

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE BEDEUTUNG VON STRESS-AKTIVIERTEN
PROTEINKINASEN (SAPK) NACH 6-HYDROXYDOPAMIN-
INDUZIERTER APOPTOSE IN SH-SY5Y-ZELLEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
FABIAN MICHAEL LINDNER
aus
Neumünster

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Herdegen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ottmar Janßen
Tag der mündlichen Prüfung: 05.08.2010
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.08.2010
gezeichnet Prof. Dr. Peter Gohlke

Meinen Großeltern

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 SH-SY5Y-Zellen - ein neurobiologisches Zellsystem.....	1
1.2 Apoptose und ihre Bedeutung.....	1
1.3 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)	2
1.3.1 Chemie	2
1.3.2 Wirkung von 6-Hydroxydopamin auf Zellen in vivo und in vitro	3
1.4 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	3
1.4.1 Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK)	4
1.4.1.1 c-Jun N-terminale Kinase (JNK).....	4
1.4.1.2 p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK)	6
1.5 Inhibitoren der MAP-Kinasen	7
1.5.1 SP600125.....	7
1.5.2 SB203580.....	7
1.6 Zielsetzung der Arbeit	8
2 MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	9
2.2 Zentrifugen und Sterilisation	10
2.3 Kultivierung, Differenzierung, Stimulation und Färbung von SH-SY5Y-Zellen.....	10
2.3.1 Standardzellkultur.....	10
2.3.1.1 Kulturbedingungen	10
2.3.1.2 Passage der SH-SY5Y-Zellen	11
2.3.1.3 Auftauen und Einfrieren der SH-SY5Y- Zellen	12
2.3.2 Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen	13
2.3.3 Stimulation von SH-SY5Y-Zellen	13
2.3.4 Trypanblau Vitalfärbung	13

2.4 Herstellung von Gesamtzelllysaten	14
2.4.2 Bestimmung des Proteingehalts von Gesamtzellextrakten.....	14
2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	15
2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	15
2.5.2 Western Blot.....	17
2.5.3 Strippen von Western-Blot-Membranen	21
2.5.4 Ponceau S-Färbung von Western-Blot-Membranen.....	22
2.6 Statistische Auswertung	22
3 ERGEBNISSE	23
3.1 Zelltod nach 24 h und 48 h	23
3.1.1 Naive Zellen	23
3.1.2 Differenzierte Zellen	24
3.2. Aktivierung von JNK und p38	24
3.2.1 Beobachtung über 4, 6 und 8 h nach 25 µM 6-OHDA	25
3.2.2 Beobachtung über 24 und 48 h nach 25 µM 6-OHDA	26
3.3 JNK- und p38 Inhibition durch SP600125 bzw. SB203580	26
3.3.1 JNK-Inhibition durch SP600125	27
3.3.1.1 Naive Zellen.....	27
3.3.1.2 Differenzierte Zellen.....	28
3.3.2 p38-Inhibition durch SB203580	29
3.3.2.1 Naive Zellen.....	29
3.3.2.2 Differenzierte Zellen.....	30
4 DISKUSSION	31
4.1 Zelltod von SH-SY5Y Zellen nach 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)	32
4.2 Verstärkter Zelltod in differenzierten SH-SY5Y Zellen	32
4.3 Aktivierung von JNK und p38 nach 6-OHDA in SH-SY5Y Zellen	33

4.4 Die Rolle von JNKs und p38 beim 6-OHDA-vermittelten Zelltod	34
5 ZUSAMMENFASSUNG	35
6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	38
7 LITERATURVERZEICHNIS	39
DANKSAGUNG	47
CURRICULUM VITAE	48

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
DDW	Doppelt destilliertes Wasser
DLB	Denaturierender Lyse-Puffer („Buffer“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced chemoluminescence
ERK	Extrazellulär regulierte Kinasen
FCS	Fetales Kälberserum
HRP	Horseradish Peroxidase
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinasen
MAPKKK	MAPKK-Kinasen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCD	Programmed cell-death
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris buffered saline
TTBS	Tween-Tris buffered saline
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 EINLEITUNG

1.1 SH-SY5Y-Zellen - ein neurobiologisches Zellsystem

SH-SY5Y ist eine klonale Sublinie der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH, die 1970 aus dem Knochenmarkbiopsiematerial eines 4-jährigen Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom gewonnen wurde (Biedler et al. 1973, Jalava et al. 1990).

Die epithel- und neuronähnlichen Zellen sind adhärent und wachsen einschichtig in Zellverbänden ohne völlige Konfluenz. Ihre Verdopplungszeit beträgt >55 Stunden und sie besitzen einen diploiden Karyotyp mit 1,8 % Polyploidie. Sie produzieren Dopamin und exprimieren Dopaminrezeptoren (Biedler et al. 1978, Decker et al. 1993). Die Zellen sind ein etabliertes Modell für dopaminerge Zellen bei der Untersuchung verschiedener neuronaler Krankheiten (Cassarino et al. 1997, Gomez-Santos et al. 2002, Tiffany-Castiglioni et al. 1982). Werden die Zellen mit Retinsäure behandelt, in diesem Fall über einen Zeitraum von 5 Tagen mit 5 μ M, bilden sie Ausläufer und haben dadurch einen neuronartigen Phänotyp (Encinas et al. 2000). SH-SY5Y-Zellen exprimieren JNK1 und JNK2.

1.2 Apoptose und ihre Bedeutung

Im Körper des Menschen finden ständig Prozesse statt, die ein kontrolliertes Absterben von Zellen notwendig machen. Dieser als Apoptose, physiologischer oder programmierter Zelltod (programmed cell-death, PCD), bezeichnete Vorgang wird genetisch kontrolliert und ist durch biochemische und morphologische Charakteristika gekennzeichnet (Kerr et al. 1972). Hierzu zählen im Wesentlichen Zellschrumpfung, Kern- bzw. DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation, Vesikelbildung („membrane blebbing“) und die Bildung von apoptotischen Körperchen („apoptotic bodies“). Da es hierbei zu keiner Freisetzung intrazellulärer Bestandteile nach außen und anschließender Aufnahme durch phagozytierende Zellen kommt, wird im Gegensatz zur Nekrose, dem sogenannten pathologischen Zelltod, keine Entzündungsreaktion ausgelöst. Apoptose findet sich u.a. als Antwort auf zellulären Stress (z.B. UV-Strahlung), bei der embryonalen Entwicklung von Fingern (das Gewebe zwischen den Fingern geht unter), bei immunologischen

Prozessen (z.B. Toleranzentwicklung, Eliminierung infizierter Zellen) und der Homöostase bestimmter Gewebe (z.B. der Haut). Gerät dieses Gleichgewicht aus Zellproliferation und Zelluntergang außer Kontrolle, kann es je nach Verschiebung zur Entstehung von Tumoren oder Autoimmunerkrankungen im Falle verminderter Apoptose (Brown und Attardi 2005), bzw. AIDS und Neurodegenerativen Erkrankungen bei gesteigerter Apoptose kommen (Thompson 1995, Alenzi 2005). Aus diesem Grund ist das Verständnis der unterschiedlichen Signalkaskaden, die zur Apoptose führen, von großer Bedeutung und ermöglicht die Entwicklung gezielter Therapieansätze zur Krankheitsbekämpfung (Fischer und Schulze-Osthoff 2005).

1.3 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)

1.3.1 Chemie

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) ist ein Analogon des Dopamins, das an Position 6 seines Sechsrings statt des Wasserstoffs eine Hydroxylgruppe hat (Abb. 1). Da es beim physiologischen pH-Wert von ca. 7,4 instabil ist, zerfällt es in sein entsprechendes para-Chinon und gibt dabei ein Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$) ab, das zu H_2O_2 weiterreagiert.

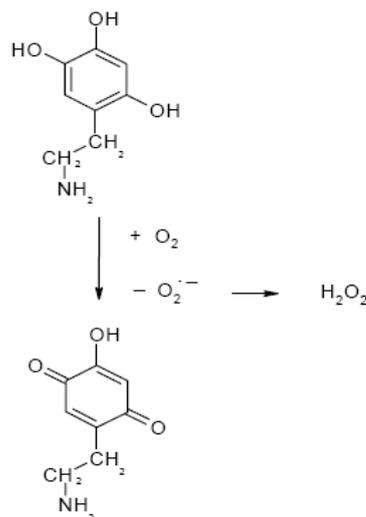


Abb. 1: Reaktion von 6-Hydroxydopamin in sein Chinon unter Abgabe reaktiver Sauerstoffverbindungen

Sowohl das entstehende Superoxidradikal als auch H_2O_2 sind als reaktive Sauerstoffverbindungen in hohem Maße toxisch für jede Zelle, indem sie die Zelle direkt abtöten oder Apoptose induzieren.

1.3.2 Wirkung von 6-Hydroxydopamin auf Zellen in vivo und in vitro

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) wird nur von Neuronen oder neuronähnlichen Zellen aufgenommen, welche die Neurotransmitter Noradrenalin und Dopamin ausschütten. Von entscheidender Bedeutung für den Effekt des 6-OHDA auf Zellen ist das Wechselspiel zwischen reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Apoptose. Neben der Induktion von Apoptose durch Sauerstoffmetabolite und oxidativen Stress (Buttke und Sandstrom, 1994) dienen die Sauerstoffmetabolite in gesunden Zellen auch als Signalmoleküle (Kane et al. 1993; Greenlund et al. 1995). Sie erhöhen die intrazelluläre Glutathion-Konzentration (Kane et al. 1993; Ferrari et al. 1995) sowie die Expression der Enzyme Glutathion-Peroxidase (Hockenberry et al. 1993), Superoxid-Dismutase (Kane et al. 1993; Greenlund et al. 1995) und Catalase (Sandstrom & Buttke 1993). Diese Enzyme senken die Konzentration der Sauerstoffradikale und hemmen die Apoptose. Die proapoptotische Wirkung von 6-OHDA auf Neuroblastomzellen wurde bereits 1970 von Angeletti und Levi-Montalcini in neugeborenen (Angeletti et al. 1970a) und adulten (Angeletti et al. 1970b) Nagetieren nachgewiesen, der therapeutische Einsatz dieses Effektes konnte allerdings nicht überzeugen (Kushner et al. 1991).

1.4 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) gehören zur Gruppe der Serin-/Threonin-Proteinkinasen und sind ein wichtiger Bestandteil verschiedener Signalwege der Zelle (Robinson und Cobb, 1997). Sie werden durch Phosphorylierung von MAP-Kinasen-Kinasen (auch MAPKK oder MAP2K genannt) aktiviert, die ihrerseits durch MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MAPKKK, MAP3K) phosphoryliert werden. Die MAPK-Signalkaskade (Abb. 2) wird durch physiologische und pathophysiologische Stimuli mittels G-Proteinen oder Rezeptor-assoziierten Proteinen in Gang gesetzt (Herdegen et al. 1997). Die MAPKs selbst können sowohl zytoplasmatische Substrate als auch Transkriptionsfaktoren phosphorylieren (Kyriakis und Avruch

2001). Grundsätzlich werden 3 Signalwege unterschieden, die jedoch auf verschiedenen Ebenen interagieren können (Schaeffer und Weber 1999): extrazellulär signal-regulierte Kinasen (ERK 1 und 2), c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK). Gegenstand dieser Arbeit sind JNK und p38, die auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) bekannt sind.

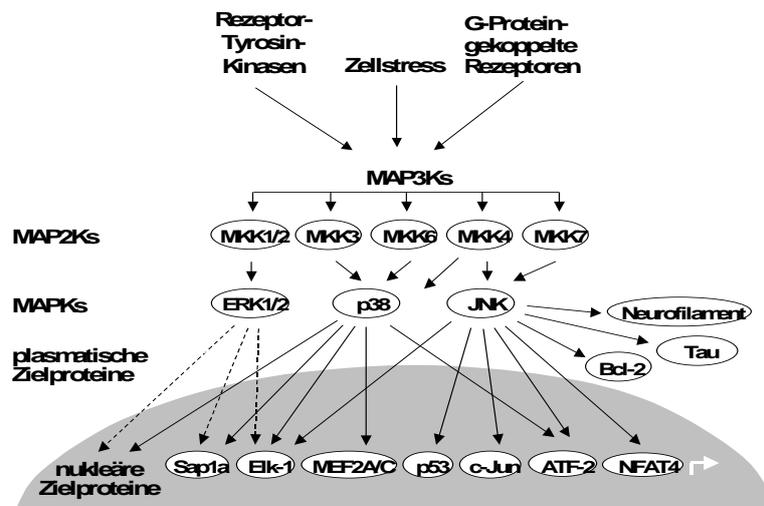


Abb. 2: Signaltransduktionswege der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

1.4.1 Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK)

1.4.1.1 c-Jun N-terminale Kinase (JNK)

Die MAPK-Familie der JNKs umfasst die ubiquitär vorkommenden Isoformen JNK1 und JNK2 sowie JNK3, welches vor allem im Gehirn, dem Herzen und den Hoden gebildet wird (Herdegen et al. 1999, Kyriakis und Avruch 2001). Durch alternatives Spleißen am C-terminalen Ende entstehen 4 (JNK1 und JNK2) bzw. 2 (JNK3) Isoformen mit einem Molekulargewicht von 46 kDa oder 54 kDa (Gupta et al. 1996). Modifizierte Domänen an Position 9 und 10 sind für die beiden zusätzlichen Isoformen von JNK1 und JNK2 verantwortlich (Kyriakis et al. 1994). Die JNKs sind zu 88-90 % homolog (Carletti et al. 1995), ihre Aktivierung erfolgt kooperativ durch die MAP2Ks MKK4 und MKK7 am Tyrosin- bzw. Threonin-Rest. Ihnen vorgeschaltet

können verschiedene MAP3Ks am Anfang der Signalkaskade stehen. MKK4 phosphoryliert bevorzugt an der Aminosäure Tyrosin und MKK7 am Threonin. Sie werden durch Serin- und Tyrosin-Phosphatasen oder spezifische MAPK-Phosphatasen inaktiviert (Manning und Davis 2003). JNKs spielen eine wichtige Rolle sowohl für physiologische als auch pathophysiologische Vorgänge in der Zelle. Erstmals 1993 durch Hibi et al. als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) beschrieben, sind sie vor allem untersucht worden im Zusammenhang mit zellulärem Stress und Apoptose, ausgelöst beispielsweise durch UV-Strahlung, Hitzeschock (Ip und Davis 1998), ionisierende Strahlung, DNA-schädigende Substanzen und Chemotherapeutika, Zytokine sowie Wachstumsfaktoren (Kharbanda et al. 1995; Deng et al. 2001). JNKs sind außerdem an verschiedenen Krankheiten wie Diabetes mellitus, Rheumatoider Arthritis, Atherosklerose, Schlaganfall, Morbus Alzheimer und Parkinson beteiligt (Waetzig und Herdegen 2006). Darüber hinaus sind die einzelnen JNKs aber auch in eine Reihe von wichtigen physiologischen Vorgängen involviert und zeigen auch antiapoptotische Eigenschaften (Waetzig et al. 2006). So ist JNK1 für eine intakte Zytoarchitektur des Gehirns erforderlich (Chang et al. 2003), JNK2 für die Aktivierung von Immunzellen (Yang et al. 1998) und die JNK3-p54 Isoform steigert die Proliferation und Neuritenbildung in PC12 Zellen, einer Zelllinie aus Ratten (Waetzig und Herdegen 2003). Vermittelt werden diese teilweise gegensätzlichen Effekte durch die Phosphorylierung einer Vielzahl von cytoplasmatischen Substraten wie IRS-1 (Insulin Rezeptor Substrat 1), MAP2A (Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2A) und Bcl-2 oder die Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF2 und Elk1. Je nach Isoform zeigen die JNKs unterschiedliche Bindungsaffinität zu ihren Substraten, so dass z.B. JNK1 25-fach stärker an c-Jun bindet als JNK2 (Kallunki et al. 1994). Von entscheidender Bedeutung für die Art und Intensität des Signals sind die Scaffold-Proteine, vor allem die JNK-Interaktions-Proteine (JIPs), welche die MAP3Ks, die beiden MAP2Ks MKK4 und MKK7 und die JNKs in räumliche Nähe zueinander bringen und auf diese Weise unterschiedlich arrangierte Komplexe bilden. Diese sogenannten Signalosomen geben letztendlich die verschiedenen intra- und extrazellulären Reize stimulus-, kompartiment- und zellspezifisch weiter (Morrison and Davis 2003). Durch Hemmung spezifischer Signalosomdomänen könnte die Möglichkeit entstehen, selektiv unerwünschte pathophysiologische Effekte der JNK Isoformen zu unterdrücken, ohne die elementaren zellbiologischen Signaltransduktionswege mit ihren Nebenwirkungen zu

beeinflussen, wie es zwangsläufig bei genereller Inhibition der JNK Isoformen bzw. MAPKs geschieht (Herdegen et al. 1997). Erste positive Ergebnisse wurden bereits 1998 mit CEP-1347 erzielt. Das Molekül hemmte den Untergang von Neuronen in Tierversuchen durch Blockierung bestimmter JNK-vermittelter Signalwege (Maroney et al. 1998). Eine Kurzzeitstudie an Patienten belegte zwar die Sicherheit in der Anwendung (Parkinson Study Group 2004), aktuelle Langzeitergebnisse zeigten jedoch keinen Nutzen in der Behandlung von Parkinson im Frühstadium (Parkinson Study Group PRECEPT Investigators 2007).

1.4.1.2 p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK)

Bei den p38-MAPKs werden mindestens 4 Isoformen unterschieden: p38 α -MAPK, p38 β -MAPK, p38 γ -MAPK und p38 δ -MAPK. Sie werden durch vielfältige Stimuli, wie z.B. die Entzündungszytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor α (TNF α), Lipopolysaccharide, verschiedene andere Stressoren wie UV-Strahlung (Keyse 1995), oxidativen Stress und Hyperosmolarität (Häussinger et al. 1999, Shapiro et al. 1995) aber auch den koloniestimulierenden Wachstumsfaktor 1 (colony-stimulating factor 1, CSF-1) (Foltz et al. 1997) aktiviert (Raingeaud et al. 1995, Jiang et al. 1996). Phosphoryliert werden die p38-Kinasen von den MAP2Ks MKK3 und MKK6, die ihrerseits durch eine Vielzahl von MAP3Ks phosphoryliert werden können. Trotz der grundsätzlich voneinander unabhängigen Signalmodule geschieht dies durch Interaktionen im Allgemeinen parallel zu den JNKs (Mendelson et al. 1996). Die Aktivierungsintensität bei der anschließenden Phosphorylierung von cytoplasmatischen Substraten oder Transkriptionsfaktoren hängt wie bei den JNKs entscheidend von den Scaffold Proteinen ab. Je nach Stimulus und zellulärem Kontext kommt es zu teils gegensätzlichen Effekten, da ihre Aktivierung in Zellen sowohl anti- (Park et al. 2002) als auch proapoptotisch (Xia et al. 1995) wirken kann. 1994 wiesen Lee et al. die wichtige Bedeutung der p38-MAPKs bei Entzündungsreaktionen nach, weil ihre Hemmung zu einer verminderten Expression von TNF α und IL-1 β führte. Der therapeutische Nutzen dieser Erkenntnis bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen wie Morbus Crohn oder der Rheumatoiden Arthritis ist Gegenstand zahlreicher Studien (Nishikawa et al. 2007, Arslan et al. 2006, Kaminska 2005). Erhöhte Aktivität von p38-MAPKs findet sich auch bei der Parkinson- und Alzheimer-Krankheit (Johnson und Bailey, 2003). Darüber hinaus

konnte in jüngerer Vergangenheit gezeigt werden, dass p38-MAPKs eine wichtige Rolle bei der Entstehung von malignen Tumoren im Sinne eines Tumorsuppressors spielen, da ihre Inhibition oder Mutation zu einer vermehrten Proliferation führen kann (Brancho et al. 2003, Hui et al. 2007). Sie haben weiterhin Bedeutung bei der Embryogenese (Allen et al. 2000).

1.5 Inhibitoren der MAP-Kinasen

1.5.1 SP600125

SP600125 (Abb. 3) ist ein Inhibitor der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK). Durch Bindung an die ATP-bindende Domäne hemmt es kompetitiv und reversibel JNK1, JNK2 und JNK3 ($IC_{50} = 40-90$ nM). Die hier verwendeten Konzentrationen von 1-2 μ M zeigten keine Interaktionen mit ERK2 oder p38 (Bennett et al. 2001).

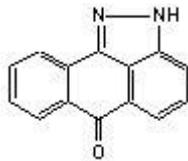


Abb. 3: SP600125 (Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-1)

1.5.2 SB203580

SB203580 (Abb.4) ist ein hochselektiver und zellpermeabler p38-MAPK-Inhibitor, der durch kompetitive Bindung an die ATP-Bindungsstelle spezifisch die katalytische Aktivität der p38-MAP-Kinase hemmt (Lee et al. 1999). Durch eine Dosierung von 1 μ M konnten die für höhere Konzentrationen beschriebenen Effekte auf die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) sowie die Inhibition der JNK vermieden werden (Davies et al. 2000).

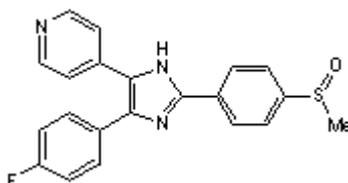


Abb. 4: SB203580 (4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-1H-imidazol-4-yl]pyridin)

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die Beantwortung folgender Fragen:

1. Führt 6-OHDA zum Tod von SH-SY5Y Zellen?
2. Besteht ein Unterschied zwischen naiven und differenzierten SH-SY5Y Zellen hinsichtlich des durch 6-OHDA induzierten Zelltods?
3. Welche SAPK werden durch 6-OHDA aktiviert?
4. Welche SAPK sind am Zelltod durch 6-OHDA beteiligt?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Tabelle 1 enthält eine Übersicht der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien. Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad *pro analysi* (p.a.).

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma, München
6-OH Dopamin	Sigma, München
Acrylamid/ bis-acrylamid Lösung 37,5:1	Bio-Rad, München
All-trans Retinsäure	Sigma, München
Aminhexansäure	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Bromophenolblau	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dye Reagent	Biorad, München
ECL Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
Ethanol (vergiftet)	Bundesmonopol für Branntwein (BfB), Offenbach
Eukobrom	Tetenal, Norderstedt
Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
Foetales Kälberserum (FCS)	Bio Whittaker; Verviers, Belgien
Glycin	Merck, Darmstadt
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Immobilon P 1500	Millipore, Eschborn
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kryotubes (2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Magermilchpulver	Uelzena Milchwerke, Uelzen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natrium dodecyl sulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
PBS (w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 IU / 10.000 µg/ml)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, München
Pipetten (steril; 5 / 10 / 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 / 200 / 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Ponceau S	Sigma, München
Proteinmarker, prestained, broad range	New England Biolabs, Frankfurt
Reaktionsgefäß (0,5 / 1,5 / 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß, steril (15 / 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
SP 600125	Alexis, Grünberg
SB 203580	Calbiochem, Schwalbach
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, München
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Calbiochem, Schwalbach
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus	NEN, Zaventem, Belgien
Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm)	Nunc, Karlsruhe
Zellschaber	Nunc, Karlsruhe

2.2 Zentrifugen und Sterilisation

Folgende Zentrifugen wurden verwendet: Biofuge fresco, Labofuge GL, Megafuge 1.0 R (alle von Heraeus, Osterode) und Mikrofuge (Neolab, Heidelberg). Die Mikrofuge erbrachte eine relative Zentrifugationsgeschwindigkeit (RCG) von maximal $2000 \times g$. Die Labofuge GL und Megafuge 1.0 R zeigten die RCG automatisch an. Die RCG der Biofuge fresco (maximaler Radius r_{\max} : 73 mm) wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\times g = 1.118 \times r_{\max} [\text{mm}] \times (\text{rpm}/1.000)^2$$

Gleichung 1: Berechnung der relativen Zentrifugationsgeschwindigkeit

Alle Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden autoklaviert (134 °C, 2,2 bar, 20 min).

Die Lösungen für die Zellkultur wurden entweder steril gekauft oder in einem DS 202 Autoklaven (Webeco, Bad Schwartau) bei 120 °C und 2,0 bar für 30 Minuten autoklaviert. Soweit nicht anders angegeben, wurde zur Herstellung von Puffern und Lösungen bidestilliertes Wasser verwendet, das mit der Anlage Seradest RO-25 compact/ Seralpur Pro90CN (Seral, Ransbach-Baumbach) hergestellt wurde. Es wird im Folgenden als „Aqua bidest.“ bezeichnet.

Die verwendeten Puffer und Lösungen werden bei den jeweiligen Methoden aufgeführt; in Klammern gesetzte Lösungen mit dem Kürzel „St.“ bezeichnen die entsprechenden Stammlösungen.

2.3 Kultivierung, Differenzierung, Stimulation und Färbung von SH-SY5Y- Zellen

2.3.1 Standardzellkultur

2.3.1.1 Kulturbedingungen

Alle Arbeitsschritte in der Zellkultur wurden in der Sterilbank (HERASafe, Heraeus, Osterode) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen wurden vor der Benutzung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (Hera cell, Heraeus, Osterode) und mit einem inversen Olympus CK 2 Mikroskop untersucht (Olympus, Hamburg).

Zur Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen wurden Kulturschalen aus Kunststoff (Nunc; Wiesbaden) mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet, in welche 7 ml Nährmedium (Tab. 2) gegeben wurden. Alle zwei bis drei Tage wurde das Nährmedium gewechselt.

Um unter reproduzierbaren Kulturbedingungen zu arbeiten, wurden nur Zellen von Passage 1 bis 20 verwendet.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Nährmediums

Inhaltsstoff	Konzentration/ Menge
foetales Kälberserum (FCS)	10 %
Penicillin/Streptomycin- Lösung in RPMI 1640 mit Glutamax	1 %

Unter der Sterilbank angesetzt, bei 4 °C gelagert.

Das FCS wurde vor Gebrauch durch dreißig-minütige Inkubation im Wasserbad bei 56 °C hitzeinaktiviert, anschließend aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

2.3.1.2 Passage der SH-SY5Y-Zellen

Tabelle 3: Zusammensetzung der Stammlösung von 10 x PBS für Zellpassagen

Inhaltsstoff	Konzentration/ Menge
NaCl	1,37 M
KCl	0,03 M
Na ₂ HPO ₃	0,07 M
KH ₂ PO ₃	0,02 M

Autoklaviert, bei 4 °C gelagert.

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, wurden sie neu ausgesät. Zunächst wurde das Nährmedium mit Hilfe einer Vakuumpumpe (KNF Miniport, Omnilab, Bremen) abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS (Verdünnung der Stammlösung (Tab. 3) mit sterilem DDW im Verhältnis 1:10) gewaschen. Um die Zellen vom Schalenboden zu lösen, wurde die Kulturschale mit 2 ml Trypsin für 2

Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Medium zugegeben und die entstandene Zellsuspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 1000 rpm (Labofuge GL, Heraeus, Osterode) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 5 ml Medium und einer zweiten Resuspension wurden 500 µl-Aliquots der Zellsuspension in neue Kulturschalen mit vorgelegtem Nährmedium gegeben, die Zellen im Verhältnis 1:14 neu ausgesät.

2.3.1.3 Auftauen und Einfrieren der SH-SY5Y- Zellen

Tabelle 4: Einfriermedium für die SH- SY5Y- Zellen

Inhaltsstoff	Konzentration/ Menge
Komplettmedium	80 %
FCS	10 %
DMSO	10 %

Frisch unter der Sterilbank angesetzt und nur kurz bei Raumtemperatur unter der Sterilbank gelagert.

Zu Beginn der Zellkultivierung wurde die Zellsuspension, die bei –80 °C gelagert worden war, rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen wurden in der Sterilbank in eine Kulturschale mit vorgelegtem Nährmedium überführt und diese anschließend im Brutschrank kultiviert. Nach spätestens 24 Stunden wurde das Nährmedium gewechselt.

Um einen Vorrat an SH-SY5Y-Zellen anzulegen, wurden die Zellen gemäß dem Protokoll für die Zellpassage von der Kulturschale gelöst und pelletiert. Anschließend wurde das Pellet je nach Zellzahl in 2 ml bis 3 ml Einfriermedium (Tab. 4) sorgfältig resuspendiert und 1 ml-Aliquots in Kryogefäße (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Die Gefäße wurden zunächst für 10 Minuten bei Raumtemperatur und dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Einfrieren wurde in mehreren Stufen durchgeführt: nach 45 Minuten bei –20 °C wurden die Zellen für einige Tage bei –80 °C inkubiert und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.2 Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen wurden mit 5 μM Retinsäure differenziert. Dazu wurden die Zellen ab einer Konfluenz von 70 % für 5 Tage mit 5 μM Retinsäure behandelt. Die Zellen bildeten Ausläufer und hatten dadurch einen neuronartigen Phänotyp.

2.3.3 Stimulation von SH-SY5Y-Zellen

Als Stimuli wurde 6-OHDA in den Konzentrationen 25 μM und 50 μM verwendet. Es wurde zum Nährmedium in die Kulturschalen pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Sollten die JNKs gehemmt werden, wurden die jeweiligen Kulturschalen vor der Applikation des Stressstimulus für 30 Minuten mit SP600125 (1 μM) im Brutschrank vorinkubiert. Das gleiche Procedere wurde mit SB203580 (1 μM) durchgeführt, wenn p38 gehemmt werden sollte.

Die stimulierten Zellen wurden bis zur weiteren Bearbeitung im Brutschrank inkubiert, dabei betrug die Dauer der Inkubation je nach Versuchsansatz 4 bis 48 Stunden.

2.3.4 Trypanblau Vitalfärbung

Zur Bestimmung der Zellzahl überlebender Zellen eignete sich Trypanblau, da intakte Zellen das Eindringen des Farbstoffes für kurze Zeit verhindern können. Hingegen diffundiert Trypanblau rasch in den Intrazellularraum derjenigen Zellen, deren Membranintegrität gestört ist, so dass diese umgehend die Blaufärbung der Umgebung annehmen.

24 oder 48 Stunden nach Applikation der Stressoren (Kap. 2.3.3) wurden die stimulierten Zellen sowie eine Platte unbehandelter Kontrollzellen gemäß dem Protokoll für die Zellpassage von den Kulturschalen gelöst und pelletiert (Kap. 2.3.1). Zum Resuspendieren wurden hier 500 μl bis 1000 μl PBS verwendet. 20 μl der entstandenen Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 20 μl Trypanblau (0,4 %) überführt und die beiden Lösungen mit Hilfe einer Pipette vermischt. Das Gemisch wurde in eine Zählkammer (Neubauer, Marienfeld) gegeben, um zügig die Zahl der lebenden Zellen in den 16 Quadraten beider Kammern zu bestimmen. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt.

2.4 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Zur Analyse der Expression und Aktivität der untersuchten Proteine wurden Gesamtzelllysate hergestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des 2-fach *denaturing lysis buffer* (DLB) für Gesamtzelllysate

Inhaltsstoff	Konzentration/ Menge
SDS	2 %
Tris (pH 7,4)	20 mM
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	1 %

Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine 1:2 Verdünnung des DLB-Puffers (Tab. 5) mit Ultra Pure Water hergestellt und 1 % Phosphatase Inhibitor Cocktail zugesetzt.

Zunächst wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 800 µl PBS in die Schale pipettiert und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt, Nümbrecht) vom Plattenboden gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge, National Labnet, Woodbridge, NJ, USA). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet je nach Volumen in 50 µl bis 100 µl Lysispuffer vollständig resuspendiert und die Probe für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock (Thermomixer 543, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 2 x 5 Impulsen eines Ultraschallstabs (GM 70 Sonicator, Bandelin, Berlin) lysiert. Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode) wurde der Überstand mit den Proteinen in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach kurzer Inkubation in flüssigem Stickstoff bei –80 °C eingefroren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde pro Probe ein 2 µl-Aliquot bei 4 °C zwischengelagert.

2.4.2 Bestimmung des Proteingehalts von Gesamtzellextrakten

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Gesamtzelllysate wurde *Dye Reagent* (BioRad, München) in einer Verdünnung von 1:5 mit Aqua bidest. verwendet. Dieser Farbstoff ist eine Variante des *Bradford's colorimetric assay*, welcher auf dem Wechsel des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm beruht, sobald der Farbstoff an Proteine bindet (saure Lösung von Coomassie-

Brilliant-Blau G-250). Der Versuch wurde in Einmalküvetten aus Kunststoff durchgeführt. Außerdem wurde eine Standardreihe mit BSA-Lösung eingesetzt, die folgende Werte umfasste: 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml.

Um Proteinkonzentrationen in der Größenordnung der Standardreihe zu erhalten, wurden zunächst die Gesamtzelllysate im Verhältnis 1:50 mit Aqua bidest verdünnt. Jeweils 20 µl der Proteinlösungen wurden in eine Küvette pipettiert und mit 1 ml der Färbelösung versetzt. Die Lösungen wurden mit Hilfe eines Vortex vermischt, um die Reaktion zu starten und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ihre Extinktion bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ in einem Spektrophotometer (U-2000, Hitachi, Wiesbaden) gemessen.

Die Proteinkonzentration der Probe $[K(P)]$ wurde aus der Extinktion der Probe $[E(P)]$ und der des Standards $[E(S)]$ sowie der Proteinkonzentration des Standards $[K(S)]$ nach der Lambert-Eaton-Gleichung berechnet:

$$K(P) = [E(P) \times K(S)] / E(S)$$

Gleichung 2: Berechnung der Proteinkonzentration $K(P)$

2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) beruht auf der Tatsache, dass Proteine nach der Behandlung mit SDS denaturiert sind und proportional zu ihrem Molekulargewicht negative Ladung tragen. Deshalb können sie im molekularen Sieb eines Polyacrylamidgels nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Zur Herstellung der Gele wurden Acrylamidmonomere mit Bis-acrylamid als Verbindungsglieder co-polymerisiert. Ammoniumpersulfat (APS) katalysierte die Reaktion, mit N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin (TEMED) wurde sie gestartet. Die Auftrennung der SDS-behandelten Proteine fand in zwei miteinander verbundenen Gelabschnitten statt (Tab. 6), die unterschiedliche Zusammensetzungen und Funktionen hatten: Im Sammelgel wurden die Proteine zunächst zu Banden komprimiert und anschließend im ca. 6 cm breiten Trenngel nach ihrem

Molekulargewicht aufgetrennt. Die verwendeten Gele hatten stets eine Dicke von 0,75 mm, der Acrylamidanteil der Trenngele betrug 12 %.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Inhaltsstoffe ¹	Trenngel aufgefüllt auf 10 ml	Sammelgel aufgefüllt auf 6 ml
Acrylamid ²	4 ml	0,6 ml
4 × Trenngelpuffer ³	2,5 ml	-
4 × Sammelgelpuffer ⁴	-	1,5 ml
Autoklaviertes DDW	3,4 ml	3,9 ml
10 % APS ⁵	100 µl	60 µl
Bromophenolblau	-	5 µl
TEMED	10 µl	6 µl

¹) alle Inhaltsstoffe aufgefüllt auf 10 ml für das Trenngel bzw. 6 ml für das Sammelgel (entspricht einem Gel);

²) Acrylamid/bis-acrylamid Lösung (37,5:1, z. B. 30 % Acrylamid und 0.8 % Bis-acrylamid; gelagert bei 4 °C);

³) 4 × Trenngelpuffer: 1,5 M Tris (pH auf 8,8 mit HCl), 0,4 % SDS;

⁴) 4 × Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris (pH auf 6,8 mit HCl), 0,4 % SDS;

⁵) 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in DDW, gelagert bei 4 °C im Dunkeln

Die Glasplatten für das Gelkammersystem *MiniProtean3 Vertical PAGE chamber* (Bio-Rad; München) wurden mit Aqua bidest. und 70 % Ethanol gereinigt, zusammengesetzt und vertikal in einer Halterung fixiert. Dann wurden die beiden Gelabschnitte nacheinander hergestellt. Die Gelmischungen (Tab. 6) wurden in je einem 15 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und nach Zugabe des TEMED mit Hilfe einer 10 ml-Kunststoffpipette (Eppendorf, Hamburg) rasch zwischen die Glasplatten gegeben. Um einen horizontalen Übergang zwischen Sammel- und Trenngel zu erreichen, wurde das Trenngel während seiner Auspolymerisation mit einigen Tropfen DDW überschichtet. Ungefähr 30 Minuten später wurde die DDW-Schicht wieder entfernt, TEMED zum vorbereiteten Sammelgel-Ansatz gegeben, dieser vorsichtig über das ausgehärtete Trenngel pipettiert, ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt und die Auspolymerisation abgewartet.

In der Zwischenzeit wurden die Proteinproben so mit autoklaviertem DDW verdünnt, dass im Endvolumen (10 µl, 20 µl oder 40 µl je nach Proteinkonzentrationen der Proben) stets eine Gesamtmenge von 20 µg Protein enthalten war. Dann wurde 5 × Probenbuffer (*sample buffer*, Tab. 7) im Verhältnis 1:5 zugegeben und die Proben für

5 Minuten bei 95 °C im Heizblock inkubiert (Thermomixer 543, Eppendorf, Hamburg). Nach abgeschlossener Denaturierung im *sample buffer* wurden die Proben bis zur Beladung des Gels bei 4 °C zwischengelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung des sample buffers für SDS- Gelelektrophoresen

Inhaltsstoffe	Menge/ Konzentration
Tris (pH auf 6,8 mit HCl)	312,5 mM
SDS	10 %
2- Mercapto- Ethanol	10 %
Glycerol	50 %
Bromphenolblau	einige Kristalle

Bei 4 °C gelagert.

Tabelle 8: Zusammensetzung des 10 x Elektrophoresepuffers (Stammlösung)

Inhaltsstoffe	Menge/ Konzentration
Tris (pH auf 8,3 mit HCl)	0,25 M
Glycin	2 M
SDS	0,03 M

Bei Raumtemperatur gelagert.

Nach vollständiger Polymerisation der Gelmatrize wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und diese mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt [1:10 Verdünnung der 10 × Stammlösung (Tab. 8) mit Aqua bidest.]. Der Kamm wurde aus dem Sammelgel genommen und verbliebene Gelreste sorgfältig mit Hilfe einer Pipette aus den puffergefüllten Geltaschen entfernt. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen gegeben. 5 µl des Größenmarkers *Broad range prestained protein marker* (New England Biolabs, Frankfurt) wurde in eine separate Geltasche pipettiert, um im nachfolgenden Western Blot (Kap 2.5.2) das Molekulargewicht der jeweiligen Banden ablesen zu können. Die Proben durchliefen das Sammelgel bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA pro Gel innerhalb von 30 Minuten (Power Supply 250 EX, Invitrogen/Gibco, Karlsruhe). Sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 30 mA pro Gel erhöht, was einer Spannung von ca. 150 V entsprach. Der Farbstoff hatte in der Regel nach 45

Minuten das Gel durchlaufen, danach wurde die Elektrophorese für weitere 30 Minuten fortgesetzt.

2.5.2 Western Blot

Bei Western-Blot-Experimenten werden Proteine von einem SDS-Page-Gel (Kap. 2.5.1) auf eine synthetische Membran übertragen. Dort können spezifische Proteine mit Hilfe von enzymgekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, wird diese zunächst in Trockenmilchpulver oder einer BSA-Lösung inkubiert und so die Proteinbindungskapazität der Membran abgesättigt. Anschließend werden die Zielproteine mit einem primären IgG-Antikörper der Spezies Kaninchen markiert und mit einem Sekundärantikörper detektiert, welcher entsprechend gegen Kaninchen-IgG gerichtet ist. An diesen Sekundärantikörper ist ein Enzym gebunden, z. B. *horseradish peroxidase* (HRP), das ein chemiluminisierendes Substrat umsetzt. Die Chemilumineszenz lässt sich anschließend auf hochsensitiven Filmen darstellen. Sie ist proportional zur Menge der an Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörper; die Bindungsrate der Primärantikörper ist wiederum proportional zur Menge der Zielproteine, die auf der Membran vorhanden ist.

Die Proteine wurden mit Hilfe einer *Semi dry-blot*-Apparatur (Pegasus, Phase, Lübeck) auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran (Immobilon™ P 1500, Millipore, Eschborn) transferiert. Es wurden folgende Puffer bei der Übertragung der Proteine verwendet (Tabelle 9):

Tabelle 9: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Western Blots

Puffer	Inhaltsstoffe	Menge/ Konzentration
Kathodenpuffer	Tris	25 nM
	Aminhexansäure	40 nM
	SDS	0,01 % (St.: 10 %)
	Methanol	20 %
Anodenpuffer 1	Tris	30 nM
	Methanol	20 %
Anodenpuffer 2	Tris	300 nM
	Methanol	20 %

Bei Raumtemperatur gelagert.

Nach Beendigung der SDS-Page (Kap. 2.5.1) wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für kurze Zeit im Kathodenpuffer zwischengelagert.

Pro Gel wurden fünfzehn Streifen Filterpapier und eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels (6 cm x 9 cm) zugeschnitten. Die Blotmembran wurde für 3 Minuten in 100 % Methanol aktiviert, das Methanol anschließend für 2 Minuten in Aqua bidest. ausgewaschen und die Membran bis zur Verwendung in Anodenpuffer 1 inkubiert. Die Filterpapierstreifen wurden mit Pufferlösung (Tab. 2.5.2.1) getränkt und nach folgendem Schema auf einer Plexiglasplatte gestapelt:

sechs Lagen Filterpapier (Anodenpuffer 2),
drei Lagen Filterpapier (Anodenpuffer 1),
aktivierte Blotmembran (Anodenpuffer 1),
Gel (Kathodenpuffer),
sechs Lagen Filterpapier (Kathodenpuffer).

Es wurde darauf geachtet, dass beim Stapeln keine Luftblasen zwischen den Schichten des Filterpapiers und vor allem zwischen Gel und Blotmembran entstehen. Außerdem wurde die Lage des Gels auf der Membran markiert. Danach wurde der Stapel so in die Blot-Apparatur eingesetzt, dass die mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapierschicht auf der Kathodenplatte zu liegen kam. Schließlich wurden die Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 65 Minuten geblottet. Anschließend wurde die Blot-Anordnung abgebaut und die Membran in einige Tropfen TTBS (Tabelle 2.5.2.2) überführt. Entsprechend der Markierungen wurden diejenigen Stellen der Membran mit einem Skalpell abgetrennt, an denen während des Blotvorgangs kein Kontakt zum Gel bestanden hatte. Dann wurde die Membran abhängig von ihrer Größe in eine Petrischale oder kleinere Plexiglasgefäße mit vorgelegtem TTBS gegeben. Alle folgenden Inkubationsschritte fanden auf einem Schüttler (Polymax 2040, Heidolph, Kehlheim) statt, folgende Lösungen wurden verwendet (Tabelle 10):

Tabelle 10: Zusammensetzung der Inkubationslösungen für geblottete PVDF- Membranen

Lösung	Inhaltsstoffe	Menge/ Konzentration	Lagerungs- bedingungen
10 x TBS (Stammlösung)	Tris/ HCl	1 M, pH 7,5	4 °C
1 x TTBS	NaCl	1,5 M	frisch angesetzt
	TBS	1:10 verdünnt	
	Tween- 20	0,1 %	
Blocking solution	Magermilchpulver in TTBS	4 g 100 ml	4 °C

Die Membran wurde für 20 Minuten in TTBS und 60 Minuten in *blocking solution* gewaschen, diese wieder entfernt und die Membran über Nacht mit einer Lösung des Primärantikörpers (Tab. 11) bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und ungebundene Antikörpermoleküle mittels fünfmaligen Waschens in TTBS (1 x 15 min, 4 x 5 min) entfernt. Es folgte die 30-minütige Inkubation mit dem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 11). Abschließend wurde der Blot einmal für 25 Minuten und weitere vier Mal für 5 Minuten mit TTBS gewaschen.

Tabelle 11: Primär- und Sekundärantikörper der Western Blots

pAb ¹ - Zielstruktur	Hersteller	pA Lösung und Puffer (M ² oder TBST)	sAb ³	sAb Puffer
p38	CST ⁴	1:1000 in TBST	α-rabbit	2% M
Phospho-p38	Promega ⁵	1:2500 in TBST	α-rabbit	4% M
Phospho-c-Jun (Ser ⁶³)	CST ⁴	1:1000 in TBST	α-rabbit	2% M
Phospho-JNK ⁶	Promega ⁵	1:2500 in 4 % M	α-rabbit	4% M
SAPK/JNK	CST ⁴	1:1000 in 3 % M	α-rabbit	2% M

¹) pAb, Primärantikörper.

²) M, Magermilchpulver (Uelzena, Uelzen) gelöst in TBST Puffer.

³) sAb, Sekundärantikörper. Sekundär-IgG-Antikörper – α-rabbit (NEB/CST) – immer mit *horse-radish-Peroxidase* gekoppelt und 1:2000 verdünnt.

⁴) CST, Frankfurt

⁵) Promega, Mannheim, Germany.

⁶) Wenn nicht anders gekennzeichnet, bezieht sich die Phosphorylierung immer auf das Motiv Thr-X-Tyr.

Während des Waschens der Blotmembran wurde das ECL-Reagenz (Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus, Amersham Biosciences, Freiburg) vorbereitet, welches das Substrat der an die Sekundärantikörper gebundenen Peroxidase darstellt. Für eine Membran der Standardgröße 6 cm x 9 cm wurden 0,975 ml der Lösung A mit 25 µl der Lösung B des *ECL Plus Reagent* gemischt. Alle folgenden Arbeitsschritte fanden in der Dunkelkammer statt.

Die gewaschene Blotmembran wurde mit der Proteinseite nach oben auf eine Frischhaltefolie überführt, überschüssiges TTBS entfernt und die Membran gleichmäßig mit der vorbereiteten ECL-Lösung benetzt. Nach einer Inkubation von 3 Minuten wurde das ECL sorgfältig abgenommen, die Membran in Folie eingeschlagen und in einer Filmkassette fixiert. Die Chemilumineszenzsignale wurden durch Exposition eines Hyperfilm™ ECL detektiert. Dabei variierte die jeweilige Dauer der Exposition. Die Filme wurden von Hand entwickelt (100 ml Eukobrom- Lösung auf 900 ml Wasser) und fixiert (500 g Natriumthiosulfat und 50 g Kaliumdisulfit auf 2 l Wasser).

2.5.3 Strippen von Western-Blot-Membranen

Das Strippen der Blotmembranen diente dazu, die Komplexe aus Primär- und Sekundärantikörpern von der Membran zu lösen, um eine Inkubation derselben Membran mit unterschiedlichen Primärantikörpern zu ermöglichen.

Tabelle 12: Zusammensetzung der stripping solution für Western Blot-Membranen

Inhaltsstoffe	Menge/ Konzentration
Tris/ HCl	0,06 M, pH 6,7
SDS	1,4 % (St. 10 %)
β- Mercaptoethanol	0,1 M, 1,4 %

Bei Raumtemperatur gelagert.

Die Membran wurde für 30 Minuten in *stripping solution* (Tab. 12) inkubiert [50 °C, auf einem Schüttler (Innova 4000, New Brunswick Scientific, Amsterdam, Niederlande)]. Anschließend wurde die *stripping solution* sorgfältig entfernt und die Membran zweimal für 10 Minuten in TTBS (Tab. 10) gewaschen. Nach 60-minütiger

Inkubation in *blocking solution* (Tab. 10) konnten die Proteine auf der Membran erneut mit einem Primärantikörper inkubiert werden (Kap. 2.5.2).

2.5.4 Ponceau S-Färbung von Western-Blot-Membranen

Ponceau S ist ein Farbstoff, mit dem man Proteine auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen anfärben kann. Da die Färbung transient ist und vollständig ausgewaschen werden kann, resultiert keine Beeinflussung der nachfolgenden Antigen-detektion. Ponceau S wurde benutzt, um die Übertragung der Proteine auf die Blotmembran nachzuweisen. Nach abgeschlossener ECL-Reaktion und Entwicklung des Western Blots (Kap. 2.5.2) wurde die Membran zweimal in TTBS (Tab. 10) gewaschen und dann für 20 Minuten mit Ponceau S gefärbt. Anschließend wurde die gefärbte Membran zweimal für 5 Minuten mit DDW gewaschen und dann luftgetrocknet.

2.6 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Analyse der Daten aus den Überlebensversuchen wurden zunächst die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen berechnet. Um zufällige Schwankungen von signifikanten Unterschieden zwischen der Kontrolle und den nach Stimulation gewonnenen Werten unterscheiden zu können, wurde der Anova-Test mit anschließender Bonferoni-Analyse durchgeführt. α -Fehler $p < 0,05$; 0,01; 0,001 wurde bei beiden Tests mit *, **, *** bzw. #, ##, ### bezeichnet.

3 ERGEBNISSE

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu sichern, wurden alle Experimente mindestens dreimal wiederholt. Alle Versuche wurden mit naiven und differenzierten SH-SY5Y-Zellen und 6-OHDA als Stressor durchgeführt.

3.1 Zelltod nach 24 h und 48 h

Mit Hilfe von Trypanblau-Assays wurde der Einfluss unterschiedlich hoher Konzentrationen von 6-OHDA auf das Überleben naiver sowie differenzierter SH-SY5Y-Zellen untersucht.

Die Zellen wurden entsprechend dem Protokoll 2.3.3 für 24 bzw. 48 Stunden mit 6-OHDA inkubiert. Anschließend wurde wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben die Anzahl der überlebenden Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich bereits nach 24 h eine signifikant niedrigere Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, welche nach 48 h weiter sank.

3.1.1 Naive Zellen

Eine Stimulation mit 25 μM 6-OHDA überlebten nach 24 Stunden 72 % und nach 48 Stunden 62 % der Zellen gegenüber der Kontrollgruppe, während es bei 50 μM nach 24 Stunden noch 41 % bzw. nach 48 Stunden 22 % waren (Abb. 5).

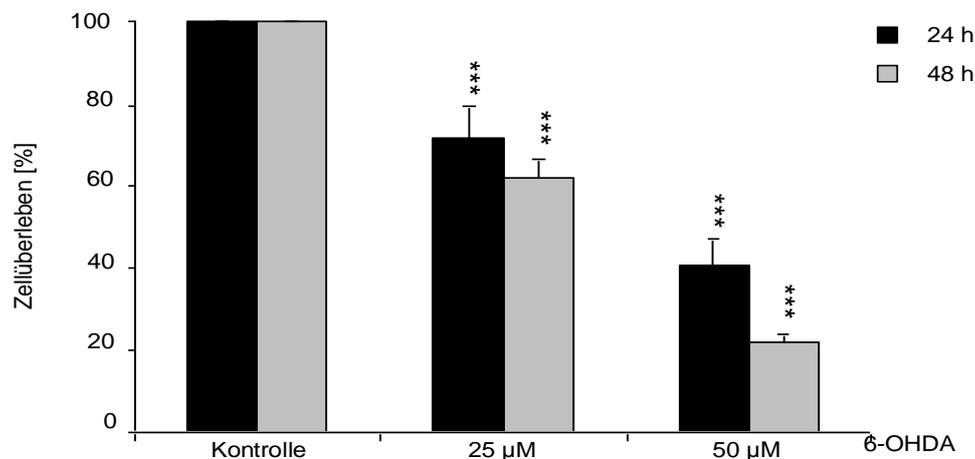


Abb. 5: Überleben naiver SH-SY5Y-Zellen nach 6-OHDA

Bestimmung der Zellzahl nach 24 und 48 h mittels Trypanblaufärbung; n=4; ***: p<0,001, verglichen mit unstimulierter Kontrolle.

3.1.2 Differenzierte Zellen

Die differenzierten Zellen reagierten insgesamt empfindlicher als die naiven. Bereits bei 25 μM 6-OHDA kam es nach 24 Stunden zu einem Rückgang der Zellzahl auf 58 % sowie 45 % nach 48 Stunden. Noch deutlicher war dies bei 50 μM . Hier überlebten lediglich 1,8 % der Zellen die ersten 24 Stunden, nach weiteren 24 Stunden wurden keine überlebenden Zellen mehr nachgewiesen (Abb. 6).

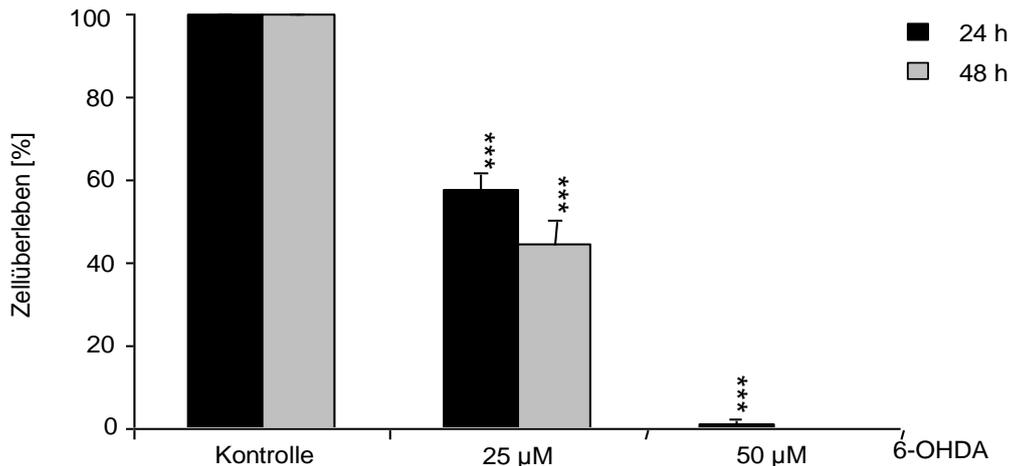


Abb. 6: Überleben differenzierter SH-SY5Y-Zellen nach 6-OHDA

Bestimmung der Zellzahl nach 24 und 48 h mittels Trypanblaufärbung; n=4; ***: $p < 0,001$, verglichen mit unstimulierter Kontrolle.

3.2. Aktivierung von JNK und p38

Da JNK und p38 durch viele Formen von zellulärem Stress aktiviert werden, wurde hier untersucht, ob die Stimulation mit 6-OHDA eine Zunahme der JNK- bzw. p38-Phosphorylierung hervorruft. Eine der Aufgaben aktivierter JNKs ist es, den induzierbaren Transkriptionsfaktor c-Jun zu phosphorylieren (pc-Jun). Die Untersuchung dieses Substrats in den Zellen erlaubt also Aussagen über die nukleäre Aktivität von JNKs. Die Untersuchungen wurden an Gesamtzelllysaten zur Analyse der JNKs und pJNKs, sowie von p38 und seiner phosphorylierten Form durchgeführt. Die Analysen wurden mit Hilfe von Western Blots durchgeführt. Die eingesetzten Antikörper für die phosphorylierte Form der JNK (pJNK) bzw. des unphosphorylierten Gesamt-JNKs (tJNK) detektierten alle Isoformen der JNK gleichermaßen. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurden die Western-Blot-Membran nach abgeschlossener ECL-Reaktion und Entwicklung mit Ponceau-S-Lösung gefärbt.

3.2.1 Beobachtung über 4, 6 und 8 h nach 25 μ M 6-OHDA

6-OHDA bewirkte bei den naiven Zellen bereits nach 4 Stunden eine starke Phosphorylierung der JNK, die sich bis zum 8-Stundenwert verstärkte. Zusätzlich zur 46-kDa-Bande wurde nach 8 Stunden die 54-kDa-Bande phosphoryliert, was bei den differenzierten Zellen schon nach 6 Stunden der Fall war.

Das pp38 zeigte bei naiven und differenzierten Zellen eine nahezu identische Kinetik: Bereits nach 4 Stunden war eine deutliche Phosphorylierung sichtbar, die sich nach 8 Stunden noch leicht verstärkte.

Analog dem pJNK war eine deutliche Zunahme von phosphoryliertem c-Jun nachweisbar, hierbei zeigten die naiven Zellen eine stärkere Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors. Eine deutliche Bande von pJNK zeigte sich nach 4 Stunden, während dies bei pc-Jun erst nach 6 Stunden der Fall war. Die Kontrolle wies in allen 3 Fällen nur sehr geringe Aktivität auf. Im Gegensatz hierzu war das Signal der JNK- und p38-Expression (tJNK und p38) zu jedem Zeitpunkt gleich und veränderte sich gegenüber der Kontrolle nicht (Abb. 7).

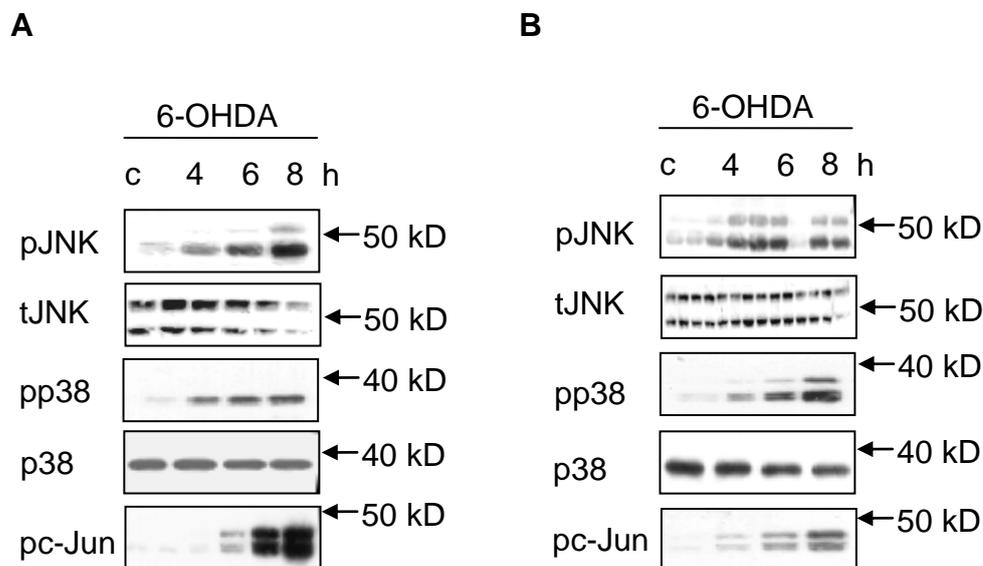


Abb. 7: Aktivierung von JNK, c-Jun und p38 in der Kurzzeit-Beobachtung

Bestimmung von JNK, c-Jun und p38 nach Stimulation mit 25 μ M 6-OHDA bei naiven (A) und differenzierten (B) Zellen. c: unstimulierte Kontrolle; Zahlen: Stunden nach Stimulation; pJNK: phosphoryliertes JNK; tJNK: total JNK; pp38: phosphoryliertes p38; pc-Jun: phosphoryliertes c-Jun; Pfeile: Molekulargewichtsmarker [kD]; Repräsentativ für n=4.

3.2.2 Beobachtung über 24 und 48 h nach 25 μ M 6-OHDA

Nach 24 und 48 h war JNK in naiven und differenzierten Zellen in etwa gleich stark phosphoryliert. Allerdings konnte bei den differenzierten Zellen keine signifikante Aktivierung von p38 nachgewiesen werden, während die naiven Zellen ein deutliches Signal zeigten. Wie auch über 4 bis 8 h war sowohl bei den naiven als auch bei den differenzierten Zellen eine deutliche Phosphorylierung von c-Jun zu erkennen, wobei auch hier die naiven Zellen ein stärkeres Signal zeigten. Die Expressionen von JNK und p38 blieb wie bei den naiven Zellen gleich.

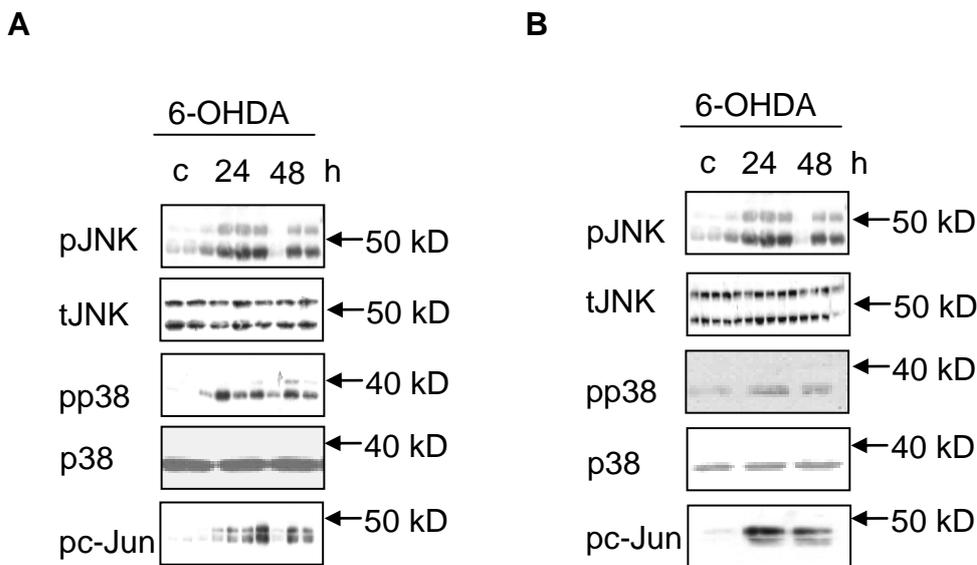


Abb. 8: Aktivierung von JNK, c-Jun und p38 in der Langzeit-Beobachtung

Bestimmung von JNK, c-Jun und p38 nach Stimulation mit 25 μ M 6-OHDA bei naiven (A) und differenzierten (B) Zellen. c: unstimulierte Kontrolle; Zahlen: Stunden nach Stimulation; pJNK: phosphoryliertes JNK; tJNK: total JNK; pp38: phosphoryliertes p38; pc-Jun: phosphoryliertes c-Jun; Pfeile: Molekulargewichtsmarker [kD]; Repräsentativ für n=4.

3.3 JNK- und p38 Inhibition durch SP600125 bzw. SB203580

Nachdem die Aktivierung der JNKs und von p38 durch den Stimulus 6-OHDA gezeigt worden war, sollte im Weiteren die Funktion beider Enzyme untersucht werden. Dazu wurde zum einen der direkte JNK-Inhibitor SP600125 verwendet, der an die ATP-bindende Domäne der Kinase bindet. Er inhibiert selektiv die JNKs und hat keinen Einfluss auf die Aktivität der anderen MAP-Kinasen (Bennett et al. 2001). Zum anderen SB203580, das durch kompetitive Bindung an die ATP-Bindungsstelle spezifisch die katalytische Aktivität der p38-MAP-Kinase hemmt (Lee et al. 1999).

Beide Inhibitoren wurden 30 Minuten vor Stimulation mit 6-OHDA in einer Konzentration von 1 μ M vorinkubiert. Im Falle von SP600125 wurde diese

Konzentration gewählt, weil es hierbei zu einer durch die JNK-Inhibition vermittelten Zellprotektion kommt. Dabei greift das SP600125 aber noch nicht, wie bei höheren Konzentrationen, in den Zellzyklus ein. Die Konzentration von 1 μM SB203580 hemmt spezifisch p38, nicht aber JNKs (Davies et al. 2000). Die folgenden Prozentangaben beziehen sich auf die unbehandelte Kontrollgruppe von 100 %.

3.3.1 JNK-Inhibition durch SP600125

3.3.1.1 Naive Zellen

Nach Stimulation mit 25 μM 6-OHDA zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Zellzahl auf 72 % bzw. 62 % gegenüber der Kontrolle. Bei den mit 1 μM SP600125 vorinkubierten Zellen überlebten 94 % nach 24 Stunden sowie 67 % nach 48 Stunden. Es zeigte sich somit nach 24 Stunden ein signifikantes Überleben gegenüber 6-OHDA, während nach 48 Stunden kein Unterschied zu den Zellen ohne Vorbehandlung mit SP600125 beobachtet werden konnte (Abb. 9). Alleinige Inkubation mit SP600125 ergab eine Zellzahl von 97 % nach 24 Stunden und 92 % nach 48 Stunden, zeigte also keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Bei einer Konzentration von 50 μM 6-OHDA schließlich kam es in beiden Fällen zu keinem signifikanten Schutz der zusätzlich mit SP600125 behandelten Zellen (24 h: 39 %, 48 h: 22 %) gegenüber den unbehandelten (24 h: 41 %, 48 h: 22 %).

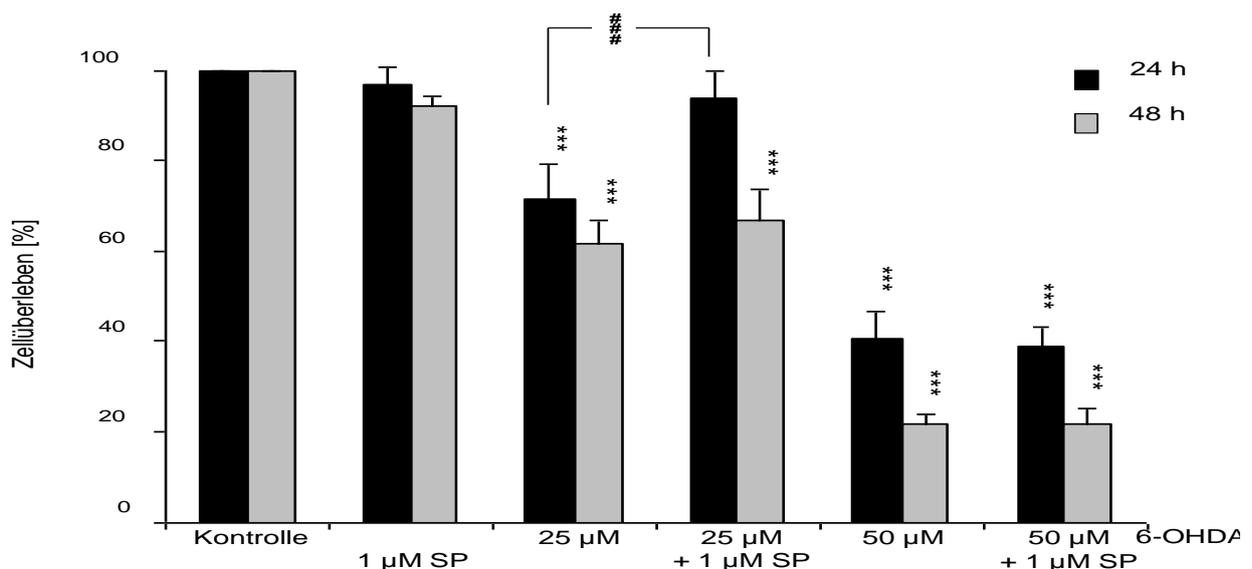


Abb. 9: Zahl naiver Zellen nach Hemmung von JNK

Bestimmung der Zellzahl 24 und 48 h nach 6-OHDA-Stimulation mittels Trypanblaufärbung; ***: $p < 0,001$, verglichen mit unstimulierter Kontrolle; ###: $p < 0,001$, verglichen mit nicht mit SP600125 vorbehandelten Zellen; $n=4$.

3.3.1.2 Differenzierte Zellen

Im Vergleich zu den naiven Zellen war die Protektion durch SP600125 von differenzierten Zellen im Konzentrationsbereich von 25 μM nach 24 Stunden schwächer, 74 % (6-OHDA + SP600125) gegenüber 58 % (nur 6-OHDA). Auch noch nach 48 Stunden zeigte sich ein signifikantes Überleben gegenüber den nicht mit SP600125 vorbehandelten Zellen, und zwar 55 % versus 45 % (Abb. 10). Bei einer Konzentration von 50 μM 6-OHDA zeigten sich wie bei den naiven Zellen keine signifikant höheren Überlebensraten bei mit SP600125 vorbehandelten Zellen. Nach 24 Stunden überlebten 1,8 % der allein mit 6-OHDA Zellen und 2,0 % der zusätzlich mit SP600125 vorinkubierten Zellen. Nach 48 Stunden wurden in beiden Fällen keine lebenden Zellen nachgewiesen. Diese Zahlen belegen, dass die differenzierten Zellen insgesamt und vor allem bei einer Konzentration von 50 μM 6-OHDA deutlich empfindlicher auf den Zellstress durch 6-OHDA reagieren als die naiven Zellen. Die nur mit SP600125 behandelten Zellen wiesen Werte von 101 % nach 24 Stunden bzw. 96 % nach 48 Stunden auf; der JNK-Inhibitor beeinträchtigte demnach nicht signifikant das Überleben der differenzierten Zellen.

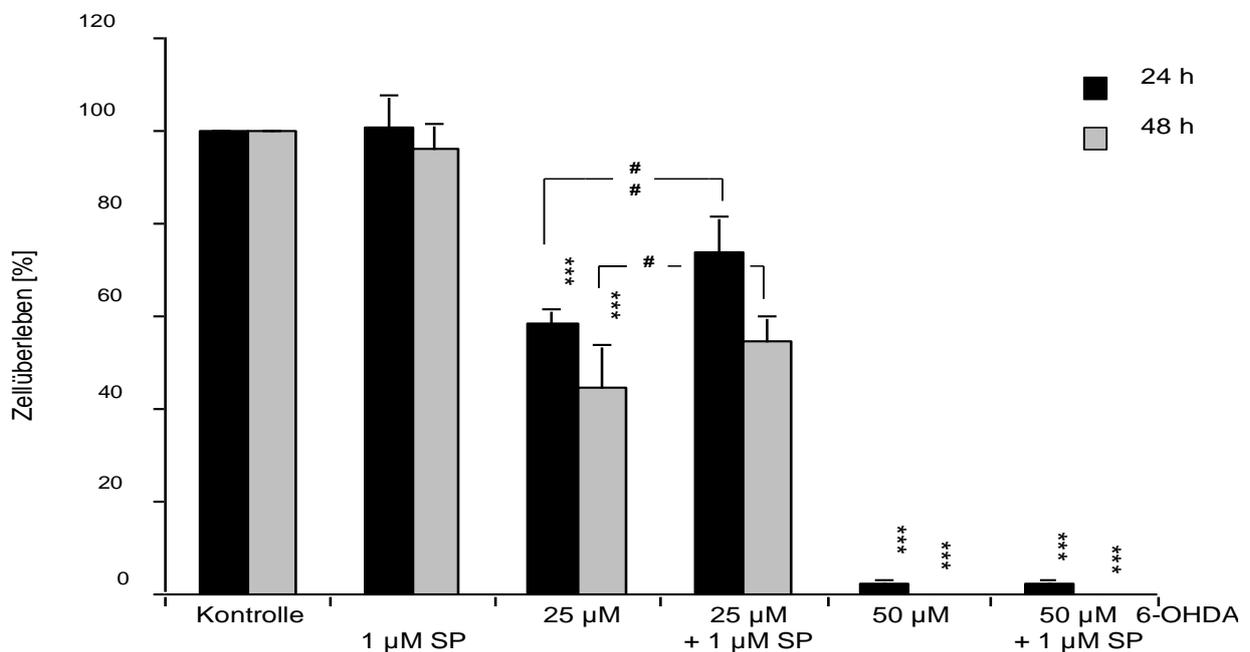


Abb. 10: Zahl differenzierter Zellen nach Hemmung von JNK

Bestimmung der Zellzahl 24 und 48 h nach 6-OHDA-Stimulation mittels Trypanblaufärbung; ***: $p < 0,001$, verglichen mit unstimulierter Kontrolle; ##: $p < 0,01$ / #: $p < 0,05$, verglichen mit nicht mit SP600125 vorbehandelten Zellen; $n=4$.

3.3.2 p38-Inhibition durch SB203580

3.3.2.1 Naive Zellen

Nach Stimulation mit 25 μM 6-OHDA zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Zellzahl auf 72 % nach 24 Stunden bzw. 62 % nach 48 Stunden gegenüber der Kontrolle. Bei den zusätzlich mit 1 μM SB203580 vorinkubierten Zellen überlebten 73 % bzw. 60 %. Es bestand somit für beide Zeiträume kein signifikanter Schutz gegenüber dem alleinigen Stimulus (Abb. 11). Auch bei einer Konzentration von 50 μM 6-OHDA kam es weder nach 24 noch nach 48 Stunden zu einem signifikanten Überleben der zusätzlich mit SB203580 behandelten Zellen (24 h: 43 %, 48 h: 19 %) gegenüber den unbehandelten (24 h: 41 %, 48 h: 22 %). Die ausschließlich mit SB203580 behandelten Zellen wiesen eine Zellzahl von 97 % nach 24 Stunden und 93 % nach 48 Stunden auf, zeigte also keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

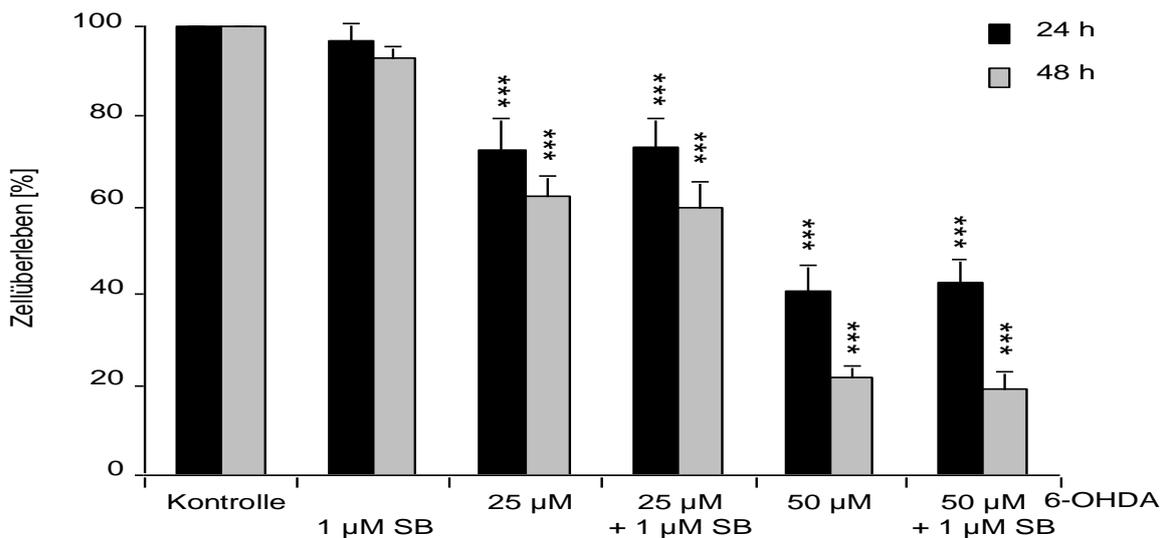


Abb. 11: Zahl naiver Zellen nach Hemmung von p38

Bestimmung der Zellzahl 24 und 48 h nach 6-OHDA-Stimulation mittels Trypanblaufärbung;
 ***: $p < 0,001$, verglichen mit unstimulierter Kontrolle; $n=4$.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Veränderungen bei naiven SH-SY5Y-Zellen

6-OHDA	25 µM		50 µM	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Zellzahl verglichen mit Kontrolle (100 %)	72 % ***	62 % ***	41 % ***	22 % ***
Schutz durch SP600125	94 % ###	67 % ***	39 % ***	22 % ***
Schutz durch SB203580	73 % ***	60 % ***	43 % ***	19 % ***
pJNK-Aktivierung	Beginn 4 h			
	Maximum 8 h			
	Dauer 48 h			
pc-Jun-Aktivierung	Beginn 6 h			
	Maximum 8 h			
	Dauer 48 h			
pp38-Aktivierung	Beginn 4 h			
	Maximum 8 h			
	Dauer 48 h			

***: $p < 0,001$, verglichen mit unstimulierter Kontrolle; ###: $p < 0,001$, verglichen mit unbehandelten Zellen.

3.3.2.2 Differenzierte Zellen

Auch bei den differenzierten Zellen konnte kein Schutzeffekt durch SB203580 festgestellt werden. Es zeigten sich wie bei den naiven Zellen Überlebensraten, die denen der nicht mit SB203580 behandelten Zellen gegenüber keinen nennenswerten Unterschied aufwiesen (Abb. 12). Für eine Konzentration von 25µM 6-OHDA bedeutete dies bei den nicht vorbehandelten Zellen 58 % (24h) bzw. 45 % (48 h) im Vergleich zu 62 % bzw. 48 % bei den vorbehandelten Zellen. Ähnliches galt auch für die 50 µM Konzentration. Während nach 24 Stunden noch 1,8 % der nur mit 6-OHDA stimulierten Zellen lebten sowie 2,0 % der zusätzlich mit SB203580 vorinkubierten, konnten nach 48 Stunden in beiden Zellreihen keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden. Wurden die Zellen nur mit SB203580 behandelt, hatten nach 24 Stunden 98 % und nach 48 Stunden 96 % der Zellen überlebt. SB203580 an sich beeinträchtigte somit wie auch SP600125 nicht signifikant das Überleben der differenzierten Zellen.

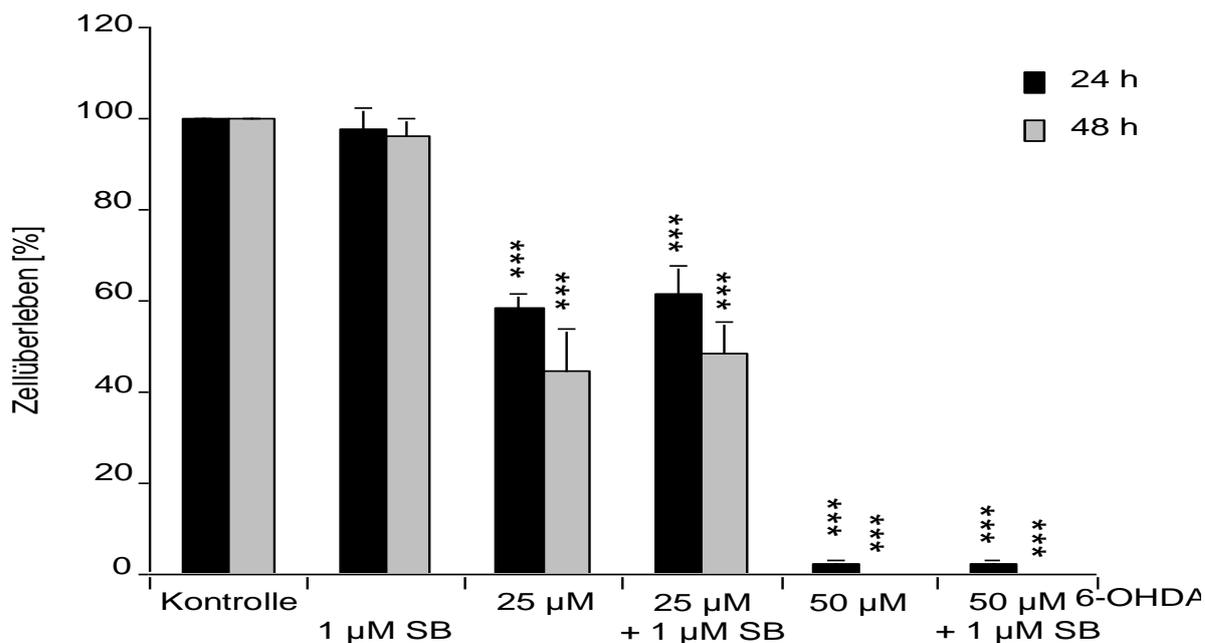


Abb. 12: Zahl differenzierter Zellen nach Hemmung von p38

Bestimmung der Zellzahl 24 und 48 h nach 6-OHDA-Stimulation mittels Trypanblaufärbung;
 ***: $p < 0,001$, verglichen mit unstimulierter Kontrolle; $n=4$.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Veränderungen bei differenzierten SH-SY5Y-Zellen

6-OHDA	25 µM		50 µM	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Zellzahl verglichen mit Kontrolle (100 %)	58 % ***	45 % ***	1,8 % ***	0 %
Schutz durch SP600125	74 % ##	55 % #	2 % ***	0 %
Schutz durch SB203580	62 % ***	48 % ***	2 % ***	0 %
pJNK-Aktivierung	Beginn 4 h			
	Maximum 8 h			
	Dauer 48 h			
pc-Jun-Aktiveringung	Beginn 6 h			
	Maximum 8 h			
	Dauer 48 h			
pp38-Aktivierung	Beginn 4 h			
	Maximum 8 h			
	Dauer ≥ 8 bis < 24 h			

***: $p < 0,001$, verglichen mit unstimulierter Kontrolle; ##: $p < 0,01$ / #: $p < 0,05$, verglichen mit unbehandelten Zellen.

4 DISKUSSION

Gegenstand dieser Arbeit ist die Beantwortung folgender Fragen:

1. Führt 6-OHDA zum Tod von SH-SY5Y Zellen?
2. Besteht ein Unterschied zwischen naiven und differenzierten SH-SY5Y Zellen hinsichtlich des durch 6-OHDA induzierten Zelltods?
3. Welche SAPK werden durch 6-OHDA aktiviert?
4. Welche SAPK sind am Zelltod durch 6-OHDA beteiligt?

4.1 Zelltod von SH-SY5Y Zellen nach 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)

Die proapoptotische Wirkung von 6-OHDA auf Neuroblastomzellen wurde bereits 1970 von Angeletti und Levi-Montalcini in neugeborenen (Angeletti et al. 1970a) und adulten (Angeletti et al. 1970b) Nagetieren nachgewiesen und durch eine Vielzahl von weiteren Experimenten bestätigt (von Coelln et al. 2001; Jiang et al. 2004; Tian et al. 2007; Nakaso und Nakashima 2008). Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigten ebenfalls, dass die Stimulierung mit 6-OHDA zu einem signifikanten Absterben der SH-SY5Y-Zellen führt. Für die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von 25 und 50 μM 6-OHDA ergab sich sowohl nach 24 als auch nach 48 h ein signifikantes Absterben der naiven und differenzierten Zellen.

Von Coelln et al. verwendeten 2001 für ihre Versuche mit naiven SH-SY5Y Zellen Konzentrationen von 10, 20 und 40 μM 6-OHDA und einen Inkubationszeitraum von 12 Stunden. 20 und 40 μM 6-OHDA führten dabei zu einem signifikanten Absterben der Zellen, während in anderen Arbeiten 6-OHDA erst ab einer Konzentration von mindestens 50 μM toxisch war (Tian et al. 2007; Jiang et al. 2004).

6-OHDA führt auch in anderen neuronalen Zellen zum Zelltod sowie *in vivo*, wie z.B. in PC12 und MN9D Zellen, primären zerebellaren Körner-Neuronen und mesenzephalischen Neuronen (Walkinshaw und Waters 1994; Wu et al. 1996; Ochu et al. 1998; Takai et al. 1998; Choi et al. 1999; Dodel et al. 1999; Lotharius et al. 1999; Eminel et al. 2004; Offen et al. 1998; Jeon et al. 1999; He et al. 2000).

4.2 Verstärkter Zelltod in differenzierten SH-SY5Y Zellen

Die differenzierten Zellen reagierten insgesamt empfindlicher als die naiven. Bereits bei einer 6-OHDA Konzentration von 25 μM überlebten nach beiden Zeiträumen jeweils ca. 15 % weniger differenzierte als naive Zellen. Noch deutlicher war der Unterschied bei einer Konzentration von 50 μM , hierbei ergab sich ein Rückgang von ca. 40 % nach 24 h, bzw. ein kompletter Zellverlust nach 48 h.

Die verstärkte Apoptose der differenzierten Zellen kann durch die Vorbehandlung mit Retinsäure erklärt werden. Als Antwort auf oxidativen Stress oder auch andere Toxine wie z.B. Doxorubicin, Taxol und UV-Strahlung kommt es u.a. zur erhöhten Expression von wichtigen pro-apoptotischen Regulatoren wie p53 und verschiedenen Caspasen (Mrass et al. 2004; Das et al. 2008), die für die erhöhte Sensitivität der Retinsäure-behandelten Zellen verantwortlich sind.

Die Empfindlichkeit von differenzierten SH-SY5Y-Zellen konnte entsprechend herabgesetzt werden, wenn die Retinsäure vor Stimulation entfernt wurde (Nakaso und Nakashima 2008), wo 50 μM 6-OHDA ebenfalls zu einem signifikanten, jedoch nicht so starken Absterben führte.

4.3 Aktivierung von JNK und p38 nach 6-OHDA in SH-SY5Y Zellen

Als Folge des oxidativen Stresses mittels 25 μM 6-OHDA zeigte sich in den Beobachtungen über 4, 6 und 8 h eine Aktivierung der JNKs (pJNK), ihres nukleären Substrats c-Jun (pc-Jun) sowie von p38 (pp38). Die Phosphorylierungsmuster in naiven und differenzierten SH-SY5Y-Zellen waren nahezu identisch (Abb. 7).

In der Langzeitbeobachtung (24 und 48 h) konnte im Gegensatz zu den naiven Zellen keine p38-Aktivität der differenzierten Zelle beobachtet werden, während eine Phosphorylierung von JNK und c-Jun nachweisbar war (Abb. 8).

Nach Stimulation von SH-SY5Y Zellen mit 6-OHDA wurden auch in anderen Arbeiten sowohl eine Aktivierung von JNK (Gomez-Lazaro et al. 2008; Ouyang und Shen 2006; Tian et al. 2007; Ruffels et al. 2004) als auch von p38 in differenzierten und naiven Zellen beschrieben. Allerdings wird p38 nicht notwendigerweise nach oxidativem Stress aktiviert (Ruffels et al. 2004).

Auch in anderen neuronalen Modellen führt 6-OHDA zur Aktivierung von JNKs. Sowohl naive (Eminel et al. 2004) als auch differenzierte PC12-Zellen (Rodriguez-Blanco et al. 2008), eine Zelllinie etabliert aus einem Phäochromozytom, reagieren

mit einer dosis- und zeitabhängigen Phosphorylierung von JNKs und begleitend c-Jun. In primären kortikalen Neuronen (Crossthwaite et al. 2002) und striatalen Neuronen von Ratten (Luo et al. 1998) kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung von JNKs und c-Jun sowie konsekutiver Apoptose nach oxidativen Stress.

Choi et al. beschrieben 2004 in MN9D-Zellen und primären mesenzephalischen Neuronen ebenfalls eine Phosphorylierung von p38 nach 6-OHDA. Sie beobachteten zusätzlich eine Aktivierung von verschiedenen Caspasen.

4.4 Die Rolle von JNKs und p38 beim 6-OHDA-vermittelten Zelltod

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass die Hemmung der beiden JNK Isoformen JNK1 und JNK2 mittels SP600125 zu einem dosis- und zeitabhängigen vermehrten Überleben von naiven und differenzierten SH-SY5Y-Zellen führt. Es bestand ein signifikanter Schutz der naiven Zellen für eine 6-OHDA Dosis von 25 μM und einen Zeitraum von 24 h. Für 50 μM konnte zu keiner Zeit eine signifikante Protektion nachgewiesen werden.

Bei den differenzierten Zellen beobachteten wir nach 24 h zwar einen geringeren Schutz als bei den naiven, dafür erwies sich die Protektion aber auch noch nach 48 h als signifikant. Bei 50 μM 6-OHDA konnte auch hier keine Schutzwirkung ermittelt werden.

Anders verhielt es sich bei p38. Die Vorinkubation mit SB203580 war unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen, von der Konzentration des Inhibitors oder des Stressors und des Zeitpunkts nicht protektiv.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass 6-OHDA-induzierte Apoptose JNK- und nicht p38-abhängig ist, auch wenn beide Stresskinasen aktiviert werden. Dies wird auch bei Jiang et al. (2004) beschrieben, wobei hier insgesamt höhere Inhibitorkonzentrationen eingesetzt wurden. Die Inkubationszeit betrug wie in der vorliegenden Arbeit 30 Minuten. Doch auch in anderen Zellen wie PC12-Zellen (Eminel et al. 2004), primären kortikalen Neuronen (Crossthwaite et al. 2002) oder striatalen Neuronen (Luo et al. 1998) verursachen ebenfalls die JNKs den 6-OHDA-vermittelten Zelltod.

In anderen Zellen werden den JNKs und p38 gegensätzliche Wirkungen zugeschrieben. Engelbrecht et al. (2004) sahen eine proapoptotische Wirkung für p38 und eine antiapoptotische für JNK. In diesem Experiment wurden allerdings

neonatale ventrikuläre Rattenmyozyten und als Stimulus eine kurzzeitige Ischämie mit nachfolgender Reperfusion verwendet.

In anderen Arbeiten wiederum ist p38 hauptsächlich verantwortlich für Apoptose in naiven SH-SY5Y-Zellen wie z.B. nach Dopamin und Peroxynitrit (Junn und Mouradian 2001; Oh-hashii et al. 1999). In PC12-Zellen scheint p38 auch an dem 6-OHDA-induzierten Zelltod beteiligt zu sein (Fujita et al. 2006).

In SH-SY5Y-Zellen sind außerdem Caspasen an der Apoptose beteiligt (von Coelln et al. 2001; Hwang und Jeong 2008). Ihre Inhibition führt zu einem signifikant erhöhten Überleben. Es zeigen sich aber dennoch Schäden wie z.B. ein Verlust von Zellfortsätzen und verminderter Dopaminaufnahme. Dies unterstreicht, dass neben den Caspase-abhängigen noch weitere Signalkaskaden, wie die in dieser Arbeit beschriebenen JNK- und p38-Kaskaden, Einfluss auf die Zellen nehmen. Außer den untersuchten Stresskinasen könnten der NF- κ -B-Signalweg, die PI-3-Kinase oder die ERK1/2-Kinasen Einfluss auf einen Zelltod haben, der durch oxidativen Stress ausgelöst wird.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) haben eine Vielzahl von Funktionen in der Zellphysiologie und der Zelldegeneration. Zur Gruppe dieser Kinasen gehören die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs), p38 und die extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2). Insbesondere JNKs und p38 werden häufig als Reaktion auf Zellstress aktiviert, beispielsweise nach oxidativem Stress, UV-Strahlung, dem Einsatz von Chemotherapeutika oder Entzündungszytokinen wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor α (TNF α). Sie werden daher auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) bezeichnet. Darüber hinaus sind sie aber auch in eine Reihe von wichtigen physiologischen Vorgängen involviert und zeigen sogar antiapoptotische Eigenschaften.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst SH-SY5Y Zellen mit 6-Hydroxydopamin, einem starken oxidativen Stressor, stimuliert und anschließend die Überlebensrate untersucht. Hierbei zeigte sich ein signifikantes Absterben sowohl der naiven als auch differenzierten Zellen gegenüber der unbehandelten Gruppe für beide Konzentrationen (25 μ g und 50 μ g) und Zeiträume (24 h und 48 h). Dabei war der Effekt bei den über 48 h mit 50 μ g 6-Hydroxydopamin behandelten differenzierten Zellen am deutlichsten, hier überlebten keine Zellen.

Als Zeichen der Aktivierung wurde danach auf Proteinebene untersucht, ob die Stimulation mit 6-OHDA eine Zunahme der JNK- bzw. p38-Phosphorylierung hervorruft. Zusätzlich wurde die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor c-Jun, ein Substrat der JNKs, als Nachweis für die nukleäre Aktivität von JNKs bestimmt. Der Stimulus verursachte bei beiden Zelltypen eine zeitabhängige JNK-, p38- und c-Jun-Phosphorylierung, deren Maximum nach 8 h lag und auch noch nach 48 h erhöht war. Allerdings konnte bei den differenzierten Zellen keine signifikante Aktivierung von p38 nachgewiesen werden, während die naiven Zellen eine klare Aktivierung zeigten. Sowohl bei den naiven als auch bei den differenzierten Zellen war eine deutliche Phosphorylierung von c-Jun zu erkennen, wobei auch hier die naiven Zellen ein stärkeres Signal zeigten.

Anschließend wurde, um den Einfluss der beiden MAPK auf den Zelltod zu erfassen, der Versuch nach vorheriger Inkubation mit spezifischen Inhibitoren wiederholt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der JNKs über 24 h und bei einer Konzentration von 25 μ g 6-OHDA zu einer signifikanten Protektion naiver

Zellen führte. Bei den differenzierten Zellen war dieser Effekt darüber hinaus auch noch nach 48 h zu beobachten. Bei 50 µg 6-OHDA ergab sich zelltypunabhängig keinerlei Protektion.

Demgegenüber führte der spezifische p38-Inhibitor sowohl bei den naiven als auch differenzierten Zellen in beiden Konzentrationen und Zeiträumen zu keinem Schutz vor einem signifikanten Absterben.

Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise darauf, dass JNKs eine wichtige Rolle bei der durch 6-OHDA induzierten Apoptose spielen. Demgegenüber ist p38 hierbei nicht involviert. Durch diese neuroprotektive Wirkung ergibt sich die Bedeutung der SAPK als pharmakologische Zielstruktur für die therapeutische Intervention bei neurodegenerativen Erkrankungen.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Reaktion von 6-Hydroxydopamin in sein Chinon unter Abgabe reaktiver Sauerstoffverbindungen

Abb. 2: Signaltransduktionswege der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

Abb. 3: SP600125 (Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-1)

Abb. 4: SB203580 (4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-1H-imidazol-4-yl]pyridin)

Abb. 5: Überleben naiver SH-SY5Y-Zellen nach 6-OHDA.

Abb. 6: Überleben differenzierter SH-SY5Y-Zellen nach 6-OHDA

Abb. 7: Aktivierung von JNK, c-Jun und p38 in der Kurzzeitbeobachtung

Abb. 8: Aktivierung von JNK, c-Jun und p38 in der Langzeitbeobachtung

Abb. 9: Zahl naiver Zellen nach Hemmung von JNK

Abb. 10: Zahl differenzierter Zellen nach Hemmung von JNK

Abb. 11: Zahl naiver Zellen nach Hemmung von p38

Abb. 12: Zahl differenzierter Zellen nach Hemmung von p38

7 LITERATURVERZEICHNIS

Alenzi FQ. Apoptosis and diseases: regulation and clinical relevance. *Saudi Med J*. 2005 Nov;26(11):1679-90.

Allen M, Svensson L, Roach M, Hambor J, McNeish J, Gabel CA. Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J Exp Med*. 2000 Mar 6;191(5):859-70.

Angeletti PU, Levi-Montalcini R. Sympathetic nerve cell destruction in newborn mammals by 6-hydroxydopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970a Jan;65:114-21.

Angeletti PU, Levi-Montalcini R. Specific cytotoxic effect of 6-hydroxydopamine on sympathetic neuroblasts. *Arch Ital Biol*. 1970b;108:213-21.

Arslan MA, Kutuk O, Basaga H. Protein kinases as drug targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006 Nov;6(7):623-34. Review.

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13681-6.

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 1973 Nov;33(11):2643-52.

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*. 1978 Nov;38(11):3751-7.

Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*. 2003 Aug 5;17(16):1969-78.

Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*. 2005 Mar;5(3):231-7. Review.

Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*. 1994 Jan;15(1):7-10. Review.

Carletti R, Tacconi S, Bettini E, Ferraguti F. Stress activated protein kinases, a novel family of mitogen-activated protein kinases, are heterogeneously expressed in the adult rat brain and differentially distributed from extracellular-signal-regulated protein kinases. *Neuroscience*. 1995 Dec;69(4):1103-10.

Cassarino DS, Fall CP, Swerdlow RH, Smith TS, Halvorsen EM, Miller SW, Parks JP, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. Elevated reactive oxygen species and antioxidant

enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Nov 28;1362(1):77-86.

Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS, Karin M. JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell*. 2003 Apr;4(4):521-33.

Choi WS, Yoon SY, Oh TH, Choi EJ, O'Malley KL, Oh YJ. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP⁺-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res*. 1999 Jul 1;57(1):86-94.

Choi WS, Eom DS, Han BS, Kim WK, Han BH, Choi EJ, Oh TH, Markelonis GJ, Cho JW, Oh YJ. Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):20451-60.

Crossthwaite AJ, Hasan S, Williams RJ. Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca²⁺ and PI3-kinase. *J Neurochem*. 2002 Jan;80(1):24-35.

Das A, Banik NL, Ray SK. Retinoids induced astrocytic differentiation with down regulation of telomerase activity and enhanced sensitivity to taxol for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *J Neurooncol*. 2008 Mar;87(1):9-22.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000 Oct 1;351(Pt 1):95-105.

Decker DE, Althaus JS, Buxser SE, VonVoigtlander PF, Ruppel PL. Competitive irreversible inhibition of dopamine uptake by 6-hydroxydopamine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1993 Feb;79(2):195-208.

Deng X, Xiao L, Lang W, Gao F, Ruvolo P, May WS Jr. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):23681-8. Epub 2001 Apr 25.

Dodel RC, Du Y, Bales KR, Ling Z, Carvey PM, Paul SM. Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999 Jan 22;64(1):141-8.

Eminel S, Klettner A, Roemer L, Herdegen T, Waetzig V. JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine. *J Biol Chem*. 2004 Dec 31;279(53):55385-92.

Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C, Comella JX. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*. 2000 Sep;75(3):991-1003.

Engelbrecht AM, Niesler C, Page C, Lochner A. p38 and JNK have distinct regulatory functions on the development of apoptosis during simulated ischaemia and reperfusion in neonatal cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*. 2004 Sep;99(5):338-50.

Ferrari G, Yan CY, Greene LA. N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J Neurosci*. 1995 Apr;15(4):2857-66.

Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev*. 2005 Jun;57(2):187-215. Review.

Foltz IN, Schrader JW. Activation of the stress-activated protein kinases by multiple hematopoietic growth factors with the exception of interleukin-4. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3092-6.

Fujita H, Ogino T, Kobuchi H, Fujiwara T, Yano H, Akiyama J, Utsumi K, Sasaki J. Cell-permeable cAMP analog suppresses 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through the activation of the Akt pathway. *Brain Res*. 2006 Oct 3;1113(1):10-23.

Gomez-Lazaro M, Galindo MF, Concannon CG, Segura MF, Fernandez-Gomez FJ, Llecha N, Comella JX, Prehn JH, Jordan J. 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *J Neurochem*. 2008 Mar;104(6):1599-612.

Gómez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Viñals F, Barrachina M, Ambrosio S. MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res*. 2002 May 10;935(1-2):32-9.

Greenlund LJ, Deckwerth TL, Johnson EM Jr.. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*. 1995 Feb;14(2):303-15.

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*. 1996 Jun 3;15(11):2760-70.

Häussinger D, Schliess F, Dombrowski F, Vom Dahl S. Involvement of p38MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration. *Gastroenterology*. 1999 Apr;116(4):921-35.

He Y, Lee T, Leong SK. 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Res*. 2000 Mar 6;858(1):163-6.

Herdegen T, Skene P, Bähr M. The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci*. 1997 May;20(5):227-31. Review.

Herdegen T, Tölle TR and Bähr MH (1997) Die Stimulations-Transkriptions-Kopplung., in: *Klinische Neurobiologie*, pp 4-9, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 1993 Nov;7(11):2135-48.

Hickman JA, Beere HM, Wood AC, Waters CM, Parmar R (1992): Mechanisms of Cytotoxicity caused by antitumor drugs. *Toxicol-Lett* 64-65:553-561.

Hui L, Bakiri L, Stepniak E, Wagner EF. p38alpha: A Suppressor of Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Cell Cycle.* 2007 Oct 15;6(20):2429-33.

Hwang YP, Jeong HG. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress. *FEBS Lett.* 2008 Jul 23;582(17):2655-62.

Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Apr;10(2):205-19. Review.

Jalava AM, Heikkilä J, Akerlind G, Pettit GR, Akerman KE. Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1990 Jun 1;50(11):3422-8.

Jeon BS, Kholodilov NG, Oo TF, Kim SY, Tomaselli KJ, Srinivasan A, Stefanis L, Burke RE. Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem.* 1999 Jul;73(1):322-33.

Jiang H, Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet.* 2004 Aug 15;13(16):1745-54.

Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem.* 1996 Jul 26;271(30):17920-6.

Junn E, Mouradian MM. Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. *J Neurochem.* 2001 Jul;78(2):374-83.

Johnson GV, Bailey CD. The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2003 Oct;183(2):263-8. Review.

Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Dérijard B, Moore G, Davis R, Karin M. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* 1994 Dec 15;8(24):2996-3007.

Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 30;1754(1-2):253-62. Epub 2005 Sep 8. Review.

- Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*. 1993 Nov 19;262(5137):1274-7.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics., *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Keyse SM. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Mar 16;1265(2-3):152-60. Review.
- Kharbanda S, Ren R, Pandey P, Shafman TD, Feller SM, Weichselbaum RR, Kufe DW. Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature*. 1995 Aug 31;376(6543):785-8.
- Kushner BH, Gulati SC, Kwon JH, O'Reilly RJ, Exelby PR, Cheung NK. High-dose melphalan with 6-hydroxydopamine-purged autologous bone marrow transplantation for poor-risk neuroblastoma. *Cancer*. 1991 Jul 15;68(2):242-7.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):807-69. Review.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994 May 12;369(6476):156-60.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994 Dec 22-29;372(6508):739-46.
- Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger A, Adams JL. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther*. 1999 May-Jun;82(2-3):389-97. Review.
- Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 1999 Feb 15;19(4):1284-93.
- Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R, Roth GS. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J Biol Chem*. 1998 Feb 6;273(6):3756-64.
- Manning AM, Davis RJ. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Jul;2(7):554-65. Review.
- Maroney AC, Glicksman MA, Basma AN, Walton KM, Knight E Jr, Murphy CA, Bartlett BA, Finn JP, Angeles T, Matsuda Y, Neff NT, Dionne CA. Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *J Neurosci*. 1998 Jan 1;18(1):104-11.

Mendelson KG, Contois LR, Tevosian SG, Davis RJ, Paulson KE. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):12908-13.

Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:91-118. Review.

Mrass P, Rendl M, Mildner M, Gruber F, Lengauer B, Ballaun C, Eckhart L, Tschachler E. Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Res*. 2004 Sep 15;64(18):6542-8.

Nakaso K, Ito S, Nakashima K. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*. 2008 Feb 20;432(2):146-50. Epub 2007 Dec 23.

Nishikawa M, Myoui A, Tomita T, Takahi K, Nampei A, Yoshikawa H. p38 MAP Kinase inhibitor. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2007 Oct;30(5):390-7.

Ochu EE, Rothwell NJ, Waters CM. Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J Neurochem*. 1998 Jun;70(6):2637-40.

Offen D, Beart PM, Cheung NS, Pascoe CJ, Hochman A, Gorodin S, Melamed E, Bernard R, Bernard O. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5789-94.

Oh-hashii K, Maruyama W, Yi H, Takahashi T, Naoi M, Isobe K. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Sep 24;263(2):504-9.

Ouyang M, Shen X. Critical role of ASK1 in the 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. 2006 Apr;97(1):234-44.

Park JM, Greten FR, Li ZW, Karin M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science*. 2002 Sep 20;297(5589):2048-51.

Parkinson Study Group PRECEPT Investigators. Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology*. 2007 Oct 9;69(15):1480-90.

Parkinson Study Group. The safety and tolerability of a mixed lineage kinase inhibitor (CEP-1347) in PD. *Neurology*. 2004 Jan 27;62(2):330-2.

Raingaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated

protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995 Mar 31;270(13):7420-6.

Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):180-6.

Rodriguez-Blanco J, Martín V, Herrera F, García-Santos G, Antolín I, Rodriguez C. Intracellular signaling pathways involved in post-mitotic dopaminergic PC12 cell death induced by 6-hydroxydopamine. *J Neurochem.* 2008 Oct;107(1):127-40.

Ruffels J, Griffin M, Dickenson JM. Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jan 12;483(2-3):163-73.

Sandstrom PA, Buttke TM. Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 May 15;90(10):4708-12.

Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 1999 Apr;19(4):2435-44.

Shapiro L, Dinarello CA. Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19;92(26):12230-4.

Takai N, Nakanishi H, Tanabe K, Nishioku T, Sugiyama T, Fujiwara M, Yamamoto K. Involvement of caspase-like proteinases in apoptosis of neuronal PC12 cells and primary cultured microglia induced by 6-hydroxydopamine. *J Neurosci Res.* 1998 Oct 15;54(2):214-22.

Thompson CB (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267:1456-1462.

Tian LL, Zhou Z, Zhang Q, Sun YN, Li CR, Cheng CH, Zhong ZY, Wang SQ. Protective effect of (+/-) isoborneol against 6-OHDA-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(6):1019-32.

Tiffany-Castiglioni E, Saneto RP, Proctor PH, Perez-Polo JR. Participation of active oxygen species in 6-hydroxydopamine toxicity to a human neuroblastoma cell line. *Biochem Pharmacol.* 1982 Jan 15;31(2):181-8.

von Coelln R, Kügler S, Bähr M, Weller M, Dichgans J, Schulz JB. Rescue from death but not from functional impairment: caspase inhibition protects dopaminergic cells against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not against the loss of their terminals. *J Neurochem.* 2001 Apr;77(1):263-73.

Waetzig V, Herdegen T. A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3;278(1):567-72.

Waetzig V, Herdegen T. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Sep;26(9):455-61. Review.

Waetzig V, Zhao Y, Herdegen T. The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol.* 2006 Oct;80(2):84-97. Epub 2006 Oct 11. Review.

Walkinshaw G, Waters CM. Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neuroscience.* 1994 Dec;63(4):975-87.

Wu Y, Blum D, Nissou MF, Benabid AL, Verna JM. Unlike MPP+, apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells is independent of mitochondrial inhibition. *Neurosci Lett.* 1996 Dec 27;221(1):69-71.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995 Nov 24;270(5240):1326-31.

Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincón M, Flavell RA. Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity.* 1998 Oct;9(4):575-85.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Herdegen.

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das mir überlassene interessante Thema und seine stets große Hilfsbereitschaft bei der Entstehung dieser Arbeit möchte ich meinem Doktorvater herzlich danken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Vicki Wätzig für die jederzeit freundliche und geduldige Betreuung sowie die hervorragende Kommunikation.

Ein freundschaftliches Dankeschön an Philip und Ekki für so manche Unterstützung und Anmerkung.

Und zuletzt ein Dankeschön aus tiefem Herzen an Julia, die mich einmal mehr bei einem wichtigen Schritt begleitet und darüber hinaus diese Arbeit gewissenhaft mit dem Rotstift einer angehenden Deutschlehrerin korrigiert hat.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Fabian Michael Lindner
Geburtsdatum	22.01.1978
Geburtsort	Neumünster

AUSBILDUNG

1990 – 1997	Wald-Oberschule, Berlin, Abschluss: Abitur
1998 – 1999	Zivildienst im Martin-Luther-Krankenhaus, Berlin
1999 – 2007	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
2001	Ärztliche Vorprüfung
seit 2003	Promotion am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel
2003	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
2005	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
2005 – 2007	Praktisches Jahr
10/05 – 02/06	Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
02/06 – 04/06	Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
07/06 – 10/06	Chirurgie, Krankenhaus Marie Curie, Buenos Aires, Argentinien
11/06 – 01/07	Dermatologie, Krankenhaus Honorio Delgado, Arequipa, Peru
Juni 2007	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

12/07 – 06/09	Assistenzarzt an der Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
seit 08/09	Assistenzarzt an der Klinik für Kardiologie und konservative Intensivmedizin, Humboldt-Klinikum, Berlin