Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. Josef Krieglstein

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF-kappaB im neuronalen Zelltod

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin am
Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von
Jan Norbert Siewe
aus
Siegen

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 11. Mai 2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan:	Prof. Dr. B. Maisch
Referent:	Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein
Koreferent:	Prof. Dr. A. Pagenstecher

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 Bedeutung von akuten und degenerativen Hirnerkrankungen 1
1.2 Programmierter Zelltod – Apoptose 3
1.3 Mechanismen des neuronalen Zelltodes 7
1.3.1 Mechanismen der neuronalen Apoptose nach Schlaganfall 7
1.3.2 Endogene Mechanismen der Neuroprotektion 10
1.4 Fragestellungen 13
2 Material und Methoden 14
2.1 Material 14
2.1.1 Tiere und Tierhaltung 14
2.1.2 Pharmaka 14
2.1.3 Materialien für die Zellkultur 15
2.1.3.1 Bestandteile der verwendeten Kulturmedien 15
2.1.3.2 Kulturgefäße 17
2.1.3.3 Sonstige Materialien in der Zellkultur 17
2.1.4 Material für die Luciferasemessung 18
2.1.5 Materialien für die Proteinuntersuchung 18
2.1.6 Material zur Bestimmung der neuronalen Apoptose 20
2.2 Methoden 20
2.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur 20
2.2.2 Anlegen und Kultivierung von embryonalen hippokampalen und kortikalen Neuronenkulturen von NF-kappaB-Reportermäusen 21
2.2.3 Herstellung der Testsubstanzlösungen 24
2.2.4 Behandlung der embryonalen Neuronenkulturen 24
2.2.5 Proteinuntersuchung 25
2.2.5.1 Untersuchung des Proteingehalts 25
2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot 26
2.2.5.3 Immunpräzipitation 29

2.2.6 Luciferaseaktivitätsmessung 30
2.2.7 Permanente fokale Ischämie der Maus 31
2.2.8 Quantifizierung der neuronalen Apoptose in kultivierten Neuronen 32
2.3 Statistik 33
3 Ergebnisse 34
3.1 P53-abhängige NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in apoptotischen Neuronen 34
3.1.1 Effekte von Camptothecin auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in kultivierten Neuronen 34
3.1.1.1 Effekte von Camptothecin auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in embryonalen hippokampalen Neuronen 34
3.1.1.2 Effekte von Camptothecin auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in embryonalen kortikalen Neuronen 35
3.1.2 Effekte des p53-Inhibitors PFT auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in kultivierten Neuronen 36
3.1.2.1 Effekte von Tumornekrosefaktor-_ auf die NF-kappaB-Aktivität in embryonalen hippokampalen Neuronen von NF-kappaB-Reportermäusen 36
3.1.2.2 Effekte von PFT auf die NF-kappaB-Aktivität in embryonalen hippokampalen Neuronenkulturen nach Camptothecinschädigung 37
3.1.2.3 Effekte von PFT auf die NF-kappaB-Aktivität in embryonalen kortikalen Neuronen nach Camptothecinschädigung 39
3.2 P53-abhängige Blockade der NF-kappaB-Transkriptionsaktivität und Effekte von PFT in ischämischem Gehirngewebe 41
3.2.1 NF-kappaB-Aktivität in Gehirngewebe nach permanenter fokaler zerebraler Ischämie 41
3.2.2 Nachweis der Regulation von NF-kappaB-Aktivität in Proben von NF-kappaB-Reportermäusen nach zerebraler Ischämie 43
3.2.3 Einfluss des p53-Inhibitors Pifithrin-_ auf die Transkriptionsaktivität von NF-kappaB in ischämischem Gehirngewebe 45
3.2.4 Einfluss von PDTC und kappaB-decoy-Oligonukleotiden auf die neuroprotektive Wirkung von PFT 47

3.2.5 Effekte von PFT und Camptothecin auf die Interaktion zwischen p53, NF-kappaB und p300. 49
3.3 Effekte von zyklischem Pifithrin (cPFT) 50
3.3.1 Effekte von cPFT auf das Überleben von embryonalen hippokampalen Neuronen nach Camptothecinschädigung 50
3.3.2 Konzentrationsabhängige Effekte von cPFT auf das Überleben von embryonalen hippokampalen Neuronen nach Camptothecinschädigung 52
3.3.3 Effekte von cPFT auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in embryonalen hippokampalen Neuronenkulturen nach Camptothecinschädigung 53
4 Diskussion 55
4.1 Regulation von NF-kappaB in der p53-abhängigen Apoptose 55
4.2 Die p53-Inhibitoren PFT und cPFT und ihr Einfluss auf die p53-abhängige Apoptose 63
4.3 Die Interaktion von p53 und NF-kappaB wird durch p300/CBP vermittelt 71
5 Zusammenfassung 76
Literaturverzeichnis 78
Lebenslauf 101
Publikationsliste 102
Verzeichnis der akademischen Lehrer 103
Danksagung 105

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von akuten und degenerativen Hirnerkrankungen

Das Gehirn des Menschen ist einzigartig in seiner Form und Funktion. Es zeichnet den Menschen als ein individuelles, unabhängiges, kreatives Wesen aus, das zur Kommunikation, Emotionalität, Bewegung und nicht zuletzt zur Autoregulation des körpereigenen Milieus fähig ist. Der Mensch wird sich in der Regel der Bedeutung dieses Organs erst dann bewusst, wenn die Leistungsfähigkeit des Gehirns beeinträchtigt ist, da sich daraus erhebliche Einschränkungen für den Einzelnen und seine Umgebung ergeben.

In den westlichen Industrienationen hat sich infolge der allgemeinen Steigerung der Lebensqualität und des technischen und medizinischen Fortschritts in den letzten 60 Jahren ein bedeutender demographischer Wandel vollzogen. In der Bundesrepublik stagnieren die Geburtenzahlen, während die mittlere Lebenserwartung mit dem Fortschritt der Medizin weiter ansteigt. Erst 1995 lag die mittlere Lebenserwartung für einen männlichen Säugling noch bei 73,5 Jahren (West) bzw. 70,7 Jahren (Ost), für einen weiblichen Säugling gar bei 79,8 Jahren (West) bzw. 78,2 Jahren (Ost). Schon im Jahr 2000 betrug die mittlere Lebenserwartung bei einem männlichen Säugling 74,4 Jahre, bei einem weiblichen 80,6 Jahre. Schätzungen gehen davon aus, dass im Jahre 2050 die mittlere Lebenserwartung von beiden Geschlechtern auf 81,1 bzw. 86,6 Jahre ansteigen wird. Die Hälfte der Bevölkerung in der BRD wird dann älter als 48 Jahre, ein Drittel sogar älter als 60 Jahre sein (Statistisches Bundesamt, 2003).

Durch diese Entwicklung hat sich infolge des gestiegenen medizinischen Standards in Diagnostik und Therapie und der verbesserten allgemeinen Hygiene das Spektrum von den Infektionskrankheiten zu den Krankheiten der Wohlstandsgesellschaft verschoben. Neoplasien, Diabetes Mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen prägen heute das Bild in den Krankenhäusern. Mit Zunahme der Lebenserwartung rücken auch ganz besonders die altersbedingten neurologischen Erkrankungen in den Vordergrund, wobei

hier vor allem Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und zerebrale Insulte zu nennen sind.

Bei Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder der senilen Demenz kommt es im Laufe des Krankheitsprozesses zu einer fortschreitenden Degeneration von Neuronen in umschriebenen Arealen des Gehirns. Im Verlauf des Morbus Parkinson degenerieren hauptsächlich dopaminerge Neurone der Substantia nigra und der Basalganglien, während beim Morbus Alzheimer vor allem der Hippokampus und der Kortex betroffen sind. Im Gegensatz zu diesen chronisch degenerativen Erkrankungen erfolgt nach einem Schlaganfall ein akutes Absterben von Nervenzellen im ischämischen oder hämorrhagischen Gebiet und seiner Umgebung, was durch den Verschluss oder die Ruptur von Gefäßen und nachfolgender Mangelversorgung des Gehirngewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen bedingt ist (Mumenthaler und Mattle, 2002). Man geht davon aus, dass beim Schlaganfall 83 % der Insulte ischämischer, 17 % dagegen hämorrhagischer Genese sind (American Stroke Association, 2003). Bei den ischämischen Insulten sind oftmals Bereiche des Kortex betroffen, wohingegen der Bereich der Basalganglien vor allem durch hämorrhagische Geschehnisse, z. B. infolge des arteriellen Hypertonus, betroffen ist. Hier stellen kleine Arterien, die sogenannten Arteriae lenticostriatae aus dem Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media, eine besondere Prädilektionsstelle für solche Ereignisse dar (Mumenthaler und Mattle, 2002).

Der Schlaganfall ist weltweit in den Industrienationen und in der BRD die dritthäufigste Todesursache. Über 30 % der Schlaganfallpatienten sind nach der Erkrankung dauerhaft auf Hilfe angewiesen. Damit ist der Schlaganfall die häufigste Ursache für schwerste Behinderungen und Pflegebedürftigkeit (American Heart Association, 2001). Allein in den USA leben 4,7 Millionen Schlaganfallpatienten. Die Kosten für die Versorgung dieser Patienten beläuft sich jährlich auf 30 bis 40 Milliarden US-Dollar (American Stroke Association, 2003). Aufgrund der demographischen Entwicklung sind die Zahlen bei Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson nicht weniger dramatisch. In der Bundesrepublik leben 1,5 Millionen Demenzpatienten. Schätzungen sagen voraus, dass in den nächsten 20 Jahren der Anteil der Demenzerkrankten in der Bevölkerung von 2 % auf über 10 % in den Industrienationen ansteigt. Das Statistische Bundesamt geht im Jahr 2005 davon aus, dass die Kosten für ambulante und stationäre

Behandlung dieser Patienten sich im Gesundheitsetat der BRD mit mehr als 5,6 Milliarden Euro niederschlagen (Statistisches Bundesamt, 2005). In der Bundesrepublik sind 250.000 bis 300.000 Menschen an Morbus Parkinson erkrankt. Im Alter von 40 Jahren sind bereits 10 %, im Alter von 50 Jahren 30 % und zwischen dem fünfzigsten und sechzigsten Lebensjahr 40 % der Betroffenen bereits erkrankt (Ärzte Zeitung, 2001).

Sowohl die verheerenden persönlichen Einschränkungen in der Lebensqualität der betroffenen Patienten als auch die ökonomischen Folgen der genannten altersbedingten, neurologischen Erkrankungen machen deutlich, dass weiter nach suffizienten Therapiemöglichkeiten geforscht werden muss. Das Verständnis der molekularen Vorgänge der Hirnschädigung bei diesen Erkrankungen ist eine unabdingbare Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist davon auszugehen, dass trotz der unterschiedlichen Ätiologien der genannten neurologischen Erkrankungen sehr ähnliche Mechanismen an der Degeneration des betroffenen Gehirngewebes beteiligt sind, die in einem festgelegten Programm den neuronalen Zelltod herbeiführen. Dieses Todesprogramm in den degenerierten Neuronen ähnelt in vielfacher Hinsicht der Apoptose, dem physiologischen Zelltod, der unter anderem wesentlich an der embryonalen Entwicklung und in Regenerationsprozessen des Organismus beteiligt ist.

1.2 Programmierter Zelltod – Apoptose

Der apoptotische Zelltod ist evolutionär betrachtet ein sehr altes Phänomen, dessen Mechanismen in eukaryontischen Zellen hoch konserviert sind. Erste Hinweise auf diese Art des Zelltodes mit „genetischer Programmierung“ stammen aus Untersuchungen an dem Nematoden Caenorhabditis elegans. Es stellte sich heraus, dass genau 131 der 1090 Zellen dieses Organismus während der Ontogenese programmiert absterben. Zusätzlich erleiden auch viele Zellen der Keimbahn dieses Schicksal (Meier et al., 2000).
Der Begriff Apoptose bezeichnet ferner das physiologische Absterben von Zellen und Zellverbänden zur Sicherstellung des Gleichgewichtes in den Organen des menschlichen Körpers. Apoptose ermöglicht dem Körper, solche Zellen aus den

Organen zu eliminieren, die ihre Funktion verloren haben oder Zellverbände gefährden oder zerstören könnten.

Beispiel dafür ist die Eliminierung von geschädigten, entarteten oder infizierten Zellen. Aber auch die Vorgänge in der Embryonalentwicklung des Menschen sind entscheidend von dieser Art des physiologischen Zelltodes abhängig, da hier angelegte Zellen wieder entfernt werden müssen, um neu entstehendem Gewebe Raum zu schaffen. Im menschlichen Organismus steuert die Apoptose während der Embryogenese die Bildung der Vorsprünge von Zehen und Fingern durch Absterben der Zellen in den Zwischenräumen (Heemels, 2000). Der Mensch würde ohne diesen Vorgang Schwimmhäute tragen. Im adulten Organismus regelt die Apoptose die Rückbildung von hormonregulierten Organen wie dem Uterus oder auch die Eliminierung von autoaggressiven T-Lymphozyten im menschlichen Thymus (Hirsch-Kaufmann und Schweiger, 2000).

Dieser physiologische Zelltod läuft nach einem genetisch determinierten Programm ab, das über eine festgelegte biochemische Kaskade der Zelle den Tod bringt. Diese biochemische Kette von Prozessen läuft in allen Geweben ähnlich ab und führte zum Begriff des programmierten Zelltodes, der mit dem Begriff Apoptose synonym gebraucht wird. Der Apoptose als morphologischem Begriff steht die Nekrose als ein passiver, energieunabhängiger und verhältnismäßig schnell ablaufender Prozess gegenüber (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997). Sie entsteht durch letale Stimuli, z. B. toxische Substanzen, die einen starken Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration mit konsekutiver Schädigung der Mitochondrien bewirken. In der Folge verklumpt das Chromatin im Zellkern zu zahlreichen, ungleichmäßig geformten Stücken (Kerr et al., 1995), während die Ribosomen sich vom endoplasmatischen Retikulum ablösen. Die Nekrose zeigt als morphologisches Charakteristikum eine Schwellung von Mitochondrien und der gesamten Zelle, die eine Ruptur der Organellen und der äußeren Zellmembran zur Folge hat. Die Zelle platzt schließlich und der Zellinhalt wird in das extrazelluläre Milieu freigegeben (Kerr et al., 1994). Durch diesen Vorgang kommt es bei der Nekrose zur Initiierung einer Entzündungsreaktion mit nachfolgender Schädigung des umliegenden Gewebes. Im Gegensatz dazu ist der programmierte Zelltod ein aktiver, energieverbrauchender Vorgang. Zunächst kondensiert das vorhandene Chromatin im Zellkern zu einer deutlich abgrenzbaren Masse, welche sich dann so an die Kernmembranen anlagert oder isoliert im Zellkern verbleibt. Der Zellkern und das kondensierte Chromatin fragmentieren und es kommt zu

DNA-Doppelstrangbrüchen mit Stücken einer charakteristischen Größe von 180 Basenpaaren oder einem Vielfachen dieser Stücke. Dieses wird durch Ca^{2+}/Mg^{2+}-abhängige Endonukleasen ausgelöst (Arends et al., 1990; Wyllie, 1980). Durch Isolierung und Elektrophorese ist der Nachweis dieser DNA-Fragmente als typische DNA-Leiter möglich (Zhu et al., 1998). Das Zytoplasma kondensiert ebenfalls, was in einer deutlichen Zellschrumpfung resultiert (Majno und Joris, 1995) und zusätzlich zytoplasmatische Vakuolen entstehen lässt. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es jedoch nicht zu einer Zerstörung der Zellmembran und auch die Mitochondrien bleiben intakt. Später bildet die Zytoplasmamembran viele kleine Ausstülpungen, was als „blebbing" bezeichnet wird. Die Zelle fragmentiert schließlich in verschieden große, membranumhüllte Vesike, die als „apoptotische Körperchen" bezeichnet werden. Die Fragmente, die in Form der kleinen, membranumhüllten, apoptotischen Körperchen entstehen, enthalten Chromatinstücke, intakte Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum und werden anschließend von anderen Zellen mittels Phagozytose aufgenommen (Kerr et al., 1995). Dabei kommt es zu keinem Zeitpunkt zu einem Austreten von intrazellulären Bestandteilen in den Extrazellulärraum, was folglich auch keinerlei Entzündungsreaktion zur Folge hat und damit in benachbarten Zellverbänden keinen Schaden hervorruft. Die Apoptose geht somit ohne inflammatorische Prozesse einher (Wyllie et al., 1980; Kerr und Harmon, 1991).

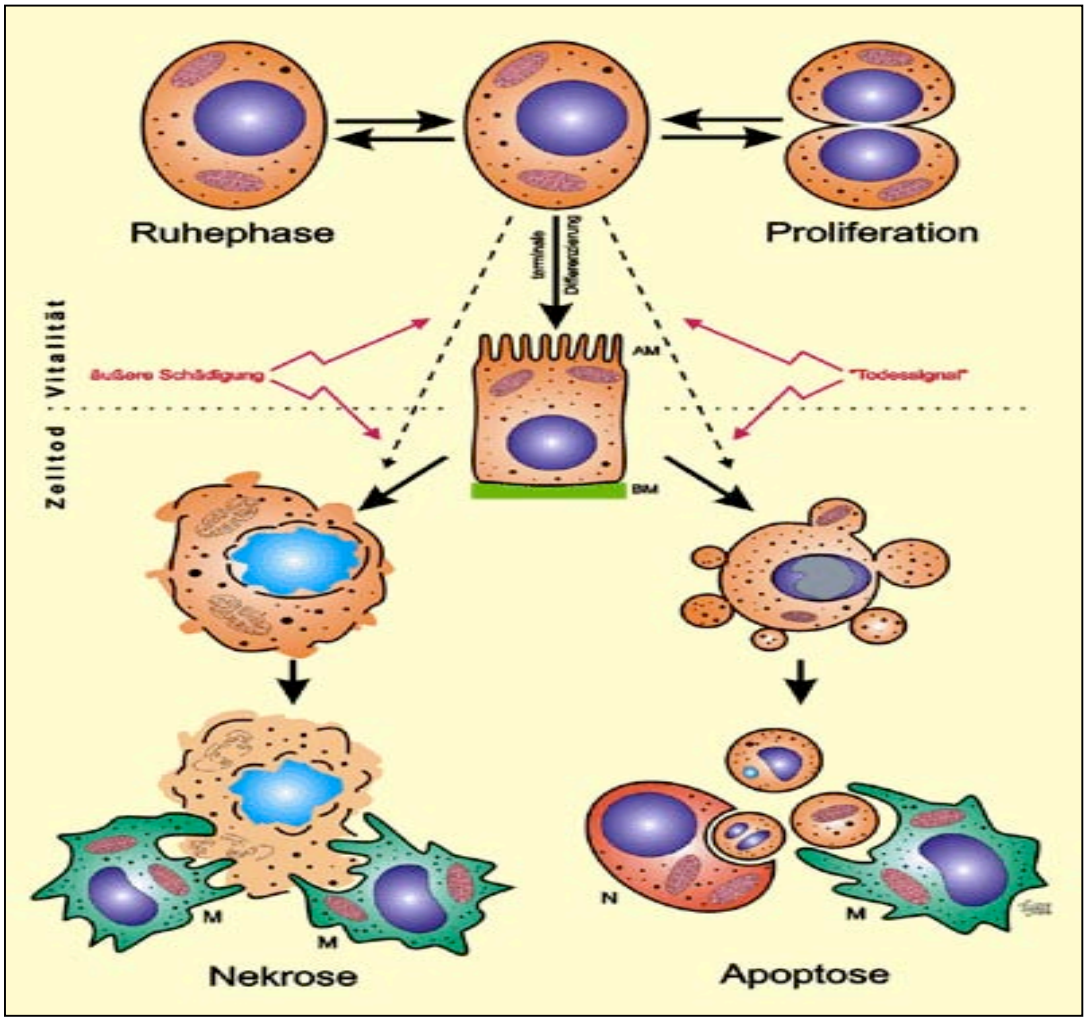

Abbildung 1: Morphologie von Apoptose und Nekrose. Adaptiert von Kammann, 2001.

Auch in menschlichen Neuronen existiert das Phänomen der Apoptose, wobei im nicht teilungsfähigen und damit nicht regenerationsfähigen Gewebe des zentralen und peripheren Nervensystems der programmierte Zelltod zumeist mit pathologischen Vorgängen verknüpft ist. Die Apoptose in der Entwicklung und der programmierte Zelltod von Neuronen bei neurodegenerativen Erkrankungen zeigen vergleichbare biochemische Kaskaden und morphologische Ähnlichkeiten, was zu einem synonymen Gebrauch beider Begriffe geführt hat (Mattson et al., 2001).

In Neuronen, die im Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen geschädigt werden, liegt wahrscheinlich eine Mischform aus einem aktiven Selbstmordprogramm der Zelle, der Apoptose, und einem passiven Zelltod, der Nekrose, vor (Newcomb-Fernandez et al., 1997; Nicotera et al., 1999; Mattson et al., 2001). Verschiedene Stimuli, wie z. B. Zytokine, Ischämie, Hitze, Pathogene etc., können sowohl Apoptose als auch Nekrose in derselben Zellpopulation auslösen. Ferner sind bei beiden Prozessen

Signaltransduktionswege beteiligt, die über Todesrezeptoren, Kinase-Kaskaden und Mitochondrien ablaufen. Durch Veränderung der Signaltransduktionswege ist es sogar möglich zwischen Apoptose und Nekrose umzuschalten (Proskuryakov et al., 2002). So gibt es deutliche Hinweise darauf, dass beispielsweise bei Morbus Alzheimer, zerebraler Ischämie und auch bei Epilepsie nicht nur Apoptose, sondern auch Nekrose von Neuronen an der Hirnschädigung beteiligt ist (Akiyama et al., 2000; Ferrer, 1999; Fujikawa, 2000).

1.3 Mechanismen des neuronalen Zelltodes

1.3.1 Mechanismen der neuronalen Apoptose nach Schlaganfall

Man geht davon aus, dass bei einem zerebralen Insult im ischämischen Fokus die Nekrose überwiegt, während die Penumbra-Zone, also das direkt umliegende Gewebe, einen Bereich mit vorwiegend apoptotischem Zelluntergang beschreibt (Bonfoco et al., 1995; Choi, 1995). Nach Schlaganfall führt die Interaktion von komplexen, pathophysiologischen Prozessen wie Exzitotoxizität, Peri-Infarkt-Depolarisation, Entzündungsreaktionen und Apoptose zum Gewebeuntergang. Alle diese vier Faktoren stellen potentielle Ziele für die Therapie dieser Erkrankung dar. In der Zukunft ist es somit sehr wahrscheinlich, dass therapeutische Strategien, die sowohl frühe Reperfusion als auch Neuroprotektion beinhalten, die Therapie des Schlaganfalls kennzeichnen werden (Dirnagl et al., 1999). Um eine moderne und effektive Therapie mit spezifisch wirkenden, neuroprotektiven Substanzen gestalten zu können, müssen die molekularbiologischen Prozesse, die dem neuronalen Zelltod zugrunde liegen, weiter aufgeklärt werden. Neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer, sind durch Schädigung der Zelle gekennzeichnet, die Funktion und Struktur der Zelle zerstören. Die Mechanismen, die dem neuronalen Zelltod im Verlauf dieser Erkrankungen zugrunde liegen, sind nur in kleinen Teilen verstanden. Es hat sich jedoch durch Untersuchungen an post-mortem-Gewebe von Patienten und in experimentellen Modellen herausgestellt, dass die Apoptose auch hier eine wesentliche Rolle bei dem progressiven Verlust der Neurone einnimmt (Guo et al., 1998; Mattson et al., 2000; Yuan und Yankner, 2000).

Die Kaskaden der neuronalen Apoptose, die bei den verschiedenen neurologischen Erkrankungen nachgewiesen wurde, läuft offenbar trotz ganz unterschiedlicher

Ursachen nach einheitlichem Grundmuster ab (Mattson et al., 2001c). Die angesprochene biochemische Todeskaskade kann durch verschiedene Stressimpulse wie oxidativer Stress, Aktivierung von Glutamatrezeptoren und Entgleisung der intrazellulären Calciumhomöostase aktiviert werden (Green und Reed, 1998; Mattson et al., 2001).

Im Einzelnen heißt das, dass z. B. durch Ischämie die zellulären ATP-Spiegel rapide sinken. Dieses führt zu insuffizienten Transportmechanismen der Zelle, die durch ATP-gesteuerte Ionenkanäle Na^+ und Ca^{2+} aus der Zelle befördern. Dieses wiederum resultiert in einer Membrandepolarisation und nachfolgender Aktivierung von Glutamatrezeptoren, die zu einem massiven Calciumeintritt durch Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und spannungsabhängigen Calciumkanälen führt. Die Folge dieses Verlustes der Calcium- und Energiehomöostase ist die Zerstörung der mitochondrialen Membran (Mattson et al., 2000a). Durch proapoptotische Onkoproteine wie der Bcl-2-Familie Bax, Bid, Bad, Bim oder Bcl-xs kommt es zur Destabilisierung der Mitochondrienmembran, während Bcl-2 und Bcl-xl die mitochondriale Membran schützen (Reed, 1998; Cory und Adams, 2002; Antonsson und Martinou, 2000). Das apoptosefördernde Protein Bad kann die apoptosehemmenden Proteine Bcl-2 und Bcl-xl in der mitochondrialen Membran binden. Dadurch können diese keine Wechselwirkung mit Bax eingehen, einem membranständigen, apoptosefördernden Protein. Bax bildet dann membranständige Kanalporen, die durch noch nicht verstandene Prozesse u. a. die Freisetzung von Cytochrom C vermitteln (Lodish et al., 2001). Durch die mitochondriale Schädigung kommt es wiederum zur Entgleisung der Calciumhomöostase und zu einer verstärkten Bildung von Sauerstoffradikalen (Mattson et al.; 2000a). Durch den oben beschriebenen Mechanismus macht das proapoptotische Onkogen Bax dann den Austritt von Cytochrom C aus dem Mitochondrium möglich (Lodish et al., 2001). Das Gleiche geschieht mit dem Apoptose-induzierenden-Faktor (AIF) und Smac/Diablo. Diese freigesetzten Faktoren leiten im Wesentlichen mittels Aktivierung von Caspasen die Endphase der Apoptose ein (Meier et al., 2000; Yuan und Yankner, 2000). Cytochrom C bindet nach der Freisetzung in das Cytosol an das Adapterprotein Apaf-1 und Procaspase-9, wodurch ein Caspase-aktivierender Komplex entsteht, der als Apoptosom bezeichnet wird. Im Apoptosom liegt Caspase-9 in der aktiven Form vor, so dass die apoptotische Caspase-Kaskade gestartet wird, die durch Aktivierung der Effektor-Caspase-3 zum neuronalen Zelltod führt (Lodish et al., 2001). Welche Prozesse für den

Funktionsverlust der Mitochondrien verantwortlich sind und wie diese Prozesse funktionieren, ist bisher nur in Ansätzen geklärt. Eine zentrale Rolle spielen die schon angesprochene Sauerstoffradikalbildung und der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Des Weiteren sind wahrscheinlich Faktoren wie Prostate Apoptosis Response-4 (Par-4) und der Tumorsuppressor p53 als zentral im Prozess der Mitochondrienschädigung anzusehen (Culmsee et al., 2001a, b; Gesagher und Martinou, 2000; Guo et al., 1998; Kruman und Mattson, 1999).

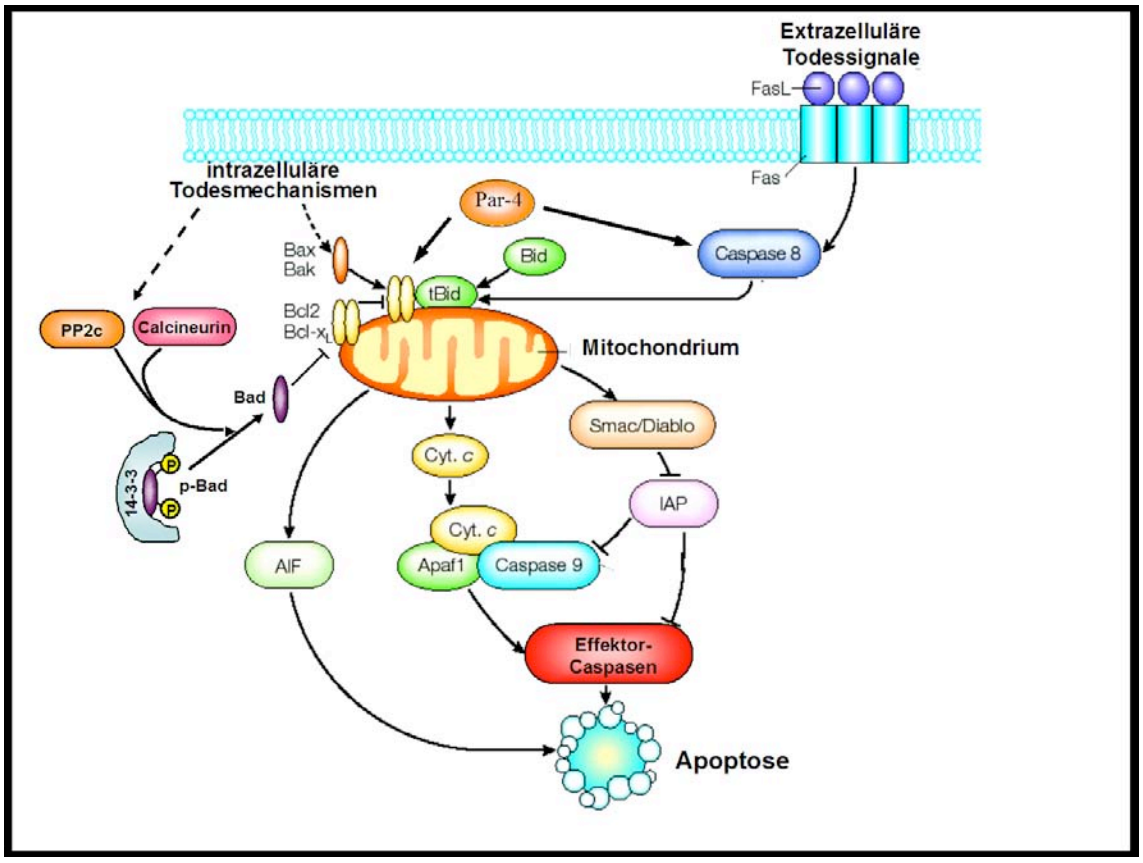

Abbildung 2: Mechanismen des programmierten Zelltods in Neuronen. Adaptiert aus Culmsee und Kriha, 2005. Nach Ischämie aktivieren extrazelluläre Signalmoleküle (z.B. Fas-Ligand , FasL) über so genannte Todesrezeptoren (Fas) oder intrazelluläre Faktoren (Calcium, freie Radikale) Signalkaskaden des programmierten Zelltods. Im Zentrum steht dabei die Schädigung der Mitochondrien, die durch proapoptotische Mitglieder der BCl-2-Proteinfamilie, z. B. Bax, Bak, tBid oder Bad, induziert wird. Diese proapoptotischen Faktoren werden entweder durch Dephosphorylierung (Bad), enzymatische Spaltung (Bid) oder vermehrte Synthese (Bax, Bak) aktiviert. Die geschädigten Mitochondrien verlieren ihre Funktion als Calciumspeicher, bilden vermehrt freie Radikale und setzen ihrerseits Apoptosefaktoren frei (Cyt. c, Smac/Diabolo, AIF) und leiten so die Endphase der Apoptose ein. Cytochrom c und Smac/ Diabolo aktivieren Effektor-Caspasen wie Caspase 3, AIF transloziert in den Zellkern,

führt dort zu DNA-Schädigungen und leitet so Caspase-unabhängigen Zelltod ein. PP2c=Phosphatase-2c, Cyt c=Cytochrom C, AIF= Apoptose-induzierender Faktor, p-BAD=phosphoryliertes BAD, Apaf1= Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1, AIP=Apoptose-Inhibitorproteine.

Der Tumorsuppressor p53 ist für den neuronalen Zelltod in verschiedenen experimentellen Modellen essentiell und nimmt wahrscheinlich auch bei neurodegenerativen Erkrankungen eine zentrale Stellung ein (Culmsee et al., 2001a, 2003). P53 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Regulation des proapoptotischen Onkogens Bax und/oder die Steigerung der Translokation von Bax vom Cytosol in die Mitochondrienmembran beim Zelltod verschiedenster Zelltypen eine zentrale Rolle einnimmt (Rich et al., 2000; Xiang et al., 1998). Es hat sich gezeigt, dass p53 beim neuronalen Zelltod bei Morbus Alzheimer (de la Monte et al., 1997), Morbus Parkinson (Blum et al., 1997), Schlaganfall (Crumrine et al., 1994; Li et al., 1994) und traumatischer Hirnschädigung (Napieralski et al., 1999) reguliert wird. Studien an Zellkulturen haben einen engen Zusammenhang zwischen Expression von p53 und dem neuronalen Zelltod, hervorgerufen durch DNA-schädigende Agentien, Sauerstoff-Glucose-Entzug („in vitro-Ischämie“) und Glutamat, aufgezeigt (Hughes et al., 1997; Sakhi et al., 1997; Uberti et al., 1998; Xiang et al., 1998; Cregan et al., 1999; Inamura et al., 2000; Culmsee et al., 2001a, 2003).

Neben proapoptotischen Mechanismen, die durch p53 als Transkriptionsfaktor initiiert werden, kann p53 auch als Repressor der Genexpression fungieren. Es sind direkte Wechselwirkungen zwischen p53 und DNA an Promotorregionen beschrieben, die zu einer reduzierten Expressionsrate protektiver Gene wie Bcl-2 führen (Budhram-Mahadeo et al., 1999). Als mögliche Mechanismen dieser Repression werden Interaktionen von p53 mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF-kappaB, SP-1, CRE, Ap-1 diskutiert (Kanaya et al., 2000; Ohlsson et al., 1998; Webster und Perkins, 1999; Sun et al., 1999).

1.3.2 Endogene Mechanismen der Neuroprotektion

Den apoptotischen Mechanismen wirken in der Zelle endogene antiapoptotische Mechanismen entgegen. In Neuronen wird z. B. durch trophische Faktoren wie NGF die Phosphoinositol-3-phosphat-Kinase (PI-3-Kinase) aktiviert, wodurch es zu einer

Aktivierung der Kinase Akt kommt, die unter anderem das proapoptotische Onkoprotein Bad phosphoryliert. In der phosphorylierten Form bindet Bad an das Protein 14-3-3, so dass Bad im Cytosol gebunden wird. Folglich können die apoptosehemmenden Proteine Bcl-2 und Bcl-xl das Membranprotein Bax inhibieren und somit die Freisetzung von Cytochrom C und die nachfolgende Aktivierung der Caspasekaskade verhindern (siehe Abb. 2). Durch den PI-3-Kinase-Akt-Signalweg werden zudem weitere bedeutende antiapoptotische Faktoren aktiviert (Lodish et al, 2001). Einer dieser antiapototischen Faktoren ist möglicherweise der Transkriptionsfaktor „Nuclear Factor kappa B“ (NF-kappaB). NF-kappaB besteht grundsätzlich in seiner inaktiven Form aus einem Komplex von drei Untereinheiten, von denen zwei (prototypische) als 50 kDa (p50) und 65 kDa (p65; RelA) und eine als inhibitorische Untereinheit (IkappaB_ oder IkappaBβ) zu identifizieren sind (Mattson et al., 2000b). Allerdings werden in Säugetieren 5 verschiedene Untereinheiten beschrieben, RelA (p65), NF-kappaB2 (p52/p100), NF-kappaB1 (p50/p105), RelB und c-Rel, die alle eine Rel-homologe Domaine enthalten. Diese erlaubt ihnen, sich zu Dimeren zu verbinden und sich an DNA zu binden. Je nach Zelltyp, Entwicklungsstadium und umgebungsspezifischen Faktoren ist es so möglich, dass sich andere NF-kappaB-DNA-bindende Untereinheiten entwickeln. In den meisten Zellen sind diese NF-kappaB-Dimere normalerweise inaktiv im Cytosol vorhanden, da die Interaktion mit einem der inhibitorischen IkB-Einheiten (IkB_, IkBß, IkB_, IkB_, Bcl-3) ihre Aktivität verhindert (Bhakar et al., 2002; Mattson et al., 2000b). Der NF-kappaB/IkB-Komplex ist im Cytosol lokalisiert und NF-kappaB wird aktiviert, wenn IkB vom Gesamtkomplex dissoziiert. Das p50/p65-Dimer oder ein anderes mögliches Dimer der oben angesprochenen NF-kappaB-Untereinheiten transloziert vom Cytosol in den Nukleus und bindet an NF-kappaB-spezifische Promotorregionen von Genabschnitten. (Mattson et al., 2000b). Die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von IkB ist Voraussetzung für die Dissoziation von IkB vom Transkriptionsfaktor-Dimer. IkappaB wird dann im Proteasom abgebaut (Woronicz et al., 1997). IkB wird durch einen Protein-Kinase-Komplex (IkBkinase, IKK) phosphoryliert. Verschiedene Kinasen wie NF-kappaB-inducing kinase (NIK; Malinin et al., 1997) und die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase-1 (MEKK1; Lee et al., 1998) werden neben Akt als Auslöser dieser IkB-Phosphorylierungskaskade beschrieben. Es wurde vielfach nachgewiesen, dass der Transkriptionsfaktor NF-kappaB in Neuronen gegen verschiedene Noxen Protektion vermittelt, z. B. gegen oxidativen Stress und

Exzitotoxizität (Mattson et al., 2000b). Es gibt zahlreiche Belege für eine Schlüsselrolle von NF-kappaB in wichtigen (neuro-) protektiven Signalkaskaden, die in der Zelle unter anderem durch Wachstumsfaktoren, z. B. Neurotrophine, aktiviert werden.

Entgegen Belegen für eine neuroprotektive Funktion von NF-kappaB wurde in kultivierten Neuronen und nach zerebraler Ischämie ein Zusammenhang der erhöhten Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors mit neuronalem Zelltod aufgezeigt (Clemens et al., 1997; Grilli et al., 1996; Stephenson et al., 2000; Schneider et al., 1999). Allerdings ist bisher nicht nachzuweisen, dass zwischen der Aktivierung von NF-kappaB in Neuronen und der Induktion von neuronaler Apoptose tatsächlich ein kausaler Zusammenhang besteht. In diesem Kontext sind aber Ergebnisse aus Untersuchungen an Zelllinien vorhanden, die den scheinbaren Widerspruch der Induktion und Aktivierung von NF-kappaB in apoptotischen Zellen aufheben können.

In diesem Zusammenhang wird häufig der Transkriptionskofaktor p300/CBP erwähnt, der als ein Bindeglied zwischen dem proapoptotischen p53-Signalweg und dem antiapoptotischen NF-kappaB fungieren könnte. Jedoch ist bislang noch völlig unklar, ob dieser Mechanismus in Neuronen, insbesondere nach Schädigung tatsächlich eine Rolle in der Apoptose von Neuronen spielt. Im Gegensatz zu diesen möglichen gegensätzlichen Effekten zeigen andere Publikationen eine kooperativ-proapoptotische Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-kappaB mit p53 in Zelllinien und in kultivierten Neuronen (Benoit et al., 2000; Grilli und Memo, 1999; Uberti et al., 2000; Ryan et al., 2000). Auch solche Wechselwirkungen sind in geschädigten Neuronen denkbar und bedürfen weiterer Klärung. Eine Möglichkeit, in die angesprochene antiapoptotische p53-Kaskade einzugreifen und damit sowohl ihre Existenz zu unterstreichen als auch weitere Mechanismen aufzudecken, ergibt sich durch den p53-Inhibitor Pifithrin-_ (PFT). In kultivierten hippokampalen und kortikalen Neuronen wurden bereits neuroprotektive Effekte gegen die DNA-schädigenden Agentien Camptothecin und Etoposid, die nachweislich neuronale Apoptosekaskaden induzieren, nachgewiesen (Culmsee et al., 2000a, 2001 a, c). Dieses unterstreicht die zentrale Bedeutung des Tumorsuppressorproteins p53 in der neuronalen Apoptose und zeigt gleichzeitig die Gelegenheit auf, mit PFT die Mechanismen des neuronalen Zelltodes weiter zu erforschen.

1.4 Fragestellungen

Aufgrund der widersprüchlichen Berichte in der Literatur ist die Rolle von NF-kappaB im neuronalen Zelltod nicht hinreichend geklärt. Dies gilt sowohl für experimentelle Modelle, in denen neuronale Apoptose durch DNA-Schädigung und somit offensichtlich p53-abhängig induziert wurde, als auch für komplexe Schädigungsmodelle der zerebralen Ischämie, bei denen eine Vielzahl von Mechanismen des neuronalen Zelltods gleichzeitig aktiviert wurden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Regulation von NF-kappaB in apoptotisch geschädigten Neuronen in vitro und im ischämischen Hirngewebe, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Interaktion von NF-kappaB mit dem Apoptose-induzierenden Tumorsuppressor p53 herausgestellt werden.

Wie ist die Transkriptionsaktivität von NF-kappaB in (apoptotisch) geschädigten Neuronen verändert?

Es soll zunächst geklärt werden, wie sich die Transkriptionsaktivität von NF-kappaB in apoptotisch geschädigten Neuronen verändert. Es ist nicht eindeutig erfasst, ob es zu einem Anstieg oder zu einem Abfall der Transkriptionsaktivität kommt. Entsprechende Untersuchungen wurden an kultivierten Neuronen und nach fokaler zerebraler Ischämie in Gehirngewebeextrakten aus NF-kappaB-Reportermäusen durchgeführt.

Hat p53 einen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von NF-kappaB?

In Modellen des p53-abhängigen Zelltods und mit Hilfe von p53-Inhibitoren soll überprüft werden, ob die NF-kappaB-Aktivität durch p53 beeinflusst wird. Dabei wird auch untersucht, wie der p53-Inhibitor Pifithrin-_ und neue PFT-Analoga die NF-kappaB-Aktivität in Neuronen unter normalen Bedingungen beeinflussen. Zudem soll geklärt werden, ob NF-kappaB als Gegenspieler von p53 tatsächlich entscheidend das Überleben von Neuronen sichert.

Spielt der Transkriptionskofaktor p300/CBP eine Rolle in der Interaktion zwischen NF-kappaB und p53?

Der Transkriptionskofaktor p300/CBP könnte das Bindeglied zwischen NF-kappaB und p53 sein (Ikeda et al., 2000; Ravi et al., 1998; Webster et Perkins, 1999). Diese Hypothese soll erstmals in Neuronen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Es wurden 14 Tage alte Embryonen von transgenen NF-kappaB-Luciferase-Reportermäusen verwendet, die aus institutseigener Zucht stammten. Diese Tiere besitzen in ihrem Genom ein Luciferase-Reporter-Gen, dem zwei Kopien der NF-kappaB-regulatorischen Einheit vorgeschaltet sind (Millet et al., 2000; Rosenfeld et al., 1983).

Die Anzahl der verwendeten Versuchstiere wurde auf das notwendige Minimum beschränkt. Die Versuche wurden nach Prüfung durch die Tierschutzkommission und Genehmigung durch die zuständige Behörde gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz so durchgeführt, dass Schmerzzustände der Tiere auf ein Minimum reduziert wurden.

Die Tiere wurden in einem klimatisierten Tierstall unter standardisierten Bedingungen in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und bei einer Raumtemperatur von 23 +/- 1˚C gehalten. Die Luftfeuchtigkeit in den Räumen betrug 55 +/- 5 %. Die Mäuse wurden durch freien Zugang zu Standardfutter der Firma Altromin (Lage/Lippe) ernährt. Zudem stand ihnen Trinkwasser zur freien Verfügung.

2.1.2 Pharmaka

Camptothecin	Sigma, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Taufkirchen
Fluothane	Zeneca GmbH, Frankfurt
KappaB-decoy-Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
PDTC (Pyridin-2,6-bis-(thiocarboxylat))	Sigma, Taufkirchen
PFT (Pifithrin-_)	Tocris Cookson, Ellisville, USA
cPFT (zyklisches Pifithrin-_)	Tocris Cookson, Ellisville, USA
TNF-α (Tumornekrosefaktor-_)	Sigma, Taufkirchen

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

2.1.3.1 Bestandteile der verwendeten Kulturmedien

Antibiotika/Antimykotika-Lösung (10000 I.E. Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin und 25µg/ml Amphotericin B)	Gibco, Eggenstein
B27 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	PAA, Cölbe
Gentamicinsulfat	Sigma, Taufkirchen
Glucose	Sigma, Taufkirchen
Hank`s Balanced Salt Solution 10x	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumsulfat x 7 H_20	Sigma, Taufkirchen
MEM (mit Earle´s Salzen, ohne Glutamin und Natriumhydrogencarbonat)	Gibco, Eggenstein
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Sigma, Taufkirchen
Neurobasal™ Medium	Gibco, Eggenstein
Pferdeserum	PAA, Marburg
Phenolrot	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenimin 50x	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

Inhaltsstoffe in mg/ml	MEM	Neurobasal™
Anorganische Salze		
$CaCl_2$	200,00	----
$Ca(N0_3)_2$ x 4 H_20	----	100,00
KCl	400,00	400,00
$MgS0_4$	97,67	48,84
NaCl	6800,00	6000,00
NaH_2P0_4 x H_20	140,00	----
Na_2HP04	----	800,00
Aminosäuren		
L-Arginin Hcl	126,00	241,86
L-Asparagin (freie Base)	----	50,00
L-Asparaginsäure	----	20,00
L-Cystin x 2 HCl	31,00	65,15
L Glutamin	----	300,00
L Glutaminsäure	----	20,00
Glycin	----	10,00
L-Histidin (freie Base)	----	15,00
L-Histidin HCl x H_2O	42,00	----
L-Hydroxyprolin	----	20,00
L-Isoleucin	52,00	50,00
L-Leucin	52,00	50,00
L-Lysin HCl	72,50	40,00
L-Methionin	15,00	15,00
L-Phenylalanin	32,00	15,00
L-Prolin	----	20,00
L-Serin	----	30,00
L-Threonin	48,00	20,00
L-Tryptophan	10,00	5,00
L-Tyrosin	36,00	----
L-Tyrosin (Dinatriumsalz)	----	28,94
L-Valin	46,00	20,00
Vitamine		
d-Biotin	----	0,20
D-Ca Panthenol	1,00	0,25
Cholinbitartrat	1,80	----
Cholinchlorid	----	3,00
Folsäure	1,00	1,00
i-Inositol	2,00	35,00
Nicotinamid	1,00	1,00
Para-Aminobenzoesäure	----	1,00
Pyridoxal HCl	1,00	1,00
Riboflavin	0,10	0,20
Thiamin HCl	1,00	1,00

Vitamin B_{12}	----	0,005
Andere Komponenten		
Bernsteinsäure	75,00	
D-Glukose	1000,00	2000,00
Glutathion (reduziert)	----	1,00
Natriumsucchinat	100,00	----
Phenolrot	6,00	5,00

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien MEM und Neurobasal™

2.1.3.2 Kulturgefäße

Falcon® Easy Grip™ Zellkulturschalen 10 x 35mm	Becton Dickinson Labware, New York, USA
Falcon® Easy Grip™ Zellkulturschalen 15 x 60 mm	Becton Dickinson Labware, New York, USA
Falcon® Zellkulturflaschen 250 ml mit Schräghals und Gasaustauschkappe (0,2 µm)	Becton Dickinson Labware, New York, USA
Falcon® Zellkulturflaschen 50 ml mit Schräghals und Gasaustauschkappe (0,2 µm)	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® Sterifilter (0,22 µm)	Corning, New York, USA
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Ethanol, 96 %	Lenz Chemie, Westerburg
Millex® Sterifilter (0,22 µm)	Millipore, Bedford, USA
Natriumtetraborat	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenimin	Sigma, Taufkirchen
Sterilium®	Bode Chemie, Hamburg
Trypsin 1:250, aus Schweinepankreas	Sigma, Taufkirchen

Trypsininhibitor Type IIO Chicken egg white	Sigma, Taufkirchen

2.1.4 Material für die Luciferasemessung

Pierce BCA Kit	Perbio Science, Bonn
Luciferase Assay System	Promega, Heidelberg

2.1.5 Materialien für die Proteinuntersuchung

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma, Taufkirchen
Amersham ECL Kit	Amersham, Buckinghamshire, GB
APS	AppliChem, Gatersleben
_-Tubulin-Antikörper	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA- Standard	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Fast Flow Protein G Sepharose	Upstate, USA
GBX Developer/ Replenisher	Sigma, Taufkirchen
GBX Fixer/ Replenisher	Eastman Kodak Company, New York, USA
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Hybond Nitrocellulosemembran	Amersham, Buckinghamshire, GB
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
KODAK-X-OMAT AR Film	Eastman Kodak Company, New York, USA
Luciferase-Antikörper	
1. aus der Ziege	Promega, Heidelberg
2. aus der Maus, monoklonal	Novus Biologicals, Littleton, USA
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell

Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Meerrettichperoxidase-gekoppelter anti-Maus-Antikörper	Promega, Madison, USA
Meerrettichperoxidase-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper	Promega, Madison, USA
Meerrettichperoxidase-gekoppelter anti-Ziege-Antikörper	Vector Labs, Burlingame, USA
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
MicroBC Assay System	Interchem, Montlucon, Frankreich
Mikrotiterplatte Nunc-Immuno™	Nunc, Roskilde, Dänemark
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
P300-Antikörper	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
P53-Antikörper, polyklonal	Cell Signaling, Beverly, USA
Ponceau S rot	Serva Feinbiochemica GmbH & Co.
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat	Sigma, Taufkirchen
Super Signal West Pico Chemilumiscent Kit	Pierce, Rockford, USA
TEMED (N, N, N´, N´-Tetramethylethyl-endiamin)	Sigma, Taufkirchen
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma, Taufkirchen
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.6 Material zur Bestimmung der neuronalen Apoptose

Axiovert 100	Zeiss, Jena
Axiovert 135 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Molecular Probes, Göttingen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat x 7 H_2O	Sigma, Taufkirchen
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur

Sämtliche Glasgeräte wurden für zwei Stunden bei 180°C (Trockenschrank TV 40 UT, Memmert, Emmendingen) hitzesterilisiert. Die Herstellung wässriger Lösungen erfolgte mit Reinstwasser. Die Vorbereitung der Kulturgefäße, Herstellung der Kulturmedien, Präparation der Primärkulturen, Medienwechsel, sowie Behandlung der Zellkulturen wurden auf einer sterilen Werkbank mit laminar horizontaler (Envirco C 424 H, Ceag, Schirp Borken) oder vertikaler Luftführung (Lamin Air ELB 2448, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Schraubdeckel für Flaschen, sowie Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipetten wurden zur Sterilisation für 25 Minuten bei 139°C und 2 bar autoklaviert (Autoklav 11210, Deutsch & Neumann, Berlin). Für die Sterifiltration von Lösungen wurden Millex® Sterifilter mit 0,22 µm Porengröße verwendet. Für Volumina größer als 50 ml wurden Corning® Einmal-Vakuum-Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm verwendet.

Vor Anlegen der Zellkulturen wurde das Präparationsbesteck für mindestens 30 Minuten in 70 %igen Ethanol eingelegt. Alle Basislösungen zur Herstellung von Kulturmedien, Kulturgefäßen und Medienzusätzen sind steril bezogen worden. Zellkulturmedien wurden vor ihrer Verwendung in einem Wasserbad (Fa. Köttermann)

auf 37°C erwärmt. Die Neuronenkulturen wurden in einem Brutschrank (Wärmebrutschrank BB 16, Heraeus, Hanau) bei 37˚C in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO_2 bei 90 bis 95 % relativer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

2.2.2 Anlegen und Kultivierung von embryonalen hippokampalen und kortikalen Neuronenkulturen von NF-kappaB-Reportermäusen

Die Vorbereitung der Kulturschalen und Kultivierung der Neuronenkulturen wurde nach einer modifizierten Methode von Mattson et al., 1993 weitestgehend durch Sandra Engel und Michaela Stumpf durchgeführt.

Vorbereitung der Kulturschalen

Um die Haftung der Zellen auf dem Boden der Kulturgefäße zu gewährleisten, wurden diese mit Polyethyleniminlösung beschichtet, die sich folgendermaßen zusammensetzt:

Boratpuffer

Borsäure	1,24 g
Natriumtetraborat	1,9 g
H_2O	ad 400 ml
pH 8,4 (eingestellt mit NaOH)	

Polyethylenimin 5 %

Polyethylenimin (50 %) 1:10 mit H_2O verdünnt

Polyethyleniminbeschichtungslösung

Polyethylenimin 5 %	0,4 ml
Boratpuffer	ad 400 ml

Die Kulturschalen wurden unter aseptischen Bedingungen für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (1ml/35 mm Ø Kulturschale und 2ml/60 mm Ø Kulturschale). Anschließend wurden die Kulturgefäße dreimal mit sterilem Wasser gespült und unter UV-Licht für mindestens 30 Minuten getrocknet. Nach diesem Vorgang konnten die Kulturschalen bei 37°C über Nacht mit MEM-Lösung folgender Zusammensetzung inkubiert werden:

MEM-Medium

MEM	4,685 g
HEPES	0,119 g
Glucose	5 g
$NaHCO_3$	1,1 g
KCl	0,605 g
Natriumpyruvat	0,06 g
L-Glutamin	0,088 g
Gentamicinsufat	5 mg
Fötales Kälberserum	50 ml
H_2O	ad 500 ml
pH 7,2	

Sie wurden dabei in einem Brutschrank bei einer Atmosphäre von 95 % Luft, 5 % CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90-95 % aufbewahrt.

Vor Beginn der Präparation wurden 20 mg Trypsin und 20 mg Trypsininhibitor in jeweils eine 60-mm-Petrischale gegeben, welche mit UV-Licht unter dem Lamina-Flow 30 Minuten bestrahlt wurden. Gleichzeitig wurden das Operationsbesteck und weitere Petrischalen unter UV-Licht sterilisiert. 9 Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm wurden mit je ca. 7 ml HBSS (1x) gefüllt. Diese Lösung wurde aus folgender Stammlösung gewonnen:

HBSS (10x, Stammlösung)

KCl	4 g
KH_2P0_4	0,06 g
NaCl	80 g
$NaHC0_3$	3,5 g
Na_2HP0_4 x 2 H_2O	0,6 g
D-Glucose	10 g
Phenolrot	0,1 g
H_2O	ad 1000 ml
pH 7,2 (eingestellt mit HCl)	

HBSS (1x)

HBSS 10x	50 ml
HEPES	1,2 g
Gentamicinsulfat	5 mg
H_20	ad 500 ml
pH 7,2 (eingestellt mit HCl)	

Nach diesen Vorbereitungen wurden die trächtigen Mäuse am 14. Tag nach Gestation in tiefer Halothannarkose durch Genickbruch getötet. Mit Ethanol (70 %) wurde die Operationsstelle am Abdomen der Mäuse gereinigt. Anschließend wurden die Embryonen aus dem Uterus des Muttertieres herauspräpariert und in die Petrischale mit 90 mm Durchmesser überführt. Nach Dekapitation und Entnahme der embryonalen Gehirne erfolgte die Dissektion des Hippokampus- und Kortexgewebes unter einem Stereomikroskop (Eschenbach Optik, Deutschland). Jeweils drei Petrischalen wurden benötigt, um die Gehirne aufzunehmen, um sie anschließend zu überführen und die Präparation der Hippokampi und Kortices durchzuführen. Das Gewebe wurde in einem Falcon®-Röhrchen mit 4°C kaltem 10 ml HBSS (1x) bis zur Trituration gesammelt. Bereits entnommenes Kortex- und Hippokampusgewebe und unpräparierte Gehirne verblieben während der Dissektion im Kühlschrank.

Zur Trituration wurden 5 ml HBSS aus dem Falcon-Röhrchen abgenommen und 5 ml Trypsinlösung (20 mg Trypsin/10 ml HBSS (1x)) hinzugegeben, was zu einer Endkonzentration des Trypsins von 1 mg/ml führte. Nach 15 Minuten wurde der Überstand abpipettiert und das Gewebe mit HBSS (1x) gespült und wiederum 5 ml HBSS hinzugefügt. 5 ml der Trypsininhibitorlösung (20 mg Trypsininhibitor/10 ml HBSS (1x)) wurde anschließend für 2 Minuten hinzugegeben, was zu einer Trypsininhibitorkonzentration von 1 mg/ml führte. Nachfolgend wurde das Gewebe zweimal mit HBSS (1x) gewaschen und wiederum 5 ml HBSS (1x) (Kortexgewebe, bei einer Anzahl von 22 Gehirnen) bzw. 4 ml HBSS (1x) (Hippokampusgewebe, bei einer Anzahl von 22 Gehirnen) hinzugegeben. Das Gewebe wurde nun mit einer 10 ml Glaspipette trituiert (maximal 20 mal) und anschließend mit einer Pipette auf die beschichteten Kulturgefäße verteilt. Abschließend musste die Aussaatdichte unter dem Mikroskop kontrolliert werden, da diese zur Proteinsammlung 3,0 x 10^4 Zellen/cm^2 betragen sollte. Die Zellen wurden bei 37°C 5 Stunden in serumhaltiger MEM-Lösung

inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit Neurobasalmedium, in dem die Zellen 7 Tage bis zur Behandlung verblieben.

Neurobasalmedium

Neurobasal	500 ml
HEPES	0,573 g
L-Glutamin	0,088 g
Gentamicinsulfat	5 mg
B-27 Supplement	10 ml
pH 7,2 (eingestellt mit NaOH)	

Die Kultivierung der embryonalen Neuronen erfolgte in einem Brutschrank bei 37ºC, unter einer Atmosphäre von 95 % Luft, 5 % CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90-95 %. Die Behandlung der Kulturen erfolgte am 7. oder 8. Tag nach der Aussaat.

2.2.3 Herstellung der Testsubstanzlösungen

Der Topoisomeraseinhibitor Camptothecin wurde in DMSO zu einer Konzentration von 5 mM gelöst. Diese Camptothecin-Stammlösung wurde entsprechend der benötigten Endkonzentration bei der Behandlung der embryonalen Neuronenkulturen mit Neurobasalmedium verdünnt. Die vorliegende Stammlösung des p53-Inhibitors PFT (100µM) wurde ebenfalls bei der Behandlung auf die entsprechende Konzentration mit Neurobasalmedium verdünnt.

2.2.4 Behandlung der embryonalen Neuronenkulturen

Die Behandlung der Neuronenkulturen mit Camptothecin und PFT erfolgte 7 Tage nach Anlegen der Kulturen. Zu dieser Zeit waren in den Kulturen weniger als 5 % nichtneuronale Zellen vorhanden, wobei es sich dabei hauptsächlich um Astrozyten handelte. PFT wurde eine Stunde vor der Behandlung mit Camptothecin zu den Kulturen mit einer Endkonzentration von 100 bis 200 nM hinzugefügt. Das Medium wurde eine Stunde später gewechselt. Die sich anschließende Camptothecinbehandlung erfolgte mit einer Endkonzentration von 10 µM. Sie wurde nach festgesetzten Zeitpunkten zwischen einer und 24 Stunden beendet.

2.2.5 Proteinuntersuchung

2.2.5.1 Untersuchung des Proteingehalts

Um bei der SDS-Page-Gelelektrophorese gleiche Proteinmengen auftragen zu können, ist es notwendig, den Gesamtproteingehalt des Extraktes zu bestimmen. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte nach der BCA-Methode photometrisch bei 570 nm. Nach dem Auftauen der homogenisierten Kulturproben wurden diese bei 4°C, 1300 x g für 20 Minuten zentrifugiert und 3 µl des Überstandes mit 97 µl PBS versetzt. Gleichzeitig wurde eine Standardreihe angefertigt. Der Standard enthielt 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 mg BSA in 100 µl PBS. Sowohl Proben als auch Standard wurden mit 500 µl BCA-Reagenz versetzt.

PBS-Lösung

KH_2PO_4	0,144 g
Na_2HPO_4 x 7 H_2O	0,526 g
NaCl	9 g
H_2O	ad 1000 ml

pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)

BCA-Reagenz ist eine Mischung aus Kupfer(II)-sulfat und Bicinchoninsäure. Die Stickstoffgruppen der Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu(II)-Salze zu Cu(I)-Salzen, die mit zwei Bicinchoninsäuremolekülen (BCA) einen violetten Komplex bilden, der bei 570 nm photometrisch vermessen werden kann.

BCA-Lösung

Reagenz A	10 ml
Reagenz B	10 ml
Reagenz C	400 µl

Nach Zugabe des Reagenz wurden Proben und Standard 30 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend je 150 µl auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und bei 570 nm vermessen. Nach Erstellen der Standardkurve konnten die Proteinkonzentrationen in den Proben berechnet werden.

2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) dient zur Analyse komplexer Proteingemische. Die Wanderung von Proteinen ist im elektrischen Feld von der Form, Ladung und Masse der Moleküle abhängig. SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung entstehen, die 1,4 g SDS pro g Protein enthalten. Da die Moleküle so über gleiche Form und Ladungsdichte verfügen, ist die Wanderungsgeschwindigkeit nur von der relativen Molekülmasse der Proteine abhängig. Bei der Vorbereitung werden die Proben mit SDS-Beladungspuffer auf 95°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen der Moleküle zu lösen. Durch den Zusatz von ß-Mercaptoethanol in den Beladungspuffer werden Schwefelbrücken zwischen Cysteinen gespalten.

Um eine maximale Bandentrennung zu erreichen, werden allgemein bevorzugt Polyacrylamid-Gele verwendet, die aus einem weitporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel bestehen. Für die Gelelektrophorese wurden Trenngele mit einem Acryl/-Bisacrylamid-Gehalt von 10 % verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele auf 3 mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman-Papier) übertragen, mit Nitrocellulose-Membranen bedeckt, die ebenfalls mit dem Transferpuffer inkubiert wurden, und zum Abschluss wieder mit 3 getränkten Filterpapieren versehen. Das Gel wurde bei 250 mA für 60 Minuten in einer Blotapparatur auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Gleichmäßiger und vollständiger Proteintransfer wurde durch Färben der Membran mit Ponceau-Rot-Lösung überprüft. Die Membranen wurden anschließend bis zur vollständigen Entfärbung mit Tween-Tris Buffered Saline (TTBS) gewaschen, dann für 2 Stunden in einer 5 %igen fettfreien Milch bei Raumtemperatur behandelt und danach bei 4°C mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran mit TTBS dreimal für 20 Minuten gewaschen und abschließend mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-verknüpften sekundären Antikörper behandelt. Um die spezifischen Signale dieser Behandlung sichtbar zu machen, wurde die Membran mit Chemilumineszenz-Reagenz behandelt und die Signale nachfolgend mit einer Belichtungszeit von 10 bis 15 Minuten auf einem Kodakfilm abgebildet.

Die SDS-Polyacrylamidgele sowie die Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot wurden nach folgenden Rezepturen hergestellt:

APS 20 % (Ammoniumpersulfat)

APS	200 mg
H_2O	ad 1 ml

Trenngel (10 %, für 10 Gele)

H_20	25 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	20 ml
TEMED	50 µl
Trenngelpuffer	15 ml
APS (20 %)	100 µl

Trenngelpuffer

Tris	182 g
SDS	4 g
H_20	ad 1000 ml
pH 8,8 (eingestellt mit HCl)	

Sammelgel (für 10 Gele)

H_20	12 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
Acryl/bisacrylamid	3 ml
TEMED	30 µl
APS (20 %, H_20)	60 µl

Sammelgelpuffer

Tris	60,5 g
SDS	4 g
H_20	ad 1000 ml
pH 6,8 (eingestellt mit HCl)	

SDS-Beladungspuffer

Tris	157,5 mg
SDS	1 g
2-Mercaptoethanol	1 ml
Glycerin	2 ml
Bromphenolblau	6 mg

pH 6,8 (eingestellt mit HCl vor Bromphenolblauzugabe)

Transferpuffer

Tris	3,027 g
Glycin	14,4 g
Methanol	100 ml
H_20	ad 1000 ml

Elektrophoresepuffer

Tris	3 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
H_20	ad 1000 ml

TBS

Tris	24,2 g
NaCl	292 g
H_20	ad 1000ml

TTBS

Tris	1,211 g
Tween 20	1 ml
NaCl	8,765 g
H_20	ad 1000 ml

pH 7,5 (eingestellt mit HCl)

Ponceau-Rot-Lösung

Ponceau S rot	2 g

Trichloressigsäure	15 g
H_20	ad 1000 ml

Blockpuffer und verwendete Antikörper:

Die Zusammensetzung des Blockpuffers wurde abhängig von den primären und sekundären Antikörpern gewählt:

Primäre Antikörper:

Polyklonaler anti-Luciferase-Antikörper (1:250) in 5 % Magermilchpulver in TTBS

_-Tubulin-Antikörper (1:1000) in 5 % Magermilchpulver

Sekundäre Antikörper:

Meerrettichperoxidase-gekoppelter anti-Maus-Antikörper (1:3000) in 5%-Magermilchpulver in TTBS

Meerrettichperoxidase-gekoppelter anti-Ziege-Antikörper (1: 5000) in TTBS

2.2.5.3 Immunpräzipitation

Um nachzuweisen, dass in den mit PFT und Camptothecin behandelten Neuronen eine Interaktion zwischen p53 und p300 bzw. NF-kappaB und p300 existiert, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Nachdem die behandelten Zellen mit eiskaltem PBS (s. 2.2.5.1) einmal gewaschen wurden, erfolgte die Zellernte mittels Extraktions-Basispuffer (+PMSF). Anschließend musste der Proteingehalt der Proben vermessen werden. 200 µg des Proteinextraktes wurden danach mit Sammelpuffer (s. 2.2.5.2) auf 250 µl verdünnt und mit 5 µl monoklonalem anti-p300-Antikörper versetzt. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C und unter langsamem Schütteln gelagert, damit sich die Antigen–Antikörperverbindung voll ausbilden konnte.

Am nächsten Tag wurden 30 µl fast flow Sepharose G mit Sammelpuffer zu den Proben hinzugefügt und wiederum bei 4°C über Nacht bei leichtem Schütteln inkubiert. Vor dem Gebrauch der Sepharose G wurde diese mehrmalig gewaschen. Dazu musste die Sepharose 30 Minuten mit Sammelpuffer inkubiert werden. Danach wurde 20 Sekunden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und wieder Sammelpuffer hinzugefügt. Dieser Waschvorgang wurde mehrere Male wiederholt.

Im nächsten Schritt wurden die Proben zentrifugiert und dreimal mit kaltem Sammelpuffer gewaschen. Anschließend wurde das übriggebliebene Pellet mit Probenpuffer (s. 2.2.5.2) versetzt, auf 95°C 5 Minuten erhitzt und zentrifugiert. Nun wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der ein 7,5 % Gel verwendet wurde, und anschließend das Protein mittels Western Blot-Technik auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dieser Vorgang wurde nach oben genannten Verfahren durchgeführt. Allerdings ist zu sagen, dass die Zeit, in der p300 transferiert wurde, sich bei diesem großen Protein auf ca. 4 Stunden belief. Nach Western Blot und Waschen der Membran in 5 % Magermilch in TTBS wurde diese mit einem polyklonalen anti-p53-Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TTBS (s. 2.2.5.2) erfolgte die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper, wobei ein Meerrettichperoxidase-verknüpfter anti-Kaninchen-Antikörper verwendet wurde. Auch hier wurden eine Chemilumineszenz-Reagenz und Kodakfilm zur Detektion der Signale verwendet.

2.2.6 Luciferaseaktivitätsmessung

Genetisch veränderte Reporter-Tiere werden in der Zellbiologie dazu verwendet, Studien über Genexpression und damit zusammenhängende zelluläre Vorgänge durchzuführen. In den verwendeten transgenen NF-kappaB-Luciferase-Reportermäusen sind dem Luciferase-Reporter-Gen zwei Kopien der NF-kappaB-regulatorischen Einheit vorgeschaltet (Millet et al., 2000; Rosenfeld et al., 1983). Bei einer Aktivitätserhöhung von NF-kappaB im Zellkern wird diese Promotorregion aktiviert. Die Folge ist eine erhöhte Luciferase-Expression und damit Luciferaseaktivitätserhöhung. Aus dem Leuchtkäfer gewonnenes Luciferin ermöglicht es, das Maß an Aktivitätserhöhung mittels des Luminometers nach der unten angeführten chemischen Reaktion zu ermitteln, indem das entstehende Licht gemessen wird.

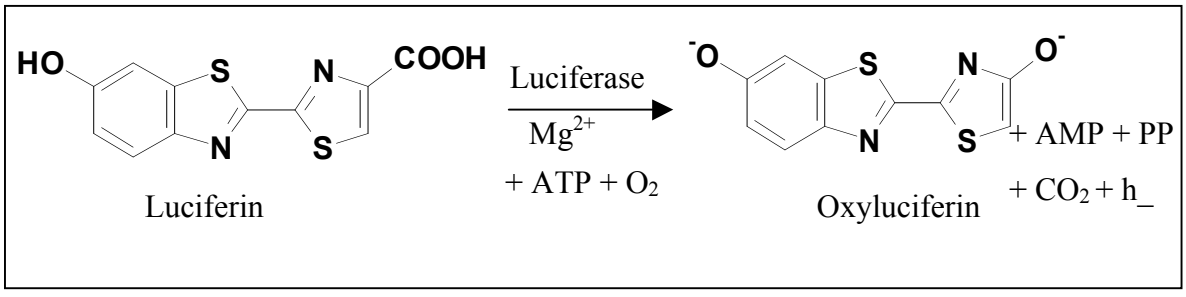

Abbildung 3: Reaktionsmechanismus des Luciferase Assay Systems

Nach Behandlung der kortikalen und hippokampalen Neuronenkulturen der embryonalen NF-kappaB-Reportermäuse wurde die Zellernte durchgeführt. Diese erfolgte zu festgesetzten Zeitpunkten zwischen einer und 24 Stunden nach Behandlung. Die Zellen wurden einmal mit PBS gespült und anschließend mit Luciferase Lysis Buffer (mit H_20 1:5 verdünnt) aufgeschlossen. Im Folgenden wurden die Proben bei 14.000 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Danach wurden die Proben bei –80°C gelagert oder es erfolgte die Luciferaseaktivitätsmessung. Dazu wurden 20 µl des Proteinextraktes mit 100 µl Luciferase Assay Substrate versetzt und unmittelbar danach mit einem Luminometer vermessen. Das daraus erhaltene Maß an Lumineszenz wurde in Lichteinheiten angegeben und auf einer fiktiven Skala aufgetragen. Diese fiktive Skala hatte als Bezugspunkt den Wert der Kontrollprobe.
Im Folgenden werden die oben genannten Lichteinheiten als relative Lichteinheiten (RLU) angegeben.

Luciferase Cell Culture Lysis Reagent, 1x:

Tris-Phosphat (pH 7,8)	25 mM
DTT	2 mM
1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N`,N`-tetraacetic acid	2 mM
Glycerol	10 %
Triton® X-100	1 %

2.2.7 Permanente fokale Ischämie der Maus

Die Versuche der permanenten fokalen Ischämie an NF-kappaB-Reportermäusen, aus denen geschädigtes Gehirngewebe weiteren Versuchen zugeführt werden konnte, wurden von Frau Dr. Vera Junker und Frau Dr. Marina Retiounskaia durchgeführt. Die permanente fokale Ischämie wurde in männlichen Mäusen eines Gewichts von 25-30 g nach der von Welsh et al., 1987 und Junker et al., 2002 beschriebenen Methode induziert. Um möglichst aseptisches Arbeiten zu ermöglichen, wurde das Präparationsbesteck mit Ethanol desinfiziert. Nach tiefer Narkotisierung der Mäuse durch intraperitoneale Injektion von Tribromethanol in einer Konzentration von 600

mg/kg Körpergewicht, wurde die Narkose durch mechanische Reizung an den Hinterpfoten überprüft. Die Körpertemperatur der Mäuse wurde während der Operation mit Hilfe einer Rotlichtlampe bei 37 ± 0,5°C konstant gehalten und mit Hilfe eines Thermometers kontrolliert. Das Fell der Mäuse wurde zwischen Auge und Ohr mit Ethanol desinfiziert und ein senkrechter, ca. 1 cm langer Hautschnitt vollzogen. Durch Elektrokoagulation wurde die Glandula Parotis entfernt und der Musculus Temporalis vom Schädelknochen getrennt. Die Schädeldecke wurde mit einem Feinbohrer (Proxon) über der Arteria cerebri media (MCA) eröffnet, die Dura mater entfernt und die Arteria cerebri media mittels Elektrokoagulation an drei Stellen nach der Abzweigung der lenticulostriären Seitenäste irreversibel verschlossen. Während des Bohrens wurde der Operationsbereich mit physiologischer Kochsalzlösung gekühlt. Nach dieser MCA-Okklusion wurde die Wunde verschlossen und die Tiere wurden in der Aufwachphase für zwei Stunden unter einer Wärmelampe bei ca. 30°C Umgebungstemperatur gelagert. Diese Maßnahme verhinderte eine Unterkühlung der Tiere, die einen neuroprotektiven Effekt zur Folge gehabt hätte. Zwei bis sieben Tage nach MCA-Okklusion konnten die Tiere nach Narkose dekapitiert werden, Gehirngewebe entnommen und weiteren molekularbiologischen Untersuchungen zugeführt werden.

2.2.8 Quantifizierung der neuronalen Apoptose in kultivierten Neuronen

Die Bestimmung der neuronalen Apoptose wurde durchgeführt, indem die geschädigten Zellen mittels Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wurden. Es handelt sich bei diesem Farbstoff um einen liophilen, kationischen Farbstoff, der in der Lage ist Biomembranen von intakten und geschädigten Zellen zu durchdringen. Er färbt die DNA im Nukleus durch Bindung an AT-reiche Sequenzen an. Lebende Zellen zeigen in der Hoechstfärbung einen intakten Zellkern und unverändertes Chromatin. Apoptotische Zellen dagegen zeigen einen fragmentierten Zellkern, der zusätzlich in seiner Größe reduziert sein kann und kondensiertes Chromatin enthält, das sich durch eine stärkere Fluoreszenz von den nicht geschädigten Zellen abhebt. Die Zellen wurden vierundzwanzig Stunden nach Behandlung einmal mit eisgekühlter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gespült und anschließend 30 Minuten mit Methanol fixiert. Die Kulturen wurden mit 1 ml 33258 Hoechstfarbstoff inkubiert, der in Methanol gelöst, in einer Konzentration von 10 µg/ml in den Kulturen vorlag. Nach diesem Vorgang wurden die Zellen nochmals mit PBS gespült und anschließend konnten die

Neuronenkulturen nach den genannten Kriterien unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden. Die Auszählung erfolgte unter Unkenntnis der jeweiligen Behandlung. Es wurden mindestens acht Stellen und 200 Zellkerne pro Kulturschale ausgezählt und daraus der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen errechnet.

2.3 Statistik

Die Daten aus den Versuchen sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (S.D.) aus n Versuchen angegeben. Für die Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde unter Zuhilfenahme des Softwareprogramms Microsoft Winstat die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Scheffé-Test (für den Vergleich mehrerer Gruppen bei Zellkulturexperimenten) oder Student´s t-Test (für den Vergleich von 2 Gruppen) kombiniert. Bei in vivo-Versuchen wurden multiple Vergleiche durch eine Varianzanalyse mit anschließendem Duncan`s-Test durchgeführt. Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit den unterschiedlichen Signifikanzniveaus von $p<0,05$, $p<0,01$ und $p<0,001$ angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 P53-abhängige NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in apoptotischen Neuronen

3.1.1 Effekte von Camptothecin auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in kultivierten Neuronen

3.1.1.1 Effekte von Camptothecin auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in embryonalen hippokampalen Neuronen

Ziel der Experimente war, herauszufinden, wie sich die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in Neuronen verändert, wenn diese mit schädigenden Agentien behandelt werden. Zu diesem Zweck wurden embryonale hippokampale Neuronenkulturen von NF-kappB-Reportermäusen mit dem Topoisomeraseinhibitor Camptothecin über Zeiträume von ein, drei, sechs und vierundzwanzig Stunden behandelt. Die Endkonzentration von Camptothecin betrug 10 µM. Mit dem Luminometer wurden die gewonnenen Proteinextrakte aus diesen Versuchen vermessen. Es zeigte sich, dass die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität bis sechs Stunden nach Schädigung auf ca. 25% des Ausgangsniveaus deutlich abnahm. Danach nahm die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität bis vierundzwanzig Stunden nach Beginn der Schädigung wieder leicht zu, erreichte aber nicht das Kontrollniveau (ca. 50% des Kontrollwertes).

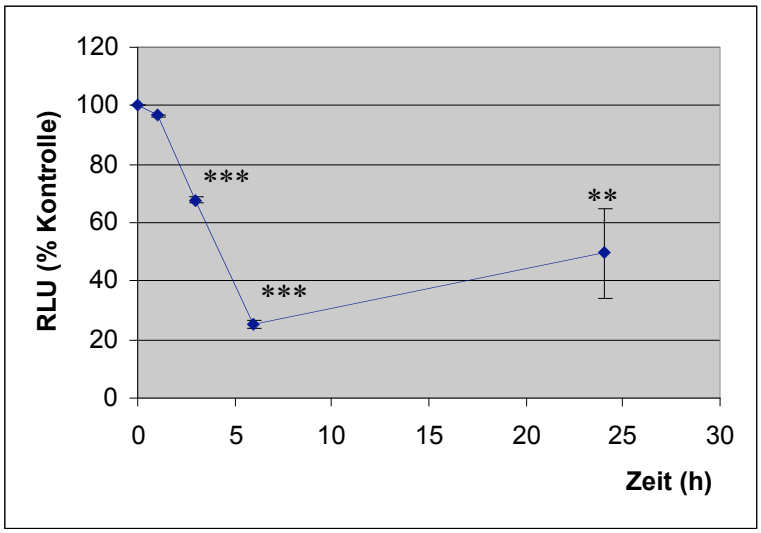

Abbildung 4: Einfluß von Camptothecin auf die NF-kappaB-Aktivität in embryonalen hippokampalen Neuronen. Embryonale hippokampale Neurone von NF-kappaB-Reportermäusen wurden 1, 3, 6, 24 Stunden mit 10 µM Camptothecin behandelt. Die Luciferaseaktivität wurde in den Proteinextrakten als relative Lichteinheiten (RLU) zu den angegebenen Zeitpunkten nach Camptothecinschädigung gemessen, auf die jeweils enthaltene Proteinmenge normalisiert und in Prozent, bezogen auf den Ausgangswert der Kontrolle, als Mittelwert ± S.D. von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. ***p<0,001, ** p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.1.1.2 Effekte von Camptothecin auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in embryonalen kortikalen Neuronen

Um die Ergebnisse der Versuche aus 3.1.1.1 zu bestätigen, wurden analoge Experimente mit embryonalen kortikalen Neuronenkulturen von NF-kappaB-Reportermäusen wiederholt. Die Versuchsbedingungen entsprachen den vorangegangenen Experimenten. Es bestätigten sich die Befunde aus den Experimenten in den hippokampalen Neuronen 3.1.1.1. Nach drei und sechs Stunden Behandlungszeit sank die Transkriptionsaktivität von NF-kappaB signifikant auf 60% bzw. 25% des Ausgangswertes, um dann wieder bis 24 Stunden nach Behandlungsbeginn auf 40% leicht anzusteigen. Es kam also auch hier nicht zu einem Anstieg der NF-kappaB-Aktivität auf Kontrollniveau.

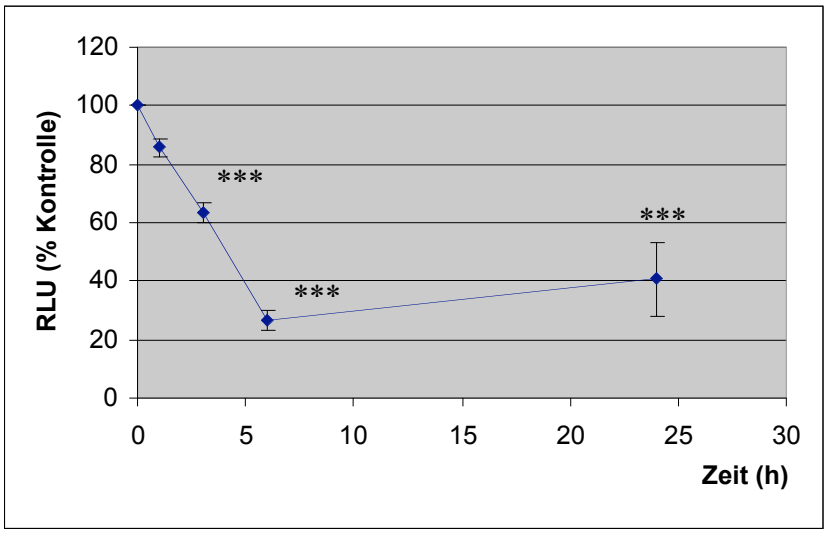

Abbildung 5: Einfluss von Camptothecin auf die Transkriptionsaktivität von NF-kappaB in embryonalen, kortikalen Neuronen. Embryonale kortikale Neurone von NF-kappaB-Reportermäusen wurden über 1, 3, 6 und 24 Stunden mit 10 µM Camptothecin behandelt. Die Luciferaseaktivität wurde in den Proteinextrakten als relative Lichteinheiten (RLU) zu den angegebenen Zeitpunkten nach Camptothecinschädigung gemessen, auf die jeweils enthaltene Proteinmenge normalisiert und in Prozent, bezogen auf den Ausgangswert der Kontrolle, als Mittelwert ± S. D. von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. ***p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.1.2 Effekte des p53-Inhibitors PFT auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in kultivierten Neuronen

3.1.2.1 Effekte von Tumornekrosefaktor-_ auf die NF-kappaB-Aktivität in embryonalen hippokampalen Neuronen von NF-kappaB-Reportermäusen

Dieser Versuch ermöglichte den Nachweis, dass der Tumornekrosefaktor-_ (TNF-_) als Positivkontrolle geeignet ist, um die NF-kappaB-induzierende Potenz des p53-Inhibitors Pifithrin-_ (PFT) zu unterstreichen. Die NF-kappaB-aktivierende Potenz von TNF-_ auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität wurde in der Literatur bereits beschrieben (Mattson et al., 2000).

Aus der Luminometermessung ergab sich eine ausgeprägte NF-kappaB-induzierende Potenz von TNF-_ gegenüber den Kontrollneuronen. Diese Eigenschaft diente in den nachfolgenden Experimenten als Positivkontrolle.

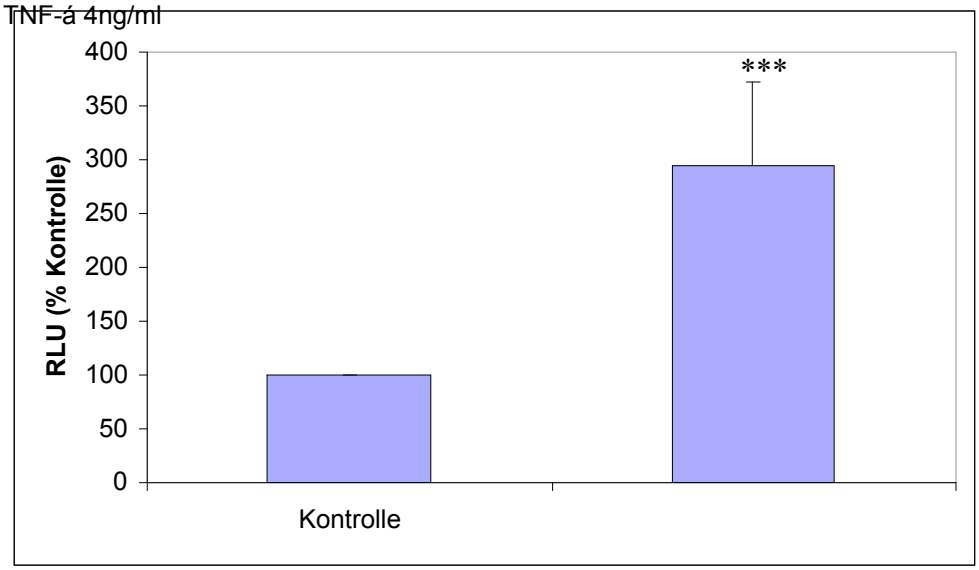

Abbildung 6: Einfluss von TNF-_ auf die NF-kappaB-Aktivität in embryonalen Neuronen. Es wurden embryonale hippokampale Neuronenkulturen verwendet, die von NF-kappaB-Reportermäusen stammten. Die Kulturen wurden sechs Stunden mit TNF-_ in einer Konzentration von 4 ng/ml behandelt, anschließend geerntet und mittels des Luminometers vermessen. Die Luciferaseaktivität wurde in den Proteinextrakten in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen und auf die jeweils enthaltene Proteinmenge normalisiert. Der RLU-Wert ist als Mittelwert ± S.D. in Prozent, bezogen auf die Kontrolle, von 3 Kulturen dargestellt. ***p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Student´s t-Test).

3.1.2.2 Effekte von PFT auf die NF-kappaB-Aktivität in embryonalen hippokampalen Neuronenkulturen nach Camptothecinschädigung

Ziel der Experimente war, die Effekte des p53-Inhibitors Pifithrin-_ (PFT) auf die NF-kappaB-Aktivität in Neuronen von NF-kappaB-Reportermäusen zu beschreiben. Dazu wurden die hippokampalen Neurone entweder mit 100 nM PFT eine Stunde vor der Schädigung mit dem Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin, nur mit PFT oder nur mit Camptothecin behandelt. Kontrollgruppen wurden mit Vehikel (0,2% DMSO) inkubiert. Die Camptothecinschädigung erfolgte über einen Zeitraum von sechs Stunden mit einer Endkonzentration von 10 µM Camptothecin. Die Proteinextrakte wurden sechs Stunden

nach Beginn der Schädigung gesammelt und mittels des Luminometers vermessen. Es zeigte sich, dass PFT den signifikanten Abfall der NF-kappaB-Aktivität nach Camptothecinschädigung teilweise verhinderte. Die PFT-Behandlung allein bewirkte zudem einen Anstieg der NF-kappaB-Aktivität über Kontrollniveau.

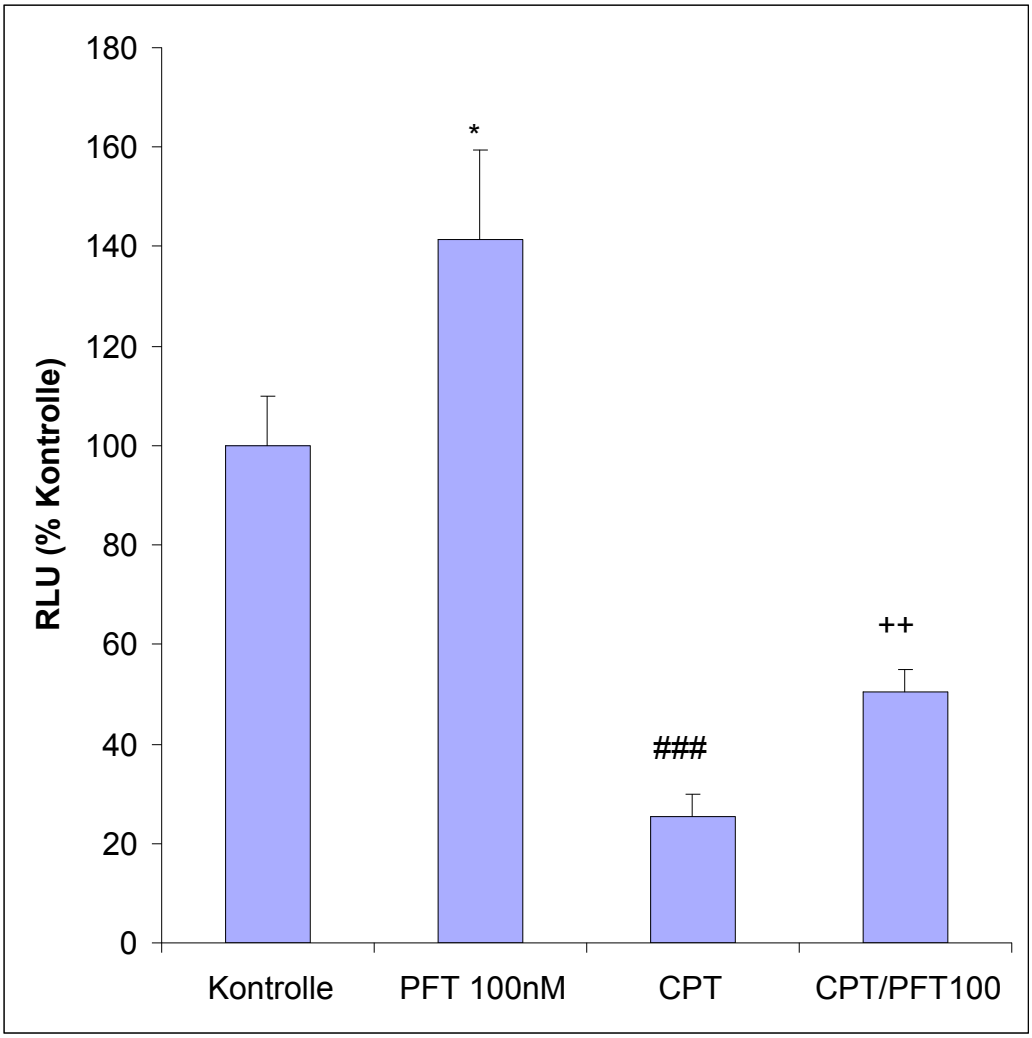

Abbildung 7: Einfluss von PFT auf die NF-kappaB-Aktivität von embryonalen hippokampalen Neuronenkulturen nach Camptothecinschädigung. Hippokampale embryonale Neurone wurden eine Stunde vor Camptothecinschädigung (10 µM) mit PFT (100 nM) behandelt. Die Proteinextrakte wurden 6 Stunden nach Schädigung gesammelt und mittels des Luminometers vermessen. Die RLU Werte sind als Mittelwerte ± S.D. in Prozent, bezogen auf die Kontrolle, von drei Kulturen je Gruppe dargestellt. *$p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, $^{++}p<0,01$ im Vergleich zur Camptothecinbehandlung (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.1.2.3 Effekte von PFT auf die NF-kappaB-Aktivität in embryonalen kortikalen Neuronen nach Camptothecinschädigung

Um die Ergebnisse aus den Versuchen unter 3.1.2.2 zu bestätigen wurden die Experimente ebenfalls an kortikalen Neuronenkulturen durchgeführt. Auch hier wurden die embryonalen, kortikalen Neurone eine Stunde vor Schädigung mit Camptothecin mit PFT (100nM) vorbehandelt. Einige Kulturen wurden nur mit PFT, Kontrollgruppen wurden mit Vehikel behandelt. Auch hier betrug die Behandlungsdauer mit Camptothecin sechs Stunden. Anschließend wurden die Proteinextrakte gesammelt und mit dem Luminometer vermessen. Der Versuch wurde um eine Positivkontrolle (TNF-_) im Vergleich zu 3.1.2.2 erweitert. Dabei wurden einige Kulturen mit TNF-_ behandelt, um einen Vergleich mit der Änderung der NF-kappaB-Aktivität unter PFT-Behandlung zu gewinnen.

Auch in diesen Versuchen zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Experimenten mit den hippokampalen Neuronen. Der durch Camptothecin induzierten Minderung der NF-kappaB-Aktivität konnte durch Behandlung mit PFT entgegengewirkt werden. Behandlung mit PFT allein führte zu einer Erhöhung der NF-kappaB-Aktivität über Kontrollniveau hinaus. Dieses galt auch für die Behandlung mit TNF-_, wobei die Aktivitätserhöhung unter diesen Bedingungen etwas geringer ausfiel als bei PFT.

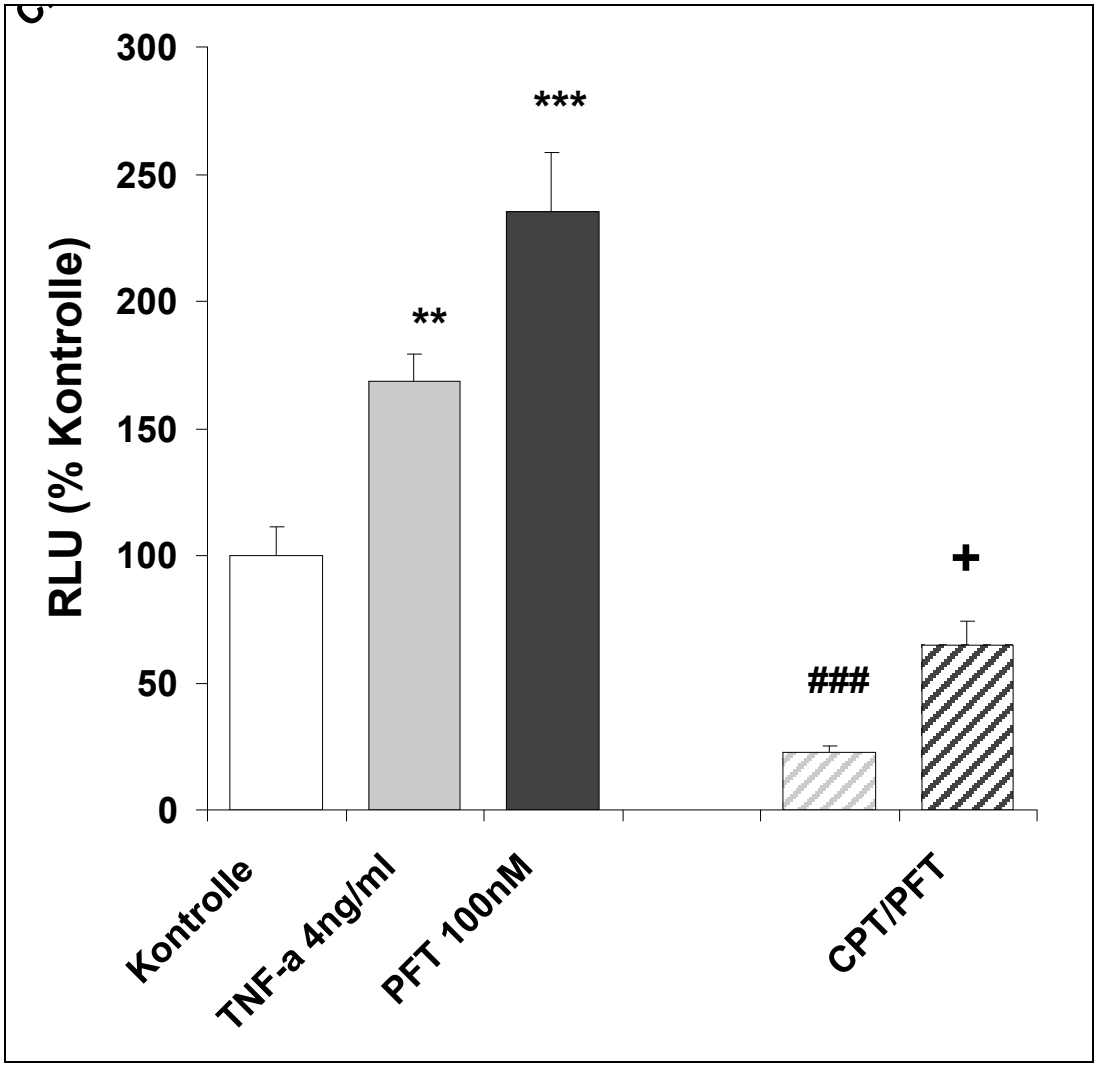

Abbildung 8: Einfluss von PFT auf die NF-kappaB-Aktivität in embryonalen, kortikalen Neuronen nach Camptothecinschädigung. Es wurden Endkonzentrationen von Camptothecin von 10 µM verwendet. Die Wirkstoffkonzentration von PFT betrug 100 nM. TNF-_ wurde mit einer Konzentration von 4 ng/ml appliziert. Die RLU-Werte sind als Mittelwerte ± S.D. in Prozent, bezogen auf die Kontrolle, von 3 Kulturen je Gruppe dargestellt. **p<0,01, ***p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle, ###p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle, +p<0,05 im Vergleich zur Camptothecinbehandlung (Varianzanalyse, Scheffé -Test).

3.2 P53-abhängige Blockade der NF-kappaB-Transkriptionsaktivität und Effekte von PFT in ischämischem Gehirngewebe

3.2.1 NF-kappaB-Aktivität in Gehirngewebe nach permanenter fokaler zerebraler Ischämie

Diese Versuche sollten zeigen, ob die Blockade der Transkriptionsaktivität von NF-kappaB nicht nur in Neuronenkulturen nach Camptothecinschädigung, sondern auch in vivo nach ischämischer Schädigung vorliegt. Es wurden Proteinextrakte von NF-kappaB-Reportermäusen aus ipsilateralen und kontralateralen Kortexgewebe nach fokaler zerebraler Ischämie gewonnen und mittels Luminometer vermessen. Die Proteinextrakte wurden 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Okklusion der Arteria cerebri media entnommen. Es zeigte sich, dass auch hier eine Hemmung der NF-kappaB-Aktivität nach zerebraler Ischämie nachweisbar ist. Es kam zu einem starken Verlust der NF-kappaB-Aktivität 3 bis 6 Stunden nach Ischämie im ipsilateralen Kortex. Erst 24 Stunden nach MCAO konnte wieder eine Aktivität gemessen werden, die Ausgangswerte erreichte. Gleichzeitig zeigte die kontralaterale Hemisphäre, die während der Okklusion der Arteria cerebri media keine ischämische Schädigung erfuhr, einen deutlichen Anstieg der NF-kappaB-Aktivität innerhalb der 6 bis 24 Stunden nach zerebraler Ischämie.

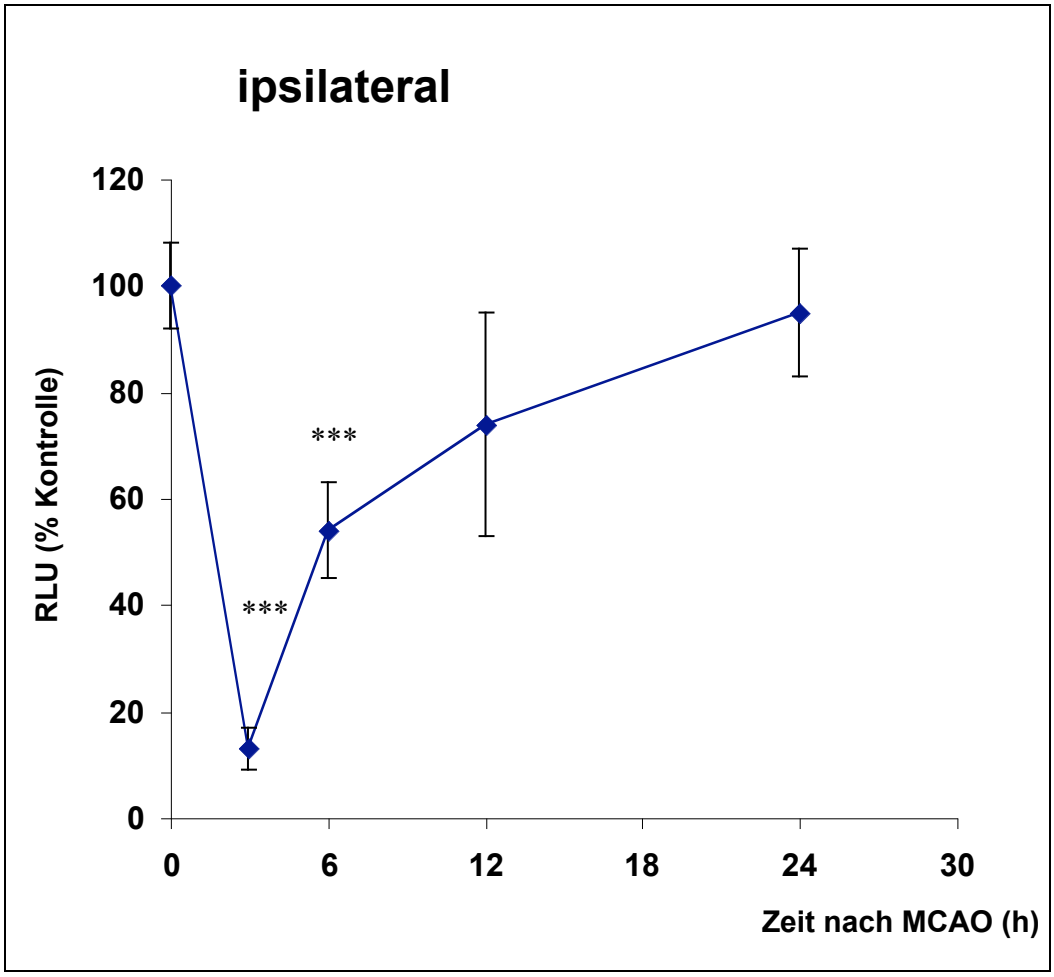

Abbildung 9: NF-kappaB-Aktivität im ipsilateralen Kortexgewebe nach permanenter fokaler zerebraler Ischämie. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach permanenter fokaler Ischämie wurden aus dem ipsilateralen Kortexgewebe von NF-kappaB-Reportermäusen Proteinextrakte gewonnen und mittels Luminometer vermessen. Die relativen Lichteinheiten (RLU) wurden auf den Proteingehalt normalisiert und sind in Prozent, bezogen auf die nichtischämischen Kontrollen, als Mittelwerte ± S.D. von 3 bis 4 Tieren je Gruppe dargestellt. ***p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Duncan`s Test).

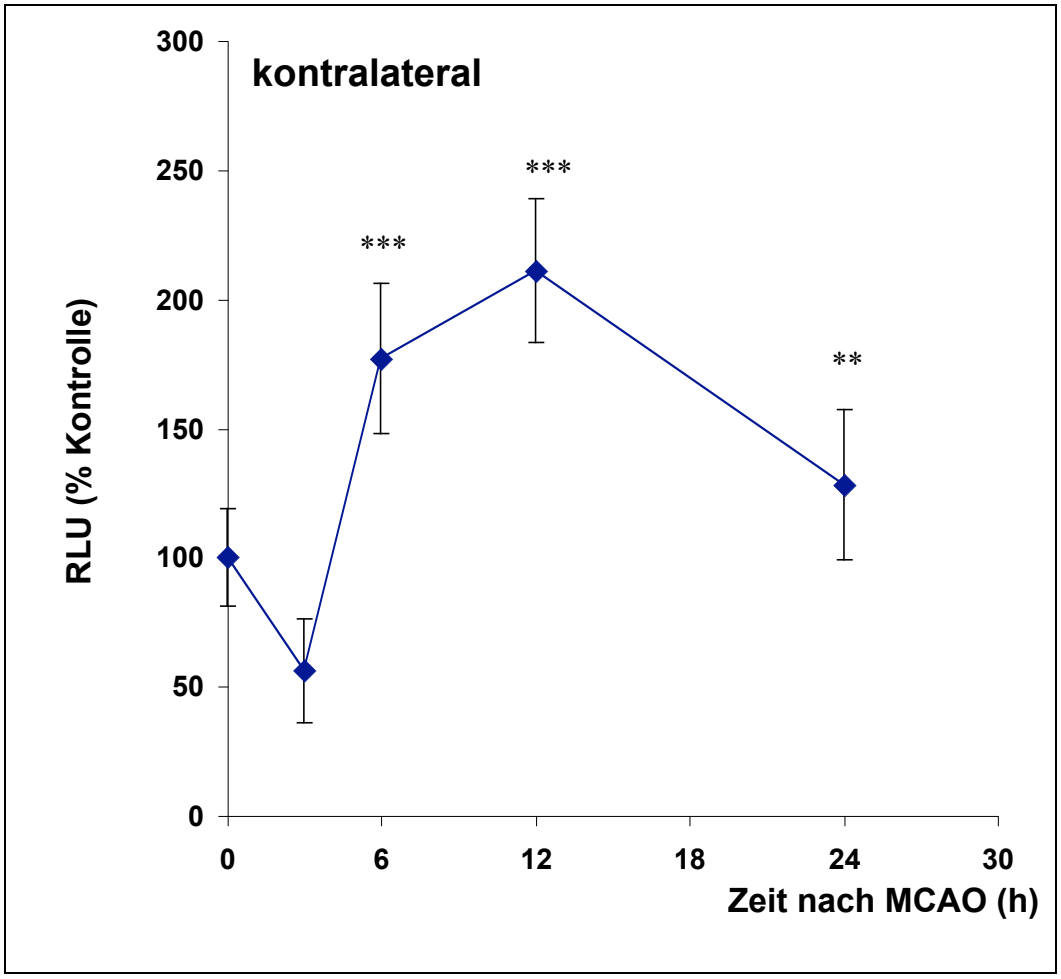

Abbildung 10: NF-kappaB-Aktivität im kontralateralen Kortexgewebe nach permanenter fokaler zerebraler Ischämie. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach permanenter fokaler Ischämie wurden aus dem kontralateralen Kortexgewebe von NF-kappaB-Reportermäusen Proteinextrakte gewonnen und mittels Luminometer vermessen. Die relativen Lichteinheiten (RLU) wurden auf den Proteingehalt normalisiert und sind in Prozent, bezogen auf die nichtischämischen Kontrollen, als Mittelwerte ± S.D. von 3 bis 4 Tieren je Gruppe dargestellt. **p<0,01, ***p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Duncan`s-Test).

3.2.2 Nachweis der Regulation von NF-kappaB-Aktivität in Proben von NF-kappaB-Reportermäusen nach zerebraler Ischämie

Um die gewonnenen Ergebnisse aus den Luminometermessungen zu bestätigen, wurden die Proteinextrakte mittels SDS-Page-Elektrophorese getrennt und durch Western Blot und Detektion mit einem Luciferase-Antikörper behandelt. Im dargestellten Versuch wurden die Proteinproben verwendet, deren Luciferaseaktivität in der Luminometermessung in Versuch 3.2.1 dargestellt sind. Es handelte sich bei den

verwendeten Proben im dargestellten Versuch ausschließlich um Proteinextrakte aus dem ipsilateralen Kortexgewebe, drei, sechs, zwölf und vierundzwanzig Stunden nach permanenter fokaler zerebraler Ischämie.

Auf den Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Expression des Luciferaseproteins nach drei Stunden im Vergleich zur Kontrolle deutlich abnahm. Auch nach sechs Stunden war dieses Phänomen zu erkennen. Nach zwölf Stunden ließ sich in den Banden eine Intensitätssteigerung verzeichnen, die jedoch immer noch nicht die Signalintensitäten der Kontrollbanden erreichten. Erst nach vierundzwanzig Stunden zeigten die Proben wieder eine Konzentration an Luciferase wie sie in den Kontrollproben nachweisbar waren. Die Untersuchungen im Western Blot unterstützen somit die Ergebnisse, die aus den zahlreichen Luminometermessungen in vivo und auch in vitro entstammen.

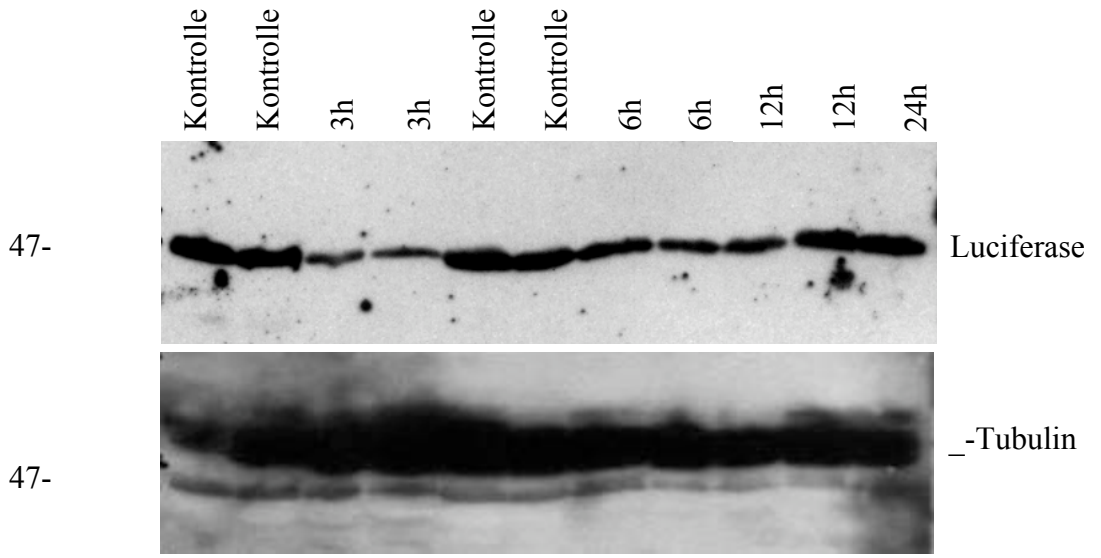

Abbildung 11: Regulation der NF-kappaB-Aktivität in Proben aus ipsilateralen Kortexgewebe von NF-kappaB-Reportermäusen nach permanenter fokaler Ischämie. Drei, sechs, zwölf und vierundzwanzig Stunden nach zerebraler fokaler Ischämie wurden Proteinextrakte aus dem ipsilateralen Kortexgewebe von NF-kappaB-Reportermäusen gewonnen und mittels Western Blot-Technik das Luciferaseprotein detektiert. In der oberen Abbildung sind durch Luciferase-Antikörper die Luciferase in den Proteinproben bei einer Proteingröße von 47 kDa detektiert**.** In der unteren Abbildung wurde die Membran mit _-Tubulin-Antikörpern zum Nachweis der äquivalent aufgetragenen Proteinmenge inkubiert.

3.2.3 Einfluss des p53-Inhibitors Pifithrin-_ auf die Transkriptionsaktivität von NF-kappaB in ischämischem Gehirngewebe

Nach den Untersuchungen des Einflusses von PFT auf die NF-kappaB-Aktivität in Neuronen nach DNA-Schädigung in vitro sollten die Effekte auch in vivo an ischämischem Gehirngewebe untersucht werden. Dazu wurden in NF-kappaB-Reportermäusen durch permanenten Verschluss der MCA eine fokale zerebrale Ischämie induziert. Den Mäusen wurde eine Stunde vor Ischämie PFT in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Drei und sechs Stunden später konnten die per Ischämie geschädigten Gehirne entnommen und weiteren Untersuchungen wie Infarktvolumenberechnung, Immunhistochemie und molekularbiologischen Methoden zugeführt werden. Für die Luminometermessung wurden aus dem ipsilateralen und kontralateralen Kortexgewebe Proteinextrakte gewonnen, die dann mit Hilfe des Luminometers vermessen wurden. PFT bewirkte sowohl im ipsilateralen als auch im kontralateralen Kortexgewebe eine deutliche Steigerung der NF-kappaB-Transkriptionsaktivität gegenüber den Vehikel-behandelten Kontrollen. Diese Beobachtung ließ sich nicht nur nach drei Stunden, sondern auch nach einem Zeitraum von sechs Stunden permanenter fokaler Ischämie verzeichnen. Gut erkennbar ist auch der Unterschied der NF-kappaB-Aktivität im kontralateralen und ipsilateralen Kortexgewebe. So zeigt sich im ipsilateralen Kortex eine deutlich geringere Aktivität als im kontralateralen Gewebe.

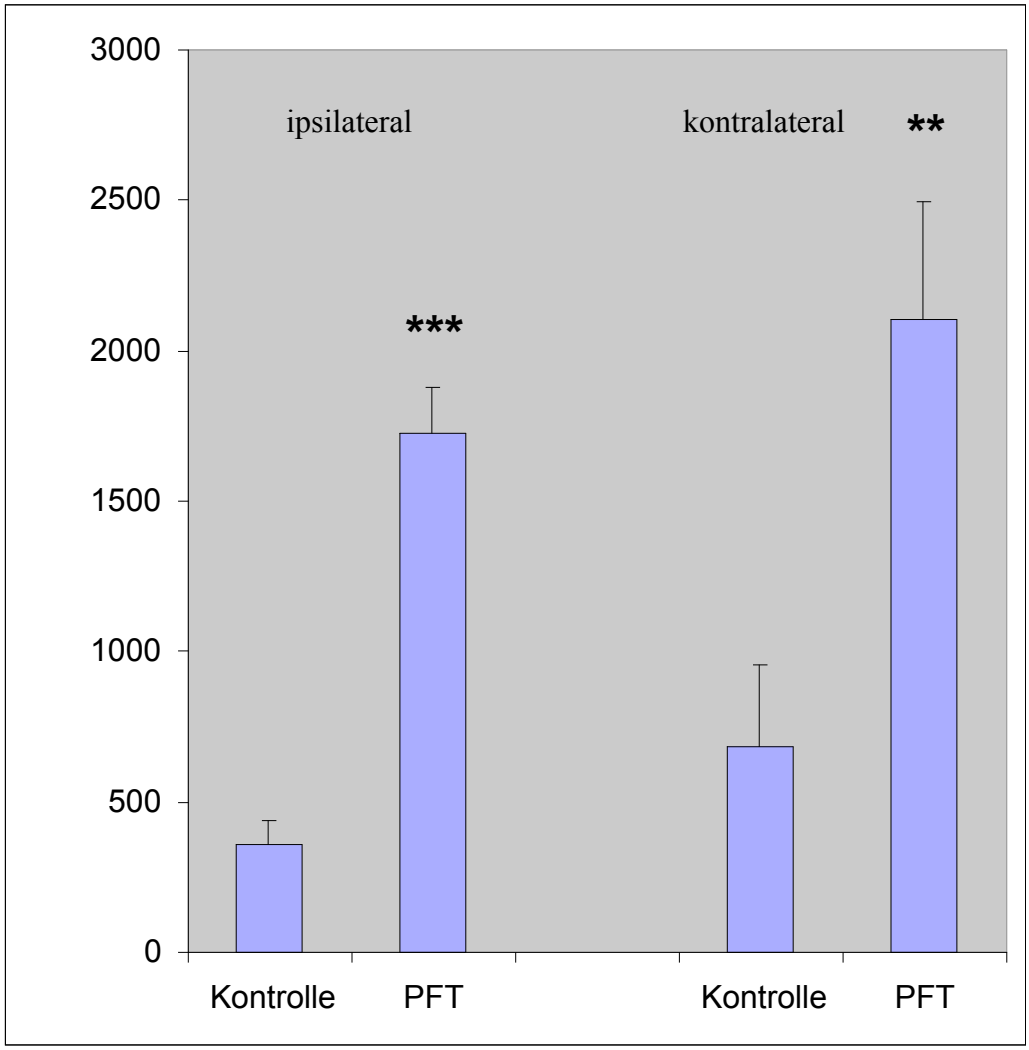

Abbildung 12: Effekte von PFT auf die NF-kappaB-Aktivität in ipsilateralen und kontralateralen Gehirngewebe, 3 Stunden nach permanenter fokaler Ischämie. NF-kappaB-Reportermäusen wurde eine Stunde vor zerebraler fokaler Ischämie PFT (2 mg/Kg) intraperitoneal appliziert. Die Kontrolltiere erhielten das vergleichbare Volumen einer Kochsalzlösung (0,9%). Drei Stunden nach Ischämie wurden aus den Gehirnen jeweils ipsilateral und kontralateral Proteinextrakte gewonnen, die mit Hilfe des Luminometers vermessen wurden. Die Luciferaseaktivität wurde in RLU (LU/_g Protein) als Mittelwert S. D. von 3 bis 4 Tieren je Gruppe dargestellt. **p<0,01 und ***p<0,001 im Vergleich zu den Kontrollen (Student´s t-Test).

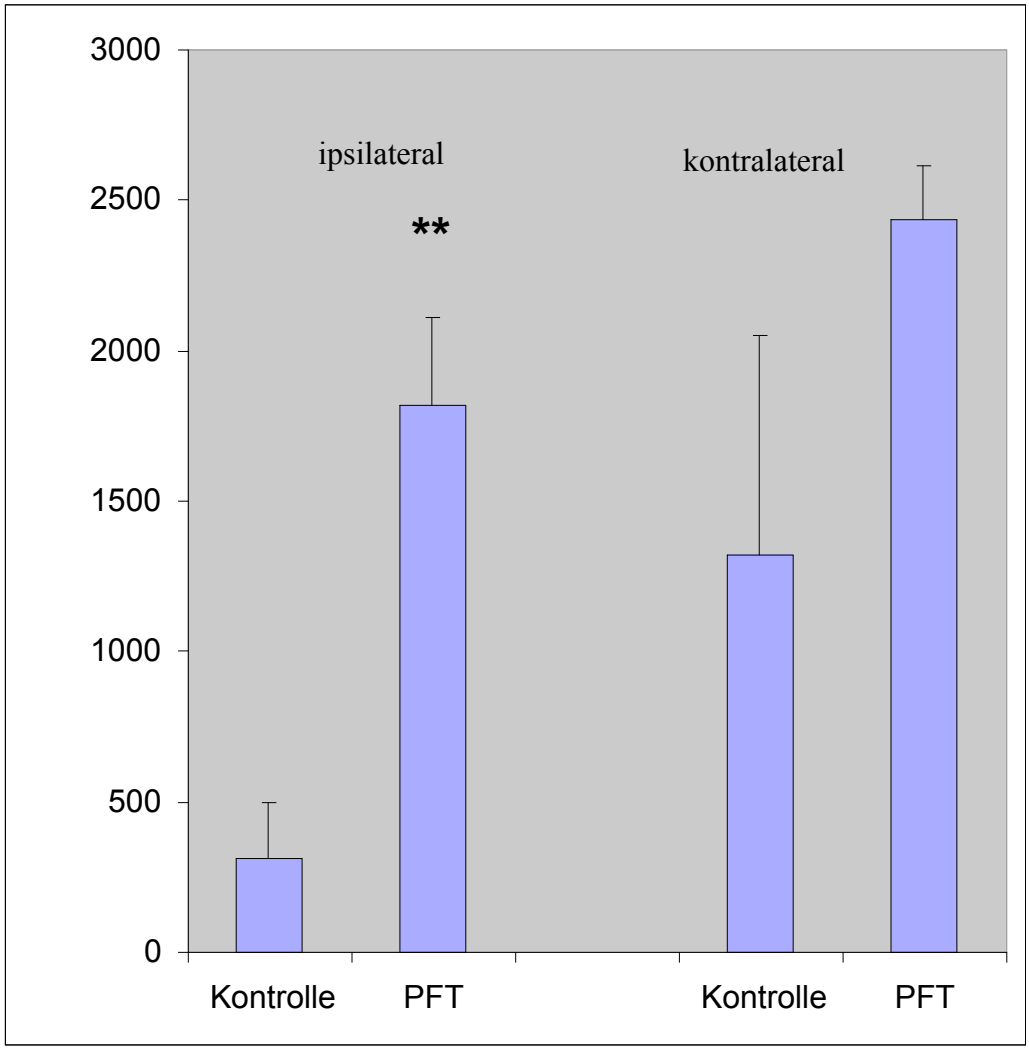

Abbildung 13: Effekte von PFT auf die NF-kappaB-Aktivität in ipsilateralen und kontralateralen Gehirngewebe, 6 Stunden nach permanenter fokaler Ischämie. NF-kappaB-Reportermäusen wurde eine Stunde vor zerebraler fokaler Ischämie PFT (2mg/KG) intraperitoneal appliziert. Die Kontrolltiere erhielten das vergleichbare Volumen einer Kochsalzlösung (0,9%). Sechs Stunden nach Ischämie wurden aus den Gehirnen ipsilateral und kontralateral Proteinextrakte gewonnen, die mit Hilfe des Luminometers vermessen wurden. Die Luciferaseaktivität wurde in RLU (LU/_g Protein) als Mittelwert S. D. von 3 bis 4 Tieren je Gruppe dargestellt. **p<0,01 und ***p<0,001 im Vergleich zu den Kontrollen (Student´s t-Test).

3.2.4 Einfluss von PDTC und kappaB-decoy-Oligonukleotiden auf die neuroprotektive Wirkung von PFT

Um den Zusammenhang der neuroprotektiven Effekte von PFT mit dem Transkriptionsfaktor NF-kappaB nachzuweisen, wurden embryonale hippokampale

Neurone mit dem NF-kappaB-Inhibitor PDTC in einer Konzentration von 100 µM behandelt. Eine Stunde später wurden die Kulturen mit PFT einer Konzentration von 100 nM und Camptothecin einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Kulturen mit Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Danach konnten die apoptotischen Nuklei quantitativ ermittelt werden. Es zeigte sich bei alleiniger Behandlung von PFT und PDTC kein nennenswerter Unterschied zu den Kontrollkulturen. Camptothecin bewirkte, wie erwartet, eine deutliche Schädigung der Neurone, die sich hier in einer deutlichen Zunahme des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellkernen zeigte. Diese Schädigung ist durch PFT signifikant zu verringern. In den mit PDTC- und kappaB-decoy-Oligonukleotid-behandelten Kulturen kann dieser neuroprotektive Effekt wieder aufgehoben werden.

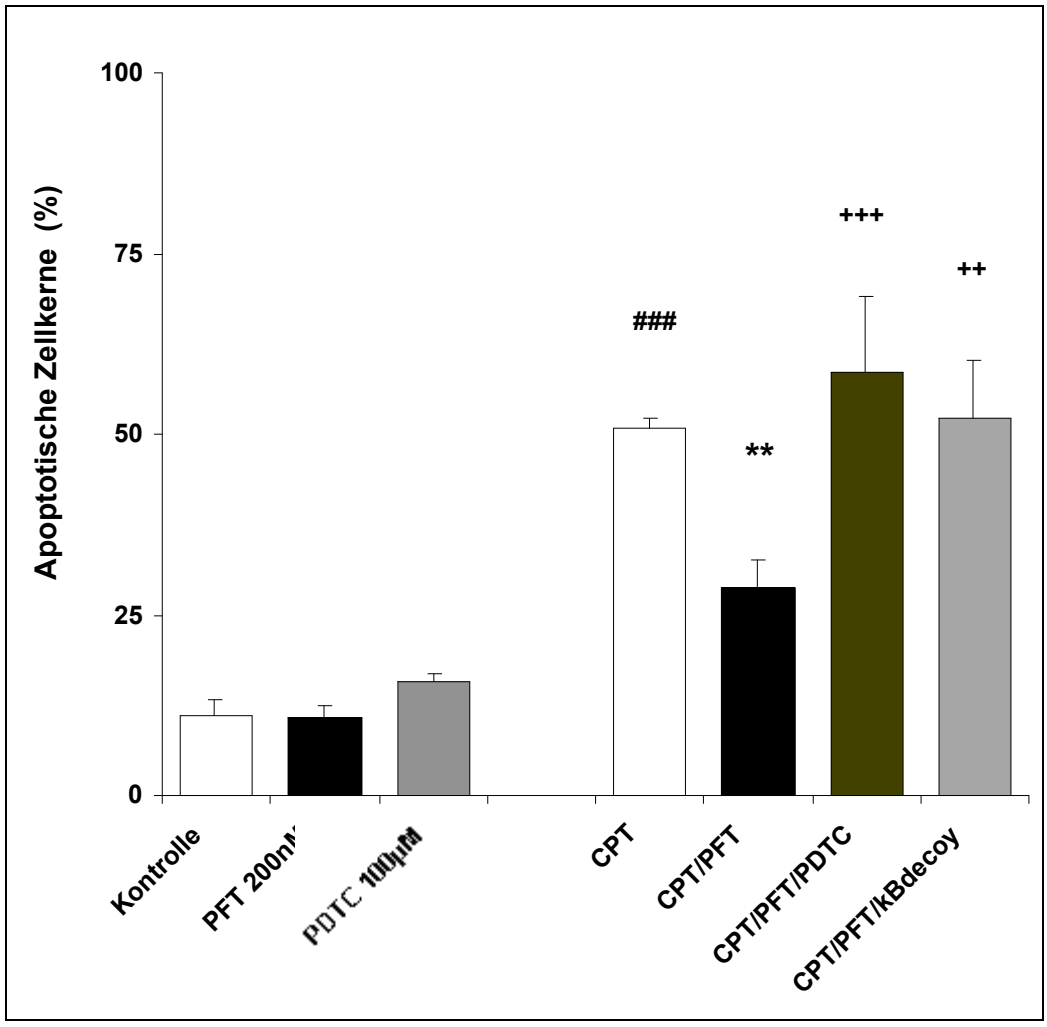

Abbildung 14: Blockade der neuroprotektiven Wirkung von PFT durch die NF-kappaB-Inhibitoren PDTC und kappaB-Oligonukleotid in Camptothecin-geschädigten Neuronen. Embryonale, hippokampale Neurone wurden mit PDTC (100 µM) und kappaB-

Oligonukleotiden (5 µM) und eine Stunde später mit Camptothecin (10µM) und PFT (100 nM) behandelt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Kulturen mit Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und die apoptotischen Nuklei ausgezählt. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellkerne ist als Mittelwert ± S.D. von 5 Kulturen je Gruppe dargestellt. $^{###}p<0,001$ im Vergleich zur Kontrolle, $^{**}p<0,01$ im Vergleich zur Camptothecinschädigung und $^{++}p<0,01$ und $^{+++}p<0,001$ im Vergleich zur Behandlung mit Camptothecin und PFT (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.2.5 Effekte von PFT und Camptothecin auf die Interaktion zwischen p53, NF-kappaB und p300.

Um herauszufinden, wie sich die Interaktionen zwischen p53, NF-kB und p300 im Einzelnen verhalten, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei wurden Proteinextrakte von Neuronen, die mit PFT, Camptothecin oder ausschließlich Vehikel über sechs Stunden behandelt worden waren, mit p300-Antikörper inkubiert, um dieses Protein zu fällen. Nach SDS-Page und Western Blot konnten die Interaktionen mit p53-Antikörper und p65-Antikörper detektiert werden. Wie zu sehen ist, kommt es durch die Behandlung mit Camptothecin zu einer Verstärkung der Interaktion von p300 und p53 im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu nimmt die Interaktion zwischen p300 und NF-kappaB-p65 ab. Durch Behandlung mit PFT allein entsteht eine deutliche Zunahme der Bindung von p65 an p300. Betrachtet man Proteinextrakte, die vor Schädigung mit Camptothecin mit PFT behandelt worden sind, erkennt man, dass die erhöhte Bindung von p53 an p300 nach Camptothecinschädigung aufgehoben wird und sich gleichzeitig die Interaktion zwischen p300 und p65 verstärkt (obere Signalreihe). Zusätzlich zeigt sich, dass PFT unter Kontrollbedingungen in der Lage ist, die Bindungsaktivität zwischen p300 und NF-kappaB zu verstärken (untere Signalreihe).

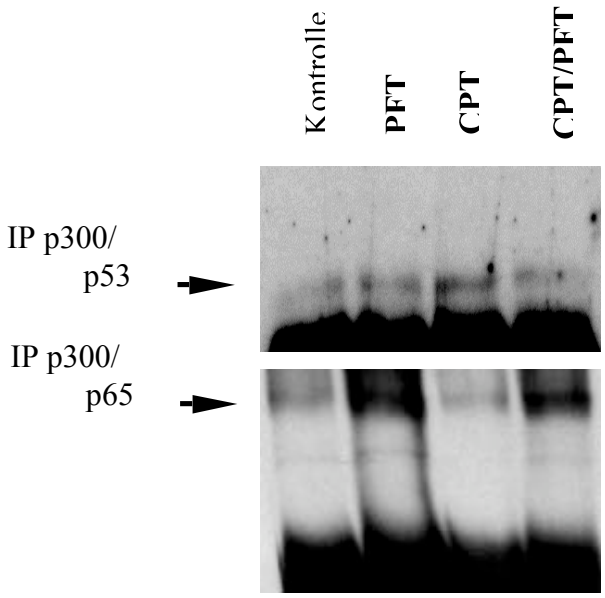

Abbildung 15: Einfluss von Camptothecin und PFT auf die Interaktionen von p53 und NF-kappaB mit p300. Neurone wurden sechs Stunden mit Camptothecin, PFT oder Vehikel behandelt und die erhaltenen Proben auf ihr Bindungsverhalten von p53 und NF-kappaB mit p300 untersucht.

3.3 Effekte von zyklischem Pifithrin (cPFT)

3.3.1 Effekte von cPFT auf das Überleben von embryonalen hippokampalen Neuronen nach Camptothecinschädigung

Zunächst sollte überprüft werden, ob sich cPFT positiv auf das Überleben von Neuronen auswirkt, die mit Camptothecin geschädigt wurden. Dazu wurden embryonale, hippokampale Neurone eine Stunde vor Inkubation mit Camptothecin mit cPFT (10 nM bis 1µM) vorbehandelt. Die Endkonzentration von Camptothecin betrug 5 µM. 24 Stunden später wurden die Neurone mit Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Danach konnten die apoptotischen Zellkerne quantitativ ermittelt werden. Es war anhand des Experiments zu erkennen, dass cPFT einen neuroprotektiven Effekt gegenüber Camptothecin-induziertem Zelltod zeigte. Es wurde deutlich, dass cPFT allein keinen Einfluss auf die Anzahl apoptotischer Neurone gegenüber den

Kontrollkulturen erkennen lässt. Die Schädigung der Neurone durch Camptothecin konnte durch cPFT deutlich eingeschränkt werden. Dieser Effekt ist bei Konzentrationen von 10 nM bis 1 µM zu erkennen, während die neuroprotektiven Effekte von PFT bei Konzentrationen von 100-200 nM nachgewiesen wurden.

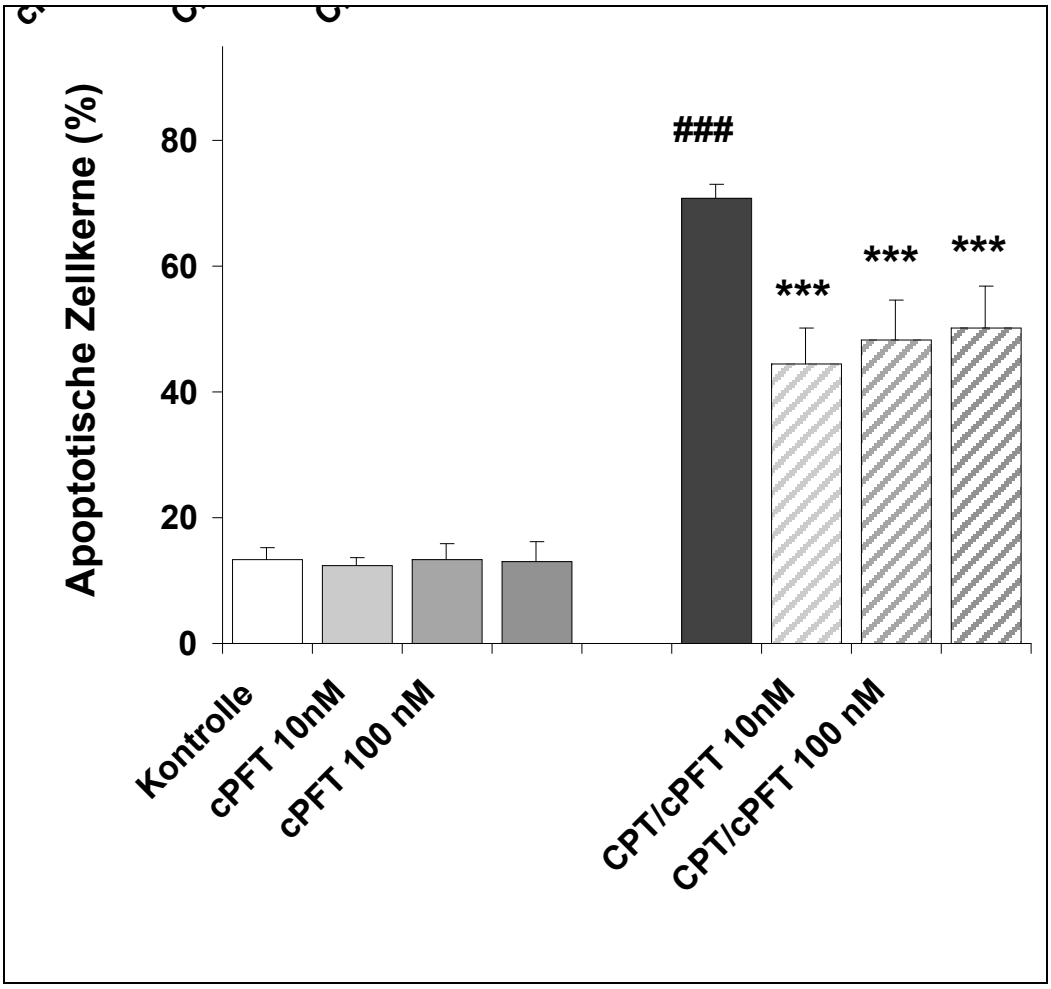

Abbildung 16: Effekte von cPFT auf das Überleben von embryonalen hippokampalen Neuronen nach Camptothecinschädigung. Embryonale hippokampale Neurone wurden eine Stunde vor Inkubation mit Camptothecin (5 µM) mit cPFT (10 nM-1 µM) behandelt und 24 Stunden später mit Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellkerne ist als Mittelwert ± S.D. von 5 Kulturen je Gruppe dargestellt. ###p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle, ***p<0,001 im Vergleich zur Camptothecinschädigung (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.2 Konzentrationsabhängige Effekte von cPFT auf das Überleben von embryonalen hippokampalen Neuronen nach Camptothecinschädigung

Als Ergänzung sollte die minimale protektive Konzentration von cPFT bestimmt werden. Auch hier wurden die Neurone mit Camptothecin (5 µM) geschädigt. Eine Stunde vor Schädigung wurden die Kulturen mit verschiedenen Konzentrationen von cPFT vorbehandelt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Neurone mit Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Danach konnten die apoptotischen Zellkerne quantitativ ermittelt werden. Es zeigte sich wiederum, dass cPFT allein keinen Effekt zeigt. Nach Schädigung ist zu erkennen, dass Konzentrationen von 10 nM und 100 nM einen deutlich protektiven Effekt bewirken. Bei einer Konzentration von 1 nM zeigt sich jedoch kein protektiver Effekt.

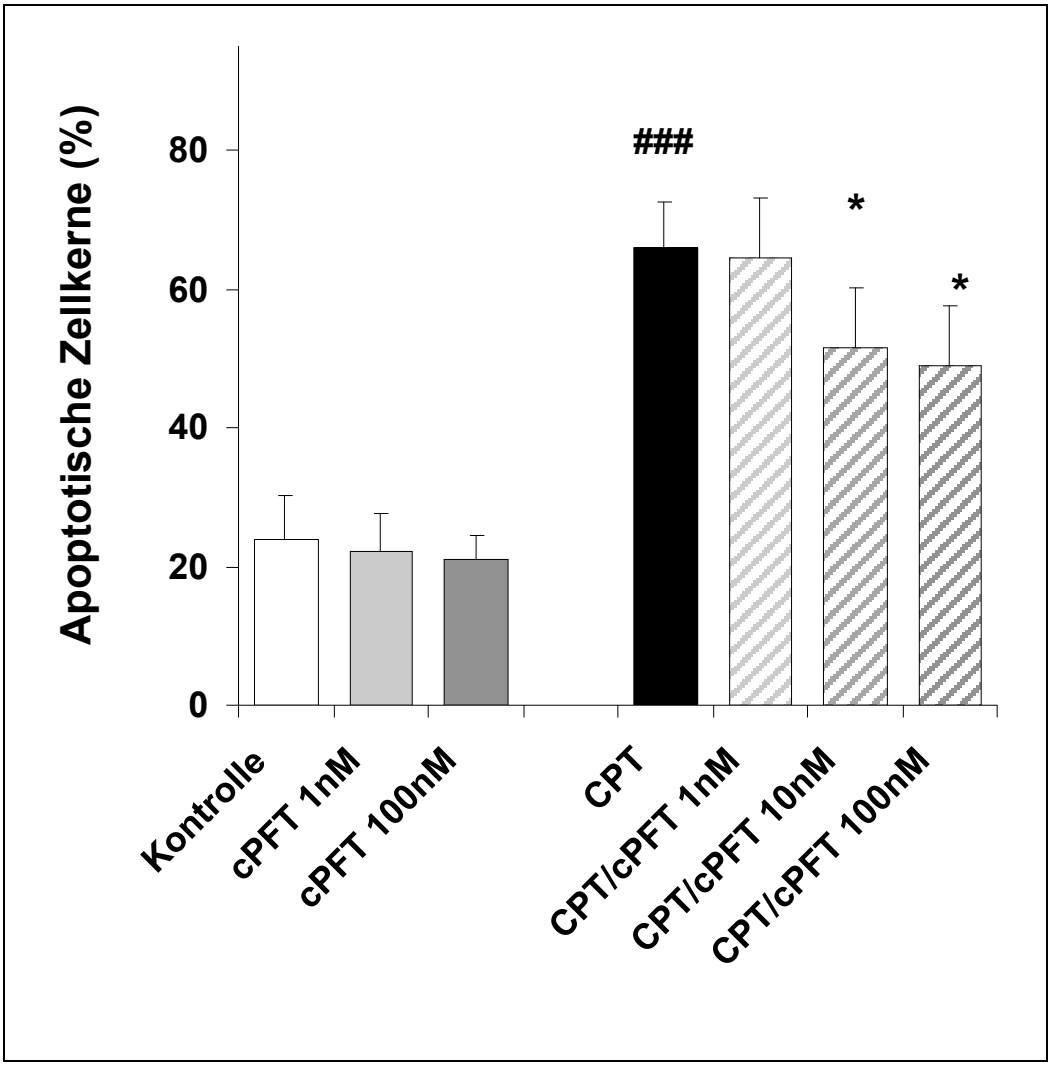

Abbildung 17: Effekte von zyklischen PFT auf das Überleben von embryonalen hippokampalen Neuronen nach Camptothecinschädigung. Embryonale hippokampale Neurone wurden mit cPFT (1-100 nM) eine Stunde vor Camptothecinexposition (10 µM)

vorbehandelt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Kulturen mit Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte ± S.D. von 5 Schwesterkulturen je Gruppe. $^{###}p<0,001$ im Vergleich zur Kontrolle, $^{*}p<0,05$ im Vergleich zur Camptothecinschädigung (Varianzanalyse, Scheffé -Test).

3.3.3 Effekte von cPFT auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in embryonalen hippokampalen Neuronenkulturen nach Camptothecinschädigung

Entsprechend den Untersuchungen mit PFT sollte auch der Einfluss von cPFT auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität eruiert werden. Dazu wurden embryonale hippokampale Neurone von NF-kappaB-Reportermäusen mit Camptothecin behandelt. Die Behandlungsdauer betrug sechs Stunden. Es wurden Camptothecinkonzentrationen von 5 µM verwendet. Eine Stunde vor Beginn der Schädigung wurden die Neurone mit 10 nM und 100 nM cPFT vorbehandelt. Die Neurone wurden entweder mit Camptothecin allein geschädigt, mit Camptothecin und cPFT (10-100 nM) oder ausschließlich mit cPFT (10-100 nM) behandelt. Die gewonnenen Proteinextrakte aus diesen Versuchen wurden dann mittels des Luminometers vermessen.

Es ist aus den Versuchen offensichtlich, dass auch mit cPFT dem Verlust an NF-kappaB-Aktivität nach Camptothecinschädigung entgegengewirkt werden kann, wobei höhere Konzentrationen (100 nM) auch höhere Effekte erzielen. Bemerkenswert ist auch hier, dass eine alleinige Gabe von cPFT wie auch bei PFT einen deutlichen Anstieg der NF-kappaB-Aktivität über Kontrollniveau zur Folge hat.

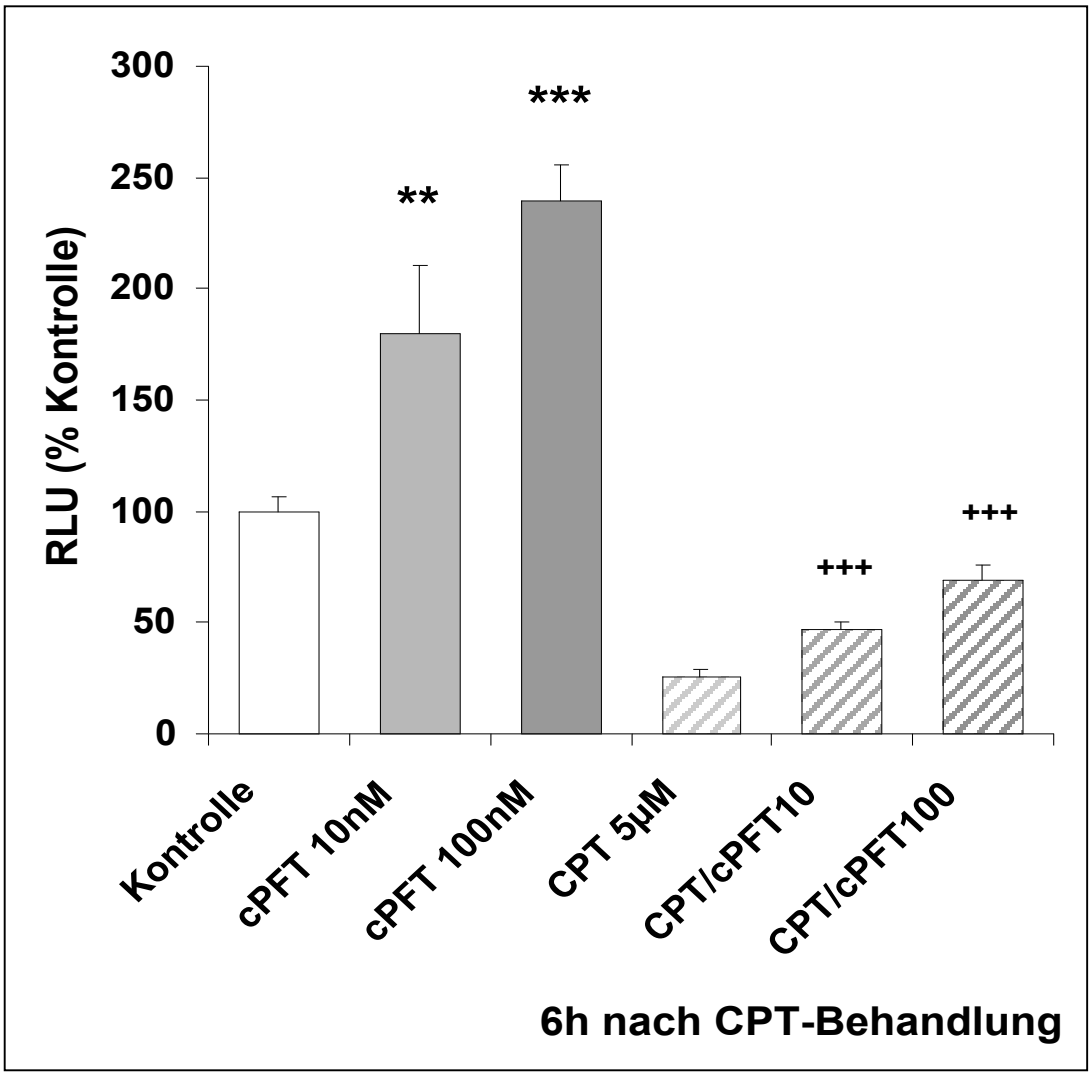

Abbildung 18: Effekte von cPFT auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in embryonalen hippokampalen Neuronen. Die Luciferaseaktivität wurde als relative Lichteinheiten (RLU) bestimmt und als Mittelwert ± S.D. aus drei Kulturen je Gruppe dargestellt. **p < 0.01, ***p < 0,001 und $^{###}$p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle und $^{+++}$p<0,001 im Vergleich zur Camptothecinschädigung (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von NF-kappaB-Transkriptionsaktivität im p53-abhängigen neuronalen Zelltod demonstriert und erstmals ein Mechanismus für die Wechselwirkung der Transkriptionsfaktoren p53 und NF-kappaB in Neuronen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass der p53-abhängige Zelltod mit einer deutlichen Hemmung der neuroprotektiven NF-kappaB-Aktivität einhergeht. Zudem wurde nachgewiesen, dass die p53-Inhibitoren PFT und cPFT diesen Abfall der NF-kappaB-Aktivität und auch den neuronalen Zelltod signifikant vermindern können. Diese neuroprotektive Wirkung der p53-Inhibitoren wird nach den vorliegenden Ergebnissen zumindest teilweise durch eine Erhöhung der NF-kappaB-Aktivität vermittelt. Schließlich konnte der Transkriptionskofaktor p300/CBP als mögliches Bindeglied der inhibitorischen Interaktion zwischen p53 und NF-kappaB in Neuronen identifiziert werden.

4.1 Regulation von NF-kappaB in der p53-abhängigen Apoptose

Dem DNA-bindenden Phosphoprotein p53 werden verschiedene bedeutende Funktionen zugeschrieben, die entscheidend an lebenswichtigen Regulationsmechanismen der Zelle beteiligt sind. Der Tumorsuppressor p53 spielt beispielsweise eine Schlüsselrolle bei der Erkennung und Reparatur von DNA-Schädigungen, bei der Regulation des Zellzyklus und der Induktion von Apoptose. Eine hohe Expression von Wildtyp-p53 geht entweder mit Zellzyklusarretierung in der G1-Phase einher oder induziert Apoptose (Mattson et al., 2000; Levine, 1997). Ohne funktionelles p53 fehlt insbesondere die Fähigkeit zur Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden, und solche Zellen sind typischerweise genetisch variabler und neigen zu ausgeprägter Tumorbildung, obwohl sie sich zunächst normal entwickeln (Donehower et al., 1992; Hollstein et al., 1991). Eine Überexpression von p53 in Mäusen bewirkt dagegen eine frühzeitige Alterung der Tiere (Tyner et al., 2002).

P53 ist ein konstitutiv exprimierter Transkriptionsfaktor mit einer kurzen Halbwertszeit von 10-15 Minuten, der durch eine Vielzahl verschiedener Stressfaktoren stabilisiert und damit aktiviert werden kann, z. B. durch DNA-Schädigung, Mitosespindelfehler oder durch aktivierte Onkogene (Agarwal et al., 1998; Prives und Hall, 1999). Es hat

sich gezeigt, dass p53 auch beim neuronalen Zelltod bei Morbus Alzheimer (de la Monte et al., 1997), Morbus Parkinson (Blum et al., 1997), Schlaganfall (Crumrine et al., 1994; Li et al., 1994) und traumatischer Hirnschädigung (Napieralski et al., 1999) reguliert wird. Weitere Studien an p53-knock-out-Mäusen weisen auf eine zentrale Rolle von p53 in der neuronalen Apoptose hin, die durch ischämische und exzitatorische Insulte induziert wurde (Crumrine et al., 1994; Morrison et al., 1996). Ferner korrelierte die Expression von p53 mit der Induktion des neuronalen Zelltodes durch DNA-schädigende Reagentien oder Glutamat (Li et al., 1994; Napieralski et al, 1999). In vielen Systemen, auch in Neuronen, kann aktiviertes p53 die Transkription und nachfolgende mitochondriale Translokation des proapoptotischen Proteins Bax stimulieren und über dieses Transkriptionsprodukt die Schädigung der Mitochondrien und konsekutive Apoptosemechanismen einleiten (Rich et al., 2000; Xiang et al., 1998). Durch p53 werden auch andere proapoptotische Faktoren wie NOXA, PUMA und AIP-1 induziert, die ebenfalls in die Mitochondrienmembran translozieren und dort die Freisetzung von Cytochrom C mit nachfolgender Aktivierung des Apaf-1/Procaspase-9 Apoptosoms bewirken (Oda et al., 2000; Nakano und Vousden, 2001). Zusätzlich zu den p53-regulierten Proteinen, die über eine Schädigung der Mitochondrien die Apoptose einleiten, können durch p53 auch Todesrezeptoren oder decoy-Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie wie Fas, Killer/DR 5 und PIDD reguliert werden, die Apoptosewege z. B. über die Aktivierung der Caspase-8 initiieren (Lin et al., 2000; Sheikh und Fornace, 2000; Vousden, 2000).

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF-kappaB im embryonalen und adulten ZNS wird sehr kontrovers diskutiert. In Organen des Immunsystems ist eine konstitutive NF-kappaB-Aktivität nachgewiesen. Auch im ZNS ist dieser Transkriptionsfaktor stark vertreten. Hier ist er besonders während der Entwicklung in den Regionen des Neokortex, der Bulbi olfaktorii, der Amygdala und des Hippocampus reguliert (Bhakar et al., 2002). In nicht-neuronalen Zellen lassen sich bisher drei Hauptfunktionen der NF-kappaB-Familie beschreiben: Erstens spielt NF-kappaB eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Genen, die proinflammatorische Prozesse in Gang setzen und eine Schlüsselposition im Abwehrsystem einnehmen (Hatada et al., 2000). Zweitens induziert NF-kappaB die Transkription von anti-apoptotischen Genen und vermittelt so das Überleben von Zellen (Van Antwerp et al., 1998; Wang et al., 1998; Barkett und Gilmore, 1999). RelA-knock-out-Mäuse sterben vor ihrer Geburt an den Folgen von

extensiven Apoptosevorgängen der Leber (Beg et al., 1995). Fibroblasten, die aus diesen Mäusen gewonnen wurden, zeigen erhöhten Zelltod nach Stimulation durch TNF-_, der durch Expression von RelA verhindert werden kann (Beg et al., 1996). Als dritter Punkt ist die Schlüsselrolle von NF-kappaB in der Entwicklung von Haut und Skelett zu nennen (Q. Li et al., 1999). Das Bild von NF-kappaB im Nervensystem ist dagegen bisher unklarer gezeichnet. Es gibt zahlreiche Studien, die diesem Transkriptionsfaktor eine tragende Rolle im Überlebensprozess von Neuronen zuschreiben (Barger et al., 1995; Guo et al., 1998; Lezoualc´h et al., 1998; Maggirwar et al., 1998; Hamanoue et al., 1999; Kaltschmidt et al., 1999). Der neuroprotektive Effekt von NF-kappaB ist wahrscheinlich auf eine gesteigerte Synthese von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2, MnSOD, Calbindin und den sogenannten Inhibitors of Apoptosis (IAPs) zurückzuführen (Mattson et al. 2000b). Unter physiologischen Bedingungen wird NF-kappaB in Neuronen wahrscheinlich über den antiapoptotisch wirksamen Akt-Signaltransduktionsweg aktiviert (Li und Stark, 2002). Der Akt-Signaltransduktionsweg wird unter anderem durch Wachstumsfaktoren reguliert, die somit über die NF-kappaB-Aktivierung das Überleben von Neuronen sichern. Auch unter pathophysiologischen Bedingungen kann NF-kappaB Neurone vor dem Zelltod schützen. In einem Epilepsiemodell wurde beispielsweise gezeigt, dass die Expression und Regulation von NF-kappaB Voraussetzung für das Überleben einer großen Zahl von Neuronen in den betroffenen CA1-und CA3-Gebieten des Hippokampus ist (Yu et al., 2000; Mattson et al., 2000b). In Mäusen, die nicht über die p50/p105 NF-kappaB-Untereinheit verfügen, war die Schädigung der hippokampalen Neurone nach Kainat-induzierter Epilepsie stärker ausgeprägt als in Wildtyp-Mäusen, was für eine neuroprotektive Funktion von NF-kappaB spricht (Yu et al., 1999). Zudem schützt NF-kappaB-Aktivierung Neurone gegen Amyloid-_-Peptid induzierte Toxizität (Barger et al., 1995), gegen Exzitotoxizität und oxidativen Stress (Goodman und Mattson, 1996; Mattson et al., 1997). Insgesamt existieren zahlreiche Hinweise darauf, dass eine Reihe physiologischer Stimuli NF-kappaB-Aktivität induzieren und so Neuroprotektion fördern können (Bhakar et al., 2002). Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen überein, die in kultivierten Neuronen eine erhöhte NF-kappaB-Aktivierung durch präkonditionierende Stimuli zeigen, die auch in vivo Neuroprotektion vermitteln können (Blondeau et al., 2001; Ravati et al., 2001).

Auf der anderen Seite liegen allerdings auch zahlreiche Berichte darüber vor, dass NF-kappaB-Aktivierung neuronalen Zelltod vermittelt (Grilli et al., 1996; Post et al., 1998; Schneider et al., 1999). Zum Beispiel wurde in den oben erwähnten p50/p105 NF-kappaB knock-out-Mäusen eine reduzierte neuronale Schädigung nach fokaler zerebraler Ischämie nachgewiesen. Dieses deutet eher auf eine tragende Rolle von NF-kappaB im Todesprozess der Neurone im geschädigten Gehirngewebe hin (Schneider et al., 1999). NF-kappaB scheint auch bei Glutamat-induzierter Toxizität eher proapoptotische Effekte zu vermitteln (Grilli und Memo, 1999). Daneben spielt NF-kappaB auch eine tragende Rolle bei der Regulation von inflammatorischen Prozessen, die durch TNF-_ induziert werden (Gerondakis et al., 1998). Aktivierung von NF-kappaB hat eine gesteigerte Transkription von verschiedenen Genen zur Folge, die für Chemokine (Il-8), Adhäsionsmoleküle (Endotheliales Leukozytenadhäsionsmolekül, Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül, Interzelluläres Adhäsionsmolekül) und Cytokine (Il-1, Il-2, TNF-_, Il-12) codieren. Diese Immunmediatoren sind entscheidend daran beteiligt, dass Entzündungszellen z.B. bei Befall von Mikroorganismen den Weg zum Ort der NF-kappaB-Aktivierung finden (Caamano et Hunter, 2002). Normale Aktivierung von NF-kappaB scheint für das Überleben von Zellen und Immunsystem notwendig. Eine abweichende Regulation führt jedoch zur Entwicklung von pathologischen Prozessen, insbesondere akuten Entzündungsprozessen (Aggarwal et al., 2004). Auch Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Diabetes Mellitus Typ 1 und Morbus Crohn entstehen wahrscheinlich NF-kappaB-abhängig (Bacher und Schmitz, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Primärkulturen embryonaler Neurone und im Gehirngewebe die Rolle von NF-kappaB im p53-abhängigen Zelltod untersucht, der in vitro durch genotoxischen Stress (Camptothecin) und in vivo durch zerebrale Ischämie induziert wurde. P53 ist ein wichtiger Transkriptonsfaktor, der unter anderem durch DNA-Schädigung induziert werden kann und maßgeblich an Zellzyklusunterbrechung und Apoptose beteiligt ist (Ko und Prives, 1996). Ein möglicher Mechanismus, durch den NF-kappaB in der Zelle seine mögliche antiapoptotische Wirkung gegenüber genotoxischem Stress entfaltet, könnte zum Beispiel die Inhibition von p53-abhängiger Transkriptionsaktivität durch RelA sein, die durch kompetitive Bindung an den Transkriptionskofaktor p300/CBP vermittelt wird (Wadgaonkar et al., 1999). Andere Arbeiten zeigen, dass diese kompetitive Bindung auch die Inhibition von NF-kappaB-

Transkriptionsaktivität durch p53 zur Folge hat (Webster und Perkins 1999; Ravi et al., 1998; Kawai et al., 1999).

Um zu definieren, wie sich die NF-kappaB-Aktivität in der p53-abhängigen Apoptose in Neuronen verhält, wurden hippokampale und kortikale embryonale Neurone von NF-kappaB-Reportermäusen mit dem Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin über verschiedene Zeiträume behandelt (Ergebnisse 3.1.1). Der Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin induziert in Neuronen DNA-Schädigung und damit p53-vermittelten Zelltod (Culmsee et al., 2001a,c; 2003). Auch der Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid führt über diesen Weg zur Apoptose (Capranico et al., 1999; Takimoto et. al.; 1999, Culmsee et al., 2001a, c). Es zeigte sich, dass in den Neuronen die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in einem Zeitfenster von 3 bis 6 Stunden nach Inkubation mit Camptothecin deutlich abnimmt, um dann bis 24 Stunden nach Behandlungsbeginn wieder zuzunehmen. Es kommt zu einer Abnahme der Transkriptionsaktivität von mindestens 70 %. Eine Abnahme der NF-kappaB-Aktivität zeigte sich auch in anderen Versuchen, bei denen der neuronale Zelltod mit Homocystein oder durch Sauerstoff-Glukose-Entzug induziert wurde (Culmsee et al., 2003). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der p53-abhängige neuronale Zelltod mit einer signifikanten Hemmung der NF-kappaB-Transkriptionsaktivität einhergeht.

Ein ähnliches Bild ergaben die Messungen der NF-kappaB-Transkriptionsaktivität im Gehirngewebe nach zerebraler Ischämie (Ergebnisse 3.2.1). Es kam in einem Zeitintervall von 3 bis 6 Stunden nach MCAO im ipsilateralen Kortexgewebe zu einer nahezu vollständigen Blockade der NF-kappaB-Transkriptionsaktivität, die erst nach 24 Stunden auf Ausgangswerte zurückging. Diese Ergebnisse wurden in entsprechenden Untersuchungen des Gewebeextraktes im Western Blot bestätigt (Ergebnisse 3.2.2). Die mögliche Beeinflussung der gemessenen Luciferaseaktivität, z.B. durch die konsekutive Enstehung von Radikalen nach Gehirngewebsschädigung, ist somit auszuschließen, da im Western Blot eindeutig eine Abnahme der Menge des Luciferaseproteins nachgewiesen wurde. Somit ist die gemessene Reduktion der Luciferase-Aktivität nach ischämischer Schädigung tatsächlich auf die verminderte Luciferasesynthese und damit auf die verminderte NF-kappaB-Aktivität zurückzuführen.

In dieser Versuchsreihe (Ergebnisse 3.2.1) wurde auch Gewebe aus der kontralateralen Hemisphäre der Mäuse entnommen, in denen über die Zeit nach Induktion der Ischämie eine erhöhte NF-kappaB-Transkriptionsaktivität gemessen wurde. Nachträglich wurden Proben der ipsilateralen Hemisphäre zusätzlichen immunhistochemischen

Untersuchungen zugeführt, die darauf hindeuten, dass in der zentralen Infarktzone der Transkriptionsblock 24 Stunden nach MCAO bestehen bleibt, die Penumbra jedoch einen Anstieg der NF-kappaB-Transkriptionsaktivität zeigt.

Die kontralaterale Hemisphäre wird während der permanenten fokalen Ischämie nicht geschädigt, so dass diese Hemisphäre nach einseitiger MCAO lediglich sublethalem Stress ausgesetzt ist. Wahrscheinlich ist eine erhöhte NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in der kontralateralen Hemisphäre eine endogene Stressreaktion, die Neurone in diesem nicht unmittelbar betroffenen Bereich vor konsekutiven Schäden des Insults schützt. Es wurde bereits experimentell nachgewiesen, dass die kontralaterale Hemisphäre nach einem einseitigen Insult bis zu mehreren Tagen vor einer Schädigung durch weitere Stresseinwirkungen geschützt ist (Belayev et al., 1996; Barone et al., 1998). Eine solche ischämische Präkonditionierung erfordert verstärkte Bildung protektiver Faktoren, die nach den hier gezeigten Befunden durch eine erhöhte NF-kappaB-Transkriptionsaktivität vermittelt werden könnte. Ähnliche protektive Mechanismen vermittelt NF-kappaB wahrscheinlich auch in der Infarktrandzone, der Penumbra in der ipsilateralen Hemisphäre. Dies würde auch den starken Wiederanstieg der NF-kappaB Aktivität 24 Stunden nach dem Insult erklären. Da NF-kappaB in inflammatorischen Prozessen reguliert wird, könnte auch eine Entzündungsreaktion in den betroffenen Arealen eine denkbare Erklärung für den Anstieg der Transkriptionsaktivität sein. Da die vermessenen Extrakte sowohl Gewebe aus dem Infarktkern als auch aus der intakten Randzone enthalten, spiegeln die Werte 3 und 6 Stunden nach MCAO den initialen Transkriptionsblock im Infarktkern wider, während zu späteren Zeitpunkten die Transkriptionsaktivität in den überlebenden Zellen der Randzone entscheidend zum Messergebnis beiträgt. Es ist davon auszugehen, dass der gemessene Wiederanstieg der NF-kappa-B-Aktivität tatsächlich eine deutliche Steigerung der NF-kappaB Aktivität in überlebenden Neuronen der Penumbra darstellt. Da sich nach 24 Stunden der Infarkt in dem verwendeten Modell nicht weiter ausweitet, schützt die gesteigerte NF-kappaB Aktivität offensichtlich auch die verbleibenden Zellen in der Penumbra der ipsilateralen Hemisphäre. Diese Schlussfolgerung wird noch gestützt von den Messungen in Tieren, die mit dem p53-Inhibitor PFT vorbehandelt wurden. In diesen Tieren war nach Ischämie die NF-kappaB-Aktivität im Gehirngewebe ipsi- und kontralateral nochmals deutlich gegenüber Vehikel-behandelten Tieren verstärkt, und diese Steigerung der NF-kappaB-Aktivität war mit einem ausgeprägten neuroprotektiven Effekt verbunden (Culmsee et al., 2003).

Eine Reihe von Autoren haben vorgeschlagen, dass die Hochregulation von NF-kappaB unter Schädigungsbedingungen, wie z.B. nach einem ischämischen Insult, den ursächlichen Zusammenhang von NF-kappaB mit dem Tod von Neuronen unterstreicht (Clemens et al., 1997; Grilli et al., 1996; Salminen et al., 1995). Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass unter pathologischen Bedingungen NF-kappaB-abhängige Gene aktiviert werden, die auf noch unbekannten Wegen die Apoptose der Zelle fördern oder sogar initiieren. NF-kappaB kann zum Beispiel Gene von Interleukin-1_ und der induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase (iNOS) aktivieren, die direkt mit der Pathogenese der zerebralen Ischämie in Verbindung stehen (Mattson et al., 2000b). Allerdings beruht die Schlussfolgerung, dass die Aktivierung von NF-kappaB den neuronalen Zelltod einleitet, weniger auf gesicherten Zusammenhängen im Sinne einer Ursache-Wirkungs-Beziehung, als vielmehr auf der Interpretation einer Assoziation dieser beiden Ereignisse (Mattson et al., 2000b). Es ist aufgrund einer Vielzahl von Evidenzen vielmehr anzunehmen, dass die NF-kappaB-Aktivität einen wichtigen endogenen Schutzmechanismus vor Schädigung darstellt. NF-kappaB ist offenbar ein wichtiges regulatorisches Element in einer evolutionär hochkonservierten, biochemischen Kaskade mit der Funktion, den Zelltod zu verhindern und Differenzierung und Aufbau von Neuronen zu fördern (Mattson et al., 2000b). Die Aktivierung von NF-kappaB macht es möglich, apoptotische Kaskaden in frühen Stadien zu unterbrechen, bevor es zur Produktion von Sauerstoffradikalen oder mitochondrialer Fehlfunktion kommt (Mattson und Furukawa, 1996; Mattson und Lindvall, 1997). Beispielsweise wurde mittels Adenovirus-vermittelter Überexpression von p65/RelA in primären Neuronen eine Akkumulation von Bcl-xl, Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (IAP1) und 2 (IAP2), induziert und damit eine signifikante Protektion gegenüber neuronaler Schädigung durch Etoposid oder Camptothecin erreicht (Bhakar et al., 2002). Zudem wurde nach Blockade der NF-kappaB-Aktivität durch Überexpression eines IkB-Super-Repressors oder dominant inhibitorischer NF-kappaB induzierender Kinase (NIK) vermehrter neuronaler Zelltod im zerebralen Kortex von Mäusen beobachtet (Bhakar et al., 2002). Diese Studien zeigen, dass eine konstitutive NF-kappaB-Aktivität im embryonalen und adulten Nervensystem eine bedeutende Rolle für das Überleben von Neuronen spielt, wenn auch die genauen Mechanismen, die diese konstitutive NF-kappaB-Aktivierung regulieren, noch nicht ausreichend definiert sind (Bhakar et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse belegen erstmals auf der Grundlage von Messungen der

tatsächlichen Transkriptionsaktivität in den Luciferase-Reportermäusen die bedeutende protektive Funktion von NF-kappaB nach Ischämie im adulten Gehirngewebe.

NF-kappaB-Aktivierung lässt sich durch zahlreiche Stimuli provozieren. Dabei ist es möglich, dass konstitutiv vorhandene parakrine oder autokrine Aktivierungskaskaden zu einer erhöhten NF-kappaB-Aktivität führen. Gleichzeitig könnte von NF-kappaB ein retrogrades Signal ausgehen, das bei synaptischen Vorgängen zu Transkription führt (Kaltschmidt et al., 1993; Meberg et al., 1996). Basale synaptische Erregung aktiviert NF-kappaB. Diese Aktivierung ist abhängig von der Ca^{2+}/Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMKII) und lokalen, submembranösen Ca^{2+}-Anstiegen. Aktiviertes NF-kappaB bewegt sich zum Nukleus und könnte so direkt synaptische Signale in Genexpression umwandeln. Mäuse, denen die p65-Untereinheit fehlt, zeigen selektive Lerndefizite (Meffert et al., 2003). Um den Tod der Mäuse in der Embryonalphase durch Leberversagen zu verhindern (Beg et al., 1995), wurden von dieser Arbeitsgruppe $TNFR^{-/-}p65^{-/-}$-Doppel-Knockout-Mäuse (Alcamo et al., 2001) verwendet. Die Tiere können dann trotz ihrer hohen Infektanfälligkeit ein annähernd normales Lebensalter erreichen (Meffert et al., 2003). NF-kappaB-Aktivierung lässt sich auch durch Glutamat, Kainatsäure und NO induzieren (Guerinni et al., 1995; Simpson et. Morris, 1999). Durch Glutamat, Kainat und Kaliumchlorid ist es möglich, die Translokation von p65/RelA von Neuriten zum Nukleus von lebenden Neuronen zu provozieren (Wellmann et al., 2001).

Obwohl die Funktion von NF-kappaB beispielsweise im Immunsystem gut charakterisiert ist, sind die Mechanismen und Konsequenzen von NF-kappaB-Aktivierung im ZNS noch nicht hinreichend erklärt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in Neuronen p53-abhängige Apoptose mit einem NF-kappaB-Funktionsverlust einhergeht. Außerdem wurde deutlich, dass eine Erhaltung von NF-kappaB-Aktivität mit Neuroprotektion einhergeht bzw. eine Hemmung von NF-kappaB diesen Effekt aufhebt. Diese Ergebnisse führen zu der Einschätzung, dass NF-kappaB eine bedeutende Rolle zum Schutz von Neuronen einnimmt.

4.2 Die p53-Inhibitoren PFT und cPFT und ihr Einfluss auf die p53-abhängige Apoptose

Aufgrund der bedeutenden Rolle des Tumorsuppressors p53 im neuronalen Zelltod und in vielen pathologischen Prozessen sind niedermolekulare Inhibitoren von p53 von großem Interesse für experimentelle Untersuchungen. P53-Inhibitoren eröffnen sowohl aussichtsreiche Optionen für Therapiestudien in Modellsystemen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen als auch weitere Erkenntnisse über p53-abhängige Pathomechanismen neurodegenerativer Prozesse. Ein solches Pharmakon ist der p53-Inhibitor Pifithrin-_ (PFT) und seine neueren Derivate (Culmsee et al., 2001; Zhu et al., 2002). In Mäusen wird p53 in verschiedenen Geweben exprimiert, insbesondere in lymphatischen und hämatopoetischen Geweben, intestinalen Epithelien und den Testes. Diese Gewebetypen sind auch die vorrangig geschädigten in der Krebstherapie (Rogel et al., 1985; Komarova et al., 1997). Basierend auf der Erkenntnis, dass ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika p53-abhängige Effekte hervorrufen, wurde p53 als eine wesentliche Determinante in der Sensibilisierung des Organismus gegenüber systemischem, genotoxischem Stress in der Krebstherapie ausgemacht (Komarov und Gudkov, 1998). P53-abhängige Apoptose ist in sensiblen Geweben kurz nach _-Strahlung zu beobachten (Komarova et al., 1997; Hendry et al., 1996). P53-knock-out-Mäuse zeigen gegenüber Wild-Typ-Tieren eine höhere Toleranz gegenüber Schädigung durch _-Strahlung (Westphal et al., 1998). Der niedermolekulare p53-Inhibitor PFT versprach diese Nebeneffekte der Tumortherapie zu beseitigen, da Mäuse durch PFT vor genotoxischem Stress durch _-Strahlung geschützt waren. Es wurden C57BL- und Balb/c-Mäuse mit 8 bzw. 6 Gy bestrahlt, was einer letalen _-Strahlendosis von 60% entspricht. PFT-Behandlung schützte die Mäuse. Dies wurde auch nach Behandlung mit höheren Dosen beobachtet, die für Kontrolltiere letal wirkten. PFT-behandelte Mäuse verloren durch die Bestrahlung weniger Gewicht als die Kontrolltiere. (Komarov et al., 1999).

Daneben gibt es eine Vielzahl von Studien, die auf eine bedeutende Rolle von p53-abhängiger Apoptose bei neurodegenerativen Prozessen hinweisen (Culmsee und Mattson, 2005). Nach den jüngsten Erkenntnissen sind Mechanismen des programmierten Zelltods auch an der Gewebeschädigung nach zerebraler Ischämie beteiligt. In verschiedenen Modellen der zerebralen Ischämie wurden bereits protektive

Effekte von Neuroprotektiva nachgewiesen, deren Wirkung auf anti-apoptotischen Mechanismen beruht. Einige davon sind der oben genannte p53-Inhibitor Pifithrin-α (PFT), NGF-Induktoren, Par-4 Antisenseoligonukleotid und 5-HT_{1A}-Agonisten (Culmsee et al., 2001a, c; Schaper et al., 2000; Zhu et al., 1998; 1999). Es gibt außerdem zunehmend Hinweise darauf, dass in Neuronen DNA-Schädigung mit nachfolgender Aktivierung von Reparaturmechanismen in der Zelle und die konsekutive Induktion von proapoptotischen Faktoren wie p53 auch in der frühen Phase der Apoptose eine zentrale Bedeutung einnehmen (Chan et al., 2000; Culmsee et al., 2001a, c, d). Demnach trägt der p53-Inhibitor PFT ein hohes neuroprotektives Potential, da durch die Blockade von p53 Mechanismen in der frühen Apoptose-Phase unterbrochen werden. In kultivierten hippokampalen Neuronen und kortikalen Neuronen wurden bereits neuroprotektive Effekte gegen die DNA-schädigenden Agentien Camptothecin und Etoposid nachgewiesen (Culmsee et al., 2000a; 2001a, c). Zusätzlich konnte durch Gel-Mobility-Shift-Assay nachgewiesen werden, dass die durch Camptothecin hervorgerufene p53-Aktivierung durch Pifithrin-α verhindert werden kann (Culmsee et al., 2000b, 2001a). PFT kann so nach DNA-Schädigungen selektiv die pro-apoptotische p53-Transkriptionsaktivität in verschiedenen Zelllinien inhibieren und in diesen Zellsystemen Apoptose verhindern (Culmsee et al., 2001a; Komarov et al., 1999; Zhu et al., 2002). Zudem schützt PFT Zellen mit normaler p53-Aktivität in vitro und in vivo vor apoptotischem Zelltod, der üblicherweise nach Exposition mit DNA-schädigenden Chemotherapeutika oder _-Strahlung z.B. im Darmgewebe auftritt. PFT schützt jedoch nicht p53-knock-out-Mäuse vor _-Strahlung in letalen Dosen. Dies ist ein weiterer Beleg für die Wirkung von PFT auf den p53-abhängigen Zelltod (Komarov et al., 1999). P53-knock-out-Mäuse reagieren auf Bestrahlung sehr sensibel mit Bildung von Tumoren (Kemp et al., 1994). Neoplasien konnten auch 7 Monate nach der Bestrahlung in den überlebenden Mäusen, die mit PFT behandelt wurden, nicht beobachtet werden (Komarov et al., 1999). PFT zeigt außerdem therapeutische Effekte in Tiermodellen des Morbus Parkinson (Duan et al., 2002) und der akuten Niereninsuffizienz (Kelly et al., 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass PFT Kardiozyten in Mäusen vor Doxorubicin-induzierter Apoptose schützt. Dies lässt auf ein mögliches Potential dieser Substanz schließen, die Nebenwirkungen von Chemotherapien wie Kardiotoxizität herabzusetzen (Liu et al., 2004). Apoptose durch Cisplatin in cochlearen und vestibulären Haarzellen wird durch PFT verhindert (Zhang et al., 2003). Auch konnte eine verbesserte Leberfunktion, -metabolismus und -integrität nach Lebertransplantation

in Ratten nachgewiesen werden. Dies ging sowohl mit einer verminderten Caspase-Aktivierung, als auch niedrigeren Apoptose- und Nekroseraten einher (El-Gibaly et al., 2004). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die p53-Blockade durch PFT eine frühe Epithelialisierung und Neovaskularisierung von kutanen Wunden bewirkt. Dies geschah durch Leukozytenrekrutierung, gesteigerte Zellproliferation und verminderten apoptotischen Zelltod (Vollmar et al., 2002).

Es handelt sich bei Pifithrin-α um eine synthetisch hergestellte, stabile, niedermolekulare, lipophile Substanz mit einem Octanol/Wasser Koeffizienten von Log P = 1,75 bei physiologischem pH. Nach systemischer Gabe kann PFT demnach die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren und sich im Gehirn in therapeutisch wirksamen Konzentrationen anreichern (Culmsee et al., 2001). In Mausmodellen der transienten fokalen Ischämie und Kainat-induzierter Epilepsie wurde eine neuroprotektive Wirkung von PFT nach systemischer Applikation nachgewiesen (Culmsee et al., 2000a, b; 2001a). Ferner konnte gezeigt werden, dass PFT Lymphozyten vor strahlungsinduzierter Apoptose zu schützen vermag und in diesen Lymphozyten eine massive Erhöhung der NF-kappaB-abhängigen Luciferaseaktivität zu verzeichnen war (Zhou, Culmsee, nicht publiziert). Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass durch PFT die Transkriptionsaktivität von NF-kappaB nach DNA-Schädigung erhalten werden kann (Ergebnisse 3.1.2.2 und 3.1.2.3). Diese Versuche zeigen sehr deutlich, dass PFT den Abfall der neuroprotektiven NF-kappaB-Transkriptionsaktivität in kultivierten Neuronen nach Camptothecinschädigung deutlich verringert und dass PFT auch in nicht-geschädigten Zellen die NF-kappaB-Aktivität über Kontrollniveau ansteigen lässt.

In den vorliegenden Versuchen wurde die NF-kappaB-Aktivität indirekt über die Messung der Luciferaseaktivität durch Verwendung eines Luciferase Assay Systems gemessen. Es muss hierbei bedacht werden, dass PFT auch direkt die Luciferaseaktivität beeinflussen kann. Es ist beschrieben, dass PFT in vivo und in vitro als ein spezifischer Inhibitor der Leuchtkäfer-Luciferase wirksam ist. Es zeigte sich jedoch, dass diese Luciferasehemmung durch PFT dosisabhängig ist (Rocha et al., 2003). PFT bewirkt in den Konzentrationen, die in den eigenen Experimenten an Neuronen verwendet wurden (100 nM), eine Reduzierung der Lucifeaseaktivität von weniger als 10 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Erst bei einer Konzentration von 1 μM kommt es zu einer 30 %igen Verminderung der Luciferaseaktivität (Rocha et al., 2003). Wenn in den eigenen Experimenten ein vergleichbarer direkter Effekt von PFT auf die Luciferaseaktivität

bestand, müsste die Luciferaseaktivität daher eher zu niedrig als zu hoch gemessen worden sein. Dieses unterstützt die korrekte Interpretation der eigenen Ergebnisse: Die Gabe von PFT verringert den Abfall der NF-kappaB-Aktivität nach Campthothecinschädigung und erhöht bei alleiniger Gabe diese über Kontrollniveau.
Alleinige Gabe von PFT (100 nM) induzierte im Vergleich eine höhere NF-kappaB-Aktivität als die Positivkontrolle mit TNF-_ (4 ng/ml). Eine verstärkte NF-kappaB-Transkriptionsaktivität durch TNF-_ wurde in Neuronen vielfach beschrieben (Mattson et al., 2000b). Neurone exprimieren zwei verschiedene TNF-Rezeptoren, den p55 und den p75-Rezeptor (Kinouchi et al, 1991; Cheng et al., 1994). Die Aktivierung des p55-Rezeptors bewirkt eine Rekrutierung von TNF-Rezeptor-assoziierten Proteinen und einer Phosphorylierungskaskade, die die Aktivierung von NF-kappaB zur Folge hat (Smith et al. 1994). Diese NF-kappaB-Aktivierung konnte in einem eigenen Versuch bestätigt werden (Ergebnisse 3.1.2.1). Die antiapoptotische Wirkung des TNF-_ lässt sich über diesen Mechanismus erklären (Mattson et al., 2000b).

Insgesamt zeigen die eigenen Ergebnisse, dass der p53-abhängige Zelltod nicht nur mit einer Induktion von proapoptotischen Faktoren einhergeht, sondern auch gleichzeitig antiapoptotische Faktoren wie NF-kappaB in ihrer Transkriptionsaktivität gehindert werden. Mögliche hemmende Wechselwirkungen zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren p53 und NF-kappaB wurden in anderen Arbeiten bislang lediglich in nicht-neuronalen Zelllinien untersucht (Webster und Perkins, 1999; Ikeda et al., 2000; Wadgaonkar et al., 1999). Damit ergibt sich für den p53-Inhibitor PFT ein hohes neuroprotektives Potential, da durch die Inhibition des pro-apoptotischen p53 gleichzeitig die Aktivität des protektiven Transkriptionsfaktors NF-kappaB gesteigert wird. Der Einfluss von PFT auf die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität konnte zusätzlich in Gehirngewebe nach permanenter, fokaler Ischämie gezeigt werden (Ergebnisse 3.2.3). Die mit PFT behandelten Tiere zeigten sowohl 3 als auch 6 Stunden nach Ischämie eine deutlich höhere NF-kappaB-Aktivität als die Kontrolltiere. Es ist wieder zu erkennen, dass die ipsilaterale Seite eine niedrigere NF-kappaB-Aktivität zeigt als die kontralaterale Seite. PFT verdeutlicht hier wieder den hemmenden Einfluss von aktiviertem p53 auf die NF-kappaB-Aktivität, die durch den p53-Inhibitor auch in vivo im Sinne einer neuroprotektiven Wirkung erhalten werden kann. Dieses neuroprotektive Potential von PFT wurde auch in anderen Versuchen demonstriert, in denen der p53-Inhibitor Neurone vor Schädigung durch Sauerstoff-Glukose-Entzug

schützen konnte (Culmsee et al., 2003). Des Weiteren schützt PFT Neurone gegenüber Schädigung durch Glutamat oder durch Amyloid-beta-Peptid, das als ein zentrales Protein im Pathomechanismus der Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer eine bedeutende Rolle spielt (Culmsee et al., 2002). Der protektive Effekt von PFT gegenüber einer Amyloid-beta-induzierten Schädigung wurde inzwischen auch in einer weiteren Arbeit belegt (Tamagno et al., 2003). 50-60 % der Neurone konnten dabei durch Vorbehandlung mit PFT vor Amyloid-beta-induzierter Apoptose geschützt werden.. Amyloid-beta vermittelt dabei neuronalen Zelltod wahrscheinlich zum Teil auch über p53-unabhängige Mechanismen, wie z.B. über die Aktivierung von SAPK (Stress-aktivierter Proteinkinase) und konsekutiver Inaktivierung von Bcl-2 (Yamamoto et al., 1999; Tamagno et al., 2003).

Im Gegensatz zu diesen protektiven Effekten des p53-Inhibitors gegen eine Vielzahl von schädigenden Stressfaktoren war es nicht möglich, den neuronalen Zelltod nach Entzug von Wachstumsfaktoren mit PFT zu verhindern (Culmsee et al., 2001), da dieser unabhängig von p53 stattfindet (Freeman et al., 1994; Sadoul et al., 1996). Mit PFT wird auch in anderen Gewebetypen mittlerweile erfolgreich experimentiert. So zeigten Schäfer et al. (2003) an Ratten, dass p53-Inhibition in der Leber sowohl eine Verminderung von Gewebeschäden durch Apoptose und Nekrose bewirkt als auch gleichzeitig die zelluläre Immunantwort bei Entzündungsprozessen vermindert wird. PFT vermochte dabei signifikant LPS (Lipopolysacharide)-induzierte Apoptose und Nekrose in Hepatozyten zu verhindern, die mit intrahepatischer Leukozytenrekrutierung und mikrovaskulärer Dysfunktion einhergeht. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich durch PFT das Verhältnis der p53-Aktivität zwischen Cytoplasma und Nukleus zugunsten des Ersteren verschiebt und die Aktivierung der Procaspase-3 durch PFT verhindert werden konnte (Schäfer et al., 2003; Komarov et al., 1999; Culmsee et al., 2001a). Hier wird deutlich, dass p53 zumindest teilweise LPS-induzierte Apoptose vermittelt und an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist, die durch Endotoxine Gewebeschäden verursachen. Im Gegensatz zu Befunden in Neuronen und in Lymphozyten wurde in den Experimenten an Leberzellen gezeigt, dass PFT eine Reduzierung der NF-kappaB-Aktivität verursachte (Schäfer et al., 2003). NF-kappaB wird nach LPS-Exposition in diversen Leberzelltypen aktiviert (Essani et al., 1996). In diesem experimentellen System an der Leber unterstützt NF-kappaB offenbar die apoptotische Antwort der Zellen und spielt zudem eine wichtige Rolle in der entzündungsassoziierten Kaskade der Gewebsschädigung (Barcurele et Henkel, 1994).

Dieses steht nicht in Einklang mit den eigenen Erkenntnissen in den Neuronenkulturen, wonach ein Anstieg der NF-kappaB-Aktivität nach p53-Inhibition zu erwarten gewesen wäre.

Im Gegensatz zu den hier gezeigten Experimenten ist vor kurzem berichtet worden, dass PFT keinen Effekt auf die NF-kappaB-Aktivität in ConA- und HeLa-Zellen, die durch TNF-_ stimuliert wurden, zeigte (Komarova et al., 2003). Die Autoren schlussfolgerten daraufhin, dass PFT keinen Einfluss auf die NF-kappaB-Aktivität ausübt. Diese Schlussfolgerung steht im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, die vielfach eine enge Beziehung von NF-kappaB-Aktivität und p53-Inhibition durch PFT belegen. Es ist anzunehmen, dass die Stimulation von NF-kappaB durch TNF-_ in der Arbeit von Komarova et al. bereits maximal war und durch PFT nicht weiter gesteigert werden konnte. Entsprechende Kontrollen und Messungen der NF-kappaB-Aktivität nach Applikation von TNF-_, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, fehlen in den Experimenten von Komarova und Kollegen. Die gleiche Arbeitsgruppe stellte in dieser Arbeit dar, dass PFT neben der Inhibition von p53 suppressiven Einfluss auf Hitzeschock- und Glukokortikoidrezeptor-Signale nimmt. PFT soll demnach die Aktivierung von Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1) reduzieren und dadurch die Sensibilisierung der Zellen gegenüber Hitze steigern. Zudem reduzierte PFT die Aktivität von Glukokortikoidrezeptoren und soll so in der Lage sein, Thymozyten der Maus in vivo und in vitro vor Apoptose nach Dexamethasonbehandlung zu schützen (Komarova et al., 2003). PFT wäre somit also nicht ausschließlich ein spezifisch wirkender p53-Inhibitor, sondern soll noch mit Komponenten anderer Signaltransduktionswege interagieren. Ein mögliches gemeinsames Ziel dieser Signaltransduktionswege wurde in den Hitzeschockproteinen ausgemacht (Komarova et al., 2003). Andere Autoren konnten jedoch zeigen, dass PFT weder Einfluss auf die Induktion durch Glukokortikoidrezeptoren noch auf Mechanismen von Chaperonen besitzt (Murphy et al., 2004). Murphy und Kollegen konnten zudem demonstrieren, dass PFT die p53-Transkriptionsaktivität erst nach der Translokation in den Nukleus verhindert (Murphy et al., 2004). Diese Erkenntnisse unterstreichen eine spezifische Inhibition von p53 durch PFT (Murphy et al., 2004). Die Ergebnisse von Murphy und Kollegen und die eigenen Ergebnisse müssen weiterhin einen engen Zusammenhang von NF-kappaB-Aktivitätssteigerung und spezifischer p53-Inhibition durch PFT annehmen lassen.

Um nun zu erfassen, ob die Aktivierung von NF-kappaB tatsächlich an den neuroprotektiven Effekten des p53-Inhibitors PFT beteiligt ist, wurden weitere Versuche mit den NF-kappaB-Inhibitoren PDTC und kappaB-decoy-Oligonukleotide durchgeführt (Ergebnisse 3.2.4). Das Antioxidans PDTC wird in vielen Arbeiten als NF-kappaB-Inhibitor verwendet (Snyder et al., 2002). Unter anderem ist es durch PDTC möglich, okulare Entzündungsprozesse durch Inhibition der NF-kappaB-Signalkaskade zu verringern (Ohta et al., 2002). Zudem wurde kappaB-decoy-DNA als spezifischer NF-kappaB-Inhibitor eingesetzt (Furukawa et al., 1998). Es zeigte sich, dass sowohl PDTC als auch kappaB-decoy-Oligonukleotide in der Lage sind, den neuroprotektiven Effekt von PFT nach Camptothecinschädigung vollständig aufzuheben. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der neuroprotektive Effekt des p53-Inhibitors PFT im p53-abhängigen Zelltod zum Teil durch die Transkriptionsaktivität des Überlebensfaktors NF-kappaB vermittelt wird. Dass kappaB-decoy-Oligonukleotide die NF-kappaB-Aktivität tatsächlich hemmen, konnte in einer parallelen Arbeit nachgewiesen werden, was die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse weiter unterstützt (Zhu et al., 2003).

Auffällig ist, dass PFT und cPFT unter Normalbedingungen eine verstärkte NF-kappaB-Aktivität in Neuronen bewirken, ohne dass die Zellen zusätzlichen Stressfaktoren ausgesetzt sind. Dies lässt darauf schließen, dass eine basale p53-Aktivität in der Zelle existiert, die die Transkriptionsaktivität von konstitutiv aktivem NF-kappaB reguliert. Es wäre möglich, dass eine p53-Grundaktivität die Zelle vor der unbegrenzten Aktivierung von Wachstums- und Überlebenskaskaden schützt und so unkontrolliertes, raumforderndes Gewebewachstum verhindert. Das Gen, welches für p53 codiert, kann in mehr als der Hälfte aller menschlichen Tumoren entweder mutiert oder gar nicht nachgewiesen werden (Hollstein et al., 1999). Eine Inaktivierung von p53 ist die häufigste Veränderung in menschlichen malignen Tumoren (Hollstein et al., 1991; Levine et al., 1991). Veränderte NF-kappaB-Transkriptionsaktivität wird in verschiedenen Geweben ebenfalls mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht und stellt ein mögliches Ziel zukünftiger Therapiekonzepte dar (Shukla et al., 2005; Russo et al., 2005). Es ist nicht zuletzt durch die eigenen Untersuchungen zu vermuten, dass zwischen NF-kappaB und p53 ein sensibles Gleichgewicht in der Zelle herrscht. PFT scheint nun in der Lage zu sein, dieses in Neuronen zugunsten der NF-kappaB-Aktivität zu verschieben und durch diesen Mechanismus die Zelle zu schützen.

PFT blockiert durch eine spezifische p53-Inhibition den entscheidenden Faktor, der die NF-kappaB-Transkriptionsaktivität unterdrückend beeinflusst. Es existiert also offensichtlich in Neuronen ein fein abgestimmtes System zwischen p53 und NF-kappaB, das entscheidend an der Regulation von Überlebens- und Zelltodmechanismen beteiligt ist (Culmsee et al., 2003).

Aufgrund der Erkenntnis, dass p53-Inhibitoren ein erhebliches neuroprotektives Potential besitzen, wurden ausgehend von der PFT-Grundstruktur weitere p53-Inhibitoren entwickelt. Es wurden aus einer ganzen Anzahl von neuen Derivaten einige Substanzen gefunden, die ähnliche neuroprotektive Eigenschaften gegenüber Camptothecinschädigung zeigten wie PFT (Culmsee et al., 2002; Zhu et al., 2002). Zusätzlich besitzen die wirksameren PFT-Derivate Radikalfängereigenschaften, die offenbar zusätzlich zur p53-Inhibtion an der neuroprotektiven Wirkung beteiligt sind. PFT dagegen zeigt Radikalfängereigenschaften erst bei einer Konzentration von 10-100 µM, jedoch nicht in neuroprotektiv wirksamen Konzentrationen, die im Bereich von 100-200 nM liegen (Culmsee et al., 2002). Dies verdeutlicht, dass PFT seine neuroprotektiven Wirkungen wahrscheinlich vor allem über die beschriebene Inhibition von p53 vermittelt. Ein weiteres neues Derivat von PFT ist cPFT. Dieses cyclische PFT-Derivat schützt Neurone sowohl gegen Homocystein- als auch nach Camptothecin- und OGD-Schädigung. In den eigenen Versuchen zeigte cPFT bereits in Konzentrationen von 10 nM eine neuroprotektive Wirkung, und Konzentrationen über 1µM waren nicht toxisch. Daraus ergibt sich eine deutlich geringere Toxizität von cPFT gegenüber PFT bei einer etwa 10-fach erhöhten Wirksamkeit (Ergebnisse 3.3.1 und 3.3.2).

In den eigenen Versuchen sollte zudem eruiert werden, ob cPFT ähnliche Auswirkungen auf die NF-kappaB-Aktivität nach Camptothecinschädigung hat wie die Leitsubstanz PFT (Ergebnisse 3.3.3). Die Auswertungen der Luciferase-Aktivität zeigten, dass die Blockade der NF-kappaB-Transkriptionsaktivität nach Camptothecinschädigung durch cPFT ebenfalls verringert werden kann. Der gleiche Effekt konnte nach OGD-Schädigung nachgewiesen werden (Culmsee et al., 2003). Ferner konnte beobachtet werden, dass die alleinige Gabe von cPFT eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität von NF-kappaB über Kontrollniveau bewirkt. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass unter normalen Bedingungen die basale p53-Aktivität suppressiven Einfluss auf die NF-kappaB-Aktivität nimmt. So lässt sich dieser Effekt unter

Kontrollbedingungen dann als Blockade der Transkription erklären, die durch beide p53-Inhibitoren, PFT oder cPFT enthemmt werden kann.

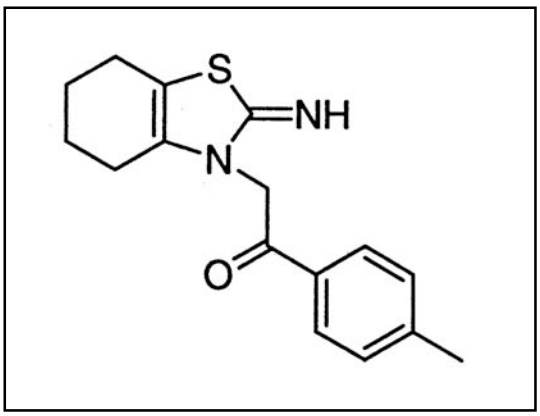

Abbildung 19: PFT

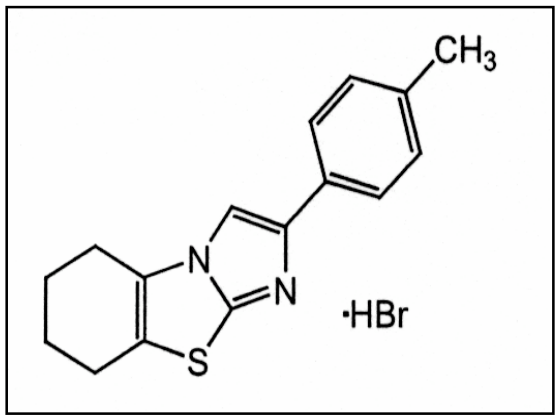

Abbildung 20: CPFT

4.3 Die Interaktion von p53 und NF-kappaB wird durch p300/CBP vermittelt

Nach Studien in nicht-neuronalen Zelllinien sind die Transkriptionskofaktoren cAMP-response-element-binding protein (CBP) und p300 mögliche Bindungspartner von p53 und NF-kappaB. P300 und CBP nehmen als Koregulatoren der Transkription an der Ausführung eines weiten Spektrums der zellulären Genexpression teil und kontrollieren so Zelldifferentierung, Zellwachstum, Zellhomöostase und Apoptose. Beide Kofaktoren agieren zusammen mit sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren wie p53 oder NF-kappaB und modifizieren in entsprechenden Transkriptionskomplexen offenbar Chromatinstrukturen von Zielgenen. Dies gelingt durch ihre intrinsischen Acetyltransferase-Aktivität, deren Ziel Histone und Transkriptionsfaktoren sind (Bordoli et al., 2001; Chan und La Thangue, 2001). Die Transkriptionsregulation unterliegt dabei multiplen Mechanismen. Eine veränderte p300/CBP-Aktivität kommt beispielsweise bei pathologischen Vorgängen vor, insbesondere in Karzinomen. Gene von p300/CBP zeigen sich in verschiedensten menschlichen Tumoren verändert (Petrij et al., 1995; Muraoka et al., 1996; Sobulo et al., 1997; Giles at al., 1998; Gayther et al., 2000). Ein Effekt könnte dabei eine Verringerung von Tumorsuppressor-Aktivitäten durch p300/CBP sein (Chan und La Thangue, 2001). Aus Untersuchungen an $Cbp^{+/-}$-

Mäusen ergaben sich Hinweise auf Tumorsuppressor-Aktivitäten von CBP im hämatopoetischen System (Kung et al., 1999).
Der Tumorsuppressor p53 unterliegt z. B. nach DNA-Schädigung strukturellen Veränderungen wie Acetylierung. Dies konnte sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen werden (Gu und Roeder, 1997; Sakaguchi et al., 1998; Liu et al., 1999). P53 unterliegt insbesondere einer Acetylierung durch die Transkriptionskofaktoren p300/CBP (Chan und La Thangue, 2001). Solche posttranslationalen Modifikationen bewirken entweder eine vermehrte Stabilität von p53 oder eine direkte Zunahme von Affinität zu DNA (Culmsee und Mattson, 2005). Auch bei anderen Transkriptionsfaktoren bewirkt Acetylierung eine gesteigerte DNA-Bindungsaktivität (Chan und La Thangue, 2001). Möglicherweise bewirkt eine Acetylierung an der C-terminalen Region von p53 eine Konformationsänderung, die zu vermehrter Bindungsaktivität führt (Gu und Roeder, 1997). P300/CBP kann über diesen Weg die Transkription bestimmter Gene spezifisch steigern.
Nicht nur p53 zeigt Interaktionsmuster mit p300 und CBP (Avantaggiati et al., 1997; Gu et al., 1997; Lill et al., 1997; Somasundaram und El-Deiry, 1997) sondern auch andere DNA-bindenden Proteine wie C/EBP und AP-1 (Fos/Jun) interagieren mit p300 und CBP (Bannister et al., 1995; Horvai et al, 1997; Kamei et al., 1996; Mink et al., 1979). Es zeigte sich, dass diese wiederum mit NF-kappaB interagieren und kooperativ mit diesem Transkriptionsfaktor DNA binden können (Stein et al., 1993 a,b). NF-kappaB bildet Komplexe mit den beiden Transkriptionskofaktoren p300 und CBP (Gerritsen et al., 1997; Perkins et al., 1997). Diese Interaktion ist mit verschiedenen Domänen von p300/CBP möglich und kann durch Phosphorylierung von RelA durch die IkappaB-assoziierte Proteinkinase A (PKA) reguliert werden. PKA nimmt auf diese Weise Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von NF-kappaB (Zhong et al., 1998).

Der Hinweis auf eine gegenseitige Regulation zwischen NF-kappaB und p53 ergibt sich durch eine Vielzahl von ähnlichen zellulären Stimuli, die beide Faktoren induzieren. Diese Stimuli beinhalten DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung (Devary et al., 1993; Hall et al., 1996; Ko et al., 1996; Levine et al., 1997; Siebenlist et al., 1994; Wang et al, 1996) und Stimulation durch TNF-_ (Donato und Perez, 1998; Gualbertoet al., 1995; Mukhopadhyay et al., 1996; Osborn et al., 1989). Die eigenen Beobachtungen lassen nun eindeutig vermuten, dass p53 und NF-kappaB sich funktionell gegenseitig regulieren. P300/CBP steht mit beiden Faktoren in enger

funktioneller Verbindung. Es ist bislang ungeklärt, auf welche Weise eine gegenseitige Regulation zwischen p53 und NF-kappaB z.B in Neuronen stattfindet und wie p300/CBP in dieser Einfluss nimmt. Die eigenen Untersuchungen konnten einen Hinweis auf die zugrundeliegenden Mechanismen geben.

Die vorliegenden Befunde führen zu der Schlussfolgerung, dass ein zellulärer Regulationsmechanismus existiert, der die gegensätzlichen Funktionen von p53 und NF-kappaB im Sinne einer wechselseitigen Hemmung in Neuronen integriert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Transkriptionsaktivität beider Faktoren von ihrer relativen Expressionsrate abhängen. NF-kappaB inhibiert die p53-abhängige Transkription, während p53-Expression mit einer verringerten NF-kappaB-Transkriptionsrate einhergeht. Zusätzlich ist es möglich, durch TNF-_-induzierte NF-kappaB-Aktivität p53-Transaktivierung zu inhibieren (Webster und Perkins, 1999). Aus vorliegenden Arbeiten entstand die Vermutung, dass der Cotranskriptionsfaktor p300/CBP zwischen p53 und NF-kappaB als Vermittler fungiert (Ravi et al., 1998; Webster und Perkins, 1999; Wadgaonkar et al., 1999). In Tumorzelllinien konkurrieren NF-kappaB und p53 um die Bindung an p300/CBP, die offenbar essentiell für ihre Funktion als Transkriptionsfaktor ist (Ikeda et al., 2000; Ravi et al.,1998; Wadgaonkar et al., 1999). Die Interaktion mit Transkriptionskofaktoren wie p300/CBP ist offenbar ein zentraler Regulationsmechanismus der p53-Transkriptionsaktivität. Diese Transkriptionskofaktoren binden phosphoryliertes p53 und bewirken über die Acetylierung am C-Terminus von p53 gesteigerte Transkriptionsaktivität an spezifischen DNA-Bindungsstellen. Über diesen Mechanismus wird somit die Transkription von p53-Zielgenen durch den p53/p300-Komplex reguliert. Es wurde auch nachgewiesen, dass eine erhöhte Translokation von NF-kappaB in den Zellkern und eine verstärkte DNA-Bindungsaktivität nicht mit einer tatsächlichen Transkriptionsaktivität gleichzusetzen ist (Campbell et al., 2001). Die eigentliche Transkriptionsaktivität von NF-kappaB ist demnach nicht allein von dem Aktivierungszustand und nukleärer Translokation abhängig, sondern auch von wichtigen Transkriptionskofaktoren wie p300/CBP. In apoptotischen Zellen könnte p53 so auch protektive Mechanismen blockieren, da NF-kappaB ohne p300/CBP seine Transkriptionsaktivität nicht ausreichend entfalten kann (Wadgaonkar et al., 1999). Die vorliegenden Messungen zeigen, dass die p53-DNA-Bindungsaktivität in hippokampalen Neuronen nach Camptothecinschädigung merklich zunimmt. Im

Gegenzug sorgt die Behandlung mit PFT für eine komplette Unterdrückung dieser Camptothecin-induzierten DNA-Bindungsaktivität (Culmsee et al., 2001a, 2003). In früheren Veröffentlichungen wurde bereits gezeigt, dass PFT die p53-abhängige Expression von Bax verhindert (Culmsee et al., 2001a). Um die Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit dem Kofaktor p300 zu eruieren, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt (Ergebnisse 3.2.5). Die Ergebnisse zeigen, dass die Camptothecin-induzierte Zunahme der Bindung von p53 an p300 gleichzeitig mit einer Abnahme der Bindung von NF-kappaB an p300 einhergeht. Diese Abnahme lässt sich durch Vorbehandlung mit PFT verhindern. Es wurde auch festgestellt, dass unter Kontrollbedingungen die Gabe von PFT zu einer merklichen Verstärkung der Bindung von p300 an NF-kappaB führte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass p53 und NF-kappaB offenbar um die Bindung an dem Kotranskriptionsfaktor p300 konkurrieren. Induktion von p53 führt so zu einer Abnahme der NF-kappaB-Bindung an p300 und zu einer Abnahme der NF-kappaB-Aktivität, wie in Immunpräzipitationsexperimenten und durch Luciferase-Aktivitätsmessungen in NF-kappaB-Reporterzellen gezeigt. Die p53-Inhibitoren verhindern die Bindung von p53 an p300, was zu einer konsekutiven NF-kappaB-Aktivitätserhöhung führt, da nun p300 als Bindungspartner wieder vermehrt zur Verfügung steht. Ein mögliches Interaktionsschema zeigt die nachfolgende Darstellung (Abb. 21).

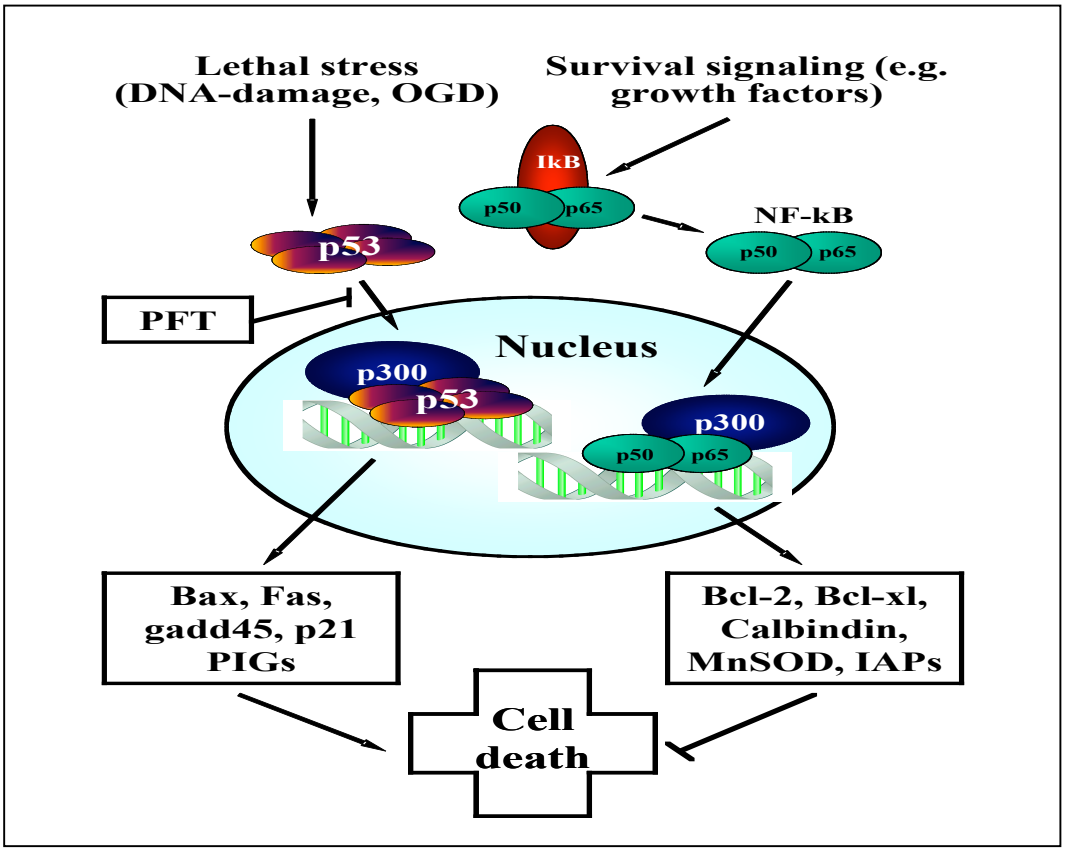

Abbildung 21: Möglicher Interaktionsmechanismus zwischen p53, NF-kappaB und p300/CBP. Adaptiert aus Culmsee und Mattson, 2005.

Sicherlich ist es möglich, dass die Steigerung der NF-kappaB-Aktivität durch PFT noch durch andere Regulationswege vermittelt wird als den hier dargestellten. Da weitere DNA-bindende Proteine wie C/EBP und AP-1 (Fos/Jun) nicht nur mit p300/CBP, sondern auch mit NF-kappaB direkt interagieren, müssen auch solche Mechanismen in Erwägung gezogen werden. Dieses wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Aber man kann sicherlich davon ausgehen, dass die Interaktion zwischen NF-kappaB und p53 im neuronalen Zelltod eine zentrale Rolle spielt und der Kotranskriptionsfaktor p300 in diese Regulation einbezogen ist.

5 Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen gewinnen im Zuge des demographischen Alterns der Industriegesellschaften immer mehr an Bedeutung. Trotz unterschiedlicher Ätiologie dieser Erkrankungen scheinen dem Zelltod der Neuronen gemeinsame biochemische Kaskaden zugrunde zu liegen, die man unter dem Begriff „programmierter Zelltod“ oder Apoptose zusammenfasst. Im Gegensatz zur Nekrose, dem passiven Zelltod, scheint es besser möglich zu sein, in diesen aktiven Todesprozess pharmakologisch einzugreifen und so das Absterben der Neurone zu verhindern.

Ein bedeutender Faktor in dieser biochemischen Kaskade ist der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53. Er ist essentiell für den neuronalen Zelltod in verschiedenen experimentellen Modellen und ist bei neurodegenerativen Erkrankungen reguliert. Durch Transaktivierung pro-apoptotischer Gene, Hemmung neuroprotektiver Transkriptionsfaktoren und direkte Effekte ist p53 in der apoptotischen Todeskaskade entscheidend an der Schädigung von Mitochondrien beteiligt.

Demgegenüber steht der Transkriptionsfaktor NF-kapppaB als potentiell antiapoptotisch wirksamer Faktor, der aber in der Vergangenheit kontrovers diskutiert wurde. Beide Faktoren stehen im Verdacht Protagonisten in einem fein abgestimmten Interaktionsmuster zu sein, das über Leben und Tod der Zelle entscheidet und in dem der Co-Transkriptionsfaktor p300/CBP eine Vermittlerrolle zwischen diesen beiden Faktoren übernimmt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Rolle des Transkriptionsfaktors NF-kappaB im p53-abhängigen neuronalen Zelltod, induziert durch DNA-Schädigung und zerebrale Ischämie, genauer definiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass DNA-Schädigung und zerebrale Ischämie zu einer signifikanten Blockade der NF-kappaB-Transkriptionsaktivität führt. Die p53-Inhibitoren PFT und cPFT konnten diesen Verlust an NF-kappaB-Transkriptionsaktivität aufheben. Diese Ergebnisse belegen, dass die Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und p53 in einem sensiblen Gleichgewicht stehen. Ferner wurde gezeigt, dass eine Grundaktivität von p53 und NF-kappaB in Neuronen

existiert, die wahrscheinlich auf der einen Seite das übermäßige Wachstum der Zelle verhindert und auf der anderen Seite die Zelle vor Schädigung bewahrt. Des Weiteren konnte der Nachweis geliefert werden, dass die PFT-vermittelte NF-kappaB-Aktivierung wesentlich am neuroprotektiven Effekt des p53-Inhibitors beteiligt ist, was zusätzlich noch einmal die Beziehung zwischen NF-kappaB und p53 im neuronalen Zelltod unterstreicht. Schließlich war es möglich, den Nachweis zu erbringen, dass die Transkriptionsfaktoren über den Kofaktor p300/CBP in Verbindung stehen und sich so gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen. Es konnten weitere Eigenschaften des neueren PFT-Derivates cPFT aufgezeigt werden. Hier zeigte sich, dass cPFT genau wie PFT in der Lage ist, die NF-kappaB-Aktivitätserniedrigung nach Camptothecinschädigung zu verringern. Außerdem konnten die Wirkstoffkonzentrationen von cPFT, bei denen die Substanz ihre neuroprotektiven Eigenschaften entfaltet, näher beschrieben werden. Im Vergleich zu PFT ist cPFT offenbar weniger toxisch und besitzt eine stärkere neuroprotektive Wirkung. Diese Erkenntnisse lassen sie in der Zukunft zu potentiellen Pharmaka zur Bekämpfung neurodegenerativer Erkrankungen und Insulten werden.

Literaturverzeichnis

Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR (1998): The p53 network. J Biol Chem 273:1-4.

Agarwal BB, Takada Y, Shishodia S, Gutierrez AM, Oommen OV, Ischikawa H, Baba Y, Kumar A (2004): Nuclear transcription factor NF-kappa B: Role in biology and medicine. Indian J Exp Biol 42(4):341-53.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O´Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, VanMuiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000): Inflammation and Alzheimer´s disease. Neurobiol Aging 21: 383-421.

Alcamo E (2001): Targeted mutation of TNF-receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappaB in leukocyte recruitment. J Immunol 167, 1592-1600.

American Heart Association (2001): 2002 Heart And Stroke Statistical Update. Dallas, Tex.: American Heart Association.

American Stroke Association (2003): www.strokeassociation.org/presenter.html.

Antonsson B, Martinou JC (2000): The bcl-2 protein family. Exp Cell Res 256: 50-57.

Arends M, Morris R, Wyllie A (1990): Apoptosis: The role of the endonuclease. Am J Pathol 136: 593-608.

Ärzte Zeitung Online (2001): Artikel vom 18.07.2001.

Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K (1997): Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. Cell 89:1175-1184.
Baeuerle PA, Henkel T (1994): Function and activation of NF-kappaB in the immune system. Annu Rev Immunol 12:141-179.

Bacher S, Schmitz ML (2004): The NF-kappaB pathway as a potential target for autoimmune disease therapy. Curr Pharm Des 10(23):2827-34.

Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T (1995): Stimulation of c-Jun activity by CBP, c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. Oncogene 11: 2509-2514.

Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP (1995): Tumor necrosis factor alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: Evidence for involvement of a kappaB-binding factor and attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation. Proc Natl Acad Sci USA 92:9328-9332.

Barkett M, Gilmore TD (1999): Control of apoptosis by Rel/ NF-kappaB transcription factors. Oncogene 18:6910-6924.

Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X, Feuerstein GZ (1998): Ischemic preconditioning and brain tolerance: Temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. Stroke 29:1937-1950.

Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Gosh S, Baltimore D (1995): Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappaB. Nature 376:167-170.

Beg AA, Baltimore D (1996): An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-_-induced cell death. Science 274:782-784.

Belayev L, Ginsberg MD, Alonso OF, Singer JT, Zhao W, Busto R (1996): Bilateral ischemic tolerance of rat hippocampus induced by prior unilateral transient focal ischemia: Relationship to c-fos mRNA expression. NeuroReport 8:55-59.

Benoit V, Hellin AC, Huygen S, Gielen J, Bours V, Merville MP (2000): Additive effect between NF-kappaB subunits and p53 protein for transcriptional activation of human p53 promotor. Oncogene 19:4787-4794.

Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA (2002): Constitutive nuclear factor kappa B activity is required for central neuron survival. J Neurosci 22:8466-8475.

Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C (2001): Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. J Neurosci 21: 4668-4677.

Blum D, Wu Y, Nissou MF, Arnaud S, Benabid A, Verna JM (1997): P53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. Brain Res. 751,139-142.

Bonfoco E, Krainc C, Ancarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995): Apoptosis and necrosis. Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D aspartate ot nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA 92:7162-7166.

Bordoli L, Netsch M, Luthi U, Lutz W, Eckner R (2001): Plant orthologs of p300/CBP: Conservation of a core domain in metazoan p300/CBP acetyltransferase-related proteins. Nucleic Acids Res 29 (3):589-97.

Budhram-Mahadeo V, Morris PJ, Smith MD, Midgley CA, Boxer LM, Latchman DS (1999): P53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. J Biol Chem 274:15237-1544.

Caamano J, Hunter CA (2002): NF-kappaB family of transcription factors: Central regulators of innate and adaptive immune functions. Clin Microbiol Rev 15(3):414-29.

Campbell KJ, Chapman NR, Perkins ND (2001): UV stimulation induces nuclear factor kappaB DNA-binding activity but not transcriptional activation. Biochemical Society Transactions 29:6.

Capranico G, Giaccone G, D`Incalci M (1999): DNA topoisomerase II poisons and inhibitors. Cancer Chemother Biol Response Modif 18:125-143.

Chan HM, La Thangue NB (2001): P300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. J Cell Sci 114(Pt 13): 2363-73.

Cheng B, Christakos S, Mattson MP (1994): Tumor necrosis factors protect neurons against excitotoxic/metabolic insults and promote maintenance of calcium homoestasis. Neuron 12: 139-153.

Choi DW (1995): Calcium: Still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. Trends Neurosci 18 (2): 58-60.

Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Dixon EP, Little SP (1997): Global ischemia activates NF-kappaB in forebrain neurons of rats. Stroke 28:1073-1080.

Cory S, Adams JM (2002): The bcl-2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer 2:647-656.

Cregan SP, MacLaurin JG, Craig CG, Robbertson GS, Nicholson DW, Park DS, Slack RS (1999): Bax-dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. J Neurosci 19: 7860-7869.

Crumrine RC, Thomas AL, Morgan PF (1994): Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. J Cereb Blood Flow Metab 14: 887-891.

Culmsee C, Yu Q, Zhu X, Guo Z, Camandola S, Zhou D, Crump SW, Partin J, Greig N, Mattson MP (2000a): Pifithrin-α and its derivates protect neurons from apoptotic insults in vitro and reduce brain dammage in mouse models of excitotoxicity and ischemia. Soc Neurosci Abstr 303.1.

Culmsee C, Zhu X, Greig N, Guo Z, Camandola S, Crump SW, Zhao D, Mattson MP (2000b): The p53 inhibitor pifithrin-α protects neurons in experimental models of Alzheimer`s disease. Neurobiol Aging 21:S44.

Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, Greig NH, Mattson MP (2001a): A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. J Neurochem 77:220-228.

Culmsee C, Zhu Y, Krieglstein J, Mattson MP (2001b): Evidence for the involvement of Par-4 in ischemic neuron cell death. J Cereb Blood Flow Metab 21:334-343.

Culmsee C, Kruman II, Yu Q, Zhu X, Camandola S, Chan SL, Guo Z, Junker V, Krieglstein J, Greig N, Mattson MP (2001c): Evidence for the emerging role of DNA-damage and activation of p53 in neuron cell death. Naunyn-Schmiedeberg`s arch Pharmacol 363 (Suppl 4): R91.

Culmsee C, Bondada S, Mattson MP (2001d): Hippocampal neurons of mice deficient in DNA-dependent protein kinase exhibit increased vulnerability to DNA damage, oxidative stress and excitotoxicity. Brain Res Mol Brain Res 87:257-262.

Culmsee C, Siewe J, Junker V, Camandola S, Zhou D, Greig N, Mattson MP, Krieglstein J (2002): Neuroprotection by p53 antagonists. Pharmacology of Cerebral Ischemia 2002, Josef Krieglstein und Susanne Klumpp, Medpharm Scientific Publishers Stuttgart.

Culmsee C, Siewe J, Junker V, Retiounskaia M, Camandola S, El-Metainy S, Behnke H, Mattson MP, Krieglstein J (2003): Reciprocal inhibition of p53 and NF-kappaB transcriptional activity determines survival or cell death in neurons. J Neurosci 23:8586-8595.

Culmsee C, Mattson MP (2005): P53 in neuronal apoptosis. In Press

De la Monte SM, Sohn YK, Wands JR (1997): Correlates of p53- and Fas(CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer`s disease. J Neurol Sci 152:73-83.

Desagher S, Martinou JC (2000): Mitochondria as the central point of apoptosis. Trends Cell Biol. 10:369-377.

Devary Y, Rosette C, DiDonato JA, Karin M (1993): NF-kappaB activation by ultraviolet light is not dependent on a nuclear signal. Science 261: 1442-1445.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischemic stroke: An integrated view. Trends Neurosci 22: 391-397.

Donato NJ, Perez M (1998): Tumor necrosis factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21WAF1 proteolysis in ME-180 cells. J Biol Chem 273: 5067-5072.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery Jr CJ, Butel JS, Bradley A (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. Nature 356:215-212.

Duan W, Zhu X, Ladenheim B, Yu QS, Guo Z, Oyler J, Cutler RG, Cadet JL, Greig NH, Mattson MP (2002): P53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental parkinsonism. Ann Neurol 52: 597-606):

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

El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B (2004): Improvement of rat liver graft quality by Pifithrin-_-mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis. Hepatology 39(6):1553-62.

Essani NA, Mcguire GM, Manning AM, Jaeschke H (1996): Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappaB in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells in vivo. J Immunol 156: 2956-2963.

Ferrer I (1999): Nuclear DNA fragmentation in Creutzfeldt-Jakob disease: Does a mere positive in situ nuclear end-labeling indicate apoptosis? Acta Neuropathol 97: 5-12.

Freeman RS, Estus S, Johnson Jr. EM (1994): Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: Selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. Neuron 1994 12: 343-355.

Fujikawa DG (2000): Confusion between neuronal apoptosis and activation of programmed cell death mechanisms in acute necrotic insults. Trends Neurosci 23: 410-411.

Furukawa K, Mattson MP (1998): The transcription factor NF-kappaB mediates increases in calcium currents and decreases in NMDA-and AMP7kainate-induced currents induced by tumor necrosis factor-_ in hippocampal neurons. J Neurochem 70:1876-1886.

Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Sowter HM, Delhanty JD, Ponder BA, Kouzarides T, Caldas C (2000): Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. Nat Genet 2000 Mar; 24(3):300-3.

Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossmann M (1998): The regulation and roles of Rel/NF-kappaB transcription factors during lymphocyte activation. Curr Opin Immunol. 10: 353-359.

Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T (1997): CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. Proc Natl Acad Sci USA 94:2927-2932.

Giles RH, Peters DJ, Breuning MH (1998): Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. Trends Genet. 1998 May;14(5):178-83.

Goodman Y, Mattson MP (1996): Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults and amyloid beta-peptide toxicity. J Neurochem 66:869-872.

Green DR, Reed JC (1998): Mitochondria and apoptosis. Science 28:1309-1312.

Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P (1996): Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. Science 274: 1383-1385.

Grilli M, Memo M (1999): Possible role of NF-kappaB and p53 in the glutamate-induced pro-apoptotic neuronal pathway. Cell Death Differ 6:22-27.

Gu W, Shi XL, Roeder RG (1997): Synergistc activation of transcription by CBP and p53. Nature 387: 819-823.

Gu W, Roeder RG (1997): Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. Cell 1997 Aug 22; 90(4):595-606.

Gualberto A, Hixon ML, Finco TS, Perkins ND, Nabel GJ, Baldwin Jr AS (1995): A proliferative p53-responsive element mediates tumor necrosis factor alpha induction of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. Mol Cell Biol 15:3450-3459.

Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S (1995): Synaptic activation of NF-kappaB by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 92:9077-9081.

Guo Q, Fu W, Xie J, Luo H, Sells SF, Geddes JW, Bondada V, Rangnekar VM, Mattson MP (1998): Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. Nat Med 4:957-962.

Guo Q, Robinson N, Mattson M (1998): Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenelin-1 by activation of NF-kappaB and stabilization of calcium homeostasis. J Biol Chem 273:12341-12351.

Hall PA, Meek D, Lane DP (1996): P53-integrating the complexity. J Pathol 180:1-5.

Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM (1999): P75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. Moll Cell Neurosci 14:28-40.

Hatada EN, Krappmann D, Schneidereit C (2000): NF-kappaB and the innate immune response. Curr Opin Immunol 12:52-58.

Heemels MT (2000): Apoptosis. Nature Vol 407.

Hirsch-Kaufmann M, Schweiger M (2000): Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Thieme Verlag S. 282, 331.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris (1991): P53 mutations in human cancers. Science 253: 49-53.

Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, Bartsch H, Wang ZQ, Hainaut P (1999): New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. Mutat Res 1999 Dec 17;431(2):199-209.

Horvai AE, Xu L, Korzus E, Brard G, Kalafus D, Mullen T, Rose DW, Rosenfeld MG, Glass CK (1997): Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. Proc Natl Acad Sci USA 94:1074-1079.

Hughes PE, Alexi T, Schreiber SS (1997): A role for the tumor suppressor gene p53 in regulating neuronal apoptosis. Neuroreport 8:5-12.

Ikeda A, Sun X, Li Y, Zhang Y, Eckner R, Doi TS, Takahashi T, Obata Y, Yoshioka K, Yamamoto K (2000): P300/CBP-dependent and -independent transcriptional interference between NF-kappaB RelA and p53. Biochem Biophys Res Commun 272:375-379.

Isabelle Millet (2000): Inhibition of NF-kappaB activity and enhancement of apoptosis by the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. J Biol Chem 275 (20): 15114-15121.

Inamura N, Araki T, Enokido Y, Nishio C, Aizawa S, Hatanaka H (2000): Role of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in organotypic slice culture from the mouse cerebellum. J Neurosci Res 60: 450-457.

Junker V, Becker A, Huhne R, Zembatov M, Ravati A, Culmsee C, Krieglstein J (2002): Stimulation of beta-adrenoceptors activates astrocytes and provides neuroprotection. Eur J Pharmacol 446:25-36.

Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurukawa R, Gloss B, Lin SC, Heymann RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (1996) : A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. Cell 85:403-414.

Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H, Inoue M (2000): Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. Clin Cancer Res 6:1239-1247.

Kaltschmidt B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C (1993): Potential involvement of the transcription factor NF-kappaB in neurological disorders. Mol Aspects Med 14:171-190.

Kaltschmidt B, Uherek M, Wellmann H, Volk B, Kaltschmidt C (1999): Inhibition of NF-kappaB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 96:9409-9414.

Kammann U (2001): http://www.ukammann.de/apoptose/Nekrose/Nekrose_Abbildung/nekrose_abbildung.html.

Kawai H, Yamada Y, Tatsuka M, Niwa O, Yamamoto K, Suzuki F (1999): Down-regulation of NF-kappaB is required for p53-dependent apoptosis in X-ray irradiated mouse lymphoma cells and thymocytes. Cancer Res 59: 6038-6041.

Kemp CJ, Wheldon T, Balmain A (1994): P53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. Nat Genet. 1994 Sep; 8(1):66-9.

Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Daghar PC (2003): P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: Protective role of a p53-inhibitor. J Am Soc Nephrol 14:128-138.

Kerr JFR, Harmon BV (1991): Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. Apoptosis: The molecular basis of cell death (Tomei LD, Cope FO, eds.) Cold Spring Harbor: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 5-29.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV (1994): Morphological criteria for identifying apoptosis. Cell Biology (Celis JE, ed.), Academic Press, NY, pp 319-329.

Kerr JFR, Gob_ GC, Winterford CM, Harmon BV (1995): Anatomical methods in cell death. Cell death (Schwaetz LM, Osborne BA, eds.) NY, Academic Press, pp 1-27.

Kinouchi K, Brown G, Pasternak G, Donner DB (1991): Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor-_ in the brain. Biochem Biophys Res Commun 181, 1532-1538.

Ko LJ, Prives C (1996): P53: Puzzle and paradigms. Genes Dev. 10, 1054-1072.

Komarova EA, Chernov MV, Franks R, Wang K, Armin G, Zelnick CR, Chin DM, Bacus SS, Stark GR, Gudkov AV (1997): Transgenic mice with p53-responsive lacZ: P53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. EMBO J 1997 Mar 17; 16(6):1391-400.

Komarova EA, Gudkow AV (1998): Could p53 be a target for therapeutic suppression? Semin Cancer Biol 8:389-400.

Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV (1999): A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. Science 285:1733-1737.

Kruman II, Mattson MP (1999): Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. J Neurochem 72:529-540.

Kung AL, Rebel VI, Bronson RT, Ch'ng LE, Sieff CA, Livingston DM, Yao TP (1999): Gene dose-dependent control of hematopoesis and hematologic tumor suppression by CBP. Genes Dev 2000 Feb 1;14(3):272-7.

Lee FS, Peters RT, Dang LC, Maniatis T (1998): MEKK1 activates both IkB kinase alpha and IkB kinase beta. Proc Natl Acad Sci USA 95, 9319-9324.

Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI (2000): Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of function during the formation of hepatocellular carcinoma. Oncogene 19:3717-3726.

Leist M, Single B, Castoldi F, 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.

Levine AJ (1997): P53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88:323-331.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991): The p53 tumour suppressor gene. Nature 1991 Jun 6; 351(6326):453-6.

Li Q, Lu Q, Hwang JY, Buscher D, Lee KF, Izpisua-Belmonte JC, Verma IM (1999): IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. Genes Dev 13:1322-1328.

Li X, Stark GR (2002): NF-kappaB-dependent signalling pathways. Exp Hematol 30:285-296.

Li Y, Chopp M, Zhang ZG, Zaloga C, Niewenhuis L, Gautam S (1994): P53-immunoreactive protein and mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke 25:849-855.

Lill NL, Grossmann SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM (1997): Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. Nature 387:823-827.

Lin Y, Ma W, Benchimol S (2000): Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. Nat Genet 26:122-127.

Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, Berger SL (1999): P53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. Mol Cell Biol. 1999 Feb; 19(2):1202-9.

Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, Chua BH (2004): Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004 Mar;286(3):H933-9.

Lodish H, Berz A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Dernell JE (2001): Molekulare Zellbiologie, Spektrum Akademischer Verlag, S. 2331-2334.

Lezoualc`h F, Sagara Y, Holsboer F, Behl C (1998): High constitutive NF-kappaB activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells. J Neurosci 18:3224-3232.

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.

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

Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D (1997): MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. Nature 385, 540-544.

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.

Mattson MP, Furukawa K (1996): Programmed cell life: Anti-apoptotic signaling and therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. Restor Neurol Neurosci 9:191-205.

Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K (1997): Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress- induced apoptosis: Evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxinitrite production and protein tyrosine nitration. J Neurosci Res 49:681-697.

Mattson MP, Lindvall O (1997): Neurotrophic factor and cytokine signaling in the aging brain. Advances in Cell Aging and Gerontology, Vol. 2: The Aging Brain (Mattson MP, Geddes JW, eds), JAI Press, Greenwich, Conneticut, pp 299-345.

Mattson MP (2000): Apoptosis in neurodegenerative disorders. Nat Rev Mol Cell Biol 1:120-129.

Mattson MP (2000a): Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. Cell Tissue Res (2000) 301:173-187.

Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S (2000b): Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. J Neurochem 74:443-456.

Mattson MP, Duan W, Pedersen WA, Culmsee C (2001): Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. Apoptosis 6:69-81.

Meberg PJ, Kinney WR, Valcourt EG, Routtenberg A (1996): Gene expression of the transcription factor NF-kappaB in hippocampus: Regulation bei synaptic activity. Brain Res Mol Brain Res 38:179-190.

Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D (2003): NF-kappaB functions in synaptic signaling and behavior. Nat. Neurosci 6 (10):1072-8.

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

Mink S, Haenig B, Klempnauer KH (1997): Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPß. Mol Cell Biol 17: 6609-6617.

Millet I, Phillips RJ, Sherwin RS, Gosh S, Voll RE, Flavell RA, Vignery A, Rincon M (2000): Inhibition of NF-kappaB activity and enhancement of apoptosis by the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. J Biol Chem 275:15114-15121.

Morrison RS, Wenzel HJ, Kinoshita Y, Robbins CA, Donehower LA und Schwartzkroin PA (1996): Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. J Neurosci 16, 1337-1345.

Mukhopadhyay T, Roth JA, Maxwell SA (1996): Induction of p53 DNA-binding activity by tumor-necrosis-factor-alpha. Int J Oncol 9: 715-720.

Mumenthaler und Mattle (2002): Grundkurs Neurologie. Thieme Verlag S.98-138.

Muraoka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Shitara N, Chong JM, Iwama T, Miyaki M (1996): P300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. Oncogene 1996 Apr 4;12(7):1565-9.

Murphy PJ, Galigniana MD, Morishima Y, Harrell JM, Kwok RP, Ljungman M, Pratt WB (2004): Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. J Biol Chem 2004 Jul 16;279(29):30195-201.

Nakano K, Vousden KH (2001): PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell 7:683-694.

Napieralski JA, Raghupathi R, Macintosh TK (1999): The tumor-suppressor gene p53 is induced in injured brain regions following experimental traumatic brain injury. Brain Res Mol Brain Res 71:78-86.

Nicotera P, Leist M, Manzo L (1999): Neuronal cell death: A demise with different shapes. Trends Pharmacol Sci 20:46-51.

Newcomb-Fernandez JK, Zhao X, Pike BR, Wang KK, Kampfl A, Beer R, DeFord SM, Nicotera P, Ankarcrona M, Bonfoco E, Orrenius S, Lipton SA (1997): Neuronal necrosis and apoptosis: Two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. Adv Neurol 72:95-101.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000): Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science 288:1053-1058.

Ohlsson C, Kley N, Werner H, LeRoith D (1998): P53 regulates insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor expression and IGF-1-induced tyrosine phosphorylation in an ostesarcoma cell line: Interaction between p53 and SP 1. Endocrinology 139:1101-1107.

Ohata K, Nakayama K, Kurokawa T, Kikuchi T, Yoshimura N (2002): Inhibitory effects of Pyrrolidine Dithiocarbamate on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. Investigate Ophtalmology & Visual Science 43: 744-750.

Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ (1989): Tumor necrosis factor-_ and interleukin-1 stimulate the human immunodeficieny virus enhancer by activation of the nuclear factor kappaB. Proc Natl Acad Sci USA 86:2336-2340.

Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, Nabel GJ (1997): Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. Science 275: 523-527.

Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ (1995): Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. Nature. 1995 Jul 27; 376(6538):348-51.

Post A, Holsboer F, Behl C (1998): Induction of NF-kappaB activity during haloperidol-induced oxidative toxicity in clonal hippocampal cells: Suppression of NF-kappaB and neuroprotection by antioxidants. J Neurosci 18:8236-8246.

Prives C, Hall PA (1999): The p53 pathway. J Pathol 187: 112-126.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov G, Gabai VL (2003): Necrosis: A specific form of programmed cell death? Academic Press, Experimental Cell Research 283: 1-16.

Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Klumpp S, Krieglstein J (2001): Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. J Neurochem 78:909-919.

Ravi R, Mookerjee B, van Hensbergen Y, Bedi GC, Giordano A, El-Deiry WS, Fuchs EJ, Bedi A (1998): P53-mediated repression of nuclear factor-kappaB RelA via the transcriptional integrator p300. Cancer Res 58:4531-4536.

Reed JC (1998): Bcl-2 family proteins. Oncogene 17: 3225-3236.

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

Rogel A, Popliker M, Webb CG, Oren M (1985): P53 cellular tumor antigen: Analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos and tumors. Mol Cell Biol 1985 Oct;5(10):2851-5.

Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM (1983): Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific rna processing. Nature 304, 129-135.

Russo P, Catassi A, Malacarne D, Margaritora S, Cesario A, Festi L, Mule A, Ferri L, Granone P (2005): Tumor necrosis factor enhances SN38-mediated apoptosis in mesothelioma cells. Cancer. 2005 Feb 7

Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH (2000): Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. Nature 404:892-897.

Sadoul R, Quiquerez AL, Martinou I, Fernandez PA, Martinou JC (1996): P53 Protein in sympathetic neurons: Cytoplasmic localization and no apparent function in apoptosis. J Neurosci 43: 594-601.

Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E (1998): DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. Genes Dev 1998 Sep 15;12(18):2831-41.

Sakhi S, Bruce A, Sun N, Tocco G, Baudry M, Schreiber SS (1997): Induction of tumor suppressor p53 and DNA fragmentation in organotypic hippocampal cultures following excitotoxin treatment. Exp Neurol 145, 81-88.

Salminen A, Liu PK, Hsu CY (1995): Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic brain. Biochem Biophys Res Commun 212:939-944.

Schaper C, Zhu Y, Kouklei M, Culmsee C, Krieglstein J (2000): Stimulation of 5-HT(1A) receptors reduces apoptosis after transient forebrain ischemia in the rat. Brain Res 883:41-50.

Schäfer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B (2003): Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. FASEB J 17, 660-667.

Schneider A, Martin Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaniger M (1999): NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. Nat Med 5:554-559.

Sheikh MS, Fornace AJ (2000): Role of p53 family members in apoptosis. J Cell Physiol 182:171-181.

Shukla S, Maclennan GT, Marengo SR, Resnick MI, Gupta S (2005): Constitutive activation of PI3K-Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model. Prostate 2005 Feb 14.

Simpson CS, Morris BJ (1999): Activation of nuclear factor kappaB by nitric oxide in rat striatal neurones: Differential inhibition of the p50 and p65 subunits by dexamethasone . J Neurochem 73:353-361.

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994): The TNF-receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation and death. Cell 76, 959-962.

Snyder G, Prewitt R, Campsen J, Britt LD (2002): PDTC amd Mg 132, inhibitors of NF-kappaB, block endotoxin induced vasodilatation of isolated rat skeletal muscle arterioles. Shock 17 Nr 4 304-307.

Sobulo OM, Borrow J, Tomek R, Reshmi S, Harden A, Schlegelberger B, Housman D, Doggett NA, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ (1997): MLL is fused to CBP, a histone acetyltransferase, in therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11; 16)(q23; p13.3). Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Aug 5; 94(16):8732-7.

Somasundaram K, El- Deiry WS (1997): Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP-interacting region. Oncogene 14:1047-1057.

Statistisches Bundesamt (2003): Pressemitteilung

Statistisches Bundesamt (2005): Telefonische Auskunft über die Pathologien F.00 bis F.03 nach ICD-10.

Stein B, Baldwin SA, Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P (1993): Cross-coupling of the NF-kappaB p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. EMBO J 12:3879-3891.

Stein B, Cogswell PC, Baldwin AS (1993): Functional and physical associations between NF-kappaB and C/EBP family members: A Rel domain-bZIP interaction. Moll Cell Biol 13: 3964-3974.

Sun Y, Sun Y, Wenger L, Rutter JL, Brinckerhoff CE, Cheung HS (1999): P53 down regulates human matrix metalloproteinase-1 (Collagenase-1) gene expression. J Biol Chem 274:11535-11540.

Takimoto CH, Kieffer LV, Kieffer ME, Arbuck SG, Wright J (1999): DNA topoisomerase I poison. Cancer Chemother Biol Response Modif 18:81-124.

Tamagno E, Parola M, Guglielmoto M, Santoro G, Bardini P, Marra L, Tabaton M, Danni O (2003): Multiple signaling events in amyloid _-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. Free Radical Biology & Medicine 35:45-58.

Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA (2002): P53 mutant mice that display early aging-associated phenotypes. Nature 415, 45-53.

Uberti D, Belloni M, Grilli M, Spano P und Memorandum M (1998): Induction of tumour-suppressor phosphoprotein p53 in the apoptosis of cultured rat cerebellar neurones triggered by excitatory amino acids. Eur J.Neurosci 10, 246-254.

Uberti D, Grilli M, Memo M (2000): Contribution of NF-kappaB and p53 in the glutamate-induced apoptosis. Int J Dev Neurosci 18:447-454.

Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR (1998): Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappaB. Trends Cell Biol 8: 107-111.

Vollmar B, El-Gibaly AM, Scheuer C, Strik MW, Bruch HP, Menger MD (2002): Acceleration of cutaneous wound healing by transient p53 inhibition. Lab Invest 82(8):1063-1071.

Vousden KH (2000): P53: Death star. Cell 103:691-694.

Wadgaonkar R, Phelps KM, Haque Z, Williams AJ, Silvermann ES, Collins T (1999): CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling. J Biol Chem 274: 1879-1882.

Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. (1996): TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF-kappaB. Science. 1996 Nov 1; 274(5288):784-7.

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin Jr AS (1998): NF-kappaB antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science 281:1680-1683.

Webster GA, Perkins ND (1999): Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. Moll Cell Biol 19:3485-3495.

Wellmann H, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2001): Retrograde transport of transcription factor NF-kappaB in living neurons. J Biol Chem 276:11821-11829.

Welsh FA, Sakamoto T, McKee AE, Sims RE (1987): Effect of lactatacidosis on pyridine nucleotide stability during ischemia in mouse brain. J Neurochem 49:841-856.

Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV (1997): IkappaB kinase-beta: NF-kB activation and complex formation with IkB kinase-a and NIK. Science 278, 866-869.

Westphal CH, Hoyes KP, Canman CE, Huang X, Kastan MB, Hendry JH, Leder P (1998): Loss of atm radiosensitizes multiple p53 null tissues. Cancer Res 1998 Dec 15; 58(24):5637-9.

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

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR (1980): Cell Death: The significance of apoptosis. Int Rec Cytol 68, 251-306.

Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS (1998): Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. J Neuroscience 18:1363-1373.

Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ (1999): Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. Mol Cell Biol 19:8469-8478.

Yu Z, Zhou D, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP (1999): Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. J Neurosci 19:8856-8865.

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

Zhang M, Liu W, Ding D, Salvi R. (2003): Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. Neuroscience 2003; 120(1):191-205.

Zhong HH, Voll RE, Gosh S (1998): Phosphorylation of NF-kappaB p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. Moll Cell 1:661-671.

Zhu Y, Culmsee C, Semkova I, Krieglstein J (1998): Stimulation of ß$_2$-adrenoceptors inhibits apoptosis in rat brain after transient forebrain ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 18:1032-1039.

Zhu Y, Prehn JH, Culmsee C, Krieglstein J (1999): The beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol modulates Bcl-2, Bcl-xl and Bax protein expression following transient forebrain ischemia. Neuroscience 90:1255-1263.

Zhu Y, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J (2004): Neuroprotection by transforming growth factor-beta1 involves activation of nuclear factor kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1,2 signaling pathways. Neuroscience 2004; 123(4):897-906.

Zhu X, Yu QS, Cutler R, Culmsee C, Holloway HW, Mattson MP, Greig NH (2002): Design and synthesis of novel p53 inhibitors as neuroprotective agents. J Med Chem 45:5090-5097.

Lebenslauf

Name:	Jan Norbert Siewe
Geburtsdatum:	12.09.1977
Geburtsort:	Siegen
Wohnort:	Hagen
Familienstand:	ledig
Eltern:	Franz Bernhard Siewe
	Ingeborg Margarete Siewe, geb. Entrup

Schulischer Werdegang

1984 – 1988	Grundschule Neunkirchen
1988 – 1997	Gymnasium Neunkichen

Wehrdienst

1997 - 1998	Standortsanitätszentrum Rennerod

Hochschulausbildung

April 1998 – November 2004	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg.
März 2000	Ärztliche Vorprüfung
März 2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2003 – September 2004	Praktisches Jahr Philipps-Universität Marburg und Regionalspital Lachen, Schweiz; Wahlfach: Anästhesie
November 2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit April 2005	Assistenzarzt Unfallchirurgie, Ev. Krankenhaus Hagen-Haspe

Publikationsliste

Orginalarbeiten

Culmsee C, Siewe J, Junker V, Retiounskaia M, Schwarz S, Camandola S, El-Metainy S, Behnke H, Mattson MP, Krieglstein J (2003) Reciprocal inhibition of p53 and NF-kappaB transcriptional activities determines cell survival or death in neurons. J Neurosci 23(24):8586-8595.

Buchkapitel

Culmsee C, Siewe J, Junker V, Zhou DH, Greig N, Mattson MP, Krieglstein J (2003): Neuroprotection by p53 antagonists. In: Krieglstein J, Klumpp S. (eds) Pharmacology of Cerebral Ischemia 2002, medpharm Scientific Publishers Stuttgart.

Vorträge/Poster

Culmsee C, Siewe J, Junker V, Mattson MP, Krieglstein J (2002): Mechanisms of neuroprotection by p53 inhibitors. International Conference "Cellular Signaling in Neuroprotection and Plasticity", Magdeburg, September 26-28, 2002. RNNEEL 20:68 (Vortrag und Poster).

Culmsee C, Siewe J, Junker V, Mattson MP, Krieglstein J (2002): Inhibition of NF-kappaB activity is involved in p53 mediated neuron death. 9 th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg, July 21-24, 2002 (Vortrag und Poster).

Culmsee C, Siewe J, Junker V, Mattson MP, Krieglstein J (2002): Neuroprotective effects of the p53 inhibitor pifithrin-_ (PFT) and new PFT- derivates. Arch Pharm Pharm Med Chem 335 (Suppl 1):V:P2 (Vortrag).

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren an der Universität Marburg:

Prof. Arnold

Prof. Aumüller

Prof. Austermann

Prof. Back

Prof. Barth

Prof. Basler

Prof. Baum

Prof. Bertalanffy

Prof. Cetin

Prof. Czubayko

Prof. Daut

Prof. Eilers

Prof. Göke

Prof. Geus

Prof. Grzeschik

Prof. Griss

Prof. Gotzen

Prof. Gudermann

Prof. Happle

Prof. Hasillik

Prof. Hellinger

Prof. Hoffmann

Prof. Junclas

Prof. Kienapfel

Prof. Kern

Prof. Klenk

Prof. Klose

Prof. Koolman

Prof. Krieg

Prof. Kroh

Prof. Kroll

Prof. Lammel

Prof. Lang

Prof. Lange

Prof. Lill

Prof. Lohoff

Prof. Maisch

Prof. Moll

Prof. Moosdorf

Prof. Mutters

Prof. Müller

Prof. Neubauer

Prof. Oertel

Prof. Renz

Prof. Remschmidt

Prof. Rosenow

Prof. Rothmund

Prof. Schachtschabel

Prof. Schäfer

Prof. Schmidt

Prof. Seitz

Prof. Steiniger

Prof. Vogelmeier

Prof. Weihe

Prof. Werner

Prof. Wulf

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Josef Krieglstein danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und seine stets freundliche Motivation. Ganz besonders möchte ich ihm für die Bereitstellung von hervorragenden wissenschaftlichen Arbeitsbedingungen danken, die es mir möglich gemacht haben, trotz Doppelbelastung durch Studium und Laborarbeit sehr erfolgreich zu arbeiten.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Carsten Culmsee für seine Einführung in das naturwissenschaftliche Arbeiten, das kritische Durchsehen des Manuskriptes, seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Projekte und seine stetige Motivation. Ganz besonders möchte ich ihm für die menschliche und angenehme Atmosphäre während der Zusammenarbeit mit ihm danken.

Herzlich danken möchte ich allen Freunden und Kollegen am Institut für die überaus gute Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt hier Herrn Dr. Norbert Gerling für seine Hilfe in den entscheidenden Momenten. Auch bedanken möchte ich mich bei Frau Sandra Engel und bei Frau Michaela Stumpf für die hervorragende Unterstützung beim Anlegen der Zellkulturen und bei allen technischen Herausforderungen. Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Frau Emma Esser, Frau Julia Michaelis und Frau Bärbel Wilhelm richten, die mir stets in allen administrativen und organisatorischen Dingen zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Annika für ihre Geduld und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und meinem Bruder Ralf für seine kreativen Impulse.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen lieben Eltern bedanken. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung sowohl in menschlicher als auch finanzieller Hinsicht wäre die Absolvierung meines Studiums und die Arbeit an dieser Dissertation niemals möglich gewesen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel
„Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF-kappaB im neuronalen Zelltod“
im Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein, mit Unterstützung durch PD Dr. C. Culmsee, ohne sonstige Hilfe selbständig durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem anderen in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- „Pharmacology of Cerebral Ischemia 2002” (medpharm Scientific Publishers Stuttgart).

- International Conference “Cellular Signaling in Neuroprotection and Plasticity”, Magdeburg, September 26-28, 2002. RNNEEL 20:68.

- 9 th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg, July 21-24, 2002.

- Arch Pharm Pharm Med Chem 335 (Suppl 1):V:P2.

- Journal of Neuroscience 23(24):8586-8595.

Jan Siewe