

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

**C-JUN N-TERMINALE KINASEN (JNK)
VERMITTELN FAS-INDUZIERTE
NEURITENREGENERATION IN PC12-ZELLEN**

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

vorgelegt von

KATJA SUSANNE LOOSE

aus Kiel

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Herdegen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Held-Feindt

Tag der mündlichen
Prüfung: 10.09.2012

Zum Druck genehmigt,

Kiel, den

gez.:

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	FUNKTION UND BEDEUTUNG DER MITOGEN-AKTIVIERTEN PROTEINKINASEN (MAPK)	1
1.1.1	<i>c-Jun N-terminale Kinasen (JNK)</i>	2
1.1.2	<i>Extracellular signal-regulated Kinasen (ERK)</i>	3
1.2	REZEPTOREN BZW. FAS-LIGAND	4
1.2.1	<i>Die Neurotrophin-Rezeptoren p75 und TrkA</i>	4
1.2.2	<i>Der APO/Fas-Rezeptor (CD95) und Fas-Ligand</i>	4
1.3	PC12-ZELLEN ALS NEUROBIOLOGISCHES ZELLMODELL	5
1.4	NERVENVERLETZUNG UND REGENERATION	6
1.5	DIE ROLLE VON JNK IN DER NEURONALEN REGENERATION	7
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	9
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	10
2.2	HERSTELLUNG UND STERILISATION VON PUFFERN UND LÖSUNGEN	12
2.3	ENZYME	12
2.4	ANTIKÖRPER	12
2.5	HERKUNFT, KULTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON PC12-ZELLEN	13
2.5.1	<i>Herkunft der PC12-Zellen</i>	13
2.5.2	<i>Kultivierung von PC12-Zellen</i>	13
2.5.3	<i>Passage von PC12-Zellen</i>	14
2.5.4	<i>Ausdifferenzierung von PC12-Zellen</i>	15
2.6	EINFRIEREN VON PC12-ZELLEN	16
2.7	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL BEI PC12-ZELLEN	16
2.8	NEURITENLÄSION VON DIFFERENZIIERTEN PC12-ZELLEN	17
2.9	HERSTELLUNG VON GESAMTZELLYSATEN	18
2.10	BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTS VON GESAMTZELLEXTRAKTEN	18
2.11	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT	20
2.11.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	20
2.11.2	<i>Western Blot</i>	22
2.11.3	<i>Strippen von Western Blot-Membranen</i>	24
2.12	UNTERSUCHUNG VON TRANSKRIPTIONSRATEN DURCH RT-PCR	24
2.12.1	<i>RNA-Präparation</i>	24
2.12.2	<i>Reverse Transkription</i>	25
2.12.3	<i>Primer-Design</i>	26
2.12.4	<i>cDNA-PCR</i>	26
2.12.5	<i>Analyse der PCR-Amplifikate</i>	29
2.13	STATISTIK UND WIEDERHOLUNGSRATE	30
3	ERGEBNISSE	31
3.1	NGF-INDUZIERTES NEURITENWACHSTUM UND NGF-REZEPTOREXPRESSION IN PC12-ZELLEN NACH NEURITENLÄSION	31
3.2	EXPRESSION UND EFFEKTE VON FAS UND FAS-LIGAND	34
3.3	DIE AKTIVIERUNG DER MAPK NACH NEURITENLÄSION DER PC12 ZELLEN	36
3.4	ERK1/2- UND JNK-AKTIVITÄT NACH REZEPTORINHIBITION	38
4	DISKUSSION	40
4.1	NEURITENWACHSTUM UND REZEPTORREGULATION	40
4.2	FAS-SIGNALWEGE NACH NEURITENLÄSION DER PC12-ZELLEN	41
4.3	DER EINFLUSS VON MAPK AUF DAS NEURITENWACHSTUM DER PC12-ZELLEN NACH NEURITENLÄSION	42
5	ZUSAMMENFASSUNG	45
I	REFERENZEN	46
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
III	TABELLENVERZEICHNIS	58
IV	DANKSAGUNG	59
V	LEBENS LAUF	60

Glossarium

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Bidestilliertes Wasser
Akt	Proteinkinase B
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APO-1	<i>apoptosis antigen 1</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATF2	<i>activating transcription factor 2</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare der DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced Chemolumineszenz</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
h	Stunde(n)
IL1	Interleukin 1
JIP	<i>JNK-interacting protein</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
lpr	lymphoproliferativ
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEKK	MAPK/ERK Kinase Kinase
Min.	Minute(n)
MKK	MAPK-Kinasen

MKKK	MAPK-Kinasen-Kinasen
MLK	<i>mixed-lineage kinase</i>
Mos	Proto-Onkogen Serin/Threonin-Proteinkinase
NFH	<i>neurofilament protein (heavy subunit)</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PAK	<i>p-21 activated kinase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC12	Phäochromocytomzellen einer Ratte
pJNK	phospho-JNK
R	Rezeptor
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion
SCG10	<i>superior cervical ganglion-10 protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
SFL	Superfas-Ligand
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA	<i>tropomyosin-related kinase A</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Funktion und Bedeutung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) kommen in allen eukaryontischen Zellen vor. Sie stellen Serin-/Threonin-Proteinkinasen dar, welche von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern, Hormonen, Zellstress und Zelladhärenz aktiviert werden können. Die Signalkaskade der MAPK umfasst drei hintereinander geschaltete Kinasen: die MAPK-Kinase-Kinase (MKKK), die MAPK-Kinase (MKK) und die MAPK (Abb. 1). Die MAPK der Säugetiere lassen sich in 5 Familien unterteilen: MAPKerk1/2, MAPKp38, MAPKjnk, MAPKerk3/4 und MAPKerk5. Jede der Familien hat eine andere biologische Aufgabe (Widmann et al., 1999). MAPK Signalwege sind zentrale Vermittler der zellulären Differenzierung im Allgemeinen und des Neuritenwachstums im Besonderen (Kaplan und Miller, 2000; Roux und Barker, 2002; Waetzig et al., 2006). Abb.1 zeigt einen Überblick über den MAPK-Signalweg (Dunn et al., 2002).

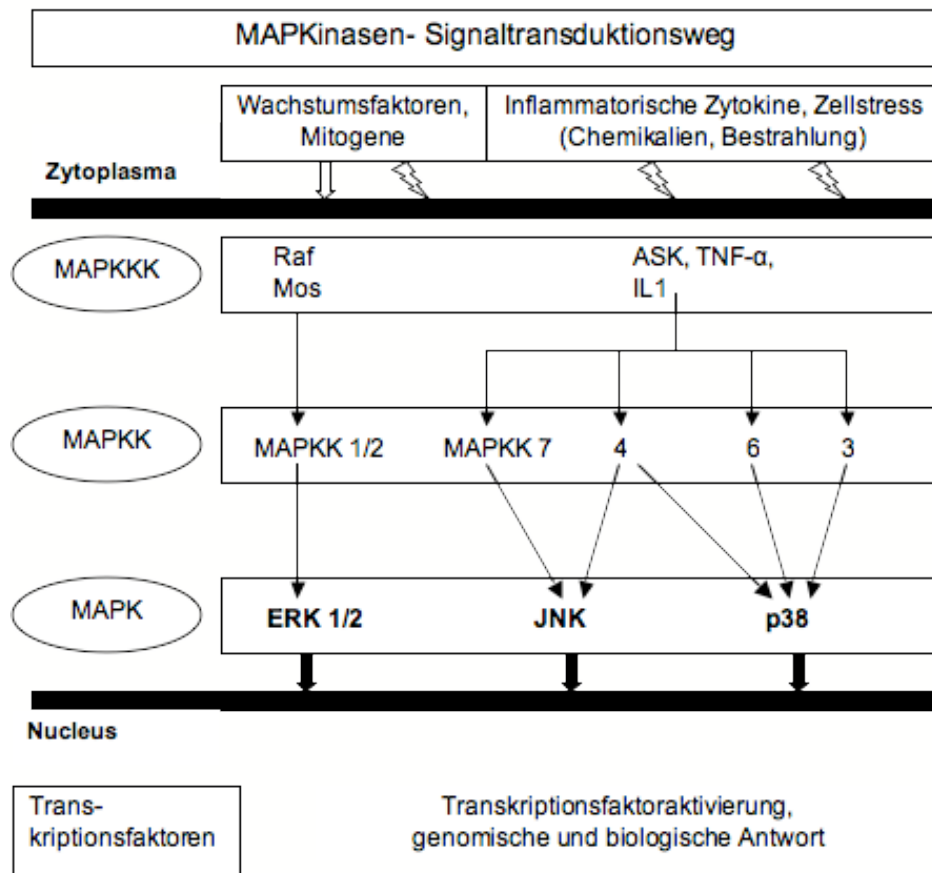


Abb.1 : Signaltransduktionsweg der MAPK (Dunn et al., 2002)

Die Gruppe der MAPK hat Einfluss auf andere Enzyme im Cytoplasma, indem sie diese durch Anhängen von Phosphatgruppen an Serin-/Threonin-Aminosäuren beeinflussen. Durch aktivierte MAPK-Kinasen (MAPKK) werden die MAPK selbst aktiviert (doppelte Phosphorylierung an einem Threonin- und Tyrosinrest). MAPKK phosphorylieren die MAPK im Bereich einer Threonin-XXX-Tyrosin-Sequenz. Die mittlere Aminosäure der Threonin-XXX-Tyrosin-Sequenz ist dabei spezifisch für eine der MAPK-Hauptgruppen. Die Gruppe der ERK, *extracellular signal-regulated Kinases*, zeichnet sich durch die Zielsequenz Threonin-Glutamat-Tyrosin aus, die Gruppe der p38 durch die Sequenz Threonin-Glycin-Tyrosin und die Gruppe der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) durch die Sequenz Threonin-Prolin-Tyrosin (Hommes et al., 2003).

ERK-MAPK werden von den MAPKK (abgekürzt MKK) MKK1 und MKK 2 aktiviert, p38 von MKK 3, MKK 4 sowie MKK 6 und JNK von MKK 4 und MKK 7.

Durch diverse MAPKinasen-Kinasen-Kinasen (MAPKKK), wie z.B. MEKK1, ASK1 und MLK werden die MAPKK aktiviert.

MAPKKK werden nun durch eine Reihe von Reizen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine und UV-Bestrahlung, von einem inaktiven in einen aktiven Zustand überführt.

Die MAPKK MKK4 und MKK7 phosphorylieren die JNK, wobei MKK4 die JNK bevorzugt am Tyrosin, MKK7 vorwiegend am Threonin phosphoryliert. Serin-/Tyrosin-Phosphatasen und spezifische MAP-Kinase-Phosphatasen ermöglichen eine Inaktivierung der JNK (Manning und Davis, 2003). 2010 zeigten Haeusgen et al., dass eine MKK7 Spleißvariante, MKK7_γ1, die Funktionen der JNK in naiven PC12-Zellen wesentlich verändert (Haeusgen et al., 2010). In kürzlich veröffentlichten Ergebnissen ändert MKK7_γ1 die Empfindlichkeit für Stress. Die Spleißvariante hat die Fähigkeit zelluläre Basisprogramme umzukehren und damit NGF (*nerve growth factor*)-vermittelte Differenzierung zu blockieren (Haeusgen et al., 2011).

MAPK wirken auf Transkriptionsfaktoren (c-Jun und ATF-2). Letztere führen zu einer Veränderung der Genexpression mit Bildung von Genprodukten (Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle), die immunkompetente Zellen aktivieren (Dong et al., 2002; Hommes et al., 2003).

1.1.1 c-Jun N-terminale Kinasen (JNK)

Die JNK als eine der MAPK-Familien haben viele verschiedene Funktionen im Nervensystem. Sie bestehen aus den ubiquitär exprimierten JNK1 und JNK2. JNK3 wird primär in Hirn, Herz und Hoden exprimiert (Widmann et al., 1999).

Verschiedene Formen von Zellstress wie UV-Strahlung, Hitze, osmotischer Schock, Behandlung mit Proteinsynthese-Inhibitoren, entzündungsfördernde Zytokine, Wachstumsfaktordeprivation, Behandlung mit Chemotherapeutika und DNA-schädigenden Substanzen aktivieren JNK (Deng et al., 2001). Doch JNK können neben proapoptotischen Funktionen auch antiapoptotisch wirken (Deng et al., 2001; Lin und Dibling, 2002). Sie werden außerdem nicht unbedingt zur Einleitung der Apoptose benötigt (Liu et al., 1996). Ferner sind sie an bedeutenden physiologischen Vorgängen beteiligt, wie Mitose, Membran- und Zytoskelettstabilität, der Regulation des Neuritenauswachsens und des Zellzyklus z.B. nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (Kita et al., 1998; Kobayashi et al., 1997; Waetzig und Herdegen, 2003b, 2005a; Yao et al., 1997).

In der Medizin sind die JNK z.B. an der Entstehung von Tumoren maßgeblich beteiligt (Kennedy und Davis, 2003), wie z.B. Glioblastomen (Potapova et al., 2000). Derzeit werden Untersuchungen zum Einsatz von JNK-Inhibitoren für die Behandlung entzündlicher, vaskulärer, neurodegenerativer, metabolischer und onkogener Erkrankungen durchgeführt. Positive Resultate für die Behandlung der Rheumatoiden Arthritis (Bogoyevitch et al., 2004; Han et al., 2001) und Asthma (Eynott et al., 2003; Eynott et al., 2004; Nath et al., 2005) konnten mit dem direkten JNK-Inhibitor SP600125 erreicht werden.

1.1.2 Extracellular signal-regulated Kinasen (ERK)

Zu einer anderen MAPK-Familie gehören ERK1/2. Sie werden wie oben genannt durch die MAPK/ERK Kinase 1 (MEK1) und MEK2 aktiviert. MEK1 und 2 wiederum können durch MEKK1 und Raf1 aktiviert werden. Raf1 wird durch Mitogene und Wachstumsfaktoren, wie z.B. NGF indirekt über das *growth factor receptor bound-protein 2* (GRB2) stimuliert. ERK1/2 spielen eine große Rolle für die Proliferation und die Differenzierung (Qui and Green, 1992; Whitmarsh und Davis, 1996), bei der Entwicklung peripherer Neurone (Liu und Snider, 2001) und der Regeneration durch Induktion von Neurotrophenen (Sheu et al., 2000).

Im Gegensatz dazu wurde die Bedeutung der p38 Kinasen, einer weiteren MAPK-Familie, für die neuronale Differenzierung und die Reparaturmechanismen kontrovers diskutiert (Morooka und Nishida, 1998; Waetzig und Herdegen, 2003b). So wird z.B. die NGF-induzierte Aktivierung der p38 Kinase in PC12-Zellen teilweise durch G_i Proteine vermittelt (Yung et al., 2008).

1.2 Rezeptoren bzw. Fas-Ligand

Um die mannigfaltigen Funktionen auszuführen, benötigen die Zelloberflächenrezeptoren komplexe intrazelluläre Signalwege mit vielseitigen Signalmolekülen.

1.2.1 Die Neurotrophin-Rezeptoren p75 und TrkA

Neuronale Regeneration wird über eine komplexe Wechselwirkung zwischen freigesetzten Faktoren und ihren entsprechenden Zelloberflächenrezeptoren reguliert. Gut charakterisierte Mediatoren neuronaler Differenzierung sind die Neurotrophine, die zwei Typen von Rezeptoren nutzen: den *tropomyosin-related kinase A*- (TrkA) und den p75 Neurotrophin-Rezeptor (p75^{NTR}). Der Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*, NGF) ist das am besten beschriebene Mitglied der Neurotrophin-Familie. NGF bindet an spezifische Rezeptoren, wie z.B. TrkA, p75^{NTR} oder den *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) (Chevet et al., 1999). Diese Rezeptoren aktivieren u.a. den ERK1/2-Weg (Qui und Green, 1992). Die Ausschüttung von NGF ist nicht nur bedeutend für die Entwicklung des Gehirns, sondern auch für neuronale Reparaturvorgänge nach Verletzung (Kaplan und Miller, 2000; Roux und Barker, 2002).

Der oben genannte p75 Neurotrophin-Rezeptor (p75^{NTR}) spielt nicht nur eine Rolle bei neuronaler Differenzierung, sondern auch bei der Vermittlung von Apoptosesignalen (Dechant und Barde, 2002; Kenchappa et al., 2006; Kenchappa et al., 2010).

Auch der TrkA-Rezeptor kann neuronalen Zelltod bedingen, so in der embryonalen Entwicklung *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Nikoletopoulou et al., 2010).

1.2.2 Der APO/Fas-Rezeptor (CD95) und Fas-Ligand

Fas gehört wegen der Eigenschaften des extrazellulären Teils zur Tumornekrosefaktor/ *nerve growth factor* (TNF/NGF)-Rezeptor-Familie (Nagata und Golstein, 1995). Apo/Fas ist möglicherweise das am besten erforschte Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie. Als Antigen des monoklonalen Antikörpers APO-1 ist Fas 1989 entdeckt worden. Eine Aktivierung des Fas-Rezeptors löst u.a. in Leukämie-Zellen, aktivierten humanen Lymphozyten und malignen humanen Lymphozyten Apoptose aus (Trauth et al., 1989), er kommt jedoch in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben vor (Leithauser et al., 1993). Bei den Mitgliedern der TNF/NGF-Rezeptor-Familie ist die Aminosäuresequenz des extrazellulären Anteils stark konserviert mit einer Homologie von 20-30% und wird hauptsächlich von Cystein-Resten gebildet (Smith et al., 1994). Ein Anteil von etwa 80 Aminosäuren, die „Todesdomäne“, die im

intrazellulären Teil von Fas lokalisiert ist, leitet die Apoptose ein (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993).

Das menschliche Fas-Ligand Gen gehört wie der Fas-Rezeptor zur TNF-Familie (Nagata, 1997). Die Expression von Fas und Fas-Ligand ist bei einer Vielzahl von neurologischen Störungen, wie z.B. degenerativen und entzündlichen Prozessen, erhöht. Das Fas/Fas-Ligand-System ist somit neben der Aufgabe, das Immunsystem supprimiert zu halten, auch in der Lage, neuronalen Zelltod und Entzündungsprozesse in einer Vielzahl von neurologischen Störungen hervorzurufen (Choi und Benveniste, 2004). Neben der Induktion von Apoptose können Fas sowie andere Mitglieder der TNF-R-Familie inflammatorische Antworten, Zellwachstum und Proliferation bedingen.

In embryonalen hippocampalen und corticalen Neuronen induziert Fas-Ligand keine Apoptose in vitro und in vivo. Das Triggern von Fas in kultivierten, undifferenzierten Neuronen erhöht die Verzweigung der Neuriten im Wesentlichen durch Förderung der Bildung dieser Neuriten (Zuliani et al., 2006). Die Vernetzung von Fas in primär sensorischen Neuronen induziert das Neuritenwachstum durch anhaltende Aktivierung des ERK-Signalwegs und eine Hochregulation von p35. In vivo ist die funktionelle Erholung nach Verletzung des Ischiasnervs bei Fas-defizienten lpr Mäusen verzögert, wohingegen eine lokale Gabe von Antikörpern gegen Fas die Regeneration beschleunigt (Desbarats et al., 2003). Eine Aktivierung von Fas erhöht das Zellüberleben von neuralen Progenitorzellen in vitro (Knight et al., 2010).

1.3 PC12-Zellen als neurobiologisches Zellmodell

PC12-Zellen stammen von einem transplantablen Phäochromozytom einer Rattennebeniere (Greene und Tischler, 1976). Die Zellen sind in der Lage die Katecholamine Dopamin und Norepinephrin, nicht aber Epinephrin zu produzieren und zu speichern. Unter stabilen Kulturbedingungen verändern sich weder die Morphologie noch die Eigenschaften der PC12-Zelllinie (Greene und Tischler, 1976). Die tumorbildenden Charakteristika der Zellen bleiben in Kultur bestehen. PC12-Zellen zeigen sich sehr sauerstoffempfindlich und sind kaum adhären auf unbeschichtetem Kunststoff. Die Zellen verdoppeln sich innerhalb von 92 h. Sie bilden dichte, chromaffinähnliche Granula. PC12-Zellen verfügen über 40 Chromosomen, 38 Autosomen und ein XY-Paar. Die Zelllinie ist ein nützliches Modell der neuronalen Differenzierung als Antwort auf verschiedene Neurotrophine (Kaplan und Miller, 2000). Nachdem man die Zellen mit NGF behandelt hat, bilden die PC12-Zellen einen neuronähnlichen Phänotyp aus, der reversibel ist (Levi et al., 1985). Das Absetzen von NGF

führt zur Degeneration der Zellausläufer innerhalb von 24 h. Die Zellen beginnen sich innerhalb von 72 h zu teilen. NGF bewirkt keine Änderung der Neurotransmitterproduktion. Der beschriebene PC12-Zelltypus ist der ursprüngliche, der heute die Bezeichnung PC12-ATCC trägt. PC12-Zellen stellen ein anerkanntes Modellsystem zur Untersuchung der Biochemie von Neuronen (Greene und Tischler, 1976) und der neuronalen Apoptose (Stefanis et al., 1996) dar. In dieser Arbeit wurden PC12-ATCC-Zellen eingesetzt.

1.4 Nervenverletzung und Regeneration

Klinisch kann sich eine Läsion eines gemischten Nervs in Form von motorischen, sensorischen, trophischen und vegetativen Störungen präsentieren. Nach ihrer Differenzierung verlieren Nervenzellen zwar die Eigenschaft, sich erneut zu teilen, die Regeneration verletzter Nerven ist jedoch noch begrenzt möglich. Im Gegensatz zu Nervenfasern des zentralen Nervensystems ist es den Nervenfasern des peripheren Nervensystems in wesentlich größerem Ausmaß möglich, sich zu regenerieren (Ide, 1996). Die Regeneration erfolgt vom proximalen Nervenstumpf in Richtung des distalen Nervenstumpfes (Brecknell und Fawcett, 1996; Ide, 1996).

Bei den Nervenverletzungen unterscheidet man Axonotmesis und Neuronotmesis. Als Axonotmesis bezeichnet man die Dichtrennung von Axon und Myelinscheide bei noch erhaltener Basalmembran. Ist die Basalmembran zusätzlich durchtrennt, spricht man von Neuronotmesis (Chaudhry und Cornblath, 1992).

Nach Durchtrennung eines peripheren Nervs erfolgt im proximalen Teil eine traumatische Degeneration und im distalen eine Wallersche Degeneration mit Veränderung der Zellkörper. Die Regeneration beginnt ab dem Ranvierschen Schnürring mit dem Wachstumskolben und der Bildung der Basalmembran. Die Myelinisierung des regenerierten Nervenabschnittes wird durch Schwannsche Zellen getriggert (Seckel, 1990). Die Wallersche Degeneration im distalen Nervenstumpf wird nahe der Läsion eingeleitet und dann nach distal fortgeführt. Eine Ursache für die progrediente Degeneration ist die mangelnde Versorgung der Zellen mit lebenswichtigen neurotrophen Faktoren. Ohne den axoplasmatischen Fluss an neurotrophen Faktoren kommt es zu einem Absinken dieser Faktoren unter ein kritisches Level, was zu einer metabolischen Aktivierung von ruhenden Schwannschen Zellen führt (Lubinska, 1977).

Schwannsche Zellen bilden Bänder aus, wenn bei einer Nervenquetschung die Basalmembran noch erhalten ist. Nach ihrem Entdecker werden diese Bänder als Büngnersche Bänder bezeichnet (Seckel, 1990). Die Axone leiten innerhalb von Stunden die Regeneration von den Ranvierschen Schnürringen des proximalen Segments entlang der Büngnerschen Bänder ein (Sjoberg und Kanje, 1990). Ab dem zweiten Tag erfolgt eine Invasion von Makrophagen über die Basalmembran, ausgelöst durch Faktoren aus dem distalen Nervenstumpf. Die

Makrophagen phagozytieren innerhalb von zwei Wochen die Myelinreste. Es besteht die Meinung, dass die Schwannschen Zellen außerdem durch Sezernierung von Zytokinen, wie Interleukin-1, durch die Makrophagen zur Proliferation während der Wallerschen Degeneration veranlasst werden (Ide, 1996). Die Wallersche Degeneration im distalen Stumpf bewirkt zudem, dass die Schwannschen Zellen neurotrophe Faktoren produzieren. Die Synthese und Freisetzung neurotropher und chemotaktischer humoraler Faktoren aus Zellen des distalen Nervenstumpfs regen möglicherweise die Regeneration peripherer Nerven an. Diese Faktoren nehmen sowohl Einfluss auf das Wachstum als auch auf die Wachstumsrichtung (Lundborg, 1987). Das mRNA-Level an NGF steigt innerhalb der ersten 2 bis 3 Tage signifikant an. Nach 3 bis 4 Wochen erzielt der Anteil an mRNA von *brain-derived growth factor* (BDNF) sein Maximum (Brecknell und Fawcett, 1996; Stoll und Muller, 1999).

1.5 Die Rolle von JNK in der neuronalen Regeneration

JNK1 und 2, die in PC12-Zellen exprimiert werden, sind am Neuritenwachstum beteiligt (Riese et al., 2004; Waetzig und Herdegen, 2003b; Wooten et al., 1999; Yang et al., 1998). Transfektion von exogener JNK3-Isoform in PC12-Zellen verstärkt das NGF-induzierte Auswachsen von Neuriten (Waetzig und Herdegen, 2003a). In PC12-Zellen wurden alle drei JNK-Isoformen unter einer Induktion mit NGF verstärkt exprimiert (Waetzig und Herdegen, 2005b). Demnach hat auch JNK2 Einfluss auf zytoskelettale Funktionen (Waetzig et al., 2006), ebenfalls gezeigt an Hinterstrangganglienneuronen im Mausmodell (Barnat et al., 2010).

Ebenso wie durch NGF wird auch durch PAK, *p-21 activated Kinase*, das Neuritenwachstum durch Aktivierung von JNK beeinflusst (Daniels et al., 1998). Zwischen dem Auswachsen von Dendriten und der Elongation von Axonen wird in dieser Studie zum Neuritenwachstum jedoch nicht unterschieden. Staak konnte 2009 in vivo zeigen, dass eine axonale Reinnervation noch teilweise abläuft, obwohl eine JNK-Isoform (JNK 2) komplett inaktiviert wird.

An der Neuritenelongation und Neuritenorganisation sind neben c-Jun als Transkriptionsfaktor unzählige andere zytoplasmatische Substrate beteiligt (Waetzig et al., 2006).

JNK phosphoryliert STAT3 (*signal transducer and transcription factor 3*) (Levy und Lee, 2002). STAT3 wird nach Nervendurchtrennung aktiviert (Sheu et al., 2000).

Cytoplasmatische JNK-Substrate wie *microtubule-associated protein 2* (MAP2) oder die schwere Einheit des *neurofilament proteins* (NFH) sind entweder für die Neuritenelongation, die Stabilität oder beides von Bedeutung (Bjorkblom et al., 2005; Chang et al., 2003; Waetzig und Herdegen, 2003b). JNK schützt in Neuronen der *Drosophila* vor Destabilisierung und somit vor Degeneration und Überlänge eines Axons (Rallis et al., 2010). JNK-abhängig

induziert Endothelin, bekannt als vasokonstriktives Peptid, über den Endothelin A-Rezeptor Neuritenelongation von corticalen Neuronen (Uesugi et al., 2009). Außerdem trägt SCG10, ein neuronenspezifisches, membran-assoziiertes Protein, das distal im Wachstumskolben zu finden ist und ein weiteres Substrat von JNK1 und 3 ist, zur Regulierung der Organisation der Mikrotubuli bei (Neidhart et al., 2001; Tararuk et al., 2006).

Was die zeitliche Einflussnahme auf die Regeneration betrifft, so beeinflusst JNK die späte Reaktion des Neurons auf eine Nervendurchtrennung wie Formation und Stabilität, ERK1/2 das frühe Aussprossen der Neuriten (Xiao und Liu, 2003). In naiven PC12-Zellen war es nicht möglich, den einzelnen JNK-Isoformen bestimmte Stufen der Differenzierung zuzuordnen (Waetzig und Herdegen, 2003b).

Die Aktivität von JNK im Kern unterscheidet sich in neuronalen Zelllinien und Primärzellen: In PC12-Zellen wird die NGF-induzierte Neuritogenese im Wesentlichen durch aktiviertes c-Jun vermittelt (Dragunow et al., 2000; Leppa et al., 1998). In hippocampalen Neuronen ist die N-terminale Phosphorylierung von c-Jun herunterreguliert trotz gesteigerter Aktivität von JNK (Eminel et al., 2008).

Eine Nervendurchtrennung bewirkt eine schnelle und anhaltende Expression von c-Jun und seiner N-terminalen Phosphorylierung (Herdegen et al., 1998). Daraus lässt sich einerseits schließen, dass eine lang anhaltende Präsenz von JNK in diesen Neuronen eine Regeneration bewirkt und die Abnahme der JNK eine erfolgreiche Wiederherstellung der neuronalen Achse anzeigt. Andererseits wäre auch denkbar, dass sich JNK im Perikaryon eines sterbenden Neuronen anreichern und die Aktivität der JNK mit Untergang des Neurons abnimmt (Waetzig et al., 2006).

Für die regenerative Wirkung der JNK steht auch die Beobachtung, dass lokale Applikation von JNK-Inhibitoren die Regeneration von explantierten Neuronen des Hinterstrangs, des Ganglion nodosum und der Ganglien des Sympathikus hemmt (Lindwall et al., 2004; Lindwall und Kanje, 2005). Raivich et al. (2004) und Staak (2009) zeigten, dass c-Jun nach Durchtrennung des Nervus facialis für die Regeneration wichtig ist.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die Expression und Funktion der Neurotrophin- und der so genannten Todesrezeptoren sowie die MAPK-Signale nach experimenteller Neuritenläsion an der Ratten-Phäochromozytomzelllinie PC12 untersucht werden.

Im Einzelnen sollen folgende Sachverhalte geklärt werden:

1. Wie beeinflusst NGF das Auswachsen der Neuriten nach Neuritenläsion?
Wie werden die NGF-Rezeptoren exprimiert und welchen Einfluss haben sie auf das Neuritenwachstum?
2. Wie werden Fas und Fas-Ligand exprimiert und welche Auswirkungen haben sie auf das Zellüberleben und das Neuritenwachstum?
Welchen Einfluss haben Fas-Fc bzw. Superfas-Ligand auf das Zellwachstum und wie verändert die Kombination mit NGF ihre Expression?
3. Was sind die Aktivitätsmuster von ERK1/2 und JNK und deren Einfluss auf das Zellwachstum nach Neuritenläsion?
4. Wie verändert die Hemmung der Rezeptoren die Aktivität von ERK1/2 bzw. JNK?

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.).

Tab. 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Acrylamid	BioRad, München
Agarose SeaKem LE®	Biozym, Oldendorf
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagen	Biochrom, Berlin
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTPmix	Gibco Life Technologies, Eggenstein
DTT 0,1 M	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Dye Reagent	BioRad, München
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
FBS	Cambrex/Lonza, Basel
Glycin	Merck, Darmstadt
Horse Serum	Invitrogen, Karlsruhe
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg
Immobilon™ P 1500	Millipore, Eschborn
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Uelzena Milchwerke, Uelzen
Magnesiumchlorid, 50mM	Gibco Life Technologies, Eggenstein

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
NGF 2,5S	Almone labs/ICS, München
Oligo(dT)-Primer	Gibco Life Technologies, Eggenstein
PBS	Gibco Life Technologies, Eggenstein
PCR-Puffer (10x)	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life, Technologies, Eggenstein
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Deisenhofen
Prestained SDS-PAGE Standards	BioRad, München
Protease-Inhibitor, complete	Boehringer, Mannheim
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Trizol	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Merck, Darmstadt
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
Western Blot Chemoluminiscence Reagent Plus	NEN, Zaventem, Belgien

2.2 Herstellung und Sterilisation von Puffern und Lösungen

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 A. bidest. bezeichnet. Zu sterilisierende Lösungen wurden bei 120°C und 2 bar autoklaviert (Autoklav: Webeco DS 202). 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 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2 : Enzyme

Enzym	Funktion	Hersteller
RNase H	Abbau von RNA	Gibco Life Technologies, Eggenstein
SuperScript II RT	reverse Transkription von mRNA	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Taq-Polymerase	PCR-Amplifikation von cDNA-Abschnitten	Gibco Life Technologies, Eggenstein

2.4 Antikörper

In der Tabelle 3 sind die verwendeten Primärantikörper aufgelistet. Die verwendeten peroxidasegekoppelten IgG-Sekundärantikörper *goat-anti-rabbit* und *goat-anti-mouse* (beide: Dianova, Hamburg) waren beide gegen die leichte und die schwere Kette des entsprechenden Primärantikörpers gerichtet.

Tab. 3 : Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller
<i>anti-Fas</i>	Santa cruz, Heidelberg
<i>anti-β-Actin</i> (monoklonal, Maus)	Sigma, Deisenhofen
<i>anti-Fas-Ligand</i>	Santa cruz, Heidelberg
<i>anti-p75</i>	Santa cruz, Heidelberg
<i>anti-TrkA</i>	Santa cruz, Heidelberg
<i>anti-phospho-ERK1/2</i>	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
<i>anti-ERK1/2</i>	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
<i>anti-phospho-JNK</i> (polyklonal, Kaninchen)	Promega, Mannheim
<i>anti-total-JNK</i> (polyklonal, Kaninchen)	Cell Signaling Technologies, Frankfurt

2.5 Herkunft, Kultivierung und Differenzierung von PC12-Zellen

2.5.1 Herkunft der PC12-Zellen

In dieser Arbeit wurde die Zelllinie PC12 (ATCC/LGC-Promochem, Wesel) verwendet.

PC12-Zellen sind Phäochromozytomzellen aus der Ratte, die adhärent wachsen und sehr sauerstoffempfindlich sind (Kap. 1.3).

2.5.2 Kultivierung von PC12-Zellen

Alle Arbeitsschritte in der Zellkultur wurden unter der Sterilbank (Herasafe, Heraeus, Osterode) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen wurden vor der Benutzung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Verwendete Zellkulturschalen

Zur Kultivierung der PC12-Zellen wurden Kulturschalen aus Kunststoff (Nunc, Wiesbaden) mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet.

Beschichtung von Kulturschalen mit Collagen

Zur Kultivierung der PC12-ATCC-Zellen und für die Ausdifferenzierung von Zellen wurden collagenbeschichtete Kulturschalen benötigt. Die Beschichtung mit Collagen wurde wie folgt durchgeführt:

1 ml einer Collagenlösung (0,1 mg/ml in PBS) wurde in eine Kulturschale gegeben und der Boden mit Hilfe einer Pipette gleichmäßig benetzt. Das überschüssige Collagen wurde abgenommen und in eine weitere Schale gegeben. So verblieben auf dem Boden einer 10-cm-Schale etwa 300 µl der Collagenlösung. Anschließend wurden die Schalen zur Collagenbindung für 60 Min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Ungebundenes Collagen wurde nach dieser Inkubation mit PBS abgespült. Vor der Benutzung wurden die Schalen bei Raumtemperatur getrocknet.

Kulturbedingungen für PC12- Zellen

Die PC12-ATCC -Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert (Hera Cell, Heraeus, Osterode). Das Nährmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. In die 10 cm collagenbeschichteten Kulturschalen wurden 7 ml Medium RPMI 1640 (mit Glutamax) gegeben. Dem Medium wurden 10% Horse Serum, 5% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

2.5.3 Passage von PC12-Zellen

Tab. 4 : Zusammensetzung von 10 x PBS und Passage-EDTA

10 × PBS für Zellpassagen (Stammlösung)		Passage-EDTA	
Inhaltsstoff	Menge	Inhaltsstoff	Menge
NaCl	1,37 M	PBS für Zellpassagen	1 ×
KCl	0,03 M	EDTA	0,5 mM
Na ₂ HPO ₃	0,07 M	<i>Mit autoklaviertem A. bidest. angesetzt, bei 4°C gelagert.</i>	
KH ₂ PO ₃	0,02 M		

Autoklaviert, bei 4°C gelagert.

Die PC12-Zellen wurden folgendermaßen passagiert: Zur Zellvermehrung wurden ausschließlich 10-cm-Kulturschalen verwendet. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht hatten, wurden sie neu ausgesät. Hierbei wurde zunächst das Nährmedium mit Hilfe einer Saugpumpe (KNF Miniport, Omnilab, Bremen) aus der Kulturschale entfernt und die

Zellen mit 2 ml Passage-EDTA (siehe Tabelle 4) gewaschen. Nach erneuter Zugabe von 2 ml Passage-EDTA wurde die Kulturschale für 2 Min. bei 37°C (Brutschrank) inkubiert. Anschließend wurden in der Sterilbank 5 ml Komplettmedium hinzugegeben. Mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) wurden die Zellen von der Platte gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde mit Hilfe einer 10-ml-Pipette in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 1000 UpM (Labofuge GL, Heraeus, Osterode) wurde der Überstand mit der Saugpumpe entfernt. Anschließend wurde das Pellet mit Hilfe einer sterilen 5-ml-Spritze (Becton-Dickinson, Heidelberg) und einer Kanüle (21 gauge; Becton-Dickinson, Heidelberg) in 2 ml des jeweiligen Nährmediums (s. o.) resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 5 ml Medium und einem zweiten Vereinzlungsschritt wurden Aliquots der Zellsuspension in neue Kulturschalen mit vorgelegtem Nährmedium (s. o.) gegeben und die Zellen im Verhältnis 1:14 neu ausgesät. Die Aliquots der Zellsuspension umfassten bei den 10-cm-Schalen 500 µl.

2.5.4 Ausdifferenzierung von PC12-Zellen

Das Ausdifferenzieren der Zellen führte dazu, dass diese eine nervenzellähnliche Form annahmen und sich nicht mehr teilten. Die Zellen wurden auf collagenbeschichteten 10-cm-Platten ausgesät. Nach einem Kulturtag wurde eine Serumdeprivation zur Synchronisation der Zellzyklen durchgeführt. Hierbei wurde das jeweilige Komplettmedium abgesaugt und durch Medium ersetzt, dem nur 0,5% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt waren. Nach drei Tagen wurde das Medium ausgetauscht. Das neue Medium enthielt zusätzlich NGF 2,5 S in einer Konzentration von 50 ng/ml bzw. 10 ng/ml. Die Zellen wurden nun für eine Woche in NGF-haltigem Medium kultiviert, das alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Eine Woche nach Beginn der NGF-Behandlung konnten die Zellen für Versuche verwendet werden.

2.6 Einfrieren von PC12-Zellen

Tab. 5 : Zusammensetzung des Einfriermediums

Einfriermedium

Inhaltsstoff	Menge
Komplettmedium	80%
FBS	10%
DMSO	10%

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

Durchführung:

Zellen aus einer 10-cm-Kulturschale wurden gemäß dem Protokoll für die Zellpassage (Kap. 2.5.3) abgeschabt und pelletiert. Die Zellen wurden in 3 ml Einfriermedium (siehe Tabelle 5) sorgfältig resuspendiert und in 1-ml-Aliquots in 2-ml-Kryogefäße (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Die Gefäße wurden zunächst für 10 Min. bei Raumtemperatur und dann für 30 Min. auf Eis inkubiert. Das Einfrieren wurde in mehreren Stufen durchgeführt: Nach 45 Min. bei -20°C wurden die Zellen für einige Tage bei -80°C inkubiert und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

2.7 Bestimmung der Zellzahl bei PC12-Zellen

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 Intrazellulärraum derjenigen Zellen, deren Membranintegrität gestört ist. Sie nehmen die blaue Farbe der Umgebung an.

3 und 5 Tage nach Applikation der Stressoren wurden die stimulierten Zellen sowie eine Platte un behandelter Kontrollzellen gemäß dem Protokoll für die Zellpassage von den Kulturschalen gelöst und pelletiert (Kap. 2.5.3). 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 un behandelten Kontrolle ermittelt.

2.8 Neuritenläsion von differenzierten PC12-Zellen

Die folgende Neuritenläsionstechnik für differenzierte PC12-Zellen wurde nach Galbiati et al. (1998) durchgeführt. Die PC12-Zellen wurden mit NGF (50 ng/ml) in RPMI 1640 mit 0,5% FBS differenziert. Es wurde 1 Schale differenzierte Zellen benötigt, um 1 Schale Zellen mit Neuritenläsionen zu erhalten. Die differenzierten Zellen wurden nach 7 Tagen passagiert (s.o.). Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 1000 UpM (Labofuge GL, Heraeus, Osterode) wurde der Überstand mit der Saugpumpe entfernt. Die Pellets wurden in einer angemessenen Menge 0,5% Medium vereinigt (pro Platte 500 µl + 500 µl Rest). Anschließend wurde die Zellsuspension ca. 15x mit Hilfe einer sterilen 5-ml-Spritze und Kanüle resuspendiert, um die Neuriten zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden Aliquots der Zellsuspension in neue Kulturschalen mit vorgelegtem 0,5%igem Nährmedium mit NGF, Fas-Fc, Superfas-Ligand (SFL) oder Inhibitoren alleine oder in Kombination gegeben. Die Aliquots der Zellsuspension umfassten bei den 10 cm-Schalen 500 µl. Die folgenden Vorinkubationszeiten wurden für die Inhibitoren vor Zugabe von 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml NGF verwendet: K252a (100 nM und 200 nM; Calbiochem/Merck, Darmstadt) für 30 Min., Pep5 (100 nM und 1 µM; Calbiochem) für 30 Min., SP600125 (2 µM; Celgene, München) für 30 Min., UO126 (5 µM; Calbiochem) für 30 Min. Fas-Fc (4 µg/ml; R&D Systems, Wiesbaden) und SFL (100 ng/ml; Alexis/Axxora, Lörrach) wurden gleichzeitig mit NGF hinzugefügt. Das Verfahren der Neuritenläsion tötete nur wenige Zellen, die vor Durchführung der Experimente bei einem Mediumwechsel 24 h nach Neuritenläsion entfernt wurden. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung bestimmt (s. 2.7). Der Anteil der Zellen mit Neuriten, die dem 1,5 fachen Durchmesser des Zellkörpers entsprachen, wurde an Tag 1, 3 und 5 nach Neuritenläsion bestimmt. Dazu wurden mittels eines Inversmikroskops Aufnahmen der Zellen gemacht. Die Software LeicaQwin (Leica; Solms) wurde verwendet, um die Zellen zu zählen.

2.9 Herstellung von Gesamtzelllysaten

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

Tab. 6: Zusammensetzung des 2x Lysispuffers für Gesamtzelllysate (DLB)

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

Für die denaturierende Lyse wurde DLB-Puffer (siehe Tabelle 6) benutzt. Er wurde als zweifache Lösung bei Raumtemperatur gelagert. Die zweifache Lösung wurde vor der Benutzung 1:1 mit autoklaviertem A. bidest. verdünnt. Direkt vor der Lyse wurde dem Puffer 1% Phosphataseinhibitor 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 (Sonoplus GM 70, 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.

2.10 Bestimmung des Proteingehalts von Gesamtzellextrakten

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Gesamtzelllysate wurde *Dye Reagent* (BioRad; München) in einer Verdünnung von 1:5 mit A. 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 A. 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 Min. 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 2.10 berechnet:

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

Gleichung 2.10 : Berechnung der Proteinkonzentration K(P)

2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

2.11.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tab. 7: Zusammensetzung von Sammelgelpuffer, Trenngelpuffer, Elektrophorese-Stammlösung und Beladungspuffer

Sammelgelpuffer (4 ×)		Trenngelpuffer (4 ×)	
Inhaltsstoff	Menge	Inhaltsstoff	Menge
Tris	0,5 M (St.: 1 M, pH 6,8)	Tris	1,5 M (St.: 2 M, pH 8,8)
SDS	0,4% (St.: 10%)	SDS	0,4% (St.: 10%)

Bei 4°C gelagert.

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (10 ×)		Beladungspuffer	
Inhaltsstoff	Menge	Inhaltsstoff	Menge
Tris	0,25 M	Tris	0,06 M (St.: 1 M; pH 6,8)
Glycin	2 M	Glycerol	27,5% (St.: 50%)
SDS	0,03 M	SDS	2,2% (St.: 10%)
		β-Mercaptoethanol	5,5%
		Bromphenolblau	0,1% (St.: 1%)

Bei Raumtemperatur gelagert.

Bei 4°C gelagert.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf. Diese Auftrennung wird durch zwei miteinander verbundene Gelabschnitte ermöglicht, die unterschiedliche Zusammensetzungen und Funktionen haben: Im Sammelgel werden die Proteine zunächst zu Banden komprimiert und anschließend im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurde das Gelkammersystem Mini Protein III™ (BioRad, München) und ein diskontinuierliches Puffersystem nach Laemmli (1970) in einer vertikalen Anordnung verwendet. Die Proteine wurden stets in einem 12%igen Gel aufgetrennt. Die eingesetzten Mengen der Gelkomponenten in Abhängigkeit von der Geldicke sind in der Tabelle 8 aufgeführt.

Die beiden Gelabschnitte wurden nacheinander hergestellt. Die Gelmischungen wurden jeweils in einem 15-ml-Reaktionsgefäß angesetzt und nach der Zugabe des TEMED mit Hilfe einer

Kunststoffpipette (Eppendorf, Hamburg) zwischen die Glasplatten des Gelsystems gegeben. Auf das Trenngel wurden während des Polymerisationsvorgangs einige Tropfen A. bidest. pipettiert, die nach dem Auspolymerisieren wieder entfernt wurden. Sie sorgten für einen geraden Übergang zwischen Sammel- und Trenngel. Nach der vollständigen Polymerisation der Gelmatrizes wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und diese mit 1 × Elektrophoresepuffer (siehe Tabelle 7) gefüllt. Nach dem Entfernen des Kamms wurden alle Gelreste sorgfältig mit Hilfe einer Pipette aus den puffergefüllten Geltaschen entfernt.

Tab. 8: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die SDS-PAGE

Substanzen	Dicke des Gels		
	0,75 mm	1,0 mm	1,5 mm
<i>Für das Sammelgel:</i>			
Acrylamid (30%)	335 µl	447 µl	670 µl
A. bidest.	1 150 µl	1 535 µl	2 300 µl
Sammelgelpuffer (4 ×)	500 µl	650 µl	1 000 µl
APS (10%)	15 µl	20 µl	30 µl
Bromphenolblau (1%)	15 µl	20 µl	30 µl
TEMED (100%)	5 µl	5 µl	10 µl
<i>Für das Trenngel:</i>			
Acrylamid (30%)	2 000 µl	2 650 µl	4 000 µl
A. bidest.	1 750 µl	2 350 µl	3 500 µl
Trenngelpuffer (4 ×)	1 250 µl	1 650 µl	2 500 µl
APS (10%)	40 µl	53 µl	80 µl
TEMED (100%)	5 µl	5 µl	10 µl

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 5:1 mit Beladungspuffer (siehe Tabelle 7) versetzt und der Größenmarker (Prestained SDS-PAGE Standards, broad range; BioRad, München) im Verhältnis 1:5 mit A. bidest. verdünnt. Anschließend wurden die Proben für 5 Min. bei 95°C (Heizblock) inkubiert, der Marker nur für 1 Min. Die Geltaschen wurden je nach Geldicke mit einer Probenmenge von 10–60 µl befüllt. Die Elektrophorese wurde in beiden Geräten (s. o.) für die ersten 30 Min. bei 15 mA pro Gel durchgeführt. Nachdem die Proben in das Trenngel gelaufen waren, wurde die Stromstärke auf 30 mA pro Gel erhöht.

2.11.2 Western Blot

Tab. 9: Zusammensetzung von 10 x TBS (Stammlösung), TTBS, Kathodenpuffer, Blocking solution, Anodenpuffer I und II

10 x TBS (Stammlösung)		TTBS	
Inhaltsstoff	Menge	Inhaltsstoff	Menge
Tris/HCl	1 M; pH 7,5	TBS	1 x
NaCl	1,5 M	Tween-20	0,1%
<i>Bei 4°C gelagert.</i>		<i>Frisch angesetzt.</i>	

Kathodenpuffer		Blocking solution	
Inhaltsstoff	Menge	Inhaltsstoff	Menge
Tris	25 mM	Magermilchpulver in TTBS	4%
Aminhexansäure	40 mM		
SDS	0,01% (St.: 10%)	<i>Bei 4°C gelagert.</i>	
Methanol	20%		
<i>Bei Raumtemperatur gelagert.</i>			

Anodenpuffer I		Anodenpuffer II	
Inhaltsstoff	Menge	Inhaltsstoff	Menge
Tris	30 mM	Tris	300 mM
Methanol	20%	Methanol	20%
<i>Bei Raumtemperatur gelagert.</i>		<i>Bei Raumtemperatur gelagert.</i>	

Nach einer SDS-PAGE im 12%igen Gel (Kap. 2.11.1) wurden die untersuchten Proteine im Western Blot qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Um alle Proteine nachweisen zu können, wurden mindestens 20 µg Protein eingesetzt. Die Proteine wurden mit Hilfe einer *Semi-dry*-Blot-Apparatur (Pegasus, Phase, Lübeck) auf eine PVDF-Blotmembran (ImmobilonTMP 1500; Millipore, Eschborn) transferiert.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und für kurze Zeit im Kathodenpuffer (siehe Tabelle 9) aufbewahrt. Die Blotmembran wurde für 3 Min. in Methanol aktiviert und anschließend in ein Gefäß mit A. bidest. überführt. Nachdem die Blotmembran in A. bidest. abgesunken war, wurde sie in den Anodenpuffer I (siehe Tabelle 9) überführt und darin bis zur Verwendung zwischengelagert.

Zum Aufbau der Blot-Anordnung wurden folgende Schichten auf einer Plexiglasplatte aufeinandergestapelt (in Klammern jeweils der Puffer, in dem sie getränkt worden waren): sechs Lagen Filterpapier (Anodenpuffer II); drei Lagen Filterpapier (Anodenpuffer I); aktivierte Blotmembran (Anodenpuffer I); Gel (Kathodenpuffer); sechs Lagen Filterpapier (Kathodenpuffer). Dieser Stapel wurde anschließend um 180° gedreht und in die Blot-Apparatur eingesetzt, so dass die mit dem Kathodenpuffer getränkte Schicht auf der Kathodenplatte der Blot-Apparatur lag.

Die Proteine wurden bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 60 Min. geblottet. Anschließend wurde die Blotmembran in eine geringe Menge TTBS (siehe Tabelle 9) auf einer Plexiglasplatte überführt, wo überflüssige Teile der Membran mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt wurden. Alle folgenden Inkubationsschritte fanden auf einem Schüttler statt. Der proteintragende Membranabschnitt wurde für 20 Min. in TTBS und anschließend für 60 Min. in *blocking solution* (siehe Tabelle 9) gewaschen. Nach dem Entfernen der *blocking solution* wurde die Membran über Nacht mit einer Lösung des Primärantikörpers inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran nach dem Entfernen der Antikörperlösung einmal für 15 Min. und zweimal für 5 Min. mit TTBS gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper dauerte 30 Min. Zum Abschluss wurde der Blot einmal für 15 Min. und viermal für 5 Min. mit TTBS gewaschen. Die empirisch bestimmten optimalen Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper in TTBS werden bei den jeweiligen Ergebnissen genannt. Alle folgenden Arbeitsschritte fanden in der Dunkelkammer statt.

Die gewaschene Blotmembran wurde auf ein Stück Folie überführt und überschüssiger Puffer entfernt. Dann wurde die Membran mit ECL-Reagenz (Western Blot Chemoluminescence Reagent Plus) für die Substratreaktion der Peroxidase bedeckt. Nach 1 Min. Inkubation wurde das Reagenz sorgfältig entfernt. Die Blotmembran wurde in Folie eingeschlagen, in eine Filmkassette geklebt und die Signale auf Hyperfilm™ ECL detektiert. Die Detektionsdauer richtete sich nach der Proteinmenge auf der Blotmembran.

2.11.3 Strippen von Western Blot-Membranen

Tab. 10: Zusammensetzung der Stripping Solution

Stripping Solution

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

Bei Raumtemperatur gelagert.

Das Strippen einer Blotmembran diente dazu, die Komplexe aus Primär- und Sekundärantikörpern von der Membran zu entfernen, um die Proteine wieder für einen Primärantikörper zugänglich zu machen. Zunächst wurde die Membran für 30 Min. bei 50°C auf einem Schüttler in der *stripping solution* (siehe Tabelle 10) inkubiert. Anschließend wurde die *stripping solution* sorgfältig entfernt und die Membran zweimal für 10 Min. in TTBS (Kap. 2.11.2) gewaschen. Die gewaschene Membran wurde für 60 Min. in *blocking solution* inkubiert und war dann bereit für eine erneute Primärantikörper-Inkubation (Kap. 2.11.2).

2.12 Untersuchung von Transkriptionsraten durch RT-PCR

2.12.1 RNA-Präparation

Tab. 11: Zusammensetzung von DEPC-Wasser

DEPC-Wasser

Inhaltsstoff	Menge
DEPC	0,1%

Bei 4°C gelagert.

Zunächst wurde das Nährmedium aus den Zellkulturschalen abgesaugt, die Schalen einmal mit PBS gewaschen und das PBS sorgfältig entfernt. Anschließend wurde in die 10-cm-Schalen 3 ml Trizol gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst und jeweils 1 ml der entstandenen Zellsuspension in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Pro Schale wurde ein 1-ml-Aliquot weiterverarbeitet.

Zu jedem Aliquot wurden 200 μ l Chloroform pipettiert und die Ansätze für 15 Sek. geschüttelt. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 13 000 UpM und 4°C (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode). Die obere,

wässrige Phase (ca. 500 μ l) wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ l Isopropanol versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Ansätze für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Min. bei 13 000 UpM und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge s. o.) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 75%igem Ethanol aufgenommen, mit Hilfe eines Vortex gelöst und die entstandene Lösung für 5 Min. bei 9 200 UpM und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge s. o.). Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet für ca. 15 Min. bei 37°C (Heizblock) getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 30 μ l DEPC-Wasser (siehe Tabelle 11) aufgenommen und bei Raumtemperatur gelöst.

Die RNA-Konzentration und das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} wurden in Quarzküvetten (Merck Eurolab, Darmstadt) mit Hilfe eines Photometers (Spectrophotometer U-2000, Hitachi, Wiesbaden) bestimmt. Als Kontrollwert diente eine Quarzküvette mit A. bidest.

2.12.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden 5 μ g RNA benötigt, die in 11 μ l DEPC-Wasser (Kap. 2.12.1) gelöst vorliegen sollten. Wenn die RNA-Konzentration unter den erforderlichen 0,45 μ g/ μ l lag, wurde die RNA-Lösung in PCR-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben, in der Speedvac (Alpha1-4, Merck Eurolab, Darmstadt) eingedampft und die entstandenen Pellets in 11 μ l DEPC-Wasser aufgenommen. Lag die RNA-Konzentration über 0,45 μ g/ μ l, wurde ein Volumenäquivalent von 5 μ g RNA eingesetzt und die Differenz zu 11 μ l mit DEPC-Wasser ausgeglichen. Den 11 μ l RNA-Lösung wurde jeweils 1 μ l Oligo(dT)-Primer-Lösung hinzugefügt.

Zum Lösen der eingedampften RNA-Proben wurden die Ansätze für 10 Min. bei 70°C in das PCR-Gerät gestellt (Personal Cycler, Biometra, Göttingen), in dem auch alle folgenden Inkubationen durchgeführt wurden. Anschließend wurde jeder Probe ein Reaktionsgemisch hinzugefügt, das aus folgenden Komponenten bestand: 2 μ l 10 \times PCR-Puffer, 2 μ l 25 mM $MgCl_2$ (aus 50 mM, Gibco Life Technologies, Eggenstein), 1 μ l 10 mM dNTP-mix und 2 μ l 0,1 M DTT. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 42°C im PCR-Gerät wurden die Ansätze durch 1 μ l SuperScript II RT vervollständigt und zunächst für 50 Min. bei 42°C, dann für 15 Min. bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 μ l RNase H pro Ansatz folgte eine 20minütige Inkubation bei 37°C. Die hergestellten cDNA-Proben wurden bei 20°C gelagert oder sofort für eine PCR verwendet.

2.12.3 Primer-Design

Mit Hilfe des Programms „Primer 3 Software Distribution“ (Whitehead Institute / Howard Hughes Medical Institute, USA) wurden PCR-Primer für die mRNAs von Fas, Fas-Ligand (FasL), p75 und TrkA entwickelt. Die DNA-Sequenzen wurden aus der Datenbank des National Center for Biotechnological Information entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Accession-No. Fas D26112.1, FasL NM_012908.1, p75 NM_012610.1, TrkA NM_021589.1.).

2.12.4 cDNA-PCR

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die PCR-Parameter unterschieden sich bei den zu amplifizierenden cDNAs. In den folgenden Abschnitten sind die Primer, Pipettierschemata und PCR-Programme für die einzelnen Amplifikationen dargestellt. Die PCR wurde stets im selben PCR-Gerät durchgeführt (Personal Cycler; Biometra, Göttingen).

- **PCR für die Fas-cDNA**

Primer:

Fas-*sense*: 5'-TCTTTGAGGGTTTGGAGTTGA-3'

Fas-*antisense*: 5'-ATTTGGTGTTGCTGGTTCGT-3'

Produktgröße: 405 bp

Annealing-Temperatur: 62°C

Reaktionsgemisch für eine Probe:**PCR-Programm:**

Lösungen	Mengen [μ l]	Schritt	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit [Min.]	
10 \times PCR-Puffer	5	1	95	5	
50 mM MgCl ₂	2	2	95	1	} 25Zyklen
dNTPmix	1	3	62	1	
Primer <i>sense</i>	1	4	72	45 sec.	
Primer <i>antisense</i>	1	5	72	10	
DEPC-Wasser	37,75	6	4	∞	
Taq-Polymerase	0,25				
cDNA-Lösung	2				

- **PCR für die Fas-Ligand-cDNA**

Primer:Fas-Ligand-*sense*: 5'-CACTTCTCCTTGGGCTCCTC-3'Fas-Ligand-*antisense*: 5'-CACACTCCTTGGCTTTTTGG-3'

Produktgröße: 373 bp

Annealing-Temperatur: 61 $^{\circ}$ C**Reaktionsgemisch für eine Probe:****PCR-Programm:**

Lösungen	Mengen [μ l]	Schritt	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit [Min.]	
10 \times PCR-Puffer	5	1	95	5	
50 mM MgCl ₂	1	2	95	1	} 26Zyklen
dNTPmix	1	3	61	1,5	
Primer <i>sense</i>	1	4	72	1	
Primer <i>antisense</i>	1	5	72	10	
DEPC-Wasser	38,75	6	4	∞	
Taq-Polymerase	0,25				
cDNA-Lösung	2				

- **PCR für die p75-cDNA**

Primer:

p75-sense: 5'-TACTACCAGGACGAGGAGACTG-3'

p75-antisense: 5'-GATGGAGCAATAGACAGGAATG-3'

Produktgröße: 438 bp

Annealing-Temperatur: 57°C

Reaktionsgemisch für eine Probe:

PCR-Programm:

Lösungen	Mengen [μ l]	Schritt	Temp. [°C]	Zeit [Min.]	
10 × PCR-Puffer	5	1	94	5	
50 mM MgCl ₂	2	2	94	1	} 20Zyklen
dNTPmix	1	3	57	1	
Primer <i>sense</i>	1	4	72	0,5	
Primer <i>antisense</i>	1	5	72	10	
DEPC-Wasser	37,75	6	4	∞	
Taq-Polymerase	0,25				
cDNA-Lösung	2				

- **PCR für die TrkA-cDNA**

Primer:

TrkA-sense: 5'-CTCAGTCACCTGAATCTCTCCT-3'

TrkA-antisense: 5'-TTCTTCTTCTTGAGATCACTGG-3'

Produktgröße: 443 bp

Annealing-Temperatur: 55°C

Reaktionsgemisch für eine Probe:**PCR-Programm:**

Lösungen	Mengen [μ l]	Schritt	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit [Min.]	
10 \times PCR-Puffer	5	1	94	5	
50 mM MgCl ₂	2	2	94	1	} 23Zyklen
dNTPmix	1	3	55	1	
Primer <i>sense</i>	1	4	72	0,5	
Primer <i>antisense</i>	1	5	72	10	
DEPC-Wasser	37,75	6	4	∞	
Taq-Polymerase	0,25				
cDNA-Lösung	2				

2.12.5 Analyse der PCR-AmplifikateTab.12: Zusammensetzung von 10 \times TBE-Puffer (Stammlösung) und 1 \times TBE (Laufpuffer)

10 \times TBE-Puffer (Stammlösung)		1 \times TBE (Laufpuffer)	
Inhaltsstoff	Menge	Inhaltsstoff	Menge
Tris	0,9 M	Tris	90 mM
Borsäure	0,9 M	Borsäure	90 mM
EDTA	20 mM	EDTA	2 mM

Autoklaviert, bei Raumtemperatur gelagert.

Frisch aus der Stammlösung angesetzt.

Aus jedem PCR-Ansatz wurden 20 μ l entnommen, mit 5 μ l Beladungspuffer vermischt und auf ein 1,5%-Agarosegel aufgetragen, das mit 1 \times TBE-Puffer (siehe Tabelle 12) und 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid hergestellt worden war. Als Größenmarker wurde eine 100-Bp-Leiter (Gibco Life Technologies, Eggenstein) eingesetzt. Die Proben wurden für 150 Min. einer Gelelektrophorese bei 80 V (Sunrise™; Gibco Life Technologies, Eggenstein) unterworfen. Anschließend wurden die ethidiumbromidgefärbten DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator (Biometra, Göttingen) sichtbar gemacht und mit einem Auswertungssystem der Firma Intas (Göttingen) digital erfaßt.

2.13 Statistik und Wiederholungsrate

Die statistische Signifikanz der normal verteilten Ergebnisse wurde mittels t-Test für die unabhängigen Proben bestimmt. Die entsprechenden Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Alle Experimente und Messmethoden wurden mindestens dreimalig wiederholt. Das Signifikanzniveau wurde festgelegt für $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu sichern, wurden alle Experimente mindestens dreimal wiederholt. Alle Versuche wurden mit differenzierten PC12-Zellen durchgeführt. Da bei den Untersuchungen zur Transkriptionsaktivität lediglich RT-PCR-Amplifikate und keine Gene oder Vollängen-mRNAs analysiert wurden, wird bei der Darstellung der Ergebnisse auf die formale Differenzierung zwischen Gen und Genprodukt verzichtet.

3.1 NGF-induziertes Neuritenwachstum und NGF-Rezeptorexpression in PC12-Zellen nach Neuritenläsion

Der erste Schritt der vorliegenden Arbeit war die Messung des Neuritenwachstums nach Neuritenläsion. Des Weiteren wurde der Zusammenhang von Expression der NGF-Rezeptoren und dem Neuritenwachstum untersucht.

Die PC12-Zellen wurden nach Neuritenläsion zum Vergleich des Neuritenwachstums mit unterschiedlicher NGF-Konzentration inkubiert. Die Regeneration der Neuriten war dosisabhängig: nach fünf Tagen hatten nur 28% der Zellen, die mit 10 ng/ml NGF behandelt worden waren, neue Neuriten ausgebildet, im Vergleich zu 66% bei den Zellen, die mit 50 ng/ml NGF stimuliert worden waren (Abb. 2A). Demnach steigerte 50 ng/ml NGF das Neuritenwachstum signifikant im Vergleich zu 10 ng/ml NGF.

Die Analyse der Expression der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} zeigte, dass beide Rezeptoren dauerhaft nachweisbar waren, jedoch ungeachtet des Grades der Differenzierung. Die NGF-Stimulation steigerte die Expression von TrkA und p75^{NTR} im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Interessanterweise war der Expressionsanstieg der beiden NGF-Rezeptoren stärker auf Proteinebene sichtbar als auf RNA-Ebene (Abb. 2B, C). Möglicherweise ist eher eine verminderte Degradation dafür verantwortlich als eine gesteigerte Transkription. Das Hinzufügen von 10 ng/ml NGF führte zu einer geringen Hochregulation der beiden Rezeptoren im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 2B, C). Eine deutlich stärkere Expression der NGF-Rezeptoren nach Inkubation mit 50 ng/ml NGF, wie zu erwarten, ließ sich in unseren Ergebnissen jedoch nicht eindeutig anhand der qualitativen Auswertung zeigen.

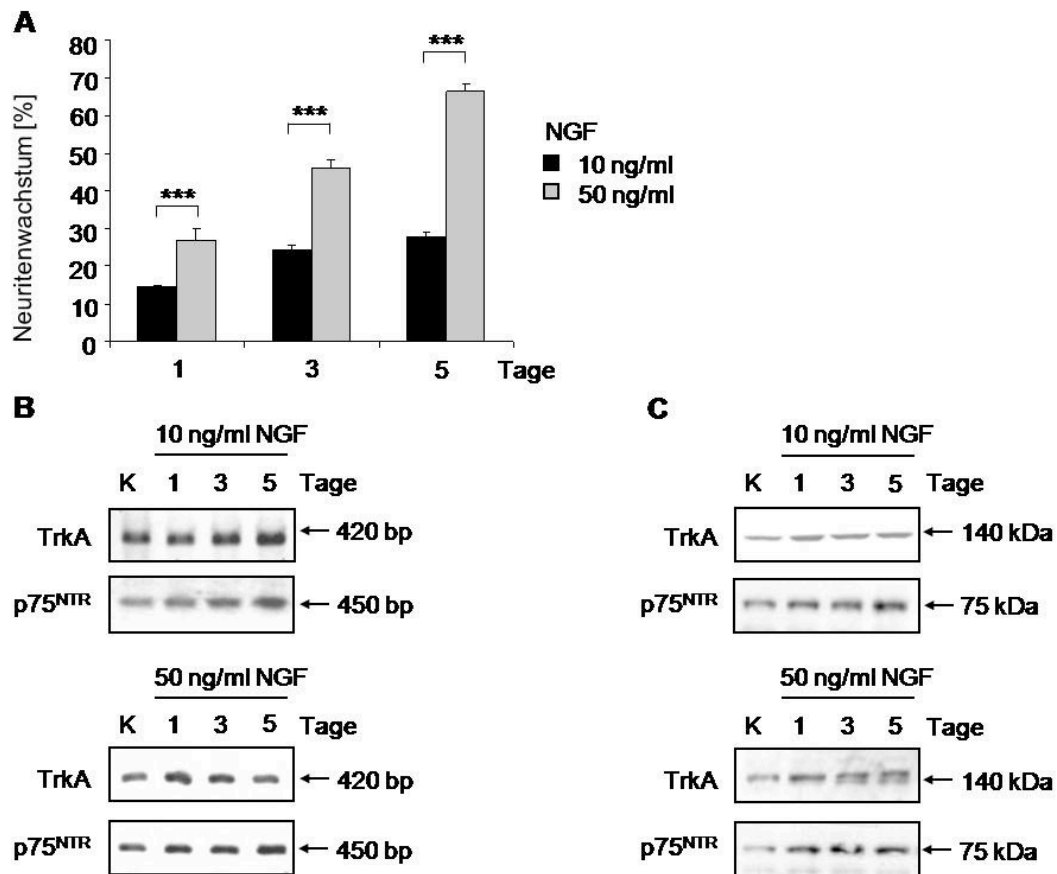


Abb. 2 : Einfluss von NGF auf Neuritenwachstum und auf Expression der NGF-Rezeptoren nach Schädigung der PC12 Zellen.

(A): Neuritenwachstum in % (Anteil neuritentragender Zellen) einen Tag, drei und fünf Tage nach Neuritenläsion nach Behandlung mit 10 ng/ml NGF im Vergleich zu 50 ng/ml NGF.

(B): Vergleich der Expression der NGF-Rezeptoren auf RNA-Ebene zwischen Kontrolle, Zugabe von 10 ng/ml NGF bzw. 50 ng/ml NGF einen Tag, drei und fünf Tage nach Neuritenläsion.

(C): Vergleich der Expression der NGF-Rezeptoren auf Proteinebene zwischen Kontrolle, Zugabe von 10 ng/ml NGF bzw. 50 ng/ml NGF einen Tag, drei und fünf Tage nach Neuritenläsion.

K = undifferenzierte Kontrolle; *** = $p < 0.001$ verglichen werden 10 ng/ml und 50 ng/ml NGF.

Um herauszufinden, ob beide NGF-Rezeptoren für die Neuritenregeneration notwendig waren, wurden Rezeptor-spezifische Inhibitoren verwendet. K252a, ein TrkA-Inhibitor, senkte die Zahl neuritentragender Zellen signifikant und dosisabhängig, während die Inhibierung von $p75^{\text{NTR}}$ durch Pep5 das Neuritenwachstum nicht wesentlich beeinflusste (Abb. 3).

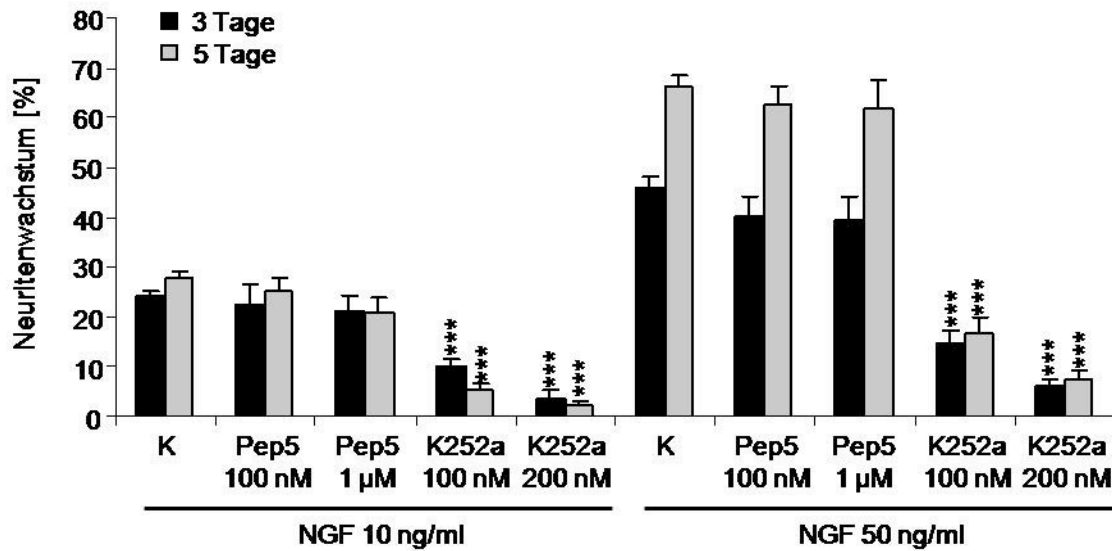


Abb. 3: Effekte des TrkA-Inhibitors K252a und des $p75^{\text{NTR}}$ -Inhibitors Pep5 auf das Neuritenwachstum.

Neuritenwachstum in % (Anteil neuritentragender Zellen) drei und fünf Tage nach Neuritenläsion. Verglichen wurden mit 10 ng/ml NGF oder mit 50 ng/ml NGF behandelte Kontrollen mit Zellen, die zuvor mit dem $p75^{\text{NTR}}$ -Inhibitor Pep5 oder dem TrkA-Inhibitor K252a vorinkubiert wurden.

K = NGF-behandelte Kontrolle; *** = $p < 0.001$ verglichen mit 10 ng/ml oder mit 50 ng/ml NGF-behandelter Kontrolle.

3.2 Expression und Effekte von Fas und Fas-Ligand

Todesrezeptoren können neuronale Differenzierung und Regeneration vermitteln (Desbarats et al., 2003). Fas und Fas-Ligand können beide nach Zellstress in differenzierten PC12-Zellen induziert werden (Le-Niculescu et al., 1999). Zu klären war, ob Fas und Fas-Ligand an der Neubildung der Neuriten nach Neuritenläsion über den NGF-Signalweg beteiligt sind.

10 ng/ml und 50 ng/ml NGF steigern beide die Expression von Fas und Fas-Ligand auf Proteinebene (Abb. 4A). Die Induktion von Fas und Fas-Ligand war nach Stimulation mit 10 ng/ml NGF leicht verzögert. Ein deutlicher Anstieg zeigte sich nach drei Tagen, wohingegen 50 ng/ml NGF die Expression von Fas und Fas-Ligand schon nach einem Tag förderten (Abb. 4A).

Der nächste Schritt prüfte die Wirkung des Fas-Systems auf das Neuritenwachstum. Fas-Fc, ein Inhibitor der Fas-Signaltransduktion, hemmte die NGF-induzierte Neuritenbildung. Eine Co-Stimulation mit NGF und dem Fas-Agonisten Superfas-Ligand (SFL) hatte entgegen der Erwartung keinen zusätzlichen Effekt auf das NGF-induzierte Neuritenwachstum. (Abb. 4B).

Da Superfas-Ligand allein das Neuritenwachstum in Hinterwurzelganglien in einem ähnlichen Ausmaß induziert wie NGF (Desbarats et al., 2003), wurde untersucht, ob eine Fas-Ligation die NGF-Stimulation in unserem Modell ersetzen könnte. Interessanterweise induzierte SFL allein das Neuritenwachstum signifikant (39% (Tag 3) und 55% (Tag 5)), wenngleich signifikant geringer als NGF allein (46% (Tag 3) und 66% (Tag 5)). Wenn die Fas-Ligation durch Fas-Fc blockiert wurde, wurde das Neuritenwachstum signifikant reduziert (23% (Tag 3) und 38% (Tag 5)). Dies zeigt, dass Fas-Ligation zwar das Neuritenwachstum unterstützt, wenn auch nicht in demselben Ausmaß wie NGF (Abb. 4C).

Bei verminderter Neuritenbildung nach Behandlung mit Fas-Fc und Superfas-Ligand im Vergleich zur Stimulation mit 50 ng/ml NGF stellte sich die Frage, ob die geringere Neuritenwachstumsrate eine Folge der reduzierten Zelllebensfähigkeit war. Alle Zellen, die mit NGF nach der Schädigung kultiviert wurden, entwickelten keinen signifikanten Verlust an Lebensfähigkeit. Mehr als 80% der Zellen überlebten die Behandlung mit Fas-Fc und Superfas-Ligand (Abb. 4D), was darauf hindeutet, dass die zusätzliche NGF-Stimulation einen positiven Effekt auf das Zellüberleben hatte, aber eine Inkubation ohne NGF nicht notwendigerweise zum Zelltod führte.

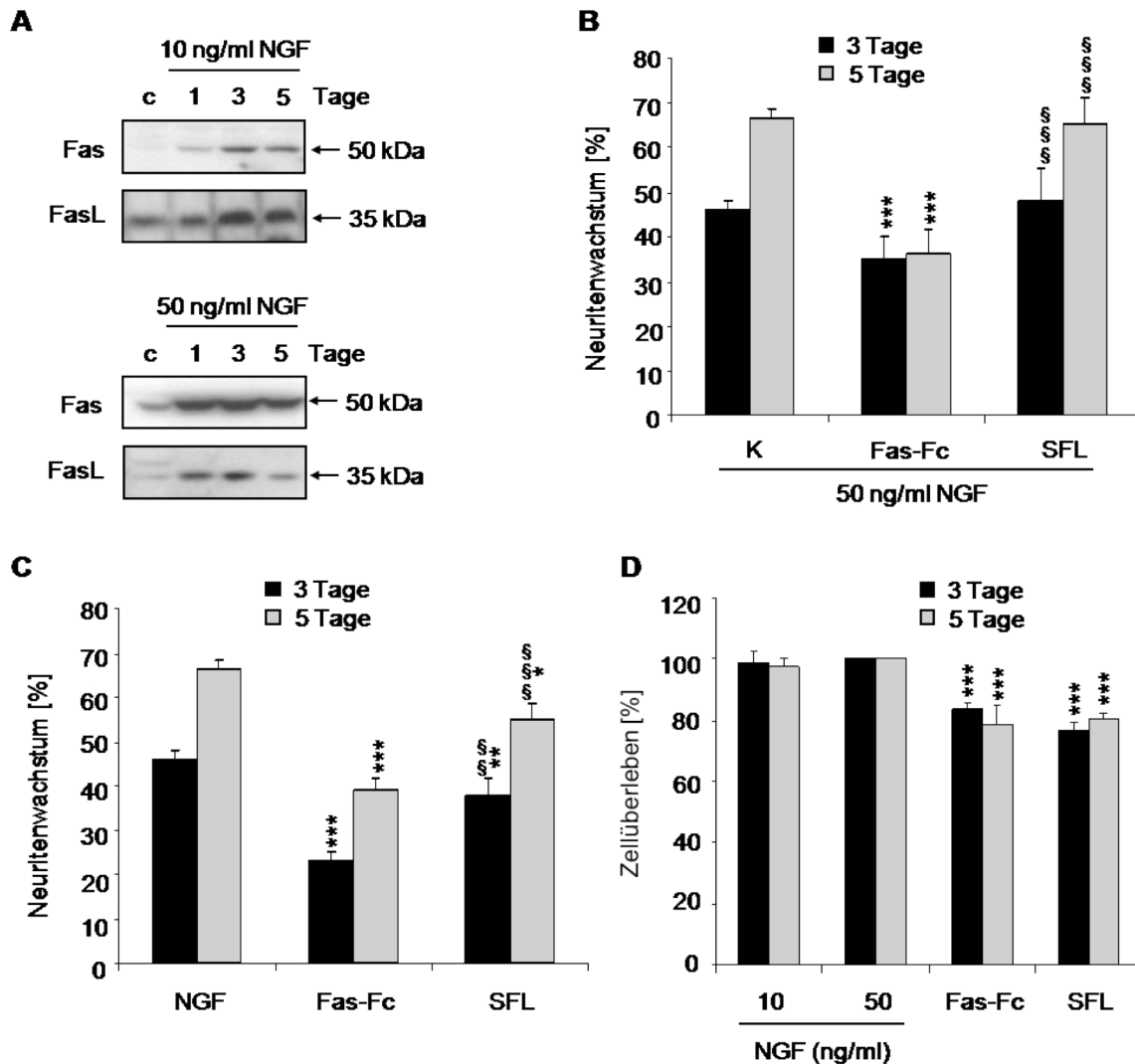


Abb. 4: Einfluss von Fas und Fas-Ligand auf das Neuritenwachstum.

(A): Expression von Fas und Fas-Ligand nach Inkubation mit 10 ng/ml oder 50 ng/ml NGF einen Tag, drei und fünf Tage nach Neuritenläsion. K = Kontrolle.

(B): Neuritenwachstum in % (Anteil neuritentragender Zellen) drei und fünf Tage nach Neuritenläsion für K = mit 50 ng/ml NGF behandelte Kontrolle, nach Hinzugabe des Fas-Inhibitors Fas-Fc (4 μ g/ml) zu den mit 50 ng/ml stimulierten Zellen und nach Co-Stimulation mit Superfas-Ligand (SFL, 100 ng/ml) und 50 ng/ml NGF.

(C): Neuritenwachstum in % (Anteil neuritentragender Zellen) drei und fünf Tage nach Neuritenläsion nach Stimulation mit Fas-Fc oder Superfas-Ligand im Vergleich zu 50 ng/ml NGF.

(D): Zellüberleben drei und fünf Tage nach Neuritenläsion nach Inkubation mit Fas-Fc oder Superfas-Ligand im Vergleich zu 10 ng/ml und 50 ng/ml NGF.

K = Kontrolle, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ verglichen mit 50 ng/ml NGF;

§§ = $p < 0.01$, §§§ = $p < 0.001$ verglichen mit 4 μ g/ml Fas-Fc.

3.3 Die Aktivierung der MAPK nach Neuritenläsion der PC12 Zellen

Da MAPK eine zentrale Rolle für die Neuritenregeneration spielen (Desbarats et al., 2003; Waetzig and Herdegen, 2005b), wurde die Expression und die Aktivierung der ERK1/2 und JNK nach experimenteller Neuritenläsion untersucht, da wenig bekannt ist, was JNK genau machen. ERK1/2 wurden durch 10 ng/ml und 50 ng/ml NGF gleich stark aktiviert (Abb. 5A). JNK wurden unter 10 ng/ml NGF nach drei und fünf Tagen nur leicht aktiviert, wohingegen 50 ng/ml NGF eine starke JNK-Aktivierung induzierten (Abb. 5B).

Eine weitere Frage war, ob sich die Aktivierung der Kinasen ändert. Es konnten hier keine Veränderungen in der Expression der Kinasen beobachtet werden (Abb. 5A und B).

Da die Effekte der MAPK untersucht werden sollten, wurden Kinaseinhibitoren verwendet. Die Inhibierung von ERK1/2 durch UO126 (5 μ M) und eine Inhibierung von JNK durch SP600125 (2 μ M) reduzierten die Wirkung von NGF auf das Neuritenwachstum signifikant (Abb. 5C).

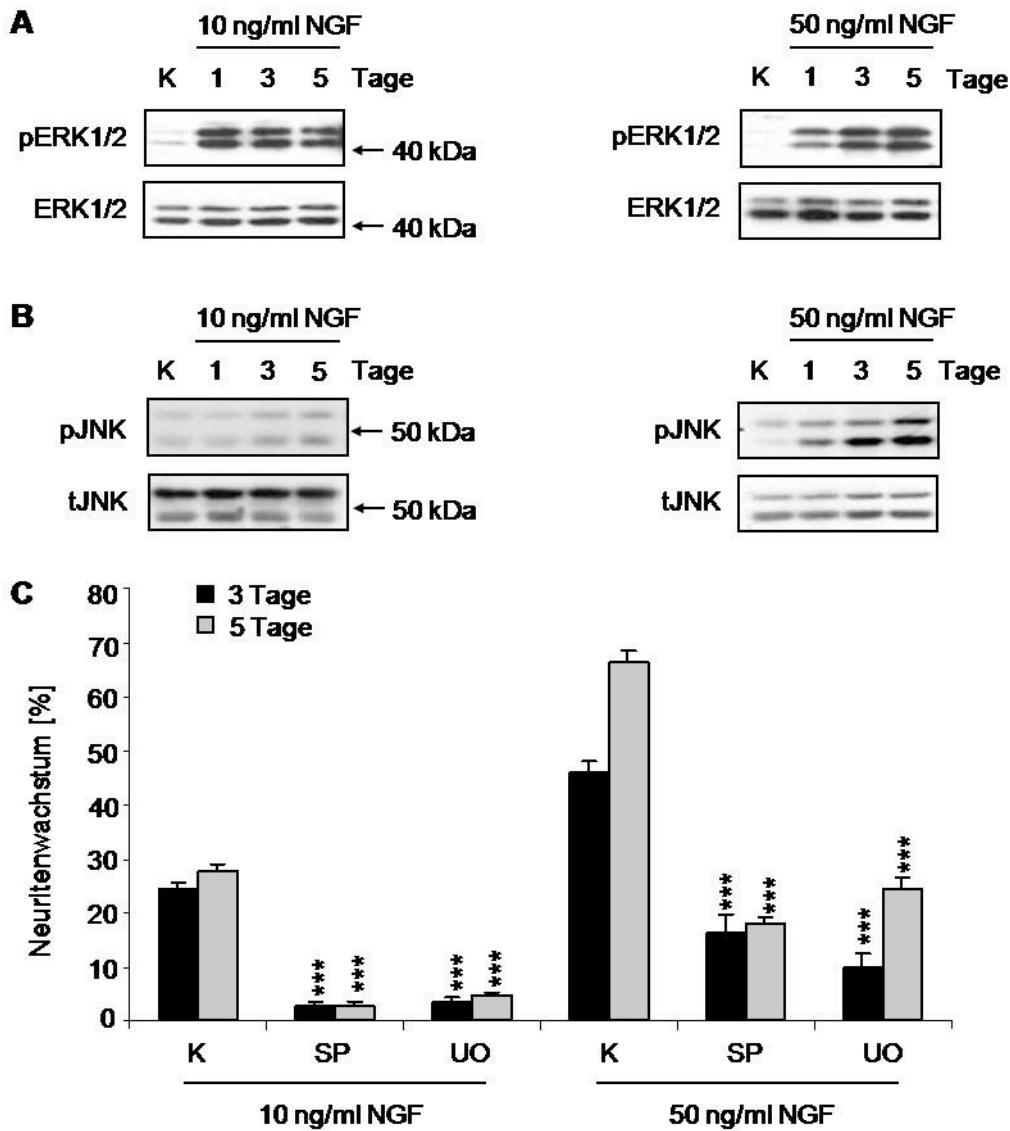


Abb. 5: Expression von ERK1/2 und JNK in Antwort auf NGF nach Neuritenläsion.

(A) Expression von *phospho*ERK1/2 und ERK1/2 einen Tag, drei und fünf Tage nach Neuritenläsion nach Inkubation mit 10 ng/ml NGF oder 50 ng/ml NGF.

(B) Expression von *phospho* und *total* JNK einen, drei und fünf Tage nach Neuritenläsion nach Inkubation mit 10 ng/ml NGF oder 50 ng/ml NGF.

(C) Neuritenwachstum (Anteil neuritentragender Zellen) in % drei und fünf Tage nach Neuritenläsion nach Inhibition beider Kinasen im Vergleich zur mit NGF behandelten Kontrolle.

K = Kontrolle; SP = SP600125 (JNK-Inhibitor); UO = UO126 (ERK-Inhibitor);

*** = $p < 0.001$ verglichen mit NGF behandelter Kontrolle.

3.4 ERK1/2- und JNK-Aktivität nach Rezeptorinhibition

Abschließend blieb die Frage, welche Rolle ERK1/2 und JNK für die TrkA- und Fas-Signalkaskade nach PC12-Zellschädigung spielten. Zunächst wurde die Aktivierung beider Kinasen nach TrkA-Inhibition durch K252a untersucht. Interessanterweise wurde die Aktivierung von ERK1/2 nicht durch K252a beeinflusst, wohingegen die JNK-Phosphorylierung dosisabhängig gesenkt wurde (Abb. 6A).

Die Co-Stimulation mit NGF (50 ng/ml) und Superfas-Ligand (100 ng/ml) aktivierte ERK1/2 und JNK in einem ähnlichen Ausmaß wie NGF allein (Abb. 6B). Allerdings führte die Co-Stimulation mit Fas-Fc (4 ng/ml) und 50 ng/ml NGF zu einer reduzierten Phosphorylierung der ERK1/2 und JNK im Vergleich zu NGF allein (Abb. 6B).

Da das Hinzufügen von Superfas-Ligand zu NGF die Aktivität von ERK1/2 und JNK nicht veränderte, wurde untersucht, ob die Neuritenbildung dennoch durch beide Signalwege in einem ähnlichen Ausmaß induziert würde. Hier gab es Unterschiede: die Vorinkubation mit dem JNK-Inhibitor SP600125 senkte (vor Zugabe von NGF und SFL) das Neuritenwachstum signifikant und effizienter als die Vorinkubation mit dem ERK-Inhibitor UO126 (Abb. 6C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ERK1/2 und JNK durch NGF aktiviert wurden. Im Gegensatz zu ERK1/2 wurde die JNK-Phosphorylierung durch eine TrkA-Inhibition abgeschwächt. Gleichermaßen bewirkte die Co-Stimulation mit SFL und NGF eine Aktivierung der ERK1/2 und JNK. Allerdings war die Neuritenbildung nach JNK-Inhibition stärker reduziert als nach ERK1/2-Inhibition. Dies deutet darauf hin, dass JNK in diesem Modellsystem bedeutender für ein Neuritenwachstum sind als ERK und die apoptotische Fas-Ligation in Neuritenwachstumssignale umwandeln.

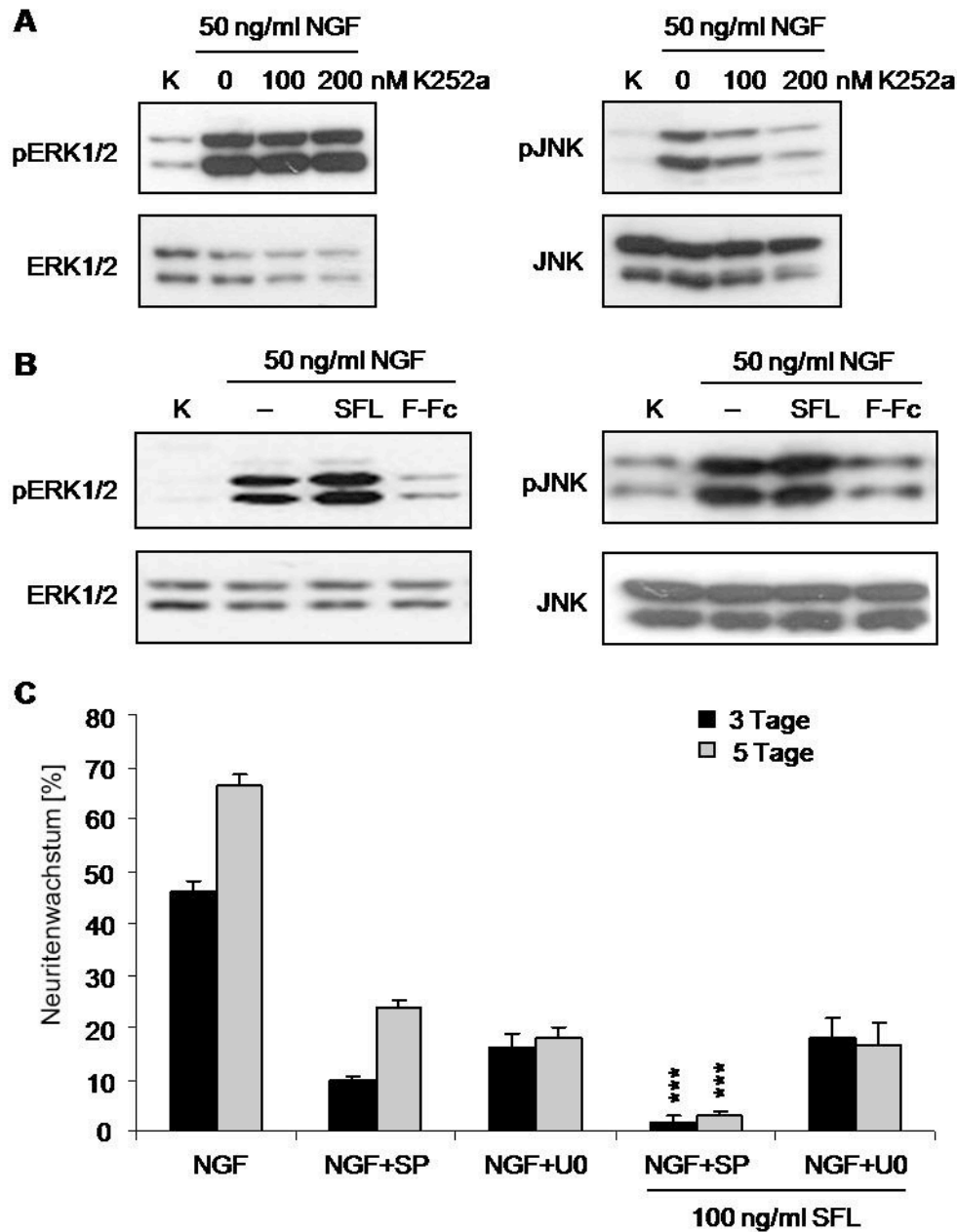


Abb. 6: Interaktionen zwischen Fas- und NGF-Signalwegen.

(A): Expression von ERK1/2 und JNK nach Inkubation mit 50 ng/ml NGF und TrkA-Inhibition durch K252a (100 nM und 200 nM).

(B): Expression von ERK1/2 und JNK nach 50 ng/ml NGF allein oder in Kombination mit 100 ng/ml Superfas-Ligand (SFL) oder 4 µg/ml Fas-Fc (F-Fc).

(C): Neuritenwachstum (Anteil neuritentragender Zellen) in % nach 50 ng/ml NGF und Vorinkubation mit SP600125 (SP, 2 µM) und U0126 (5 µM) und zusätzlicher Gabe von 100 ng/ml Superfas-Ligand (SFL). K = Kontrolle, *** = $p < 0.001$.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der NGF-Rezeptoren und des Fas-Systems für ein Neuritenwachstum und deren Effekt auf die Aktivierung der MAPK nach der experimentellen Neuritenläsion der differenzierten PC12-Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass NGF das Neuritenwachstum und die Expression von TrkA und p75^{NTR} sowie Fas und Fas-Ligand induziert. Während TrkA wichtiger für die Neuritenneubildung als p75^{NTR} nach alleiniger Stimulation mit NGF ist, scheint die Signaltransduktion, die die neuronale Regeneration unterstützt, durch die Fas-Ligation modifiziert zu werden, was auf eine parallele Induktion des Neuritenwachstums durch NGF und das Fas-System hindeutet. Die MAPK ERK1/2 und JNK werden durch NGF aktiviert und beeinflussen entscheidend das Neuritenwachstum, wobei in diesem Zusammenhang nur JNK die Fas-Signale vermitteln.

4.1 Neuritenwachstum und Rezeptorregulation

Während des experimentellen Neuritenläsionsversuchs wurden die Neuriten der differenzierten PC12-Zellen abgetrennt. Anschließend wurden die geschädigten Zellen mit NGF stimuliert, um das Neuritenwachstum zu induzieren. Während das Zellüberleben nach Neuritenläsion unabhängig von der verwendeten NGF-Konzentration war, konnte schnelles Neuritenwachstum nur mit 50 ng/ml erreicht werden, aber nicht mit 10 ng/ml NGF. Das zeigt, dass eine bestimmte Konzentrationsschwelle von NGF nötig ist, um die Neuritenausbildung zu fördern. Dieses dosisabhängige Neuritenwachstum der geschädigten PC12-Zellen ist vergleichbar mit der NGF-vermittelten Differenzierung der PC12-Zellen (Waetzig und Herdegen, 2003b), was auf einen gemeinsamen Mechanismus für das Neuritenwachstum während der Differenzierung und nach Neuritenläsion schließen lässt.

Entsprechend war zu erwarten, dass die Behandlung mit 50 ng/ml NGF die Expression der Rezeptoren während des Neuritenwachstums in einem größeren Maß steigerte als die 10 ng/ml-Dosis. Dieser Zusammenhang zwischen Rezeptorregulation und Neuritenregeneration nach Neuritenläsion ließ sich in den Blots dieser Arbeit nicht zeigen. In Tiermodellen ist ein Anstieg von neuronalem p75^{NTR} nach Neuritenläsion entweder beteiligt an der anti-inflammatorischen Antwort (Gschwendtner et al., 2003) oder er ist nur in intakten Neuronen präsent, die nicht unmittelbar von der Läsion betroffen sind (Obata et al., 2006). Nach einer Rückenmarksverletzung und Axotomie sinkt die TrkA-Expression am Ort der Läsion und kann nicht durch Hinzufügen von NGF beeinflusst werden (King et al., 2000; Liebl et al., 2001; Mohiuddin et al., 1999). Nur nach Läsionen des Sehnervs steigt TrkA während der

Regeneration an (Caminos et al., 1999). Nichtsdestoweniger ist TrkA von großer Bedeutung für die neuronale Regenerierung und das Überleben (Gallo and Letourneau, 1998). Die TrkA-Expression wird nach Neuritenläsion allerdings nur langsam wiederhergestellt (Liebl et al., 2001). In intakten Neuronen fördert eine verstärkte Expression von p75^{NTR} die Signaltransduktion der verbleibenden TrkA-Rezeptoren (Obata et al., 2006). Diese synergistische Rezeptorinteraktion ist auch für PC12-Zellen beschrieben worden (Rankin et al., 2005), was darauf hindeutet, dass das verstärkte NGF-Signal eher durch eine steigende Rezeptoraktivität als durch eine stärkere Rezeptorexpression erreicht wird. In Bezug auf die Rezeptorfunktion ist TrkA der entscheidende Mediator der NGF-Signale, was bereits in Hinterwurzelganglien gezeigt werden konnte (Gallo und Letourneau, 1998). Kürzlich wurde publiziert, dass Schwannsche Zellen über eine verstärkte NGF-Sekretion die Regeneration von Hinterwurzelganglien-Neuronen via TrkA-Rezeptor fördern (Hu et al., 2011). Auch im PC12-Zellmodell wird die NGF-vermittelte Neuritenausbildung durch Stabilisierung der TrkA-Rezeptoren verstärkt (Song und Yoo, 2011). Im Allgemeinen steigert das Vorhandensein von p75^{NTR} die Bindung von TrkA an NGF (Roux und Barker, 2002) und erleichtert die TrkA-Kaskade (Epa et al., 2004; Makkerh et al., 2005). Normalerweise ist p75^{NTR} allein mit einem Kollabieren des Wachstumskegels (Ahmed et al., 2006) oder Apoptose assoziiert (Bhakar et al., 2003; Kenchappa et al., 2010). TrkA wird dazu benötigt, p75^{NTR} zu deaktivieren (Ahmed et al., 2006; Urra et al., 2007) oder apoptotische Signale zu blockieren (Roux und Barker, 2002). In PC12-Zellen allerdings induziert p75^{NTR} die Apoptose nur, wenn es überexprimiert ist (Bhakar et al., 2003). Interessanterweise ist die unterstützende und stabilisierende Funktion von p75^{NTR} offensichtlich nicht notwendig für die Neuausbildung der Neuriten nach Neuritenläsion der PC12-Zellen.

4.2 Fas-Signalwege nach Neuritenläsion der PC12-Zellen

Fas und Fas-Ligand sind im Nervensystem weit exprimiert und ihre Expression ist bei verschiedenen neurologischen Funktionsstörungen und nach Schädigung z.B. des Rückenmarks gesteigert (Choi und Benveniste, 2004; Li et al., 2000). Im Rattenmodell kann Fas nach neonataler Hyperoxie zum neuronalen Zelltod führen (Dzietko et al., 2008). Oxidativer Stress allein, der auch unter neuropathologischen Bedingungen vorkommt, kann Fas und Fas-Ligand in PC12-Zellen induzieren (Facchinetti et al., 2002) und könnte sogar zur Apoptose führen (Dermitzaki et al., 2002). Deswegen war das Blockieren der Fas-Signalkaskade eine Möglichkeit das Zellüberleben zu verbessern, wie z.B. nach einer Rückenmarksschädigung (Demjen et al., 2004). Differenzierte PC12-Zellen sind gegen Fas-induzierte Apoptose

geschützt. Wenngleich NGF die Bildung von Fas-Ligand nicht supprimiert, induziert es die Expression des protektiven Fas-Apoptoseinhibitormoleküls (FAIM) (Segura et al., 2007). Nach mechanischer Schädigung zeigten die PC12-Zellen, die nur mit Fas-Fc oder Superfas-Ligand allein behandelt wurden, sinkende Überlebensraten. Da Fas-Inhibition und Fas-Stimulation den gleichen Effekt hatten, scheint das reduzierte Zellüberleben aus dem NGF-Entzug zu resultieren, der gewöhnlich zu einer potenzierten Aktivität des Fas-Systems und anschließend zur Apoptose führt (Le-Niculescu et al., 1999).

Co-Stimulation mit Superfas-Ligand und NGF induzierte das Neuritenwachstum im gleichen Ausmaß wie NGF allein, wobei das Hinzufügen von Fas-Fc das Wachstum der Neuriten reduzierte. In anderen neuronalen Systemen kann die Aktivierung von Fas und Fas-Ligand die Verzweigung steigern (Zuliani et al., 2006) oder zur Differenzierung und Regeneration nach Schädigung des Ischiasnervs beitragen (Desbarats et al., 2003). Eine Aktivierung von Fas erhöht das Zellüberleben von neuronalen Progenitorzellen *in vitro* (Knight et al., 2010). Corsini et al. zeigten 2009, dass eine Stimulation von Fas in neuronalen Stammzellen zu gesteigertem Stammzellüberleben und neuronaler Spezifizierung führt (Corsini et al., 2009).

Besonders der starke neuritenbildende Effekt von Superfas-Ligand in Hinterwurzelganglien konnte in PC12-Zellen nicht beobachtet werden, da ihr Überleben NGF-abhängig ist. NGF ist somit eine Voraussetzung für das Neuritenwachstum. Allerdings scheint die Fas-Signaltransduktion parallel zu NGF zu agieren, da ihre Inhibition durch Fas-Fc das Neuritenwachstum im Vergleich zu NGF allein reduziert. In diesem Fall könnte man einen zusätzlichen Effekt von einer Co-Stimulation mit NGF und Superfas-Ligand erwarten. Dennoch wurde dieser Effekt noch nicht beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Regeneration der geschädigten PC12-Zellen in diesem Modell der Neuritenläsion allein durch NGF so schnell wie möglich in Gang gesetzt wird.

4.3 Der Einfluss von MAPK auf das Neuritenwachstum der PC12-Zellen nach Neuritenläsion

ERK1/2 und JNK werden während der Neubildung der Neuriten aktiviert. Ihre Inhibition reduziert das Neuritenwachstum signifikant. Einige Studien haben die Bedeutung der ERK1/2 für die neuronale Regeneration in experimentellen Zellmodellen (Waetzig und Herdegen, 2005b) oder die Axonregeneration von sich im Wachstum befindlichen peripheren Neuronen (Liu und Snider, 2001) beschrieben.

JNK werden als bedeutende Mediatoren der regenerativen Zellkörperantwort aufgefasst (Herdegen et al., 1997; Raivich et al., 2004; Saporito et al., 2000) und sind maßgeblich an der

Induktion der darauf folgenden Apoptose beteiligt (Waetzig et al., 2006). Allerdings ist die Aktivität der JNK in experimentellen Zellmodellen oder Hinterwurzelganglien stark mit einem Neuritenwachstum verbunden (Lindwall et al., 2004; Waetzig und Herdegen, 2005b). Sogar nach Durchtrennung des Ischiasnervs ist die Aktivität der axonalen JNK gesteigert (Kenney und Kocsis, 1998), und diese Aktivität kann zum Zelltod oder zur Nervenregeneration führen. Während der axonalen Regeneration sind die JNK dauerhaft aktiviert (Herdegen et al., 1998; Kenney und Kocsis, 1998). JNK beeinflussen die neuronale Regeneration auch nach Durchtrennung des Nervus facialis (Staak 2009).

In Bezug auf den Mechanismus der MAPK-Aktivierung reduzierte die TrkA-Inhibition nicht die Phosphorylierung von ERK1/2, sondern nur die der JNK. Diese Ergebnisse sind überraschend, insofern als die TrkA-Kaskade dafür bekannt ist, dass sie ERK1/2 aktiviert (Kaplan und Miller, 2000; Roux und Barker, 2002). Insgesamt sind JNK gewöhnlich mit der p75-Aktivierung und der Induktion von Zelltod assoziiert (Bhakar et al., 2003; Linggi et al., 2005; Salehi et al., 2002). Nur nach zellulärem Stress wurde beschrieben, dass der TrkA-Inhibitor K252a wie ein JNK-Inhibitor wirkt und das Überleben durch die Aktivierung von ERK1/2 und die Serin-/Threonin-Kinase Akt fördert (Roux et al., 2002), ähnlich wie sein Derivat und der MLK3-Inhibitor CEP-1347. Für die Neuritenregeneration wurde die Verbindung zwischen JNK und TrkA bislang noch nicht nachgewiesen.

Nach der Co-Stimulation mit Fas-Fc und NGF wurde die Aktivität von ERK1/2 und JNK reduziert, wobei die Co-Stimulation mit SFL und NGF die Phosphorylierungsmuster von beiden Kinasen im Vergleich zur Stimulation mit NGF allein nicht verändert. Die Rolle von ERK1/2 bei Fas-vermittelten Signalen ist entweder antagonistisch und blockiert den Zelltod (Kotone-Miyahara et al., 2004; Lin et al., 2005) oder agonistisch durch das Fördern der phänotypischen Reifung der dendritischen Zellen oder der Cytokinausschüttung in humanen Gliazellen (Choi et al., 2001; Guo et al., 2003). Auch nach Schädigung des Ischiasnervs vermitteln ERK1/2 das Fas-induzierte Wachstum der Neuriten (Desbarats et al., 2003). In geschädigten PC12-Zellen scheinen ERK1/2 nicht an der Fas-Signaltransduktion teilzuhaben. Nach Co-Stimulation mit Fas-Fc und NGF war die ERK1/2-Aktivität im Vergleich zu NGF allein reduziert, verblieb aber oberhalb des basalen Niveaus. Dies weist darauf hin, dass ERK1/2 weiterhin NGF-Signale vermittelte. Im Gegensatz dazu war die ERK1/2-Aktivität nach Stimulation mit entweder NGF allein oder NGF und SFL ähnlich. Zudem war die Inhibition des Neuritenwachstums durch Vorinkubation mit dem MEK1/ERK1/2-Inhibitor U0126 unabhängig von der Fas-Aktivierung durch SFL, was darauf hindeutet, dass ERK1/2 in die NGF-Signalkaskade unabhängig von einer zusätzlichen Fas-Stimulation involviert sind.

In der Literatur werden JNK hauptsächlich als Mediatoren der Fas-vermittelten Apoptose beschrieben sowie als Regulator der Expression von Fas und Fas-Ligand einbezogen (Herdegen et al., 1998; Le-Niculescu et al., 1999; Raoul et al., 2005). Stimulation von Fas induziert eine Produktion von proinflammatorischen Mediatoren durch eine ERK/JNK-abhängige Aktivierung von NF-kappaB in der *macrophage-like* Zelllinie THP-1 (Lee et al., 2011).

Nach experimenteller Schädigung der differenzierten PC12-Zellen war die Rolle der JNK eine andere. Stimulation mit SFL scheint einen Signalweg parallel zu NGF einzuleiten, um die Neuritenbildung und das Rekrutieren eines Teils des JNK-Pools zu unterstützen, der andernfalls in die NGF-Signaltransduktion involviert sein könnte. Wenn der Fas-Inhibitor Fas-Fc hinzugefügt wird, werden die JNK-Aktivität und das Neuritenwachstum reduziert. Außerdem schwächt die Vorbehandlung mit SP600125 besonders die Neuritenbildung nach der Co-Stimulation mit NGF und SFL, was ferner unterstreicht, dass sich die Neuritenwachstumssignale nach Fas-Stimulation ändern. All diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Fas-Signalkaskade via JNK zur Neuritenregeneration nach Neuritenläsion beiträgt. Im Gegensatz zu den normalen apoptotischen Eigenschaften der Fas-Ligation und der darauf folgenden JNK-Aktivierung könnte die simultane Aktivität der NGF-Signale zur Aktivierung eines hypothetischen „physiologischen JNK Pools“ führen, der auch durch den Fas-Signalweg nach Neuritenläsion angesteuert wird und demzufolge eher Neuritenwachstum einleitet als Degeneration.

5 Zusammenfassung

Als Reaktion auf Schädigung und Verletzung beginnen periphere neuronale Zellen komplexe Signalkaskaden zur Förderung von Überleben und Regeneration. In der vorliegenden Dissertation wurde ein Modell einer experimentellen Neuritenläsion in der Phäochromozytomzelllinie PC12 verwendet, um Rezeptorsignale zu untersuchen, die zum Neuritenauswachsen führen. Die PC12-Zellen wurden nach Neuritenläsion zum Vergleich des Neuritenwachstums mit unterschiedlicher NGF-Konzentration inkubiert. Der Anteil neuritentragender Zellen wurde einen Tag, drei und fünf Tage nach Neuritenläsion bestimmt. Danach wurden Untersuchungen mittels qualitativer Techniken (RT-PCR, Western Blot) auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt und die Expression der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} nach Neuritenläsion analysiert. Rezeptor-spezifische Inhibitoren wurden verwendet, um zu zeigen, ob beide Rezeptoren für die Neuritenregeneration notwendig sind. Anschließend wurden Rezeptoren der Apoptosesignalkaskade untersucht.

Aus diesen Untersuchungen resultierten folgende Ergebnisse: Der Nervenwachstumsfaktor NGF induzierte das Neuritenwachstum und die Expression der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} sowie von Fas und Fas-Ligand. Die Neuritenregeneration wurde durch chemische Inhibition von TrkA, jedoch nicht von p75^{NTR}, und durch das Fas-Inhibitor Protein Fas-Fc vermindert. Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) *extracellular signal-regulated Kinase* 1/2 (ERK1/2) und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) wurden als Antwort auf NGF aktiviert und trugen beide signifikant zum Neuritenwachstum bei. Interessanterweise unterstützte die sonst apoptotisch wirkende Fas-Ligation die neuronale Regeneration, wobei die Fas-Ligation die Regeneration ausschließlich via JNK aktivierte und das Neuritenwachstum parallel zu NGF förderte.

Diese Ergebnisse weisen auf eine neuartige Signalvernetzung von den NGF- und Fas-Signalwegen in der JNK-Achse der MAPK-Kaskaden hin. Diese Arbeit zeigt, dass JNK-Signalwege degenerative in regenerative Signale umwandeln können.

I Referenzen

- Ahmed, Z., Mazibrada, G., Seabright, R.J., Dent, R.G., Berry, M., and Logan, A. (2006). TACE-induced cleavage of NgR and p75NTR in dorsal root ganglion cultures disinhibits outgrowth and promotes branching of neurites in the presence of inhibitory CNS myelin. *FASEB J* 20, 1939-1941.
- Barnat, M., Enslin, H., Propst, F., Davis, R.J., Soares, S., and Nothias, F. (2010). Distinct roles of c-Jun N-terminal kinase isoforms in neurite initiation and elongation during axonal regeneration. *J Neurosci* 30, 7804-7816.
- Bhakar, A.L., Howell, J.L., Paul, C.E., Salehi, A.H., Becker, E.B., Said, F., Bonni, A., and Barker, P.A. (2003). Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J Neurosci* 23, 11373-11381.
- Bjorkblom, B., Ostman, N., Hongisto, V., Komarovski, V., Filen, J.J., Nyman, T.A., Kallunki, T., Courtney, M.J., and Coffey, E.T. (2005). Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *J Neurosci* 25, 6350-6361.
- Bogoyevitch, M.A., Boehm, I., Oakley, A., Ketterman, A.J., and Barr, R.K. (2004). Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1697, 89-101.
- Brecknell, J.E., and Fawcett, J.W. (1996). Axonal regeneration. *Biol Rev Camb Philos Soc* 71, 227-255.
- Camino, E., Becker, E., Martin-Zanca, D., and Vecino, E. (1999). Neurotrophins and their receptors in the tench retina during optic nerve regeneration. *J Comp Neurol* 404, 321-331.
- Chang, L., Jones, Y., Ellisman, M.H., Goldstein, L.S., and Karin, M. (2003). JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* 4, 521-533.
- Chaudhry, V., and Cornblath, D.R. (1992). Wallerian degeneration in human nerves: serial electrophysiological studies. *Muscle Nerve* 15, 687-693.
- Chevet, E., Lemaître, G., Janjic, N., Barritault, D., Bikfalvi, A., and Katinka, M.D. (1999). Fibroblast growth factor receptors participate in the control of mitogen-activated protein kinase

activity during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 274, 20901-20908.

Choi, C., and Benveniste, E.N. (2004). Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev* 44, 65-81.

Choi, C., Xu, X., Oh, J.W., Lee, S.J., Gillespie, G.Y., Park, H., Jo, H., and Benveniste, E.N. (2001). Fas-induced expression of chemokines in human glioma cells: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase. *Cancer Res* 61, 3084-3091.

Corsini, N.S., Sancho-Martinez, I., Laudenklos, S., Glasgow, D., Kumar, S., Letellier, E., Koch, P., Teodorczyk, M., Kleber, S., Klussmann, S., *et al.* (2009). The death receptor CD95 activates adult neural stem cells for working memory formation and brain repair. *Cell Stem Cell* 5, 178-190.

Daniels, R.H., Hall, P.S., and Bokoch, G.M. (1998). Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J* 17, 754-764.

Dechant, G., and Barde, Y.A. (2002). The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5, 1131-1136.

Demjen, D., Klussmann, S., Kleber, S., Zuliani, C., Stieltjes, B., Metzger, C., Hirt, U.A., Walczak, H., Falk, W., Essig, M., *et al.* (2004). Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10, 389-395.

Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P., and May, W.S., Jr. (2001). Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* 276, 23681-23688.

Dermitzaki, E., Tsatsanis, C., Gravanis, A., and Margioris, A.N. (2002). Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277, 12280-12287.

Desbarats, J., Birge, R.B., Mimouni-Rongy, M., Weinstein, D.E., Palerme, J.S., and Newell, M.K. (2003). Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5, 118-125.

Dong, C., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20, 55-72.

Dragunow, M., Xu, R., Walton, M., Woodgate, A., Lawlor, P., MacGibbon, G.A., Young, D., Gibbons, H., Lipski, J., Muravlev, A., *et al.* (2000). c-Jun promotes neurite outgrowth and survival in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 83, 20-33.

Dunn, C., Wiltshire, C., MacLaren, A., and Gillespie, D.A. (2002). Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal* 14, 585-593.

Dzietko, M., Boos, V., Sifringer, M., Polley, O., Gerstner, B., Genz, K., Endesfelder, S., Borner, C., Jacotot, E., Chauvier, D., *et al.* (2008). A critical role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia-induced brain injury. *Ann Neurol* 64, 664-673.

Eminel, S., Roemer, L., Waetzig, V., and Herdegen, T. (2008). c-Jun N-terminal kinases trigger both degeneration and neurite outgrowth in primary hippocampal and cortical neurons. *J Neurochem* 104, 957-969.

Epa, W.R., Markovska, K., and Barrett, G.L. (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J Neurochem* 89, 344-353.

Eynott, P.R., Nath, P., Leung, S.Y., Adcock, I.M., Bennett, B.L., and Chung, K.F. (2003). Allergen-induced inflammation and airway epithelial and smooth muscle cell proliferation: role of Jun N-terminal kinase. *Br J Pharmacol* 140, 1373-1380.

Eynott, P.R., Xu, L., Bennett, B.L., Noble, A., Leung, S.Y., Nath, P., Groneberg, D.A., Adcock, I.M., and Chung, K.F. (2004). Effect of an inhibitor of Jun N-terminal protein kinase, SP600125, in single allergen challenge in sensitized rats. *Immunology* 112, 446-453.

Facchinetti, F., Furegato, S., Terrazzino, S., and Leon, A. (2002). H₂O₂ induces upregulation of Fas and Fas ligand expression in NGF-differentiated PC12 cells: modulation by cAMP. *J Neurosci Res* 69, 178-188.

Galbiati, F., Volonte, D., Gil, O., Zanazzi, G., Salzer, J.L., Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Engelman, J.A., Schlegel, A., Parenti, M., *et al.* (1998). Expression of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10257-10262.

Gallo, G., and Letourneau, P.C. (1998). Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. *J Neurosci* *18*, 5403-5414.

Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *73*, 2424-2428.

Gschwendtner, A., Liu, Z., Hucho, T., Bohatschek, M., Kalla, R., Dechant, G., and Raivich, G. (2003). Regulation, cellular localization, and function of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) during the regeneration of facial motoneurons. *Mol Cell Neurosci* *24*, 307-322.

Guo, Z., Zhang, M., An, H., Chen, W., Liu, S., Guo, J., Yu, Y., and Cao, X. (2003). Fas ligation induces IL-1beta-dependent maturation and IL-1beta-independent survival of dendritic cells: different roles of ERK and NF-kappaB signaling pathways. *Blood* *102*, 4441-4447.

Haeusgen, W., Herdegen, T., and Waetzig, V. (2010). Specific regulation of JNK signalling by the novel rat MKK7gamma1 isoform. *Cell Signal* *22*, 1761-1772.

Haeusgen, W., Herdegen, T., and Waetzig, V. (2011). MKK7gamma1 reverses nerve growth factor signals: proliferation and cell death instead of neuritogenesis and protection. *Cell Signal* *23*, 1281-1290.

Han, Z., Boyle, D.L., Chang, L., Bennett, B., Karin, M., Yang, L., Manning, A.M., and Firestein, G.S. (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* *108*, 73-81.

Herdegen, T., Blume, A., Buschmann, T., Georgakopoulos, E., Winter, C., Schmid, W., Hsieh, T.F., Zimmermann, M., and Gass, P. (1997). Expression of activating transcription factor-2, serum response factor and cAMP/Ca response element binding protein in the adult rat brain following generalized seizures, nerve fibre lesion and ultraviolet irradiation. *Neuroscience* *81*, 199-212.

Herdegen, T., Claret, F.X., Kallunki, T., Martin-Villalba, A., Winter, C., Hunter, T., and Karin, M. (1998). Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* *18*, 5124-5135.

- Hommel, D.W., Peppelenbosch, M.P., and van Deventer, S.J. (2003). Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52, 144-151.
- Hu, J., Zhou, J., Li, X., Wang, F., and Lu, H. (2011). Schwann cells promote neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons through secretion of nerve growth factor. *Indian J Exp Biol* 49, 177-182.
- Ide, C. (1996). Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 25, 101-121.
- Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268, 10932-10937.
- Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10, 381-391.
- Kenchappa, R.S., Zampieri, N., Chao, M.V., Barker, P.A., Teng, H.K., Hempstead, B.L., and Carter, B.D. (2006). Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* 50, 219-232.
- Kenchappa, R.S., Tep, C., Korade, Z., Urra, S., Bronfman, F.C., Yoon, S.O., and Carter, B.D. (2010). p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/ADAM17. *J Biol Chem* 285, 20358-20368.
- Kennedy, N.J., and Davis, R.J. (2003). Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle* 2, 199-201.
- Kenney, A.M., and Kocsis, J.D. (1998). Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia In vivo. *J Neurosci* 18, 1318-1328.
- King, V.R., Bradbury, E.J., McMahon, S.B., and Priestley, J.V. (2000). Changes in truncated trkB and p75 receptor expression in the rat spinal cord following spinal cord hemisection and spinal cord hemisection plus neurotrophin treatment. *Exp Neurol* 165, 327-341.
- Kita, Y., Kimura, K.D., Kobayashi, M., Ihara, S., Kaibuchi, K., Kuroda, S., Ui, M., Iba, H., Konishi, H., Kikkawa, U., *et al.* (1998). Microinjection of activated phosphatidylinositol-3

kinase induces process outgrowth in rat PC12 cells through the Rac-JNK signal transduction pathway. *J Cell Sci* *111* (Pt 7), 907-915.

Knight, J.C., Scharf, E.L., and Mao-Draayer, Y. (2010). Fas activation increases neural progenitor cell survival. *J Neurosci Res* *88*, 746-757.

Kobayashi, M., Nagata, S., Kita, Y., Nakatsu, N., Ihara, S., Kaibuchi, K., Kuroda, S., Ui, M., Iba, H., Konishi, H., *et al.* (1997). Expression of a constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase induces process formation in rat PC12 cells. Use of Cre/loxP recombination system. *J Biol Chem* *272*, 16089-16092.

Kotone-Miyahara, Y., Yamashita, K., Lee, K.K., Yonehara, S., Uchiyama, T., Sasada, M., and Takahashi, A. (2004). Short-term delay of Fas-stimulated apoptosis by GM-CSF as a result of temporary suppression of FADD recruitment in neutrophils: evidence implicating phosphatidylinositol 3-kinase and MEK1-ERK1/2 pathways downstream of classical protein kinase C. *J Leukoc Biol* *76*, 1047-1056.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.

Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., Claret, F.X., Green, D.R., and Karin, M. (1999). Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol* *19*, 751-763.

Lee, S.M., Kim, E.J., Suk, K., and Lee, W.H. (2011). Stimulation of Fas (CD95) induces production of pro-inflammatory mediators through ERK/JNK-dependent activation of NF-kappaB in THP-1 cells. *Cell Immunol* *271*, 157-162.

Leithauser, F., Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Moller, P. (1993). Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* *69*, 415-429.

Leppa, S., Saffrich, R., Ansorge, W., and Bohmann, D. (1998). Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J* *17*, 4404-4413.

Levi, A., Eldridge, J.D., and Paterson, B.M. (1985). Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* *229*, 393-395.

- Levy, D.E., and Lee, C.K. (2002). What does Stat3 do? *J Clin Invest* *109*, 1143-1148.
- Li, G.L., Farooque, M., and Olsson, Y. (2000). Changes of Fas and Fas ligand immunoreactivity after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol* *100*, 75-81.
- Liebl, D.J., Huang, W., Young, W., and Parada, L.F. (2001). Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord. *Exp Neurol* *167*, 15-26.
- Lin, A., and Dibling, B. (2002). The true face of JNK activation in apoptosis. *Aging Cell* *1*, 112-116.
- Lin, T.Y., Chiou, S.H., Chen, M., and Kuo, C.D. (2005). Human lactoferrin exerts bi-directional actions on PC12 cell survival via ERK1/2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* *337*, 330-336.
- Lindwall, C., Dahlin, L., Lundborg, G., and Kanje, M. (2004). Inhibition of c-Jun phosphorylation reduces axonal outgrowth of adult rat nodose ganglia and dorsal root ganglia sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* *27*, 267-279.
- Lindwall, C., and Kanje, M. (2005). The Janus role of c-Jun: cell death versus survival and regeneration of neonatal sympathetic and sensory neurons. *Exp Neurol* *196*, 184-194.
- Linggi, M.S., Burke, T.L., Williams, B.B., Harrington, A., Kraemer, R., Hempstead, B.L., Yoon, S.O., and Carter, B.D. (2005). Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* *280*, 13801-13808.
- Liu, R.Y., and Snider, W.D. (2001). Different signaling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth. *J Neurosci* *21*, RC164.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* *87*, 565-576.
- Lubinska, L. (1977). Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. *Brain Res* *130*, 47-63.
- Lundborg, G. (1987). Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand* *58*, 145-169.

- Makkerh, J.P., Ceni, C., Auld, D.S., Vaillancourt, F., Dorval, G., and Barker, P.A. (2005). p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* 6, 936-941.
- Manning, A.M., and Davis, R.J. (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* 2, 554-565.
- Mohiuddin, L., Delcroix, J.D., Fernyhough, P., and Tomlinson, D.R. (1999). Focally administered nerve growth factor suppresses molecular regenerative responses of axotomized peripheral afferents in rats. *Neuroscience* 91, 265-271.
- Morooka, T., and Nishida, E. (1998). Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem* 273, 24285-24288.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Nath, P., Eynott, P., Leung, S.Y., Adcock, I.M., Bennett, B.L., and Chung, K.F. (2005). Potential role of c-Jun NH2-terminal kinase in allergic airway inflammation and remodelling: effects of SP600125. *Eur J Pharmacol* 506, 273-283.
- Neidhart, S., Antonsson, B., Gillieron, C., Vilbois, F., Grenningloh, G., and Arkininstall, S. (2001). c-Jun N-terminal kinase-3 (JNK3)/stress-activated protein kinase-beta (SAPKbeta) binds and phosphorylates the neuronal microtubule regulator SCG10. *FEBS Lett* 508, 259-264.
- Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J.M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M., and Barde, Y.A. (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* 467, 59-63.
- Obata, K., Katsura, H., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., and Noguchi, K. (2006). Suppression of the p75 neurotrophin receptor in uninjured sensory neurons reduces neuropathic pain after nerve injury. *J Neurosci* 26, 11974-11986.
- Potapova, O., Gorospe, M., Bost, F., Dean, N.M., Gaarde, W.A., Mercola, D., and Holbrook, N.J. (2000). c-Jun N-terminal kinase is essential for growth of human T98G glioblastoma cells. *J Biol Chem* 275, 24767-24775.

- Qui, M.S., and Green, S.H. (1992). PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* 9, 705-717.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Da Costa, C., Iwata, O., Galiano, M., Hristova, M., Nateri, A.S., Makwana, M., Riera-Sans, L., Wolfer, D.P., *et al.* (2004). The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* 43, 57-67.
- Rallis, A., Moore, C., and Ng, J. (2010). Signal strength and signal duration define two distinct aspects of JNK-regulated axon stability. *Dev Biol* 339, 65-77.
- Rankin, S.L., Guy, C.S., and Mearow, K.M. (2005). TrkA NGF receptor plays a role in the modulation of p75NTR expression. *Neurosci Lett* 383, 305-310.
- Raoul, C., Barthelemy, C., Couzinet, A., Hancock, D., Pettmann, B., and Hueber, A.O. (2005). Expression of a dominant negative form of Daxx in vivo rescues motoneurons from Fas (CD95)-induced cell death. *J Neurobiol* 62, 178-188.
- Riese, U., Ziegler, E., and Hamburger, M. (2004). Militarinone A induces differentiation in PC12 cells via MAP and Akt kinase signal transduction pathways. *FEBS Lett* 577, 455-459.
- Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67, 203-233.
- Roux, P.P., Dorval, G., Boudreau, M., Angers-Loustau, A., Morris, S.J., Makkerh, J., and Barker, P.A. (2002). K252a and CEP1347 are neuroprotective compounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK. *J Biol Chem* 277, 49473-49480.
- Salehi, A.H., Xanthoudakis, S., and Barker, P.A. (2002). NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 277, 48043-48050.
- Saporito, M.S., Thomas, B.A., and Scott, R.W. (2000). MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J Neurochem* 75, 1200-1208.
- Seckel, B.R. (1990). Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 13, 785-800.

Segura, M.F., Sole, C., Pascual, M., Moubarak, R.S., Perez-Garcia, M.J., Gozzelino, R., Iglesias, V., Badiola, N., Bayascas, J.R., Llecha, N., *et al.* (2007). The long form of Fas apoptotic inhibitory molecule is expressed specifically in neurons and protects them against death receptor-triggered apoptosis. *J Neurosci* 27, 11228-11241.

Sheu, J.Y., Kulhanek, D.J., and Eckenstein, F.P. (2000). Differential patterns of ERK and STAT3 phosphorylation after sciatic nerve transection in the rat. *Exp Neurol* 166, 392-402.

Sjoberg, J., and Kanje, M. (1990). The initial period of peripheral nerve regeneration and the importance of the local environment for the conditioning lesion effect. *Brain Res* 529, 79-84.

Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.

Song, E.J., and Yoo, Y.S. (2011). Nerve growth factor-induced neurite outgrowth is potentiated by stabilization of TrkA receptors. *BMB Rep* 44, 182-186.

Staak, N. (2009). Einfluss von c-Jun und den JNK1, 2 und 3 auf die Regeneration des N. facialis, Medizinische Dissertation, CAU Kiel, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie.

Stefanis, L., Park, D.S., Yan, C.Y., Farinelli, S.E., Troy, C.M., Shelanski, M.L., and Greene, L.A. (1996). Induction of CPP32-like activity in PC12 cells by withdrawal of trophic support. Dissociation from apoptosis. *J Biol Chem* 271, 30663-30671.

Stoll, G., and Muller, H.W. (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9, 313-325.

Tararuk, T., Ostman, N., Li, W., Bjorkblom, B., Padzik, A., Zdrojewska, J., Hongisto, V., Herdegen, T., Konopka, W., Courtney, M.J., *et al.* (2006). JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J Cell Biol* 173, 265-277.

Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., and Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.

Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.

- Uesugi, N., Muramatsu, R., and Yamashita, T. (2009). Endothelin promotes neurite elongation by a mechanism dependent on c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 509-512.
- Urrea, S., Escudero, C.A., Ramos, P., Lisbona, F., Allende, E., Covarrubias, P., Parraguez, J.I., Zampieri, N., Chao, M.V., Annaert, W., *et al.* (2007). TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. *J Biol Chem* 282, 7606-7615.
- Waetzig, V., and Herdegen, T. (2003a). A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death. *J Biol Chem* 278, 567-572.
- Waetzig, V., and Herdegen, T. (2003b). The concerted signaling of ERK1/2 and JNKs is essential for PC12 cell neuritogenesis and converges at the level of target proteins. *Mol Cell Neurosci* 24, 238-249.
- Waetzig, V., and Herdegen, T. (2005a). Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 26, 455-461.
- Waetzig, V., and Herdegen, T. (2005b). MEKK1 controls neurite regrowth after experimental injury by balancing ERK1/2 and JNK2 signaling. *Mol Cell Neurosci* 30, 67-78.
- Waetzig, V., Zhao, Y., and Herdegen, T. (2006). The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol* 80, 84-97.
- Whitmarsh, A.J., and Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74, 589-607.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.
- Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Zhou, G., Vandenplas, M.L., and Tan, T.H. (1999). Overexpression of atypical PKC in PC12 cells enhances NGF-responsiveness and survival through an NF-kappaB dependent pathway. *Cell Death Differ* 6, 753-764.
- Xiao, J., and Liu, Y. (2003). Differential roles of ERK and JNK in early and late stages of neuritogenesis: a study in a novel PC12 model system. *J Neurochem* 86, 1516-1523.

Yang, S.H., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., and Sharrocks, A.D. (1998). Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J* 17, 1740-1749.

Yao, R., Yoshihara, M., and Osada, H. (1997). Specific activation of a c-Jun NH2-terminal kinase isoform and induction of neurite outgrowth in PC-12 cells by staurosporine. *J Biol Chem* 272, 18261-18266.

Yung, L.Y., Tso, P.H., Wu, E.H., Yu, J.C., Ip, N.Y., and Wong, Y.H. (2008). Nerve growth factor-induced stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase in PC12 cells is partially mediated via G(i/o) proteins. *Cell Signal* 20, 1538-1544.

Zuliani, C., Kleber, S., Klussmann, S., Wenger, T., Kenzelmann, M., Schreglmann, N., Martinez, A., del Rio, J.A., Soriano, E., Vodrazka, P., *et al.* (2006). Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ* 13, 31-40.

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signaltransduktionsweg der MAPK	1
Abbildung 2: Einfluss von NGF auf das Neuritenwachstum und auf die Expression der NGF-Rezeptoren nach Schädigung der PC12 Zellen	32
Abbildung 3: Effekte des TrkA-Inhibitors K252a und des p75 ^{NTR} -Inhibitors Pep5 auf das Neuritenwachstum	33
Abbildung 4: Einfluss von Fas und Fas-Ligand auf das Neuritenwachstum	35
Abbildung 5: Expression von ERK1/2 und JNK in Antwort auf NGF nach Neuritenläsion	37
Abbildung 6: Interaktionen zwischen Fas- und NGF-Signalwegen	39

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	10
Tabelle 2 : Enzyme	12
Tabelle 3 : Primärantikörper	13
Tabelle 4 : Zusammensetzung von 10 x PBS und Passage-EDTA	14
Tabelle 5 : Zusammensetzung des Einfriermediums	16
Tabelle 6 : Zusammensetzung des 2 x Lysispuffers für Gesamtzellysate (DLB)	18
Tabelle 7 : Zusammensetzung von Sammelgelpuffer, Trenngelpuffer, Elektrophorese- Stammlösung und Beladungspuffer	20
Tabelle 8 : Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die SDS-Page	21
Tabelle 9 : Zusammensetzung von 10 x TBS (Stammlösung), TTBS, Kathodenpuffer, Blocking solution, Anodenpuffer I und II	22
Tabelle 10: Zusammensetzung der Stripping Solution	24
Tabelle 11: Zusammensetzung von DEPC-Wasser	24
Tabelle 12: Zusammensetzung von TBE-Puffer (Stammlösung) und TBE-Laufpuffer	29

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit durch Rat und Tat sowohl in fachlichen wie auch privaten Belangen erst möglich gemacht haben:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ingolf Cascorbi für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel.

Bei Herrn Prof. Dr. med. T. Herdegen und Frau PD Dr. rer. nat. Vicki Wätzig möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas, die Anleitung zum selbständigen Arbeiten, die stetige Diskussionsbereitschaft und die konstruktive Durchsicht dieser Arbeit bedanken. Abgesehen davon danke ich für die ausgesprochen freundliche und intensive Betreuung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor sowie meinen Mitdoktoranden danke ich für die herzliche Aufnahme, das gute Arbeitsklima, die technische Unterstützung und die kollegiale Zusammenarbeit, die ich jederzeit erfahren durfte. Stellvertretend für alle möchte ich nur Einige erwähnen: Annika Mütze, Elke Schröder, Dr. med. Moritz Kanzow, Dr. med. Nils Staak.

Schließlich danke ich meiner Familie, meinem Freund und Freunden für die Hilfe, Unterstützung und Geduld, die sie mir immer wieder entgegengebracht haben.

V Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Katja Loose
Geburtsdatum:	02.03.1982 in Kiel
Familienstand:	ledig
Adresse:	Jungmannstr. 71 24105 Kiel

Schulausbildung

1988-1992	Grundschule am Sonderburger Platz in Kiel
1992-2001	Ernst-Barlach-Gymnasium in Kiel
6/2001	Abitur

Hochschulausbildung

10/2001-11/2007	Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
8/2003	Physikum
11/2007	2. Ärztliche Prüfung
2004-2006	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie des UKSH Campus Kiel (Praktischer Teil)
6/2008-6/2012	Assistenzärztin in der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten (Klinik für Innere Medizin IV) am UKSH Campus Kiel
Seit 7/2012	Assistenzärztin in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie der II. Medizinischen Klinik am UKSH Campus Kiel

Originalpublikation

Waetzig V, Loose K, Haeusgen W, Herdegen T.

c-Jun N-terminal kinases mediate Fas-induced neurite regeneration in PC12 cells.

Biochem Pharmacol. 2008 Dec 1;76(11):1476-84. Epub 2008 Jul 19.