES, E. G. GABAergic neuronal populations in monkey primary auditory cortex defined by co-localized calcium binding proteins and surface antigens. *Exp Brain Res* **88**, 422–432 (1992).
- [MOR92B] C. M. MORRIS, J. M. CANDY, A. E. OAKLEY, C. A. BLOXHAM, J. A. EDWARDSON. Histochemical distribution of non-haem iron in the human brain. *Acta Anat (Basel)* **144**, 235–257 (1992).

- [MOR00] N. P. MORRIS, Z. HENDERSON. Perineuronal nets ensheath fast spiking, parvalbumin-immunoreactive neurons in the medial septum/diagonal band complex. *Eur J Neurosci* **12**, 828–838 (2000).
- [MOR04A] EZEQUIEL MORALES, FERNANDO R FERNANDEZ, SUZANNE SINCLAIR, MICHAEL M MOLINEUX, W. HAMISH MEHAFFEY, RAY W TURNER. Releasing the peri-neuronal net to patch-clamp neurons in adult CNS. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **448** (2), 248–258 (2004).
- [MOR04B] M. MORAWSKI, M. K. BRÜCKNER, P. RIEDERER, G. BRÜCKNER, T. ARENDT. Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol* **188**, 309–315 (2004).
- [MOR04C] M. MORAWSKI, T. REINERT, G. BRÜCKNER, F. E. WAGNER, T. ARENDT, W. TRÖGER. The Binding of Iron to Perineuronal Nets: A Combined Nuclear Microscopy and Mössbauer Study. *Hyperfine Interactions* **159**, 285–291 (2004).
- [MOR05A] M. MORAWSKI, C. MEINECKE, T. REINERT, A. C. DÖRFFEL, P. RIEDERER, T. ARENDT, T. BUTZ. Determination of trace elements in the human substantia nigra. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **231** (1–4), 224–228 (2005).
- [MOR05B] M. MORAWSKI, T. REINERT, C. MEINECKE, T. ARENDT, T. BUTZ. Antibody meets the microbeam – or how to find neurofibrillary tangles. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **231**, 229–233 (2005).
- [MOR06] M. MORAWSKI. *Perineuronal nets: A potentially neuroprotective structure against iron mediated oxidative processes in Alzheimers and Parkinsons disease: Dissertation*. Dissertation, Universität Leipzig, Leipzig (2006).
- [MOR07] J. MORA, C. LAVARINO, M. ALAMINOS, N. K. CHEUNG, J. RIOS, C. DE TORRES, P. ILLEI, G. JUAN, W. L. GERALD. Comprehensive analysis of tumoral DNA content reveals clonal ploidy heterogeneity as a marker with prognostic significance in locoregional neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 385–396 (2007).
- [MOR08A] M. MORAWSKI. *persönliche Mitteilung (mündlich)*, (2008).
- [MOR08B] M. MORAWSKI, A. ALPÁR, G. BRÜCKNER, A. FIEDLER, C. JÄGER, T. ARENDT. Postnatal development of chondroitin sulfate proteoglycan-based extracellular matrix in chicken (*Gallus domesticus*) brain. *eingereicht* (2008).
- [MOR08C] M. MORAWSKI, C. JÄGER, TH. ARENDT BRÜCKNER, G. Perineuronal nets in the lesser tenrec hedgehog (*Echinops telfairi*). **in Vorbereitung** (2008).

- [MOR08D] M. MORAWSKI, S. PAVLICA, G. SEEGER, J. GROSCHE, E. KOUZNETSOVA, R. SCHLIEBS, G. BRÜCKNER, T. ARENDT. Perineuronal nets are largely unaffected in Alzheimer model Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging* Seite im Druck (2008).
- [MOS06] B. MOSCH, A. MITTAG, D. LENZ, T. ARENDT, A. TÁRNOK. Laser scanning cytometry in human brain slices. *Cytometry A* **69**, 135–138 (2006).
- [MOS07] BIRGIT MOSCH. *Neuronale Aneuploidie und DNA-Replikation im normalen humanen Gehirn und bei der Alzheimerschen Erkrankung: Dissertation*. Dissertation, Universität Leipzig, Leipzig (2007).
- [MUL92] R. J. MULLEN, C. R. BUCK, A. M. SMITH. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201–211 (1992).
- [MUR94] T. MURAKAMI, M. TSUBOUCHI, Y. TUBOUCHI, T. TAGUCHI, A. OHTSUKA. The occurrence of neurons with strongly negatively charged surface coats in mammalian, avian, reptilian, amphibian and piscine brains. *Acta Med Okayama*. **48** (4), 195–197 (1994).
- [MUR95] T. MURAKAMI, A. OHTSUKA, T. TAGUCHI, D. X. PIAO. Perineuronal sulfated proteoglycans and dark neurons in the brain and spinal cord: a histochemical and electron microscopic study of newborn and adult mice. *Arch Histol Cytol* **58**, 557–565 (1995).
- [NOV00] ULRIKE NOVAK, ANDREW H. KAYE. Extracellular matrix and the brain: components and function. *Journal of Clinical Neuroscience* **7** (4), 280–290 (2000).
- [OHY97] J. OHYAMA, H. OJIMA. Labeling of pyramidal and nonpyramidal neurons with lectin *Vicia villosa* during postnatal development of the guinea pig. *J Comp Neurol* **389**, 453–468 (1997).
- [OJI98] H. OJIMA, M. SAKAI, J. OHYAMA. Molecular heterogeneity of *Vicia villosa*-recognized perineuronal nets surrounding pyramidal and nonpyramidal neurons in the guinea pig cerebral cortex. *Brain Res* **786**, 274–280 (1998).
- [ORI01] K. ORINO, L. LEHMAN, Y. TSUJI, H. AYAKI, S. V. TORTI, F. M. TORTI. Ferritin and the response to oxidative stress. *The Biochemical Journal* **357** (1), 241–247 (2001).
- [ORT05] R. ORTEGA. Chemical elements distribution in cells. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **231**, 218–223 (2005).
- [ORT07] R. ORTEGA, P. CLOETENS, G. DEVES, A. CARMONA, S. BOHIC. Iron Storage within Dopamine Neurovesicles Revealed by Chemical Nano-Imaging. *PLoS ONE* **9**, e925 (2007).

- [PAN04] K. PANTOPOULOS. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* **1012**, 1–13 (2004).
- [PAN06] H. PANTAZOPOULOS, N. LANGE, L. HASSINGER, S. BERRETTA. Subpopulations of neurons expressing parvalbumin in the human amygdala. *J Comp Neurol* **496**, 706–722 (2006).
- [PAN08] H. PANTAZOPOULOS, E. A. MURRAY, S. BERRETTA. Total number, distribution, and phenotype of cells expressing chondroitin sulfate proteoglycans in the normal human amygdala. *Brain Res* **1207**, 84–95 (2008).
- [PAP98] M. C. PAPADOPOULOS, I. L. KOUMENIS, T. Y. YUAN, R. G. GIFFARD. Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neuroscience* **82**, 915–925 (1998).
- [PAR06] PARKS, M. ROEDERER, W. A. MOORE. A new 'Logicle' display method avoids deceptive effects of logarithmic scaling for low signals and compensated data. *Cytometry A* **69**, 541–551 (2006).
- [PAX98] G. PAXINOS, C. WATSON. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, vol. 4th edition. Academic Press, New York (1998).
- [PAX04] G. PAXINOS. *The Rat Nervous System*, vol. 3th edition. Elsevier Academic Press, London (2004).
- [PER67] M. PERL. Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin* **39** (1), 42–48 (1867).
- [PET02] F. PETRAT, D. WEISHEIT, M. LENSEN, H. DE GROOT, R. SUSTMANN, U. RAUEN. Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem J.* **362**, 137–147 (2002).
- [PET08] R. A. PETERSON, D. L. KRULL, L. BUTLER. Applications of laser scanning cytometry in immunohistochemistry and routine histopathology. *Toxicol Pathol* **36**, 117–132 (2008).
- [PIN00] PINERO, D. J. AND LI, N. Q. AND CONNOR, J. R. AND BEARD, J. L. Variations in dietary iron alter brain iron metabolism in developing rats. *J Nutr* **130**, 254–263 (2000).
- [PIZ02] TOMMASO PIZZORUSSO, PAOLO MEDINI, NICOLETTA BERARDI, SABRINA CHIERZI, JAMES W. FAWCETT, LAMBERTO MAFFEI. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science (New York, N.Y.)* **298** (5596), 1248–1251 (2002).
- [PRU05] PRUIMBOOM-BREES, I. M. AND BREES, D. J. AND SHEN, A. C. AND KEENER, M. AND FRANCONI, O. AND AMACHER, D. E. AND LOY, J.

- K. AND KERLIN, R. L. Using laser scanning cytometry to measure PPAR-mediated peroxisome proliferation and  $\beta$  oxidation. *Toxicol Pathol.* **33** (1), 86–91 (2005).
- [QIA98] Z. M. QIAN, Q. WANG. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews* **27**, 257–267 (1998).
- [QIA01] Z. M. QIAN, X. SHEN. Brain iron transport and neurodegeneration. *Trends in Molecular Medicine* **7**, 103–108 (2001).
- [QUE08] E. L. QUE, D. W. DOMAILLE, C. J. CHANG. Metals in Neurobiology: Probing Their Chemistry and Biology with Molecular Imaging. *Chem. Rev.* **108**, 1517–1549 (2008).
- [QUI95] B. QUINN, A. W. TOGA, S. MOTAMED, C. A. MERLIC. Fluoro nissl green: a novel fluorescent counterstain for neuroanatomy. *Neurosci Lett* **184**, 169–172 (1995).
- [QUI06] QUINTANA, C. AND BELLEFQIH, S. AND LAVAL, J. Y. AND GUERQUIN-KERN, J. L. AND WU, T. D. AND AVILA, J. AND FERRER, I. AND ARRANZ, R. AND PATINO, C. Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *Journal of Structural Biology* **153**, 42–54 (2006).
- [RAJ05] R. RAJENDRAN, M. REN, G. CASADESUS, M. A. SMITH, G. PERRY, E. HUANG, W. Y. ONG, B. HALLIWELL, F. WATT. Nuclear microscopy of diffuse plaques in the brains of transgenic mice. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **231** (1–4), 326–332 (2005).
- [RAW05] D. RAWER. *Real-Time PCR: Optimierung und Evaluation, Etablierung von Housekeeping-Genen und die Expressionsanalyse bei Fallotscher Tetralogie: Dissertation.* Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen (2005).
- [REI75] J. M. REID, D. G. GWYM, B. A. FLUMERFELT. A cytoarchitectonic and Golgi study of the red nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology* **162** (3), 337–361 (1975).
- [REI01] T. REINERT. *Ionenstrahluntersuchungen am Gelenkknorpel: Dissertation.* Dissertation, Universität Leipzig, Leipzig (2001).
- [REI03] T. REINERT, M. MORAWSKI, T. ARENDT, T. BUTZ. Quantitative microanalysis of perineuronal nets in brain tissue. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **210**, 395–400 (2003).
- [REI04] T. REINERT, A. FIEDLER, J. SKOPEK, J. TANNER, J. VOGT, T. BUTZ. Single ion bombardment of living cells at LIPSION. *Nuclear Instruments and*

- Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **219–220**, 77–81 (2004).
- [REI07A] REIMERS, S. AND HARTLAGE-RÜBSAMEN, M. AND BRÜCKNER, G. AND ROSSNER, S. Formation of perineuronal nets in organotypic mouse brain slice cultures is independent of neuronal glutamatergic activity. *Eur J Neurosci* **25**, 2640–2648 (2007).
- [REI07B] K. C. REINERT, W. GAO, G. CHEN, T. J. EBNER. Flavoprotein autofluorescence imaging in the cerebellar cortex in vivo. *J Neurosci Res* **85**, 3221–3232 (2007).
- [REN01] M. Q. REN, J. P. XIE, X. S. WANG, W. Y. ONG, S. K. LEONG, F. WATT. Iron concentrations and distributions in the parkinsonian substantia nigra of aged and young primate models. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **181**, 522–528 (2001).
- [REN03] M. Q. REN, W. Y. ONG, X. S. WANG, F. WATT. A nuclear microscopic and histochemical study of iron concentrations and distribution in the mid-brain of two age groups of monkeys unilaterally injected with MPTP. *Exp Neurol* **184**, 947–954 (2003).
- [RET98] W. RETZ, W. GSELL, G. MÜNCH, M. RÖSLER, P. RIEDERER. Free radicals in Alzheimer’s disease. *J Neural Transm Suppl.* **54**, 221–236 (1998).
- [RHO04] K. E. RHODES, J. W. FAWCETT. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* **204**, 33–48 (2004).
- [RIE92] P. RIEDERER, K. W. LANGE. Pathogenesis of Parkinson’s disease. *Current opinion in neurology and neurosurgery* **5** (3), 295–300 (1992).
- [RIE04] JAN RIEMER, HANS HERMANN HOEPKEN, HANIA CZERWINSKA, STEPHEN R. ROBINSON, RALF DRINGEN. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Analytical Biochemistry* **331** (2), 370–375 (2004).
- [ROE01] M. ROEDERER. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* **45**, 194–205 (2001).
- [ROS94] A. J. ROSKAMS, J. R. CONNOR. Iron, transferrin, and ferritin in the rat brain during development and aging. *J Neurochem* **63**, 709–716 (1994).
- [ROT03] J. A. ROTH, M. D. GARRICK. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochemical Pharmacology* **66**, 1–13 (2003).
- [ROU05] T. A. ROUAULT, W. H. TONG. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 345–351 (2005).

- [ROU06] T. A. ROUAULT, S. COOPERMAN. Brain Iron Metabolism. *Seminars in Pediatric Neurology* **13**, 142–148 (2006).
- [ROY01] C. N. ROY, N. C. ANDREWS. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum Mol Genet* **10**, 2181–2186 (2001).
- [RUO96] E. RUOSLAHTI. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* **6** (5), 489–492 (1996).
- [RUT11] E. RUTHERFORD. The scattering of  $\alpha$  and  $\beta$  particles by matter and the structure of the atoms. *Philos. Mag.* (6), 1–24 (1911).
- [RYA01] C. G. RYAN. Developments in Dynamic Analysis for quantitative PIXE true elemental imaging. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **181**, 170–179 (2001).
- [SAC69] L. SACHS. *Statistische Auswertungsmethoden*. Springer, Berlin, 2. Ausgabe (1969).
- [SAC04] U. SACK, J. BOCSI, A. TÁRNOK. Slide-based cytometry and predictive medicine: the 8th Leipziger workshop and the 1st international workshop on slide-based cytometry. *Cytometry A* **60**, 189–205 (2004).
- [SAG01] A. K. SAGHATELYAN, A. DITYATEV, S. SCHMIDT, T. SCHUSTER, U. BARTSCH, M. SCHACHNER. Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci.* **17** (1), 226–240 (2001).
- [SAV99] J. SAVORY, M. M. HERMAN. Advances in instrumental methods for the measurement and speciation of trace metals. *Ann Clin Lab Sci.* **29** (2), 118–126 (1999).
- [SAY00] L. M. SAYRE, G. PERRY, P. L. HARRIS, Y. LIU, K. A. SCHUBERT, M. A. SMITH. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J Neurochem* **74**, 270–279 (2000).
- [SCH82] L. C. SCHMUED, L. W. SWANSON, P. E. SAWCHENKO. Some fluorescent counterstains for neuroanatomical studies. *J Histochem Cytochem* **30**, 123–128 (1982).
- [SCH95] D. SCHUBERT, M. CHEVION. The role of iron in beta amyloid toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **216** (2), 702–707 (1995).
- [SCH02] K. SCHUPPEL, K. BRAUER, W. HÄRTIG, J. GROSCHE, B. EARLEY, B. E. LEONARD, G. BRÜCKNER. Perineuronal nets of extracellular matrix around hippocampal interneurons resist destruction by activated microglia in trimethyltin-treated rats. *Brain Res* **958**, 448–453 (2002).

- [SCH04] N. B. SCHWARTZ, M. DOMOWICZ. Proteoglycans in brain development. *Glycoconj J* **21**, 329–341 (2004).
- [SEE94] G. SEEGER, K. BRAUER, W. HÄRTIG, G. BRÜCKNER. Mapping of perineuronal nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide histochemistry and lectin cytochemistry. *Neuroscience* **58**, 371–388 (1994).
- [SER05] C. SERGEANT, M. H. VESVRES, G. DEVES, F. GUILLOU. Calcium, potassium, iron, copper and zinc concentrations in the white and gray matter of the cerebellum and corpus callosum in brain of four genetic mouse strains. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **231**, 234–238 (2005).
- [SER06A] R. F. B. SERPA, E. F. O. DE JESUS, M. J. ANJOS, M. G. T. DO CARMO, M. S. ROCHA, A. M. B. MARTINEZ, R. T. LOPES. Elemental concentration analysis in brain structures from young, adult and old Wistar rats by total reflection X-ray fluorescence with synchrotron radiation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **61**, 1205–1209 (2006).
- [SER06B] R. F. B. SERPA, E. F. O. DE JESUS, M. J. ANJOS, R. T. LOPES, M. G. T. DO CARMO, M. S. ROCHA, L. C. RODRIGUES, S. MOREIRA, A. M. B. MARTINEZ. Cognitive impairment related changes in the elemental concentration in the brain of old rat: TXRF-2005, 11th International Conference on Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry and Related Methods. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **61** (10–11), 1219–1223 (2006).
- [SIL04] JERRY SILVER, JARED H. MILLER. Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews. Neuroscience* **5** (2), 146–156 (2004).
- [SIR08] SIRRI, V. AND URCUQUI-INCHIMA, S. AND ROUSSEL, P. AND HERNANDEZ-VERDUN, D. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol.* **129** (1), 13–31 (2008).
- [SMI97] M. A. SMITH, P. L. HARRIS, L. M. SAYRE, G. PERRY. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9866–9868 (1997).
- [SOH89] R. S. SOHAL, U. T. BRUNK. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol.* **266**, 17–26 (1989).
- [SON07] N. SONG, H. JIANG, J. WANG, J. X. XIE. Divalent metal transporter 1 up-regulation is involved in the 6-hydroxydopamine-induced ferrous iron influx. *J Neurosci Res* **85**, 3118–3126 (2007).
- [SPA22] H. SPATZ. Über die Eisennachweise im Gehirn, besonders in Zentren des extrapyramidal-motorischen Systems. Teil I. *Z Ges Neurol Psychiat* **77**, 261–390 (1922).

- [SPI98] M. G. SPILLANTINI, R. A. CROWTHER, R. JAKES, M. HASEGAWA, M. GOEDERT.  $\alpha$ -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6469–6473 (1998).
- [STA05] C. E. STAFSTROM. The role of the subiculum in epilepsy and epileptogenesis. *Epilepsy Curr* **5**, 121–129 (2005).
- [STE59] H. STERN, F. B. JOHNSTON, G. SETTERFIELD. Some Chemical Properties of Isolated Pea Nucleoli. *J. BIOPHYSIC. AND BIOCHEM. CYTOL.* **6** (1), 57–60 (1959).
- [STE88] D. T. STEPHENSON, P. D. KUSHNER. An Atlas of a Rare Neuronal Surface Antigen in the Rat Central Nervous System. *J. Neurosci.* **8** (8), 3035–3056 (1988).
- [STE96] C. STEINHAUSER. In situ Eigenschaften zentraler Gliazellen: Konsequenzen für das Konzept der Informationsverarbeitung im ZNS? *Biologie in unserer Zeit* **26** (2), 78–84 (1996).
- [SUR04] N. SURGULADZE, K. M. THOMPSON, J. L. BEARD, J. R. CONNOR, M. G. FRIED. Interactions and reactions of ferritin with DNA. *J Biol Chem* **279**, 14694–14702 (2004).
- [TÁR02] A. TÁRNOK, A. O. GERSTNER. Clinical applications of laser scanning cytometry. *Cytometry* **50**, 133–143 (2002).
- [TEM02] D. M. TEMPLETON. *Molecular and cellular iron transport*. Marcel Dekker, Inc., New York (2002).
- [TER04] ALEXEI TERMAN, ULF T. BRUNK. Lipofuscin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36** (8), 1400–1404 (2004).
- [THO99A] F. THOMAS, G. SERRATRICE, C. BEGUIN, E. S. AMAN, J. L. PIERRE, M. FONTECAVE, J. P. LAULHERE. Calcein as a fluorescent probe for ferric iron. Application to iron nutrition in plant cells. *J Biol Chem* **274** (19), 13375–13383 (1999).
- [THO99B] P. S.P. THONG, F. WATT, D. PONRAJ, S. K. LEONG, Y. HE, T. K.Y. LEE. Iron and cell death in Parkinson's disease: a nuclear microscopic study into iron-rich granules in the parkinsonian substantia nigra of primate models. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **158**, 349–355 (1999).
- [THO00] N. THON, C. A. HAAS, U. RAUCH, T. MERTEN, R. FASSLER, M. FROTSCHER, T. DELLER. The chondroitin sulphate proteoglycan brevican is upregulated by astrocytes after entorhinal cortex lesions in adult rats. *Eur J Neurosci* **12**, 2547–2558 (2000).

- [THO01] K. J. THOMPSON, S. SHOHAM, J. R. CONNOR. Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Research Bulletin* **55**, 155–164 (2001).
- [THO02] K. J. THOMPSON, M. G. FRIED, Z. YE, P. BOYER, J. R. CONNOR. Regulation, mechanisms and proposed function of ferritin translocation to cell nuclei. *J Cell Sci* **115**, 2165–2177 (2002).
- [THO03] A. M. THOMSON, A. P. BANNISTER. Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex* **13**, 5–14 (2003).
- [TSU08] T. TSUJIOKA, A. TOCHIGI, M. KISHIMOTO, T. KONDO, T. TASAKA, H. WADA, T. SUGIHARA, Y. YOSHIDA, K. TOHYAMA. DNA ploidy and cell cycle analyses in the bone marrow cells of patients with megaloblastic anemia using laser scanning cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* **74**, 104–109 (2008).
- [ULF01] N. ULFIG, W. Y. CHAN. Differential expression of calcium-binding proteins in the red nucleus of the developing and adult human brain. *Anat Embryol (Berl)* **203**, 95–108 (2001).
- [VAL05] M. VALKO, H. MORRIS, M T D CRONIN. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry* **12** (10), 1161–1208 (2005).
- [VAR03] J. D. VARGAS, B. HERPERS, A. T. MCKIE, S. GLEDHILL, J. MCDONNELL, H. M. VAN DEN, K. E. DAVIES, C. P. PONTING. Stromal cell-derived receptor 2 and cytochrome b561 are functional ferric reductases. *Biochim Biophys Acta* **1651**, 116–123 (2003).
- [VID06A] E. VIDAL, R. BOLEA, R. TORTOSA, C. COSTA, A. DOMENECH, E. MONLEON, A. VARGAS, J. J. BADIOLA, M. PUMAROLA. Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains. *Journal of Virological Methods* **136**, 137–146 (2006).
- [VID06B] E. VIDAL, M. MÁRQUEZ, R. TORTOSA, C. COSTA, A. SERAFÍN, M. PUMAROLA. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in its early stages. *Journal of Virological Methods* **134** (1–2), 15–29 (2006).
- [VIT98] VITELLARO-ZUCCARELLO, L. AND BIASI, S. DE AND SPREAFICO, R. One hundred years of Golgi's 'perineuronal net': history of a denied structure. *Ital J Neurol Sci* **19**, 249–253 (1998).
- [WAN02] X. S. WANG, W. Y. ONG, J. R. CONNOR. Increase in ferric and ferrous iron in the rat hippocampus with time after kainate-induced excitotoxic injury. *Exp Brain Res* **143**, 137–148 (2002).
- [WAT95] F. WATT, T. LEE, P. S.P. THONG, S. M. TANG. Nuclear microscopy in Parkinson's disease. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **104**, 361–364 (1995).

- [WEG03] F. WEGNER, W. HÄRTIG, A. BRINGMANN, J. GROSCHE, K. WOHLFARTH, W. ZUSCHRATTER, G. BRÜCKNER. Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 1$  subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Experimental Neurology* **184**, 705–714 (2003).
- [WEY03] A. WEYER, K. SCHILLING. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* **73**, 400–409 (2003).
- [WIG88] J. M. WIGGLESWORTH, H. BAUM. Iron-dependent enzymes in the brain. In: Youdim, M. B. H., ed. Topics in neurochemistry and neuropharmacology. Seiten 25–66 (1988).
- [WIL03] R. J.P. WILLIAMS. The biological chemistry of the brain and its possible evolution. *Inorganica Chimica Acta* **356**, 27–40 (2003).
- [WOL96] WOLF, H. K. AND BUSLEI, R. AND SCHMIDT-KASTNER, R. AND SCHMIDT-KASTNER, P. K. AND PIETSCH, T. AND WIESTLER, O. D. AND BLÜMCKE, I. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* **44**, 1167–1171 (1996).
- [WON89] WONG-RILEY, MARGARET T. T. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neurosciences* **12** (3), 94–101 (1989).
- [WU04] L. J. WU, A. G. LEENDERS, S. COOPERMAN, E. MEYRON HOLTZ, S. SMITH, W. LAND, R. Y. TSAI, U. V. BERGER, Z. H. SHENG, T. A. ROUAULT. Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res* **1001**, 108–117 (2004).
- [WU05] YAOJIONG WU, JIN WU, DANIEL Y. LEE, ALBERT YEE, LIU CAO, YAOU ZHANG, CHRIS KIANI, BURTON B. YANG. Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **24** (1), 3–13 (2005).
- [YAM00] Y. YAMAGUCHI. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **57**, 276–289 (2000).
- [YAR05] A. YARUNIN, V. G. PANSE, E. PETFALSKI, C. DEZ, D. TOLLERVEY, E. C. HURT. Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *EMBO J* **24**, 580–588 (2005).
- [YAS94] O. YASUHARA, H. AKIYAMA, E. G. MCGEER, P. L. MCGEER. Immunohistochemical localization of hyaluronic acid in rat and human brain. *Brain Res* **635**, 269–282 (1994).
- [YEF00] YEFIMOVA, M. G. AND JEANNY, J. C. AND GUILLONNEAU, X. AND KELLER, N. AND NGUYEN-LEGROS, J. AND SERGEANT, C. AND GUILLOU, F.

- AND COURTOIS, Y. Iron, ferritin, transferrin, and transferrin receptor in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 2343–2351 (2000).
- [YEF02] M. G. YEFIMOVA, J. C. JEANNY, N. KELLER, C. SERGEANT, X. GUIL-  
LONNEAU, C. BEAUMONT, Y. COURTOIS. Impaired retinal iron homeostasis  
associated with defective phagocytosis in Royal College of Surgeons rats. *In-  
vest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 537–545 (2002).
- [ZEC01] L. ZECCA, D. TAMPELLINI, M. GERLACH, P. RIEDERER, R. G. FARI-  
ELLO, D. SULZER. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and  
molecular behaviour. *Mol Pathol* **54**, 414–418 (2001).
- [ZEC03] L. ZECCA, F. A. ZUCCA, H. WILMS, D. SULZER. Neuromelanin of the sub-  
stantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics.  
*Trends in Neurosciences* **26**, 578–580 (2003).
- [ZEC04] L. ZECCA, M. B. YODIM, P. RIEDERER, J. R. CONNOR, R. R.  
CRICHTON. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev  
Neurosci* **5**, 863–873 (2004).
- [ZHA97] Z. W. ZHANG, M. DESCHENES. Intracortical axonal projections of lamina  
VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: a single-cell labeling  
study. *J Neurosci* **17**, 6365–6379 (1997).
- [ZHA08] H. ZHAO, F. TRAGANOS, Z. DARZYNKIEWICZ. Kinetics of histone H2AX  
phosphorylation and Chk2 activation in A549 cells treated with topotecan  
and mitoxantrone in relation to the cell cycle phase. *Cytometry A* **73A** (6),  
480–489 (2008).
- [ZUC06] F. A. ZUCCA, C. BELLEI, S. GIANNELLI, TERRENI, M. GALLORINI, E.  
RIZZIO, G. PEZZOLI, A. ALBERTINI, L. ZECCA. Neuromelanin and iron in  
human locus coeruleus and substantia nigra during aging: consequences for  
neuronal vulnerability. *J Neural Transm* **113**, 757–767 (2006).

# Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Rudolf Rübsamen, der mir durch seine Betreuung an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie die Anfertigung der Arbeit außerhalb der Fakultät ermöglichte und mich dadurch in meiner interdisziplinären Ausbildung unterstützte.

Besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Arendt vom Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung der Medizinischen Fakultät und bei Prof. Dr. Tilman Butz vom Institut für Experimentelle Physik II der Fakultät für Physik und Geowissenschaften für dieses Promotionsthema und für die sorgfältige Betreuung innerhalb des GRK *InterNeuro*.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Gert Brückner bedanken, der mir mit seinem Wissen jahrelanger Forschung an perineuronalen Netzen bereitwillig fachliche Auskunft gab.

Ein herzliches Dankeschön geht an Prof. Dr. Andreas Reichenbach, der durch seine studentenfreundliche Art und engagierte Organisation des GRK *InterNeuro* wesentlich zu meiner guten Betreuung und Ausbildung beigetragen hat.

Natürlich habe ich auch eine ganze Menge praktische Hilfe bei meinen Kollegen erfahren. Deshalb möchte ich mich bei Birgit für die praktische Einweisung in die qRT-PCR und bei Uwe für die theoretische Hilfe (manchmal auch Verwirrung) bedanken. Jens S. danke ich für die Einweisung in die Wissenschaft des Gradientengeließens und des Western Blottens, sowie für seine allgemeine Hilfsbereitschaft und für die Spenden aus seiner Espressomaschine. Max hat mir mit seinen spontanen und sachlichen Antworten auf allerlei Fragen jeglicher Art geholfen und mich mit seiner experimentierfreudigen Art entzückt. Frau Gruschka und Frau Bauer danke ich für ihre Unterstützung bei der Präparation der Tiere und Schnitte sowie für gefüllte Keksdosen. Kelli möchte ich für ihre gut organisierte, unkomplizierte und schnelle Erledigung bürokratischer Dinge danken. Der gesamten AG Neuroanatomie verdanke ich eine entspannte Atmosphäre voller lustiger und freundschaftlicher Momente.

Der AG Nukleare Festkörperphysik danke ich für die freundliche Aufnahme als Biologin in die Horte der Physiker vor einigen Jahren und erfreue mich an der guten und entspannten Zusammenarbeit.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Tárnok, insbesondere Anja Mittag, danke ich für die Einweisung in die Objektträger-basierte Laser Scanning Zytometrie und die Möglichkeit der Nutzung des *iCys*.

Markus gehört mein besonderer Dank. Als direkter Betreuer wies er mich engagiert in mein Thema und in alle (Immun)histochemie-assoziierten Techniken ein. Bei Fragen

und Problemen stand er, unabhängig von der Tageszeit oder dem Wochentag, hilfsbereit zur Seite. Mit seiner menschlichen und ehrliche Art unterstützte er durch gemeinsame Diskussionen und Überlegungen nicht nur mein selbständiges Arbeiten, sondern auch mich persönlich. Unser freundschaftliches Verhältnis schätze ich sehr und macht mir den Abschied besonders schwer.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Freund Tilo bedanken, der mir nicht nur als Betreuer in der Physik zur Seite stand, sondern auch privat. Er hat mich geduldig und fachkundlich in die Ionenstrahlmikroskopie und dessen Auswertung eingewiesen und mich jederzeit betreut. Dabei war er stets darauf bedacht, daß das, was er mir erklärt hat, ich auch verinnerlicht habe (für manche Ungeduldigkeit oder zugefallene Augen zu späterer Stunde möchte ich mich entschuldigen). In stressigen Zeiten war er als mein Partner immer der ausgleichende Ruhepol und unterstützte so das Zustandekommen dieser Arbeit maßgeblich.

Mein inniger Dank gilt auch meinen Ellis, die mir in der gesamten Zeit in jeglicher Hinsicht zur Seite standen und mich bei meiner Ausbildung immer unterstützen. Ihre liebevolle Zuneigung macht mich sehr glücklich.

# Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen sind als solche gekennzeichnet. Ich versichere, daß Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und daß die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck der Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Leipzig, 29.08.2008

Anja Fiedler



# Lebenslauf

**Anja Fiedler**

Tel.: +49 178 5257255  
afiedler@uni-leipzig.de

## Persönliche Daten

geboren am 29.05.1981 in Leipzig  
Familienstand ledig

## Wissenschaftlicher Werdegang

1999 Abitur: Nikolaus-Kopernikus-Gymnasium Leipzig  
10/1999–03/2005 Biologie-Studium: Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig, Hauptfächer: Genetik, Zoologie, Immunbiologie, Tierphysiologie, Molekulare Medizin  
08–10/2003 Auslandspraktikum: University of Oslo, Dept. of Biology, Unit electron microscopy (Prof. N. Ross)  
2003–2005 Studentische Mitarbeiterin: Max-Planck-Institut für Evolutionäre Anthropologie Leipzig, Evolutionary Genetics (Prof. S. Pääbo)  
03/2004–03/2005 Diplomarbeit: Institut für Experimentelle Physik II der Universität Leipzig (Prof. T. Butz) und Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie (Prof. H. Sass), *Bestrahlung lebender Humanzellen mit hochenergetischen Ionen*. Note: 1,1  
03/2005 Diplom, Note: 1,6  
04/2005–09/2008 Promotion: GRK 1097 *InterNeuro* der DFG / wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Leipzig, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung (Molekulare und Zelluläre Mechanismen der Neurodegeneration, Prof. T. Arendt) und Institut für Experimentelle Physik II (Prof. T. Butz), *Eisen und Eisenproteine in Neuronen mit perineuronalem Netz*.  
seit 10/2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena, Abt. Evolutionäre Neuroethologie (Prof. B. Hansson, Dr. S. Sachse)

Leipzig, 09.01.2009

Anja Fiedler

### Eingeworbene Drittmittel / Reisestipendien

- *formel.1*–Projekt 2007 (NBL *formel.1*–90) der Medizinischen Fakultät Leipzig, 49.953 Euro
- Reisestipendium der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, 6<sup>th</sup> FENS 07/2008, Genf
- Reisestipendium der Columbia University, 7<sup>th</sup> International Workshop: Microbeam Probes of Cellular Radiation Response 03/2006, New York

### Preise

- Posterpreis des 6. Leipziger Research Festivals 12/2007, Leipzig

### Publikationen

- **A. Fiedler**, A. Mittag, T. Reinert, A. Tárnok, T. Arendt, M. Morawski, *Quantification of iron proteins by slide-based laser scanning cytometry* (in Vorbereitung)
- **A. Fiedler**, G. Brückner, T. Arendt, M. Morawski, *Neurons bearing a perineuronal net possess a high concentration in iron and iron proteins* (in Vorbereitung)
- M. Morawski, T. Reinert, W. Meyer-Klaucke, F. E. Wagner, W. Tröger, G. Brückner, **A. Fiedler**, T. Butz and T. Arendt, *Aggrecan based extracellular matrix provides cationic binding capacities in the brain* (in Vorbereitung)
- M. Morawski, A. Alpár, G. Brückner, **A. Fiedler**, C. Jäger, J. T. Stieler, T. Arendt, *Postnatal development of chondroitin sulfate proteoglycan-based extracellular matrix in chicken (*Gallus domesticus*) brain*, Brain Research (in Begutachtung)
- **A. Fiedler**, M. Halbach, B. Sinclair, M. Benecke, *What is the Edge of a Forest? A Diversity Analysis of Adult Diptera Found on Decomposing Piglets inside and on the Edge of a Western German Woodland inspired by a Courtroom Question*, Entomologie heute 20 (2008) 173–191
- **A. Fiedler**, J. Rehdorf, F. Hilbers, L. Johrdan, C. Stribl, M. Benecke, *Detection of Semen (Human and Boar) and Saliva on Fabrics by a Very High Powered UV-/VIS-Light Source*, The Open Forensic Science Journal 1 (2008) 12–15
- **A. Fiedler**, T. Reinert, M. Morawski, G. Brückner, T. Arendt, T. Butz, *Intracellular iron concentration of neurons with and without perineuronal nets*, NIM B 260 (2007) 153–158
- **A. Fiedler**, T. Reinert, J. Tanner, T. Butz, *DNA-DSB and Hsp70 induction in living cells by proton irradiation*, NIM B 260 (2007) 169–173

- M. Morawski, **A. Fiedler**, T. Reinert, G. Brückner, T. Arendt, *Iron compartmentalisation in the rat brain: do perineuronal net-ensheathed neurons play a special role?*, J. Neurochem. 101 (2007) 35
- T. Reinert, **A. Fiedler**, M. Morawski, T. Arendt, *High resolution quantitative element mapping of neuromelanin-containing neurons*, NIM B 260 (2007) 227–230
- **A. Fiedler**, T. Reinert, J. Tanner, T. Butz, *DNA DSBs and HSP70 expression in proton-irradiated living cells at LIPSION*, Radiation Research 166 (4) (2006) 674–675
- **A. Fiedler**, J. Škopek, T. Reinert, J. Tanner, J. Vogt, J. Österreicher, L. Navratil, T. Butz, *Irradiation experiments with living cells at LIPSION*, Radiation Research 161 (1) (2004) 95–96
- T. Reinert, **A. Fiedler**, J. Škopek, J. Tanner, J. Vogt, T. Butz, *Single ion bombardment of living cells at LIPSION*, NIM B 219 (77) (2004) 77–81

### Konferenzbeiträge

- **A. Fiedler**, M. Morawski, T. Reinert, G. Brückner, T. Arendt, *Intraneuronal analyses of iron and iron proteins*, 6<sup>th</sup> FENS, 07/2008, Geneva, Switzerland
- M. Weber, **A. Fiedler**, S. Wernicke, T. Reinert, *Quantitative element microscopy of human hippocampi of opiate abusers*, 6<sup>th</sup> FENS, 07/2008, Geneva, Switzerland
- **A. Fiedler**, M. Morawski, T. Reinert, G. Brückner, T. Arendt, *Iron management of neurons surrounded by a specialized net of extracellular matrix*, 6<sup>th</sup> Leipziger Research Festival, 12/2007, Leipzig
- **A. Fiedler**, M. Morawski, T. Reinert, G. Brückner, T. Arendt, T. Butz, *Quantitatively analysed cellular iron and ferritin localisation in neurons*, International Conference on Biomedical Application of High Energy Ion Beams, 08/2007, University of Surrey, Surrey, GB
- **A. Fiedler**, M. Morawski, T. Reinert, G. Brückner, T. Arendt, *Intracellular iron: Quantitative element microscopy of perineuronal net-ensheathed neurons*, 8<sup>th</sup> Intern. Conf. AD/PD, 03/2007, Salzburg
- **A. Fiedler**, J. Rehdorf, F. Hilbers, L. Johrdan, C. Stribl, M. Benecke, *Detection of semen and saliva on fabrics by a highly intensive UV-/VIS-light source*, 59<sup>th</sup> Annual Meeting American Association of Forensic Sciences (AAFS), 02/2007, San Antonio, Texas/USA
- **A. Fiedler**, M. Morawski, T. Reinert, G. Brückner, T. Arendt, *Do perineuronal nets protect against iron-mediated degeneration? - A quantitative element microscopy study*, 5<sup>th</sup> Research Festival Leipzig, 12/2006, Leipzig

- **A. Fiedler**, T. Reinert, M. Morawski, G.Brückner, T. Arendt, T. Butz, **Eingeladener Plenarvortrag**: *Intracellular iron concentration of neurons with and without perineuronal nets*, Internat. Conference of Nuclear Microscopy Technique & Application (ICNMTA), 06/2006, Singapur.
- **A. Fiedler**, M. Morawski, T. Reinert, G. Brückner, T. Butz, T. Arendt, *Do perineuronal nets influence the intraneuronal iron concentration?*, 5<sup>th</sup> Biotechnology-Symposium Leipzig, 05/2006
- **A. Fiedler**, T. Reinert, T. Butz, *DNA-DSBs and Hsp70 expression of proton irradiated living cells at LIPSION*, 7<sup>th</sup> Intern. Workshop of Microbeams & Cellular Radiation Resp., 03/2006, New York
- **A. Fiedler**, T. Reinert, J. Tanner, T. Butz, *Bestrahlung lebender Humanzellen mit hochenergetischen Protonen*, 4<sup>th</sup> Biotechnology-Symposium Leipzig, 05/2005, Leipzig
- **A. Fiedler**, J. Škopek, T. Reinert, J. Tanner, J. Vogt, T. Butz, *Irradiation of living cells with high energetic protons*, European Radiation Research, 08/2004, Budapest, Ungarn
- **A. Fiedler**, T. Reinert, J. Škopek, J. Tanner, T. Butz, **Talk**: *First irradiation experiments with living cells at LIPSION*, *Microbeam Probes of Cellular Radiation Response*, 03/2003, Oxford