Die Interaktion von Wachstumsfaktoren mit ATP als Voraussetzung für ihre neuroprotektive Wirkung

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sandra Maier

aus Reutlingen

Marburg/Lahn 2007

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 23. Februar 2007 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein
Zweitgutachterin: Prof. Dr. S. Klumpp
Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 2007

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von **Prof. Dr. Dr. Josef Krieglstein.**
Für seine hervorragende Betreuung, seine freundliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken. Ohne seine motivierenden Hilfestellungen und zahlreichen Anregungen zur Durchführung des Projekts wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinen besonderen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Susanne Klumpp vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster aussprechen. Ihre zahlreichen wertvollen Anregungen und konstruktiven Diskussionen trugen erheblich zum Entstehen dieser Arbeit bei.
Ebenso möchte ich ihrem gesamten Arbeitskreis für die gute Kooperation und die vielen schönen gemeinsamen Zusammenkünfte danken. Insbesondere Frau Anja Hasche gilt mein spezieller Dank für die freundschaftliche Zusammenarbeit und ihre stete Hilfsbereitschaft in den vergangenen Jahren.

Meinen Kollegen und Freunden danke ich für ein wunderbares Arbeitsklima. Vor allem Sandra Engel, Renate Hartmannsgruber, Emma Esser, Eva Guntermann und Vera Junker möchte ich für ihre ununterbrochene Hilfe und Unterstützung ganz herzlich danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei David bedanken, der mir durch seine unendliche Geduld und seinen Optimismus immer wieder Kraft gegeben hat.
Aus tiefstem Herzen danke ich meinen Eltern und meiner Omi, die mich in jedem Lebensabschnitt mit Liebe und Verständnis unterstützt und mich so dahin gebracht haben, wo ich jetzt bin.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... **v**

1 Einleitung **1**

1.1 Die Familie der Neurotrophine 2
1.2 Neurotrophine und ihre Rezeptoren 5
1.3 Mechanismen des Zelltods 11
1.4 Struktur und funktionale Bedeutung von VEGF 13
1.5 Weitere untersuchte Wachstumsfaktoren 15
1.5.1 Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) 15
1.5.2 Epidermal Growth Factor (EGF) 15
1.5.3 Insulin-like Growth Factor (IGF) 16
1.5.4 Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF) 16
1.5.5 Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) 16
1.6 Reversible Phosphorylierung als Regulationsmechanismus 17
1.7 Fragestellung 19

2 Material und Methoden **21**

2.1 Material 21
2.1.1 Tiere und Tierhaltung 21
2.1.2 Proteine und Chemikalien als Testsubstanzen 21
2.1.3 Materialien für die Zellkultur 22
2.1.3.1 Bestandteile der verwendeten Kulturmedien 22
2.1.3.2 Kulturgefäße 23
2.1.3.3 Sonstige Materialien in der Zellkultur 23
2.1.4 Materialien zur Bestimmung der neuronalen Apoptose 24
2.1.5 Materialien für die Proteinbestimmung 24
2.1.6 Materialien für SDS-Page und Western Blotting 25
2.1.7 Materialien für die Silberfärbung 26
2.1.8 Materialien für die Immunozytochemie 26
2.1.9 Antikörper 27
2.1.10 Materialien zur Endotoxin-Bestimmung 27
2.1.11 Materialien zur permanenten zerebralen Ischämie 28
2.1.12 Materialen für die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Phospho-Aminosäuren 28
2.1.13 Sonstige Geräte 29
2.1.14 Software 30
2.2 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur 30
2.3 Anlage und Kultivierung von hippokampalen und kortikalen Primärkulturen 31
2.3.1 Vorbereitung der Kulturschalen 31
2.3.2 Präparation der hippokampalen und kortikalen neonatalen Primärkulturen 31
2.3.3 Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums 32
2.3.4 Präparationslösungen 32
2.4 SH-SY5Y-Zellen 33
2.4.1 Charakterisierung der SH-SY5Y-Zellen 33
2.4.2 Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen 33
2.4.3 Behandlung der SH-SY5Y-Zellen 34

2.5 Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC) 35
2.5.1 Charakterisierung der HUVECs 35
2.5.2 Kultivierung der HUVECs 35
2.5.3 Protektive Wirkung von VEGF bei Serumentzug an HUVECs 36
2.6 Phosphorylierung von NGF und BDNF 36
2.7 Behandlung neuronaler Primärkulturen mit Wachstumsfaktoren 37
2.8 Schädigung neuronaler Primärkulturen durch Sauerstoff- und Glukose-Entzug (OGD) 37
2.9 Bestimmung der neuronalen Apoptose 39
2.10 Proteinbestimmung 40
2.10.1 Proteinextraktion aus hippokampalen Primärkulturen 40
2.10.2 Bestimmung der Proteinmenge 41
2.11 SDS-PAGE, Silberfärbung und Western Blot 42
2.11.1 Herstellung der Polyacrylamidgele 42
2.11.2 SDS-PAGE 43
2.11.3 Silberfärbung 43
2.11.4 Western Blot 44
2.12 Immunozytochemie 46
2.13 Test auf bakterielle Endotoxine 47
2.14 Fokale zerebrale Ischämie an der Maus 48
2.14.1 Operationstechnik 48
2.14.2 Perfusion mit Neutralrot 50
2.14.3 Entnahme des Gehirns 50
2.14.4 Berechnung der Infarktoberfläche 50
2.14.5 Herstellung und Applikation der Testsubstanzen 51
2.15 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Phospho-Aminosäuren 51
2.15.1 Synthese von Phospho-Histidin und Phospho-Lysin 51
2.15.2 Radioaktive Phosphorylierung von selbst exprimiertem BDNF 52
2.15.3 Dünnschichtchromatographische Trennung der Phospho-Aminosäuren 52
2.16 Statistik 53

3 Ergebnisse 54

3.1 Charakterisierung der Zellkultur 54
3.2 Neuroprotektion der Neurotrophine NGF und BDNF 55
3.2.1 Neuroprotektion von NGF 55
3.2.1.1 NGF schützt konzentrationsabhängig hippokampale Primärkulturen vor Staurosporin-induzierter Apoptose 55
3.2.1.2 NGF schützt konzentrationsabhängig kortikale Primärkulturen vor Staurosporin-induzierter Apoptose 57
3.2.2 Neuroprotektion von BDNF 58
3.2.2.1 BDNF wirkt neuroprotektiv bei Staurosporin-induzierter Apoptose an hippokampalen Primärkulturen 58
3.2.2.2 BDNF wirkt neuroprotektiv bei Staurosporin-induzierter Apoptose an kortikalen Primärkulturen 59
3.2.3 Neuroprotektiver Effekt von NGF und BDNF im OGD-Modell 60
3.2.4 Neuroprotektive Wirkung von intraventrikulär injiziertem NGF nach MCAO 61
3.3 Phosphorylierung von NGF und BDNF 61

3.4 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt der Neurotrophine 64
3.4.1 Kontrollen zu den Versuchen mit alkalischer Phosphatase 64
3.4.2 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von NGF 65
3.4.3 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von BDNF 66
3.4.4 Überprüfung des Einflusses von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von NGF und BDNF im OGD-Modell 67
3.5 Überprüfung der Ergebnisse in anderen Zellarten: SH-SY5Y-Zellen 69
3.5.1 Überprüfung des Rezeptorstatus' 69
3.5.2 Nachweis der Neuroprotektion von NGF 70
3.5.3 Nachweis der Neuroprotektion von BDNF 71
3.5.4 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf NGF und BDNF in der SH-SY5Y-Kultur 72
3.6 Effekte von permanent phosphorylierten Neurotrophinen 73
3.6.1 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf permanent phosphoryliertes NGF 73
3.6.2 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf permanent phosphoryliertes BDNF 76
3.7 Proteinchemische Untersuchungen zum Einfluss von alkalischer Phosphatase auf die Phosphorylierung des Trk-Rezeptors und nachgeschalteter Signalkaskaden-Proteine 78
3.7.1 Untersuchung des Trk-Rezeptors 78
3.7.2 Untersuchungen zum Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den Phosphorylierungsstatus der Signalkaskaden-Proteine P-Akt und P-ERK 1/2 79
3.7.3 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den Phosphorylierungsstatus von P-Akt und P-ERK 1/2 nach Behandlung mit dauerhaft phosphorylierten Wachstumsfaktoren 81
3.8 Einfluss von ATPase auf die neuroprotektive Wirkung von NGF und BDNF 82
3.8.1 Kontrollen zum ATPase-Experiment 82
3.8.2 Einfluss von ATPase auf die neuroprotektive Wirkung von NGF 84
3.8.3 Einfluss von ATPase auf die neuroprotektive Wirkung von BDNF 85
3.9 Protektive Effekte von VEGF an HUVECs 86
3.9.1 Protektive Effekte von VEGF bei Serumentzug 87
3.9.2 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den protektiven Effekt von VEGF 89
3.9.3 Einfluss von ATPase auf die protektive Wirkung von VEGF 90
3.9.4 Untersuchungen zu den Effekten von VEGF in hippokampalen Primärkulturen 92
3.9.5 Wirkung von VEGF auf P-Akt und P-ERK 1/2 93
3.10 Dünnschichtchromatographie mit Phospho-Aminosäuren 95
3.11 Untersuchungen zu BDNF-WT aus *E. coli* 96
3.11.1 Reinheit des exprimierten Proteins 96
3.11.2 Untersuchungen zur biologischen Aktivität des BDNF-WTs 98
3.11.3 Untersuchungen zu Pro-BDNF 100
3.12 Untersuchungen zu selbst exprimiertem NGF und Pro-NGF 101
3.12.1 Reinheit des exprimierten Pro-NGFs 101
3.12.2 Biologische Aktivität des NGF-WTs 102
3.13 Untersuchungen zu weiteren Wachstumsfaktoren 103
3.13.1 Untersuchungen zu EGF 104
3.13.2 Untersuchungen zu IGF 106
3.13.3 Untersuchungen zu G-CSF 107
3.13.4 Untersuchungen zu CNTF 108
3.13.5 Untersuchungen zu TGF-β1 109

4 Diskussion 110

4.1 Schädigungsmodelle und neuronale Primärkultur 110

4.2 Untersuchungen zur Charakterisierung der Aktivierung von NGF und BDNF 114

4.3 Untersuchungen zu VEGF 119

4.4 Untersuchungen zu selbst exprimierten Wachstumsfaktoren 122

4.5 Untersuchungen zu weiteren Wachstumsfaktoren 125

5 Zusammenfassung 129

6 Literaturverzeichnis 131

Anhang 148

Abkürzungverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	Mikro (10^{-6})
A	Adenin
AIF	Apoptose induzierender Faktor
AK	Arbeitskreis
Akt/PKB	*V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*/ Proteinkinase B
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor-1
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPγS	Adenosin-5'-(thiotriphosphat)
Bad	*Bcl-associated death promotor*
Bax	*Bcl-associated x-protein*
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	*B-cell lymphoma-2*
$Bcl\text{-}x_L$	*Bcl-extra long*
BDNF	*Brain-derived growth factor*
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Caspase	Cystein/Aspartat-spezifische Protease
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
CNTF	*Ciliary neurotrophic factor*
CREB	*cAMP-response element-binding protein*
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	Tag(e)

dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
DISC	*Death-inducing signaling-complex*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR-3	*Death receptor-3*
DTT	Dithiothreitol
E.	Escherichia
ECL	*Enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	*Epidermal growth factor*
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)tetraessigsäure
ERK	*Extracellular signal regulated kinase*
FADD	*Fas-associated death domain*
FAK	*Focal adhesion kinase*
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescinisothiocyanat
g	Gramm
Gab1	*Growth factor receptor-bound protein 2-associated binder 1*
G-CSF	*Granulocyte colony-stimulating factor*
GFAP	*Glial fibrillary acid protein*
GSK-3ß	Glykogen-Synthase-Kinase-3ß
h	Stunde(n)
HBSS	*Hank's balanced salt solution*
HEPES	4-[(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	*Human umbilical vein endothelial cells*
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IAP	*Inhibitor-of-apoptosis-protein*
Ig	Immunglobulin
IGF	*Insulin-like growth factor*

IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IRS-1/2	Insulinrezeptorsubstrat-1/2
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
K_i	Dissoziationskonstante des Inhibitors
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MCA	Mittlere Zerebralarterie
MCAO	Mittlere Zerebralarterienokklusion
MEK	MAPK-Kinase
MEM	*Minimal essential medium*
MeOH	Methanol
min	Minuten
MKK	MAPK-Kinase
mol	Mol(e) ($6{,}023 \times 10^{23}$)
n	Nano (10^{-9})
N	Stickstoff
NaOH	Natriumhydroxid
NeuN	*Neuron-specific nuclear protein*
Neurobasal™	Neurobasalmedium pH 7,2
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NGF	*Nerve growth factor*
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRP-1/2	Neuropilin-1/2
NT	Neurotrophin
OGD	Sauerstoff-Glukose-Entzug
p	Signifikanzniveau
p75	p75 Neurotrophin-Rezeptor ($p75^{NTR}$)
PAGE	Polyacralamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PEI	Polyethylenimin

PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC-γ1	Phospholipase-γ1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
Raf	*Rat fibroma*
Ras	*Rat sarcoma*
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSK2	p90/*ribosomal-S6-kinase* 2
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S.D.	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde(n)
STS	Staurosporin
TBST	Tween-haltige Tris gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
TGF-ß1	*Transforming growth factor-ß1*
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-hydroxylmethyl-1,2-propandiol
Trk	*Tropomyosin-related kinase*
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheit
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Das menschliche Nervensystem ist ein äußerst komplexes und empfindliches System aus ca. 100 Milliarden miteinander vernetzten und kommunizierenden Nervenzellen (Williams und Herrup, 1988), dessen Funktionsweise im vollen Umfang trotz der großen Fortschritte in der Erforschung neuronaler Vorgänge bis heute nicht entschlüsselt werden konnte.

Angesichts der Komplexität und schieren Größe dieses sensiblen Systems, das sich über Jahrtausende von Jahren von primitiven Strukturen in Invertebraten zu immer leistungsfähigeren Vernetzungen entwickelt hat, ist es erstaunlich, wie die Regulation der Vielzahl von Nervenzellen, sowie deren Verknüpfungsmuster untereinander koordiniert und moduliert werden.

Hier führte die Evolution zu einer ganz wesentlichen Weiterentwicklung im Aufbau, der Koordination und der funktionellen Interaktion des Nervensystems: so besitzen primitive Tiere wie der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* individuell identifizierbare Neurone – nämlich genau 302 an der Zahl – mit definierten Verknüpfungen (White *et al.,* 1986). Das Nervensystem der Wirbeltiere hingegen setzt sich aus einem anfänglich hohen Überschuss von Neuronen zusammen. Im Verlauf der Embryonalentwicklung werden neuronale Netzwerke ausgebildet und überflüssige oder nicht funktionell verknüpfte Neurone durch Apoptose, den programmierten Zelltod, eliminiert.

Eine substantielle Rolle bei der Steuerung dieser physiologischen Vorgänge spielen hierbei die sogenannten neurotrophen Faktoren. Diese Faktoren – die Neurotrophine – werden während der Entwicklung des Nervensystems in geringen Konzentrationen in den entsprechenden Zielgebieten exprimiert. Lediglich die Nervenzellen, die ausreichende Mengen der Faktoren erhalten, überleben. Derartige neurotrophe Regulationsmechanismen gewährleisten eine Anpassung an die Größe des Zielgewebes und wurden in den letzten Jahrzehnten in vielfältigen Experimenten untersucht und weitestgehend aufgeklärt (Cohen, 1960; Levi-Montalcini und Booker, 1960; Johnson *et al.,* 1980 und 1983; Aloe *et al.,* 1981; Rohrer *et al.,* 1988).

Neurotrophine stellen jedoch nicht nur das Überleben von bestimmten Neuronen sicher, sie können auf der anderen Seite auch proapoptotische Prozesse auslösen, die zum Absterben von Zellen führen. Des Weiteren beeinflussen sie die

Differenzierung und Spezifizierung von Neuronen und sind für die Plastizität des Nervensystems verantwortlich.
Die Effekte der Neurotrophine sind nicht auf Nervenzellen beschränkt; Einflüsse auf nicht-neuronale Zellen sind ebenso bekannt. So fördern Neurotrophine zum Beispiel die Migration von Schwann'schen Zellen (Anton *et al.,* 1994; Bentley und Lee, 2000) und scheinen als Vermittler zwischen Immun- und Nervensystem von Bedeutung zu sein (Skaper *et al.,* 2001). Darüber hinaus wirken sie modulierend bei pathologischen Prozessen wie Autoimmunerkrankungen oder Entzündungen (Serafeim *et al.,* 2001).
Aufgrund der protektiven und regenerativen Wirksamkeit der Neurotrophine im Nervensystem des erwachsenen Menschen wurde ihr therapeutischer Einsatz bislang bei neuronalen degenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder bei chronischem Schmerz in mehreren klinischen Studien überprüft (Saragovi und Gehring, 2000).
Allerdings sind ungünstige Parameter wie eine kurze biologische Halbwertszeit der Neurotrophine *in vivo* (z. B. Pardridge *et al.,*1994), ungünstige Pharmakokinetik oder unerwünschte pleiotrope Effekte dafür verantwortlich, dass sich eine Therapie mit Neurotrophinen als sehr schwierig erweist und Behandlungsstrategien mit dieser Gruppe der Wachstumsfaktoren bisher noch nicht zur Verfügung stehen (Thoenen und Sendtner, 2002).

1.1 Die Familie der Neurotrophine

Die Geschichte und damit die Erforschung der Neurotrophine hat ihren Ursprung in den frühen 1950er Jahren und begann mit der Entdeckung des *Nerve Growth Factors* (NGF). Rita Levi-Montalcini machte erstmals die Beobachtung, dass zielgerichtetes Neuritenwachstum in Dorsalwurzelganglien von Hühnerembryos durch benachbarte Mäusesarkomzellen induziert werden konnte (Levi-Montalcini und Hamburger, 1951; Cohen *et al.,* 1954).
Weitere Untersuchungen brachten sie auf die Spur eines humoralen Proteins, das aus den Sarkomzellen zu stammen schien und offensichtlich in der Lage war, das Wachstum und die Differenzierung von Nervenzellen zu stimulieren. Sie nannte es *Nerve Growth Factor* (NGF). Die weitreichende Bedeutung dieser Entdeckung und

ihrer Erforschung wurde 1986 durch die Verleihung des Nobelpreises an Levi-Montalcini und ihren Kollegen Stanley Cohen honoriert.

Das zweite Mitglied der Neurotrophin-Familie, das NGF mit einer Sequenzhomologie von über 50% sehr ähnelt, ist der *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) (Hofer und Barde, 1988). Kurze Zeit nach seiner Entdeckung wurden Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) (Hohn *et al.,* 1990; Maisonpierre *et al.,* 1990; Hallbook *et al.,* 1991; Berkemeier *et al.,* 1991) entdeckt und der Neurotrophin-Familie zugeordnet (Übersicht siehe Barde, 1990; Bibel und Barde, 2000). NT-4 wurde zuerst in *X.laevis,* einem Krallenfrosch, entdeckt; später stieß man auf NT-5, was das Ortholog im Säugetier zu sein scheint (Ip *et al.,* 1992).

Neurotrophine werden als Prä-Pro-Proteine translatiert und anschließend als nicht-kovalente Homodimere sezerniert (Berger *et al.,* 1977; Ullrich *et al.,* 1983). Die Prä-Sequenz wird bei der Translokation in das endoplasmatische Retikulum abgespalten und Pro-Neurotrophine werden durch bestimmte Pro-Protein-Konvertasen wie Furin und Furin-artige Proteasen PACE4 und PC5/6-B im *trans-Golgi-Network* prozessiert (Bresnahan *et al.,* 1990; Seidah *et al.,* 1996; Farhadi *et al.,* 1997; Mowla *et al.,* 1999). Bis vor kurzem wurde angenommen, dass Pro-Neurotrophine unwirksame Vorstufen des eigentlich biologisch aktiven Proteins sind. Es konnte aber in aktuellen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Pro-Formen mit sehr hoher Affinität selektiv an den Neurotrophinrezeptor p75 zu binden vermögen und dadurch Apoptose auslösen können (Lee *et al.,* 2001; Beattie *et al.,* 2002; Harrington *et al.,* 2004). Interessant ist des Weiteren das Phänomen, dass bei zahlreichen pathologischen Prozessen wie z. B. Hirnläsionen (Harrington *et al.,* 2004), Rückenmarksverletzungen (Beattie *et al.,* 2002) und Morbus Alzheimer die Konzentration von pro-NGF erhöht ist und somit verstärkt p75-vermittelte apoptotische Prozesse induziert werden (Fahnestock *et al.,* 2001; Peng *et al.,* 2004).

Neurotrophine liegen im Körper hauptsächlich als Homodimere vor und besitzen in dieser Form ein Molekulargewicht von 26 bis 28 kDa. Der zentrale Bereich einer jeden Untereinheit weist zwei Paare einer β-Faltblatt-Struktur auf (Bradshaw *et al*., 1993). An einem Ende schließen sich drei *loop*-Regionen an, am anderen Ende befindet sich das sogenannte *cystine-knot*-Motiv. Dieser Cystin-Knoten ist charakteristisch für die räumliche Struktur der Neurotrophine und besteht aus drei Paaren antiparalleler β-Faltblattstränge, die durch Disulfidbrücken zwischen sechs hoch konservierten Cysteinresten gebildet werden (Mobley *et al.,* 1976; McDonald *et*

al., 1991; Ibanez *et al.,* 1998). Darüber hinaus existieren weitere dimere Wachstumsfaktoren, die keine Sequenzhomologien zu den Neurotrophinen aufweisen, jedoch als räumliches Charakteristikum ebenfalls ein Cystin-Knoten-Motiv besitzen – so z. B. der *Transforming Growth Factor*-β (TGF-β), der *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) oder *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG).

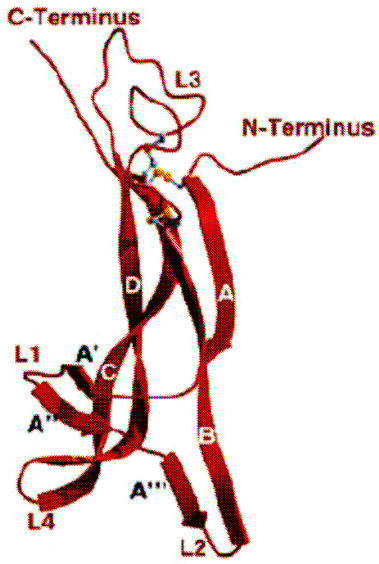


Abb. 1-1: Struktur des NGF-Monomers

Markiert sind die *Loop*-Regionen (L1-L4), die β-Faltblattstrukturen (A-D) sowie C- und N-Terminus (aus Wiesman und de Vos, 2001).

Schon früh wurde erkannt, dass NGF nicht nur das Wachstum von sensorischen und sympathischen Ganglien induzieren kann, sondern auch die Komplexität der dendritischen Verzweigungen erhöht und eine entscheidende Rolle als neuroprotektiver Wachstumsfaktor spielt (Ruit *et al.,* 1990). Diese funktionale Bedeutung konnte auch für die anderen Mitglieder der Neurotrophin-Familie nachgewiesen werden (Cohen-Cory und Fraser, 1995; Mc Allister *et al.,* 1995 und 1997).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Neurotrophine in der Lage sind, Neurone zu depolarisieren und die Neurotransmitter-Ausschüttung zu induzieren – somit beeinflussen sie direkt die synaptische Transmission (Yang *et al.,* 2002). Andererseits können elektrische Impulse in Nervenzellen zur Sekretion von Neurotrophinen führen (Übersicht in Thoenen, 1995).

Interessanterweise wirken Neurotrophine und besonders NGF nicht nur fördernd auf das Überleben von Neuronen, sondern können unter bestimmten Voraussetzungen gezielt Apoptose über den Neurotrophinrezeptor p75 auslösen (siehe 1.2).

1.2 Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Neurotrophine weisen nicht nur in hohem Maße Homologien in ihren Aminosäuresequenzen auf, auch die biologischen Effekte, die sie auslösen, ähneln sich sehr. Trotz gewisser Überschneidungen der Zielzellen und Effekte gibt es für jedes Neurotrophin ein zeitliches und zellpopulationbezogenes spezielles Wirkspektrum, das schon früh vermuten ließ, dass unterschiedliche Rezeptoren bei der Vermittlung von Effekten involviert sind.

Man kennt zwei in ihrem Aufbau und den vermittelten Effekten hochgradig unterschiedliche Rezeptoren der Neurotrophine: den *Tropomyosin-related kinase* Rezeptor (Trk) (Martin-Zanca *et al.,* 1989; Kaplan *et al.,* 1991; Klein *et al.,* 1991), der meist als „hochaffin“ bezeichnet wird und zur Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Familie zählt, und den sogenannten „niedrig affinen“ Neurotrophinrezeptor $p75^{NTR}$ ($p75^{LNTR}$ oder p75) (Johnson *et al.,* 1986), ein Mitglied der TNF-Rezeptor/Fas/CD40-Familie. Dass eine binäre Unterscheidung der Neurotrophinrezeptoren in hochaffin und niedrigaffin nicht möglich ist, wird im weiteren Verlauf der Einleitung noch eingehend erläutert.

Es existieren unterschiedliche Isoformen der Trk-Rezeptoren. Während NGF ausschließlich und mit einer hohen Affinität (K_D~10^{-11} M) an TrkA bindet (Kaplan *et al.,* 1991), ist TrkB der spezifische Rezeptor für BDNF, NT-3 und NT-4 (Berkemeier *et al.,* 1991; Klein *et al.,* 1989, Ip *et al.,* 1992; Middlemas *et al.,* 1991, Squinto *et al.,* 1991), sowie TrkC für NT-3 (Lamballe *et al.,* 1991a, b; Kaplan und Miller, 2000). In geringerem Maße kann NT-3 auch mit TrkA interagieren (Cordon-Cardo *et al.,* 1991).

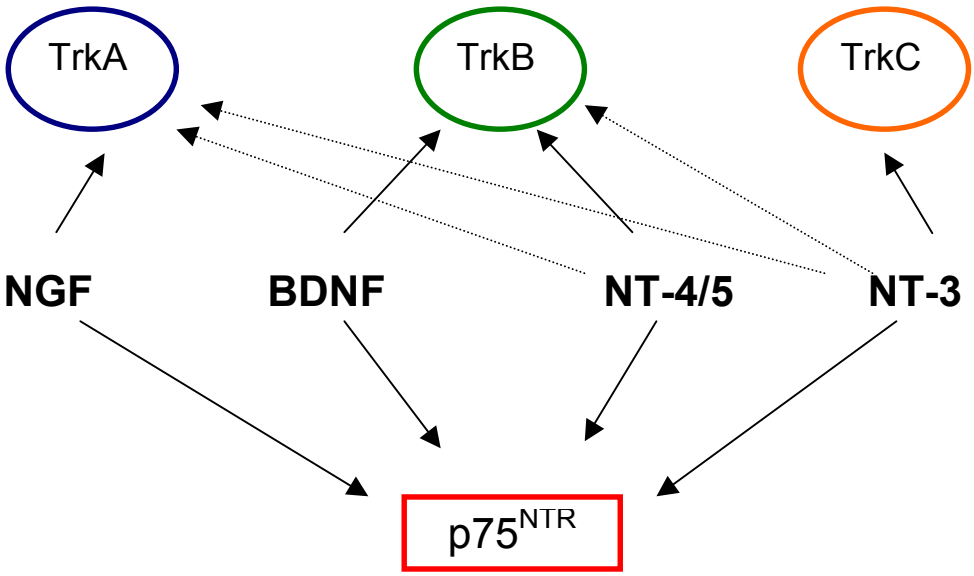


Abb. 1-2: Die Neurotrophin-Rezeptoren

Alle Neurotrophine binden mit ähnlicher Affinität an p75, Unterschiede gibt es hier lediglich in der Kinetik. Die Bindung an die Trk-Rezeptoren geschieht jedoch selektiv: TrkA bindet hauptsächlich NGF, kann aber auch mit NT-3 wechselwirken, an TrkB bindet mit sehr hoher Affinität BDNF, in geringerem Maße auch NT-3 und NT-4/5. Der spezifische Ligand für TrkC ist NT-3.

Strukturell sind die einzelnen Trk-Isoformen ähnlich aufgebaut. Es sind an der Zelloberfläche befindliche transmembrane Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 140-145 kDa. In der extrazellulären Domäne finden sich Leucin-reiche Motive (LRR1-3), zwei Cystein-Cluster (C1, C2), zwei immunglobulinähnliche Domänen (Ig1, Ig2) und eine transmembrane Region (Schneider und Schweiger, 1991). Bedeutsam ist hierbei, dass die intrazellulären Regionen der Rezeptoren eine Sequenzhomologie von über 87% aufweisen, während sich die extrazellulären Bereiche mit einer Homologie von nur ca. 30% eher voneinander unterscheiden. Demnach ist die Ursache für die Spezifität der Rezeptoren im extrazellulären Bereich zu finden. Tatsächlich ist die zweite Ig-ähnliche Domäne nicht nur maßgeblich für die Bindung der Neurotrophine, sondern insbesondere für ihre Spezifität verantwortlich (Urfer *et al.,* 1995 und 1998; Ultsch *et al.,* 1999). Aus der Strukturanalyse eines Co-Kristalls aus NGF und der zweiten Ig-ähnlichen Domäne (d5) von TrkA wurde ersichtlich, dass die Rezeptor-Ligand-Interaktion an zwei Stellen stattfindet, wobei ein Motiv von allen Neurotrophinen geteilt wird, während das zweite für die spezifische Bindung von NGF verantwortlich ist (Wiesman *et al.,* 1999).

Die extrazelluläre Domäne enthält zudem zahlreiche Glykosylierungsstellen. Es konnte gezeigt werden, dass Trk-Rezeptoren, die unglykolysiert vorliegen, die

Zellmembran nicht erreichen – obwohl sie aktiviert vorliegen, sind sie offensichtlich nicht in der Lage, die nachfolgenden Signalkaskaden anzustoßen und Differenzierung von Nervenzellen zu vermitteln. Insofern wird davon ausgegangen, dass die Glykosylierung nicht nur für die Positionierung in der Transmembran-Region, sondern auch für die Verhinderung einer spontanen Aktivierung verantwortlich ist (Watson *et al.,* 1999).

Der intrazelluläre Teil des Rezeptorproteins besteht aus einer juxtamembranen Domäne, einer Tyrosinkinaseregion und einem carboxyterminalen Rest. In der Tyrosinkinasedomäne befinden sich hochkonservierte Tyrosinreste, die im phosphorylierten Zustand in der Lage sind, Adapterproteine der Signalkaskaden zu binden.

Die Aktivierung eines Trk-Rezteptors durch Anlagerung seines jeweils spezifischen Neurotrophin-Liganden läuft nach einem Schema ab, das allen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gemein ist: es kommt zur Liganden-induzierten Dimerisierung der Rezeptor-Proteine, anschließend zur initialen Aktivierung der Autokinase-Domäne, zur Phosphorylierung der Tyrosin-Reste innerhalb des sogenannten *activation loops*, welches wiederum zur vollen Aktivierung der Autokinase führt und schließlich in einer Autophosphorylierung der Tyrosinreste außerhalb des *activation loops* resultiert. An die phosphorylierten Tyrosinreste können nun bestimmte Adapterproteine binden, die die intrazellulären Signalkaskaden vermitteln und anstoßen. Am intensivsten wurden die Vorgänge an den Tyrosinresten Y490 und Y785 untersucht, da hier die Übertragung der extrazellulären Aktivierung auf die intrazellulären Signalwege stattfindet (z. B. Baxter *et al.*, 1995). Hierzu zählen der Ras/*extracellular signal regulated kinase* (ERK)-Weg, der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K)/Akt-Kinase-Weg und Phospholipase C-γ1 (PLC-γ1)-Weg.

Der phosphorylierte Tyrosinrest Y490 ermöglicht die Anlagerung und die Phosphorylierung des Adapterproteins Shc (Kaplan und Stephens, 1994; Obermeier *et al.,* 1994; Stephens *et al.,* 1994), das im phosphorylierten Zustand an einen Grb2-*son of Sevenless* (SOS)-Komplex bindet, was wiederum zu einer Aktivierung von Ras führt (Basu *et al.,* 1994). Ras und Rap, beides GTPasen, assoziieren und aktivieren die Proteinkinase Raf, die wiederum die MAPK-Kinase 1/2 (MKK 1/2) phosphoryliert und dadurch aktiviert. MKK 1/2 schließlich ist für die Phosphorylierung von ERK 1/2 verantwortlich, was zur Aktivierung der Proteinkinase p90/*ribosomal-S6-kinase* 2 (RSK2) führt (Bonni *et al.,* 1999). Dieses Protein vermag durch

inhibitorische Phosphorylierung von Bad oder durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cyclic AMP-response element binding* (CREB) apoptotische Vorgänge zu unterdrücken. Bad ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie, das nur in unphosphoryliertem Zustand in der Lage ist, Bcl-x_L zu binden und so apoptotische Vorgänge zu induzieren. Wird Bad phosphoryliert, werden somit proapoptotische Signale verhindert und das Überleben der Zelle begünstigt (Datta *et al.,* 1997). Der Ras/Raf/MAPK-Signalweg vermittelt außer Neuroprotektion auch Differenzierung und Wachstum von Neuronen.

Ein zweiter wichtiger Signalweg verläuft über PI3K und ist vor allem für das Neurotrophin-vermittelte Überleben von Neuronen verantwortlich (Segal *et al.,* 1996). PI3K kann entweder direkt durch die Trk-Rezeptoren oder über Signalproteine wie Ras und *insulin receptor substrate* (IRS) 1/2 aktiviert werden. Ist PI3K aktiv, produziert es den *second messenger* Phosphatidylinositol-3-Phosphat, was zu einer Aktivierung der Proteinkinase Akt, auch Proteinkinase B genannt, führt. Durch eine inhibitorische Phosphorylierung von Glykogen-Synthasekinase 3 (GSK3) ist aktivierte Akt in der Lage, den programmierten Zelltod zu reduzieren. Darüber hinaus kommt es durch aktive Akt zu einer inhibtorischen Phosphorylierung von Bad und damit zu einer Verhinderung der Assoziation mit Bcl-x_L. An dieser Stelle treffen somit die zwei bislang getrennt ablaufenden Signalwege - der PI3K-Akt-Weg und der MAPK-Signalweg - zusammen (Yuan und Yankner, 2000).

Der phosphorylierte Tyrosinrest Y785 stellt eine Bindungsstelle für PLC-γ1 dar, die durch die Trk-Kinase phosphoryliert, dadurch aktiviert wird und durch hydrolytische Spaltung von Phospatidylinositid-Verbindungen Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) generiert. IP3 induziert die Ausschüttung von Calcium in den zytoplasmatischen Raum, was zur Aktivierung verschiedener Calcium-kontrollierter Signalwege führt (Patapoutian und Reichardt, 2001).

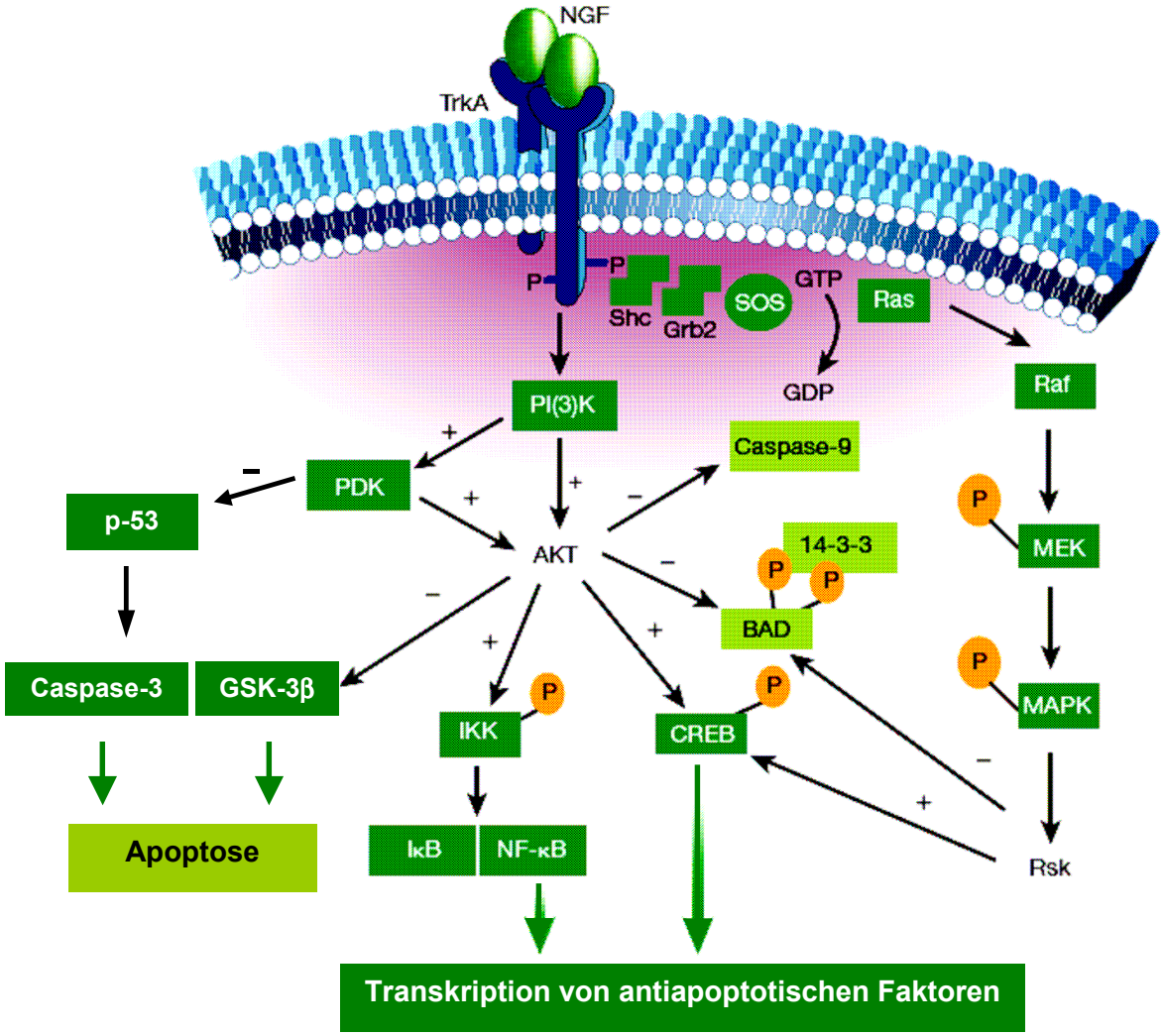


Abb. 1-3: Signalkaskaden der TrkA-vermittelten Effekte (modifiziert aus Yuan und Yankner, 2000); Erläuterungen siehe Text

Den zweiten, völlig andersartigen Rezeptor, an den alle Neurotrophine mit einer ähnlich niedrigen Affinität binden (K_D~10^{-9} M), stellt das Rezeptorprotein p75 dar (Sutter *et al.,* 1979). Hierbei handelt es sich um ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 75 kDa, einer extrazellulären Cystein-reichen Domäne und einem intrazellulären carboxyterminalen Bereich. Letzterer weist eine hohe Sequenzhomologie zu anderen Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie wie TNF-R1, Fas oder *death receptor-3* (DR-3) auf und wird auch als „Todesdomäne" bezeichnet.

Erst vor kurzem gelang die Kristallisation eines Komplexes aus NGF und p75 und damit dessen strukturelle Aufklärung. Erstaunlicherweise existiert in diesem Komplex ein stöchiometrisches NGF-p75-Verhältnis von 2:1, d.h. ein NGF-Homodimer bindet

ein einzelnes p75-Monomer. Dieses nicht-symmetrische Verhältnis basiert auf einer durch die Bindung induzierten strukturellen Veränderung des NGF-Proteins, so dass die Anlagerung an ein weiteres p75-Rezeptorprotein nicht möglich ist. Der für die p75-Bindung verantwortliche Sequenzbereich ist in allen Neurotrophinen hoch konserviert. So lässt sich auch erklären, warum alle Neurotrophine trotz spezifischer Trk-Rezeptoren mit vergleichbarer Affinität an den p75-Rezeptor binden (He und Garcia, 2004).
Der exakte Signalweg, der zur apoptotischen Zellantwort führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Was allerdings bislang gezeigt werden konnte, ist eine Liganden-induzierte Aktivierung von Rac, einem Protein, das GTP bindet und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) aktiviert (Casaccia-Bonnefil *et al.,* 1996). Außerdem findet eine Aktivierung von NF-κB (Carter *et al.,* 1996; Yoon *et al.,* 1998) und die gesteigerte Produktion von Ceramiden (Dobrowsky *et al.,* 1994) statt.

Die Effekte, die p75 vermittelt, hängen stark davon ab, ob in dem betreffenden Gewebe Trk-Rezeptoren co-exprimiert werden. Die jahrelange Bezeichnung von p75 als „Todesrezeptor“ konnte erst in aktuelleren Untersuchungen als irreführend aufgedeckt werden. Denn obwohl die komplizierten Zusammenhänge der Interaktionen zwischen Trk- und p75-Rezeptor noch nicht vollständig verstanden wurden, scheint die Funktion als Todesrezeptor nur dann zum Tragen zu kommen, wenn keine Trk-Rezeptoren in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind. In diesem Fall wird durch Bindung von Neurotrophinen die apoptotische Signalkaskade in Gang gesetzt und der programmierte Zelltod ausgelöst. Dies konnte sowohl in neuronalen (Rabizadeh *et al.,* 1993; Cotrina *et al.,* 2000; Friedman, 2000), als auch in nicht-neuronalen Zellen beobachtet werden (Casaccia-Bonnefil *et al.,* 1996).
Sind jedoch Trk-Rezeptoren vorhanden, kann p75 sogar die Affinität von Neurotrophinen an ihren spezifischen Trk-Rezeptor erhöhen. Dies bedeutet, dass der Neurotrophin-vermittelte neuroprotektive Effekt durch Einwirken von p75 sogar gesteigert wird. Für dieses Phänomen wurden unterschiedliche empirisch belegte Erklärungsmodelle aufgestellt.
Das sogenannte Rekrutierungsmodell geht davon aus, dass p75 die NGF-Bindung an TrkA erleichtert, indem es das Protein zuerst bindet und dann TrkA präsentiert. Für diese These spricht die hohe „*on and off rate“* von p75 gegenüber NGF, ebenso

die im Vergleich zu Trk-Rezeptoren sehr viel höhere Anzahl an p75-Rezeptoren auf der Zellmembran neuronaler Zellen (Chao und Hempstead, 1995).
Eine weitere Modellvorstellung ist jene, dass p75 dafür sorgen könnte, die NGF-Konzentration in der Nähe der Zellmembran zu erhöhen und so eine Bindung an TrkA wahrscheinlicher werden zu lassen (Barrett, 2000).

1.3 Mechanismen des Zelltods

Der Zelltod ist ein natürlicher Vorgang im Laufe der embryonalen Entwicklung, welcher dafür sorgt, dass sich bestimmte Organe ausbilden und nicht mehr funktionelle Strukturen eliminiert werden (Oppenheim, 1991; Teng *et al.,* 2000). Schon früh wurden aufgrund morphologischer und biochemischer Unterschiede der zugrundegehenden Zellen zwei Formen des Zelltodes unterschieden: die Nekrose und die Apoptose (Kerr *et al.,* 1971, 1972; Wyllie, 1980; Gerschenson *et al.,* 1992).
Auslösende Faktoren für einen nekrotischen Vorgang können z. B. toxische Substanzen, Verbrennungen oder Bakterienbefall darstellen. Es handelt sich hierbei um einen energie-unabhängigen, passiven und im Vergleich zur Apoptose schnell ablaufenden Prozess (Eguchi *et al.,* 1997; Leist *et al.,* 1997), bei dem es zu einem starken Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration mit Schädigung der Mitochondrien kommt. Das Chromatin verklumpt zu ungleichmäßig geformten Stücken, die Ribosomen können sich vom endoplasmatischen Retikulum ablösen. Ebenso charakteristisch ist das Anschwellen der Zellorganelle und der Zelle selbst, was bei Fortschreiten des Prozesses zum Platzen der Zellmembran und zur Entleerung des Zellinhalts in das extrazelluläre Milieu führt (Kerr *et al.,* 1994). Dies kann inflammatorische Reaktionen, Schädigungen des umliegenden Gewebes sowie Ödembildungen zur Folge haben.
Die Apoptose wird hingegen als der „programmierte Zelltod“ beschrieben (Meier *et al.*, 2000; Graham und Chen, 2001; Martin, 2001), der beispielsweise dafür verantwortlich ist, dass während der embryonalen Entwicklung beim Menschen die Schwimmhäute zwischen Zehen und Fingern zurückgebildet werden. Während der Ontogenese des Gehirns sterben 20-80 % der Neurone durch Apoptose ab (Oppenheim, 1991). Ein genetisch festgelegtes „Programm“ entscheidet also, welche Zellen absterben und welche sich weiter differenzieren. Doch auch bei

pathologischen Prozessen wie chronisch degenerativen Gehirnerkrankungen spielt Apoptose eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus werden Zellen entfernt, die ihre physiologischen Aufgaben aufgrund von Virenbefall oder mutagenöser Einflüsse nicht mehr erfüllen können (Vaux *et al.,* 1994; Williams, 1991).

Allgemein kann bei apoptotischen Vorgängen auch von einem „stillen“ Zelltod gesprochen werden, da keine Entzündungsreaktionen beobachtet werden und am Ende der Zerfall und die Phagozytose der Zelle steht. Einige die Apoptose auslösende Stimuli wurden bereits identifiziert und untersucht, wie etwa ein Mangel an Wachstumsfaktoren, DNA-Schädigungen, Stimulierung von Todesrezeptoren, Störungen der Calciumhomöostase basierend auf Einwirkung von exzitatorischen Neurotransmittern oder oxidativer Stress (Rich *et al.*, 2000; Richter, 1997; Slater *et al.,* 1995; van de Water *et al.,* 1994). Dabei kommt es zum Anstoß von Signalkaskaden, die das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins zu einer scharf abgegrenzten Masse zur Folge haben (Majno und Joris, 1995). Im Gegensatz zur Nekrose bleiben die Plasmamembran und die Struktur der Mitochondrien intakt, weshalb der Zellinhalt auch nicht freigesetzt wird und inflammatorische Prozesse ausbleiben (Kerr und Harmon, 1991). Ca^{2+}/Mg^{2+}-abhängige Endonukleasen bewirken im weiteren Verlauf Brüche im DNA-Doppelstrang, was zum Auftreten von charakteristischen Fragmenten mit 180 Basenpaaren und einem Vielfachen davon führt (Arends *et al.,* 1990; Wyllie, 1980). Werden diese Fragmente isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt, zeigt sich das typische Bild der sogenannten DNA-Leiter (Masters *et al.,* 1989; Shi *et al.,* 1990). Schließlich bilden sich kleine membranumhüllte Partikel, die fragmentierte Chromatinstückchen, intakte Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum enthalten und auch als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Diese apoptotischen Körperchen werden letztendlich von Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert (Kerr *et al.,* 1995).

Der programmierte Zelltod kann sowohl von intrazellulären als auch von extrazellulären Faktoren ausgelöst werden. Daher wird in der Regel eine Unterscheidung zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Weg vorgenommen.

Beispiele für Auslöser des intrinsischen Weges sind DNA-Strangbrüche durch Bestrahlung, Zellschäden durch Einwirkung von freien Radikalen bei Hyperoxie oder Entzug von NGF (Maroto und Perez-Polo*,* 1997). Als Folge eines so induzierten „Todessignals“ werden verschiedenen mitochondriale Proteine wie Cytochrom C,

apoptosis inducing factor (AIF) oder Smac/DIABLO aus dem Intermembran-Bereich der Mitochondrien ausgeschüttet (Liu *et al.,* 1996; Du *et al.,* 2000; Verhagen *et al.,* 2000). Der exakte Mechanismus entzieht sich bislang der genauen Kenntnis, beinhaltet aber die Bildung eines Komplexes aus Cytochrom C, *apoptosis protease activation factor 1* (Apaf-1) und Caspase-9, was wiederum zu einer Aktivierung der Caspase-3 führt. AIF bewirkt eine Kondensation von DNA. Smac/DIABLO fördert die Caspase-Aktivierung, indem es inhibitorisch auf das *inhibitor-of-apoptosis-protein* (IAP) wirkt; letzteres besitzt eine hemmende Wirkung auf Procaspasen.

Der extrinsische Apoptoseweg wird durch Ligandenbindung an einen Todesrezeptor wie z. B. CD 95 (APO-1/Fas) ausgelöst, ein membranständiges Mitglied der TNF-Familie. Durch die Liganden-induzierte Aktivierung wird die Bildung eines *death-inducing signaling-complex* (DISC) ermöglicht, der das Adapterprotein *Fas-associated death domain* (FADD) enthält. Durch den DIS-Komplex wird eine Autoproteolyse der Pocaspase-8 ausgelöst, so dass die nun aktive Caspase-8 in der Lage ist, weitere Effektor-Caspasen zu aktivieren und den Zelltod auszulösen (Barinaga*,* 1996; Wallach*,* 1997).

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass eine strenge Kategorisierung in apoptotischen und nekrotischen Zelltod nicht möglich ist. In verschiedenen Untersuchungen zu Formen des Zelluntergang wurden Zellen beobachtet, die deutliche Charakteristika beider Todesarten aufweisen (Wang, 2000; Leist und Jäättelä, 2001). Man sollte also Apoptose und Nekrose als Extremformen des Zelltodes verstehen, neben denen weitere Misch- und Zwischenformen existieren.

1.4 Struktur und funktionale Bedeutung von VEGF

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) wurde ursprünglich als Mitogen für Endothelzellen entdeckt, die aus Arterien, Venen oder lymphatischem Gewebe gewonnen wurden (Plouet *et al.,* 1989; Ferrara *et al.,* 1997a, b). Physiologisch steht seine Rolle bei der Regulation der Angiogenese und der Permeabilität der Blutgefäße im Vordergrund (Plate *et al.,* 1992), darüber hinaus übt es seine Effekte jedoch auch auf andere Zellarten aus, wie z. B. auf Pigmentepithelzellen der Retina (Guerrin *et al.,* 1995), Schwann-Zellen (Sondell *et al.,* 1999) oder hippokampale Zellen (Svensson *et al.,* 2002).

Es existieren sechs VEGF-Isoformen, die alle als Homodimere exprimiert werden und als gemeinsames Charakteristikum ein Cystin-Knoten-Motiv aufweisen: zwischen acht Cysteinresten spannen sich intra- und intermolekulare Disulfidbrücken. Die Monomere dimerisieren in einer antiparallelen Orientierung und weisen als zentrales Strukturelement eine viersträngige β-Faltblattstruktur auf (Neufeld *et al.,* 1999; Ortega *et al.,* 1999). Das Molekulargewicht von VEGF bewegt sich zwischen 34 und 42 kDa. Für die hier gezeigten Versuche wurde mit der Isoform $VEGF_{165}$ gearbeitet, die einen isoelektrischen Punkt im Basischen und eine moderate Affinität zu Heparin besitzt.

Die Effekte von VEGF werden über die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, -2 und -3 vermittelt. Hierbei handelt es sich um Mitglieder der Rezeptor-Tyrosinkinasenfamilie, die – genau wie die Trk-Rezeptoren der Neurotrophine – nach Ligandenbindung dimerisieren, sich auto-transphosphorylieren und durch Aktivierung von Effektorproteinen Signalkaskaden auslösen. Die VEGF-Rezeptoren sind durch sieben extrazelluläre immunglobulin-ähnliche Domänen charakterisiert, an die sich eine transmembrane Region und intrazellulär die Tyrosinkinase-Domäne anschließt (Shibuya *et al.,* 1990; Matthews *et al.,* 1991; Terman *et al.,* 1991).

Weitere Rezeptoren für VEGF sind Neuropilin-1 und -2 (NRP1, NRP2), die vor allem in Tumor- und Endothelzellen exprimiert werden (Soker *et al.,* 1998) und eine Art von Co-Rezeptoren für VEGF-Rezeptor-2 und -3 darstellen (McColl *et al.,* 2004, Neufeld *et al.,* 1999).

Erstaunlich ist das Phänomen, dass die Expression von VEGF direkt durch Hypoxie gesteuert wird und z. B. bei ischämischen Herzkrankheiten dazu führen kann, dass neue Blutgefäße gebildet werden (Shweiki *et al.,* 1992; Banai *et al.,* 1994). Ebenfalls von großer Bedeutung ist die Tatsache, dass VEGF von den meisten Tumoren exprimiert und freigesetzt wird und VEGF-Rezeptoren verstärkt in Tumor-versorgenden Gefäßen zu finden sind (Martiny-Baron und Marmé, 1995). Das Wachstum eines Krebsgeschwürs und die Entstehung sowie Ausbreitung von Metastasen sind Prozesse, die abhängig sind von der Bildung neuer Blutgefäße, die den hyperaktiven, entarteten Zellen ausreichend Nährstoffe zuführen (Folkman, 1994). Um diese Angiogenese zu verhindern und somit den Tumor „auszuhungern“, wurde ein monoklonaler VEGF-Antikörper – Bevacizumab® – entwickelt, der zwischenzeitlich in Kombination mit einer intravenösen Chemotherapie für die Behandlung von Dickdarmkrebs in Deutschland zugelassen ist.

In Experimenten zu protektiven Eigenschaften des VEGFs konnten anti-apoptotische Effekte nach Serum-Entzug, ionisierender Bestrahlung oder Einwirken von oxidiertem LDL beobachtet werden (Katoh *et al.,* 1995; Gerber *et al.,* 1998; Kuzuya *et al.,* 2001). Für unsere Untersuchungen wurde VEGF aufgrund seiner dokumentierten protektiven Wirksamkeit gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose in HUVE-Zellen und neuroprotektiver Effekte an hippokampalen Primärkulturen ausgewählt (Vinci *et al.,* 2004; Svensson *et al.,* 2002).

1.5 Weitere untersuchte Wachstumsfaktoren

1.5.1 Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)

CNTF wird im zentralen und peripheren Nervensystem von Gliazellen exprimiert. Seine Effekte betreffen u.a. sympathische, motorische und sensorische Neurone und sind pro-apoptotischer und modulierender Natur. Wie in Knock-out-Mäusen, die ein inaktives CNTF-Gen besaßen, gezeigt werden konnte, ist CNTF nicht für die Entwicklung des Nervensystems, sondern vielmehr für regulatorische Prozesse bei Stress oder Verletzungen verantwortlich (Friedman *et al.,* 1992; Ip *et al.,* 1993; Masu *et al.,* 1993). Das Protein besteht aus vier antiparallelen α-Helices und besitzt ein Molekulargewicht von 22 kDa.

1.5.2 Epidermal Growth Factor (EGF)

EGF wurde zufällig durch einen Bioassay entdeckt, der eigentlich Effekte des NGFs untersuchen sollte und mit einem Extrakt aus den submaxillaren Drüsen der männlichen Maus durchgeführt wurde. In diesen Drüsen wird auch EGF in größeren Mengen synthetisiert. Es besitzt ein Molekulargewicht von 6 kDa und drei intramolekulare Disulfidbrücken, die sich zwischen 6 Cysteinresten erstrecken (Massague und Pandiella, 1993). Obwohl EGF eine Reihe von modulierenden Effekte auf Zellen ausübt, steht die proliferierende Wirkung wohl im Vordergrund. Interessanterweise scheint EGF nur auf Zellen des zentralen und nicht des peripheren Nervensystem zu wirken (Morrison *et al.,* 1988; Kornblum *et al.,* 1990; Chalazonitis *et al.,* 1992).

1.5.3 Insulin-like Growth Factor (IGF)

IGF-I und IGF-II wurden Mitte der 70er Jahre entdeckt und weisen eine Sequenzhomologie von ca. 70 % auf. Das hier verwendete IGF-I hat ein Molekulargewicht von ca. 7,6 kDa und besteht aus einer Polypeptid-Kette aus 70 Aminosäuren. Es wird als Pro-Form synthetisiert und beinhaltet in der reifen Form drei Disulfidbrücken. Dokumentiert ist seine proliferierende Wirkung auf Neurone des zentralen und peripheren Nervensystem, außerdem übt es Effekte auf den Insulin-Stoffwechsel und das Muskelwachstum aus (Adams, 2000). Seine protektiven Effekte werden über PI3K-Weg und den MAPK-Weg vermittelt (Le Roith *et al.,* 1995; Werner und Le Roith, 1997).

1.5.4 Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF)

G-CSF ist einer der wenigen Wachstumsfaktoren, der als Fertigarzneimittel verfügbar ist und seit einigen Jahren erfolgreich als Therapeutikum eingesetzt wird. G-CSF wird bei Neutropenie nach myelosuppressiver Chemotherapie z. B. während einer Krebserkrankung appliziert und bewirkt einen Anstieg des Leukozytenanteils. Somit wird die Regeneration des Immunsystems unterstützt und die Inzidenz von neutropenischen Infektionen reduziert.

Physiologisch wird G-CSF verstärkt bei Entzündungsreaktionen exprimiert und fördert das Überleben und die Proliferation unreifer Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems. Reife neutrophile Granulozyten werden durch G-CSF aktiviert, migrieren aufgrund chemotaktischer Signale zu den Infektionsherden und sind dort in der Lage, körperfremde Organismen zu elimieren.

G-CSF ist ein Glykoprotein mit vier antiparallelen α-Helices und einem Molekulargewicht von 19 kDa (Lovejoy *et al.,* 1993).

1.5.5 Transforming-Growth-Factor-β1

TGF-β1 ist ein multifunktionelles Zytokin, das sowohl stimulierende als auch inhibitorische Effekte auf die Zellreplikation ausüben kann. Seine modulierende Wirkung wurde auf die Angiogenese, Zellmigration, Hämatopoese und weitere Prozesse, die die Wundheilung und Bildung von Gewebe betreffen, nachgewiesen (Sporn *et al.,* 1987; Barnard *et al.,* 1990; Moses *et al.,* 1990; Sporn und Roberts, 1992). Auch neuronale Zellen werden durch TGF-β1 beeinflusst: es stimuliert

kultivierte Astrozyten zur Freisetzung von NGF und schützt kortikale Rattenneurone vor exzitatorischer Schädigung durch Glutamat (Prehn *et al.,* 1993).
Bei TGF-β1 handelt es sich um ein 25 kDa großes Homodimer, dessen Sequenz in verschiedenen Spezies hoch konserviert ist. So unterscheidet sich beispielsweise die humane von der murinen Sequenz in nur einer Aminosäure (Derynck *et al.,* 1986).

1.6 Reversible Phosphorylierung als Regulationsmechanismus

Noch vor wenigen Jahrzehnten wurde die Bedeutung und das Ausmaß des Einflusses von Kinasen und Phosphatasen völlig unterschätzt. Ihre Erforschung stand noch am Anfang und erst allmählich wurde die Relevanz von Phosphorylierungen als Regulationsmechanismus deutlich.
Heute weiß man, dass reversible Phosphorylierungen eine regulatorische Rolle in fast allen Bereichen des Lebens spielen und dass über 30% aller zellulären Proteine kovalent gebundene Phosphatreste tragen (Cohen, 2000). Ebenso ist bekannt, dass abnorme Phosphorylierungsgrade sowohl Ursache als auch Resultat von Krankheiten wie Krebs, rheumatoider Arthritis oder Diabetes sein können. Es wird somit deutlich, dass es sich hierbei nicht nur um ein weitläufiges, sondern auch vielversprechendes und für die Entwicklung neuer therapeutischer Verfahren wichtiges Forschungsgebiet handelt. Insbesondere die Beeinflussung und Steuerung spezieller Proteine oder Signalkaskaden durch Kinasen und Phosphatasen stehen dabei im Zentrum wissenschaftlicher Forschung.

Umso erstaunlicher ist, dass speziell im Bezug auf die Signalwege der Wachstumsfaktoren lediglich die intrazellulären, durch reversible Phosphorylierung gesteuerten Kaskaden aufgedeckt und intensiv untersucht wurden. Prozesse im Extrazellulärraum und speziell die mögliche Aktivierung von Wachstumsfaktoren durch reversible Phosphorylierung blieben bislang weitgehend unerforscht.
Es existiert zur Zeit lediglich eine Publikation, die näher auf Aktivierungsmechanismen von Wachstumsfaktoren eingeht: Klumpp *et al.* (2006) wiesen erstmalig auf eine mögliche Bedeutung von reversiblen Phosphorylierungen für die biologische Aktivität von Wachstumsfaktoren hin.

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass mit der vorliegenden Arbeit wissenschaftliches Neuland betreten wird und – ausgehend von den Ergebnissen von Klumpp *et al.* (2006) – eine spezifischere Erforschung der Aktivierung von Wachstumsfaktoren durch ATP-Bindung(en) und/oder reversible Phosphorylierung(en) geleistet werden kann.

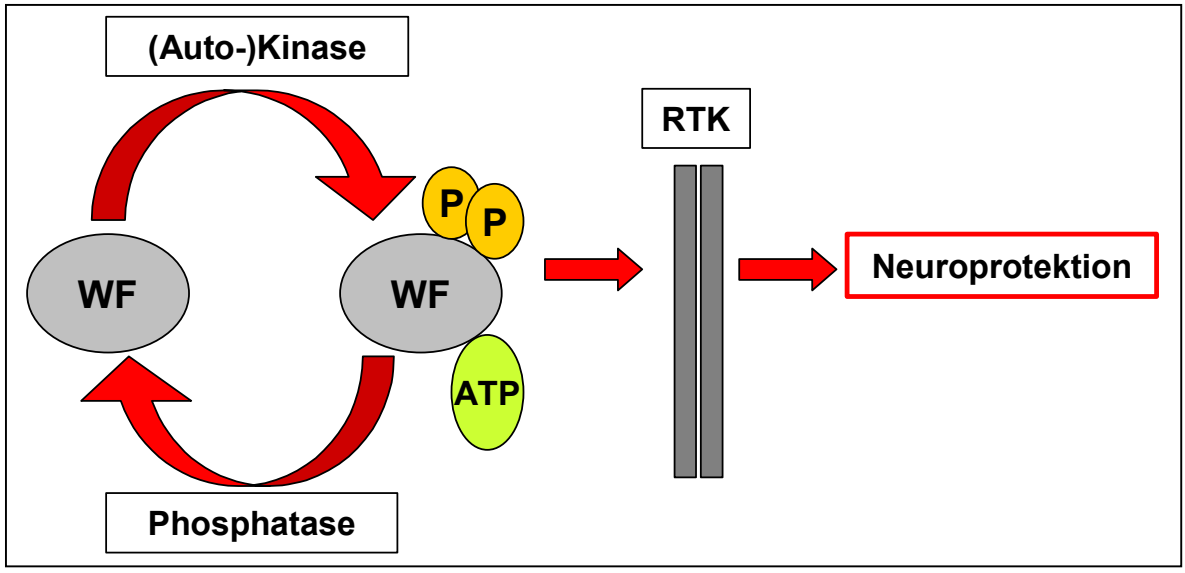


Abb. 1-4: Hypothese zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren durch reversible Phosphorylierung(en) und/oder ATP-Bindung(en)

WF = Wachstumsfaktor; RTK = Rezeptor-Tyrosin-Kinase

Unserer Hypothese liegt die Annahme zugrunde, dass Wachstumsfaktoren erst dann in der Lage sind, an ihre spezifischen Rezeptoren zu binden und so die Effekte-vermittelnden Signalkaskaden anzustoßen, wenn sie aktiviert sind. Diese Aktivierung könnte durch Anlagerung eines oder mehrerer ATP-Moleküle und der Bindung von einer oder mehreren Phosphatgruppen geschehen. Dies würde wiederum eine Konformationsänderung der Wachstumsfaktoren bewirken und dadurch eine Interaktion mit dem Rezeptorprotein erst ermöglichen.

Für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF wurden in unserem Arbeitskreis schon umfassende Untersuchungen ausgeführt und die Bedeutung einer reversiblen Phosphorylierung näher beleuchtet (Kriha, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass vor allem ein Lysinrest an Position 134 notwendig für die biologische Aktivität und für die wirkungsrelevante Bindung von Heparin ist.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwieweit unsere Hypothese auf weitere Wachstumsfaktoren zutrifft und ob es sich hiermit um ein allgemeines Prinzip

zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren handeln könnte. Im Fokus der Studien standen die Neurotrophine NGF und BDNF. Ergänzend zu jenen Befunden wurden noch weitere Wachstumsfaktoren – VEGF, CNTF, EGF, IGF, G-CSF und TGF-β1 – zur Untermauerung unserer Hypothese getestet.

1.7 Fragestellung

Als neuroprotektiv wirksame Substanzen stehen Wachstumsfaktoren, insbesondere Neurotrophine, hinsichtlich verbesserter Therapieansätze zur Behandlung von degenerativen Gehirnerkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson im Fokus der Medizin. Aufgrund problematischer Nebenwirkungen sowie komplizierter Applikationsmethoden wie beispielsweise intrazerebroventrikulärer Injektionen gestalten sich Behandlungskonzepte mit Neurotrophinen jedoch als sehr schwierig. Es ist daher die Aufgabe der Wissenschaftler, die Wirkungsweise und Regulationsmechanismen der durch Wachstumsfaktoren ausgelösten Prozesse besser zu verstehen, um neue Ansätze für Therapien zu entwickeln.

Die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren löst eine Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden aus, die biologische Effekte wie die Differenzierung oder das Überleben von Zellen zur Folge haben und durch reversible Phosphorylierungen reguliert werden.

Obwohl der Extrazellulärraum ähnlich komplex organisiert ist wie der Bereich innerhalb der Zellmembran, sind hier zahlreiche Vorgänge und Mechanismen noch weitgehend unerforscht. So ist bislang unklar, ob Wachstumsfaktoren einer Aktivierung bedürfen, um überhaupt in der Lage zu sein, an ihren spezifischen Rezeptor zu binden und wie in diesem Falle ihre Aktivierung charakterisiert ist.

Unsere Hypothese besagt, dass verschiedene Wachstumsfaktoren ATP binden und/oder phosphoryliert werden müssen, um wirksam werden zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es somit, die Art der Aktivierung näher zu charakterisieren und aufzuklären, inwieweit gebundenes ATP oder Phosphatreste relevant für die biologische Aktivität von Wachstumsfaktoren ist oder sind.

Hierbei liegt der Schwerpunkt der Studien auf den Neurotrophinen NGF und BDNF. Als Basis für die Untersuchungen diente ein Zellkulturmodell, in dem die protektiven Effekte der Wachstumsfaktoren bei apoptotischen Schädigungen von kultivierten

Neuronen als Maß ihrer Aktivität herangezogen wurden. Induziert wurden apoptotische Prozesse vor allem durch den unspezifischen Kinase-Inhibitor Staurosporin. Ergänzend wurde das OGD-Modell angewandt, um durch einen kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Entzug in der Zellkultur ischämische Bedingungen nachzuahmen. Des Weiteren fand eine Überprüfung der Aktivierung der für die Neuroprotektion verantwortlichen Signalwege statt, um auch auf Proteinebene die Potenz der Wachstumsfaktoren nachzuweisen, biologische Effekte zu vermitteln.

In den beschriebenen Modellen wurde der Einfluss eines dephosphorylierenden Enzyms, der alkalischen Phosphatase, und von ATPase auf die biologische Aktivität der Wachstumsfaktoren untersucht. Darüber hinaus wurde durch den Einsatz von Inhibitoren der Proteinkinase A und C die Existenz einer Autokinasefunktion innerhalb der Neurotrophine überprüft.

Um weitere Anhaltspunkte zu finden, ob unsere Hypothese als allgemeines Aktivierungsprinzip auf eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren zutreffen könnte, wurden weitere Wachstumsfaktoren – CNTF, EGF, IGF, G-CSF, TGF-β1 und VEGF – untersucht.

Als Ausgangsbasis für gezielte Mutationen innerhalb der Aminosäuresequenz der Neurotrophine wurde sowohl rekombinantes NGF als auch BDNF im Arbeitskreis Klumpp hergestellt, welche im Staurosporin-Schädigungsmodell an neuronalen Primärkulturen auf ihre biologische Aktivität getestet wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Die Gewinnung der neuronalen Primärkulturen wurde unter Beachtung des Tierschutzgesetztes der Bundesrepublik Deutschland und den einschlägigen Richtlinien des Bundesamts für Veterinärwesen zur Durchführung von Tierversuchen durchgeführt.

Verwendet wurden neonatale Fischer-344-Ratten (Charles River, Sulzfeld). Alle Tiere wurden in einem vollklimatisierten Tierstall unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 23 ± 1°C, relative Luftfeuchte 55 ± 5%, zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus) mit freiem Zugang zu Futter (Altromin®, Lage) und Trinkwasser gehalten. Im Umgang mit den Tieren wurde zu jedem Zeitpunkt darauf geachtet, dass die Belastung so gering und kurz wie möglich war.

2.1.2 Proteine und Chemikalien als Testsubstanzen

Wirkstoff	**Herkunft (Firma, Ort)**
2.5S NGF	Promega, Mannheim Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
Alkalische Phosphatase	Sigma, Taufkirchen
ATP	Sigma, Taufkirchen
ATPγS	Alexis, Lausen, Schweiz
ATPase	Sigma, Taufkirchen
BDNF	Acris Antibodies, Hiddenhausen
CNTF	Sigma, Taufkirchen
EGF	Sigma, Taufkirchen
G-CSF (Neupogen®48)	Amgen, München
IGF-1	Sigma, Taufkirchen
Protein Kinase A, Fragment 5-24, Amid	Sigma, Taufkirchen
Protein Kinase C, Fragment 19-31, Amid	Sigma, Taufkirchen

Wirkstoff	Herkunft (Firma, Ort)
TGF-β1	R&D Systems, Wiesbaden
$VEGF_{165}$	Acris Antibodies, Hiddenhausen

Tab. 2-1: Verwendete Substanzen

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

2.1.3.1 Bestandteile der verwendeten Kulturmedien

Antibiotika/Antimykotika-Lösung (10 000 I.E. Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin und 25 µg/ml Amphotericin B)	Gibco, Eggenstein
Acutase®	PAA, Marburg
B27 Supplement	Gibco, Eggenstein
Calciumchlorid	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum	Sigma, Taufkirchen
Gentamicinsulfat	Sigma, Taufkirchen
Glukose	Sigma, Taufkirchen
HAM's F12	Gibco, Eggenstein
HEPES	Sigma, Taufkirchen
HUVECs Cell Growth Medium	Promocell, Heidelberg
Kaliumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumsulfat x 7 H_2O	Sigma, Taufkirchen
MEM mit Earle's Salzen	PAA, Marburg
MEM mit Earle's Salzen, ohne Glutamin und Natriumhydrogencarbonat	Gibco, Eggenstein
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen

Natriumpyruvat	Sigma, Taufkirchen
Neurobasal ™ Medium	Gibco, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin Lösung (10 000 I.E. Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin)	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum	PAA, Marburg
Phenolrot	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

2.1.3.2 Kulturgefäße

Falcon® Easy Grip™ Zellkulturschalen 10 x 35 mm	Becton Dickinson Labware, New York, USA
Falcon® Easy Grip™ Zellkulturschalen 15 x 60 mm	Becton Dickinson Labware, New York, USA

2.1.3.3 Sonstige Materialien in der Zellkultur

Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Cellstar® Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Corning® Sterilfilter (0,22 µm)	Corning, New York, USA
Ethanol 96%	Lenz Chemie, Westerburg
Millex® Sterilfilter	Millipore, Bedford, USA
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
Natriumtetraborat	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenimin	Sigma, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Sterilium®	Bode Chemie, Hamburg
Trypsin 1:250 aus Schweinepankreas	Sigma, Taufkirchen
Trypsininhibitor Type II-O Chicken egg white	Sigma, Taufkirchen

2.1.4 Materialien zur Bestimmung der neuronalen Apoptose

Axiovert 100	Zeiss, Jena
Axiovert 135 Fluoreszensmikroskop	Zeiss, Jena
di-Natriumhydrogenphosphat x 7 H_2O	Sigma, Taufkirchen
Formaldehydlösung	Riedel-de Häen, Seelze
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
Olympus® OM-4Ti	Olympus, Tokio, Japan
Staurosporin	Alexis, Lausen, Schweiz
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

2.1.5 Materialien für die Proteinbestimmung

BSA-Standard	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
MicroBC Assay System	Interchim, Montlucon, Frankreich
Mikrotiterplatte Nunc-Immuno	Nunc, Roskilde, Dänemark
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I Enthält Microcystein LR, Cantharidin und (-)-p-Bromotetraisol	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II Enthält Natriumorthovanadat, Natriumtartrat, Imidazol und Natriummolybdad	Sigma, Taufkirchen
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Taufkirchen

2.1.6 Materialien für SDS-Page und Western Blotting

Agar	Sigma, Taufkirchen
Amersham ECL Kit	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
APS	AppliChem, Gatersleben
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
FITC-Avidin	Invitrogen, Karlsruhe
GBX Developer/Replenisher	Eastman Kodak, New York, USA
GBX Fixer/Replenisher	Eastman Kodak, New York, USA
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Hybond Nitrocellulosemembran	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Kodak X-Omat AR Film	Eastman Kodak, New York, USA
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
Peq-Gold Proteinmarker IV	Peqlab, Erlangen
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S rot	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
Rotiphorese® 30 (30% Acrylamid) Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Roth, Karlsruhe

Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Sigma, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.7 Materialien für die Silberfärbung

Essigsäure	Riedel-de Häen, Seelze
Formaldehydlösung	Riedel-de Häen, Seelze
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

2.1.8 Materialien für die Immunozytochemie

Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser, 24 mm Ø	Kobe, Marburg
di-Natriumhydrogenphosphat x 7 H_2O	Sigma, Taufkirchen
Fluoroisothiocanat (FITC)-Avidin-Lösung	Sigma, Taufkirchen
Formaldehydlösung	Riedel-de Häen, Seelze
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Natriumdihydrogenphophat	Sigma, Taufkirchen
Objektträger, 76 x 26 mm	IDL, Nidderau
Triton ® X-100	Sigma, Taufkirchen
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg
Ziegenserum	PAA, Marburg

2.1.9 Antikörper

	Klonalität	Spezies	Bezug
α-Tubulin	Monoklonal	Maus	Sigma, Taufkirchen
BDNF	Polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
GFAP	Monoklonal	Maus	Chemicon, Temekula, USA
Neu N	Monoklonal	Maus	Chemicon, Temekula, USA
NGF	Polyklonal	Kaninchen	Chemicon Temekula, USA
Phospho-Pan-Trk	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signalling, Berveling, USA
Phospho-Akt	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signalling, Berveling, USA
TrkA	Polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Phospho-ERK 1/2	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signalling, Berveling, USA

Tab. 2-2: Verwendete Erst-Antikörper

	Spezies	Bezug
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Esel	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	Kaninchen	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Anti-Maus IgG, biotinyliert	Ziege	Vector Labs, Burlingame, USA

Tab. 2-3: Zweit-Antikörper

2.1.10 Materialien zur Endotoxin-Bestimmung

Pyrotell® Limulus Amebocyte Lysate (LAL)

STV, 0,03 EU/ml	Cape Cod, East Falmouth, USA
Controll Standard Endotoxin (CSE)	Cape Cod, East Falmouth, USA
Pyrogenfreies Wasser	Cape Cod, East Falmouth, USA

2.1.11 Materialien zur permanenten zerebralen Ischämie

2,2,2-Tribromethanol	Fluka Chemie, Buchs
Bepanthen® Augensalbe	Roche, Grenzach-Whylen, Schweiz
di-Natriumhydrogenphosphat x 7 H_2O	Sigma, Taufkirchen
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung	Riedel-de Häen, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Mikroliterspritzen (701N, 10 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Neutralrot	Merck, Darmstadt
Sterican® Kanülen	Braun, Melsungen
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

2.1.12 Materialen für die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Phospho-Aminosäuren

[γ-^{32}P]ATP	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Ammoniak 25%	Merck, Darmstadt
DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{245}	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Phospho-Arginin	Sigma, Taufkirchen
Phosphorylchlorid	Sigma, Taufkirchen
Phospho-Serin	Sigma, Taufkirchen
Phospho-Threonin	Sigma, Taufkirchen
Phospho-Tyrosin	Sigma, Taufkirchen
Poly-Histidin	Sigma, Taufkirchen
Poly-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Triethylamin	Merck, Darmstadt
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

2.1.13 Sonstige Geräte

AIDA Image Analyser mit BAS-Reader	Raytest, Straubenhardt
Autoklav HICLAVE HV-110 L	HMC, Tokio, Japan
Bildauswertungssytem IBAS 2	Kontron, Eching
Blottingapparatur	Biometra, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Feinbohrer Proxxon 28702/N	Proxxon, Niesbach/Eiffel
Fujifilm BAS-1800 II	Raytest, Straubenhardt
Hitzesterilisator TV 40 UT	Memmert, Emmerdingen
Kühlzentrifuge Microfuge® R	Beckmann, Krefeld
Lamin Air ELB 2448	Heraeus, Hanau
Luftsauerstoff-Messgerät	GMH 3691 GL, Greisinger Electronic, Regenstauf
Luftsauerstoffsensor	GGO 369 S, Greisinger Electronic, Regenstauf
Luminometer Ultraspec 1000	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
Mikroskop Nissho TZ 240	Nissho Optical, Japan
OGD-Inkubationsbox	Billups-Rothenberg, Del Mar, USA
Operationsmikroskop M650	Wildleitz, Heerbrugg, Schweiz
pH-Meter, Digital-pH-Meter	Knick, Berlin
Plattenreader	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
Pumpe Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Spannungsquellle Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia, Freiburg
Stereolupe	Eschenbach, Nürnberg
Thermokauter Erbotom T 71 D	Erbe, Tübingen
Thermometer Digimed H115	Hugo Sachs Elektronik, March
Ultraschallgerät Sonifier B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Videokamera Tyk 92D	Bosch, Stuttgart
Waage, BL3100	Sartorius, Göttingen

Waage P163	Mettler-Toledo, Giessen
Werkbänke Envirco C424 H	Ceag Schirp, Borken
Zentrifuge Sepatech Biofuge 13	Heraeus, Hanau

2.1.14 Software

Bildverarbeitungssystem Kontron IPS	Kontron, Eching
Microsoft Excel Office 2000	Microsoft, Redmont, USA
WinSTAT Version 2.0	Microsoft, Redmont, USA
Zeiss LSM Image Browser 3.2	Zeiss, Jena

2.2 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur

Sämtliche Arbeiten, die im Zusammenhang mit den Zellkulturen standen – also Präparation der Primärkulturen, Kultivierung der SH-SY5Y- sowie HUVE-Zellen, Herstellung der sterilen Lösungen und Medien, Medienwechsel und Behandlung der Zellkulturen – wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Werkbank mit laminar horizontaler (Envirco C 424H, Ceag Shirp, Borken) oder vertikaler Luftführung (Lamin Air ELB 2448, Hereaus, Hanau) durchgeführt.
Die verwendeten Glasgeräte wurden in einem Trockenschrank (TV 40 UT, Memmert, Emmerdingen) bei 180°C für 2 h hitzesterilisiert. Wasser, Schraubdeckel für Flaschen und Pipettenspitzen für die Eppendorff-Pipetten wurden bei 121°C und 2 bar innerhalb von 60 min autoklaviert. Alle verwendeten wässrigen Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und sterilfiltriert.
Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte in einem Brutschrank (Cytoperm, Heraeus, Hanau oder Function Line, Typ BB 16, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5% CO_2 und einer relativen Luftfeuchte von 90-95%.

2.3 Anlage und Kultivierung von hippokampalen und kortikalen Primärkulturen

2.3.1 Vorbereitung der Kulturschalen

Um die Haftung der Zellen auf dem Boden der Kulturschale zu gewährleisten, wurden diese maximal sieben Tage vor der eigentlichen Präparation mit Poly (L)-Lysinlösung beschichtet.
Folgende Lösungen wurden hierfür verwendet:

Borsäurelösung 1,25%

Borsäure	1,25 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Boraxlösung 1,91%

Natriumtetraborat	1,91 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Poly-L-lysin-Lösung

Poly-L-Lysin (MG 300 000-700 000)	1 mg
Borsäurelösung 1,25%	5 ml
Boraxlösung 1,91%	5 ml

Jeweils 1,5 ml der sterilfiltrierten Beschichtungslösung wurde für 2 h auf die Kulturschalen (35 mm Ø) gegeben. Nach dem Absaugen der Lösung wurde dreimal mit je 2 ml sterilem Wasser gespült und die Schalen anschließend durch 30-minütige Bestrahlung mit UV-Licht sterilisiert. Unmittelbar vor Beginn der Präparation wurden die beschichteten Schalen mit je 1,5 ml Neurobasal™-Medium befüllt und zur Temperaturanpassung in den Brutschrank gestellt.

2.3.2 Präparation der hippokampalen und kortikalen neonatalen Primärkulturen

Die Präparation wurde nach einer modifizierten Methode von Banker und Cowan (1977) durchgeführt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt und alle verwendeten Geräte wie Präparationsbesteck, Pipetten und

Glasschalen zuvor durch Strahlensterilisation oder 30-minütiges Einlegen in Alkohol sterilisiert.

2.3.3 Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums

Neurobasal™-Medium	500 ml
Supplement B27	10 ml
Penicillin/Streptomycin	1,5 ml
HEPES	0,573 g
L-Glutamin	0,088 g
pH 7,2 (eingestellt mit NaOH)	

2.3.4 Präparationslösungen

Lösung 1:

Neurobasal™-Medium	150 ml
BSA, Albumin Bovine Fraction V	30 mg

Lösung 2:

Lösung 1	30 ml
Papain	30 mg

Lösung 3:

Neurobasal™-Medium	50 ml
Trypsin-Inhibitor, Type II-O Chicken egg white	500 mg
BSA, Albumin Bovine Fraction V	500 mg

Als Ausgangsmaterial für die hippokampalen neonatalen Primärkulturen wurden Hippokampi bzw. Cortices von maximal 24 h alten Fischer-344-Ratten benötigt. Nach Desinfektion und Dekapitation der Ratten wurden die Hippokampi mit Hilfe einer Präparationsschere entfernt, in Lösung 1 gesammelt und von anhängenden Gefäßresten befreit. Anschließend wurden sie in vorgewärmte Lösung 2 überführt und bei 37°C für 20 min unter mehrmaligem Umschwenken inkubiert.

Nach Absaugen der Papainlösung wurden die Hippokampi bzw. Cortices mit 1 ml Neurobasal™-Medium überschichtet und mit einer sterilen Pasteurpipette trituiert. Nachdem größere Gewebsstückchen abgesunken waren, wurde der trübe Überstand

vorsichtig abgenommen und zu Lösung 3 mit dem enthaltenen Trypsin-Inhibitor gegeben. Die undissoziierten Gewebestücke wurden nochmals trituiert und der Überstand wiederum zur Lösung 3 gegeben.
Die vereinigten Zellsuspensionen wurden bei 600 rpm (*revolutions per minute*) und Raumtemperatur für 8 min zentrifugiert (Minifuge, Heraeus, Hanau), der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellett in Neurobasal™-Medium aufgenommen. Mit Hilfe des Neubauer-Hämozytometers wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt und die auszusäende Mikroliterzahl so gewählt, dass pro Kulturschale eine Zelldichte von 2,5 x 10^4 /cm^2 erzielt wurde.
Am dritten Kulturtag erfolgte der erste Medienwechsel, der zweite am siebten Tag unmittelbar vor der Arzneistoff-Behandlung. Für die Versuche wurden die Zellen ausschließlich am siebten Kulturtag verwendet.

2.4 SH-SY5Y-Zellen

2.4.1 Charakterisierung der SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zelllinie wurde 1970 aus einem Neuroblastom eines vierjährigen Mädchens gewonnen und als stabile Subklon-Linie weiterkultiviert (Biedler *et al.,* 1973). Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt durchschnittlich etwa 48 h. Sie wachsen adhärent als polygonale Zellen mit kleinen Ausläufern, neigen allerdings zur Bildung von Aggregaten.
Als neuronale Zelllinie besitzen SH-SY5Y-Zellen sowohl TrkA, als auch TrkB-Rezeptoren, was sie für Experimente im Rahmen der NGF- und BDNF-Untersuchungen interessant macht (Eggert *et al.,* 2000).

2.4.2 Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden in serumhaltigem Ham's F12/MEM in Falcon® Zellkulturflaschen (250 ml, 75 cm²) kultiviert und alle 2-3 Tage mit frischem Medium bedeckt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie gesammelt und im Verhältnis 1:3 bis 1:5 neu ausgesät. Nach einem Waschschritt mit serumfreiem Ham's F12/MEM wurden die Zellen 5 min lang bei 37°C mit 3 ml einer Trypsinlösung inkubiert. Durch Zugabe von 5 ml serumhaltigem Kulturmedium wurde das Trypsin

inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen gesammelt und bei 800 rpm 5 min lang zentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und auf zuvor befüllte Kulturflaschen verteilt.

Ham's F12/MEM (serumhaltig)

HAM's F12	250 ml
MEM (mit Earl's Salzen und Glutamat)	250 ml
FCS	50 ml
MEM Non-Essential AA	6 ml
Pen/Strep-Lösung	2 ml

Ham's F12/MEM (serumfrei)

HAM's F12	250 ml
MEM (mit Earl's Salzen und Glutamat)	250 ml
MEM Non-Essential AA	6 ml
Pen/Strep-Lösung	2 ml

Trypsinlösung

Trypsin	100 mg
Na-EDTA	20 mg
Ham's F12/MEM serumfrei	ad 100 ml

2.4.3 Behandlung der SH-SY5Y-Zellen

Für die Behandlung mit Wachstumsfaktoren wurden die Zellen nach dem Splitten in Kulturschalen (35 mm ∅), die zuvor mit Poly-(L)-Lysin beschichtet worden waren, ausgesät. Um die Auszählung unter dem Fluoreszenzmikroskop zu ermöglichen, wurde eine Zelldichte von 100 000 Zellen pro Schale gewählt. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen mit 1 ml Kulturmedium bedeckt, mit den entsprechenden Konzentrationen des Wachstumsfaktors behandelt und 1 h später Staurosporin in einer Konzentration von 300 nM zugegeben. Die weitere Durchführung entspricht exakt den Bedingungen für neuronale Primärkulturen (siehe 2.6).

2.5 Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC)

2.5.1 Charakterisierung der HUVECs

Die von der Firma Promocell bezogenen HUVECs sind endotheliale venöse Zellen aus der menschlichen Nabelschnur, die von mehreren Spenderinnen gesammelt und vereinigt wurden. In kultivierter Form haben die Zellen eine Verdopplungszeit von ca. 48 h und bilden bei 80% Konfluenz einen einschichtigen Zellrasen (Monolayer). Die folgenden Experimente wurden ausschließlich an konfluenten Zellkulturen der Passagen 3-7 durchgeführt.

2.5.2 Kultivierung der HUVECs

Die kryokonservierten HUVECs wurden zur Kultivierung im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und direkt in die sterilen Kulturflaschen pipettiert, die zuvor mit angewärmtem Medium gefüllt worden waren. Waren die Zellen zu einem konfluenten Zellrasen herangewachsen, wurden sie gesammelt und im Verhältnis 1:3 neu ausgesät. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit Acutase® für 10 min inkubiert. Nach Überführen in ein steriles Falcontube wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und das so erhaltene Zellpellett in angewärmtem Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde zur weiteren Kultivierung in die vorher mit Medium befüllten Kulturflaschen verteilt oder für die Experimente in Kulturschalen ausgesät.

Zusammensetzung des HUVEC-Mediums:

Fötales Kälberserum	0,02 ml/ml
Wachstumszusatz für Endothelzellen/Heparin	0,004 ml/ml
Humaner epidermaler Wachstumsfaktor	0,1 ng/ml
Humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor	1,0 ng/ml
Hydrocortison	1,0 µg/ml
Gentamycinsulfat	50 µg/ml
Amphotericin B	50 ng/ml
Endotheliales Wachstumsmedium	ad 500 ml

2.5.3 Protektive Wirkung von VEGF bei Serumentzug an HUVECs

Um den protektiven Effekt von VEGF zu überprüfen, wurden die Zellen, sobald sie einen konfluenten Zellrasen bildeten, nach einmaligem Waschen mit serumfreiem OptiMEM bedeckt. In die Kulturschalen der entsprechenden Gruppen wurde VEGF bzw. VEGF und alkalische Phosphatase oder ATPase entweder direkt ins Medium zugesetzt oder extern zusammen für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach 48-stündigem Serumentzug wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Kerne ausgezählt (siehe 2.9).

2.6 Phosphorylierung von NGF und BDNF

Die Neurotrophine NGF und BDNF wurden jeweils in einem 1 ml-Ansatz in Gegenwart von 1 mM $MgCl_2$, 25 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 1 µM ATP bzw. ATPγS bei 37°C für 15 min phosphoryliert.

Bei den Experimenten, in denen der Einfluss von alkalischer Phosphatase oder ATPase auf die neuroprotektive Wirkung von NGF oder BDNF untersucht werden sollte, wurde anschließend an die Phosphorylierung eine weitere 10-minütige Inkubation mit dem jeweiligen Enzym bei 37°C durchgeführt. Für die ATPase-Inkubation wurde vom Hersteller ein Pufferzusatz mit folgender Zusammensetzung empfohlen: 24 mM Tris HCl pH 7,4; 0,68 mM EDTA; 6 mM $MgCl_2$; 2 M NaCl; 45 mM KCl. ATPase oder alkalische Phosphatase wurden vor Zugabe ins Kulturmedium nicht abgetrennt.

Für die Untersuchungen einer Beeinflussung durch Proteinkinase-Inhibitoren wurden Inhibitoren der Proteinkinase A und C direkt dem Phosphorylierungsansatz zugesetzt. Die verwendeten Konzentrationen lagen hierbei 10-fach über dem jeweiligen K_i-Wert (Proteinkinase A-Inhibitor: 23 nM; Proteinkinase C-Inhibitor: 1,5 µM).

2.7 Behandlung neuronaler Primärkulturen mit Wachstumsfaktoren

Die Behandlung der neuronalen Primärkulturen neonataler Ratten erfolgte immer nach demselben Prinzip, unabhängig davon, ob es sich um kortikale oder hippokampale Neurone handelte.
Die Zellen wurden am siebten Tag in Kultur nach einem Medienwechsel mit 1 ml Neurobasal™-Medium bedeckt, mit der jeweiligen Konzentration der Wachstumsfaktoren bzw. die entsprechenden Gruppen simultan mit alkalischer Phosphatase oder ATPase behandelt und 1 h später mit Staurosporin (200 nM) versetzt. Nach 20 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit Formalinlösung fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop der Anteil der apoptotischen Nuclei ermittelt.

2.8 Schädigung neuronaler Primärkulturen durch Sauerstoff- und Glukose-Entzug (OGD)

Um die physiologischen Vorgänge während einer zerebralen Ischämie möglichst naturgetreu an der Zellkultur nachahmen zu können, wurde die sogenannte *Oxygen-Glucose-Deprivation*-Methode (OGD) angewandt. Bei dieser Methode werden Neurone durch kombinierten Sauerstoff-Glukose-Entzug geschädigt.
Die zunächst mit Neurobasal™-bedeckten Zellen wurden mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor und/oder alkalischer Phosphatase vorbehandelt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit den enthaltenen Wirkstoffen gruppenweise gesammelt und eventuelle Reste durch einmaliges Waschen mit serumfreiem vorgewärmtem Locke's(-)-Medium entfernt. Zum Einleiten des Glukose-Entzugs wurde sodann jeweils 1 ml Locke's(-)-Medium mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor und / oder alkalische Phosphatase in die Kulturschalen gegeben. Nach diesem Wechsel wurden die Zellen sofort in eine gasdichte Kammer in einem auf 37°C angewärmten Wärmeschrank überführt, die mit einem zuvor angefeuchteten und angewärmten Gasgemisch aus 95% N_2 und 5% CO_2 gespült wurde. Der Sauerstoffpartialdruck konnte zu jedem Zeitpunkt über eine externe

Sauerstoff-Messelektrode kontrolliert werden. Nach 15-minütigem Durchspülen und Abfall des Sauerstoff-Partialdrucks auf unter 1% wurde die Kammer gasdicht verschlossen und für weitere 3 h und 45 min im Wärmeschrank verwahrt.
Die Kontrollgruppen waren Zellkulturen, die nur einen Medienwechsel mit Neurobasal™-Medium erfahren hatten bzw. mit jeweils 1 ml Locke's(+)-Medium gespült und bedeckt sowie anschließend bei 37°C , 5% CO_2 und 95% Luftanteil für 3 h und 45 min inkubiert wurden.
Nach insgesamt 4 h Sauerstoff- und Glukose-Entzug wurden die Kulturschalen aus der gasdichten Kammer entnommen, das Locke's(-)-Medium mit den enthaltenen Wachstumsfaktoren und/oder alkalischer Phosphatase abgesaugt und das zuvor gruppenweise gesammelte Neurobasal™-Medium-Wirkstoff-Gemisch wieder auf die zugehörigen Zellen gegeben. Entsprechend wurde auch bei den Kontrollgruppen ein Medienwechsel mit Neurobasal™-Medium durchgeführt. Zur Reoxygenierung wurden die Kulturschalen für 16 h im 37°C warmen Brutschrank belassen, dann mit Formalinlösung fixiert und die apoptotischen Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt.

Verwendete Lösungen:

Locke's(+)-Medium

NaCl	4,495 g
Glukose	0,9 g
HEPES	0,595 g
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,169 g
KCl	0,208 g
$NaHCO_3$	0,501 g
$MgCl_2$ x 6 H_2O	0,102 g
Phenolrot	5 mg
Gentamicin	5 mg
H_2O	ad 500 ml
pH 7,2 (eingestellt mit HCl)	

Locke's(-)-Medium

NaCl	4,495 g
HEPES	0,595 g
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,169 g
KCl	0,208 g
$NaHCO_3$	0,501 g
$MgCl_2$ x 6 H_2O	0,102 g
Phenolrot	5 mg
Gentamicin	5 mg
H_2O	ad 500 ml
pH 7,2 (eingestellt mit HCl)	

2.9 Bestimmung der neuronalen Apoptose

Als ein lipophiler kationischer Fluoreszenzfarbstoff ist Hoechst 33258 in der Lage, Zellmembranen sowohl von intakten als auch von apoptotisch geschädigten Zellen zu durchdringen und sich im Zellkern verstärkt an AT-reiche Sequenzen der DNA anzulagern (Latt und Wohlleb, 1975; Latt und Stetten, 1976; Araki *et al.,* 1985). Aufgrund dieser Bindung lässt sich unter dem Fluoreszenzmikroskop (Exzitationsmaximum 352 nm, Emissionsmaximum 461 nm) eine blaue Färbung der Nuclei beobachten. Aufgrund der morphologischen Besonderheiten lassen sich apoptotische Zellen mit ihrem geschrumpften oder fragmentierten Zellkern und kondensiertem Chromatin deutlich von gesunden Zellen mit intaktem Nucleus unterscheiden.

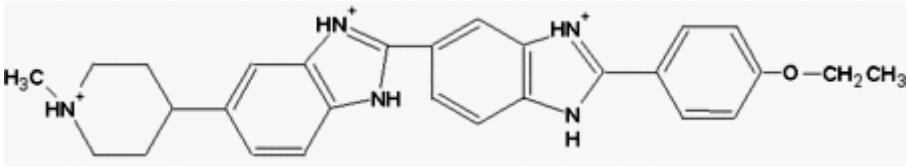


Abbildung 2.1: Strukturformel von Hoechst 33258

(Quelle: www.sigmaaldrich.com)

Der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff ging eine 20-minütige Fixierung mit Formalinlösung voraus. Danach wurden die Zellen mit je 1 ml einer Lösung von Hoechst 33258 in Methanol (10 µg/ml) bedeckt und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Färbelösung wurden die Kulturschalen mit 2 ml PBS befüllt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dabei wurden pro Schale jeweils 9 zufällig ausgewählte Bereiche mit insgesamt min 300 Nuclei erfasst und das Verhältnis der apototischen zu gesunden Zellen ermittelt.
Die Kontrollgruppen unterlagen den selben Behandlungsschritten, wurden aber ausschließlich mit Staurosporin-freiem Medium behandelt. Die Auswertung erfolgte ohne Kenntnis der Behandlung.

PBS

KH_2PO_4	0,144 g
Na_2PO_4	0,526 g
NaCl	9,0 g
H_2O	ad 1000 ml

Formalinlösung

NaH_2PO_4	1,88 g
Na_2HPO_4	14,24 g
Formalin	100 ml
H_2O	ad 1000 ml

2.10 Proteinbestimmung

2.10.1 Proteinextraktion aus hippokampalen Primärkulturen

Für die Proteinextraktion wurden die Neuronenkulturen nach der Behandlung einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers in eiskaltem Homogenisierungspuffer gesammelt. Zum Aufschließen der Zellen wurde die Zellsuspension 5 sec mit Ultraschall behandelt, anschließend bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Lysispuffer

Glycerin	1 ml
10% SDS	3 ml
0,5 M Tris (pH 6,8)	2,5 ml
Bidest	2,5 ml
Proteaseinhibitor-Cocktail I	90 µl
Phosphataseinhibitor-Cocktail I	90 µl
Phosphataseinhibitor-Cocktail II	90 µl

2.10.2 Bestimmung der Proteinmenge

Die in den Zelllysaten enthaltenen Proteinmenge wurde nach der BCA-Methode (Smith *et al.,* 1985) mit Hilfe eines entsprechenden Kits photometrisch bestimmt. Dazu wurden je 5 µl des Zellextraktes in 95 µl PBS verdünnt und BSA-(Bovine Serum Albumine)-Standardlösungen aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml) in Konzentrationen von 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 und 0,5 µg/µl PBS hergestellt. Zu 100 µl der so hergestellten Proteinlösungen wurden jeweils 500 µl der nach Vorschrift hergestellten frischen BCA-Lösung pipettiert und anschließend 30 min bei 60°C inkubiert. Danach wurden jeweils 200 µl der Proben und der Standardlösungen auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und bei 570 nm photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand der erstellten Eichgerade und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet – üblicherweise bewegten sich die Werte zwischen 1 und 5 mg/ml.

BCA-Lösung (Kit)

Reagenz A: Na_2CO_3, $NaHCO_3$, Natriumtartrat, NaOH 0,2 N

Reagenz B: Bicinchoninsäure 4% in H_2O

Reagenz C: $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ 4% in H_2O

gebrauchsfertige Lösung: 24 T Reagenz A
25 T Reagenz B
1 T Reagenz C

Albuminstandard

Rinderserumalbumin (BSA) 2 mg/ml

NaCl 0,9%

NaN_3 0,05%

2.11 SDS-PAGE, Silberfärbung und Western Blot

2.11.1 Herstellung der Polyacrylamidgele

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die SDS-PAGE Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 7,5% verwendet. Die bei der Herstellung verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel (7,5%, für 10 Gele)

Trenngelpuffer (4x)	15 ml
H_2O	30 ml
Rotiphorese® 30	15 ml
TEMED	50 µl
APS (20%)	100 µl

Trenngelpuffer

Tris	182 g
SDS	4 g
H_2O	ad 1000 ml
pH 8,8 (eingestellt mit HCl)	

Sammelgel (für 10 Gele)

Rotiphorese® 30	3 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
H_2O	12 ml
TEMED	30 µl
APS (20%)	60 µl

Sammelgelpuffer

Tris	60,5 g
SDS	4,0 g
H_2O	ad 1000 ml
pH 6,8 (eingestellt mit HCl)	

APS (20%)

APS	200 mg
H_2O	ad 1 ml

2.11.2 SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben wurden Zell-Lysate verwendet, deren Proteingehalt zuvor mit Hilfe eines BCA-Assays bestimmt wurde. Jeweils identische Proteinmengen wurden mit destilliertem Wasser auf 20 µl verdünnt und im Verhältnis 1:5 mit Probenpuffer versetzt. Einer 5-minütigen Denaturierung bei 95°C folgte das Einfüllen der Proben in die Taschen des Polyacrylamid-Gels. Die Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophorese nach dem Molekulargewicht. Die Zuordnung der einzelnen Proteinbanden zu einem bestimmten Molekulargewicht wurde durch Auftragen eines Proteinmarker-Standards ermöglicht.

Probenpuffer

Tris	157,7 mg
SDS	1,0 g
2-Mercaptoethanol	1,0 ml
Glycerin	2,0 ml
Bromphenolblau	6,0 mg

pH 6,8 (eingestellt mit HCl vor Bromphenolblau-Zugabe)

Elektrophorese-Puffer

Tris	3,0 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
H_2O	ad 1000 ml

2.11.3 Silberfärbung

Um die Reinheit des im Arbeitskreis Klumpp exprimierten BDNF und NGF zu überprüfen wurde von den verschieden Chargen jeweils ein Silbergel angefertigt. Dazu wurde zunächst im SDS-Gel eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine durchgeführt, das Gel für mindestens 1 h in der Fixiererlösung inkubiert, anschließend 20 min lang mit 30%igem Ethanol gewaschen und dann 1 min lang imprägniert. Überschüssiges Natriumthiosulfat wurde durch kurzes heftiges Schwenken mit Wasser entfernt. Nach 20-minütiger Inkubation mit Silbernitrat-

Lösung folgte die proteinspezifische Reduktion der Silberionen durch die Entwicklungslösung, die durch eiskalte Fixiererlösung gestoppt wurde.

Fixierlösung

MeOH	500 ml
CH_3COOH	120 ml
H_2O	ad 1000 ml

Imprägnierlösung

HCHO (37%)	100 µl
$Na_2S_2O_3$ (43 g/100 ml)	75 µl
H_2O	150 ml

Silbernitratlösung

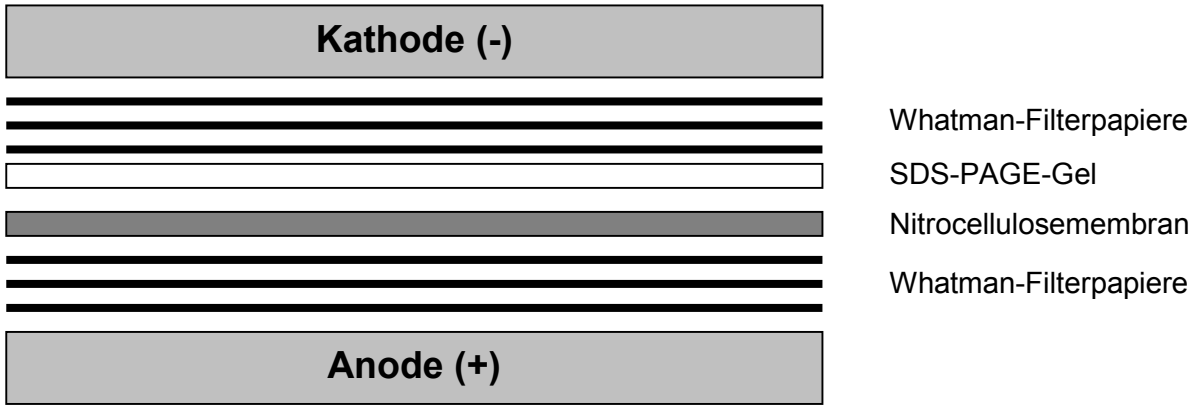
$AgNO_3$ (2 g/l)	150 ml
HCHO (37%)	100 µl

Entwicklungslösung

Na_2CO_3 (60 g/l)	500 ml
HCHO (37%)	250 µl
$Na_2S_2O_3$ (43 g/100 ml)	5 µl

2.11.4 Western Blot

Nachdem die Proteine mittels Elektrophorese aufgetrennt worden waren, wurden sie auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin *et al.,* 1979).



Der eigentliche Transfervorgang wurde innerhalb 1 h mit einer Spannung von 10 V durchgeführt. Anschließend wurde die Membran zur Fixierung und Anfärbung der Proteine für 30 min in Ponceaurot-S-Lösung gelegt, mit TBST gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit Blockpuffer inkubiert.
Nach einem erneuten Waschschritt mit TBST wurde die Membran dann über Nacht mit dem entsprechenden Erst-Antikörper in BSA/TBST bzw. in Blockpulver bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert, am folgenden Tag erneut dreimal mit TBST gewaschen und mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweit-Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Einem weiteren Waschschritt folgte die einminütige Inkubation mit ECL-(Enhanced Chemoluminescence)-Lösung, wodurch es möglich war, die spezifischen Signale in einer Dunkelkammer auf einen Kodak-Film zu übertragen. Die Exposition variierte zwischen 2 min und 1 h, je nach Stärke der Signale. Schließlich wurde der Film entwickelt, gewaschen, fixiert und getrocknet.

Ponceaurot-S-Lösung

Ponceau-S rot	2 g
Trichloressigsäure	15 g
H_2O	ad 1000 ml

Transferpuffer

Tris	3,027 g
Glycin	14, 4 g
Methanol	100 ml
H_2O	ad 1000 ml

TBST

Tris	1,211 g
NaCl	8,765 g
Tween 20	1 ml
H_2O	ad 1000 ml
pH 7,5 (eingestellt mit HCl)	

Blockpuffer (5% Magermilch/TBST)

Magermilchpulver	1 g
TBST	20 ml

Protein	Antikörper aus	Verdünnung	in
α-Tubulin	Maus	1:2500	5% Magermilch/TBST
BDNF	Kaninchen	1:500	5% Magermilch/TBST
NGF	Kaninchen	1:1000	5% Magermilch/TBST
Phospho-Akt	Kaninchen	1:1000	5% BSA/TBST
Phospho-ERK 1/2	Kaninchen	1:1500	5% BSA/TBST
Phospho-Pan-Trk	Kaninchen	1:100	5% BSA/TBST
TrkA	Kaninchen	1:1000	5% Magermilch/TBST

Tabelle 2-5: Verwendete Erst-Antikörper

Erst-AK aus	Zweit-AK	Verdünnung	in
Kaninchen	Anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert	1:2500	5% Magermilch/TBST
Maus	Anti-Maus IgG HRP-konjugiert	1:2500	5% Magermilch/TBST

Tabelle 2-6: Verwendete Zweit-Antikörper

2.12 Immunozytochemie

Bei der Präparation der hippokampalen Primärkultur wurde für diesen Versuch die Zellsuspension in Falcon® Easy Grip™ Kulturschalen (ø 35 mm) mit Deckgläschen ausgesät. Am siebten Kulturtag wurden die Zellen mit Formalinlösung 30 min lang fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellwände für 5 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS behandelt. Nach erneuten drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellkulturen 30 min mit Blockpuffer (PBS mit 5% Ziegenserum) bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Erst-Antikörper (in Blockpuffer) konnte über Nacht bei 4°C einwirken. Die Verdünnung betrug beim NeuN-Antikörper 1:100 (in Blockpuffer), bei dem GFAP-Antikörper 1:300 (in Blockpuffer). Es folgte ein weiterer Waschschritt, nach dem der

biotinylierte anti-Maus-Antikörper (in Blockpuffer) für 90 min aufgetragen wurde. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte standardmäßig durch 20-minütiges Einwirken der Hoechst 33258-Lösung (siehe 2.9) bei Raumtemperatur. Nach Entfernen der überschüssigen Hoechstlösung durch Waschen mit PBS folgte eine 45-minütige Behandlung mit einer Fluoroisothiocyanat (FITC)-Avidin-Lösung (1:200 in PBS) unter Lichtschutz, die die immunozytochemische Detektion ermöglichte. Es wurde wiederum mit PBS gewaschen, die Deckgläschen aus den Kulturschalen mittels Pinzette auf einen Objektträger übertragen und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.
Die Dokumentation und Auswertung der immunozytochemischen Färbung wurde mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskop mit einem 40x Immersionsöl-Objektiv einer Anregungswellenlänge von 494 nm und einer Emissionswellenlänge von 518 nm durchgeführt.
Um die Immunoreaktivität zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen vergleichen zu können, wurde innerhalb eines Versuches die Laser- und Detektorintensität nicht verändert.

2.13 Test auf bakterielle Endotoxine

Die Untersuchung der NGF-Proteinlösung auf bakterielle Endotoxine erfolgte mit Hilfe des LAL-Tests, der laut Hersteller (Cape Cod) eine Empfindlichkeit von 0,03 Endotoxin-Einheiten pro ml aufwies. Hierfür wurde die Wachstumsfaktor-Lösung zunächst 1:10 mit pyrogenfreiem Wasser verdünnt, 200 µl der Verdünnung unter sterilen Bedingungen in die Einzelteströhrchen pipettiert und diese für 1 h erschütterungsfrei im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Genauso wurde mit der Negativ-Kontrolle (nur pyrogenfreies Wasser), mit der Positiv-Kontrolle (Standard-Endotoxin mit pyrogenfreiem Wasser) und einer Positiv-Produkt-Kontrolle (zehnfache Verdünnung der Wachstumsfaktorlösung mit Standard-Endotoxin) verfahren. Nach Ende der vorgeschriebenen Inkubationszeit wurden die Teströhrchen dem Wasserbad entnommen und sofort in einer fließenden Bewegung um 180° gedreht. Konnte die Bildung eines festen Gels festgestellt werden, wurde der Nachweis als positiv gewertet und die Anwesenheit von Endotoxinen als gegeben postuliert.

2.14 Fokale zerebrale Ischämie an der Maus

Die *in-vivo*-Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Junker nach einer modifizierten Methode von Welsh *et al*. (1987) durchgeführt. Verwendet wurden männliche NMRI-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 25-30 g.

2.14.1 Operationstechnik

Zu Beginn der Operation wurden die Tiere mit 2,2,2-Tribromethanol (600 mg/kg Körpergewicht) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Bis zum Eintritt der Narkose vergingen zwischen 1 und 2 min, die Narkose selber dauerte 30-40 min an. Die Narkotisierung des Tieres wurde durch einen leichten Schmerzreiz in der Hinterpfote überprüft. Erfolgte hierauf keine Reaktion mehr, wurden die Augen der Maus mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe bedeckt, um ein Austrocknen der Kornea zu verhindern. Des weiteren wurde ein Fieberthermometer rektal eingeführt, um während der gesamten Dauer der Operation die Körpertemperatur zu kontrollieren und mittels einer Infrarotlampe auf 37±1°C zu halten. Sowohl das Operationsbesteck als auch die Maus wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert, um weitestgehende aseptische Bedingungen zu gewährleisten und einer Infektion vorzubeugen. Zunächst wurde eine ca. 1,5 cm lange Öffnung in die Kopfhaut der Tiere geschnitten und an der zuvor markierten Position ein Loch in die Schädeldecke gebohrt. Als Koordinaten wurden verwendet: Bregma -0,02 cm (posterior), +0,12 cm (lateral) und -0,2 cm (ventral ab Duralevel). Mittels einer Glas-Mikroliterspritze wurde über einen Zeitraum von 5 min kontrolliert ein Volumen von 5 µl stereotaktisch in den rechten lateralen Ventrikel injiziert.

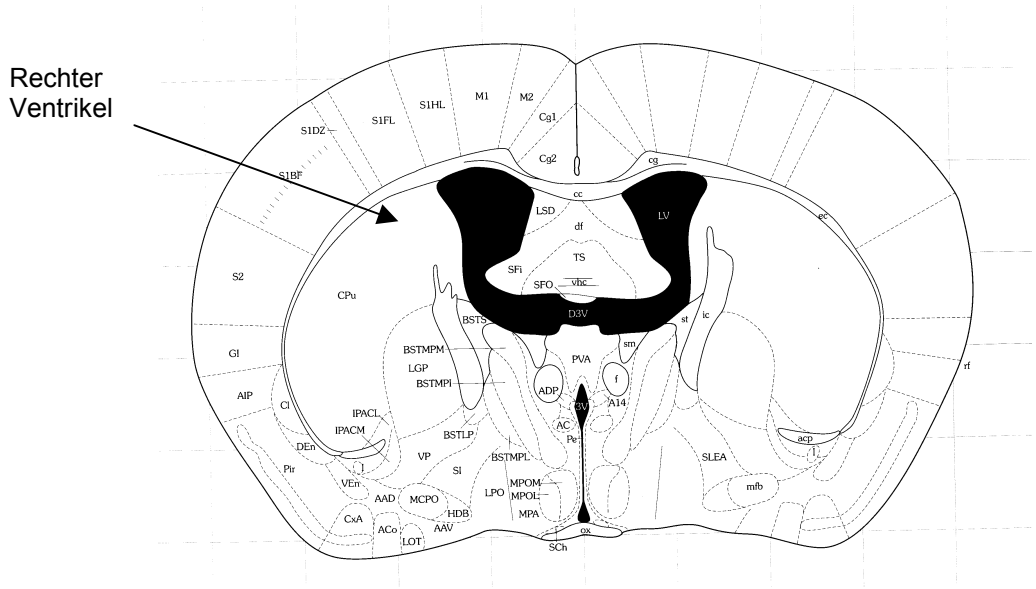


Abb. 2-2: Koronaler Schnitt durch das Gehirn der Maus

Rechter und linker Ventrikel sind schwarz hervorgehoben (aus Paxinos und Franklin, 2000)

Anschließend wurde die Nadel weitere 5 min am Injektionsort belassen und erst dann über eine Zeitspanne von 1,5 min langsam aus dem Bohrloch entfernt, um das eventuelle Zurückströmen der injizierten Lösung in den Stichkanal zu minimieren. Die Inzision der Kopfhaut wurde mit einer einfachen Wundnaht geschlossen.

Für die Okklusion der Arteria cerebri media (MCA) wurden die Mäuse in Rechtsseitenlage positioniert und zwischen linker Orbita und Auricula ein vertikaler ca. 15 mm langer Schnitt angefertigt. Die Haut wurde mit Klebestreifen zur Seite gespannt und die Glandula parotis mit einer Thermokauterpinzette entfernt. Ebenso wurde der Musculus temporalis von seinem Ursprung am Os temporale abgesetzt.

Für die folgenden Schritte wurde ein Operationsmikroskop benötigt. In unmittelbarer Nähe des Foramen ovale wurde mittels eines Feinbohrers die Schädeldecke derart aufgebohrt, dass eine 4 mm^2 kreisrunde Öffnung direkt über der MCA entstand.

Um die darunter liegenden Gewebeschichten vor Überhitzung zu schützen, wurde während des Bohrvorgangs mit physiologischer Kochsalzlösung gekühlt. Das trepanierte Kochenstück wurde vorsichtig mit einer Pinzette zur Seite geklappt und die darunter liegende Dura mater entfernt, so dass die Y-förmig verlaufende MCA gut erkennbar war. Sie wurde einmal kaudal der Verzweigung und jeweils an beiden Seitenästen mit der Thermokauterpinzette irreversibel koaguliert. Nachdem die Haut über der Operationsstelle wieder zusammen genäht worden war, wurde das Tier zur Beobachtung für 2 h in einen Käfig unter eine Wärmelampe gelegt.

2.14.2 Perfusion mit Neutralrot

Zwei Tage nach der Operation wurden die Mäuse erneut durch Injektion von 2,2,2-Tribromethanol in Narkose versetzt. Es folgte eine intraperitoneale Injektion von 0,5 ml einer 1%igen Neutralrotlösung (in physiologischer Kochsalzlösung) und die Verteilung des Farbstoffes im gesamten Blutkreislauf des Tieres. An nicht von Fell bedeckten Körperstellen war dies gut an der Rotfärbung kleiner Blutgefäße zu beobachten. Eine halbe Stunde nach Injektion des Farbstoffes wurde die Maus getötet und das Gehirn entnommen.

2.14.3 Entnahme des Gehirns

Nach der für die Verteilung des Farbstoffs im gesamten Blutkreislauf erforderlichen halben Stunde wurde der Kopf der Maus vom Rumpf abgetrennt, das Fell entfernt und die Schädelkalotte vorsichtig mit einer spitzen Schere bis zum Bregma hin geöffnet. Der Schädelknochen wurde nach beiden Seiten hin aufgeklappt und entfernt. Das Gehirn wurde mit einem gebogenen Spatel sorgsam von seinen basalen Strukturen gelöst, aus der Kalotte entnommen und für mindestens 24 h in Formaldehyd-Phosphatpuffer (pH 7,4) aufbewahrt.

2.14.4 Berechnung der Infarktoberfläche

Die entnommenen Gehirne waren aufgrund der Perfusion mit Neutralrot gleichmäßig rot gefärbt, mit Ausnahme des Versorgungsgebiets der Arteria cerebri media, welches wegen der Okklusion nicht vom Farbstoff erreicht werden konnte. Dieses Areal entsprach der Infarktoberfläche und wurde computergestützt ermittelt. Die Gehirne wurden zur Vermessung unter einer Videokamera positioniert, die das Bild für den Monitor des Auswertungssystems lieferte. Mit dem Cursor wurde das Infarktgebiet manuell eingegrenzt und mit Hilfe des Computers in mm^2 berechnet.

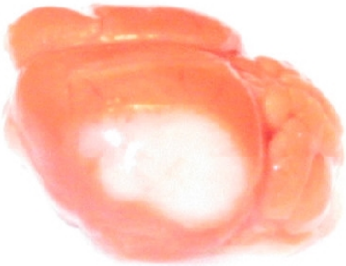


Abb. 2-3: Mit Neutralrot perfundiertes Mäusegehirn

2.14.5 Herstellung und Applikation der Testsubstanzen

Kommerziell erworbenes 2.5S NGF wurde in einer Konzentration von 1 µg/µl in PBS gelöst. Jeweils 5 µl dieser Lösung wurden in den rechten lateralen Ventrikel mit einer Glas-Mikroliterspritze injiziert. Die Kontrollgruppe wurde mit demselben Volumen Vehikel (PBS) behandelt.

2.15 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Phospho-Aminosäuren

2.15.1 Synthese von Phospho-Histidin und Phospho-Lysin

Im Arbeitskreis Klumpp wurde radioaktiv phosphoryliertes NGF und BDNF mit Säure oder Natronlauge behandelt und die Persistenz des radioaktiven Signals überprüft. Es stellte sich heraus, dass das Signal nur nach Lauge-Behandlung bestehen blieb und offensichtlich durch Einwirken der Säure verschwand. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei der phosphorylierten Aminosäure um ein Phospho-Amid oder eine Phospho-Acylgruppe handelt, da diese ebenfalls ein säurelabiles und laugenstabiles Verhalten zeigen (Sickmann und Meyer, 2001). Um diese Frage näher zu beleuchten, sollten Phospho-Aminosäuren dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit radioaktiv markiertem und hydrolysiertem BDNF verglichen werden. Threonin, Tyrosin und Arginin können kommerziell in phosphorylierter Form erworben werden, Lysin und Histidin jedoch aufgrund ihrer chemischen Labilität nicht. Daher mussten diese beiden zunächst nach einer Methode von Wei und Matthews (1991) synthetisiert werden.

Dazu wurden 50 mg Poly-Histidin in 1,5 ml Wasser gelöst und anschließend bis zur Trübung mit Triethylamin versetzt. In kleinen Portionen von 10 µl wurden dann 110 µl Phosphorylchlorid ($POCl_3$) zugesetzt und der pH-Wert zwischen 9,5 und 12,5 mittels NaOH-Zugabe gehalten. Alle Vorgänge fanden unter Rühren und auf Eis statt. Der Reagenzansatz wurde mit Wasser auf ein Endvolumen von 3 ml gebracht und über Nacht gegen 0,1 M NaOH dialysiert. Am nächsten Morgen wurde das Gesamtvolumen ermittelt, eine KOH-Konzentration von 3 M eingestellt und die Lösung für 5 h bei 105°C inkubiert. Das Hydrolysat wurde nach dem Abkühlen um den Faktor 10 mit Wasser verdünnt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Die Synthese des Phospho-Lysins folgte demselben Prinzip. Als Ausgangsstoff wurde hier Poly-Lysin verwendet.

2.15.2 Radioaktive Phosphorylierung von selbst exprimiertem BDNF

Im Arbeitskreis Klumpp exprimiertes BDNF wurde unmittelbar vor Auftragen auf die Kieselgelplatte mit [γ-^{32}P]ATP phosphoryliert.

Phosphorylierungspuffer:

$MgCl_2$	1,5 mM
DTT	15 mM
Tris HCl	375 mM

Phosphorylierungsansatz:

Phosphorylierungspuffer	1 µl
BDNF-Proteinlösung (230 mg/ml)	12,5 µl
[γ-^{32}P]ATP	1,25 µl

Der Phosphorylierungsansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert und überschüssiges [γ-^{32}P]ATP durch Zentrifugation in Centriseps abgetrennt (2 x 2 min bei 2900 rpm).
Die Hydrolyse des radioaktiv markiertem BDNF wurde durch 3-stündige Inkubation mit 3 M KOH bei 95°C erreicht. Anschließend wurde der Ansatz mit 37%iger Salzsäure neutralisiert.

2.15.3 Dünnschichtchromatographische Trennung der Phospho-Aminosäuren

Jeweils 0,5 µl der Lösungen (2 mg/ml) der kommzerziell erworbenen Phospho-Aminosäuren Phospho-Threonin, -Tyrosin, -Serin, -Arginin und der selbst hergestellten Phospho-Lysin- und Phospho-Histidinlösungen wurden auf eine Kieselgel-Platte aufgetragen und mit einem Fön gut getrocknet. Auf die getrockneten Aminosäure-Flecken wurde 6 x 1 µl des Phospho-BDNF-Hydrolysates aufgetragen und auch jeweils gut getrocknet. Die Kieselgelplatte wurde in eine DC-Kammer, die 30 min zuvor mit einer Mischung aus 68 Teilen Ethanol (85%) und 32 Teilen Ammoniaklösung (25%) 3 cm hoch befüllt wurde, 4 h erschütterungsfrei gestellt und anschließend getrocknet. Über Nacht wurde eine *Phospho-Imaging*-Platte aufgelegt

und am nächsten Tag die Signale des radioaktiv markierten BDNFs mittels *Phospho-Imager* detektiert. Erst dann wurden die aufgetrennten Phospho-Aminosäuren durch Aufsprühen einer 0,1%igen Ninhydrin-Lösung sichtbar gemacht und mit dem Laufverhalten der radioaktiven Markierungen verglichen.

2.16 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Excel und WinSTAT heran gezogen. Zum Vergleich der Zellkulturexperimente wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) kombiniert mit dem Scheffé-Test durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse der MCAO erfolgte durch Vergleich mittels t-Test nach Student. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (S.D.) angegeben. Ein Signifikanzniveau von $p<0,05$ wurde als signifikant betrachtet.
Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde wie folgt dargestellt:

Irrtumswahrscheinlichkeit	**Symbol**
$p<0,05$	*
$p<0,01$	**
$p<0,001$	***

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zellkultur

Zur Überprüfung und Charakterisierung der verwendeten Zellkultursysteme wurden einerseits die Neuronenanzahl und andererseits der Anteil an Astrozyten in der verwendeten neonatalen Primärkultur bestimmt.

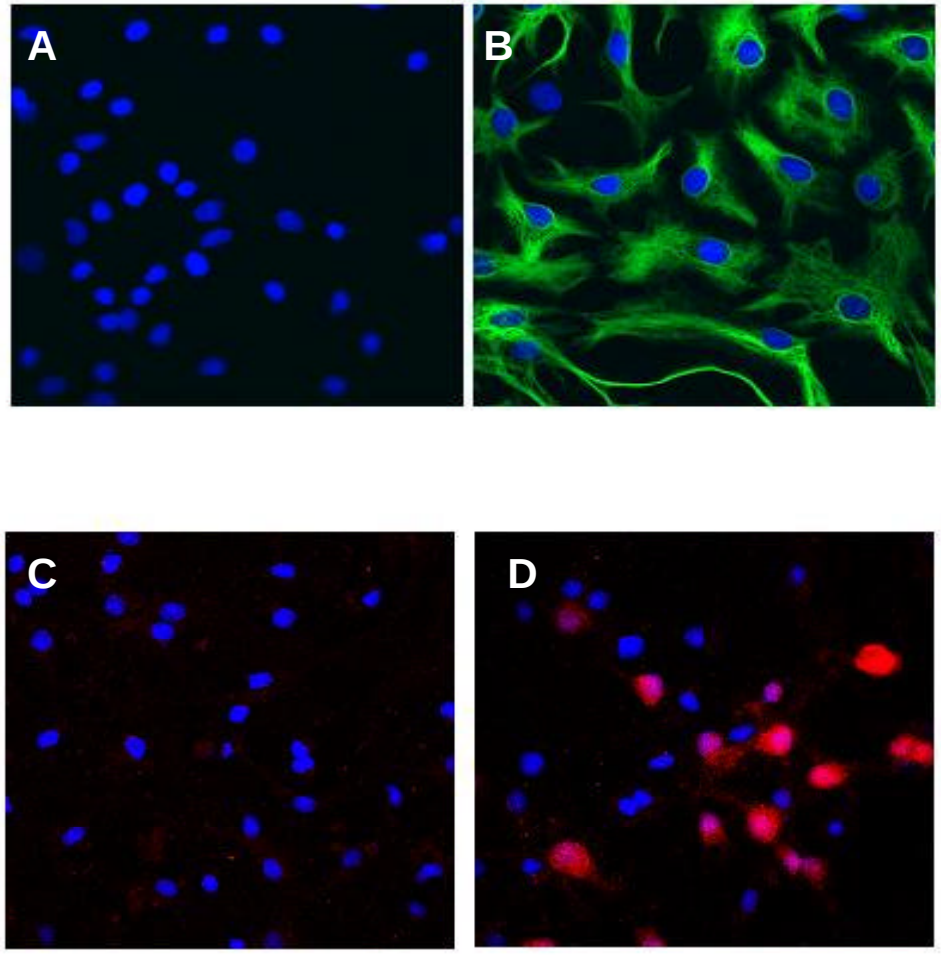


Abb. 3-1: Immunozytochemische Überprüfung des Neuronenanteils in der neonatalen hippokampalen Primärkultur

Hippokampale Primärkulturen neugeborener max. 24 h alter Ratten wurden am 7. Kulturtag fixiert und mit dem Astrozytenmarker GFAP (Verdünnung 1:300) oder dem neuronenspezifischen Marker NeuN (Verdünnung 1:100) inkubiert. A und C stellen Zellen dar, die ohne Erst-Antikörper und nur mit Hoechst 33258 inkubiert wurden, B zeigt mit GFAP behandelte Kulturen und D mit NeuN gefärbte Zellen.

Das Auszählen der gefärbten Neurone bzw. Astrozyten ergab einen Neuronenanteil von ca. 50%, es handelt sich also um eine neuronale Mischkultur. Im Gegensatz hierzu steht die embryonale Primärkultur, die eine relativ reine Neuronenkultur mit einem Anteil von 95% und nur 5% Astrozyten darstellt (Daten nicht gezeigt).

3.2 Neuroprotektion der Neurotrophine NGF und BDNF

3.2.1 Neuroprotektion von NGF

3.2.1.1 NGF schützt konzentrationsabhängig hippokampale Primärkulturen vor Staurosporin-induzierter Apoptose

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag zunächst für 1 h mit NGF im Konzentrationsbereich 1 ng/ml bis 1 µg/ml inkubiert, dann mit Staurosporin in der Konzentration 200 nM behandelt und 20 h später fixiert. In den mit Staurosporin behandelten Kulturschalen ließ sich eine massive Schädigung gegenüber der Kontrollgruppe beobachten, was sich am Anteil der apoptotischen Kerne zeigt, der von 20 % auf 35 % ansteigt.

Die mit NGF vorbehandelten Gruppen zeigten ab einer Konzentration von 5 ng/ml eine signifikante Reduktion der Apoptoserate; eine Steigerung der Neuroprotektion ließ sich ab einer Konzentration von 200 ng/ml nicht mehr feststellen.

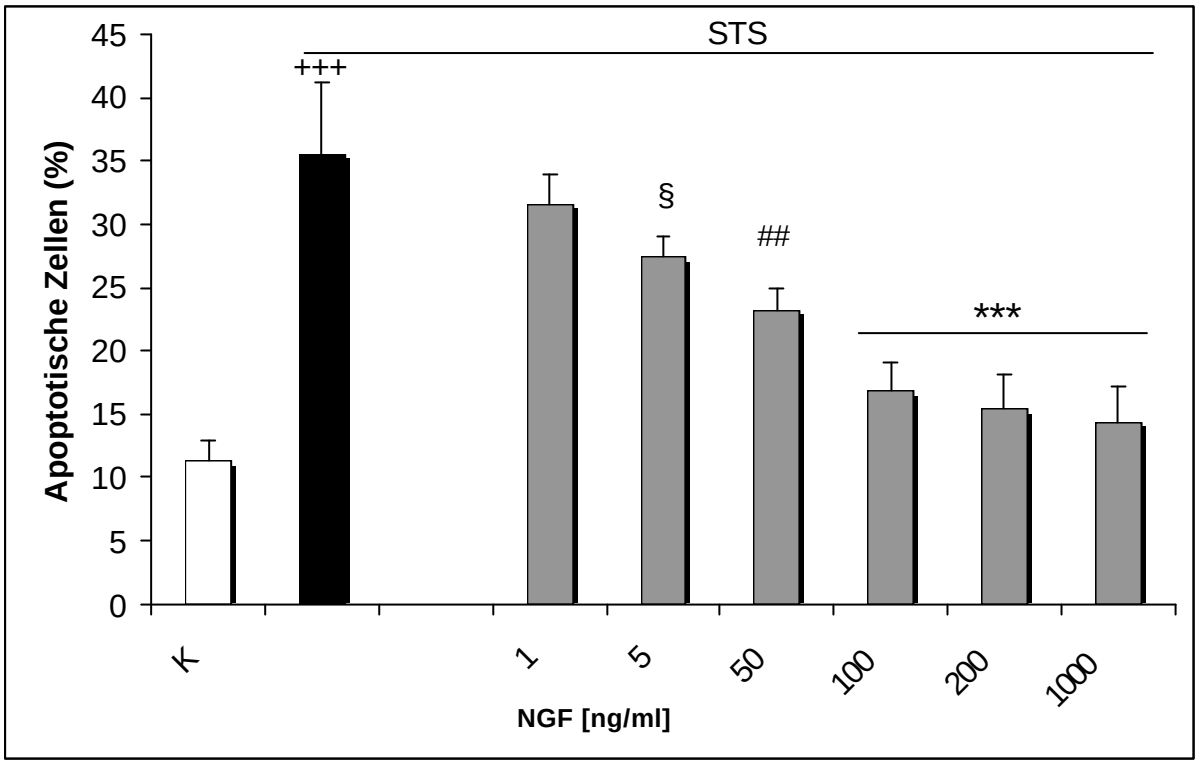


Abb. 3-2: NGF wirkt konzentrationsabhängig neuroprotektiv gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose an hippokampalen neonatalen Primärkulturen

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag 1 h vor der Behandlung mit 200 nM Staurosporin (STS) mit NGF in den Konzentrationen von 1 ng/ml bis 1000 ng/ml behandelt. 20 h später wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und das Verhältnis der apoptotischen zu den gesunden Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur Kontrolle ohne NGF-Behandlung (K); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle (ohne NGF-Behandlung); $^{\#\#}p<0,01$ im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle; $^{\S}p<0,05$ im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle (Varianzkontrolle, Scheffétest).

3.2.1.2 NGF schützt konzentrationsabhängig kortikale Primärkulturen vor Staurosporin-induzierter Apoptose

Auch an kortikalen Primärkulturen neonataler Ratten konnte der konzentrationsabhängige Effekt von NGF beobachtet werden. Die Versuchsbedingungen entsprachen exakt der Behandlung der hippokampalen Neuronenkultur.

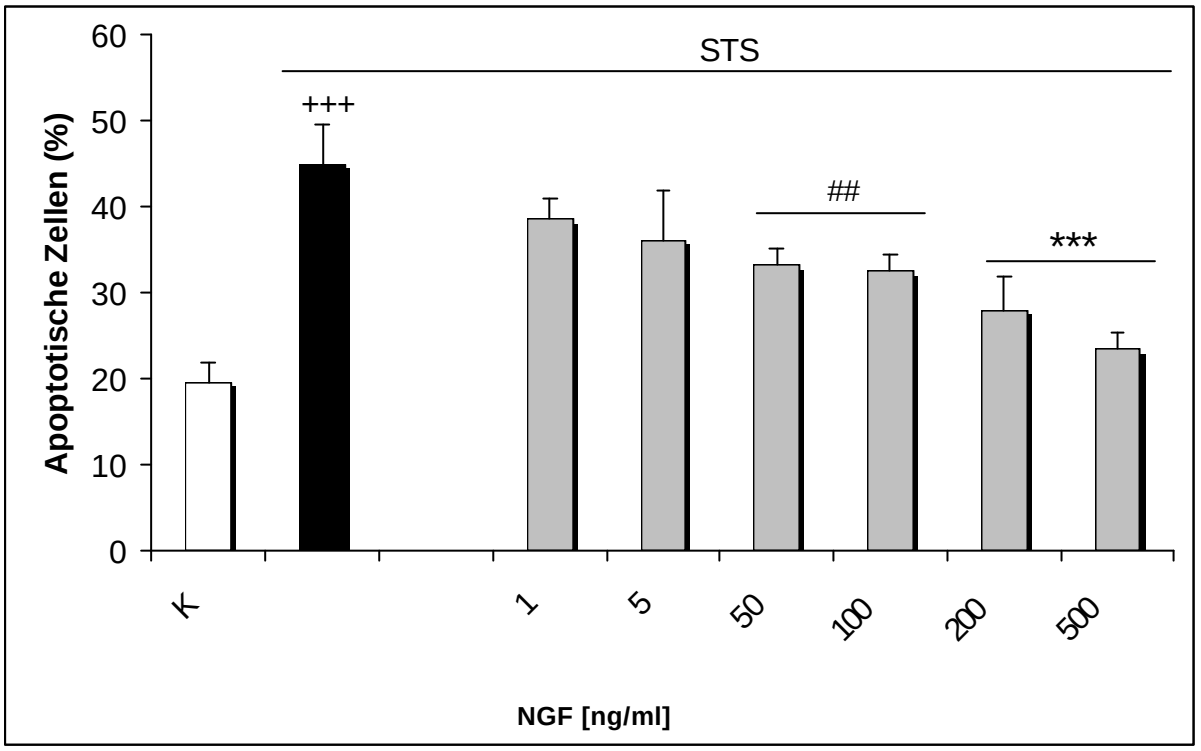


Abb. 3-3: NGF wirkt konzentrationsabhängig neuroprotektiv gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose an kortikalen neonatalen Primärkulturen

Kortikale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag 1 h vor der Behandlung mit 200 nM Staurosporin (STS) mit NGF in den Konzentrationen von 1 ng/ml bis 500 ng/ml behandelt. 20 h später wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und das Verhältnis der apoptotischen zu den gesunden Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle ohne NGF-Behandlung (K); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle (ohne NGF-Behandlung); $^{\#\#}$p<0,01 im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle (Varianzkontrolle, Scheffétest).

NGF war in der Lage, auch in kortikalen Primärkulturen neonataler Ratten seine neuroprotektive Wirkung ab einer Konzentration von 50 ng/ml zu vermitteln.

3.2.2 Neuroprotektion von BDNF

3.2.2.1 BDNF wirkt neuroprotektiv bei Staurosporin-induzierter Apoptose an hippokampalen Primärkulturen

In Anlehnung an die Ergebnisse mit NGF wurde auch BDNF im Hinblick auf neuroprotektive Effekte im Staurosporin-Modell getestet.

Auch hier wurde der Wachstumsfaktor 1 h vor Staurosporinzugabe in einem Konzentrationsbereich von 5-500 ng/ml direkt in die Kulturschalen pipettiert und war während der 20-stündigen Inkubation mit 200 nM Staurosporin anwesend.

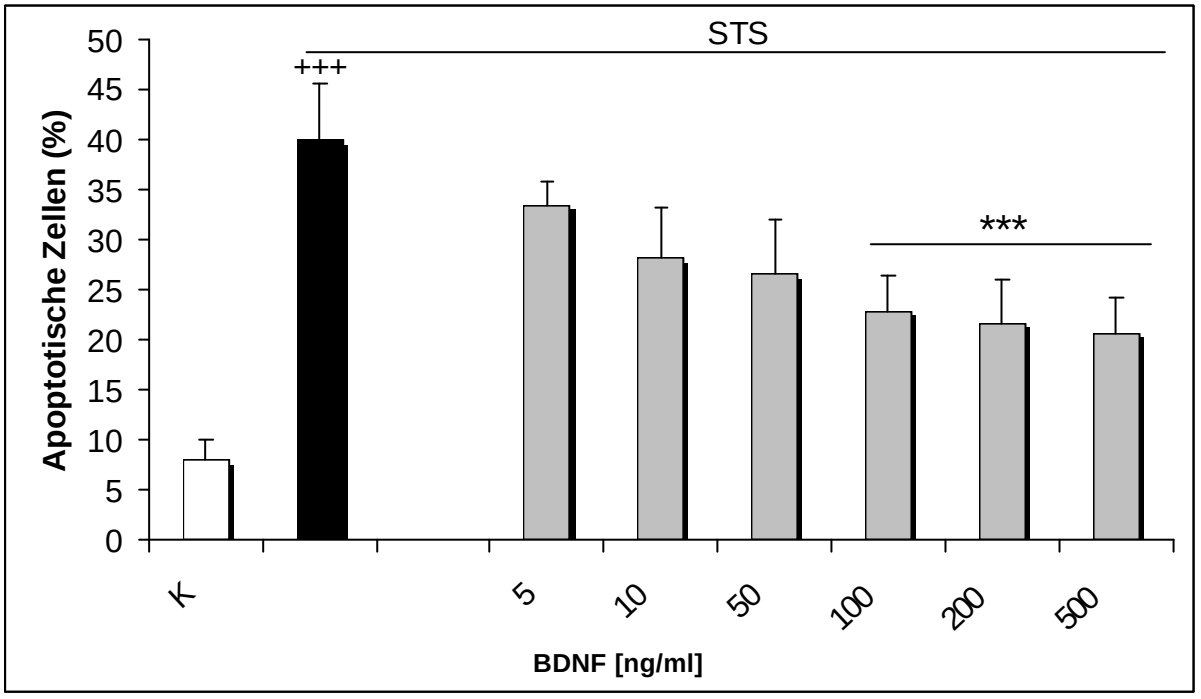


Abb. 3-4: BDNF wirkt konzentrationsabhängig neuroprotektiv gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose an hippokampalen neonatalen Primärkulturen

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag 1 h vor der Behandlung mit 200 nM Staurosporin (STS) mit BDNF in den Konzentrationen von 5 ng/ml bis 500 ng/ml behandelt. 20 h später wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und das Verhältnis der apoptotischen zu den gesunden Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle ohne BDNF-Behandlung (K); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle (ohne BDNF-Behandlung); (Varianzkontrolle, Scheffétest).

Die Auszählung der apoptotischen Kerne ergab wie schon bei NGF, dass BDNF ab einer Konzentration von 100 ng/ml eine signifikante Reduktion der Schädigung bewirkt.

3.2.2.2 BDNF wirkt neuroprotektiv bei Staurosporin-induzierter Apoptose an kortikalen Primärkulturen

Auch an kortikalen Primärkulturen neonataler Ratten konnte die konzentrationsabhängige Neuroprotektion durch BDNF-Behandlung beobachtet werden.

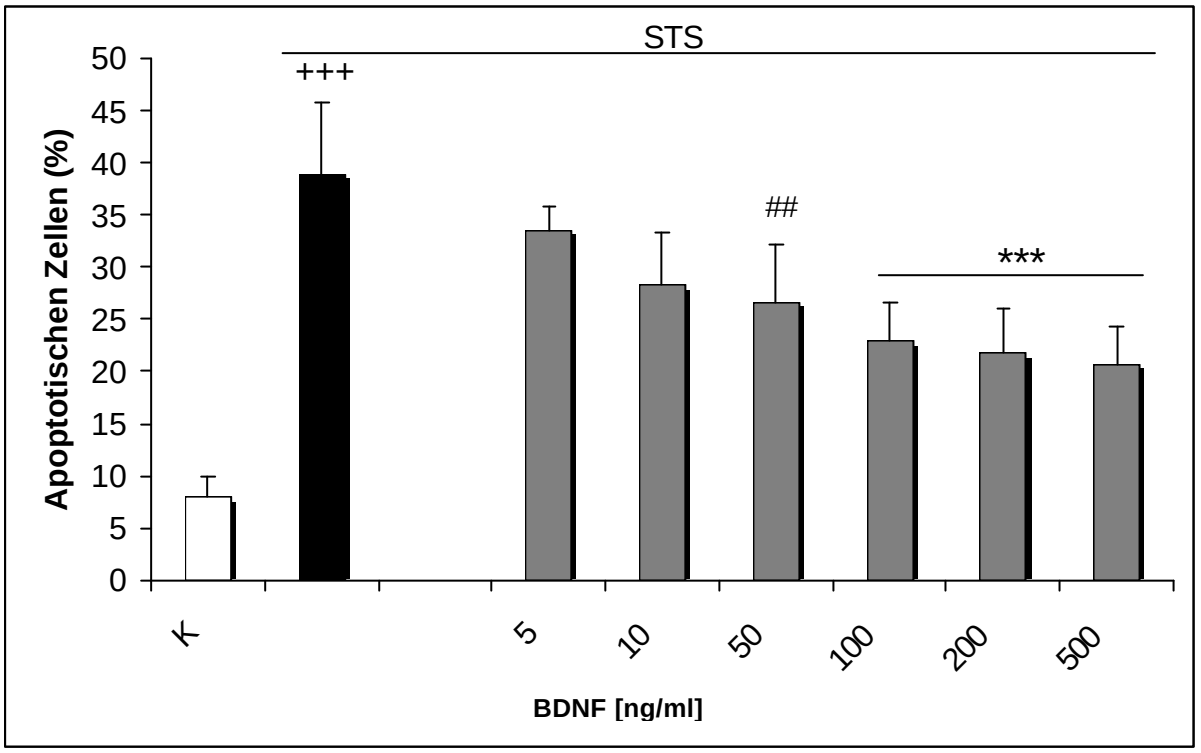


Abb. 3-5: BDNF wirkt konzentrationsabhängig neuroprotektiv gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose an kortikalen neonatalen Primärkulturen

Kortikale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag 1 h vor der Behandlung mit 200 nM Staurosporin (STS) mit BDNF in den Konzentrationen von 5 ng/ml bis 500 ng/ml behandelt. 20 h später wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und das Verhältnis der apoptotischen zu den gesunden Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$<0,001 im Vergleich zur Kontrolle ohne BDNF-Behandlung (K); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle (ohne BDNF-Behandlung); (Varianzkontrolle, Scheffétest).

Auch bei einer Behandlung von kortikalen Primärkulturen zeigte BDNF ab einer Konzentration von 50 ng/ml eine deutlich neuroprotektive Wirkung vor Staurosporin-induzierter Apoptose.

3.2.3 Neuroprotektiver Effekt von NGF und BDNF im OGD-Modell

Die OGD-Methode verursacht aufgrund eines Sauerstoff- und Glukose-Entzuges eine Schädigung der kultivierten Neurone.

Die neuroprotektiven Effekte der Neurotrophine wurden auch in diesem *in vitro*-Ischämiemodell getestet.

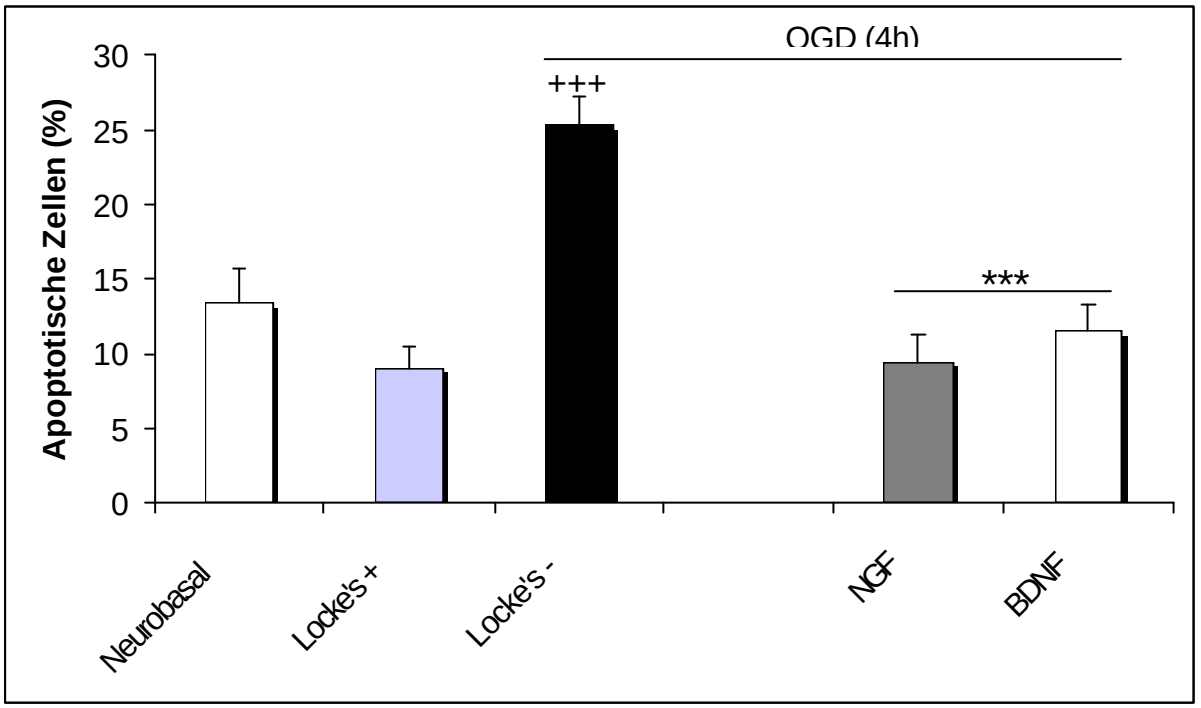


Abb. 3-6: NGF und BDNF schützen neonatale hippokampale Primärkulturen gegen durch Sauerstoff- und Glukose-Entzug ausgelösten Zelltod

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden 1 h vor Beginn des Sauerstoff- und Glukose-Entzugs (OGD) mit je 200 ng NGF oder BDNF pro ml Medium inkubiert. Während der 4-stündigen OGD-Phase waren die Wachstumsfaktoren ebenfalls in dieser Konzentration im glukosefreien Locke's-Medium zugegen. Nach der anschließenden Reoxygenierungsphase von 16 h wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und die apoptotischen Kerne ausgezählt. Angegeben sind die Mittelwerte der apoptotische Zellen in Prozent ± S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ verglichen mit der Locke's(+)-Kontrollgruppe; ***$p<0,001$ im Vergleich zur OGD-Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffétest).

3.2.4 Neuroprotektive Wirkung von intraventrikulär injiziertem NGF nach MCAO

Im *in vivo*-Modell der MCAO sollte der neuroprotektive Effekt von gekauftem NGF validiert werden, um in späteren Versuchen einen Vergleich zu selbst exprimierten Mutanten ziehen zu können. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Junker durchgeführt.

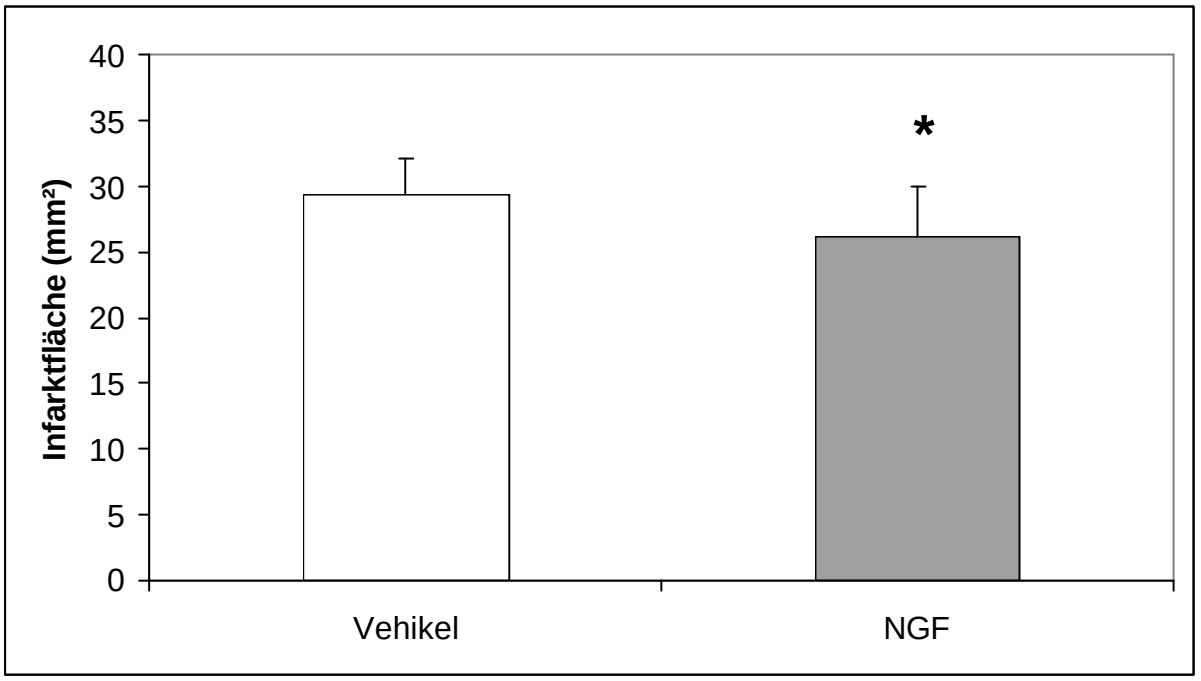


Abb. 3-7: MCAO nach NGF- Injektion

NGF wurde in einer Konzentration von 200 µg/kg Körpergewicht intraventrikulär injiziert, als Vehikel wurde steriles PBS verwendet. 2,5 h nach Injektion wurde die Okklusion der mittleren Zerebralarterie durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ? S.D. der Infarktgröße nach 48 h von 12 Tieren pro Gruppe. *p=0,33 im Vergleich zum Vehikel (t-test, Anova).

Das kommerziell erworbene NGF war in der Lage, das Infarktvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu reduzieren.

3.3 Phosphorylierung von NGF und BDNF

Die Phosphorylierungsversuche, die in der Arbeitsgruppe Klumpp mit radioaktiv markiertem ATP ohne Zusatz von Kinasen durchgeführt wurden, deuteten stark auf

eine Auto-Phosphorylierung der Neurotrophine hin. Auch bei Zusatz von spezifischen Inhibitoren der Proteinkinase A und C waren die Phosphorylierungssignale im Autoradiogramm unverändert stark zu beobachten. Hieraus ergab sich die interessante Fragestellung, wie sich der Effekt der Neuroprotektion in der Zellkultur bei Anwesenheit von Kinase-Inhibitoren verändert.

Hierfür wurden NGF oder BDNF vor der Behandlung in Anwesenheit von Inhibitoren der Proteinkinase A und C phosphoryliert (vgl. 2.6). Es wurden Konzentrationen verwendet, die 10-fach über dem K_i -Wert lagen (Inhibitorfragment Proteinkinase A: 23 nM; Inhibitorfragment Proteinkinase C: 1,5 µM). Nach der üblichen Inkubationsdauer von 15 min bei 37°C wurde die Lösung ohne Abtrennen der Proteinkinase-Inhibitoren in die Zellkultur pipettiert. Nach einer Vorbehandlung von 1 h wurde Apoptose durch Zugabe von 200 nM Staurosporin ausgelöst, die Zellen nach weiteren 20 h fixiert, gefärbt und die apoptotischen Kerne ausgezählt.

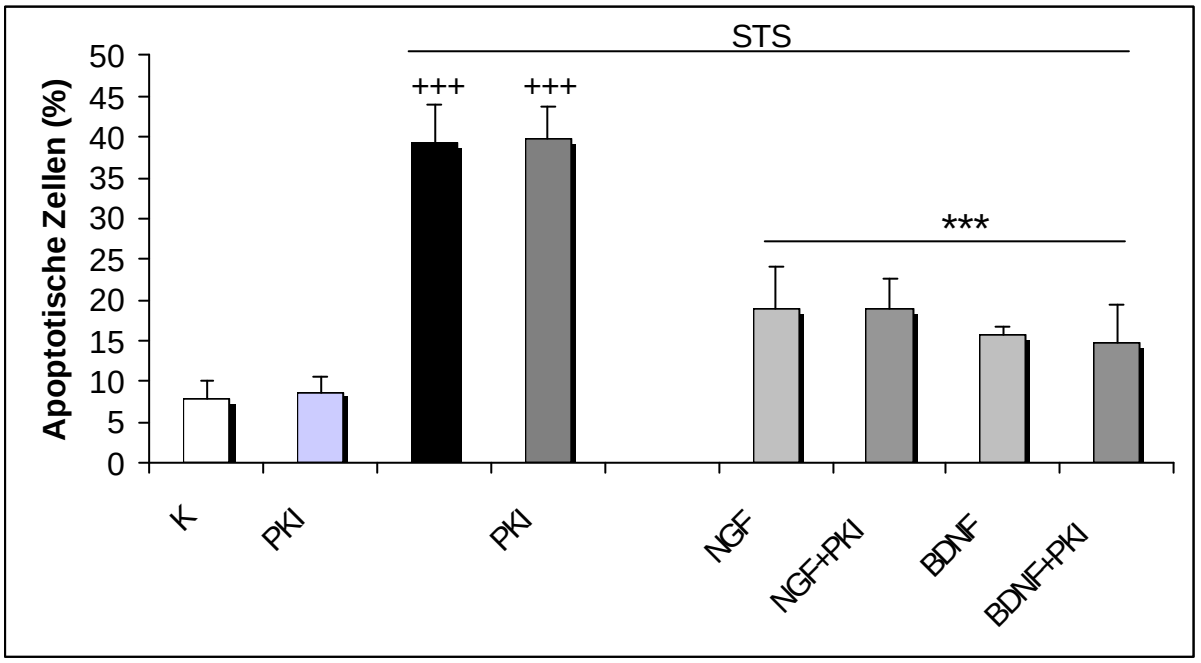


Abb. 3-8: Simultane Behandlung mit Inhibitoren der Proteinkinase A und C (PKI) und Neurotrophinen

NGF und BDNF wurden zunächst in Anwesenheit der Inhibitoren der Proteinkinase A (23 nM) und C (1,5 µM) phosphoryliert und dann 1 h vor Zugabe von Staurosporin (STS; 200 nM) in einer Konzentration von 200 ng/ml auf die hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten am 7. Kulturtag gegeben. Nach 20 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Kerne gezählt. Angegeben sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0{,}001$ im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ohne Staurosporin-Behandlung; ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle (ohne Wachstumsfaktor-Behandlung) (Varianzanalyse, Scheffétest).

Die Auswertung des Zählergebnisses ergab, dass auch in Anwesenheit der Proteinkinase-Inhibitoren der neuroprotektive Effekt von NGF und BDNF den Anteil der apoptotischen Kerne drastisch reduzierte. Diese Befunde zeigten sich auch in Experimenten, in denen die Proteinkinase-Inhibitoren zusammen mit den Wachstumsfaktoren direkt ins Medium der Zellkulturen pipettiert wurden.

3.4 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt der Neurotrophine

Experimente, die im Arbeitskreis Klumpp mit (auto-)phosphoryliertem BDNF bzw. NGF und alkalischer Phosphatase durchgeführt wurden, ließen im Autoradiogramm eine deutliche Abschwächung der Signale erkennen. Dies weist auf eine Dephosphorylierung der Proteine hin. Die Bedeutung dieser Beobachtungen sollte im Hinblick auf den Effekt der Neuroprotektion in der Zellkultur überprüft werden.

3.4.1 Kontrollen zu den Versuchen mit alkalischer Phosphatase

Um auszuschließen, dass alkalische Phosphatase schädigende oder protektive Einflüsse auf die kultivierten Neurone ausübt, wurden entsprechende Kontrollgruppen angelegt und untersucht.

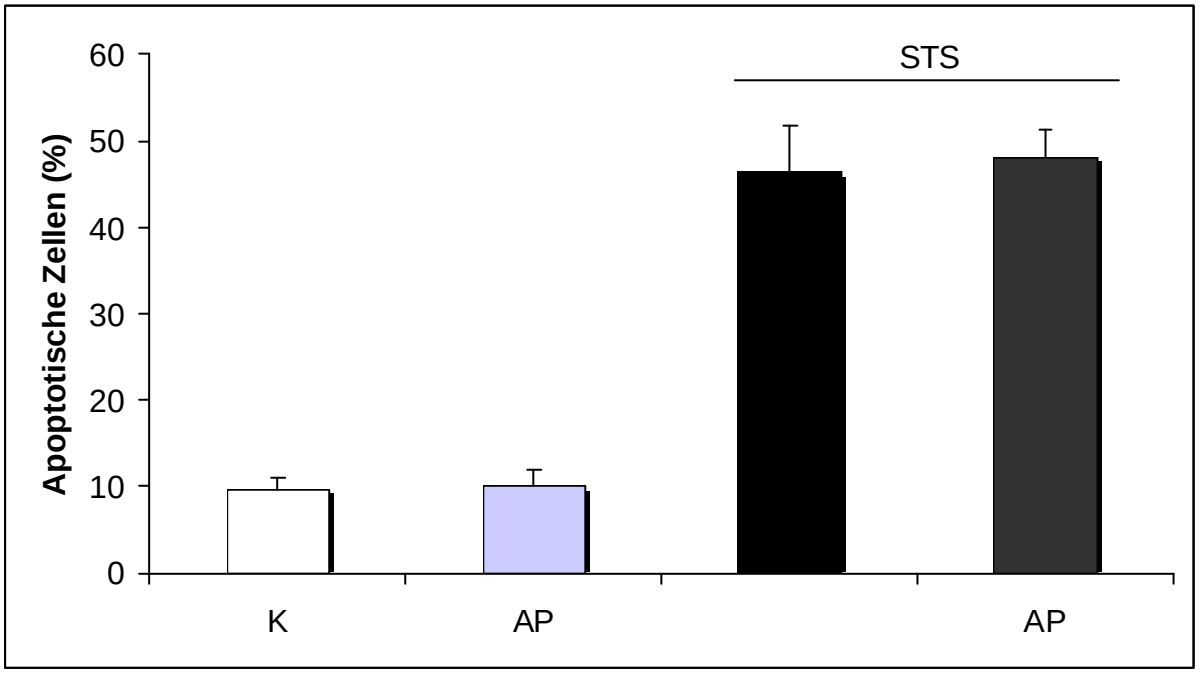


Abb. 3-9: Kontrollversuch zur Wirkung der alkalischen Phosphatase

Alkalische Phosphatase (AP) wurde eine Stunde vor Auslösen der Apoptose durch 200 nM Staurosporin (STS) in einer Konzentration von 800 ng/ml auf die hippokampalen neonatalen Primärkulturen gegeben. 20 h später wurden die Zellen fixiert, gefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe.

Es lässt sich erkennen, dass alkalische Phosphatase weder schädigend noch protektiv auf hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wirkt.

3.4.2 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von NGF

Um die mögliche Bedeutung einer reversiblen Phosphorylierung an den Wachstumsfaktoren zu überprüfen, wurde zeitgleich zu dem schützend wirkenden NGF alkalische Phosphatase in einer Konzentration von 800 ng/ml ins Medium gegeben, 1 h vorinkubiert und anschließend durch Staurosporinzugabe Apoptose induziert. Nach Fixierung, Färben und Auszählen der Hoechst-gefärbten Zellkerne wurde das Verhältnis gesunder zu geschädigten Zellen ermittelt.

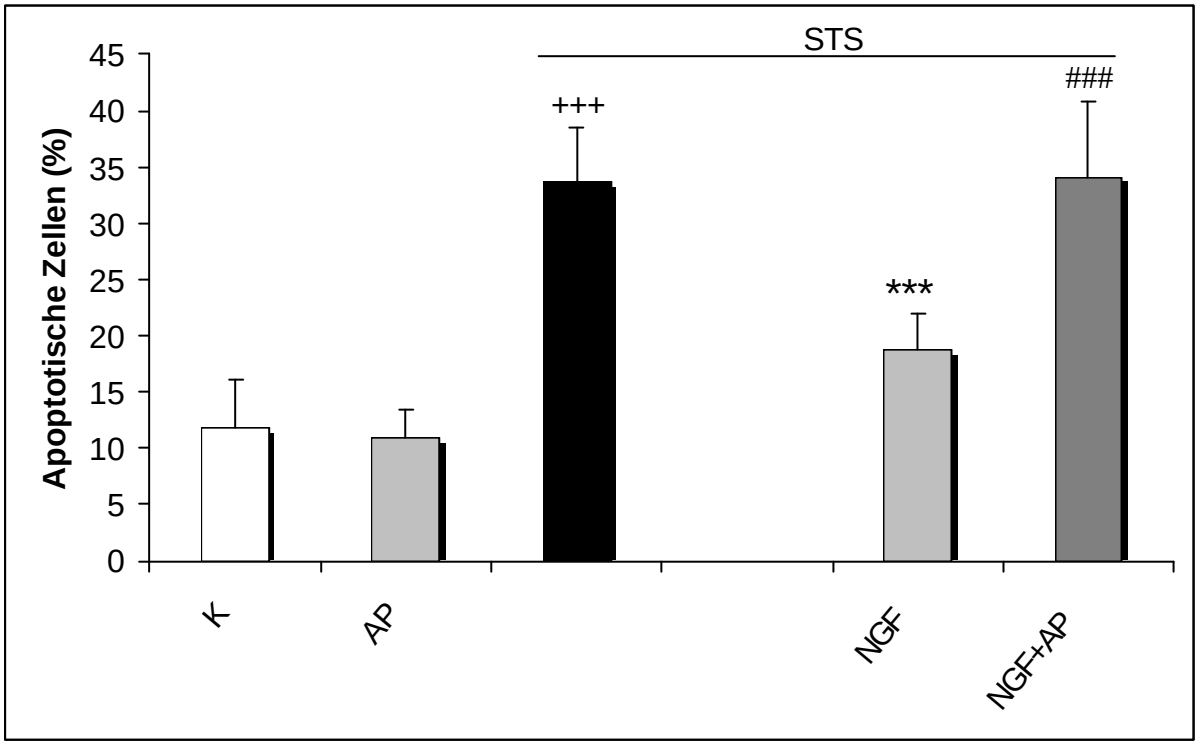


Abb. 3-10: Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von NGF
Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag zur Behandlung herangezogen. Alkalische Phosphatase (AP) wurde zeitgleich zu NGF (200 ng/ml) in einer Konzentration von 800 ng/ml ins Medium gegeben. 1 h später fand die Apoptoseinduktion durch Zugabe von 200 nM Staurosporin (STS) statt, die nach 20 h durch Fixierung und Färbung der hippokampalen Primärkultur beendet wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur STS-Kontrolle (ohne NGF und AP); $^{###}p<0,001$ im Vergleich zur mit NGF und Staurosporin behandelten Gruppe ohne alkalische Phosphatase (Varianzanalyse, Scheffétest).

Die Aufhebung des neuroprotektiven Effektes von NGF nach Staurosporin-induzierter Apoptose durch alkalische Phosphatase konnte sowohl in hippokampalen als auch in kortikalen Primärkulturen neonataler Ratten beobachtet werden.

3.4.3 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von BDNF

Die Behandlung der hippokampalen neonatalen Zellen erfolgte nach dem identischen Prinzip wie bei NGF.

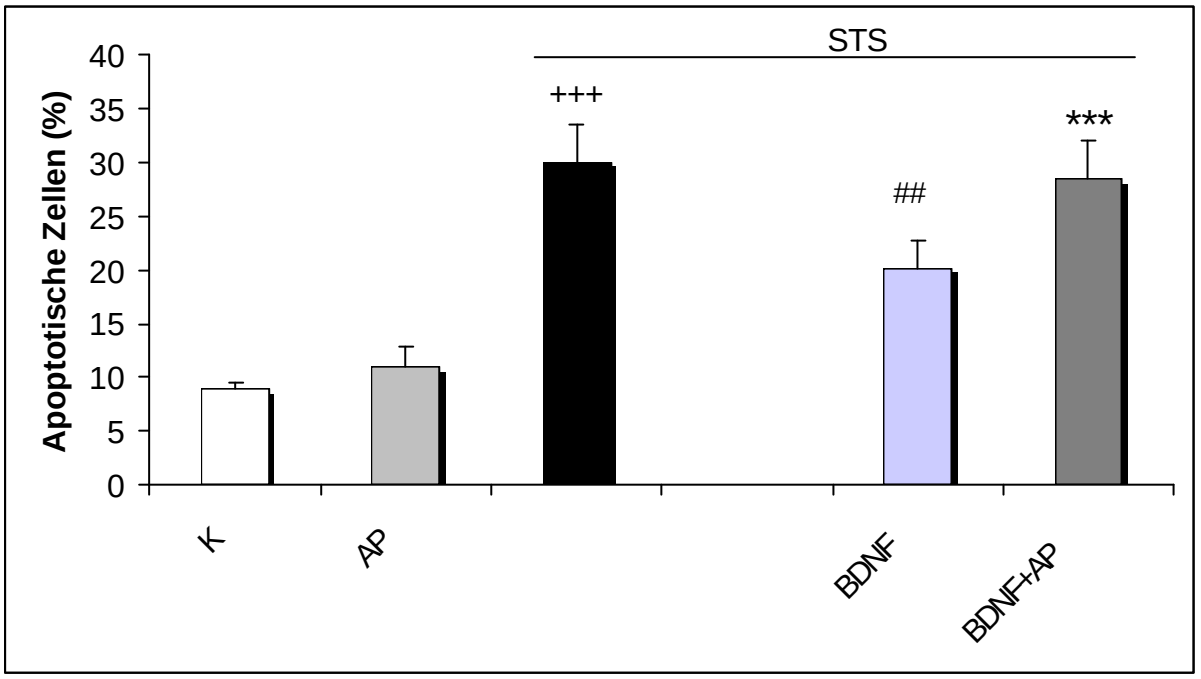


Abb. 3-11: Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von BDNF
Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag zur Behandlung herangezogen. Alkalische Phosphatase (AP) wurde zeitgleich zu BDNF (200 ng/ml) in einer Konzentration von 800 ng/ml ins Medium gegeben. 1 h später fand die Apoptoseinduktion durch Zugabe von 200 nM Staurosporin (STS) statt, die nach 20 h durch Fixierung und Färbung der Zellen beendet wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K); $^{\#\#}$p<0,01 im Vergleich zur STS-Kontrolle (ohne BDNF und AP); ***p<0,001 im Vergleich zur mit BDNF und Staurosporin behandelten Gruppe ohne AP (Varianzanalyse, Scheffétest).

Bei simultaner Behandlung von BDNF und alkalischer Phosphatase konnte, genau wie bei NGF, kein schützender Effekt vor dem apoptotischen Einfluss des Staurosporins nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ließ sich unabhängig davon beobachten, ob die Wachstumsfaktoren vor der Behandlung der Zellen extern mit

bzw. ohne alkalische Phosphatase inkubiert wurden oder ob sie zeitgleich direkt ins Medium zugegeben wurden.

3.4.4 Überprüfung des Einflusses von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von NGF und BDNF im OGD-Modell

Die Ergebnisse, die aus den Versuchen an hippokampalen und kortikalen Primärkulturen neonataler Ratten mit NGF bzw. BDNF und alkalischer Phosphatase resultierten, sollten auch im Modell des durch Sauerstoff- und Glukose-Entzug ausgelösten Zelltodes überprüft werden.

Hierfür wurden hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten am siebten Kulturtag mit NGF bzw. BDNF (je 200 ng/ml) und alkalischer Phosphatase (800 ng/ml) behandelt. Nach 1 h Vorinkubation wurde das Neurobasal? -Medium mit den enthaltenen Substanzen abgenommen und gesammelt. Nach einmaligem Waschen mit Locke's(-)-Medium wurden die Zellen mit je 1 ml des glukosefreien Mediums bedeckt, in dem die entsprechenden Konzentrationen der Neurotrophine und alkalischer Phosphatase enthalten waren. Nach 4-stündigem Entzug von Sauerstoff und Glukose und 16-stündiger Reoxygenierungszeit war ein Anstieg der apoptotischen Kerne von 13 % (Locke's(+)-Kontrolle) auf ca. 25 % zu beobachten. An den mit NGF oder BDNF behandelten Kulturen ließ sich ein neuroprotektiver Effekt deutlich erkennen, während die simultan mit alkalischer Phosphatase behandelten Gruppen eine ähnlich hohe Schädigung aufwiesen wie die ungeschützte Kontrollgruppe (ohne NGF/BDNF). Alkalische Phosphatase ohne weitere Zusätze hatte weder einen schädigenden Einfluss auf die Neurone, noch wirkte sie protektiv.

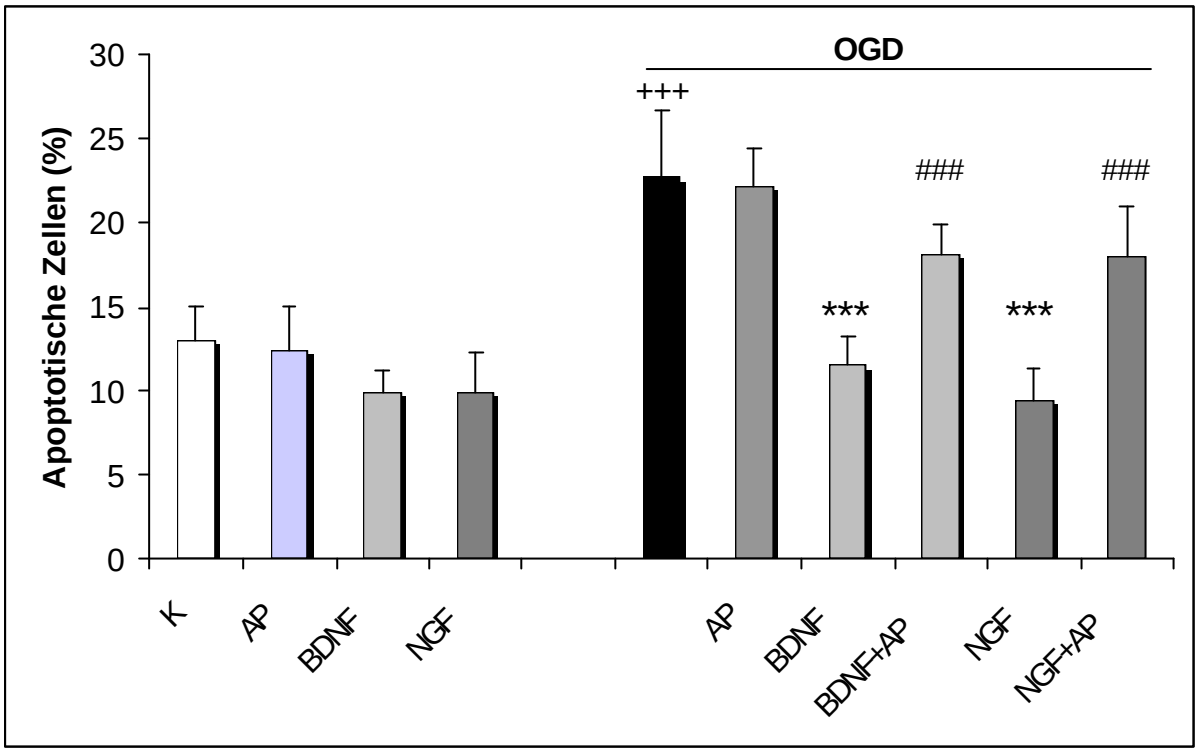


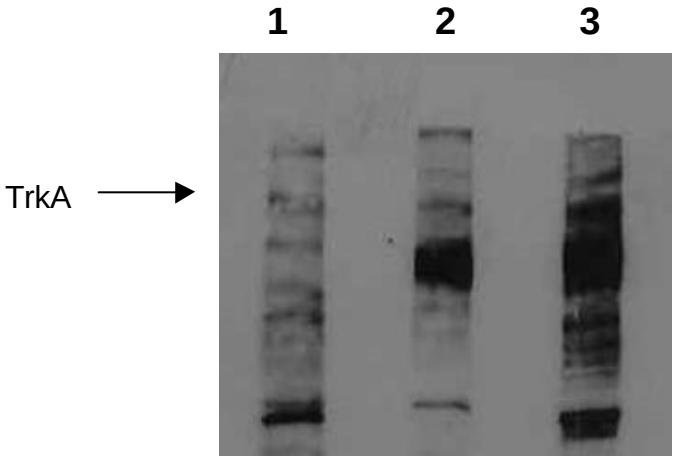
Abb. 3-12: Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von NGF und BDNF im OGD-Modell

Hippokampale neonatale Primärkulturen wurden 1 h vor dem Entzug von Sauerstoff und Glukose (OGD) mit jeweils 200 ng/ml NGF oder BDNF behandelt. Simultan wurde den entsprechenden Gruppen jeweils 800 ng/ml alkalische Phosphatase (AP) zugesetzt. Nach 4-stündiger OGD-Behandlung, während der die Substanzen in denselben Konzentrationen zugegen waren, fand eine 16-stündige Reoxygenierungsphase statt, nach der die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Kerne ausgezählt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur Locke's(+)-Kontrolle ohne Wachstumsfaktor (K); ***p<0,001 im Vergleich zur OGD-Kontrolle; $^{###}$p<0,001 im Vergleich zu der mit NGF bzw. BDNF behandelten Gruppe ohne AP (Varianzanalyse, Scheffétest).

3.5 Überprüfung der Ergebnisse in anderen Zellarten: SH-SY5Y-Zellen

3.5.1 Überprüfung des Rezeptorstatus'

Da bis zu diesem Zeitpunkt sämtliche Experimente an neuronalen embryonalen oder neonatalen Primärkulturen durchgeführt wurden, galt es zu überprüfen, ob die vorliegenden Resultate auch auf andere Zellkultursysteme übertragbar sind. Interessant erschienen uns SH-SY5Y-Zellen, eine Zelllinie aus humanen Neuroblastomzellen, die in der Literatur als Trk-exprimierend charakterisiert wird (z. B. Eggert *et al.,* 2000). Um sicherzustellen, dass die verwendete Zellkultur tatsächlich auf eine NGF-Behandlung anspricht, wurde ein SH-SY5Y-Lysat mit Hilfe eines TrkA-Antikörpers im Western Blot untersucht.



Bahn 1: Zelllysat von PC12-Zellen (als Kontrolle)
Bahn 2: Zelllysat nicht-ausdifferenzierter SH-SY5Y-Zellen
Bahn 3: Zelllysat ausdifferenzierter SH-SY5Y-Zellen

Abb. 3-13: Untersuchung eines SH-SY5Y-Zelllysates im Western Blot
Zelllysate unterschiedlicher Zelllinien wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem TrkA-Antikörper in der Verdünnung 1:1000 detektiert. Aufgetragen wurden jeweils 30 µg Protein pro Bahn.

Sowohl im Kontroll-Zelllysat der PC12-Zellen als auch in den SH-SY5Y-Lysaten ließ sich der TrkA-Rezeptor im Western Blot nachweisen. Somit waren die Voraussetzungen für Protektions-Versuche mit NGF gegeben.

3.5.2 Nachweis der Neuroprotektion von NGF

In einem ersten Schritt wurde die wirksame Dosis von NGF und BDNF ermittelt, die für die Vermittlung von deutlich erkennbaren protektiven Effekten nötig war. Da sich die SH-SY5Y-Zellen als unempfindlicher im Vergleich zu den Primärkulturen erwiesen, wurde in diesen Versuchen eine Staurosporin-Konzentration von 300 nM über einen Zeitraum von 20 h verwendet.

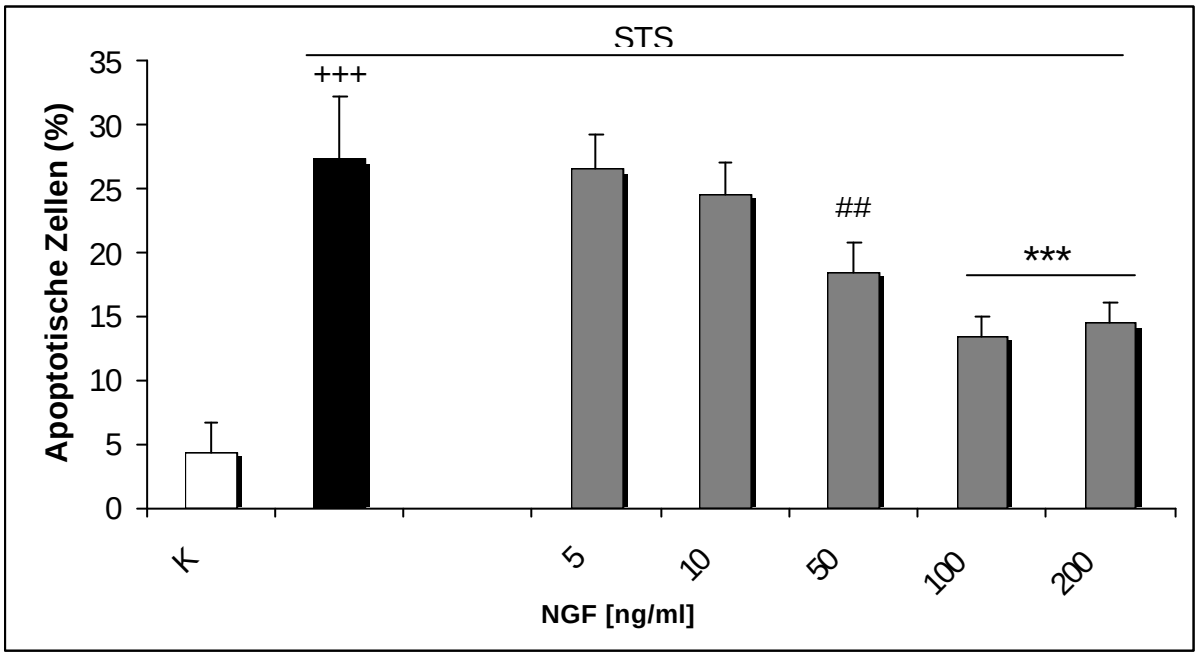


Abb. 3-14: Dosis-Wirkung-Beziehung von NGF an SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an NGF für 1 h inkubiert, bevor Apoptose durch Zugabe von 300 nM Staurosporin (STS) ausgelöst wurde. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop der prozentuale Anteil der apoptotischen Nuclei ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K); $^{\#\#}$p<0,01 im Vergleich zur Staurosporingruppe (ohne NGF); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporingruppe (ohne NGF) (Varianzanalyse, Scheffétest).

Ab einer Konzentration von 50 ng/ml lässt sich eine protektive Wirkung von NGF in der SH-SY5Y-Kultur feststellen.

3.5.3 Nachweis der Neuroprotektion von BDNF

Auch für BDNF wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung aufgestellt und damit die für die Neuroprotektion benötigte Dosis an SH-SY5Y-Zellen ermittelt.

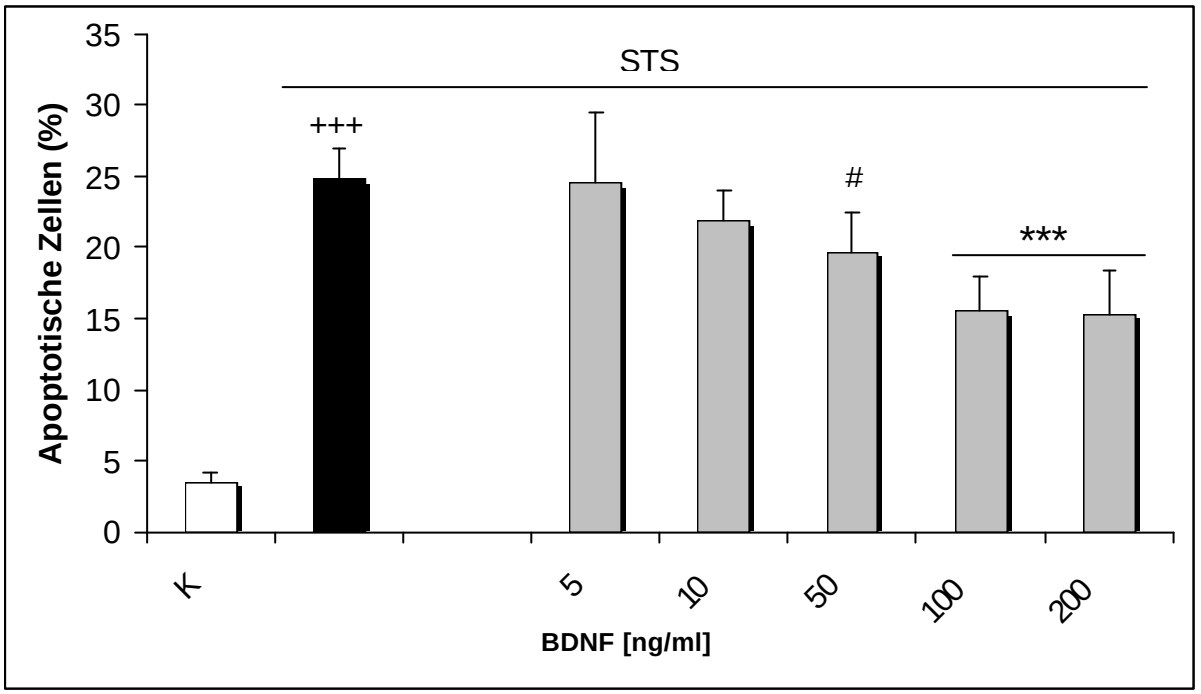


Abb. 3-15: Dosis-Wirkung-Beziehung von BDNF an SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an BDNF für 1 h inkubiert, bevor Apoptose durch Zugabe von 300 nM Staurosporin (STS) ausgelöst wurde. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop der prozentuale Anteil der apoptotischen Nuclei ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K); $^{\#}$p<0,05 im Vergleich zur Staurosporingruppe (ohne BDNF); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporingruppe (ohne BDNF) (Varianzanalyse, Scheffétest).

Trotz eines deutlich protektiven Effektes schon ab Konzentrationen von 50 ng/ml NGF oder BDNF, wurde in allen folgenden Experimenten mit Konzentrationen von 100 ng/ml gearbeitet.

3.5.4 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf NGF und BDNF in der SH-SY5Y-Kultur

Nach dem Nachweis der neuroprotektiven Effekte von NGF und BDNF an SH-SY5Y-Zellen nach Staurosporin-Schädigung, sollte im nächsten Schritt der Einfluss von alkalischer Phosphatase überprüft werden.

Die Behandlung der Zelllinie erfolgte nach demselben Schema wie jene der neuronalen Primärkulturen.

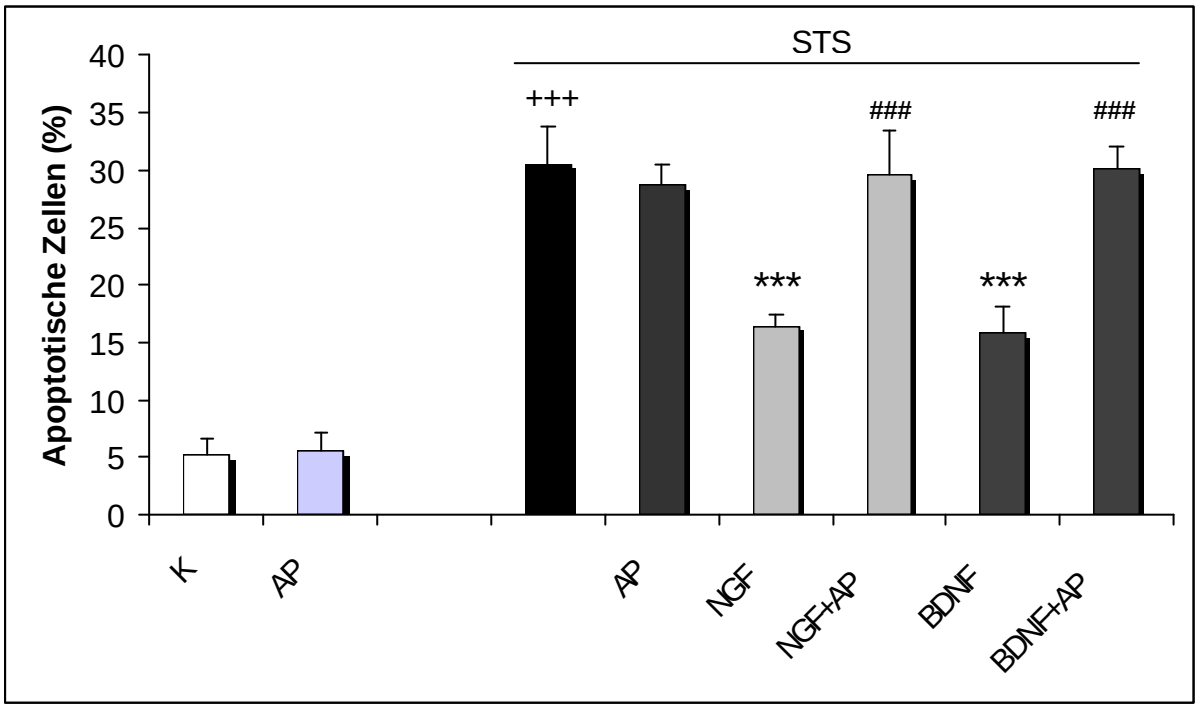


Abb. 316: Einfluss von alkalischer Phosphatase auf neuroprotektiven Effekt von NGF und BDNF an SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden mit NGF oder BDNF (je 100 ng/ml) und in den entsprechenden Gruppen mit alkalischer Phosphatase (AP) (800 ng/ml) für 1 h vorinkubiert und anschließend mit 300 nM Staurosporin (STS) behandelt. Nach Fixieren und Färben der Zellen wurde das Verhältnis der apoptotischen zu gesunden Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporingruppe (ohne Wachstumsfaktor); $^{###}$p<0,001 im Vergleich zur mit Wachstumsfaktor behandelten Gruppe (NGF oder BDNF) (Varianzanalyse, Scheffétest).

3.6 Effekte von permanent phosphorylierten Neurotrophinen

Die Aufhebung des neuroprotektiven Effekts durch Einwirken der alkalischen Phosphatase führte im nächsten Schritt zu der Frage, wie sich der Einfluss dieser Phosphatase auf permanent phosphorylierte Neurotrophine auswirkt. Dazu wurde mit Hilfe von ATP?S eine nicht hydrolysierbare Phosphatgruppe an NGF bzw. BDNF angehängt. Die Phosphorylierung wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt wie mit ATP (siehe 2.6).

3.6.1 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf permanent phosphoryliertes NGF

NGF wurde in Gegenwart von 1 µM ATP?S, 1 mM $MgCl_2$ und 25 mM Tris/HCl für 15 min bei 37°C phosphoryliert. Anschließend wurden hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten mit dem dauerhaft phosphorylierten NGF in Konzentrationen von 5 bis 200 ng/ml behandelt. Nach 1 h Inkubation folgte die Zugabe von 200 nM Staurosporin. Weitere 20 h später wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und ausgezählt.

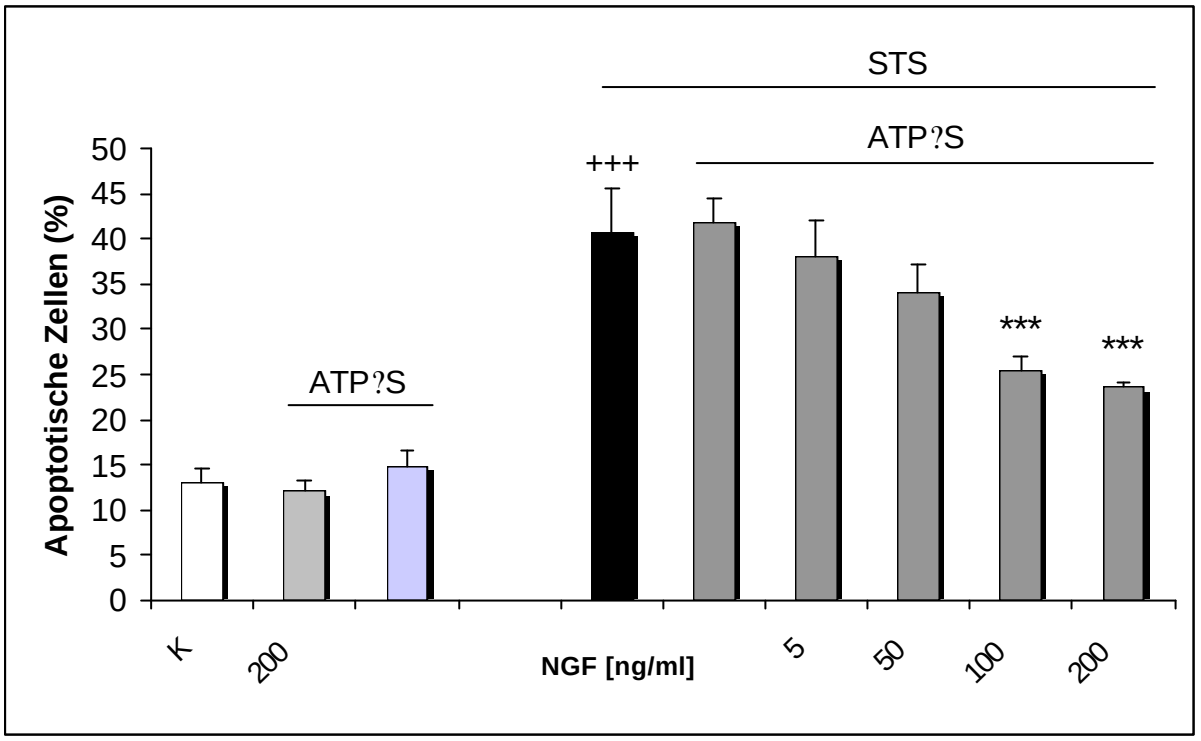


Abb. 3-17: Neuroprotektive Wirkung von permanent phosphoryliertem NGF

NGF wurde mit ATP?S (100 µM) bei 37°C für 15 min phosphoryliert und anschließend in Konzentrationen von 5 ng/ml bis 200 ng/ml der hippokampalen Primärkultur zugesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen mit permanent phosphoryliertem NGF und ATP?S ohne Staurosporinzugabe behandelt. Der apoptotische Zelltod wurde 1 h nach Wachstumsfaktorbehandlung durch 200 nM Staurosporin (STS) induziert. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Nuclei erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur STS-unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur STS-Kontrolle; (Varianzanalyse, Scheffétest).

Es zeigte sich, dass auch permanent phosphoryliertes NGF in der Lage war, hippokampale Rattenneurone vor apoptotischen Schädigungen zu schützen.
Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den Effekt des permanent phosphorylierten NGFs untersucht.

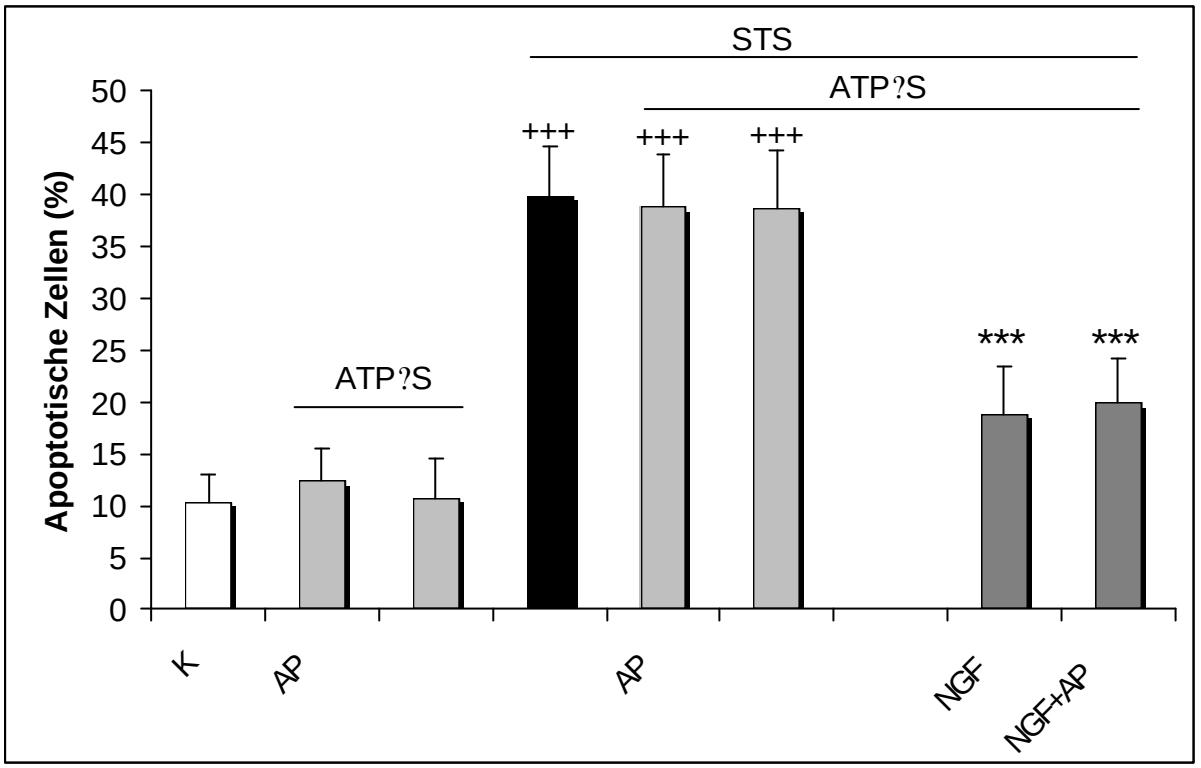


Abb. 3-18: Einfluss von alkalischer Phosphatase auf neuroprotektive Wirkung von permanent phosphoryliertem NGF

NGF wurde mit ATP?S (100 µM) bei 37°C für 15 min phosphoryliert und anschließend in einer Konzentration von 200 ng/ml der hippokampalen Primärkultur zugesetzt. In die entsprechende Gruppe wurde zeitgleich alkalische Phosphatase (AP; 800 ng/ml) zugegeben. Der apoptotische Zelltod wurde 1 h später durch 200 nM Staurosporin (STS) induziert. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Nuclei erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur STS-unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur STS-Kontrolle; (Varianzanalyse, Scheffétest).

Die Auswertung der unter dem Fluoreszenzmikroskop apoptotisch erscheinenden Kerne ergab, dass alkalische Phosphatase die neuroprotektive Wirkung von dauerhaft phosphoryliertem NGF nicht aufzuheben vermag. Des Weiteren übt ATP?S weder schädigende noch protektive Effekte auf die Neurone aus.

3.6.2 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf permanent phosphoryliertes BDNF

Ergänzend zu den Ergebnissen aus dem NGF-Experiment sollte auch das zweite Mitglied der Neurotrophin-Familie dauerhaft phosphoryliert und anschließend mit alkalischer Phosphatase inkubiert werden. Auch permanent phosphoryliertes BDNF wurde zunächst auf seinen neuroprotektiven Effekt hin untersucht.

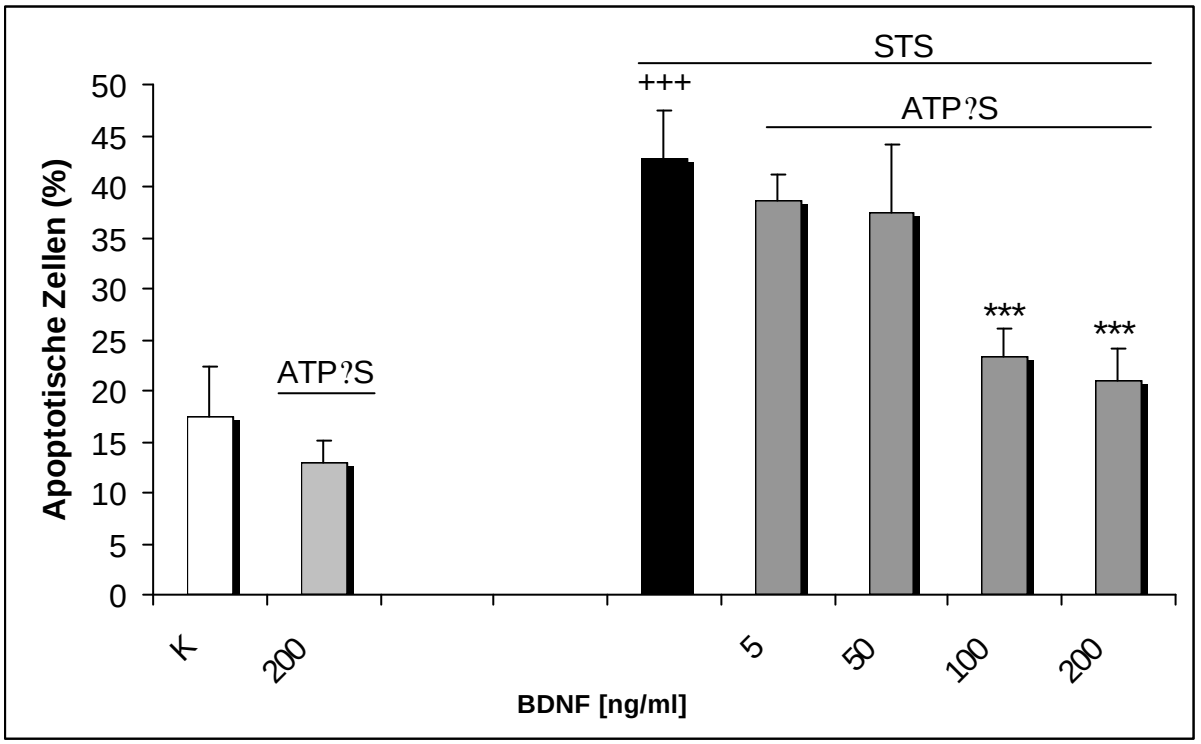


Abb. 3-19: Neuroprotektive Wirkung von permanent phosphoryliertem BDNF

BDNF wurde mit ATP?S (100 µM) bei 37°C für 15 min phosphoryliert und anschließend in Konzentrationen von 5 ng/ml bis 200 ng/ml der hippokampalen Primärkultur zugesetzt. Der apoptotische Zelltod wurde 1 h später durch 200 nM Staurosporin (STS) induziert. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und der Anteil der apoptotischen Nuclei erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur STS-unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur STS-Kontrolle; (Varianzanalyse, Scheffétest).

Nach Aufstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung des permanent phosphorylierten BDNFs, wurde nun die Kombination mit alkalischer Phosphatase im Staurosporin-Modell getestet.

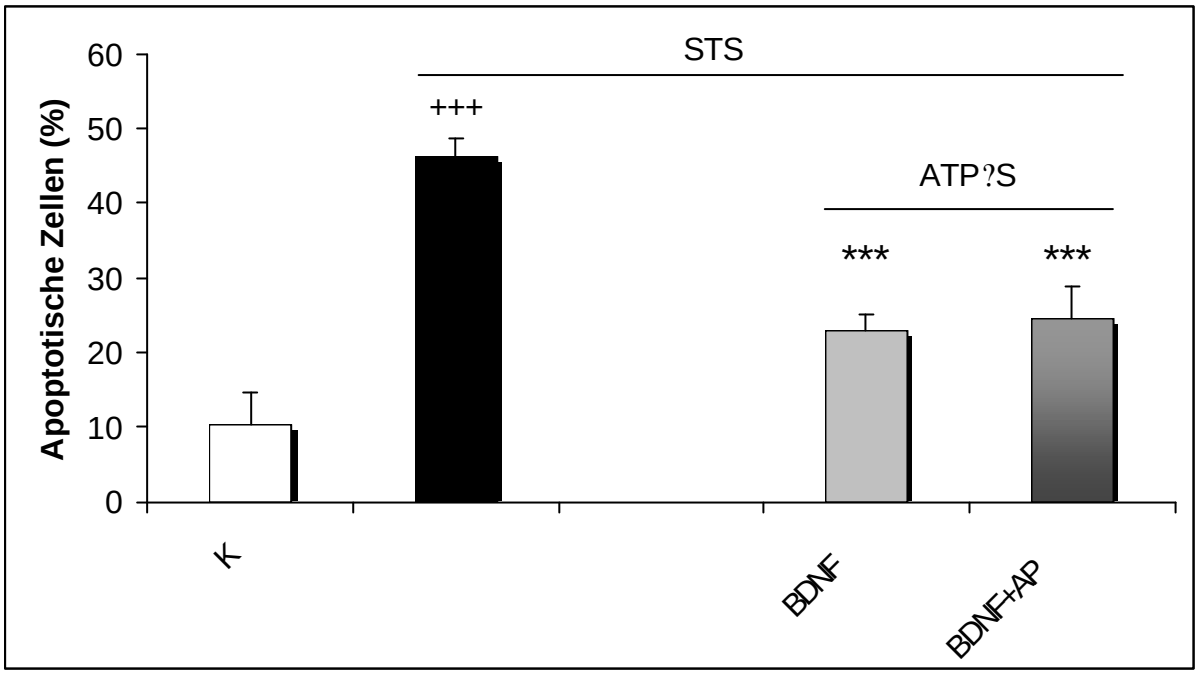


Abb. 3-20: Einfluss von alkalischer Phosphatase auf neuroprotektive Wirkung von permanent phosphoryliertem BDNF

BDNF wurde mit ATP?S (100 µM) bei 37°C für 15 min phosphoryliert und anschließend in einer Konzentration von 200 ng/ml der hippokampalen Primärkultur zugesetzt. Die entsprechende Gruppe wurde zeitgleich mit alkalischer Phosphatase (AP; 800 ng/ml) behandelt. Der apoptotische Zelltod wurde 1 h später durch 200 nM Staurosporin (STS) induziert. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und der Anteil der apoptotischen Nuclei erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur STS-unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur STS-Kontrolle; (Varianzanalyse, Scheffétest).

Auch bei permanent phosphoryliertem BDNF ist alkalische Phosphatase nicht in der Lage, die protektive Wirkung des Wachstumsfaktors auf die Neuronen aufzuheben.

3.7 Proteinchemische Untersuchungen zum Einfluss von alkalischer Phosphatase auf die Phosphorylierung des Trk-Rezeptors und nachgeschalteter Signalskaskaden-Proteine

3.7.1 Untersuchung des Trk-Rezeptors

Durch Bindung der Neurotrophine NGF und BDNF kommt es zur Dimerisierung und Trans-Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosin-Reste der Trk-Rezeptoren (Cunningham *et al.,* 1997) und zur Anlagerung weiterer Adapterproteine und dadurch zur Aktivierung spezieller Signalkaskaden.

In diesem Zusammenhang interessierte uns die Frage, ob sich die Aufhebung des neuroprotektiven Effektes durch simultane Behandlung von NGF bzw. BDNF und alkalischer Phosphatase auch in einem unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad des Rezeptors feststellen lässt.

Dazu wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben und Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran eine Inkubation mit einem Antikörper gegen den phosphorylierten Tyrosinrest 675 der Trk-Rezeptoren durchgeführt.

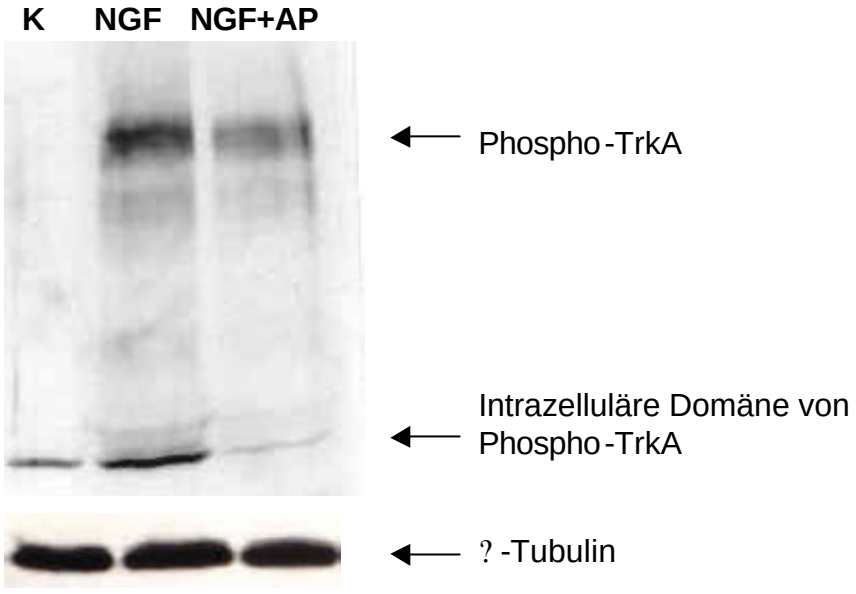


Abb. 3-21: Überprüfung der Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors im Western Blot

Vergleich des Phosphorylierungsstatus des TrkA-Rezeptors nach NGF-Behandlung hippokampaler Primärkulturen neonataler Ratten am 7. Kulturtag oder simultaner Behandlung mit NGF (200 ng/ml) und 800 ng/ml alkalischer Phosphatase (AP). Es wurden 30 µg Protein pro Bahn aufgetragen; die Verdünnung des Antikörpers betrug 1:100.

Obwohl der verwendete Antikörper sehr schwach war und durch die lange Entwicklungsdauer störende Hintergrundsignale auftraten, lässt sich eine Abnahme des Phosphorylierungszustandes des Trk-Rezeptors bei Anwesenheit von alkalischer Phosphatase und gleichbleibendem ?-Tubulingehalt erkennen.

3.7.2 Untersuchungen zum Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den Phosphorylierungsstatus der Signalkaskaden-Proteine P-Akt und P-ERK 1/2

Die Anlagerung bestimmter Adapterproteine wie Shc (van der Geer *et al.,* 1995) führt zur nachgeschalteten Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs mit anschließender Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase Akt/Proteinkinase B (PKB) und *Nuclear Factor-kappa B* (NF-?B) (Maggirwar *et al.,* 1998; Yuan und Yankner, 2000) und des Ras/MAPK-Signalwegs (Gomez und Cohen, 1991; Nobes *et al.,* 1996). Diese Aktivierung sollte durch Überprüfung des Phosphorylierungsstatus' von Akt/PKB und ERK 1/2 nachgewiesen und eine mögliche Beeinflussung durch alkalische Phosphatase untersucht werden.

Hierfür wurden hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten am 7. Kulturtag mit NGF bzw. BDNF (jeweils 200 ng/ml) und in den entsprechenden Gruppen mit alkalischer Phosphatase (800 ng/ml) für 10 min inkubiert und geerntet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine und Behandlung mit Antikörpern gegen Phospho-Akt und Phospho-ERK 1/2 wurde der Phosphorylierungstatus der einzelnen Gruppen verglichen.

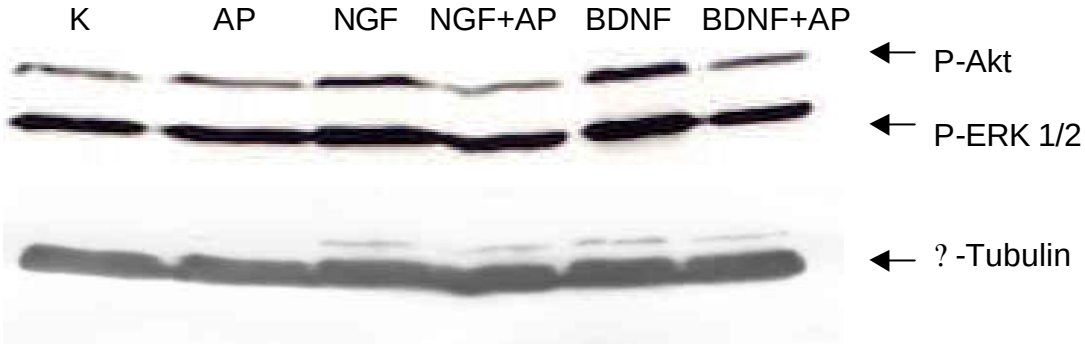


Abb. 3-22: Phosphorylierung von Akt und ERK 1/2 nach Behandlung mit NGF bzw. BDNF und alkalischer Phosphatase (Western Blot)

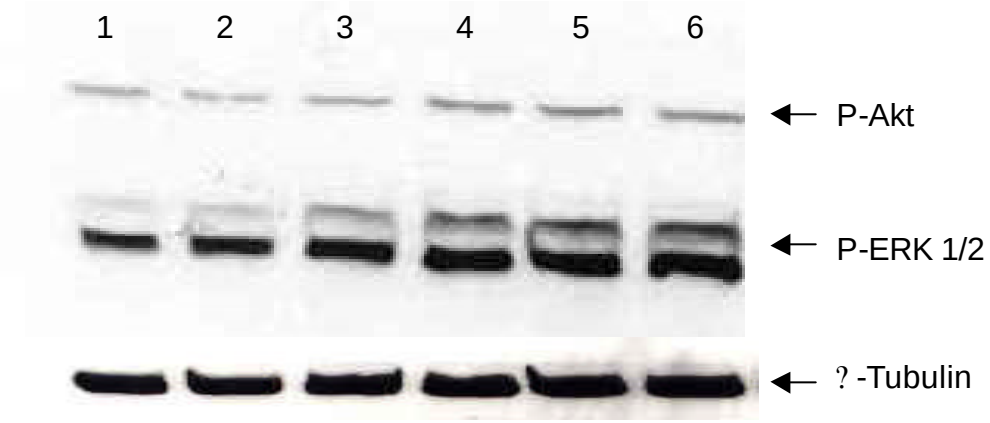
Die Aktivierung der Signalkaskadenproteine Akt und ERK 1/2 konnte in der Immunoblotanalyse gezeigt werden, während bei einer gleichzeitigen Inkubation mit alkalischer Phosphatase (AP) eine Steigerung des Signales nicht beobachtet werden konnte. Aufgetragen wurden 30 µg Gesamtprotein, die Verdünnung der Antikörper betrug 1:1000 (P-Akt) bzw. 1:1500 (P-ERK 1/2).

Bei gleichbleibendem ?-Tubulin kann bei der mit NGF behandelten Gruppe eine Zunahme des Phosphorylierungsstatus' von P-Akt und P-ERK 1/2 beobachtet werden, während diese Aktivierung bei gleichzeitiger Einwirkung von alkalischer Phosphatase nicht erkennbar ist.

Somit kann man auch auf Protein-Ebene nachvollziehen, dass die reduzierte Neuroprotektion, die bei simultaner Behandlung mit NGF bzw. BDNF und alkalischer Phosphatase beobachtet wurde, mit einer verminderten Aktivierung der Signalkaskaden-Proteine P-Akt und P-ERK 1/2 korreliert.

3.7.3 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den Phosphorylierungsstatus von P-Akt und P-ERK 1/2 nach Behandlung mit dauerhaft phosphorylierten Wachstumsfaktoren

Nachdem der Western Blot nach NGF bzw. BDNF-Behandlung eine Reduktion der Aktivierung der Signalkaskade-Proteine P-Akt und P-ERK 1/2 bei Anwesenheit von alkalischer Phosphatase gezeigt hat, sollte als logischer Folgeversuch eine identische Versuchsanordnung mit permanent phosphorylierten Neurotrophinen erfolgen. Dafür wurden hippokampale Primärkulturen am 7. Kulturtag entweder nur mit permanent phosphoryliertem NGF bzw. BDNF (vgl. 2.6) oder zusätzlich mit alkalischer Phosphatase behandelt und nach 7 min geerntet. Von den so erhaltenen Proteinproben wurde ein Western Blot angefertigt, der über Nacht mit einem P-Akt und einem P-ERK 1/2-Antikörper inkubiert wurde.



Bahn 1: Kontrolle
Bahn 2: Alkalische Phosphatase
Bahn 3: permanent phosphoryliertes NGF
Bahn 4: permanent phosphoryliertes NGF + alkalische Phosphatase
Bahn 5: permanent phosphoryliertes BDNF
Bahn 6: permanent phosphoryliertes BDNF + alkalische Phosphatase

Abb. 3-23: Phosphorylierung von Akt und ERK 1/2 nach Behandlung mit permanent phosphoryliertem NGF bzw. BDNF und alkalischer Phosphatase (Western Blot)
Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden für 7 min mit permanent phosphoryliertem NGF oder BDNF (jeweils 200 ng/ml) und in den entsprechenden Gruppen mit alkalischer Phosphatase (AP; 800 ng/ml) behandelt. Es wurden 30 µg Gesamtprotein aufgetragen, die Verdünnung der Antikörper betrug 1:1000 (P-Akt) bzw. 1:1500 (P-ERK 1/2).

Die Analyse per Western Blot zeigt deutlich eine Aktivierung der Signalkaskaden-Proteine durch mit ATP?S phosphoryliertes NGF oder BDNF, die durch Einwirken von alkalischer Phosphatase nicht reduziert oder abgeschwächt wird.

3.8 Einfluss von ATPase auf die neuroprotektive Wirkung von NGF und BDNF

Um die Bedeutung einer oder mehrerer ATP-Bindestellen im Hinblick auf die neuroprotektive Wirksamkeit weiter aufzuklären, wurden NGF und BDNF zunächst phosphoryliert, anschließend wurde ein Teil des Phosphorylierungsansatzes mit ATPase und ein Teil mit alkalischer Phosphatase für 15 min inkubiert. Der dritte Teil blieb ohne Zusatz. Die drei Ansätze wurden 1 h vor Behandlung mit Staurosporin (200 nM) direkt in die Kulturschalen mit hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten zugesetzt.

3.8.1 Kontrollen zum ATPase-Experiment

Um schädigende oder protektive Einflüsse des Puffers oder der ATPase selbst auszuschließen, wurden hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten am 7. Kulturtag mit Puffer oder mit Puffer und ATPase behandelt und entweder 1 h später mit Staurosporin (200 nM) versetzt oder ohne weitere Zusätze für 20 h inkubiert. Für die Behandlung der Puffer-Kontrollgruppe wurde die Verdünnung des Inkubationsansatzes durch das Zellmedium miteinberechnet.

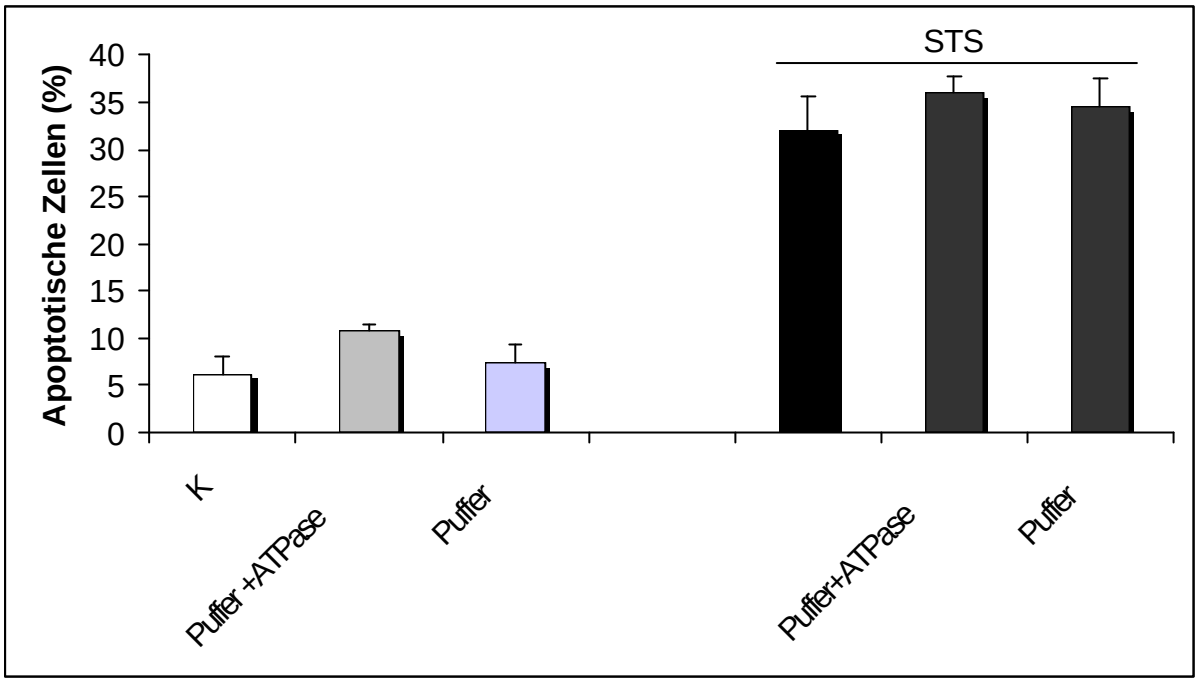


Abb. 3-24: Kontrollgruppen zur Überprüfung des Einflusses von ATPase bzw. Puffer

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag mit Puffer (4 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,7 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0,3 M NaCl, pH 7,4) oder mit Puffer und ATPase (1 mg/ml) behandelt und 1 h später entweder mit Staurosporin (200 nM) versetzt und weitere 20 h inkubiert. Nach Fixieren und Anfärben mit Hoechst 33258 wurde das Verhältnis der apoptotischen zu den gesunden Kernen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent ? S.D. von 5 Kulturen pro Gruppe.

Wie aus dem Kontrollexperiment ersichtlich wird, wirkt weder ATPase noch der verwendete Puffer für sich protektiv oder schädigend. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf Veränderungen zurückzuführen sind, die mit den Wachstumsfaktoren selbst und ihrer Interaktion am und mit dem Rezeptor zusammenhängen.

3.8.2 Einfluss von ATPase auf die neuroprotektive Wirkung von NGF

Anlehnend an die Untersuchung des Einflusses von alkalischer Phosphatase sollte in diesem Experiment eine Veränderung des neuroprotektiven Effekts durch Einwirken von ATPase beobachtet werden.

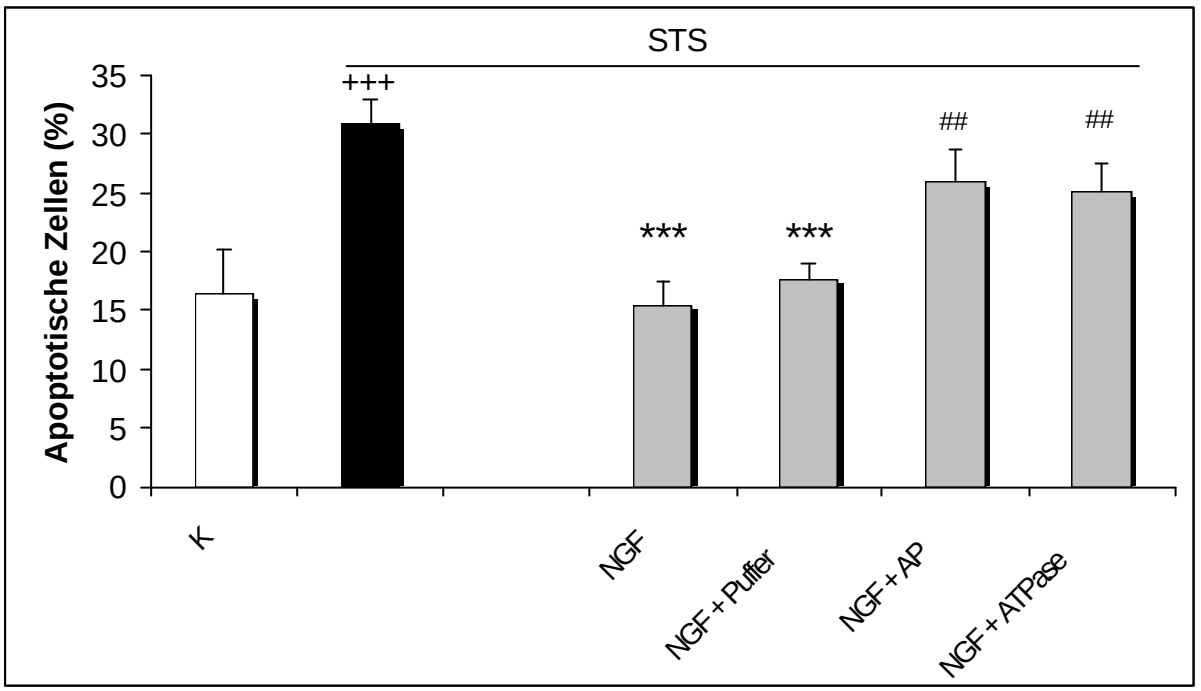


Abb. 3-25: Einfluss von ATPase und alkalischer Phosphatase auf die neuroprotektive Wirkung von NGF

NGF wurde zunächst extern phosphoryliert, dann entweder mit ATPase (1 mg/ml), mit alkalischer Phosphatase (AP; 800 ng/ml) oder nur dem Phosphorylierungspuffer (1 mM $MgCl_2$, 25 mM Tris/HCl, pH 7,5) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten und 1 h später der Zusatz von 200 nM Staurosporin (STS). Weitere 20 h später wurden die Zellen fixiert, angefärbt und der prozentuale Anteil der apoptotischen Kerne ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporin-behandelten Gruppe; $^{\#\#}$p<0,01 im Vergleich zur NGF/NGF-Puffer-behandelten Gruppe (Varianzanalyse, Scheffétest).

Nach Inkubation mit ATPase war das der Zellkultur zugesetzte NGF nicht mehr in der Lage, seine neuroprotektive Wirkung zur Geltung zu bringen. Sowohl das Einwirken von alkalischer Phosphatase, als auch von ATPase hat eine Aufhebung der Neuroprotektion zur Folge.

3.8.3 Einfluss von ATPase auf die neuroprotektive Wirkung von BDNF

In Ergänzung zu den mit NGF erhaltenen Ergebnissen wurde auch die neuroprotektive Wirkung von BDNF auf eine Beeinflussung durch ATPase untersucht.

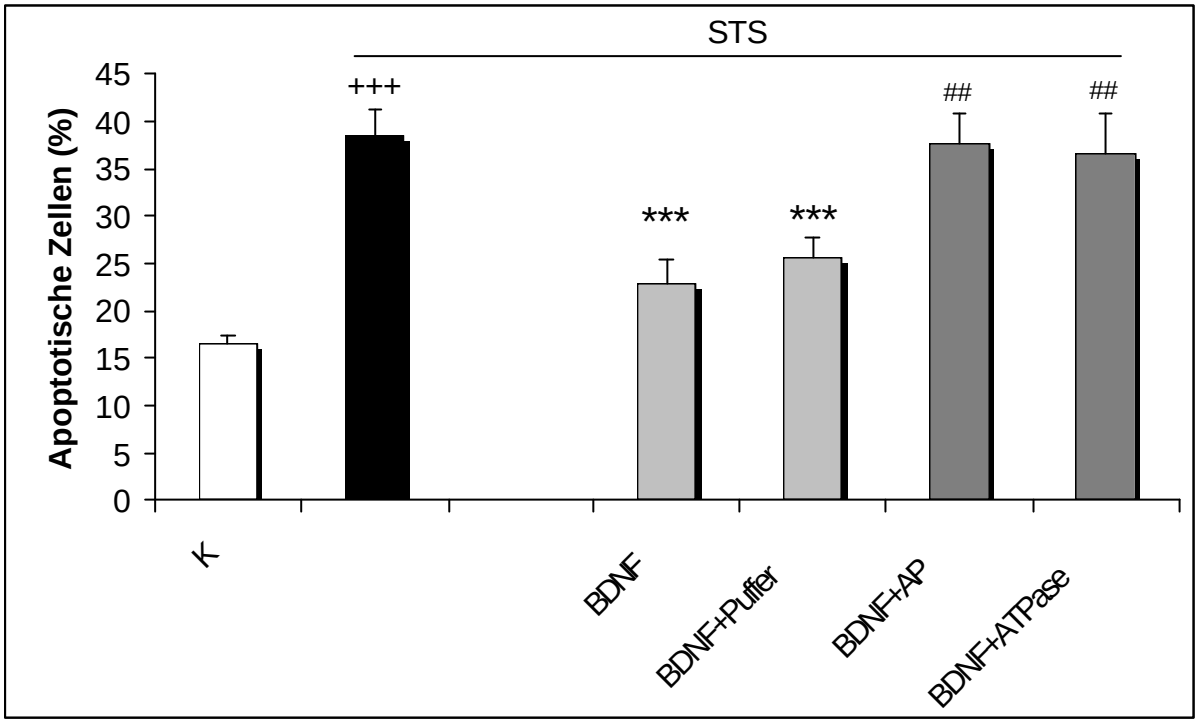


Abb. 3-26: Einfluss von ATPase und alkalischer Phosphatase auf die neuroprotektive Wirkung von BDNF

BDNF wurde zunächst extern phosphoryliert, dann entweder mit ATPase (1 mg/ml), mit alkalischer Phosphatase (AP; 800 ng/ml) oder nur mit Pufferzusatz (1 mM $MgCl_2$, 25 mM Tris/HCl pH 7,5) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der hippokampalen neonatalen Neurone und 1 h später der Zusatz von 200 nM Staurosporin (STS). Weitere 20 h später wurden die Zellen fixiert, angefärbt und der prozentuale Anteil der apoptotischen Kerne ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporin-behandelten Gruppe; $^{\#\#}$p<0,01 im Vergleich zur BDNF/BDNF-Puffer-behandelten Gruppe (Varianzanalyse, Scheffétest).

In dem Kombinationsversuch mit ATPase und zuvor phosphoryliertem BDNF konnte gezeigt werden, dass, ähnlich wie bei Beeinflussung durch alkalische Phosphatase, das neuroprotektive Potential des Wachstumsfaktors reduziert wird. Das bedeutet, dass nicht nur eine oder mehrere Phosphatgruppen, sondern auch an den Wachstumsfaktor gebundenes ATP eine tragende Rolle in der Rezeptorbindung oder allgemeiner in der Vermittlung des neuroprotektiven Effekts spielen könnte.

3.9 Protektive Effekte von VEGF an HUVECs

Die Ergebnisse der Experimente mit alkalischer Phosphatase und ATPase an NGF und BDNF weisen auf eine signifikante Bedeutung einer Phosphorylierung und einer ATP-Bindung hin. In den durchgeführten Versuchsreihen verhielten sich NGF und BDNF als Vertreter der Neurotrophin-Familie sehr ähnlich. Für uns stellte sich die Frage, ob andere protektiv wirkende Wachstumsfaktoren auch in gleicher Weise auf Inkubation mit alkalischer Phosphatase oder ATPase reagieren. Zudem sollten die Resultate, die wir bislang aus neuronalen Zellkulturen erhalten konnten, in einem anderen Zellkultur-Modell untersucht werden.

Aufgrund diverser Eigenschaften schien der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ein geeigneter und interessanter Wachstumsfaktor für unsere Untersuchungen zu sein: er unterscheidet sich in der Aminosäure-Sequenz von den Neurotrophinen, besitzt einen Wirkungsschwerpunkt im nicht-neuronalen Bereich und vermag ebenso wie die Neurotrophine protektive Effekte zu vermitteln. Des Weiteren bindet er an Rezeptoren, die zwar auch Tyrosinkinase-Rezeptoren sind, sich aber strukturell von Trk-Rezeptorproteinen unterscheiden.

In der Literatur sind protektive Effekte des VEGFs hauptsächlich an endothelialen Zellsystemen beschrieben worden. Dies bot uns die Möglichkeit, die Experimente zusätzlich zu den neuronalen Zellkulturen auch an völlig andersartigen Zellen durchzuführen und eine weitere Schädigungsmethode zu testen.

3.9.1 Protektive Effekte von VEGF bei Serumentzug

Zur Induktion einer Zellschädigung wurde den HUVECs Serum vorenthalten. Die zeitabhängige Zunahme der Schädigung kann in Abbildung 3-27 nachvollzogen werden.

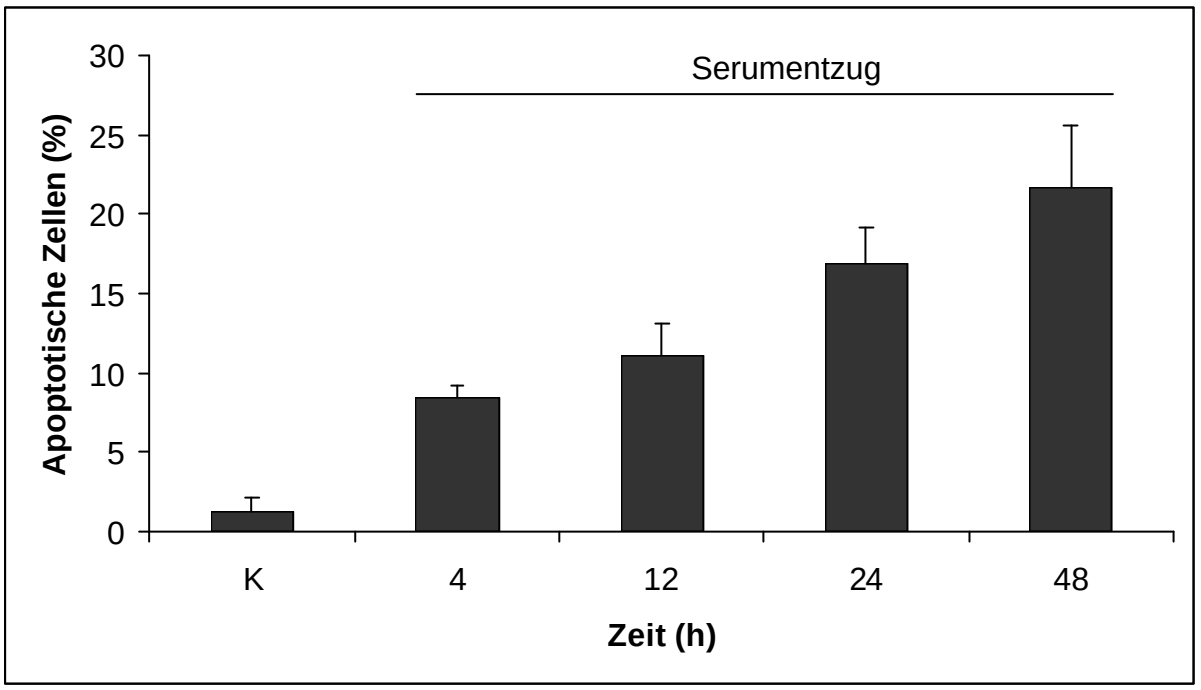


Abb. 3-27: Serumentzug an HUVECs über einen Zeitraum von 4 bis 48 h

Konfluente HUVEC-Kulturen wurden mit serumfreiem OptiMEM bedeckt und für 4-48 h im Brutschrank inkubiert. Die Kontrollgruppe (K) erhielt serumhaltiges OptiMEM. Nach der jeweiligen Behandlungsdauer wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Kerne ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe.

Durch 48-stündigen Serumentzug konnte der Anteil der apoptotischen Zellen von unter 2% (Kontrollgruppe mit serumhaltigem OptiMEM) auf 22% gesteigert werden. Bei länger andauernder Inkubation ohne Serum war die Ablösung der Zellen vom Kulturschalen-Boden so stark, dass keine Auswertung mehr möglich war.

Als nächster Schritt sollte die zur Protektion der HUVECs notwendige Konzentration an VEGF herausgefunden werden.

Dazu wurden die konfluenten Zellen während des 48-stündigen Serumentzugs mit unterschiedlichen Konzentrationen des Wachstumsfaktors inkubiert und anschließend der Anteil der apoptotischen Nuclei bestimmt.

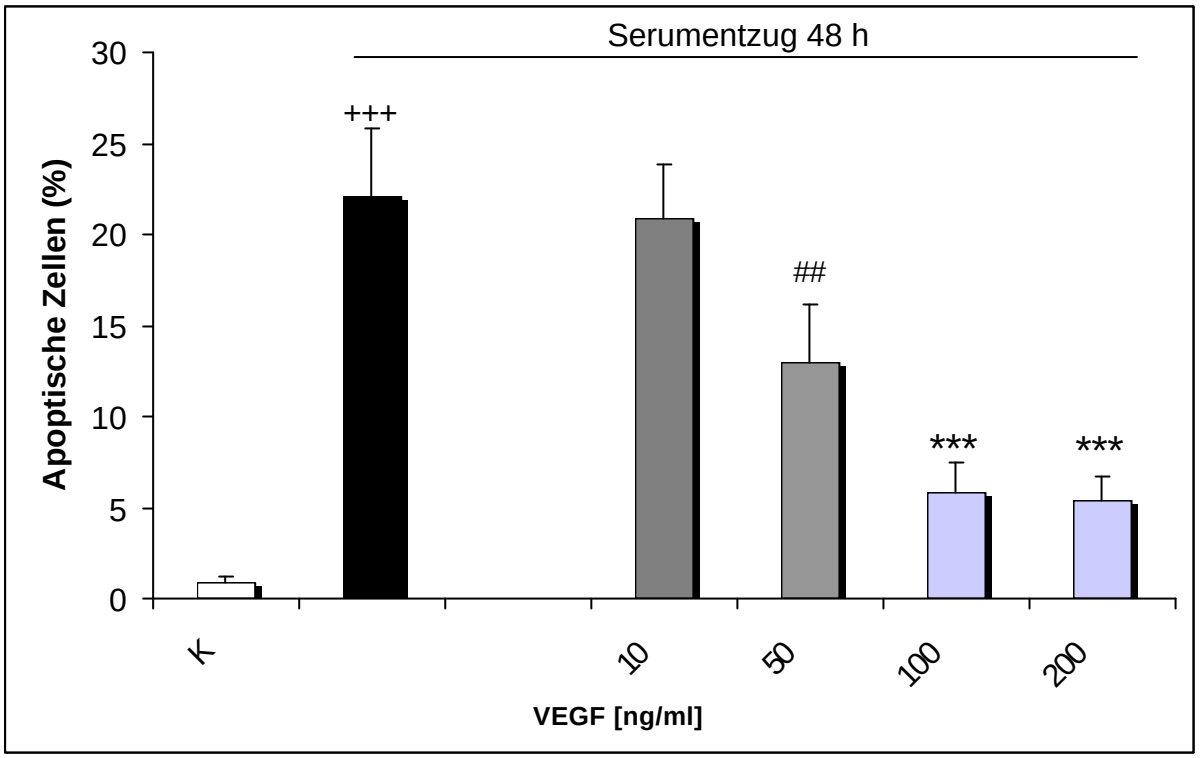


Abb. 3-28: Dosis-Wirkungsbeziehung von VEGF in einer HUVEC-Kultur

Konfluente HUVECs wurden mit serumfreiem OptiMEM bedeckt und mit VEGF in Konzentrationen von 10 ng/ml bis 200 ng/ml versetzt. 48 h später wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und der Anteil der apoptotischen Kerne ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur serumhaltigen OptiMEM-Kontrollgruppe (K); $^{\#\#}p<0,01$ im Vergleich zur unbehandelten Serumentzug-Gruppe; ***p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Serumentzug-Gruppe (S); (Varianzanalyse, Scheffétest).

VEGF war ab einer Konzentration von 50 ng/ml in der Lage, HUVEC-Kulturen vor einer Schädigung durch Serumentzug zu schützen. Ab einer Konzentration von 100 ng/ml war keine Steigerung der Protektion mehr zu erkennen.

3.9.2 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den protektiven Effekt von VEGF

Nachdem eine deutlich erkennbare protektive Wirkung von VEGF in einem Konzentrationsbereich von 50 bis 200 ng/ml festgestellt werden konnte, sollte nun der Einfluss der alkalischen Phosphatase auf jenen Effekt getestet werden.
Dazu wurden konfluente HUVECs zu Beginn des Serumentzugs zeitgleich mit VEGF und alkalischer Phosphatase behandelt.

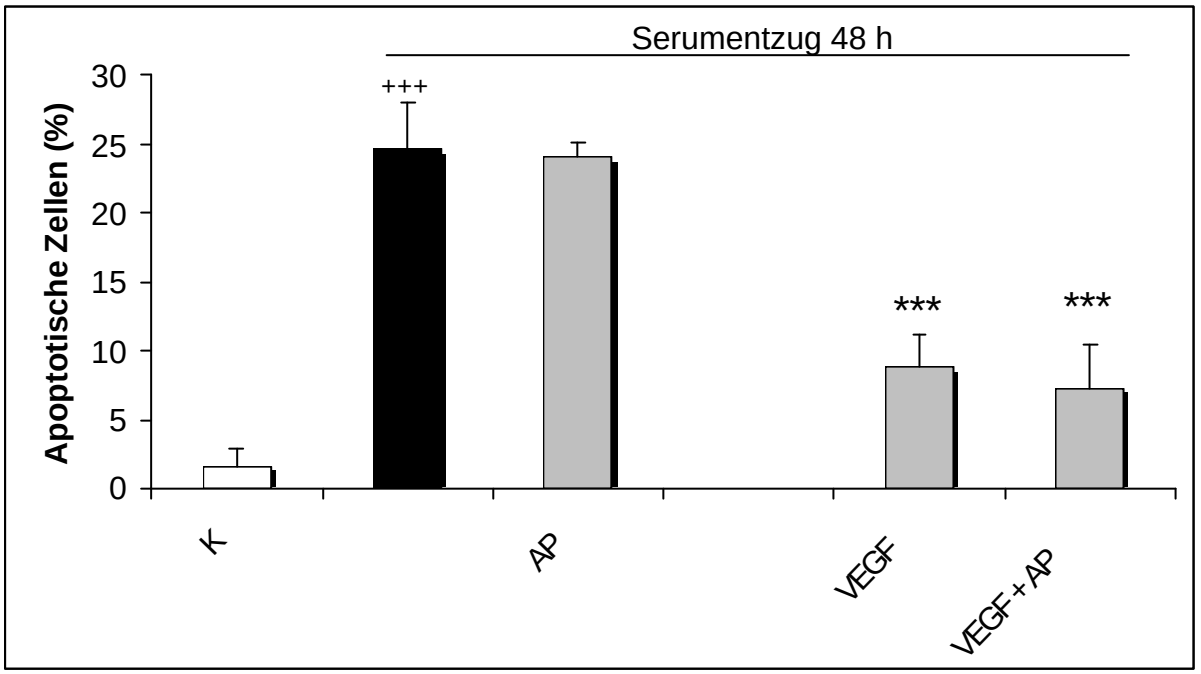


Abb. 3-29: Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den protektiven Effekt von VEGF
Alkalische Phosphatase (AP) wurde zeitgleich zu VEGF (100 ng/ml) in einer Konzentration von 800 ng/ml ins serumfreie Medium der Kulturgefäße gegeben. Nach 48 h wurden die HUVECs mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) mit serumhaltigem Medium; ***p<0,001 im Vergleich zur mit Serumentzug geschädigten Kontrolle (S) (Varianzanalyse, Scheffétest).

Das Ergebnis der kombinierten Behandlung von VEGF und alkalischer Phosphatase unterschied sich gänzlich von dem der Neurotrophine NGF und BDNF. VEGF in einer Konzentration von 100 ng/ml schützte die HUVECs deutlich vor dem schädigenden Serumentzug. Gleichzeitige Inkubation mit alkalischer Phosphatase zeigte keine Auswirkung auf diesen protektiven Effekt. Dieser Befund bestätigte sich unabhängig davon, ob VEGF simultan mit alkalischer Phosphatase ins Medium zugesetzt wurde oder ob eine 10-minütige externe Vorinkubation statt fand.

3.9.3 Einfluss von ATPase auf die protektive Wirkung von VEGF

Zunächst wurden sowohl schädigende, als auch schützende Effekte der verwendeten Enzyme selbst ausgeschlossen.

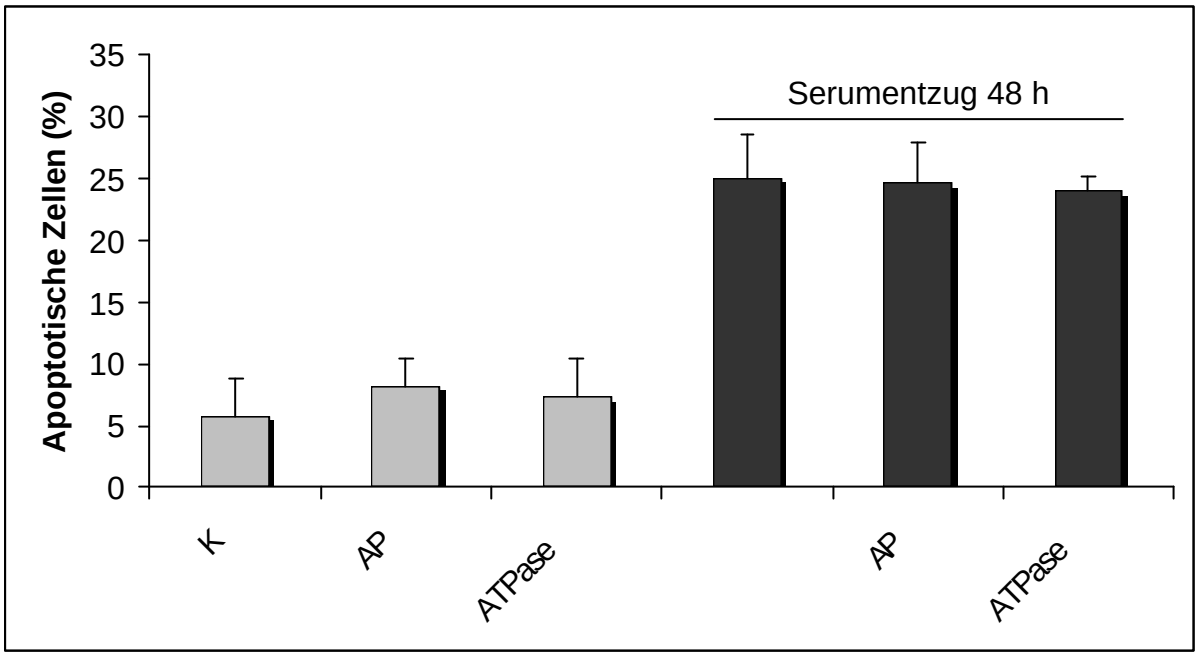


Abb. 3-30: Kontrollexperiment zum Einfluss von ATPase und AP

Konfluente HUVE-Zellen wurden mit serumfreiem oder serumhaltigem OptiMEM bedeckt und mit alkalischer Phosphatase (AP; 800 ng/ml) oder ATPase (1 mg/ml) behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und der apoptotische Zelltod ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe.

Wie aus dem Kontrollversuch ersichtlich wurde, hatte keines der eingesetzten Enzyme – ATPase und alkalische Phosphatase – protektive oder schädigende Effekte auf die Zellkulturen.

Die Untersuchungen zum Einfluss der ATPase auf die Effekte von VEGF verliefen nach demselben Protokoll wie der unter 3.8.1 beschriebene Versuch. Vor der Behandlung der Zellen wurde VEGF mit der entsprechenden Konzentration an ATPase vorinkubiert und erst dann direkt in das serumfreie Medium gegeben.

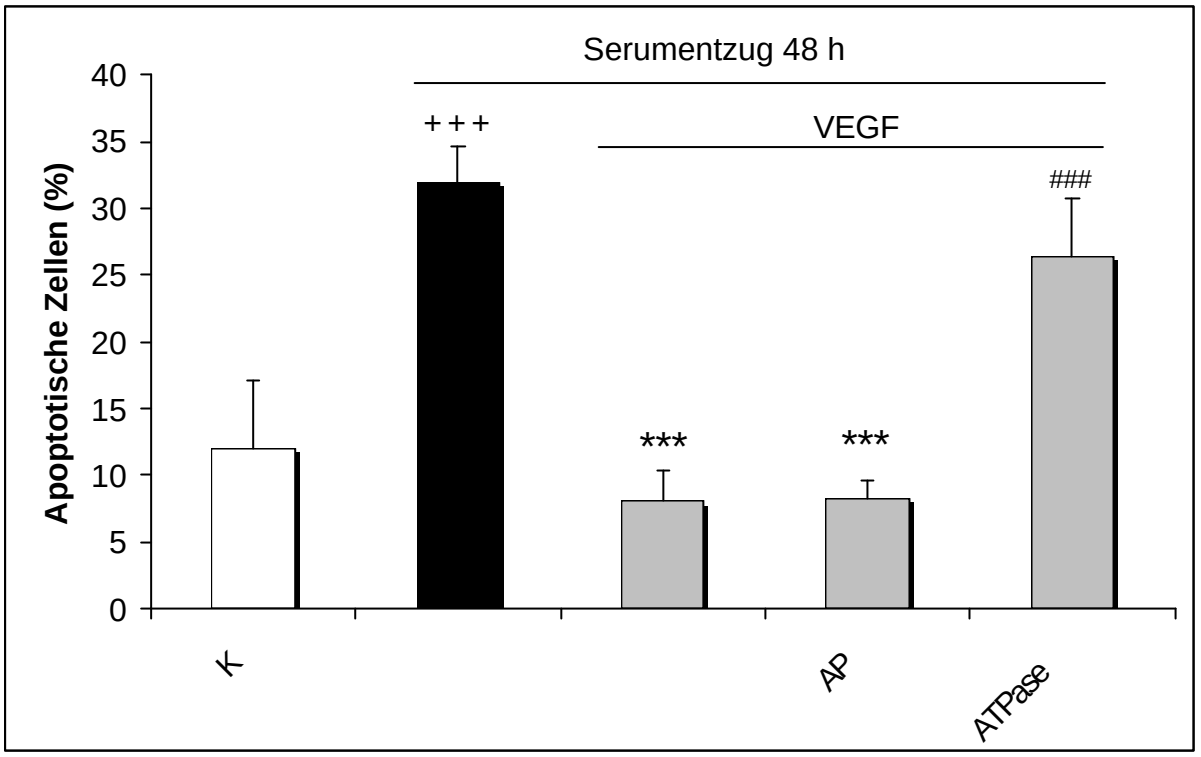


Abb. 3-31: Einfluss von alkalischer Phosphatase und ATPase auf den protektiven Effekt von VEGF

Alkalische Phosphatase (AP; 800 ng/ml) und ATPase (1 mg/ml) wurden zeitgleich zu VEGF (100 ng/ml) ins serumfreie Medium der Kulturgefäße gegeben. Nach 48 h wurden die HUVECs mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ± S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) mit serumhaltigem Medium; ***p<0,001 im Vergleich zur mit Serumentzug geschädigten Kontrolle (S); $^{###}p<0,001$ gegenüber der mit VEGF behandelten Gruppe (Varianzanalyse, Scheffétest).

Durch Behandlung mit VEGF und der Kombination von VEGF und alkalischer Phosphatase ließen sich die Zellen gut vor der durch Serumentzug ausgelösten Schädigung schützen. Bei Anwesenheit von ATPase und VEGF war kein protektiver Effekt des Wachstumsfaktors zu erkennen.

3.9.4 Untersuchungen zu den Effekten von VEGF in hippokampalen Primärkulturen

Um auszuschließen, dass sich die Unterschiede in den Beobachtungen mit VEGF im Vergleich zu denen der beiden Neurotrophine NGF und BDNF durch die andersartige Schädigungsmethode und die unterschiedlichen Zellkultur-Systeme erklären lassen, wurde die Kombinationsbehandlung VEGF mit alkalischer Phosphatase auch an hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten durchgeführt. Obwohl VEGF eine neuroprotektive Wirkung gegenüber Staurosporin induzierter Apoptose abgesprochen wird (Svensson *et al.,* 2002), konnte in unserem Modell eine deutliche schützenden Wirkung des Wachstumsfaktors beobachtet werden. Hierbei wurde eine Konzentration von 200 ng/ml VEGF eingesetzt. Als direkter Vergleich wurden Zellkulturen mit BDNF bzw. BDNF und alkalischer Phosphatase behandelt.

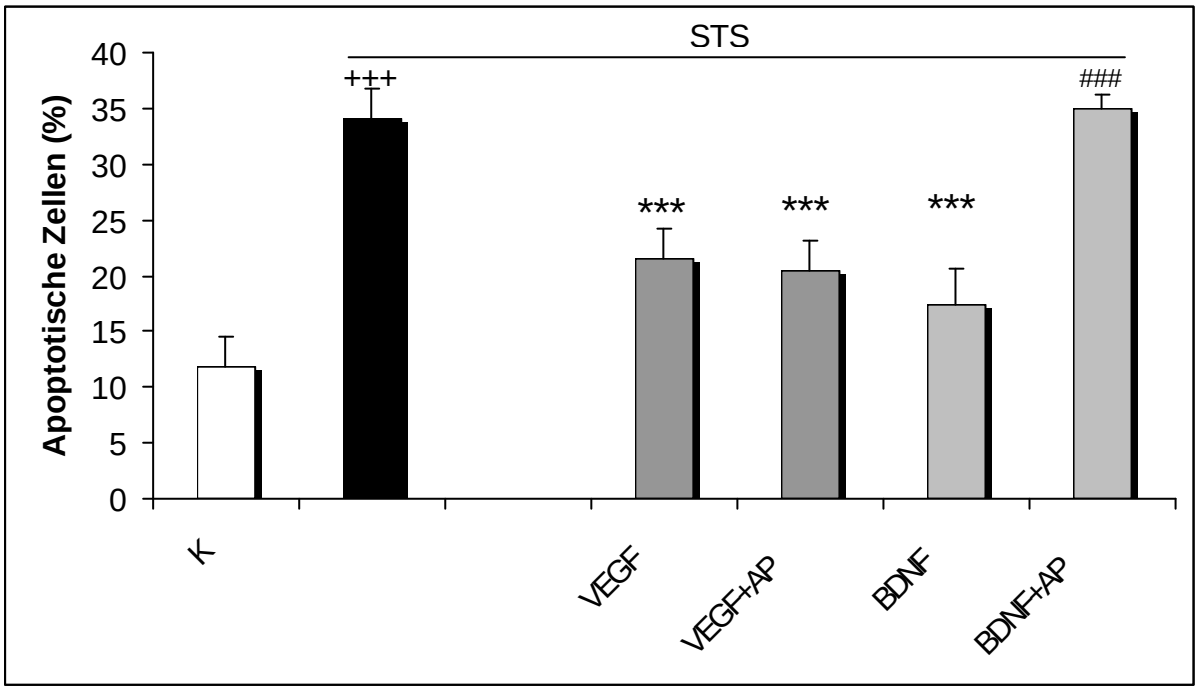


Abb. 3-32: Überprüfung des VEGF-Befundes in einer hippokampalen Primärkultur neonataler Ratten mit BDNF als Kontrolle

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag mit VEGF (200 ng/ml) oder BDNF (200 ng/ml) und in den entsprechenden Gruppen mit 800 ng/ml alkalischer Phosphatase (AP) 1 h vor Staurosporinzugabe (STS; 200 nM) behandelt. Nach 20 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und der Anteil der apoptotischen Kerne ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K); $^{###}$p<0,001 im Vergleich zur BDNF-behandelten Gruppe; ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporin-Gruppe; (Varianzanalyse, Scheffétest).

VEGF ist in der Lage, hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten vor Staurosporin induzierten Schädigungen zu schützen.
Die Beobachtungen, die mit VEGF an der HUVEC-Zelllinie gemacht wurden, bestätigten sich auch in der Primärkultur: im Gegensatz zu den Neurotrophinen besteht die protektive Wirkung von VEGF auch bei simultaner Behandlung mit alkalischer Phosphatase weiter.

3.9.5 Wirkung von VEGF auf P-Akt und P-ERK 1/2

Die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden lässt sich an einer gesteigerten Phosphorylierung von P-Akt sowie P-ERK 1/2 erkennen. Durch eine Western-Blot-Analyse wurde der Effekt von VEGF bzw. VEGF und alkalischer Phosphatase auf die Kaskadenproteine überprüft.

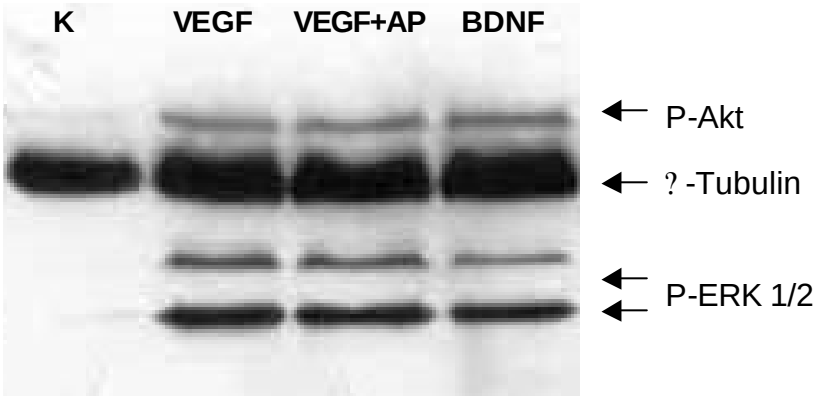


Abb. 3-33: Untersuchung von P-Akt und P-ERK 1/2 nach Behandlung mit VEGF, VEGF und AP sowie BDNF im Western Blot

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden für 7 min mit VEGF oder BDNF (jeweils 200 ng/ml) und in der entsprechenden Gruppe simultan mit alkalischer Phosphatase (AP; 800 ng/ml) behandelt. Es wurden 30 µg Gesamtprotein aufgetragen, die Verdünnung der Antikörper betrug 1:1000 (P-Akt) bzw. 1:1500 (P-ERK 1/2).

Die Signalkaskaden-Proteine P-Akt und P-ERK 1/2 werden durch die Behandlung mit VEGF aktiviert. Eine simultane Behandlung mit alkalischer Phosphatase hat keinen reduzierenden Einfluss auf die verstärkte Phosphorylierung.

3.10 Dünnschichtchromatographie mit Phospho-Aminosäuren

Um durch einen Vergleich des Laufverhaltens zwischen den einzelnen Phospho-Aminosäuren und dem zuvor mit [?-^{32}P]ATP phosphorylierten und hydrolysierten BDNF Rückschlüsse auf die Phosphorylierungsstelle des Proteins ziehen zu können, wurde eine dünnschichtchromatographische Untersuchung durchgeführt. Hierfür wurde selbst exprimiertes BDNF aus *E. coli* verwendet. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung wurde davon ausgegangen, dass in dem *E. coli*-Lysat aktives BDNF vorliegt. Da sich erst zu einem späteren Zeitpunkt herausstellte, dass aufgrund der Existenz von *inclusion bodies* kein biologisch wirksames BDNF enthalten war, können keine auswertbaren Ergebnisse aus diesem Experiment gezogen werden. Die folgende Darstellung soll daher lediglich Anhaltspunkte für kommende Untersuchungen liefern.

Auf jede Probe der Phospho-Aminosäuren wurden jeweils 6x1 µl des *E. coli*-Lysats auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Dieses *„Spiken“* soll die gegenseitige Beeinflussung des Laufverhaltens des phosphorylierten *E. coli*-Lysats und den einzelnen Phospho-Aminosäuren berücksichtigen.

Nach der Entwicklung der radioaktiven Signale per Phospho-Imager bzw. der Aminosäure-Flecken durch Aufsprühen einer Ninhydrin-Lösung wurde ein Vergleich des Laufverhaltens durchgeführt.

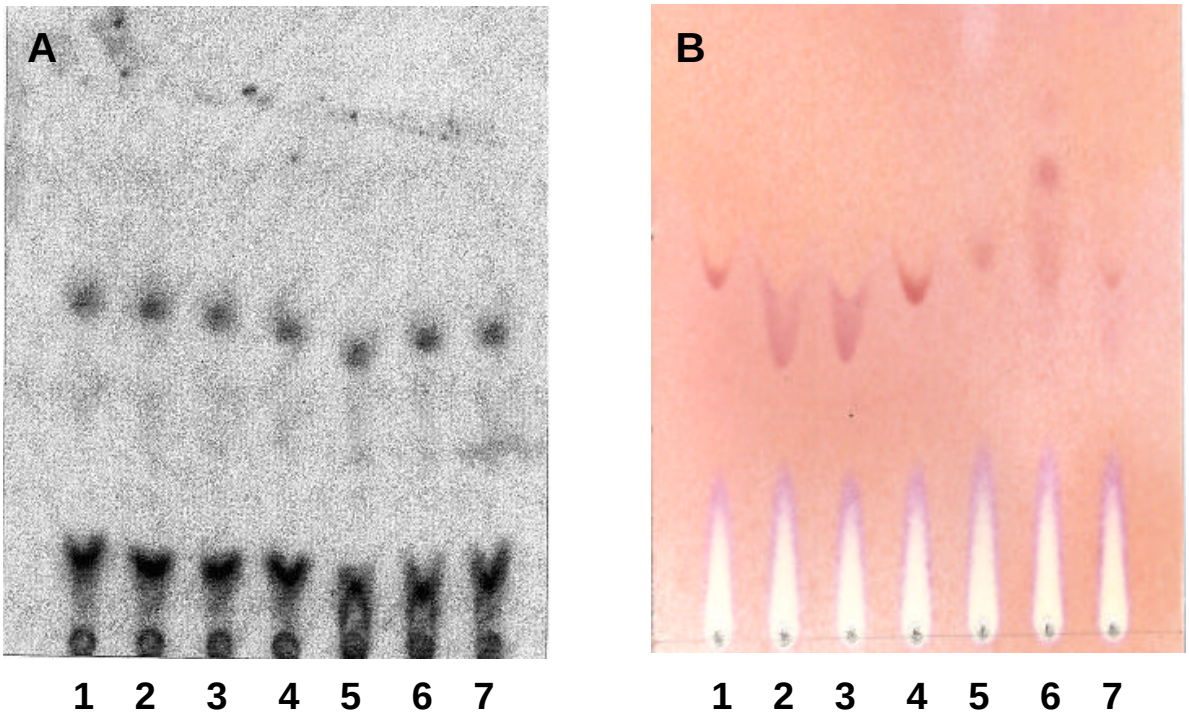


Abb. 3-34: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Phospho-Aminosäuren

A: Detektion der radioaktiven Signale im Phospho-Imager; B: DC-Platte nach Färbung der Aminosäure-Punkte durch Ninhydrin-Lösung. Aufgetragen wurden jeweils 0,5 µl der Aminosäuren-Lösungen (2 mg/ml): 1: P-Arginin; 2: P-Serin; 3: P-Threonin; 4: P-Tyrosin; 5: P-Histidin; 6: P-Lysin; 7: Mix aus 1-6; auf alle Spots wurde hydrolysiertes, zuvor radioaktiv markiertes *E. coli*-Lysat (6x1 µl) aufgetragen. Fließmittel: 68 Teile Ethanol (85%) und 32 Teile Ammoniak (25%); DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F_{245}.

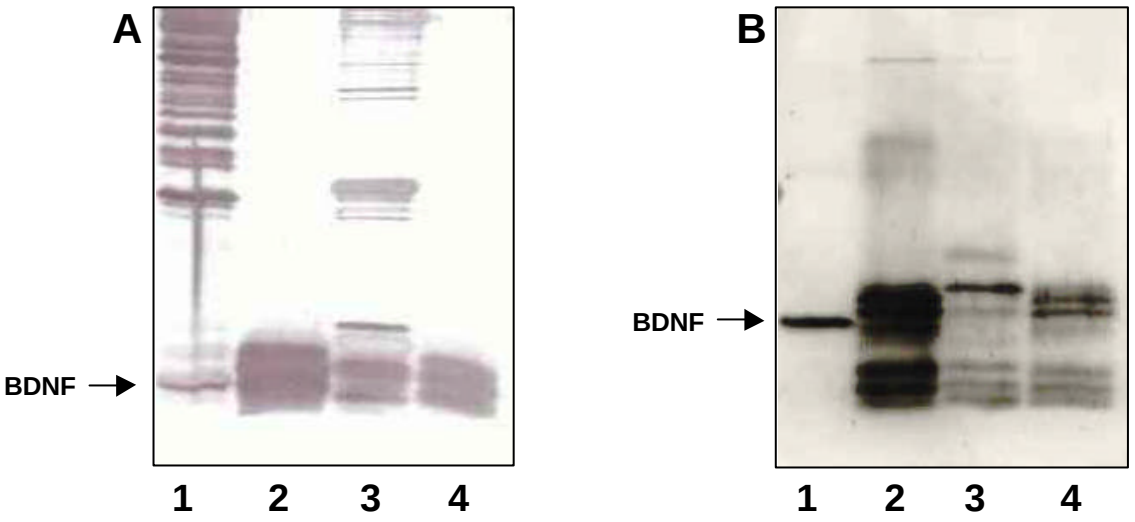
Beim Vergleichen der radioaktiven Signale des *E. coli*-Lysats mit den Aminosäure-Punkten zeigte sich, dass die Laufstrecke des Phospho-Histidins ungefähr jener des radioaktiven Signals entsprach. Die Laufstrecken der anderen Phospho-Aminosäuren wichen von den dazugehörigen Signalen des Phospho-Images ab.

3.11 Untersuchungen zu BDNF-WT aus *E. coli*

Im Arbeitskreis Klumpp wurde von Frau Dipl.-Biotechnologin Anja Hasche mit Hilfe eines BDNF-Plasmids in *E. coli*-Bakterien ein BDNF-Wildtyp sowie eine BDNF-Mutante exprimiert, bei der der Lysinrest an Position 50 gegen Alanin ausgetauscht wurde (K50A). Das so selbst produzierte Protein sollte in hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten auf seine biologische Aktivität hin getestet werden. Erst im Laufe der hier gezeigten Untersuchungen wurde aufgrund einer fehlenden neuroprotektiven Wirkung der BDNF-Proteinlösung erkannt, dass kein freies, biologisch aktives BDNF vorlag und eine Änderung der Expressionsmethode notwendig war. Die Versuche, die auf diese Erkenntnis hinwiesen, sollen im Folgenden dargestellt werden.

3.11.1 Reinheit des exprimierten Proteins

Die Reinheit des exprimierten Proteingemisches wurde mittels Silbergel untersucht. Außerdem wurde ein Western Blot angefertigt, der mit einem BDNF-Antikörper inkubiert wurde. Die Angaben zur eingesetzten Proteinmenge beziehen sich auf den Gesamtprotein-Gehalt des *E. coli*-Lysats.



1. BDNF (Acris)
2. BDNF-Probe aus *E. coli* BL 21 (DE3)
3. BDNF-Probe aus *E. coli* Origami B
4. Probe der BDNF-Mutante K50A

Abb. 3-35: Silbergel (A) und Western Blot (B) zur Untersuchung des exprimierten BDNFs
(A) Für das Silbergel wurden kommerziell erworbenes BDNF (Acris, 40 ng; enthält 0,1% BSA), BDNF-Proteinlösung aus *E. coli* BL 21 (DE3) (500 ng), BDNF-Proteinlösung aus *E. coli* Origami B (500 ng) und eine Probe der BDNF-Mutante K50A (500 ng) elektrophoretisch aufgetrennt und durch die proteintypische Reduktion von Silberionen sichtbar gemacht.
(B) Für die Analyse durch einen Western Blot wurden BDNF (Acris, 60 ng), BDNF-Proteinlösung aus *E. coli* BL 21 (DE3) (1 µg), BDNF-Proteinlösung aus *E. coli* Origami B (1 µg) und eine Probe der BDNF-Mutante K50A (1 µg) ebenfalls durch Elektrophorese getrennt und anschließend mit einem anti-BDNF-Antikörper (1:500) inkubiert.

Das Silbergel zeigt, dass die Reinigungsschritte bei der BDNF-Proteinlösung aus *E. coli* BL 21 und der Probe der Mutante K50A effektiv waren. Die Verunreinigungen beim kommerziell erworbenen BDNF (Acris) stammen von einem 0,1%igen BSA-Zusatz, der vom Hersteller zur Stabilitätsgewährleistung empfohlen wird. Das Lysat aus *E. coli* Origami B wird von einer Vielzahl an Fremdproteinen begleitet.
Bei der Western Blot-Analyse erkennt man nur in der Spur des gekauften BDNFs eine einzelne Bande, die selbst exprimierten Proteinlösungen enthalten offensichtlich unterschiedliche Neben- oder Zwischenprodukte, die für das Auftauchen mehrerer Banden verantwortlich sind. Erklärend sei hier angemerkt, dass der verwendete BDNF-Antikörper gegen die Aminosäuren 130-247 der humanen BDNF-Sequenz gerichtet ist und daher auch Bruchstücke des Wachstumsfaktor detektieren kann.

3.11.2 Untersuchungen zur biologischen Aktivität des BDNF-WTs

Um sicherzustellen, dass die Aminosäurensequenz des selbst exprimierten BDNFs die korrekte ist, wurde es von der Firma Seqlab (Göttingen) sequenziert. Auch wurde die Phosphorylierbarkeit des Proteins im Autoradiogramm getestet. Im Arbeitskreis Klumpp wurde durch Behandlung mit [?-^{32}P]ATP gezeigt, dass sich das aus *E. coli* gewonnene Protein phosphorylieren ließ. Um darüber hinaus die biologische Aktivität zu beweisen, wurden die BDNF-Proteinlösungen in dem etablierten Staurosporin-Schädigungsmodell an hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten getestet.

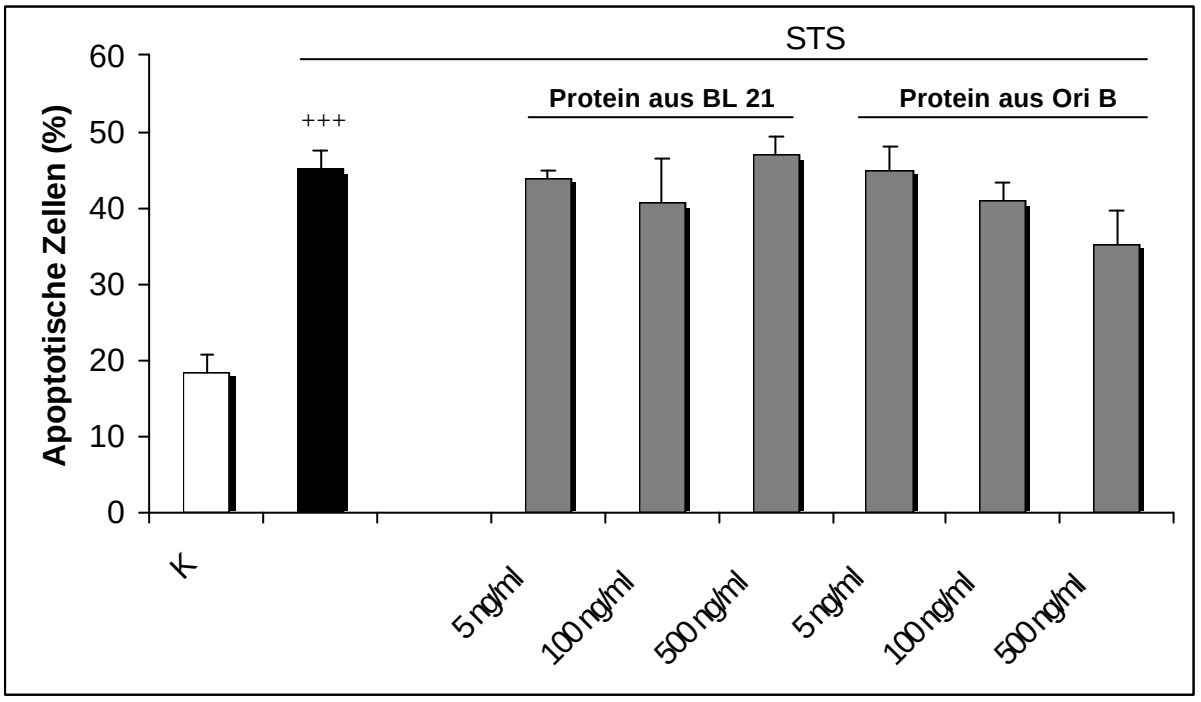


Abb. 3-36: Untersuchung des neuroprotektiven Effekts von vermeintlich rekombinantem BDNF aus unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag mit unterschiedlichen Konzentrationen der BDNF-Proteinlösungen aus *E. coli* BL 21 (DE3) („BL 21“) und *E. coli* Origami B („Ori B“) behandelt. Nach 1 h Präinkubation wurde 200 nM Staurosporin (STS) zugefügt, die Zellen nach weiteren 20 h fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Kerne ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ± S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0{,}001$ im Vergleich zur STS-unbehandelten Kontrollgruppe (K) (Varianzanalyse, Scheffétest).

Leider konnte bei der Behandlung mit den Proteinlösungen aus unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen im Konzentrationsbereich von 5 bis 500 ng/ml keine Protektion vor einer Staurosporin-Schädigung beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob der ausbleibende Effekt auf die Verwendung von zu niedrigen Konzentrationen

zurückzuführen ist, wurde in einem weiteren Versuch die eingesetzte Konzentration erhöht. Außerdem wurde zusätzlich die Mutante K50A getestet und BDNF der Firma Acris als Kontrolle eingesetzt.

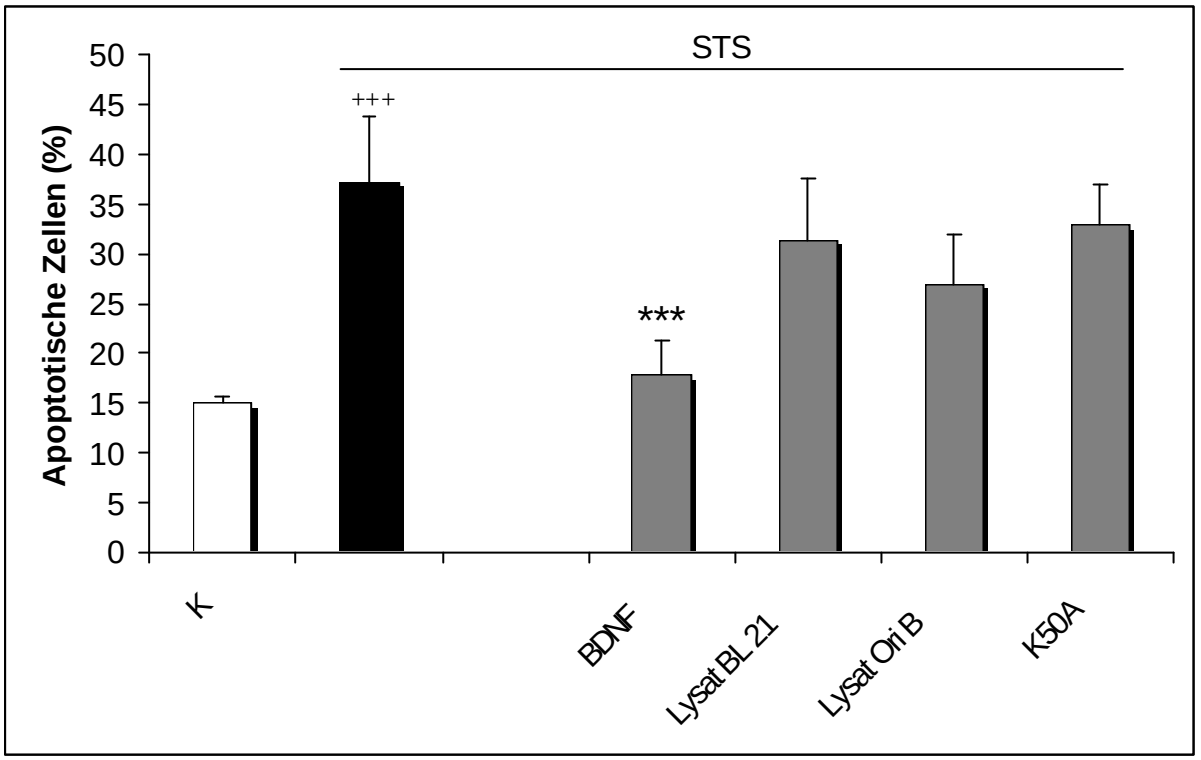


Abb. 3-37: Untersuchung des neuroprotektiven Effekts der BDNF-Proteinlösungen aus unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen und einer Mutante, im Vergleich dazu kommerziell erworbenes BDNF

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag mit jeweils 1 µg/ml BDNF-Proteinlösung aus *E. coli* BL 21 (DE3) („BL 21“), BDNF-Proteinlösung aus *E. coli* Origami B („Ori B“) und einer Proteinlösung der Mutante K50A behandelt, parallel als Kontrolle wurden 200 ng/ml BDNF (Acris) eingesetzt. Nach 1 h Präinkubation wurde 200 nM Staurosporin (STS) zugefügt, die Zellen nach weiteren 20 h fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Kerne ermittelt.
Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ± S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur STS-unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur STS-Kontrolle; (Varianzanalyse, Scheffétest).

Im etablierten Schädigungsmodell mit Staurosporin ist keine signifikante Protektion der Neurone durch Behandlung mit sehr hohen Konzentrationen der selbst exprimierten BDNF-Lösung oder der Mutante zu erkennen, während das kommerziell erworbene BDNF in einer sehr viel niedrigeren Konzentration gut wirksam ist. Diese Ergebnisse ließen uns erkennen, dass offensichtlich kein aktives BDNF in dem *E. coli*-Lysat vorlag und machten eine Änderung der Expressionsmethode notwendig.

3.11.3 Untersuchungen zu Pro-BDNF

Nachdem die ersten Expressionsversuche kein biologisch aktives BDNF hervorbrachten, wurde eine neue Methode angewandt, der die Pro-Form des Proteins zugrunde lag (Rattenholl *et al.,* 2001). Diese Pro-Sequenz unterstützt die biologisch korrekte Faltung des durch notwendige Reinigungsschritte denaturierten Wachstumsfaktors und erhöht somit die Ausbeute an biologisch aktivem BDNF bzw. Pro-BDNF. Pro-BDNF sowie das durch Trypsinspaltung generierte BDNF wurden im etablierten Schädigungsmodell auf ihre Effekte hin untersucht.

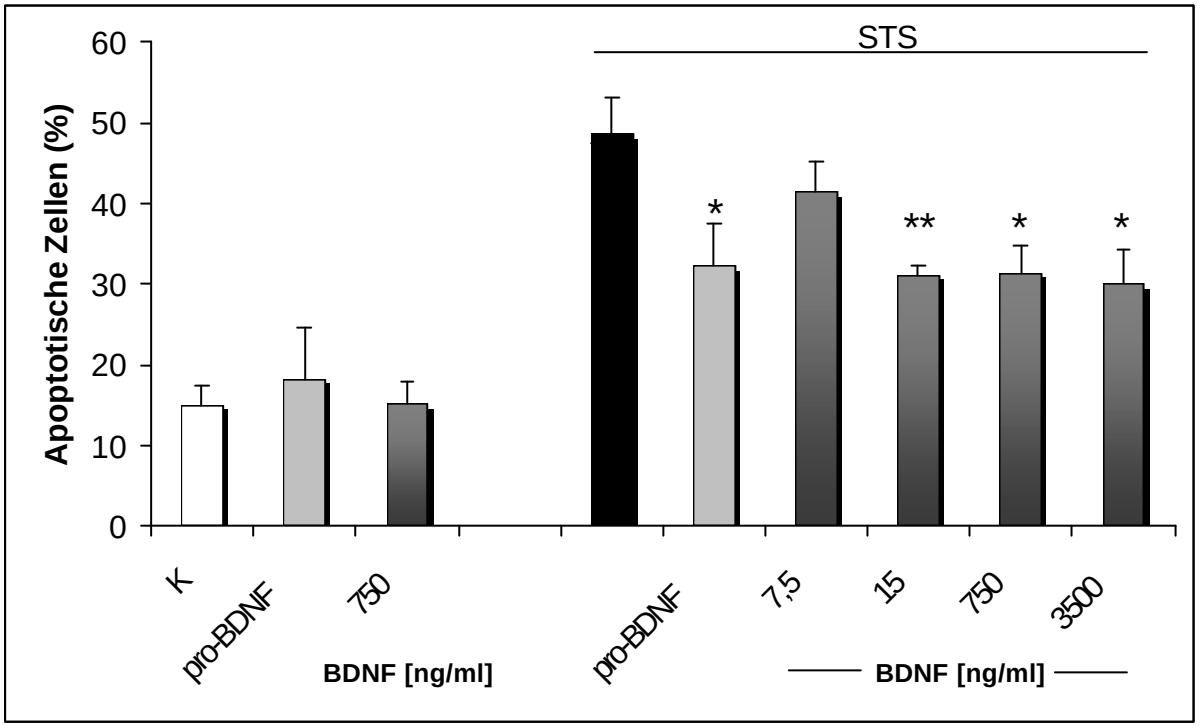


Abb. 3-38: Effekte von Pro-BDNF und BDNF

Behandlung von hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten am 7. Kulturtag, 1 h Vorinkubation mit rekombinantem BDNF-WT (unterschiedliche Konzentrationen) oder Pro-BDNF (326 ng/ml); anschließend wurde Apoptose durch Zugabe von 200 nM Staurosporin (STS) ausgelöst, nach 20 h erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 4 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K); **p<0,01; *p<0,05 im Vergleich zur Staurosporin-Gruppe (Varianzanalyse, Scheffétest).

Es lassen sich deutliche neuroprotektive Effekte sowohl des BDNFs, als auch des Pro-BDNFs erkennen. Beide Proteine übten keine schädigende Wirkung auf die Neurone aus.

3.12 Untersuchungen zu selbst exprimiertem NGF und Pro-NGF

3.12.1 Reinheit des exprimierten Pro-NGFs

Ebenfalls von Frau Dipl.-Biotechnologin Anja Hasche wurde NGF bzw. Pro-NGF exprimiert und gereinigt, wobei sich auch hier im Autoradiogramm eine Autophosphorylierung bei Zugabe von [?-^{32}P]ATP erkennen ließ. Zunächst wurde die Reinheit der rekombinanten Proteine im Silbergel überprüft.

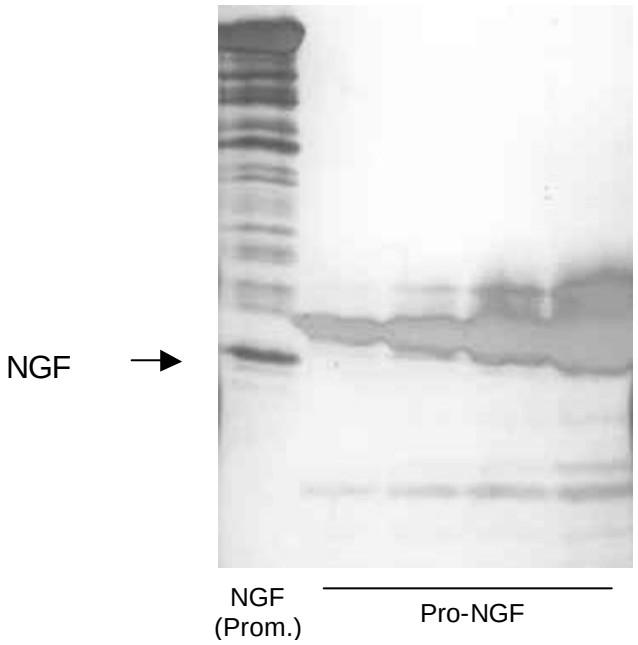


Abb. 3-39: **Silbergel mit NGF (Promega) und selbst exprimiertem Pro-NGF (Arbeitskreis Klumpp)**

600 ng NGF (Promega, mit 0,1% BSA) und selbst exprimiertes Pro-NGF in den Konzentrationen 1 bis 10 µg wurden im Silbergel miteinander verglichen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die aus *E. coli* Rosetta gewonnene Pro-NGF-Proteinlösung kaum Fremdproteine enthält.

3.12.2 Biologische Aktivität des NGF-WTs

Das selbst exprimierte NGF sollte ebenfalls auf seine biologische Aktivität hin in der Zellkultur getestet und die Neuroprotektion bei Staurosporinschädigung nachgewiesen werden.

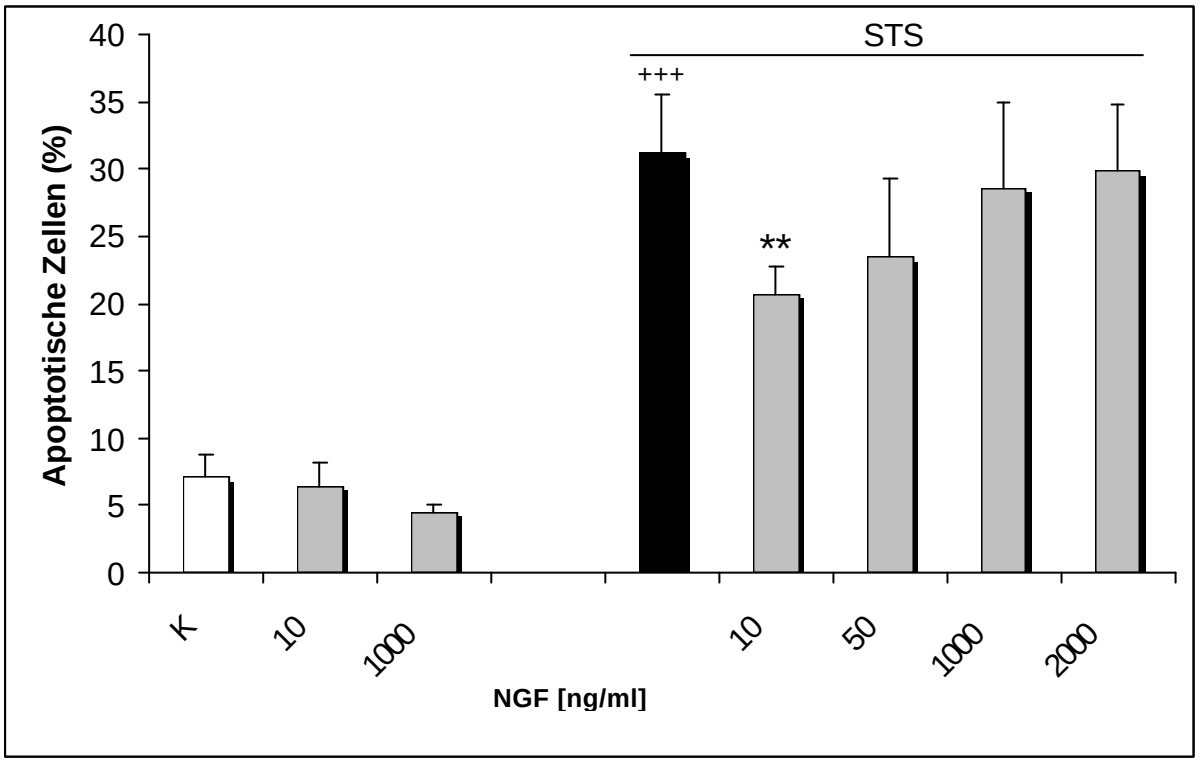


Abb. 3-40: Untersuchung des neuroprotektiven Effekts von selbst exprimiertem NGF aus *E. coli*
Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag mit unterschiedlichen Konzentrationen des NGF aus *E. coli* Rosetta behandelt. Nach 1 h Präinkubation wurde 200 nM Staurosporin (STS) zugefügt, die Zellen nach weiteren 20 h fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Kerne ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ± S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur STS-unbehandelten Kontrollgruppe (K); **p<0,01 im Vergleich zur Staurosporin-Gruppe (Varianzanalyse, Scheffétest).

Erstaunlicherweise zeigt das selbst exprimierte NGF in niedrigen Konzentrationen eine deutliche Neuroprotektion gegenüber der Staurosporin-induzierten Apoptose, während bei höheren Konzentrationen die Schädigungsrate wieder zunimmt. Da kommerziell erworbenes NGF (Promega und Sigma) auch in sehr hohen Konzentrationsbereichen getestet wurde und keine schädigende Wirkung erkennen ließ, kann ein allgemein schädigender Effekt durch hohe Wachstumsfaktor-Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Die Ursache für die zunehmende Schädigung der Zellen bei höheren Konzentrationen könnte ein hoher Endotoxin-Gehalt der Protein-Lösung sein. Um dies zu überprüfen, wurde der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL) durchgeführt.
Der Test auf Endotoxine fiel deutlich positiv aus, so dass der toxische Effekt auf die Neurone möglicherweise durch die hohen Endotoxin-Konzentrationen in der Protein-Lösung zurückzuführen sind.
Die Empfindlichkeit des LAL-Tests beträgt laut Hersteller 0,03 Endotoxin-Einheiten pro ml (EU/ml), so dass unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte eine Konzentration von mindestens 3 EU/ml in der untersuchten NGF-Lösung vorliegt.

3.13 Untersuchungen zu weiteren Wachstumsfaktoren

Nachdem festgestellt worden war, dass Mitglieder unterschiedlicher Wachstumsfaktor-Familien auch unterschiedlich auf Einwirken von dephosphorylierenden Substanzen reagieren, war es weiter von Interesse, welche Wachstumsfaktoren, außer den bisher beschriebenen und intensiv untersuchten, interessant im Sinne einer Aktivierung durch reversible Phosphorylierung und/oder ATP-Bindung sein könnten. Als untersuchenswert schienen uns Faktoren zu sein, deren neuroprotektive Effekte bewiesen und dokumentiert und die kommerziell erhältlich sind.

3.13.1 Untersuchungen zu EGF

Zunächst wurde EGF auf seine neuroprotektive Wirkung getestet.

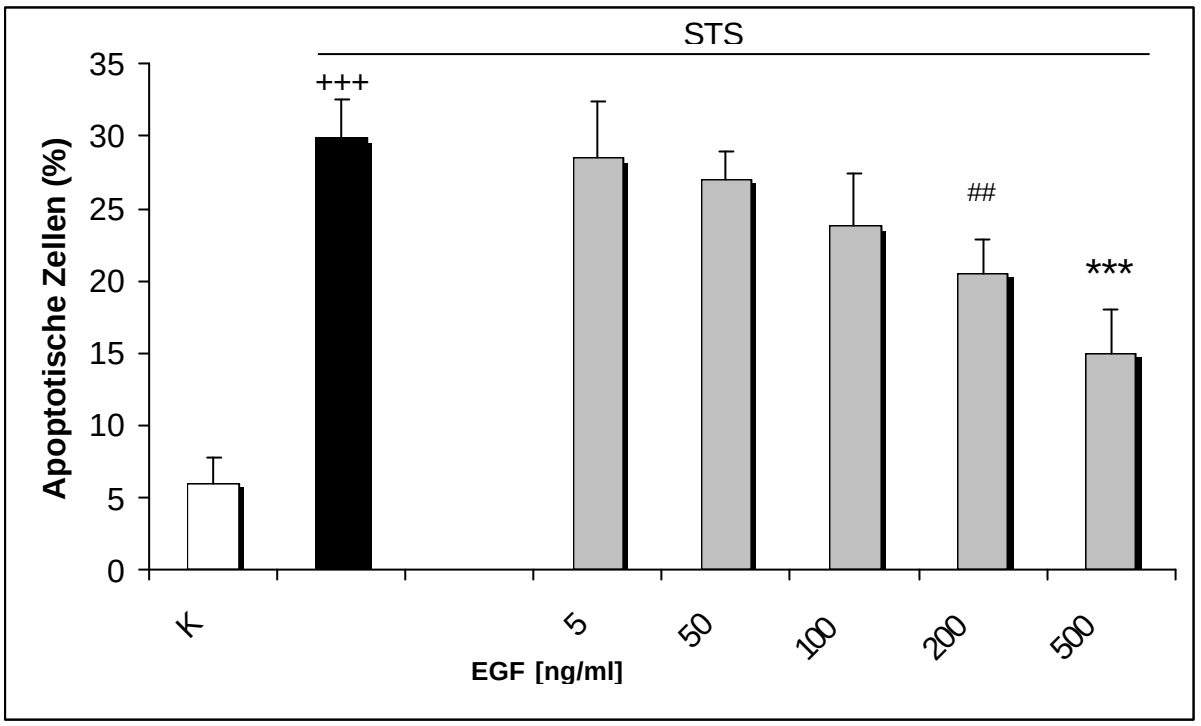


Abb. 3-41: Neuroprotektive Wirkung von EGF

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag mit unterschiedlichen Konzentrationen EGF behandelt. Der apoptotische Zelltod wurde 1 h nach Wachstumsfaktor-Behandlung durch 200 nM Staurosporin (STS) induziert. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und die apoptotischen Nuclei erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur STS-unbehandelten Kontrollgruppe (K); $^{\#\#}p<0,01$ im Vergleich zur STS-Kontrolle; ***p<0,001 im Vergleich zur STS-Kontrolle; (Varianzanalyse, Scheffétest).

Im untersuchten Konzentrationsbereich war EGF in der Lage, ab einer Konzentration von 200 ng/ml die Staurosporin-induzierte Schädigung der Neurone deutlich aufzuheben.

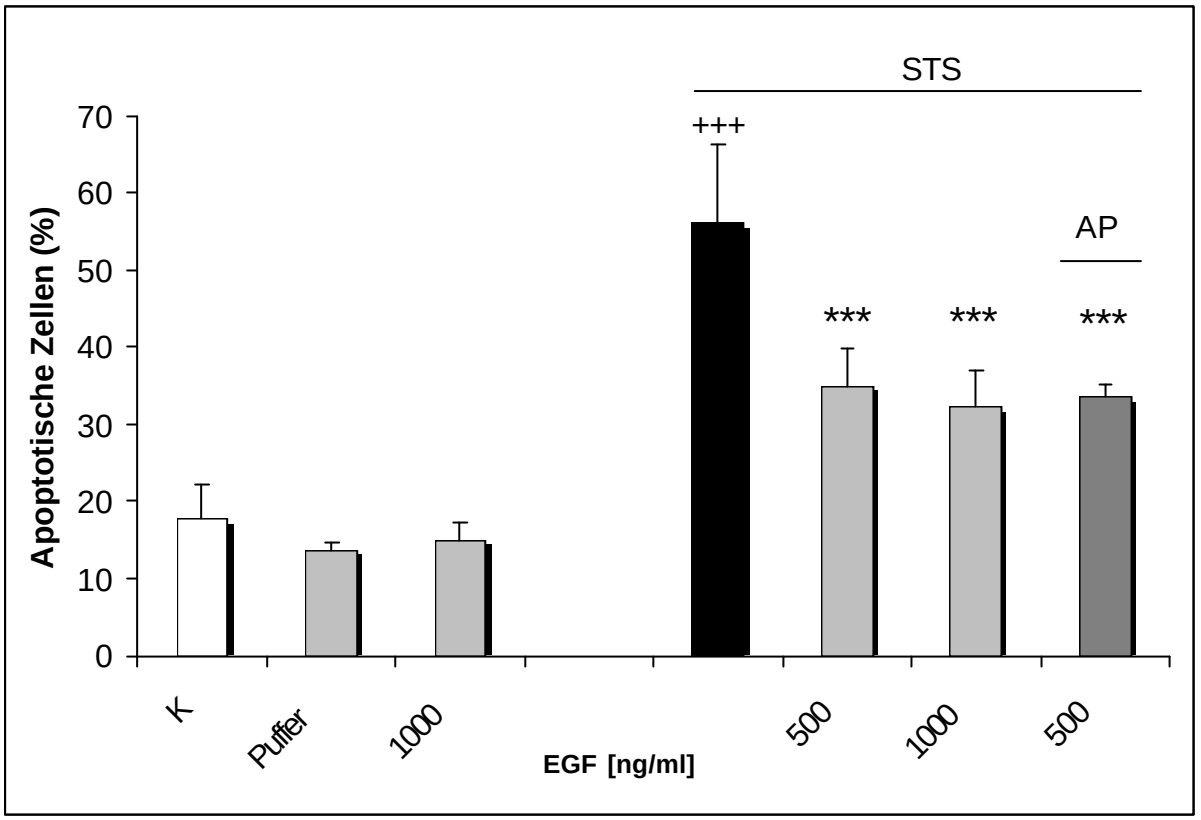


Abb. 3-42: Einfluss von alkalischer Phosphatase auf den neuroprotektiven Effekt von EGF
Alkalische Phosphatase (AP) wurde zeitgleich zu EGF (500 und 1000 ng/ml) in einer Konzentration von 800 ng/ml ins Medium der Kulturgefäße gegeben. Um schädigende Effekte des Puffers (10 mM Essigsäure + 0,1% BSA), in dem EGF gelöst wurde, auszuschließen, wurde eine Gruppe nur mit der entsprechenden Menge Puffer behandelt. 1 h später fand die Apoptoseinduktion durch Zugabe von 200 nM Staurosporin (STS) statt, die nach 20 h durch Fixierung und Färbung der Zellen beendet wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K); ***p<0,001 im Vergleich zur Staurosporin behandelten Gruppe (Varianzanalyse, Scheffétest).

Der vom Hersteller empfohlene Lösungspuffer (10 mM Essigsäure + 0,1% BSA) hatte keinen schädigenden Effekt auf hippokampale Neurone. Des Weiteren lässt sich ein deutlicher neuroprotektiver Effekt von EGF nach Staurosporin-Schädigung beobachten. Simultane Behandlung mit alkalischer Phosphatase hat keine Auswirkung auf die schützende Wirkung des Wachstumfaktors.

3.13.2 Untersuchungen zu IGF

Als Anhaltspunkt für die eingesetzte Konzentration dienten bereits veröffentlichte Daten über neuroprotektive Effekte des IGFs (Azcoitia *et al.,* 1999).

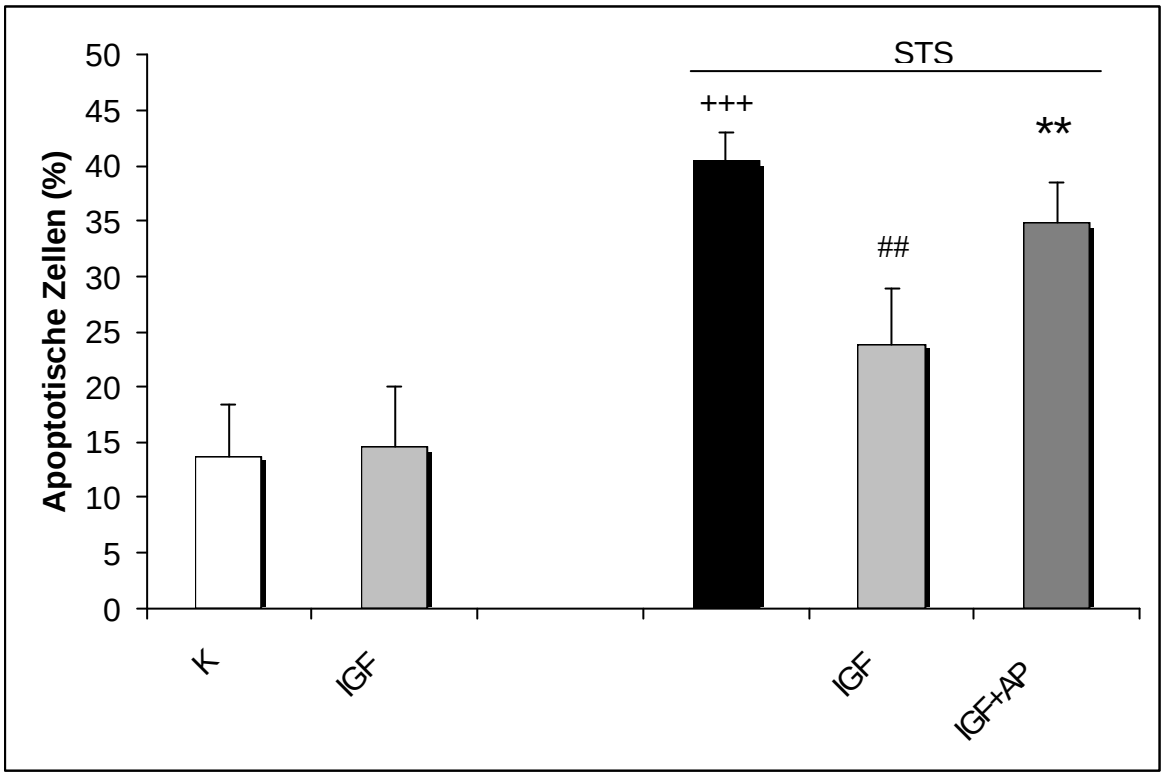


Abb. 3-43: Simultane Behandlung mit IGF und alkalischer Phosphatase

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag 1 h vor der Staurosporinbehandlung (STS; 200 nM) mit IGF in einer Konzentration von 100 ng/ml, die entsprechende Gruppe simultan mit 800 ng/ml alkalischer Phosphatase (AP) behandelt. 20 h später wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und das Verhältnis der apoptotischen zu den gesunden Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ohne IGF-Behandlung (K); $^{\#\#}p<0,01$ im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle ohne IGF-Behandlung; **p<0,01 im Vergleich zur Staurosporingruppe mit IGF-Behandlung (Varianzkontrolle, Scheffétest).

Die Untersuchungen zu IGF ergaben, dass dieser Wachstumsfaktor an hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten bei Staurosporin-induzierter Apoptose protektiv wirkt. Dieser schützende Effekt ist bei einer simultanen Behandlung mit alkalischer Phosphatase nicht mehr nachweisbar.

3.13.3 Untersuchungen zu G-CSF

Für die Experimente mit G-CSF wurde die protektiv wirksame Dosis aus der Publikation von Schneider *et al.* (2005) übernommen und auch in unserem Modell für wirksam befunden.

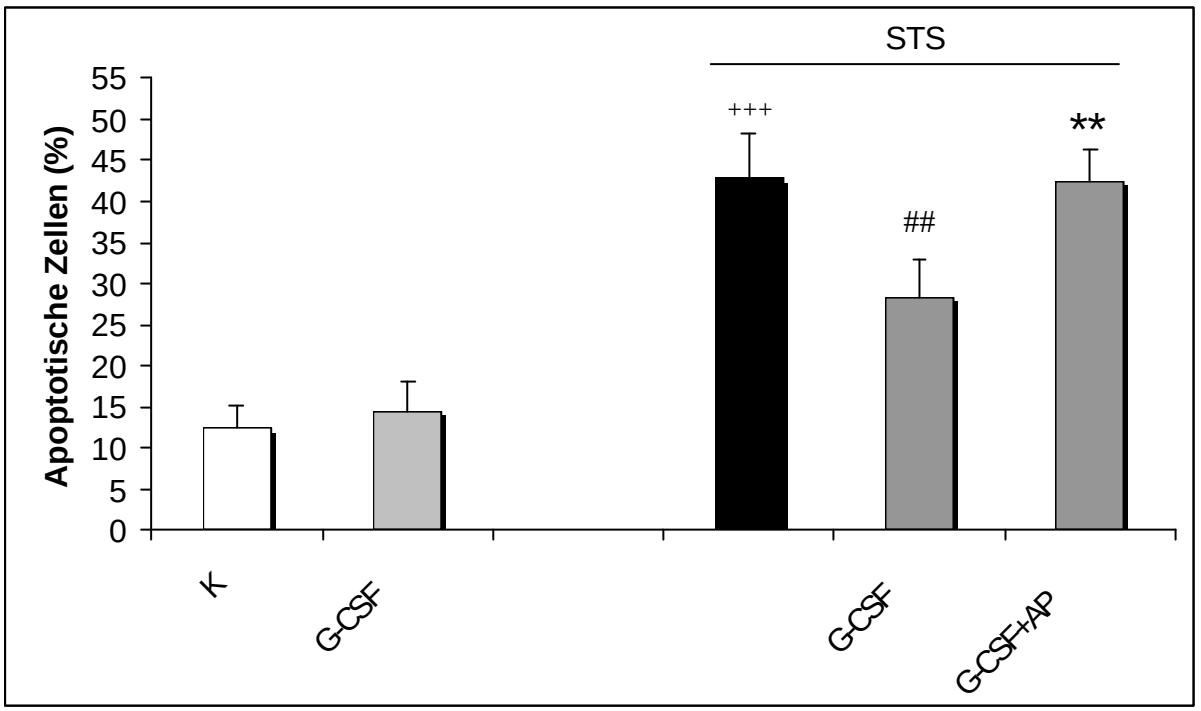


Abb. 3-44: Wirkung von G-CSF und alkalischer Phosphatase bei Staurosporin-Schädigung
Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag 1 h vor der Behandlung mit Staurosporin (STS) mit G-CSF in einer Konzentration von 480 ng/ml, die entsprechende Gruppe simultan mit 800 ng/ml alkalischer Phosphatase (AP) behandelt. 20 h später wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und das Verhältnis der apoptotischen zu den gesunden Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur Kontrolle ohne G-CSF-Behandlung (K); $^{\#\#}p<0,01$ im Vergleich zur Staurosporin-Kontrolle (ohne G-CSF-Behandlung), **p<0,01 im Vergleich zur Staurosporingruppe mit G-CSF-Behandlung; (Varianzkontrolle, Scheffétest).

Während G-CSF eine deutliche Protektion vor der apoptotischen Schädigung vermittelt, wird bei gleichzeitigem Einwirken von alkalischer Phosphatase die neuroprotektive Wirkung aufgehoben.

3.13.4 Untersuchungen zu CNTF

Als Orientierung für die eingesetzte Konzentration in den Neuroprotektionsversuchen mit CNTF dienten Daten von Semkova *et al.* (1999).

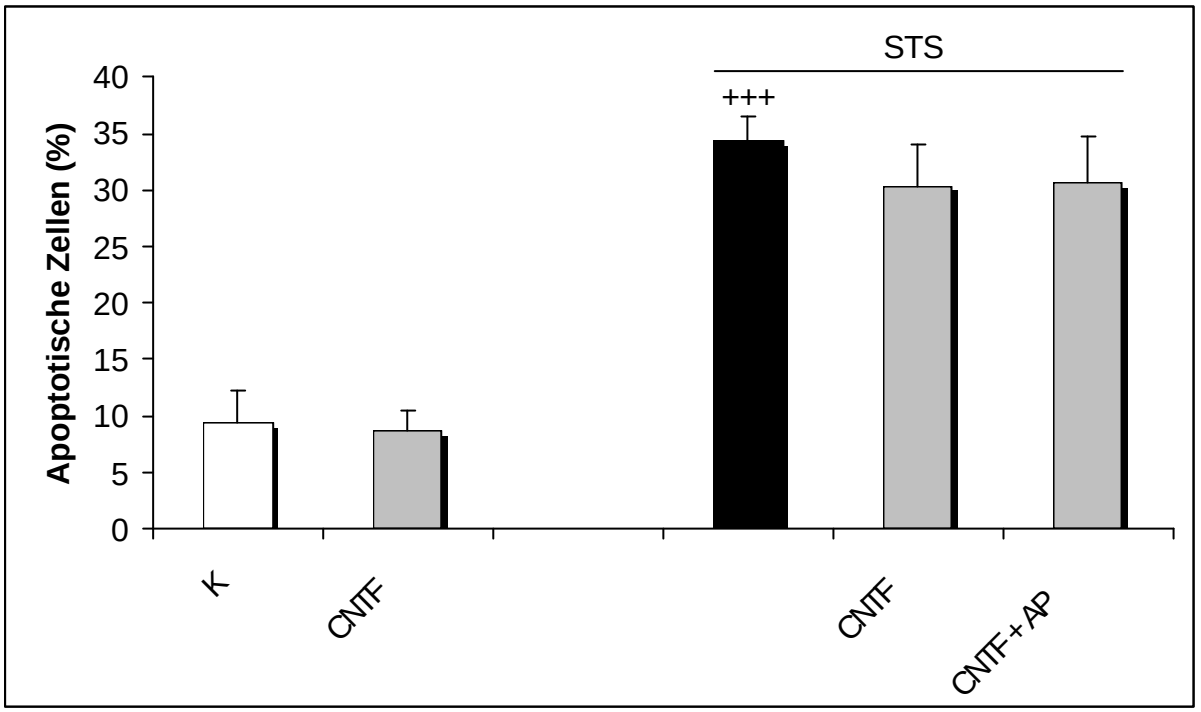


Abb. 3-45: Untersuchung von Effekten des CNTF

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag 1 h vor der Behandlung mit 200 nM Staurosporin (STS) mit CNTF in einer Konzentration von 200 ng/ml, die entsprechende Gruppe simultan mit 800 ng/ml alkalischer Phosphatase (AP) behandelt. 20 h später wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und das Verhältnis der apoptotischen zu den gesunden Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ± S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) (Varianzkontrolle, Scheffétest).

CNTF war in der applizierten Konzentration in dem hier angewandten Modell nicht neuroprotektiv wirksam. Effekte durch einen Einfluss der alkalischer Phosphatase ließen sich daher nicht beobachten.

3.13.5 Untersuchungen zu TGF?-1

Als Anhaltspunkt dienten die Experimente von Zhu *et al.* (2002).

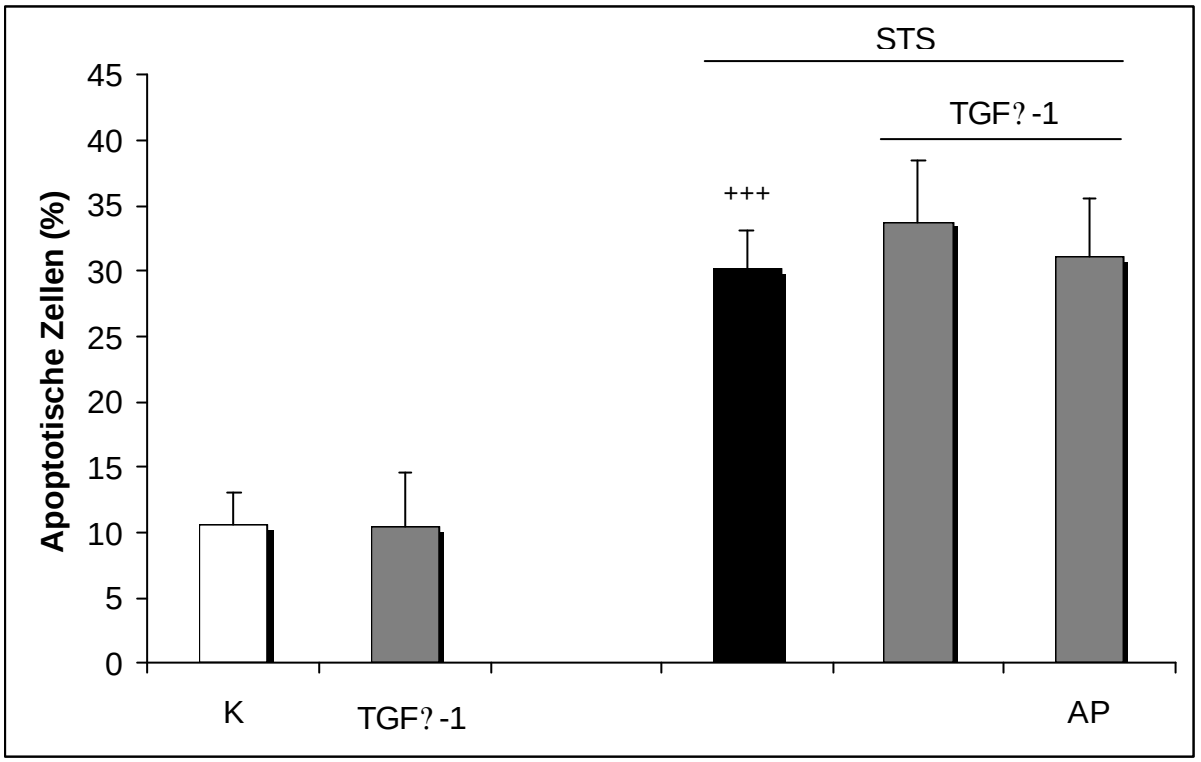


Abb. 3-46: Untersuchung von Effekten des TGF?-1

Hippokampale Primärkulturen neonataler Ratten wurden am 7. Kulturtag 1 h vor der Behandlung mit 200 nM Staurosporin (STS) mit TGF?-1 in einer Konzentration von 50 ng/ml, die entsprechende Gruppe simultan mit 800 ng/ml alkalischer Phosphatase (AP) behandelt. 20 h später wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und das Verhältnis der apoptotischen zu den gesunden Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent ? S.D. aus 5 Kulturen pro Gruppe. $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) (Varianzkontrolle, Scheffétest).

Es lässt sich keine Reduktion der apoptotischen Schädigung durch Behandlung mit TGF-?1 erkennen, so dass angenommen werden muss, dass TGF-?1 in unserem System keine Effekte ausübt.

4 Diskussion

4.1 Schädigungsmodelle und neuronale Primärkultur

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, physiologische Prozesse oder pathophysiologische Situationen *in vitro* nachzuahmen und gezielt einzelne Aspekte zu untersuchen: einerseits unter Zuhilfenahme von Zelllinien und andererseits durch Verwendung von Primärkulturen.

Zelllinien haben den Vorteil, dass sie leicht zu handhaben sind, große Mengen an Zellmaterial liefern und meist relativ unempfindlich gegenüber äußeren Einflüssen wie z. B. Temperaturschwankungen oder Erschütterungen sind. Dennoch muss man sich im Umgang mit Zelllinien bewusst darüber sein, dass während einer oft jahrelangen Kultivierung der Zellen bestimmte Transformationen und somit mitunter große Unterschiede zur Originalkultur entstanden sein können (Engelholm *et al*., 1985). Die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der einzelnen Versuche ist daher unter Umständen nicht gewährleistet.

Im Vergleich zu den Zelllinien ist die Empfindlichkeit der Primärkulturen erheblich höher und kleinste Fehler in der Präparationstechnik führen zu unbrauchbaren Zellkulturen. Da die gewonnenen Zellen jedoch direkt aus einem lebenden Organismus stammen, spiegeln sie die physiologische *in vivo* Situation wesentlich besser wider, als das in Zelllinien der Fall ist.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurde teilweise mit neuronalen und endothelialen Zelllinien, in der Hauptsache jedoch mit hippokampalen und kortikalen Primärkulturen neonataler Ratten gearbeitet. Diese wurden jeweils am 7. Kulturtag verwendet und wiesen zu diesem Zeitpunkt einen Neuronenanteil von 50-55% auf. Die Zusammensetzung der Mischkultur und der Anteil an nicht-neuronalen Zellen – hauptsächlich Astrozyten – wurde regelmäßig durch immunozytochemische Analytik überprüft. Hierfür wurde einerseits der astrozytenspezifische Marker GFAP (Moller *et al.*, 1978), andererseits der neuronenspezifische Marker NeuN (Wolf *et al.*, 1996) als Erst-Antikörper eingesetzt.

Die beobachteten Effekte in der hier verwendeten Zellkultur sind also nicht allein auf Neurone zurückzuführen, wie das z. B. in embryonalen Primärkulturen mit einem Neuronenanteil von ca. 95 % eher der Fall ist. Um jedoch die physiologische

Situation im Gehirn nachzuahmen, eignen sich Mischkulturen gerade wegen ihres Anteils an Glia-Zellen. So ist z. B. von Astrozyten bekannt, dass sie selbst humorale Faktoren sezernieren – darunter auch neurotrophe Stoffe wie NGF – und hierdurch die Proliferation und Vernetzung der kultivierten Zellen beeinflussen können (Carman-Krzan *et al.,* 1991).

Für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung unserer Hypothese gab es prinzipiell zwei Effekte, die sich als Anhaltspunkte für die biologische Aktivität der Wachstumsfaktoren NGF und BDNF nutzen ließen: ihre neurotrophe Wirkung und die durch sie vermittelte Neuroprotektion.

Studien zur neurotrophen Wirkungsweise des NGFs wurden überwiegend an PC12-Zelllinien durchgeführt – Zellen, die normalerweise erst durch Zusatz von NGF beginnen, sich zu differenzieren (z. B. Pang *et al.,* 1995). Da aber in früheren Experimenten in unserem Arbeitskreis beobachtet wurde, dass eine Differenzierung der PC12-Zellen teilweise auch ohne NGF-Applikation auftrat, schien uns diese Methode wenig spezifisch zu sein.

Daher konzentrierten sich unsere Untersuchungen auf die protektiven Eigenschaften der Neurotrophine. Diese neuroprotektiven Effekte sind ein unmittelbarer Beweis ihrer biologischen Aktivität und lassen sich eindeutig nachweisen und bestimmen. Für ihre Vermittlung sind vor allem die *tropomyosin-related kinase* (Trk)-Rezeptoren verantwortlich. Hierbei handelt es sich um Tyrosinkinase-Rezeptoren, die nach Ligandenbindung dimerisieren und bestimmte Signalkaskaden anstoßen. Jedoch auch die Bedeutung des Neurotrophinrezeptors p75 soll im Zusammenhang mit anti-apoptotischen Effekten an dieser Stelle nochmals betont werden: eine Interaktion zwischen Trk und p75 erhöht die Affinität der Neurotrophine für Trk und steigert somit ihre protektive Potenz (Barker und Shooter, 1994; Hantzopoulos *et al.,* 1994; Culmsee *et al.,* 2002).

Die für die Neuroprotektion verantwortliche Signaltransduktion geht vom auto-transphosphorylierten Trk-Rezeptor aus und verläuft, durch reversible Phosphorylierungen gesteuert, über Ras, Gab-1 oder IRS-1/2 bis hin zu Akt, welche durch inhibitorische Phosphorylierungen Einfluss auf die pro-apoptotischen Proteine Bad, Pro-Caspase-9 und Forkhead nimmt. In geringerem Maße werden die neuroprotektiven Signale auch über Ras, Raf, MAPK-Kinase und MAP-Kinase, welche CREB reguliert, vermittelt, was zu einer erhöhten Transkription des anti-apoptotisch wirksamen Bcl-2 führt.

Wir etablierten ein Schädigungsmodell, das es uns ermöglichte, insbesondere den Neurotrophin-vermittelten Schutz vor apoptotischem Zelltod zu beobachten.
Dabei wurde für diese Art der Schädigung der unspezifische Kinase-Inhibitor Staurosporin als Auslöser eingesetzt. Das Alkaloid Staurosporin wird aus Streptomyces-Bakterien gewonnen und wirkt inhibitorisch auf Serin/Threonin-Kinasen und Protein-Tyrosinkinasen (Lazarovici *et al.,* 1996; 1997). Vor allem die Hemmung der Proteinkinase C und der Phospholipase C ist offensichtlich für die Induktion von Apoptose verantwortlich (Bunn und Saunders, 1995; Lazarovici *et al.,* 1997). Staurosporin-Konzentrationen im nanomolaren Bereich sind ausreichend, um in den meisten Säugetier-Zellen (Tamaoki *et al.,* 1986; Bombeli *et al.,* 1997; Fiorucci *et al.,* 2002) und somit auch in neuronalen Primärkulturen der Ratte den programmierten Zelltod auszulösen (Krohn *et al.,* 1998).
Durch Behandlung der neuronalen Primärkulturen mit unterschiedlichen Staurosporin-Konzentrationen und verschiedenen Inkubationsperioden wurde eine für unsere Versuche geeignete Konzentration von 200 nM ermittelt. Durch eine 20-stündige Inkubationszeit wurde ein Anstieg der Apoptoserate (Verhältnis der apoptotischen zu gesunden Zellen) auf ca. 40 % in den mit Staurosporin behandelten Kulturen gegenüber ca. 13-16 % der Kontrollgruppen erzielt.
In den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl NGF als auch BDNF in Konzentrationen ab 50 ng/ml in der Lage waren, neuronale Mischkulturen vor Apoptose zu schützen. Diese protektive Wirkung ließ sich sowohl dann beobachten, wenn die Wachstumsfaktoren direkt in das Kulturmedium gegeben wurden, als auch bei einer vorausgehenden externen Phosphorylierung mit ATP. Die Befunde konnten gleichermaßen in hippokampalen wie in kortikalen Primärkulturen neonataler Ratten reproduziert werden.
Der Schutz vor neuronalem Zelltod wurde in einem weiteren Modell, dem *Oxygen-Glucose-Deprivation*-Modell (OGD) überprüft, in dem den Zellen über einen gewissen Zeitraum hinweg Sauerstoff und Glukose entzogen wird. Diese Methode soll die Situation während eines ischämischen Vorfalls im Gehirn nachahmen: aufgrund einer mangelhaften oder stagnierten Blutzirkulation in einem bestimmten Hirnareal sind die betroffenen Neurone einem massiven Sauerstoff- und Nährstoffmangel ausgesetzt. Diese pathologische Situation führt innerhalb kürzester Zeit zum Untergang von Nervenzellen und dadurch zu irreparablen Schäden der betroffenen Hirnregion.

Im Vergleich zu *in vivo*-Experimenten weist die OGD-Methode den Vorteil auf, dass Einflussfaktoren, die ein Verschleiern der Effekte zur Folge haben könnten, minimiert werden. Während im *in vivo*-Modell beispielsweise Konzentrationsschwankungen des applizierten Wirkstoffes durch Stoffwechselmetabolisierungen und Eliminationsprozesse in Kauf genommen werden müssen, kann im OGD-Modell durch genaues Bestimmen des Volumens des Zellkulturmediums und dadurch des Verteilungskompartiments die gewünschte Konzentration präzise eingestellt und relativ konstant gehalten werden. Zudem lässt sich durch die Möglichkeit, Parameter wie den Sauerstoffpartialdruck, die Dauer der Hypoxie, die Temperatur und die relative Luftfeuchtigkeit exakt zu bestimmen und zu steuern, eine gute Reproduktion und Vergleichbarkeit der Einzelexperimente untereinander gewährleisten.

Die OGD-Methode geht zurück auf Goldberg und Choi (1990; 1993), die sie vor über 15 Jahren in kortikalen Primärkulturen der Maus entwickelten.

Unsere Untersuchungen zeigen in hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten, dass durch einstündige Vorinkubation mit NGF und BDNF und kontinuierlicher Präsenz dieser Faktoren sowohl während der OGD-Phase, als auch während der Reoxygenierungsphase das Ausmaß der Schädigung deutlich reduziert werden konnte.

Die OGD-Methode an neuronalen Primärkulturen ist eine geeignete Methode, die Vorgänge, die während einer Ischämie im Gehirn ablaufen, *in vitro* nachzuahmen. Dennoch stellt die Basis des Modells lediglich eine Zellkultur mit isolierten Zellen dar, die aus dem Gesamtsystem eines lebenden Organismus entfernt wurden und unter Umständen anders reagieren können. Eine Überprüfung der in der Zellkultur erhaltenen Ergebnisse in einem *in vivo*-Modell bleibt daher unumgänglich.Das Modell der MCAO – also die permanente Okklusion der mittleren Zerebralarterie – stellt eine weitere Optimierung der Untersuchungsmöglichkeiten der ischämischen Situation dar.

Es konnte in unseren Versuchen demonstriert werden, dass durch intraventrikuläre Injektion von NGF die Infarktfläche nach der MCAO reduziert wurde.

4.2 Untersuchungen zur Charakterisierung der Aktivierung von NGF und BDNF

NGF und BDNF zeigten nach einer Behandlung mit [γ-^{32}P]ATP eine deutliche radioaktive Markierung im Autoradiogramm. Diese Experimente wurden im Arbeitskreis Klumpp ohne Zusatz von Kinasen durchgeführt. Darüber hinaus wurden die radioaktiven Phosphorylierungen in Anwesenheit von Proteinkinase-Inhibitoren überprüft. In beiden Fällen konnte eine Phosphorylierung eindeutig nachgewiesen werden, was auf eine Autokinase-Funktion innerhalb dieser Wachstumsfaktoren hindeutet.
Um die Befunde, die aus diesen Phosphorylierungsversuchen erhalten wurden, auch an lebenden Zellen und in dem etablierten Schädigungsmodell zu überprüfen, wurden zeitgleich zu den Wachstumsfaktoren Inhibitoren der Proteinkinase A und C ins Kulturmedium gegeben. Der neuroprotektive Effekt von NGF und BDNF konnte weiterhin beobachtet werden. Dies galt auch für Versuche, in denen NGF und BDNF vor Zugabe ins Medium in Anwesenheit der Proteinkinase-Inhibitoren phosphoryliert wurden. Die verwendeten Inhibitoren bestehen aus Peptidfragmenten, die inhibitorisch auf Proteinkinase A und C wirken und die Zellmembran nicht durchdringen können, so dass ihr Einfluss auf den Extrazellulärraum beschränkt ist. Anhand der Kontrollgruppen konnten Effekte der Proteinkinase-Inhibitoren auf das Ausmaß der Schädigung und auf die unbehandelte Kontrollgruppe ausgeschlossen werden. Somit konnten die Ergebnisse aus dem Arbeitskreis Klumpp, die stark auf eine Autokinase-Domäne innerhalb der Proteine hindeuteten, gefestigt werden.
Insgesamt ließen sich keine Unterschiede im Ausmaß der Neuroprotektion zwischen den zuvor extern phosphorylierten Wachstumsfaktoren und den direkt ins Zellmedium zugesetzten Proteinen erkennen. Geht man von der Existenz einer Autokinase-Funktion der Neurotrophine aus, so wäre eine Autophosphorylierung und eine ATP-Bindung durch das im Kulturmedium vorhandene ATP denkbar. Dies würde gemäß unserer Hypothese zu aktivierten Wachstumsfaktoren führen, die in der Lage sind, an ihren spezifischen Rezeptor zu binden und die intrazellulär verlaufenden Signalkaskaden anzustoßen.

Ein weiteres Indiz auf das Zutreffen unserer Hypothese waren Resultate, die aus Experimenten mit alkalischer Phosphatase gewonnen werden konnten. Alkalische

Phosphatase ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das Phosphatgruppen abzuspalten vermag. Im Arbeitskreis Klumpp wurde in radioaktiven Untersuchungen durch Zusatz dieses Enzyms eine Dephosphorylierung der Neurotrophine erzielt.
Zunächst galt es sorgfältig zu überprüfen, ob alkalische Phosphatase durch ihre unspezifisch dephosphorylierende Wirkung essentielle Signalproteine oder Stoffwechselaktivitäten der Neurone beeinflusst und dadurch schädigende Effekte auf die Zellen bewirken könnte. In Kontrollkulturen, die über den gesamten Behandlungszeitraum ausschließlich mit alkalischer Phosphatase inkubiert wurden, konnte jedoch keine Beeinflussung erkannt werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass überlebenswichtige Signalkaskaden durch direkte Einwirkung des Enzyms unterbrochen werden. Darüber hinaus wurde in den Western-Blot-Analysen die Phosphorylierung von Akt und ERK 1/2 nach einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase überprüft. Auch hier ergaben sich keine Unterschiede im detektierten Signal gegenüber der unbehandelten Kontrollkultur.
Für die Versuche in der Zellkultur wurde simultan zur Behandlung mit NGF und BDNF alkalische Phosphatase ins Medium zugesetzt. Während das Enzym selbst keinen schädigenden Effekt auf die Neuronenkultur ausübte, wurde der neuroprotektive Effekt sowohl von NGF, als auch von BDNF vollständig aufgehoben. Ein identisches Ergebnis zeigte sich auch in Versuchen, bei denen eine externe Vorinkubation mit alkalischer Phosphatase statt fand.

Die Beobachtungen, die im Staurosporin-Schädigungsmodell erhalten wurden, sollten auch mit der OGD-Methode überprüft werden, um staurosporin-spezifische Effekte auszuschließen. Hierbei kam es auch bei einer Induktion des Zelltods durch Sauerstoff- und Glukose-Entzug zu einer Aufhebung der neuroprotektiven Wirkung von NGF und BDNF durch Einwirken der alkalischen Phosphatase.
Um die in den angewandten Schädigungsmodellen erzielten Ergebnisse hinsichtlich der neuroprotektiven Potenz von NGF und BDNF auch im Hinblick auf die involvierten Signaltransduktionsproteine zu überprüfen, wurde einerseits die Aktivierung des Trk-Rezeptors und zum anderen die der nachgeschalteten Kaskadenproteine Akt und ERK 1/2 per Western Blot-Analyse untersucht.
Als Schnittstelle zwischen der durch Ligandenbindung extrazellulär ausgelösten Aktivierung und der ins Zellinnere führenden Signalwege übt der Trk-Rezeptor eine

unersetzbare Funktion aus und eignet sich daher besonders für eine genauere Untersuchung.
In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung mit BDNF eine rasche Zunahme der Phosphorylierung am Rezeptormolekül auftrat. Das Maximum dieser Phosphorylierung wurde 5-7 min nach Applikation des Wachstumsfaktors erreicht und nahm dann wieder ab. Bei simultaner Behandlung der Zellen mit alkalischer Phosphatase war das detektierte Signal bei gleichbleibendem α-Tubulinniveau schwächer ausgeprägt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass bei Anwesenheit von alkalischer Phosphatase die Aktivierung des Trk-Rezeptors in geringerem Maße stattfindet.
Ebenso bedeutend für die Vermittlung der Effekte sind Akt und ERK 1/2, die wichtige Schlüsselpositionen innerhalb zweier unterschiedlich verlaufender Signalwege besetzen und durch reversible Phosphorylierung reguliert werden. Die Aktivierung wurde mit Hilfe eines Antikörpers untersucht, der nur die phosphorylierten, also aktiven Proteine detektiert. Obwohl schon bei der Kontrollgruppe mit unbehandelten Zellen ein Signal zu beobachten und damit phosphoryliertes Akt und ERK 1/2 vorhanden war, löste eine Behandlung der neuronalen Primärkulturen mit NGF oder BDNF eine deutliche Verstärkung des Phosphorylierungssignals sowohl von Phospho-Akt, als auch von Phospho-ERK 1/2 aus. Dies kann als Zeichen einer Aktivierung der Kaskadenproteine und übergeordnet einer Aktivierung des Signalweges betrachtet werden.
Bei simultaner Behandlung mit alkalischer Phosphatase blieben die Signale von Phospho-Akt und Phospho-ERK 1/2 auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollkultur. In diesen Zellkulturen fand also keine Aktivierung der entsprechenden Signalwege statt, was mit dem Fehlen des neuroprotektiven Effekts korreliert.
Es kann also anhand der untersuchten Signalwege festgestellt werden, dass der Einfluss eines dephosphorylierenden Enzyms die Aktivierungsprozesse sowohl am Rezeptor, als auch an tieferliegenden Kaskadenproteinen abschwächt. Somit steht die Aufhebung der neuroprotektiven Wirkung der Wachstumsfaktoren in direktem Kausalzusammenhang mit einer verminderte Aktivierung des Rezeptors sowie der Signaltransduktion begründet.

Weitere Hinweise auf die Bedeutung einer reversiblen Phosphorylierung für die biologische Aktivität von NGF und BDNF erhielten wir durch die Inkubation der

Wachstumsfaktoren mit ATPγS. Diese Substanz kann als Substrat für Kinasen dienen, die so generierten Phospho-Proteine sind jedoch nicht durch Phosphatasen dephosphorylierbar. Es stellte sich somit die Frage, wie sich die neuroprotektive Wirkung dauerhaft phosphorylierter Neurotrophine bei Einfluss von alkalischer Phosphatase verändert. Hierzu musste zunächst einmal die neuroprotektive Potenz von permanent phosphoryliertem NGF und BDNF sichergestellt werden. Dabei ergaben sich keinerlei Unterschiede zu den mit ATP phosphorylierten Wachstumsfaktoren. Eine interessante Untersuchung, die nicht im direkten Zusammenhang mit unserer Hypothese steht, wäre die Überprüfung der Frage, ob sich die Dauer des Apoptoseschutzes bei permanent phosphorylierten Wachstumsfaktoren verlängert. Da eine Deaktivierung durch eine Dephosphorylierung bei diesen so vorbehandelten Proteinen durch Phosphatasen nicht möglich ist, wäre eine logische Konsequenz, dass es zur fortwährenden Aktivierung der Rezeptoren und damit zu einer verlängerten anti-apoptotischen Wirkung kommt.

Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass alkalische Phosphatase nicht in der Lage war, die neuroprotektive Wirkung von permanent phosphoryliertem NGF und BDNF zu reduzieren. Dieser Befund ist ein Beweis dafür, dass die verminderte Aktivierung des Trk-Rezeptors sowie des Signalweges und die Aufhebung der neuroprotektiven Wirkung nicht auf einem direkten Einwirken der alkalischen Phosphatase beruht und darüber hinaus, dass eine reversible Phosphorylierung und/oder eine ATP-Bindung entscheidend für die Vermittlung der protektiven Effekte ist.

Auch die Detektion der phosphorylierten Signalkaskade-Proteine Akt und ERK 1/2 im Western Blot ließ erkennen, dass die permanent phosphorylierten Neurotrophine weiterhin in der Lage waren, Akt und ERK 1/2 zu aktivieren. Bei einer simultanen Applikation von alkalischer Phosphatase wurde keine Reduktion des Phosphorylierungssignals bewirkt. Auch dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen, die in den Protektionsstudien erhalten wurden.

Eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase ermöglicht keine Unterscheidung, ob die Aufhebung der Neuroprotektion auf einer Hydrolyse von kovalent gebundenen Phosphatresten oder von gebundenem intaktem ATP basiert, da das Enzym ebenso in der Lage ist, ein bis zwei Phosphate von ATP-Molekülen abzuspalten. Da

Markierungen von NGF mit [α-^{32}P]ATP zu deutlichen Signalen im Autoradiogramm führten, lag die Vermutung nahe, dass gebundenes ATP ebenso von Relevanz für die Aktivierung sein könnte. Es galt also, weitere Untersuchungen durchzuführen, um aufzuklären, inwieweit ATP als Aktivierungskomponente benötigt wird. Hierfür wurde das Enzym ATPase sowohl in den radioaktiven Experimenten, als auch in den Zellkultur-Versuchen eingesetzt. ATPase ist ein Kalium-, Natrium- und Magnesium-abhängiges Enzym, das ATP auch in gebundener Form in ADP bis hin zu AMP und Phosphat spalten kann. In den hier vorgestellten Versuchen wurde NGF bzw. BDNF zunächst mit ATP phosphoryliert und im nächsten Schritt entweder mit alkalischer Phosphatase oder ATPase für weitere 15 min inkubiert. Die anschließende Behandlung erfolgte nach dem etablierten Modell. Es zeigte sich, dass in den jeweiligen Gruppen die Inkubation mit ATPase eine drastische Reduktion der protektiven Effekte von NGF und BDNF bewirkte. Um Sicherzustellen, dass die Schädigung der Zellen nicht auf ein vermindertes ATP-Angebot im Medium und damit auf eine mangelhafte Energieversorgung der Neurone zurückgeht, wurde in entsprechenden Kontrollversuchen dieser Sachverhalt überprüft. Einflüsse der ATPase selbst - sei es protektiver oder schädigender Natur – auf hippokampale Mischkulturen neonataler Ratten konnten ausgeschlossen werden.
Sowohl die Untersuchungen mit radioaktiven ATP-Markierungen als auch die Neuroprotektionsversuche bestätigen die These, dass gebundenes ATP eine signifikante Bedeutung in der Aktivierung von NGF und BDNF und ihrer Potenz zur Vermittlung anti-apoptotischer Effekte besitzt.

Parallel zu den in Zellkulturen durchgeführten Experimenten wurden im Arbeitskreis Klumpp und in Kooperation mit Frau PD Dr. S. König (Münster) massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt, die zunächst das rekombinante NGF charakterisierten. Nachdem die Identität des Proteins bestätigt war, wurde in einem nächsten Schritt mit ATP behandeltes NGF massenspektrometrisch untersucht. Die dabei auftretende Massendifferenz wies deutlich auf gebundenes ATP hin. Es zeigte sich sowohl in Reproduktionsversuchen mit ATP, als auch in Phosphorylierungsexperimenten mit CTP, UTP, dATP und ddATP, dass die Differenz des entsprechenden Nukleotids zu erkennen war. Man kann also davon ausgehen, dass sich in der Struktur von NGF eine Domäne mit hoher ATP- oder Triphosphat-Affinität befindet.

Betrachtet man die Ergebnisse, die in dieser Arbeit durch Versuche in neuronalen Primärkulturen erhalten werden konnten und bringt sie in einen Kontext mit den Resultaten aus den radioaktiven und massenspektrometrischen Untersuchungen, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Anlagerung von ATP relevant und sogar eine Voraussetzung für die biologische Aktivität von NGF ist.

4.3 Untersuchungen zu VEGF

Um näher zu beleuchten, inwieweit unsere Hypothese ein generelles Prinzip zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren sein könnte, wurde VEGF als Vertreter einer anderen Wachstumsfaktor-Familie untersucht. Bislang veröffentlichte Studien zu protektiven Effekten von VEGF wurden hauptsächlich an endothelialen Zellen wie beispielsweise den humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt (Vinci *et al.,* 2004).

Die Untersuchung eines weiteren Wachstumsfaktors in einer nicht neuronalen Zelllinienkultur in Kombination mit einer andersartigen Schädigungsmethode gab uns die Möglichkeit, die Aussage unserer Hypothese noch allgemeiner treffen zu können und nicht auf das Modell der Primärkulturen oder der Staurosporinschädigung reduzieren zu müssen.

HUVE-Zellen durchlaufen bei einem länger andauernden Serumentzug apoptotische Prozesse, die durch eine Behandlung mit VEGF abgemildert und sogar annähernd aufgehoben werden können (Gerber *et al.,* 1998). Eine Schwierigkeit, die sich in unserer Versuchsanordnung während des Serumentzugs zeigte, war eine starke Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschalen, die sich auch durch Beschichtung der Schalen mit Poly-Lysin oder Poly-Ethylenimin (PEI) kaum beheben ließ und proportional zur Dauer des Serumentzugs zunahm.

So galt es zunächst, die optimale Dauer des schädigenden Entzugs zu ermitteln, um eine ausreichend hohe Schädigung zu erzielen und gleichzeitig die Ablöserate der Zellen in Grenzen zu halten. Als bester Kompromiss zwischen diesen zwei Kriterien erwies sich ein Zeitraum von 48 h, der auch standardmäßig in allen folgenden Versuchen angewandt wurde.

Erwartungsgemäß ließ sich durch Inkubation mit VEGF ab einer Konzentration von 50 ng/ml das Ausmaß der Serumentzug-induzierten Schädigung signifikant reduzieren.

Allerdings ergab sich bei der kombinierten Behandlung mit alkalischer Phosphatase ein gänzlich anderes Bild, als das bei NGF und BDNF der Fall war: während das Einwirken des Enzyms auf die Neurotrophine eine drastische Reduktion des neuroprotektiven Effekts zur Folge hatte, war VEGF weiterhin in der Lage, trotz Anwesenheit alkalischer Phosphatase seine protektive Wirkung zu vermitteln. Diese Beobachtung ließ sich auch bei einer vorangeschalteten Inkubation von VEGF mit alkalischer Phosphatase reproduzieren. Ein protektiver Effekt des Enzyms selbst konnte durch Kontrollen ausgeschlossen werden.

Bemerkenswerterweise zeigte sich nach einer Inkubation mit ATPase eine Aufhebung der durch VEGF vermittelten Protektion vor dem schädigenden Serumentzug. Diese Befunde decken sich mit jenen der Neurotrophine, die ihre protektive Wirkung in Anwesenheit von ATPase ebenfalls nicht ausüben konnten.

Darüber hinaus interessierte uns die Übertragbarkeit der in HUVEC-Kulturen durchgeführten Experimente auf neuronale Zellen. Dies sollte zum einen zellspezifische Effekte ausschließen; zum anderen konnte dadurch in ein und demselben Modell der unterschiedliche Einfluss von alkalischer Phosphatase auf VEGF und BDNF, als Vertreter der Neurotrophine, untersucht werden. Daher galt es zunächst festzustellen, ob VEGF in unserem Modell neuroprotektive Effekte auf hippokampale Mischkulturen vermitteln konnte.

Die Existenz des VEGF-Rezeptors-2 und dessen Co-Rezeptor Neuropilin-1 wurde in hippokampalen Rattenneuronen nachgewiesen (Sondell *et al.,* 2000), ebenso die Vermittlung neuroprotektiver Effekt bei exzitatorischer Schädigung durch Glutamat (Svensson *et al.,* 2002). In der Arbeitsgruppe von Svensson wurden auch protektive Eigenschaften bei Staurosporin-induzierter Schädigung untersucht. Es konnte in der dortigen Versuchsanordnung keine Neuroprotektion des Wachstumfaktors beobachtet werden.

In unseren Experimenten, die eine höhere Konzentration des VEGF, eine kürzere Vorinkubationzzeit und eine abweichende Staurosporin-Konzentration beinhalteten, konnte im Gegensatz dazu ein deutlich schützender Effekt von VEGF in der hippokampalen Neuronenkultur beobachtet werden.

Die Unterschiede in den erhaltenen Ergebnissen könnten einerseits auf die geringere Konzentration des VEGFs und andererseits auf die relativ lange Prä-Inkubation vor Schädigungsbeginn in den Versuchen von Svensson *et al.* (2002) zurückzuführen sein. Es konnte per Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen phosphorylierte Signalkaskadenproteine dargestellt werden, dass die Phosphorylierung und damit Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und der nachgeordneten Adapterproteine in einem Zeitfenster von wenigen Minuten abläuft (Bernatchez *et al.,* 2001). So wurde das Maximum der Phosphorylierung von Phospho-Akt nach einer VEGF-Inkubationszeit von 7,5 Minuten beobachtet – bei Phospho-MAPK wurde eine maximale Phosphorylierung nach schon 5 Minuten erreicht und nahm anschließend rasch ab. Es könnte also entscheidend sein, zu welchem Zeitpunkt die Schädigung induziert wird, damit die durch VEGF ausgelösten Effekte auch voll zum Tragen kommen und damit der Schutz der Neurone gewährt werden kann.

Die Bestätigung sowohl der protektiven, als auch der durch alkalische Phosphatase bewirkten Effekte in neuronalen Zellkulturen erlaubten ein Ausschließen von zellspezifischen Phänomenen. Untermauert werden die Ergebnisse der Protektionsversuche darüber hinaus durch die Western-Blot-Analyse, die auch bei Einwirken von alkalischer Phosphatase ein unverändert starkes Phosphorylierungssignal von Phospho-Akt und Phospho-ERK 1/2 erkennen lässt.

Somit unterscheiden sich die Ergebnisse, die aus den Experimenten mit VEGF in Kombination mit alkalischer Phosphatase oder ATPase erzielt wurden, deutlich von den Befunden der Experimente mit NGF und BDNF.

VEGF als ein Vertreter einer anderen Wachstumsfaktorfamilie, der sich in zahlreichen Charakteristika wie z. B. der Lokalisation im Körper, dem Expressionsmuster oder den Zielzellen von den Neurotrophinen unterscheidet, könnte tatsächlich auch einen Unterschied im Aktivierungsmechanismus aufweisen. Die Protektionsstudien, die die Beeinflussung durch alkalische Phosphatase oder ATPase überprüften, deuten auf eine signifikante Bedeutung einer ATP-Bindung für die Vermittlung von anti-apoptotischen Effekten hin, während kovalent gebundenes Phosphat eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. So könnte hier eine Aktivierung durch ATP-Bindung im Vordergrund stehen. Jedoch werden weiterführende Experimente wie beispielsweise Markierungen mit radioaktivem [α-

^{32}P]ATP oder [γ-^{32}P]ATP notwendig sein, um diese Aktivierung näher charakterisieren zu können.

4.4 Untersuchungen zu selbst exprimierten Wachstumsfaktoren

Im Laufe der Studien wurde es notwendig, rekombinantes NGF und BDNF selbst zu exprimieren, um einerseits den eigenen Bedarf zu decken und andererseits eine Basis für spätere Mutationen zu schaffen. Im Arbeitskreis Klumpp wurde von Frau Dipl.-Biotechnologin Anja Hasche in *E. coli*-Stämmen zunächst versucht, BDNF zu produzieren. Das Verhalten des selbst exprimierten Proteins in unterschiedlichen Experimenten entsprach genau den zuvor mit gekauftem BDNF erhaltenen Resultaten. Die Untersuchungen zu Reinheit und Identität des exprimierten Proteins per Silbergel- und Western Blot-Analyse verliefen gemäß unseren Erwartungen: die nach der elektrophoretischen Auftrennung detektierten Banden entsprachen dem theoretisch ermittelten Wert. Auch die Reinheit des exprimierten Proteingemischs war zufriedenstellend.

Allein die biologische Aktivität des BDNFs in Form der Neuroprotektion, ließ sich trotz unterschiedlicher Ansätze und Konzentrationen nicht nachweisen. Diese Diskrepanz zwischen den proteinchemischen Analysen, die keine Anhaltspunkte für Abweichungen vom gekauften Protein gaben, und den Versuchen an lebenden Neuronen, die auf eine Behandlung mit jenem Protein keinerlei Effekte erkennen ließen, veranlasste uns zu weiteren Kontrollversuchen. Im Arbeitskreis Klumpp wurde schließlich experimentell bewiesen, dass die Phosphorylierungssignale im Autoradiogramm und somit auch das vermeintlich charakteristische Verhalten bei Säure-Lauge-Behandlung nicht auf BDNF, sondern auf ein nicht näher spezifiziertes Fremdprotein aus dem *E. coli*-Lysat zurückzuführen sind. BDNF wurde zwar exprimiert, lag aber offensichtlich in *inclusion bodies* vor, so dass eine biologische Aktivität und damit auch neuroprotektive Effekte nicht nachzuweisen waren.

Es existieren in der einschlägigen Literatur mehrere Quellen, die sich mit dem Problem der *inclusion bodies* auseinandersetzen (z. B. Rudolph und Lilie, 1996). Trotz der dort diskutierten unterschiedlichen Ansätze, das biologisch aktive Protein zu gewinnen, blieb die Ausbeute jeweils sehr gering. Rattenholl *et al*. (2001)

optimierten eine Methode, die als wesentlichen Unterschied zu vorherigen Ansätzen die Expression von Pro-NGF als Kernstück beinhaltete. Zunächst wurden die auch hier entstandenen *inclusion bodies* solubilisiert, was eine Denaturierung des Proteins verursachte. Bei der anschießenden Renaturierung unterstützte die Pro-Sequenz offensichtlich die biologisch korrekte Faltung, so dass eine Ausbeute von ca. 35 % des aktiven Proteins erreicht wurde. Die Pro-Sequenz ließ sich durch eine Behandlung mit Trypsin abspalten.

Dank eines neuen Plasmids, das die Pro-Sequenz von BDNF enthielt und freundlicherweise von Dr. Peder Madsen (Universität Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt wurde, konnte diese Methode für alle folgenden Expressionen angewandt werden. Das so gewonnene BDNF konnte sowohl durch Sequenzierung, Western Blot- und Silbergelanalyse einwandfrei identifiziert werden, als auch parallel dazu im Zellkulturmodell als neuroprotektiv wirksam befunden werden. Somit steht uns nun ein rekombinanter, biologisch aktiver BDNF-Wildtyp zur Verfügung, der als Ausgangspunkt für zielgerichtete Mutationen dienen kann.

Parallel zu den Protektionsversuchen mit BDNF wurde auch die Pro-Form auf ihre biologische Aktivität getestet. Wie aus aktuellen Studien bekannt ist, binden Pro-Neurotrophine mit höherer Affinität an p75, als die reifen Proteine. Dadurch werden verstärkt apoptotische Effekte bei einer Behandlung mit Pro-Neurotrophinen beobachtet (Lee *et al.,* 2001; Ibanez, 2002). Das in unseren Experimenten getestete Pro-BDNF hatte jedoch keinerlei schädigende Wirkung auf die kultivierten Neurone, es wirkte im Gegenteil deutlich protektiv. Dieses Ergebnis kann einerseits mit der Rezeptoren-Verteilung in der verwendeten Mischkultur zusammenhängen. Auf der anderen Seite könnten Proteasen in der Zellkultur für eine Spaltung des Pro-BDNFs verantwortlich sein. Da bei der Präparation der Primärkulturen die Verwendung von Papainlösung erforderlich ist, könnten Reste davon in der Zellkultur vorhanden sein. In diesem Falle würde der beobachtete protektive Effekt nicht auf Pro-BDNF, sondern auf die reife Form des Neurotrophins zurückgehen.

Mit dem im Arbeitskreis Klumpp exprimierten NGF wurde ähnlich verfahren. Nachdem Reinheit und Identität überprüft worden waren, wurde die neuroprotektive Potenz des Proteins im etablierten Staurosporin-Schädigungsmodell untersucht.

Da der Reinigungsprozess, der der Gewinnung des Proteins aus *E. coli*-Kulturen nachgeschaltet ist, eine komplette Denaturierung mit anschließender Renaturierung

beinhaltet, ließ sich nicht ausschließen, dass einzelne NGF-Proteine in einer unnatürlichen Faltung und damit biologisch inaktiv vorlagen. Es wurde daher ein Konzentrationsspektrum getestet, das bis in den mikromolaren Bereich reichte. Eine deutliche neuroprotektive Wirkung des NGFs wurde hierbei nur in niedrigen Konzentrationen beobachtet. Bei Zugabe hoher Konzentrationen der Proteinlösung lag der Anteil der apoptotischen Zellen in den betreffenden Gruppen auf demselben Niveau, wie die ausschließlich mit Staurosporin behandelten Zellen. Verantwortlich hierfür könnte die Existenz von Fremdstoffen, wie z. B. Endotoxinen, in der Proteinlösung sein, die in niedriger Konzentration von den Zellen toleriert werden und dadurch den neuroprotektiven Effekt des NGFs nicht verschleiern, deren neurotoxische Wirkung dann aber in höheren Konzentrationen zum Tragen kommt. In der Tat beweisen Untersuchungen von Garke *et al.* (2000), dass bei der Herstellung von rekombinanten Wachstumsfaktoren in *E. coli*-Bakterien Verunreinigungen mit Lipopolysacchariden anfallen. Des Weiteren sind schädigenden Effekte dieser Lipopolysaccharide auf hippokampale Zellen erwiesen (Lee *et al.,* 2003). Der durch den Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test ermittelte relativ hohe Endotoxingehalt könnte durch weitere Reinigungsschritte reduziert und so ein schädigender Einfluss minimiert werden.

Einen weiteren Anhaltspunkt zur Charakterisierung der Aktivierung erhielten wir aus Experimenten mit [γ-^{32}P]ATP (Arbeitskreis Klumpp): die Form der Phosphorylierung ist <u>säurelabil</u> und <u>laugestabil</u>. Diese Beobachtung ist von entscheidender Bedeutung und lässt weitere Schlussfolgerungen hinsichtlich der Art der Phosphorylierung zu, da dieses Verhalten ganz spezifisch für bestimmte Phospho-Aminosäuren ist. So lassen sich Phosphatgruppen an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin nicht durch Säurebehandlung hydrolysieren, wohingegen sich über Stickstoff gebundene Phosphatreste wie bei Histidin, Lysin und Arginin sehr leicht im Sauren abspalten lassen. Auch die Acyl-Phosphatgruppe des Aspartats ist säurelabil (Sickmann und Meyer, 2001). Diese Überlegungen spielen eine gewichtige Rolle bei der Entwicklung von Mutanten, um so eine genaue Lokalisation der Phosphorylierung definieren zu können.

Um diese Frage näher zu beleuchten, führten wir eine dünnschicht-chromatographische Untersuchung bestimmter Phospho-Aminosäuren durch. Die kommerziell nicht erhältlichen Aminosäuren Phospho-Histidin und Phospho-Lysin

wurden nach einer Methode von Wei und Matthews (1991) synthetisiert. Das Ziel dieser Untersuchung war ein Vergleich der Laufstrecken der Phospho-Aminosäuren mit denen des zuvor radioaktiv markierten und hydrolysierten rekombinanten BDNFs. Es stellte sich leider erst in späteren Untersuchungen heraus, dass es sich in diesem Fall bei dem selbst exprimierten Protein nicht um rekombinantes BDNF, sondern um ein Fremdprotein aus *E. coli* handelte. Auch wenn das Ergebnis des Versuchs daher nicht verwertbar ist, soll es dennoch an dieser Stelle angesprochen werden, um die Vorgehensweise auch als Anhaltspunkt für zukünftige Arbeiten, darzustellen.
Es zeigte sich, dass die Laufstrecke des Phospho-Histidins mit der des hydrolysierten E. coli-Lysats übereinstimmte. Würde sich dieses Resultat bei einem Wiederholungsversuch mit BDNF reproduzieren lassen, wären die in der Aminosäuresequenz auftauchenden Histidinreste erste Angriffspunkte für einen Austausch mit einer nicht phosphorylierbaren Aminosäure wie Alanin. Diese Mutanten müssten dann auf ihre Phosphorylierbarkeit und ihre neuroprotektive Wirkung hin untersucht werden und könnten so wichtige Hinweise auf die Lokalisation der Aktivierungsstelle liefern.

4.5 Untersuchungen zu weiteren Wachstumsfaktoren

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, inwieweit unsere Hypothese der notwendigen Aktivierung von Wachstumsfaktoren auf weitere Vertreter dieser Proteinklasse zutrifft, wurden einige von ihnen in dem etablierten Schädigungsmodell in hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten untersucht.
Es wurden gezielt Wachstumsfaktoren gewählt, deren neuroprotektive Effekte bereits dokumentiert waren. So lassen sich Publikationen über EGF und seine protektiven Effekte auf hippokampale Primärkulturen der Ratte finden (Maiese *et al.,* 1993; Maiese und Boccone, 1995). Auch für IGF sind derartige Wirkspektren bekannt (Mattson *et al.,* 1993; Doré *et al.,* 1997). Des Weiteren wurde seine regulierende Rolle in apoptotischen Prozessen bereits intensiv untersucht (Übersicht in Butt *et al.,* 1999).
Bei G-CSF handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, der im allgemeinen zur Behandlung von Chemotherapie-induzierten Neutropenien eingesetzt wird. Hier kann G-CSF eine drastische Reduktion der Häufigkeit und des Schweregrades

neutropenischer Infektionen bewirken (Crawford *et al.,* 1991; Trillet-Lenoir *et al.,* 1993). In aktuellen Untersuchungen wurde allerdings seine protektive Wirksamkeit bei Schlaganfall im Tiermodell und bei apoptotischen Schädigungen von kortikalen und hippokampalen Rattenneuronen sowie SH-SY5Y-Zellen entdeckt (Schneider *et al.,* 2005). Auch CNTF ist in der Lage, protektive Effekte auf hippokampale Rattenneurone auszuüben (Semkova *et al.,* 1999).

TGF-β1 wirkt je nach Zellpopulation und Entwicklungsstadium der Zellen anti- oder pro-apoptotisch. So wurden beispielsweise seine apoptotischen Effekte auf endotheliale Zellen dokumentiert (Hyman *et al.,* 2002) während in hippokampalen Primärkulturen protektive Eigenschaften zum Tragen kommen (Zhu *et al.,* 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse sollen Aufschluss darüber geben, für welche weiteren Wachstumsfaktoren eine reversible Phosphorylierung die Voraussetzung für ihre biologische Aktivität sein kann.

Bei den Experimenten mit den Wachstumsfaktoren CNTF und TGF-β1 konnte in unserer Versuchsanordnung keine protektive Wirkung nachgewiesen werden. Ein Einfluss von alkalischer Phosphatase konnte daher auch nicht untersucht werden.

Obwohl protektive Effekte des CNTFs schon in hippokampalen Primärkulturen beschrieben wurden, scheint der Schwerpunkt seiner Wirkung hauptsächlich auf dem Schutz vor nekrotischen Einflüssen zu liegen (Semkova *et al.,* 1999). Ein Ausbleiben der neuroprotektiven Effekte könnte also durch die Art der Schädigung, die in unseren Experimenten apoptotischer Natur ist, erklärbar sein.

Obwohl protektive Effekte des TGF-β1 nach Staurosporinschädigung in hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten beschrieben wurden (Zhu *et al*., 2002), sind in den hier vorgestellten Versuchen keine schützenden Einflüsse zu erkennen. Aufgrund keiner beobachtbaren neuroprotektiven Effekte in dem verwendeten Modell wurden daher die Untersuchungen zu CNTF und TGF-β1 vorerst zurückgestellt.

EGF wirkte in dem angewandten Modell eindeutig neuroprotektiv und reduzierte die apoptotische Schädigung bis auf das Kontrollniveau der unbehandelten Zellen. Wurde eine zeitgleiche Applikation von alkalischer Phosphatase durchgeführt, konnte der signifikante protektive Effekt weiterhin nachgewiesen werden. Somit lässt sich ein deutlich unterschiedliches Verhalten von EGF zu NGF oder BDNF erkennen.

Ähnlich wie bei VEGF scheint eine reversible Phosphorylierung für die Vermittlung neuroprotektiver Effekte nicht notwendig zu sein.

Die Untersuchungen von IGF ließen in unserer Versuchsanordnung eine deutlich schützende Wirkung vor Staurosporin-induzierter Apoptose erkennen; gleichwohl zeigte sich bei simultaner Behandlung mit alkalischer Phosphatase eine Reduktion dieser Neuroprotektion. Derselbe Befund ergab sich bei der Untersuchung von G-CSF: auch hier wurde der deutlich nachzuweisende protektive Effekt durch den Einfluss der alkalischen Phosphatase aufgehoben. Da also die neuroprotektive Potenz dieser beiden Wachstumsfaktoren durch den dephosphorylierenden Einfluss von alkalischer Phosphatase reduziert wird, würden sich IGF und G-CSF besonders für eine eingehendere Untersuchung im Hinblick auf eine Aktivierung durch reversible Phosphorylierungen und ATP-Bindungen eignen.
Tatsächlich scheinen also sowohl ATP-Bindungen als auch reversible Phosphorylierungen von signifikanter Bedeutung bei der Aktivierung von Wachstumsfaktoren zu sein. Allerdings weist das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Vertreter dieser Zytokine in den hier dargestellten Versuchen auf Unterschiede des Aktivierungsprinzips hin (Übersicht der Ergebnisse in Tab. 4-1). Für eine endgültige Aussage über den detaillierten Ablauf der Aktivierung sind daher noch tiefergehende Studien notwendig, für die diese Arbeit essentielle Anhaltpunkte liefert.

Untersuchter Wachstumsfaktor	Neuroprotektive Wirkung*	Einfluss von AP	Einfluss von ATPase	Markierung durch [γ-^{32}P]ATP
NGF	Ja	Aufhebung der NP	Aufhebung der NP	Ja
BDNF	Ja	Aufhebung der NP	Aufhebung der NP	Ja
VEGF	Ja	Kein Einfluss	Aufhebung der NP	Vermutlich ja
EGF	Ja	Kein Einfluss	-	-
IGF	Ja	Aufhebung der NP	-	-
G-CSF	Ja	Aufhebung der NP	-	Ja
CNTF	Nicht nachweisbar	-	-	-
TGF-β1	Nicht nachweisbar	-	-	-

Tab. 4-1: Übersicht zu den Ergebnissen der untersuchten Wachstumsfaktoren

AP, alkalische Phosphatase; NP, Neuroprotektion; - = es liegen bislang noch keine Daten vor; * = beobachtete neuroprotektive Wirkung nach Staurosporin-Schädigung in hippokampalen Primärkulturen neonataler Ratten am 7. Kulturtag.

5 Zusammenfassung

In einer Gesellschaft, die aufgrund eines hohen Lebensstandards, verbesserter medizinischer Versorgung und weiteren technischen Neuerungen immer älter wird, treten zunehmend degenerative Hirnerkrankungen und ischämische Vorfälle auf. Nicht nur stellen diese Erkrankungen eine Belastung für die betroffenen Patienten und deren Angehörige dar, insbesondere in den westlichen Industrienationen haben sie auch unmittelbar sozioökonomische Konsequenzen. Umso dringlicher ist daher die Aufgabe der Wissenschaft, neue Präventions- und Therapiemaßnahmen auf diesem Gebiet zu finden.

Zahlreiche Strategien mit neuroprotektiver Zielrichtung wurden in diesem Zusammenhang bereits verfolgt. Speziell Therapieansätze mit Neurotrophinen erwiesen sich aufgrund mangelhafter Effizienz oder intolerabler Nebeneffekte jedoch in der Praxis meist als wenig geeignet.

Unsere Hypothese könnte die Grundlage für neue Therapiestrategien darstellen, in denen eine Beeinflussung des Aktivitätszustands der Wachstumsfaktoren im Vordergrund stehen könnte. Unsere Annahme, dass Wachstumsfaktoren, speziell NGF und BDNF, einer Aktivierung bedürfen, um an ihre spezifischen Rezeptoren binden und so bestimmte Effekte vermitteln zu können, wurde durch die in dieser Arbeit vorgestellten Studien weiter gefestigt.

So konnte gezeigt werden, dass das Einwirken eines dephosphorylierenden Enzyms – in unserem Fall der alkalischen Phosphatase – die neuroprotektive Wirkung von NGF und BDNF in hippokampalen Primärkulturen vollständig aufhebt. Diese Befunde wurden sowohl in verschiedenen Zellkultursystemen wie auch mit unterschiedlichen Schädigungsmethoden bestätigt. Ebenso bewirkte eine simultane Applikation von ATPase eine drastischen Reduktion jener anti-apoptotischer Effekte. Unter Einbeziehung von Ergebnissen, denen massenspektrometrische Untersuchungen von phosphoryliertem NGF zugrunde lagen, kann man von einer ATP-Bindung an NGF ausgehen, die für die biologische Aktivität relevant ist.

Da die durchgeführten Experimente zwar auf die zusätzliche Bedeutung einer oder mehrerer reversiblen Phosphorylierungen hindeuten, aber aufgrund experimenteller Voraussetzungen keine endgültige Aussage zulassen, muss dieser Punkt in weiteren Studien näher beleuchtet und untersucht werden.

Die hier vorgestellten Befunde zeigen, dass nicht alle Wachstumsfaktoren in gleicher Weise auf die Dephosphorylierung oder ATP-Hydrolyse reagieren: VEGF wirkt trotz Anwesenheit der alkalischen Phosphatase protektiv, während bei Behandlung mit ATPase jegliche schützende Wirkung verloren geht. Ebenso zeigte sich in den Experimenten mit EGF keine Beeinflussung durch eine dephosphorylierende Behandlung. IGF und G-CSF lassen ein ähnliches Verhalten wie die Neurotrophine NGF und BDNF erkennen und können ihre anti-apoptotischen Effekte nur in Abwesenheit von alkalischer Phosphatase vermitteln.

Somit lässt sich feststellen, dass Wachstumsfaktoren tatsächlich einer Aktivierung bedürfen, bei der ATP die tragende Rolle beigemessen werden muss. Für NGF kann man eine ATP-Bindung annehmen, die relevant für die biologische Aktivität des Proteins ist. Die Frage nach einer kovalenten Phosphatbindung muss durch verfeinerte Untersuchungsmethoden in zukünftigen Studien detaillierter betrachtet werden. Ebenso sollte in weiteren Experimenten analysiert werden, ob und wie eine Deaktivierung der Wachstumsfaktoren stattfindet. Hier könnten beispielsweise Phosphatase-Domänen der Wachstumsfaktoren selbst oder am Rezeptorprotein eine Rolle spielen.

Zur Klärung und weiteren Erforschung der genannten Punkte steht uns selbst exprimiertes, rekombinantes NGF und BDNF zur Verfügung, deren biologische Aktivität nachgewiesen werden konnte und die die Basis für die Herstellung von Mutanten sind.

Die gezielte Beeinflussung des Aktivitätszustands von Wachstumsfaktoren könnte sich als eine innovative und elegante Strategie erweisen, um insbesondere Patienten mit Morbus Alzheimer oder der Parkinson-Krankheit zu therapieren, die Effizienz der Therapie zu steigern und Nebenwirkungen zu reduzieren.

6 Literaturverzeichnis

Adams GR (2000) Insulin-like growth factor in muscle growth and its potential abuse by athletes. Br J Sports Med 34: 412-413.

Aloe L, Cozzari C, Calissano P, Levi-Montalcini R (1981) Somatic and behavioral postnatal effects of fetal injections of nerve growth factor antibodies in the rat. Nature 291: 413-415.

Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD (1994) Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 2795-2799.

Araki T, Tohno Y, Takakusu A, Yamada MO (1985) Polarization fluorometry of nucleosome DNA structure with Hoechst 33258 fluorochrome. Cell Mol Biol 31: 407-412.

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease. Am J Pathol 136: 593-608.

Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM (1999) Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. J Neurosci Res 58: 815-822.

Baldwin AN, Shooter, EM (1995) Zone mapping of the binding domain of the rat low affinity nerve growth factor receptor by the introduction of novel N-glycosylation sites. J Biol Chem 270: 4594-4602.

Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E (1994) Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. Cardiovasc Res 28: 1176-1179.

Banker GA, Cowan WM (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. Brain Res 126: 397-342.

Barde YA (1990) The nerve growth factor family. Prog Growth Factor Res 2: 237-248.

Barinaga M (1996) Forging a path to cell death. Science 273: 735-737.

Barker PA, Shooter EM (1994) Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. Neuron 13: 203-215.

Barnard JA, Lyons RM, Moses HL (1990) The cell biology of transforming growth factor beta. Biochim Biophys Acta 1032: 79-87.

Barrett GL (2000) The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. Prog Neurobiol 61: 205-229.

Basu T, Warne PH, Downward J (1994) Role of Shc in the activation of Ras in response to epidermal growth factor and nerve growth factor. Oncogene 9: 3483-3491.

Baxter RM, Cohen P, Obermeier A, Ullrich A, Downes CP, Doza YN (1995) Phosphotyrosine residues in the nerve-growth-factor receptor (Trk-A). Their role in the activation of inositolphospholipid metabolism and protein kinase cascades in phaeochromocytoma (PC12) cells. Eur J Biochem 234: 84-91.

Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, Yoon SO (2002) ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. Neuron 36: 375-386.

Bentley CA, Lee KF (2000) p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. J Neurosci 20: 7706-7715.

Berger EA, Shooter EM (1977) Evidence for pro-beta-nerve growth factor, a biosynthetic precursor to beta-nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 74: 3647-3651.

Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. Neuron 7: 857-866.

Bernatchez PN, Allen BG, Gelinas DS, Guillemette G, Sirois MG (2001) Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways. Br J Pharmacol 134: 1253-1262.

Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes Dev 14: 2919-2937.

Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorgenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Res 33: 2643-2652.

Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM (1997) Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. Blood 89: 2429-2442.

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. Science 286: 1358-1362.

Bradshaw RA, Blundell TL, Lapatto R, McDonald NQ, Murray-Rust J (1993) Nerve growth factor revisited. Trends Biochem Sci 18: 48-52.

Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, Thorner J, Gibson HL, Brake AJ, Barr PJ, Thomas G (1990) Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. J Cell Biol 111: 2851-2859.

Bunn SJ, Saunders HI (1995) Staurosporine inhibits inositol phosphate formation in bovine adrenal medullary cells. Eur J Pharmacol 290: 227-236.

Butt AJ, Firth SM, Baxter RC (1999) The IGF axis and programmed cell death. Immunol Cell Biol 77: 256-262.

Carman-Krzan M, Vige X, Wise BC (1991) Regulation by interleukin-1 of nerve growth factor secretion and nerve growth factor mRNA expression in rat primary astroglial cultures. J Neurochem 56: 636-643.

Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA (1996) Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. Science 272: 542-545.

Casaccia-Bonnefil P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. Nature 383: 716-719.

Chalazonitis A, Kessler JA, Twardzik DR, Morrison RS (1992) Transforming growth factor alpha, but not epidermal growth factor, promotes the survival of sensory neurons in vitro. J Neurosci 12: 583-594.

Chao MV, Hempstead BL (1995) p75 and Trk: a two-receptor system. Trends Neurosci 18: 321-326.

Chao M, Casaccia-Bonnefil P, Carter B, Chittka A, Kong H, Yoon, SO (1998) Neurotrophin receptors: Mediators of life and death. Brain Res Rev 2: 295-301.

Cohen P (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. Trends Biochem Sci 25: 596-601.

Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V (1954) A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. Proc Natl Acad Sci U S A 40: 1014-1018.

Cohen S (1960) Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. Proc Natl Acad Sci U S A 46: 302-311.

Cohen-Cory S, Fraser SE (1995) Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. Nature 378: 192-196.

Cordon-Cardo C, Tapley P, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Lamballe F, Kovary K, Klein R, Jones KR, Reichardt LF (1991) The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. Cell 66: 173-183.

Cotrina ML, Gonzalez-Hoyuela M, Barbas JA, Rodriguez-Tebar A (2000) Programmed cell death in the developing somites is promoted by nerve growth factor via its p75(NTR) receptor. Dev Biol 228: 326-336.

Crawford J, Ozer H, Stoller R, Johnson D, Lyman G, Tabbara I, Kris M, Grous J, Picozzi V, Rausch G (1991) Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. N Engl J Med 325: 164-170.

Culmsee C, Gerling N, Lehmann M, Nikolova-Karakashian M, Prehn JH, Mattson MP, Krieglstein J (2002) Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor p75. Neuroscience 115: 1089-1108.

Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR, Greene LA (1997) Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. J Biol Chem 272: 10957-10967.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 91: 231-241.

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Goeddel DV (1986) The murine transforming growth factor-beta precursor. J Biol Chem 261: 4377-4379.

Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA (1994) Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. Science 265: 1596-1599.

Doré S, Kar S, Quirion R (1997) Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human amylin-induced toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 4772-4777.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 102: 33-42.

Eggert A, Ikegaki N, Liu XG, Brodeur GM (2000) Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma. Klin Padiatr 212: 200-205.

Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. Cancer Res 57: 1835-1840.

Engelholm SA, Vindelov LL, Spang-Thomsen M, Brunner N, Tommerup N, Nielsen MH, Hansen HH (1985) Genetic instability of cell lines derived from a single human small cell carcinoma of the lung. Eur J Cancer Clin Oncol 21: 815-824.

Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD (2001) The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. Mol Cell Neurosci 18: 210-220.

Farhadi H, Pareek S, Day R, Dong W, Chretien M, Bergeron JJ, Seidah NG, Murphy RA (1997) Prohormone convertases in mouse submandibular gland: co-localization of furin and nerve growth factor. J Histochem Cytochem 45: 795-804.

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997a) The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 18: 4-25.

Ferrara N, Keyt B (1997b) Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. EXS 79: 209-232.

Fiorucci S, Mencarelli A, Mannucci R, Distrutti E, Morelli A, del Soldato P, Moncada S (2002) NCX-4016, a nitric oxide-releasing aspirin, protects endothelial cells against apoptosis by modulating mitochondrial function. FASEB J 16: 1645-1647.

Folkman J (1994) Angiogenesis and breast cancer. J Clin Oncol 12: 441-443.

Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrisey D, McClain J, Wang DY, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM (1992) Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. Neuron 9: 295-305.

Friedman WJ, Green LA (1999) Neurotrophin signaling via Trks and p75. Exp Cell Res 253: 131-142.

Friedman WJ (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. J Neurosci 20: 6340-6346.

Garke G, Deckwer WD, Anspach FB (2000) Preparative two-step purification of recombinant human basic fibroblast growth factor from high-cell-density cultivation of Escherichia coli. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 737: 25-38.

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N (1998) Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem 273: 13313-13316.

Gerschenson LE, Rotello RJ (1992) Apoptosis: a different type of cell death. FASEB J 6: 2450-2455.

Goldberg MP, Choi DW (1990) Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose. Stroke 21: III75-77.

Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. J Neurosci 13: 3510-3524.

Gomez N, Cohen P (1991) Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. Nature 353: 170-173.

Graham SH, Chen J (2001) Programmed cell death in cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 21: 99-109.

Guerrin M, Moukadiri H, Chollet P, Moro F, Dutt K, Malecaze F, Plouet J (1995) Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. J Cell Physiol 164: 385-394.

Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary. Neuron 6: 845-858.

Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD (1994) The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. Neuron 13: 187-201.

Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO, Giehl KM (2004) Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 6226-6230.

He XL, Garcia KC (2004) Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. Science 304: 870-875.

Hofer MM, Barde YA (1988) Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. Nature 331: 261-262.

Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. Nature 344: 339-341.

Hyman KM, Seghezzi G, Pintucci G, Stellari G, Kim JH, Grossi EA, Galloway AC, Mignatti P (2002) Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in vascular endothelial cells by activation of mitogen-activated protein kinase. Surgery 132: 173-179.

Ibanez CF (1998) Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. Trends Neurosci 21: 438-444.

Ibanez CF (2002) Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. Trends Neurosci 25: 284-286.

Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R, Squinto SP (1992) Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution and receptor specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 3060-3064.

Ip NY, McClain J, Barrezueta NX, Aldrich TH, Pan L, Li Y, Wiegand SJ, Friedman B, Davis S, Yancopoulos GD (1993) The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. Neuron 10: 89-102.

Johnson EM, Gorin PD, Brandeis LD, Pearson J (1980) Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. Science 210: 916-918.

Johnson EM, Osborne PA, Rydel RE, Schmidt RE, Pearson J (1983) Characterization of the effects of autoimmune nerve growth factor deprivation in the developing guinea-pig. Neuroscience 8: 631-642.

Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. Cell 47: 545-554.

Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF (1991) Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. Nature 350: 158-160.

Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 10: 381-391.

Kaplan DR, Stephens RM (1994) Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. J Neurobiol 25: 1404-1417.

Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res 55: 5687-5692.

Kerr JF (1971) Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. J Pathol 105: 13-20.

Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV (1995) Anatomical methods in cell death. Methods Cell Biol 46: 1-27.

Kerr JF, Harmon BV (1991) Definition and incidence of apoptosis: a historical perspective. In: Apoptosis: The molecular basis of cell death. Current communications in cell and molecular biology (Tomei LD, Cope FO, eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 73: 2013-2026.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257.

Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M (1991) The trk-proto oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. Cell Mol Biol 65: 189-197.

Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M (1989) TrkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. EMBO J 8: 3701-3709.

Klumpp S, Kriha D, Bechmann G, Maassen A, Maier S, Pallast S, Hoell P, Krieglstein J (2006) Phosphorylation of the growth factors bFGF, NGF and BDNF: a prerequisite for their biological activity. Neurochem Int 48: 131-137.

Kornblum HI, Raymon HK, Morrison RS, Cavanaugh KP, Bradshaw RA, Leslie FM (1990) Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor: effects on an overlapping population of neocortical neurons in vitro. Brain Res 535: 255-263.

Kriha D (2006) Phosphorylierung von FGF-2: Strukturelle Charakterisierung und funktionelle Bedeutung. Dissertation, Marburg.

Krohn AJ, Preis E, Prehn JH (1998) Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. J Neurosci 18: 8186-8197.

Kuzuya M, Ramos MA, Kanda S, Koike T, Asai T, Maeda K, Shitara K, Shibuya M, Iguchi A (2001) VEGF protects against oxidized LDL toxicity to endothelial cells by an intracellular glutathione-dependent mechanism through the KDR receptor. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 765-770.

Lamballe F, Klein R, Barbacid M (1991a) TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. Cell 66: 967-979.

Lamballe F, Klein R, Barbacid M (1991b) The trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. Princess Takamatsu Symp 22: 153-170.

Latt SA, Wohlleb JC (1975) Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin and metaphase chromosomes. Chromosoma 52: 297-316.

Latt SA, Stetten G (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. J Histochem Cytochem 24: 24-33.

Lazarovici P, Rasouly D, Friedman L, Tabekman R, Ovadia H, Matsuda Y (1996) K252a and staurosporine microbial alkaloid toxins as prototype of neurotropic drugs. Adv Exp Med Biol 391: 367-377.

Lazarovici P, Matsuda Y, Kaplan D, Guroff G (1997) The protein kinase inhibitors K-252a and staurosporine as modifiers of neurotrophin receptor signal transduction. In: Cellular and Molecular Mechanisms of Toxin Action (Gutman Y, Lazarovici P, eds), pp 69-93. Amsterdam: Harwood Academic Publishers GmbH.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. Science 294: 1945-1948.

Lee P, Son D, Lee J, Kim YS, Kim H, Kim SY (2003) Excessive production of nitric oxide induces the neuronal cell death in lipopolysaccharide-treated rat hippocampal slice culture. Neurosci Lett 349: 33-36.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. J Exp Med 185: 1481-1486.

Leist M, Jäättelä M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 589-598.

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. Endocr Rev 16: 143-163.

Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. J Exp Zool 116: 321-361.

Levi-Montalcini R, Booker B (1960) Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve-growth protein. Proc Natl Acad Sci U S A 46: 384-391.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 86: 147-157.

Lovejoy B, Cascio D, Eisenberg D (1993) Crystal structure of canine and bovine granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). J Mol Biol 234: 640-653.

Maggirwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, Freeman RS (1998) Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. J Neurosci 18: 10356-10365.

Maiese K, Boniece I, DeMeo D, Wagner JA (1993) Peptide growth factors protect against ischemia in culture by preventing nitric oxide toxicity. J Neurosci 13: 3034-3040.

Maiese K, Boccone L (1995) Neuroprotection by peptide growth factors against anoxia and nitric oxide toxicity requires modulation of protein kinase C. J Cereb Blood Flow Metab 15: 440-449.

Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. Science 247: 1446-1451.

Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 146: 3-15.

Maroto R, Perez-Polo JR (1997) BCL-2-related protein expression in apoptosis: oxidative stress versus serum deprivation in PC12 cells. J Neurochem 69: 514-523.

Martin LJ (2001) Neuronal cell death in nervous system development, disease and injury. Int J Mol Med 7: 455-478.

Martiny-Baron G, Marme D (1995) VEGF-mediated tumour angiogenesis: a new target for cancer therapy. Curr Opin Biotechnol 6: 675-680.

Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M (1989) Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. Mol Cell Biol 9: 24-33.

Massague J, Pandiella A (1993) Membrane-anchored growth factors. Annu Rev Biochem 62: 515-541.

Masters JN, Finch CE, Sapolsky RM (1989) Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons does not involve deoxyribonucleic acid cleavage. Endocrinology 124: 3083-3088.

Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H (1993) Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. Nature 365: 27-32.

Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR (1991) A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 9026-9030.

Mattson MP, Zhang Y, Bose S (1993) Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. Exp Neurol 121: 1-13.

McAllister AK, Lo DC, Katz LC (1995) Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. Neuron 15: 791-803.

McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1997) Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. Neuron 18: 767-778.

McColl BK, Stacker SA, Achen MG (2004) Molecular regulation of the VEGF family - inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. APMIS 112: 463-480.

McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL (1991) New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. Nature 354: 411-414.

Meier P, Finch A, Evan G (2000) Apoptosis in development. Nature 407: 796-801.

Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T (1991) TrkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. Mol Cell Biol 11: 143-153.

Mobley WC, Schenker A, Shooter EM (1976) Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor. Biochemistry 15: 5543-5552.

Moller M, Ingild A, Bock E (1978) Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. Brain Res 140: 1-13.

Morrison RS, Keating RF, Moskal JR (1988) Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor exert differential trophic effects on CNS neurons. J Neurosci Res 21: 71-79.

Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA (1990) TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. Cell 63: 245-247.

Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, Morris SJ, Sossin WS, Murphy RA (1999) Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. J Neurosci 19: 2069-2080.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 13: 9-22.

Nobes CD, Reppas JB, Markus A, Tolkovsky AM (1996) Active p21Ras is sufficient for rescue of NGF-dependent rat sympathetic neurons. Neuroscience 70: 1067-1079.

Obermeier A, Bradshaw RA, Seedorf K, Choidas A, Schlessinger J, Ullrich A (1994) Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. EMBO J 13: 1585-1590.

Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. Annu Rev Neurosci 14: 453-501.

Ortega N, Hutchings H, Plouet J (1999) Signal relays in the VEGF system. Front Biosci 4: 141-152.

Pang L, Sawada T, Decker SJ, Saltiel AR (1995) Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. J Biol Chem 270: 13585-13588.

Pardridge WM, Kang YS, Buciak JL (1994) Transport of human recombinant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through the rat blood-brain barrier in vivo using vector-mediated peptide drug delivery. Pharm Res 11: 738-746.

Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Curr Opin Neurobiol 11: 272-280.

Paxinos G, Franklin KBJ (2000) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic.

Peng S, Wuu J, Mufson EJ, Fahnestock M (2004) Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol 63: 641-649.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. Nature 359: 845-848.

Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D (1989) Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. EMBO J 8: 3801-3806.

Prehn JH, Peruche B, Unsicker K, Krieglstein J (1993) Isoform-specific effects of transforming growth factors-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. J Neurochem 60: 1665-1672.

Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. Science 261: 345-348.

Rattenholl A, Lilie H, Grossmann A, Stern A, Schwarz E, Rudolph R (2001) The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. Eur J Biochem 268: 3296-3303.

Rich T, Allen RL, Wyllie AH (2000) Defying death after DNA damage. Nature 407: 777-783.

Richter C (1997) Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca2+ homeostasis and respiration. Biosci Rep 17: 53-66.

Rohrer H, Hofer M, Hellweg R, Korsching S, Stehle AD, Saadat S, Thoenen H (1988) Antibodies against mouse nerve growth factor interfere in vivo with the development of avian sensory and sympathetic neurons. Development 103: 545-552.

Rudolph R, Lilie H (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. FASEB J 10: 49-56.

Ruit KG, Osborne PA, Schmidt RE, Johnson EM, Jr., Snider WD (1990) Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse. J Neurosci 10: 2412-2419.

Saragovi HU, Gehring K (2000) Development of pharmacological agents for targeting neurotrophins and their receptors. Trends Pharmacol Sci 21: 93-98.

Schneider R, Schweiger M (1991) A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. Oncogene 6: 1807-1811.

Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schabitz WR (2005) The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. J Clin Invest 115: 2083-2098.

Segal RA, Greenberg, ME (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. Annu Rev Neurosci 19: 463-489.

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chretien M, Murphy RA (1996) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. Biochem J 314 (Pt 3): 951-960.

Semkova I, Haberlein C, Krieglstein J (1999) Ciliary neurotrophic factor protects hippocampal neurons from excitotoxic damage. Neurochem Int 35: 1-10.

Serafeim A, Gordon J (2001) The immune system gets nervous. Curr Opin Pharmacol 1: 398-403.

Shi YF, Szalay MG, Paskar L, Sahai BM, Boyer M, Singh B, Green DR (1990) Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. J Immunol 144: 3326-3333.

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. Oncogene 5: 519-524.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 359: 843-845.

Sickmann A, Meyer HE (2001) Phosphoamino acid analysis. Proteomics 1: 200-206.

Skaper SD (2001) Nerve growth factor: a neurokine orchestrating neuroimmune-endocrine functions. Mol Neurobiol 24: 183-199.

Slater AF, Nobel CS, Orrenius S (1995) The role of intracellular oxidants in apoptosis. Biochim Biophys Acta 1271: 59-62.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150: 76-85.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell 92: 735-745.

Sondell M, Lundborg G, Kanje M (1999) Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. J Neurosci 19: 5731-5740.

Sondell M, Sundler F, Kanje M (2000) Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. Eur J Neurosci 12: 4243-4254.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrugghe B (1987) Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. J Cell Biol 105: 1039-1045.

Sporn MB, Roberts AB (1992) Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. J Cell Biol 119: 1017-1021.

Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Blanco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM, Distefano PS, Yancopoulos GD (1991) TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. Cell 65: 885-893.

Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR (1994) Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving Shc and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. Neuron 12: 691-705.

Sun FY, Guo X (2005) Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. J Neurosci Res 79: 180-184.

Sutter A, Riopelle RJ, Harris-Warrick RM, Shooter EM (1979) Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglion cells. J Biol Chem 254: 5972-5982.

Svensson B, Peters M, Konig HG, Poppe M, Levkau B, Rothermundt M, Arolt V, Kogel D, Prehn JH (2002) Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. J Cereb Blood Flow Metab 22: 1170-1175.

Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase. Biochem Biophys Res Commun 135: 397-402.

Teng CS (2000) Differential expression of c-Jun proteins during mullerian duct growth and apoptosis: caspase-related tissue death blocked by diethylstilbestrol. Cell Tissue Res 302: 377-385.

Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB (1991) Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. Oncogene 6: 1677-1683.

Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. Science 270: 593-598.

Thoenen H, Sendtner M (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. Nat Neurosci 5 Suppl: 1046-1050.

Towbin V, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 76: 4350-4354.

Trillet-Lenoir V, Green J, Manegold C, Von Pawel J, Gatzemeier U, Lebeau B, Depierre A, Johnson P, Decoster G, Tomita D (1993) Recombinant granulocyte colony stimulating factor reduces the infectious complications of cytotoxic chemotherapy. Eur J Cancer 29A: 319-324.

Ullrich A, Gray A, Berman C, Dull TJ (1983) Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. Nature 303: 821-825.

Ultsch MH, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, Reilly D, Bass SH, de Vos AM (1999) Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. J Mol Biol 290: 149-159.

Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Shelton DL, Parada LF, Presta LG (1995) An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. EMBO J 14: 2795-2805.

Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Hongo JA, Zhao W, Presta LG (1998) High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. J Biol Chem 273: 5829-5840.

van de Water B, Zoeteweij JP, de Bont HJ, Mulder GJ, Nagelkerke JF (1994) Role of mitochondrial Ca2+ in the oxidative stress-induced dissipation of the mitochondrial membrane potential. Studies in isolated proximal tubular cells using the nephrotoxin 1,2-dichlorovinyl-L-cysteine. J Biol Chem 269: 14546-14552.

van der Geer P, Wiley S, Lai VK, Olivier JP, Gish GD, Stephens R, Kaplan D, Shoelson S, Pawson T (1995) A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides. Curr Biol 5: 404-412.

Vaux DL, Haecker G, Strasser A (1994) An evolutionary perspective on apoptosis. Cell 76: 777-779.

Verhagen A, Ekert P, Pakusch M, Silke J, Connolly L, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell 102: 43-53.

Vinci MC, Visentin B, Cusinato F, Nardelli GB, Trevisi L, Luciani S (2004) Effect of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor on iatrogenic apoptosis in human endothelial cells. Biochem Pharmacol 67: 277-284.

Wallach D (1997) Apoptosis. Placing death under control. Nature 388: 125-126.

Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? Trends Neurosci 23: 20-26.

Watson FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, Stiles CD, Segal RA (1999) TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. J Neurobiol 39: 323-336.

Wei YF, Matthews HR (1991) Identification of phosphohistidine in proteins and purification of protein-histidine kinases. Methods in Enzymology 200: 388-414.

Welsh FA, Sakamoto T, McKee AE, Sims RE (1987) Effect of lactacidosis on pyridine nucleotide stability during ischemia in mouse brain. J Neurochem 49: 846-851.

Werner H, Le Roith D (1997) The insulin-like growth factor-I receptor signaling pathways are important for tumorigenesis and inhibition of apoptosis. Crit Rev Oncog 8: 71-92.

White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode C. elegans. Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences 314: 1-340.

Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, de Vos AM (1999) Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. Nature 401: 184-188.

Wiesmann C, de Vos AM (2001) Nerve growth factor: structure and function. Cell Mol Life Sci 58: 748-759.

Williams RW, Herrup K (1988) The control of neuron number. Annu Rev Neurosci 11: 423-453.

Williams GT (1991) Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell 65: 1097-1098.

Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blumcke I (1996) NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. J Histochem Cytochem 44: 1167-1171.

Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284: 555-556.

Yang B, Slonimsky JD, Birren SJ (2002) A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. Nat Neurosci 5: 539-545.

Yoon SO, Casaccia-Bonnefil P, Carter B, Chao MV (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. J Neurosci 18: 3273-3281.

Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. Nature 407: 802-809.

Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J (2002) Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. J Neurosci 22: 3898-3909.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Sandra Maier
Geburtsdatum	24.02.1978
Geburtsort	Reutlingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Dissertation und Studium

Oktober 2003	Beginn der Promotion bei Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität Marburg
August 2003	Erteilung der Approbation als Apothekerin
Juli 2003	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 2002	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
März 2000	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1998 – 2002	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg

Schulausbildung

1984 – 1997	Grundschule und Gymnasium in Reutlingen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Famulatur

April 2002	Rathaus-Apotheke, Reutlingen
Dezember 2002	Department of Pharmacognosy and Phytotherapy (Prof. Dr. M. Heinrich), School of Pharmacy, University of London

Ergebnisse dieser Arbeit fanden Eingang in folgende Publikationen und Konferenzbeiträge

Maier S, Hasche A, Pallast S, Kriha D, Rose K, Klumpp S, Krieglstein J: Reversible Phosphorylation of bFGF, NGF and BDNF. Posterpräsentation auf dem 11th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Münster, 23.-26.07.2006

Pallast S, Rose K, Kriha D, Hasche A, Maier S, Krieglstein J, Klumpp S: Autophosphorylation and / or ATP-binding of fibroblast growth factor. Posterpräsentation auf dem 11th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Münster, 23.-26.07.2006

Klumpp S, Kriha D, Bechmann G, Maassen A, Maier S, Pallast S, Hoell P, Krieglstein J (2006): Phosphorylation of the growth factors bFGF, NGF and BDNF: A prerequisite for their biological activity, Neurochem Int 48: 131-137

Ott D, Pallast S, Bechmann G, Maassen A, Maier S, Klumpp S, Krieglstein J: Reversible Phosphorylation of bFGF regulates its receptor-mediated signalling. Posterpräsentation auf dem 10th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg, 25.-28.07.2004