

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

Neuritenstabilisierung und Neuritenneubildung in PC12-Zellen

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

vorgelegt von

Milana Belzer
aus Belc

Kiel 2016

1. Berichterstatter: PD Dr. Vicki Wätzig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer
Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.07.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

INHALTSVERZEICHNIS

GLOSSARIUM

1 EINLEITUNG

1.1	Zellkultur mit PC12-Zellen als neurobiologisches Zellmodell.....	1
1.2	Zelloberflächenrezeptoren für intrazelluläre Signaltransduktion: TrkA und p75.....	1
1.3	Bedeutung der Signalkaskade der MAPK.....	2
1.3.1	<i>Extrazellulär-Regulierte-Kinase (ERK)</i>	2
1.3.2	<i>c-JUN N-Terminale Kinase (JNK)</i>	3
1.3.3	<i>p38-MAPK-Signalweg</i>	3
1.4	Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und Akt.....	4
1.5	Neuritenschädigung und Neuronale Regeneration.....	5
1.5.1	<i>Häufige Ursachen neuronaler Schädigung</i>	5
1.5.2	<i>Einteilung traumatischer Nervenläsionen</i>	5
1.5.3	<i>Axonale Regeneration und Waller-Degeneration</i>	6
1.6	JNK als bedeutender Faktor in der neuronalen Regeneration und Stabilisierung.....	7
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	8

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	10
2.2	Herstellung und Sterilisation von Puffern und Lösungen.....	11
2.3	Herkunft, Kultivierung und Differenzierung von PC12-Zellen.....	11
2.3.1	<i>Herkunft der PC12-Zellen</i>	11
2.3.2	<i>Kultivierung der PC12-Zellen</i>	12
2.3.3	<i>Verwendete Zellkulturschalen</i>	12
2.3.4	<i>Beschichtung von Kulturschalen mit Collagen</i>	12
2.3.5	<i>Kulturbedingungen für PC12-Zellen</i>	12
2.3.6	<i>Passage von PC12-Zellen</i>	13
2.3.7	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	13
2.3.8	<i>Differenzierung von PC12-Zellen</i>	14
2.3.9	<i>Die mechanische Entfernung von Neuriten (injury)</i>	15
2.3.10	<i>Stimulation von PC12-Zellen durch SP600125, U0126 und Wortmannin</i>	15
2.3.11	<i>Einfrierung von PC12-Zellen</i>	15
2.4	Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	16
2.4.1	<i>DLB-Lyse</i>	16
2.4.2	<i>Caspase Lyse</i>	17
2.4.3	<i>Herstellung von nativen Proteinen</i>	17
2.5	Herstellung von Kernproteinen.....	18
2.6	Bestimmung des Proteingehaltes von Zellextrakten.....	19
2.7	Immunpräzipitation.....	19
2.7.1	<i>Pre – Cleaning</i>	20
2.7.2	<i>Bildung des Antikörper–Matrix–Komplexes</i>	20

2.7.3	<i>Immunpräzipitation und Western-Blot</i>	20
2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	20
2.8.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	20
2.8.2	<i>Western-Blot</i>	22
2.9	Antikörper.....	24
2.10	Strippen von Western-Blot-Membranen.....	25
2.11	Statistische Auswertung der Überlebensversuche und des Neuritenwachstum.....	25
3	ERGEBNISSE	
3.1	Neuritenstabilisierung.....	27
3.1.1	<i>Inkubation von PC12-Zellen mit SP600125, U0126, Wortmannin</i>	27
3.1.2	<i>Aktivierung und Expression von MAP-Kinasen und Akt nach Gabe von SP600125, U0126 und Wortmannin</i>	29
3.1.3	<i>Interaktion von ERK1/2, JNK und Akt</i>	32
3.2	Neuritenretraktion und Neuritenregeneration.....	35
3.2.1	<i>PC12-Zellmodelle zur Retraktion und Regeneration von Neuriten</i>	35
3.3	Neuritenretraktion nach Serungabe bzw. NGF-Entzug.....	39
3.3.1	<i>Neuritenretraktion und Überleben</i>	39
3.3.2	<i>Kinase-Aktivität während Neuriten-Retraktion nach Vollmedium, NGF-Entzug</i>	40
3.4	Neuritenneubildung nach Serungabe bzw. NGF-Entzug.....	42
3.4.1	<i>Neuritenbildung und Überleben</i>	42
3.4.2	<i>Kinase-Aktivität während Neuriten-Regeneration nach Vollmedium, NGF- Entzug</i>	43
4	DISKUSSION	
4.1	Neuritenstabilisierung und Zelltod.....	45
4.2	Zelluläre Modelle zur Retraktion und Regeneration von Neuriten.....	47
4.3	Retraktion von Neuriten.....	50
4.4	Regeneration von Neuriten.....	52
5	ZUSAMMENFASSUNG	55
I	REFERENZEN	56
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	62
III	TABELLENVERZEICHNIS	64
IV	PUBLIKATIONEN	65

GLOSSARIUM

A. bidest.	Bidestilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
ANOVA	<i>one-way analysis of variance with repeated measures</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat ^[L¹SEP]
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
BSA	Bernsteinsäureanhydrid
c-Myc	Zelluläres myelocytomatosis viral oncogene homolog
Casp. 3	Caspase 3
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
CSF1	<i>colony stimulating factor 1</i>
DLB-Lyse	Denaturierender Lyse-Puffer („Buffer“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol ^[L¹SEP]
ECL	<i>enhanced Chemolumineszenz</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat ^[L¹SEP]
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
Elk-1	<i>E26 transformations-spezifisch ETS transcription factor 1</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ^[L¹SEP]
FCS	fetale Kälberserum
GDP	<i>Guanosin-5'-diphosphat</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HPK1	<i>hematopoietic progenitor kinase 1</i>
inj.	injury
JIP	<i>JNK-interacting protein</i> ^[L¹SEP]
JNK	c-Jun N-terminale Kinase ^[L¹SEP]
K	Kontrolle
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEKK	MAPK/ERK Kinase Kinase ^[L]_{SEP}]
Min.	Minute(n)
MKK	MAPK-Kinasen
MKKK	MAPK-Kinasen-Kinasen
MKP1	<i>mitogen-activated protein kinase phosphatase 1</i>
MLK-3	<i>Mixed-lineage protein kinase 3</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF-H	<i>neurofilament protein (heavy subunit)</i> ^[L]_{SEP}]
NGF	<i>nerve growth factor</i> ^[L]_{SEP}]
Noc	Nocodazol
p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
p75	<i>p75 neurotrophin receptor</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ^[L]_{SEP}]
PC12	Phäochromocytomzellen einer Ratte ^[L]_{SEP}]
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pJNK	phospho-JNK ^[L]_{SEP}]
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNPP	para-Nitrophenylphosphat
PNS	periphere Nervensystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rezeptor
Rac	<i>Rho family of GTPases</i>
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i> ^[L]_{SEP}]
RPMI	Roswell Park Memorial Institut ^[L]_{SEP}]
SCG10	<i>superior cervical ganglion-10 protein</i>
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
ser	Vollmedium
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris-buffered saline</i> ^[L]_{SEP}]
TEMED	Tetramethylethylendiamin ^[L]_{SEP}]

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA	<i>tropomyosin-related kinase A</i>
TTBS	tris-buffered saline
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WST	<i>water soluble tetrazolium</i>
ZNS	Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Zellkultur mit PC12-Zellen als neurobiologisches Zellmodell

PC12-Zellen stammen aus einem Phäochromozytom der Nebenniere einer Ratte und wurden bereits 1976 von Greene und Tischler entdeckt (Greene and Tischler, 1976). PC12-Zellen sind in der Lage, Katecholamine zu produzieren, allerdings nur Dopamin und Norepinephrin, kein Epinephrin (Greene and Tischler, 1976). Die Synthese der Katecholamine aus PC12-Zellen ist vergleichbar bzw. intensiver als beim Phäochromozytom. Die Zellen besitzen einen diploiden Chromosomensatz aus 40 Chromosomen, davon 38 Autosomen und ein XY-Paar (Greene and Tischler, 1976). Eine Verdopplung der Zellen ist nach ca. 92 Stunden erreicht. Nach einer einwöchigen Exposition mit dem Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) zeigen die chromaffinen Zellen einen neuronalen Phänotyp. Auch Levi et. al. konnten 1985 die Wichtigkeit von NGF für die Differenzierung von Neuronen feststellen (Levi et al., 1985). Die NGF-Gabe hat jedoch keine Auswirkungen auf die Katecholaminsynthese. Nach mehreren Wochen kontinuierlicher NGF-Gabe können die Ausläufer der PC12-Zellen eine Länge von ca. 500 – 1000 µm erreichen. Durch NGF-Entzug degenerieren die Zellausläufer differenzierter PC12-Zellen innerhalb von 24 Stunden. Somit ist das PC12-Zellmodell durch seine Eigenschaften für neurobiologische und neurochemische Forschungsprojekte nützlich (Greene and Tischler, 1976).

1.2 Zelloberflächenrezeptoren für intrazelluläre Signaltransduktion: TrkA und p75

NGF gehört zur Neutrophinfamilie und vermittelt seine biologische Wirkung durch Bindung an Transmembranrezeptoren, welche in 2 Klassen eingeteilt werden: die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Trk) und p75, welches ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie ist (Casaccia-Bonnel et al., 1996; Klein et al., 1991). NGF bindet an einen spezifischen Rezeptor der Trk-Familie, von denen bisher drei bekannt sind, den TrkA-Rezeptor (Klein et al., 1991). Der p75-Rezeptor wird im Gegensatz zu den Trk-Rezeptoren von allen Neutrophinen aktiviert (Friedman, 2000; Philo et al., 1993). Beide Rezeptorklassen aktivieren unabhängig voneinander unterschiedliche Signaltransduktionswege (Miller and Kaplan, 2001). Durch die Aktivierung von TrkA durch NGF, kommt es zu Wachstum, Differenzierung und Proliferation der Neuronen. Es kommt zu einer Aktivierung von zwei Signalwegen, nach Bindung intrazellulärer Signalmoleküle (Kaplan and Miller, 1997): Es wird über PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) Akt (Protein Kinase B) aktiviert. Außerdem kommt es zur Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras, welches das Signal auf MAPK weiterleitet. Beide Signalkaskaden führen zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die wiederum Einfluss auf den Zellzyklus und das Neuritenwachstum haben (Kaplan and Miller, 2000).

Der Signalweg, der durch p75 induziert wird, führt häufig zum programmierten Zelltod und Apoptose von Nervenzellen (Casaccia-Bonnet et al., 1996). Da p75 nicht zu der Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Familie gehört, binden alle Neutrophine an der extrazellulären Domäne von p75. Durch die Bindung und die intrazelluläre Domäne erfolgt die Aktivierung von bspw. JNK und vielen anderen Molekülen (Le-Niculescu et al., 1999).

1.3 Bedeutung der Signalkaskade der MAPK

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ist ein essentieller Bestandteil eukaryontischer Zellen und reguliert eine Vielzahl physiologischer Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus, Apoptose und viele andere Prozesse in der Zelle (Junttila et al., 2008). Die MAPKs werden durch extrazelluläre Reize wie Hormone, Zellstress, Zytokine aktiviert und beeinflussen die Zellantwort. Die Signalkaskade unterliegt einem mehrstufigen Phosphorylierungsvorgang, der hierarchisch angeordnet ist: MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), MAPK-Kinase (MAPKK) und die MAPK (Junttila et al., 2007). Nach ihrer Aktivierung können die MAPKs im Zytoplasma oder im Zellkern eine Vielzahl von Substraten phosphorylieren, die ihrerseits in zentrale Vorgänge wie Transkription, Wachstum oder Zelltod eingreifen.

Die MAPKs selbst werden in Untergruppen unterteilt. Die wichtigsten dabei sind die Extrazellulär-Regulierten-Kinasen (ERK), die c-JUN N-Terminale Kinase (JNK) und p38 (Junttila et al., 2007).

1.3.1 Extrazellulär-Regulierte-Kinase (ERK)

Die Familie der Extrazellulär-Regulierten Kinasen (ERK) wurde als erste in Säugetieren beschrieben (Boulton et al., 1990). Aufgrund verschiedener Aminosäuresequenzen können mehrere Unterfamilien unterschieden werden, von denen ERK1 und ERK2 am intensivsten untersucht wurden (Sun et al., 2015) und die im Folgenden als ERK bezeichnet werden. Die ERK-Signalkaskade (A-Raf, B-Raf, Raf – 1 → MEK1,2 → ERK1,2) wird häufig durch neurotrophe Substanzen und Wachstumsfaktoren aktiviert und ist deshalb mit Zellproliferation, Zellwachstum und Überleben der Zelle assoziiert (Ballif and Blenis, 2001; Meloche and Pouyssegur, 2007; Rubinfeld and Seger, 2005). Die Kaskade wird in vielen Fällen durch Rezeptor-Tyrosinkinasen, Zytokinrezeptoren und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren über Mitglieder der Ras-Familie initiiert (McKay and Morrison, 2007). Ras ist ein membrangebundenes Protein, das durch den Tausch von GDP zu GTP aktiviert wird. Das aktivierte Ras-Molekül rekrutiert wiederum Raf-Proteine (MAPKKK) zur Plasmamembran, wo diese von Membran-gebundenen Kinasen phosphoryliert werden. Die Raf-Proteine A-Raf, B-

Raf, Raf-1 aktivieren MEK1 und MEK2 (MAPKK) durch Phosphorylierung von 2 Serinresten. ERK1/2 (MAPK) werden von MEK1 und MEK2 (MAPKK) an einem Thyrosin- bzw. einem Threoninrest phosphoryliert. Aktiviertes ERK1/2 kann in den Zellkern translozieren und dort verschiedene Transkriptionsfaktoren wie c-Myc oder Elk-1 aktivieren (Junttila et al., 2008).

1.3.2 c-JUN N-Terminale Kinase (JNK)

Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) wurden ursprünglich als Stresskinasen beschrieben (Deng et al., 2001). Unter anderem können Zytokine, Hitzeschock, oxidativer Stress, DNA-Schädigung und zahlreiche andere noxische Reize verschiedene MAPKKK, wie beispielsweise ASK1, HPK1, MLK-3, MKKK1-4 aktivieren (Davis, 2000; Weston and Davis, 2007). Den JNKs vorgeschaltet als MAPKK sind MKK4 und MKK7, die die JNKs einem Tyrosin- und einem Threoninrest phosphorylieren. Es sind drei Isoformen der JNKs bekannt: JNK1, JNK2, JNK3, wobei JNK3 nur im ZNS, Herz, Hoden und Pankreas exprimiert wird (Widmann et al., 1999). Nach der Aktivierung können die JNKs eine Vielzahl von nukleären und zytoplasmatischen Substraten phosphorylieren.

Neben proapoptischen Prozessen vermitteln JNKs auch physiologische Funktionen in der Zelle. Gerade bei der Regeneration von peripheren Nerven sind JNKs wichtig (Junttila et al., 2008; Waetzig and Herdegen, 2003a). Auch in physiologischen Vorgängen wie Membran- und Zytoskelettstabilität, sowie Mitose und Regulation des Zellzyklus und des Neuritenwachstums übernehmen JNKs eine zentrale Bedeutung (Kita et al., 1998; Kobayashi et al., 1997; Waetzig and Herdegen, 2005; Yao et al., 1997). Je nach physiologischem Zustand der Zelle oder Stimulus kann die Aktivität der JNKs demnach zur Apoptose, Proliferation oder zum Überleben führen.

1.3.3 p38-MAPK-Signalweg

Der p38-MAPK-Signalweg kann durch verschiedene Stimuli aktiviert werden: Umweltfaktoren, die zu Zellstress führen, wie osmotischer Stress, UV-Strahlung, Hitze, Schock und Hypoxie und inflammatorische Zytokine sowie Erythropoetin, Koloniestimulierender Faktor 1 (CSF1) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor (GM-CSF) (Ashwell, 2006; Roux and Blenis, 2004). Die Signalkaskade kann mit unterschiedlichen MAPKKK beginnen, wie z.B. den G-Proteinen Rac und Cdc42 oder den Kinasen TAK1, ASK1 und MLK3, die die MAPKK MKK3 und MKK6 phosphorylieren (Junttila et al., 2007). Das p38-Protein ist in vier Isoformen nachweisbar: p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ . Auch hier gibt es unterschiedliche zytoplasmatische und nukleäre Substrate. Eine besondere Bedeutung der p38-Aktivität wurde in Krebszellen beschrieben, die zum Zellwachstum und Überleben führte

(Gauthier et al., 2005; Greenberg et al., 2002; Junntila et al., 2007). Zusätzlich spielt der p38 Signalweg eine maßgebliche Rolle in der Regulierung und Expression vieler inflammatorischer Moleküle, der Differenzierung epidermaler Keratinozyten, Myoblasten und Zellen des Immunsystems (Ashwell, 2006; Efimova et al., 2003; Roux and Blenis, 2004).

1.4 Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und Akt

Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3Ks) gehören zu einer Familie von intrazellulären Lipidkinasen, die über die Phosphorylierung der 3'-Hydroxylgruppe von Phosphatidylinositen *second-messenger*-Lipide generieren wie Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3) (Neri et al., 2002). Je nach Substrat und Sequenz-Homologien lassen sich drei Gruppen unterscheiden. Die Kinasen der Klasse IA werden durch Rezeptor-Tyrosinkinasen wie den NGF-Rezeptor aktiviert und bestehen aus einer regulatorischen (p85) und katalytischen (p110) Untereinheit (Neri et al., 2002). Nach Entstehung von PIP3 kommt es zur Aktivierung von Protein-Kinase B, auch als Akt bekannt. Diese Serin-Threonin-Kinase spielt eine maßgebliche Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen wie Zellüberleben, Zellwachstum, Genexpression und der Onkogenese (Park et al., 2002). Dem PI3K-Akt Signalweg wird eine wichtige Rolle bei der neuronalen Regeneration nach axonaler Schädigung zugeschrieben (Chan et al., 2014). In mehreren Arbeiten wurde zudem die Wichtigkeit von Akt für neuronales Überleben beschrieben (Kaplan and Miller, 2000) (Dudek et al., 1997). Akt kann die apoptotische Aktivität der Zelle supprimieren: durch direkte Inhibition von Forkhead oder Bad; durch indirekte Suppression von GSK-3 oder durch die Blockierung des JNK-p53-Bax Signalweges, der zur neuronalen Zelloptose führt (Kaplan and Miller, 2000).

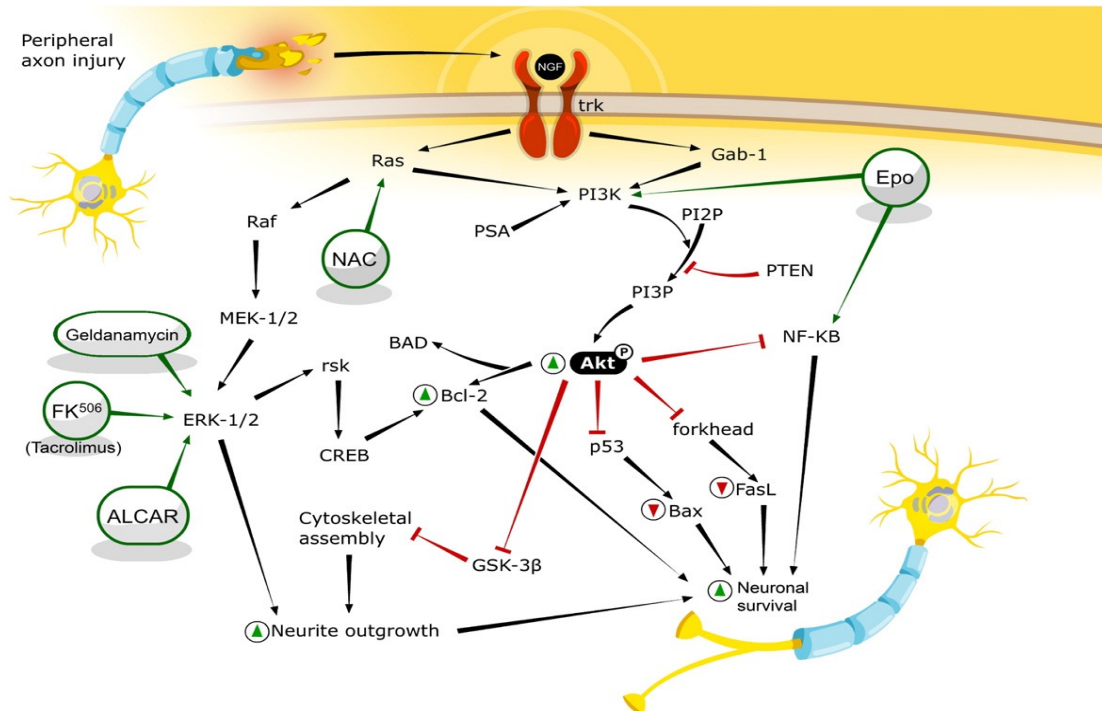


Abb.1.1 zeigt den PI3K-Akt Signalweg. Dieser Signalweg ist entscheidend für die Regeneration und das Überleben von Neuronen nach axonaler Schädigung. Die hintereinander geschaltete Signalkaskade ist mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Blockierende rote Pfeile stellen die Inhibition dar. Potentiell intervenierende Substanzen sind mit einer grünen Umkreisung gekennzeichnet. (Chan et al., 2014)

1.5 Neuritenschädigung und Neuronale Regeneration

1.5.1 Häufige Ursachen neuronaler Schädigung

Nervenzellen kommen sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS) sowie im peripheren Nervensystem (PNS) vor. Die häufigste Ursache neuronaler Schädigung ist traumatischer Genese wie bspw. Schnittverletzungen. Auch die stumpfe Gewalteinwirkung und Quetschung wie länger andauernder Druck wirken auf die nervale Versorgung und führen langfristig zu einer Schädigung. Auch raumfordernde Prozesse, wie Tumoren und Entzündungen können zu einer Neuritenschädigung führen. Die Regeneration peripherer Nerven ist im Vergleich zur Schädigung im ZNS in einem wesentlich größeren Ausmaß möglich (Ide, 1996).

1.5.2 Einteilung traumatischer Nervenläsionen

Seddon teilte 1943 die traumatische Nervenläsion des PNS in 3 Grade ein: Neurapraxie, Axonotmesis, Neurotmesis (Seddon, 1943).

Grad I: Neurapraxie

Die Neurapraxie ist die leichteste Form neuronaler Schädigung. Sie führt innerhalb von Stunden bis Wochen zur kompletten Remission und Funktionalität. Die Kontinuität der Nerven bleibt erhalten. Es kommt zu einer Quetschung und Blockade im Bereich der Verletzung.

Grad II: Axonotmesis

Hierbei ist das umhüllende Nervengewebe intakt. Nur die Axone sind durchtrennt. Diese Teilschädigung der Nervenstruktur schließt die komplette Regeneration nicht aus. Allerdings ist der Prozess der spontanen Regeneration im Vergleich zur Neurapraxie sehr viel langsamer.

Grad III: Neurotmesis

Die Neurotmesis ist die schwerste Form der neuronalen Schädigung. Hier sind das Nervengewebe, sowie das Peri- und Epineurium komplett durchtrennt. Eine spontane Regeneration ist nicht mehr möglich. Bei der Neurotmesis ist die interventionelle, chirurgische Wiederherstellung notwendig (Seddon, 1943).

Klinische Folgen von Nervenläsionen sind motorische und/oder sensorische, vegetative und trophische Störungen. Die Regeneration des verletzten Nervs erfolgt vom proximalen in Richtung des distalen Nervenstumpfes (Ide, 1996).

1.5.3 Axonale Regeneration und Waller-Degeneration

Das PNS hat im Gegensatz zum ZNS die Eigenschaft sich nach Verletzungen zu regenerieren (Doron-Mandel et al., 2015). Die Lokalisation der Verletzung ist dabei, neben vielen weiteren Faktoren wie Ausmaß der Schädigung, etc., entscheidend für die Ausheilung. Je näher die Verletzung am Rückenmark ist, desto geringer sind die Chancen auf eine komplette Remission. Durch die Verletzung wird der Nerv in zwei Abschnitte getrennt: Den proximale Teil, der weiterhin mit dem Zellkörper in Verbindung steht und den distalen Teil, was unterschiedliche Prozesse in den Teilen in Gang setzt (Makwana and Raivich, 2005). Innerhalb der ersten Tage nach nervaler Schädigung sterben die Axone im proximalen Stumpf bis zum nächsten proximal gelegenen Schnürring ab. Oberhalb der nervalen Verletzung schwellen die Fasern als Folge des gestörten Transportes von Zellmaterial an und bilden eine Art Wachstumskolben. Durch eintreffende Signale, welche die zelluläre Verletzung und den Stress melden, wird die Bildung von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun sowie Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren induziert. Folglich kommt es zu einer axonalen Elongation aus dem Wachstumskolben (Makwana and Raivich, 2005). Diesen Prozess bezeichnet man als axonale Regeneration. Innerhalb der ersten zwei bis drei Tage nach Verletzung steigt der mRNA-Spiegel von NGF an und hat nach Lundborg (Lundborg, 1987) einen signifikanten Einfluss auf die nervale Regeneration. Gundersen et. al. zeigten in seinen Experimenten mit NGF, dass dieser Wachstumsfaktor einen rapiden Effekt auf axonales Wachstum und dessen Wachstumsrichtung hat (Gundersen and Barrett, 1979).

Da der distale Abschnitt des Nervs nicht mit dem Zellkörper verbunden ist, erhält dieser keinerlei lebenserhaltende Proteine und durchläuft die sogenannte Waller-Degeneration. Im

Jahre 1850 erforschte der Physiologe A. Waller die anterograde Degeneration, die an dem Durchtrennungsort der nervalen Fasern beginnt (Waller, 1843). Zunächst zerfallen die Axone und deren Myelinscheiden, welche die Axone umgeben. Bereits nach 2 Tagen werden die Zelltrümmer von einwandernden Makrophagen und den Schwann-Zellen selbst phagozytiert. Durch die entstehenden Zerfallsprodukte werden die Schwann-Zellen zur Proliferation angeregt und bilden sogenannte Büngner-Bänder, die als geschlossene Zellsäulen mit zusammenhängender Basalmembran den von proximal aussprossenden Axonen als Leitschiene dienen (Stoll and Müller, 1999). Ide et. al. äußerten 1996 die Vermutung, dass Makrophagen Zytokine wie Interleukin-1 sezernieren, die die Proliferation der Schwann-Zellen während der Waller-Degeneration anregen (Ide, 1996). Außerdem bewirkt die Waller-Degeneration die Synthese von neurotrophen Faktoren in den Schwann-Zellen, die möglicherweise die Regeneration peripherer Nerven anregt und Einfluss auf die Wachstumsrichtung und das Wachstum nimmt (Lundborg, 1987).

1.6 JNK als bedeutender Faktor in der neuronalen Regeneration und Stabilisierung

Wie in 1.3.2. erwähnt, sind drei Isoformen der JNKs bekannt, wobei JNK1 und JNK2 ubiquitär vorhanden sind und auch in PC12-Zellen vorkommen. Alle drei oben genannten Isoformen der JNK Familie werden unter regelmäßiger NGF-Gabe verstärkt exprimiert (Waetzig and Herdegen, 2005). Zunächst wurde hauptsächlich die Bedeutung der MAPKs für die Neuritenbildung untersucht. Waetzig et al. konnten im Jahre 2003 präsentieren, dass die Inhibition von ERK1/2 und JNKs das Neuritenwachstum signifikant reduzierte (Waetzig and Herdegen, 2003a), indem sie selektive Inhibitoren nutzen. Für ERK1/2 wurde mit dem spezifischen Inhibitor PD 98059 gearbeitet (Waetzig and Herdegen, 2003a). Um die JNKs zu blockieren nutzte man zwei Inhibitoren, den indirekten Inhibitor CEP 11004 und den direkten JNK-Inhibitor SP600125 (Waetzig and Herdegen, 2003a). Selbst JNK3, dem hauptsächlich apoptotische Funktionen zugeschrieben wurden, vermittelte nach Transfektion in PC12-Zellen Neuritenwachstum (Waetzig and Herdegen, 2003b). Mit SB 203580, einem Inhibitor von p38 α , konnte keine signifikante Wirkung auf das Neuritenwachstum nach NGF Stimulation gezeigt werden (Waetzig and Herdegen, 2003a). ERK1/2 und die JNKs sind entscheidender für die NGF-abhängige Differenzierung von PC12-Zellen (Waetzig and Herdegen, 2003a). Im Review von Eleanor Coffey wurde die Bedeutsamkeit der JNKs für die axodendritische Architektur während der Gehirnentwicklung beschrieben (Coffey, 2014). Außerdem werden Neuronen spezifische Funktionen wie synaptische Plastizität auch auf die Funktion der JNKs zurückgeführt (Coffey, 2014). Wie Tararuk et al. 2006 in ihrem Paper beschrieben haben, sind Mikrotubuli fundamentale Komponente des eukaryotischer Zytoskeletts (Tararuk et al., 2006).

SCG10, ein neuronenspezifisches, membran-assoziiertes Protein, welches zu der Stathmin Familie gehört, trägt zu der Organisation der Mikrotubuli bei und ist ein Substrat der JNKs (Tararuk et al., 2006). Vor allem die Isoform JNK1 führt zu einer signifikant wirksamen Phosphorylierung des SCG10 Proteins, das eine Wirkung auf das axodendritische Wachstum, die neuronale Elongation und Migration während der Gehirnentwicklung hat (Tararuk et al., 2006).

Was die Stabilisierung von Neuriten anbelangt, ist die Rolle der JNKs wesentlich unklarer. Bislang konnte ein Schutz vor Destabilisierung und somit auch vor Degeneration in Drosophila-Neuronen gezeigt werden (Rallis et al., 2010). Wie wichtig die JNKs für die Regeneration nach Verletzung peripherer Neurone sind, haben mehrere Arbeiten dargestellt. An Hirnstrangganglionneuronen konnte man im Mausmodell zeigen, dass die Isoform JNK2 großen Einfluss auf zytoskelettale Funktionen hat (Barnat et al., 2010). Barnat et al. präsentierten durch das Arbeiten mit zwei JNK Inhibitoren, dass die JNKs sowohl in der Initiation, als auch in der Elongation der axonalen Regeneration involviert sind (Barnat et al., 2010). Vor allem JNK2 und JNK3 können in den Zellkern transloziert werden und dort die Transkription von *c-jun*, einem Transkriptionsfaktor, bekannt für die neuronale Regeneration und Differenzierung, anregen (Barnat et al., 2010). Durch die genaue Untersuchung der drei Isoformen in dieser Arbeit konnte man schlussfolgern, dass JNK2 und JNK3 maßgeblich für die axonale Initiation und JNK1 und JNK2 für das weitere axonale Wachstum am ausschlaggebendsten sind (Barnat et al., 2010).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll die Bedeutung einzelner Mediatoren für die Stabilisierung und die Neubildung von Neuriten untersuchen. Als Modell wurden PC12-Zellen verwendet, die mit nerve growth factor (NGF) zu einem neuronentypigen Phänotyp differenziert werden können. Überprüft wird die Wirkung einiger Inhibitoren zentraler Signalwege auf die Neuriten bzw. das Überleben der Zellen. Außerdem wird in zwei Regenerationsmodellen untersucht, inwieweit dieselben Signalwege wichtig sind bzw. welche Mediatoren über Zelltod oder Regeneration entscheiden.

Im Einzelnen sollen folgende Sachverhalte erläutert werden:

1. Untersuchung der Stabilisierung von Neuriten in PC12-Zellen
2. Untersuchung der Retraktion von Neuriten in PC12-Zellen
3. Untersuchung der Neuriten-Neubildung in PC12-Zellen

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Folgende Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien. Alle aufgezählten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad *pro analysi* (p. a.).

Tab. 2.1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Acrylamid	BioRad, München
Aminhexansäure	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Deisenhofen
Collagen	Biochrom, Berlin
DMSO	Merck, Darmstadt
Dye Reagent	BioRad, München
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
FCS	Biochrom, Berlin
Glycin	Merck, Darmstadt
Horse Serum	Biochrom, Berlin
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon™ P 1500	Millipore, Eschborn
Immunocruz	Santa Cruz, Heidelberg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Uelzena Milchwerke, Uelzen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

NGF 2,5S	alomone labs, Jerusalem, Israel
Nocodazol	Calbiochem, Schwalbach
PBS	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Deisenhofen
Prestained SDS-PAGE Standards	BioRad, München
RPMI 1640	Gibco Life Technologies, Eggenstein
SDS	Merck, Darmstadt
SP600125	Alexis, Grünberg
U0126	Calbiochem, Schwalbach
Wortmannin	Calbiochem, Schwalbach
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Merck, Darmstadt
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz, Heidelberg
WST-1-Reagenz	Sigma, Deisenhofen

2.2 Herstellung und Sterilisation von Puffern und Lösungen

Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet, welches mit der Anlage Seradest RO-25 compact / Seralpur Pro90CN (Seral, Ransbach-Baumbach) hergestellt wurde.

Die zu sterilisierenden Lösungen wurden bei 2 bar und 120 °C autoklaviert (Autoklav: Webeco DS 202).

2.3 Herkunft, Kultivierung und Differenzierung von PC12-Zellen

2.3.1 Herkunft der PC12-Zellen

Für diese Arbeit wurde mit der Zelllinie PC12 (DSMZ, Braunschweig) gearbeitet. PC12-Zellen stammen aus dem Nebennierenmarkstumor (Phäochromozytom) der Ratte. PC12-Zellen sind sehr sauerstoffempfindlich und wachsen adhärent.

2.3.2 Kultivierung der PC12-Zellen

Die Kultivierung und alle weiteren Arbeitsvorgänge der Zellkultur erfolgten unter einer Sterilbank (Herasafe, Heraeus, Osterode). Die verwendeten Nährmedien wurden vor der Benutzung mindestens 30 Min. im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.3.3 *Verwendete Zellkulturschalen*

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

2.3.4 *Beschichtung von Kulturschalen mit Collagen*

Für die Kultivierung und Ausdifferenzierung der PC12-Zellen wurden collagenbeschichtete Kulturschalen benötigt. Die Beschichtung mit Collagen wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde eine Mischung aus PBS und Collagen in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen hergestellt. Dabei wurde für differenzierte PC12-Zellen eine Collagen-Mischung aus PBS und Collagen von 1:10 genutzt. Für naive PC12-Zellen 1:5.

Erstmals wurde 1 ml einer Collagenlösung in eine Kulturschale gegeben und der Boden mit Hilfe einer Pipette gleichmäßig benetzt. Das überschüssige Collagen wurde mit einer Pipette sorgfältig in die nächste Schale transferiert. Ca. 300 µl der Collagenlösung verblieben somit auf dem Boden jeder Kulturschale. Zur Collagenbindung wurden die beschichteten Schalen für 60 Min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden das nicht gebundene Collagen mit PBS abgespült und die Schalen unter der Sterilbank getrocknet.

2.3.5 *Kulturbedingungen für PC12-Zellen*

Die Kultivierung der PC12-Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank (Hera Cell, Heraeus, Osterode). Der Wechsel der Nährmedien erfolgte alle zwei bis drei Tage. In die 10-cm-collagenbeschichteten Kulturschalen wurden 7 ml Medium gegeben, welches ein Gemisch aus RPMI 1640, 10 % Horse Serum, 5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bestand.

2.3.6 Passage von PC12-Zellen

10 × PBS für Zellpassagen (Stammlösung)		Passage-EDTA	
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,</i>	
KH ₂ PO ₃	0,02 M	<i>bei 4 °C gelagert.</i>	

Autoklaviert, bei 4 °C gelagert.

Passage von PC12 Zellen: Zur Zellvermehrung wurde mit Collagen-beschichteten 10-cm-Kulturschalen gearbeitet. Die Zellen wurden bis Passage 20 verwendet. Nach ca. 7 Tagen, bei einer Konfluenz von 80 %, wurden die Zellen neu ausgesät. Zunächst wurde das Nährmedium mit Hilfe einer Saugpumpe (KNF Miniport, Omnilab, Bremen) aus der Kulturschale entfernt und anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Passage-EDTA gewaschen. Nach erneuter Zugabe von 2 ml Passage-EDTA wurde die Kulturschale für 2 Min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden unter der Sterilbank 5 ml Komplettmedium hinzugegeben, sodass nach diesem Schritt insgesamt 7 ml Medium in der Kulturschale waren. Mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) wurden die Zellen von der Platte abgeschabt und mit einer 10-ml-Pipette in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 1000 UpM (Labofuge GL, Heraeus, Osterode) wurde der Überstand vom Zellpellet mit der Saugpumpe abgesaugt. Später wurde das Zellpellet 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. Erneute Resuspendierung mit einer Pasteurpipette nach Zugabe von weiteren 5 ml Medium. Anschließend wurden die Zellen ausgezählt (2.3.7) und mit einer Konzentration von $1,0-1,8 \times 10^6$ auf die Kulturschalen mit vorgelegtem Medium verteilt.

2.3.7 Bestimmung der Zellzahl

Vor der Zellaussaat mussten die Zellen im Pellet gezählt und gleichermaßen auf die collagenbeschichteten Platten verteilt werden. Dazu verwendeten wir die sog. CasyOne Zellzählung. Die Messung erfolgte über ein elektrisches Feld. Intakte Zellen stellten beim Fluss durch die Kapillare des Gerätes einen Widerstand für das Spannungsfeld dar. Tote Zellen, bei denen die Zellmembran porös war, bildeten keinen Widerstand mehr. Sie wurden von der Messkapillare lediglich mit der Größe ihres Zellkerns erfasst.

Nach Differenzierung (siehe Kapitel 2.3.8) und Stimulation mit den Inhibitoren SP600125, U0126 und Wortmannin hatten die Zellen eine zum Teil stark veränderte Morphologie, sodass

die Zählungen mit Hilfe der Kapillare des CasyOne-Gerätes schwankten. Zur Kontrolle wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet, um lebende und tote Zellen mikroskopisch zu unterscheiden und die Zahl der lebenden Zellen zu bestimmen. Die Zellen wurden gemäß dem Protokoll für die Zellpassage von den Kulturschalen abgeschabt und pelletiert. Zum Resuspendieren der Zellen wurden 500 µl PBS verwendet. Zwanzig Mikroliter der entstandenen Zellsuspension wurden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 20 µl Trypanblau (0,4 %) überführt. Die beiden Lösungen wurden mit Hilfe einer Pipette vermischt. Das Gemisch wurde in eine Zählkammer (Neubauer, Marienfeld) gegeben, um die Zahl der lebenden Zellen zu bestimmen.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Anzahl von stoffwechselaktiven Zellen war die Durchführung eines WST-1-Assay. Das Tetrazoliumsalz WST-1 (Water Soluble Tetrazolinium) wurde von metabolisch aktiven Zellen über mitochondriale Dehydrogenasen zu einem Formazan-Salz reduziert, das photometrisch nachgewiesen werden konnte. Die PC12-Zellen wurden auf eine 96-well-Platte ausgesät, kultiviert und stimuliert. Vor Gebrauch wurde die WST-1-Lösung für 5 Min. in einem Wasserbad aufgewärmt, um sie später leichter zu pipettieren. Pro well einer 96-well-Platte wurden 10 µl Färbelösung verwendet, die für mindestens 30 Min. bis maximal 4 h auf den Zellen verblieb. Die anschließende Messung fand bei 450 nm statt.

2.3.8 Differenzierung von PC12-Zellen

Die Ausdifferenzierung der PC12-Zellen führte dazu, dass diese eine nervenzellähnliche Form annahmen und sich nicht mehr teilten. Nach dem Aussäen der Zellen auf collagenbeschichteten Platten (s.o.), wurden die Zellen 1-2 Tage nach dem Vermehren mit 0,5%igem Medium gefüttert und für 3 Tage in den Brutschrank gestellt. Hierbei wurde das jeweilige Komplettmedium abgesaugt und durch das 0,5 %ige Medium ersetzt, dem nur 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt waren. Nach drei Tagen wurde das Medium ausgetauscht. Das neue Medium enthielt zusätzlich NGF 2,5 S (almone labs) in einer Konzentration von 50 ng/ml. Die Zellen wurden für eine Woche in NGF-haltigem Medium kultiviert, welches alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Eine Woche nach Beginn der NGF-Behandlung haben ca. 60% der Zellen Ausläufer gebildet und konnten für die geplanten Versuche verwendet werden.

2.3.9 Die mechanische Entfernung von Neuriten (injury)

Die mechanische Entfernung von Neuriten bei differenzierten 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 über 7 Tage differenziert. Es wurde 1 Schale differenzierte Zellen benötigt, um 1 Schale injury-Zellen 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 gegeben. Die Aliquots der Zellsuspension umfassten bei den 10-cm-Schalen 500 µl. Der Anteil der Zellen mit Neuriten, die dem 1,5 fachen Durchmesser des Zellkörpers entsprachen, wurde an den Tagen 1 bis 5 nach *injury* bestimmt.

2.3.10 Stimulation von PC12-Zellen durch SP600125, U0126 und Wortmannin

Zur Stimulation wurden die Inhibitoren SP600125 (SP), U0126 (U0), Wortmannin (Wort) in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Vor der Zugabe der verschiedenen Substanzen wurde das Medium abgesaugt und durch neues ersetzt. Anschließend wurden die Stimulantien in unterschiedlichen Konzentrationen dem Medium mit den Zellen zugesetzt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach einer Dauer von 24 h bzw. 48 h wurden die unterschiedlichen Analysen durchgeführt. Für die Versuche wurden differenzierte Zellen genutzt.

2.3.11 Einfrieren von PC12-Zellen

Einfrieremedium

Komplettmedium	80 %	<i>Frisch unter der Sterilbank angesetzt und nur</i>
FCS	10 %	<i>kurz bei Raumtemperatur unter der Sterilbank</i>
DMSO	10 %	<i>gelagert.</i>

Zellen aus einer 10-cm-Kulturschale wurden nach dem Protokoll für die Zellpassage (Kap. 2.3.6.) abgeschabt und pelletiert. Die Zellen wurden in 3 ml Einfrieremedium 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 bei -80 °C eingefroren.

2.4 Herstellung von Gesamtzelllysaten

2.4.1 DLB-Lyse

10 × PBS (Stammlösung)		Lysispuffer für Gesamtzelllysate (DLB-Puffer)	
NaCl	1,37 M	Tris (pH 7,4)	10 mM
KCl	0,03 M	SDS	1% (St. 10%)
Na ₂ HPO ₃	0,07 M	Phosphatase-Inhibitor	1%
KH ₂ PO ₃	0,02 M		

Bei 4 °C gelagert.

Für die denaturierende Lyse wurde DLB-Puffer benutzt. Er wurde als zweifach konzentrierte 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% Phosphatase-Inhibitor zugesetzt.

Zunächst wurde das Nährmedium aus der Kulturschale mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt. Danach wurden 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 Schalenboden gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert und die Zellen kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge: National Labnet, Woodbridge NJ, USA). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach seinem Volumen in 80-100 µl Lysispuffer vollständig resuspendiert. Anschließend wurden die Proben 5 Min. bei 95°C im Heizblock (Thermomixer 543, Eppendorf, Hamburg) gekocht. Zur Lyse wurden die Proben zweimal für 5 sec mit einem Ultraschallstab behandelt (Sonoplus GM70, Bandelin, Berlin) und anschließend für 15 Min. bei 4 °C und 13 000 UpM zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode). Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Proteinbestimmung konnten die Proben auf Eis zwischengelagert oder bei –80 °C eingefroren werden.

2.4.2 Caspase Lyse

10 × PBS (Stammlösung)		Lysispuffer für Gesamtzelllysate (Caspase 3)	
NaCl	1,37 M	Chaps Cell extract Puffer	
KCl	0,03 M	Pipes/ NaOH (pH 6,5)	50mM
Na ₂ HPO ₃	0,07 M	EDTA	2mM
KH ₂ PO ₃	0,02 M	Chaps	0,1%

Bei 4 °C gelagert.

Der Lysispuffer wurde bei 4°C gelagert. Direkt vor der Lyse wurden PMSF (1 mM), Leupeptin (20 µg/ml), DTT (5 mM), Aprotinin (10 µg/ml) und Pepstatin (10 µg/ml) zugesetzt. Zunächst wurde das Nährmedium aus der Kulturschale mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt. Danach wurden 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 Schalenboden gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert und die Zellen kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge: National Labnet, Woodbridge NJ, USA). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach seinem Volumen in 20-30 µl Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben wiederholt (insgesamt dreimal) in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Schließlich wurden die Proben für 15 Min. bei 4 °C und 13 000 UpM zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode). Der Überstand mit den Proteinen wurde für die Proteinbestimmung in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß übergeführt.

2.4.3 Herstellung von nativen Proteinen

10 × PBS (Stammlösung)		Lysispuffer für Gesamtzelllysate	
NaCl	1,37 M	NaCl	250 mM (St.: 1 M)
KCl	0,03 M	Tris	20 mM (St.: 1 M)
Na ₂ HPO ₃	0,07 M	EDTA	3 mM (St.: 0,5 M)
KH ₂ PO ₃	0,02 M	EGTA	3 mM (St.: 0,25 M)
<i>Bei 4 °C gelagert.</i>		Nonidet P-40	0,5 %
		<i>Bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch zugeben:</i>	
<i>PMSF-Stammlösung</i>		β-Glycerolphosphat	100 mM (St.: 1 M)
PMSF in Isopropanol	100 mM	Na-Vanadat	100 µM (St.: 1 M)
<i>Aliquotiert, bei -20 °C gelagert.</i>		PMSF	100 µM (St.: 100 mM)
		PNPP	1 mM (St.: 1 M)
		<i>Auf Eis zwischengelagert.</i>	

Zur Analyse Proteininteraktionen musste eine andere Lyse verwendet werden, um die Struktur der Proteine nicht zu stark zu verändern. Zunächst wurde das Nährmedium aus der Kulturschale abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 800 µl PBS in die Schale pipettiert und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Schalenboden gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert und die Zellen kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge: National Labnet, Woodbridge NJ, USA). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach seinem Volumen in 50-200µl Lysispuffer vollständig resuspendiert. Zur Lyse wurden die Proben für 30 Min. auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Min. bei 4°C und 13 000 UpM zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode). Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Proteinbestimmung konnten die Proben auf Eis zwischengelagert oder bei – 80 °C eingefroren werden.

2.5 Herstellung von Kernproteinen

10 × PBS (Stammlösung)

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

Bei 4 °C gelagert.

Lysispuffer

HEPES	10 mM (St.: 1 M; pH 7,9)
-------	-----------------------------

KCl	10 mM (St.: 1 M)
MgCl ₂	1,5 mM (St.: 100 mM)

Bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch zugegeben:

Dithiothreitol	0,5 mM (St.: 1 M)
PMSF	0,5 mM (St.: 100 mM)

Auf Eis zwischengelagert.

Lysispuffer für Gesamtzelllysate (DLB-Puffer)

Tris (pH 7,4)	10 mM
SDS	1% (St. 10%)
Phosphatase-Inhibitor	1%

Lysispuffer mit Nonidet P-40

Zusätzlich unmittelbar vor Gebrauch zugegeben:

Nonidet P-40	0,1 % (v/v)
--------------	-------------

Zunächst wurde das Nährmedium aus der Kulturschale entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden in jede Kulturschale 800 µl PBS pipettiert und die Zellen vom Schalenboden abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt

und kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge: National Labnet, Woodbridge NJ, USA). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Lysispuffer ohne Nonidet gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Resuspendieren in 50 µl Lysispuffer mit Nonidet P-40 und eine zehnmündige Inkubation auf Eis lysiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 4 °C und 11 700 UpM (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode) wurde der Überstand (Zytoplasma-Fraktion) in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 1% SDS überführt. Das Pellet (Kernproteine) wurde in 20-50 µl DLB-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden alle Proben 5 Min. bei 95°C im Heizblock (Thermomixer 543, Eppendorf, Hamburg) gekocht. Zur Lyse wurden die Proben zweimal für 5 sec mit einem Ultraschallstab behandelt (Sonoplus GM70, Bandelin, Berlin) und anschließend für 15 Min. bei 4 °C und 13 000 UpM zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode). Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Proteinbestimmung konnten die Proben auf Eis zwischengelagert oder bei -80 °C eingefroren werden.

2.6 Bestimmung des Proteingehaltes von Zellextrakten

Für die Bestimmung des Proteingehaltes von Gesamtzellextrakten (Kap. 2.4) wurde eine Standardreihe mit BSA-Lösung eingesetzt, die folgende Werte umfasste: 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml und 0,6 mg/ml. Als Färbelösung diente Dye Reagent (BioRad, München) in einer Verdünnung von 1:5 mit A. bidest.

Zunächst wurden die Gesamtzellextrakte verdünnt, um Werte in den Größenordnungen der Standardreihe zu erhalten. Die Gesamtzellextrakte wurden jeweils im Verhältnis 1:50 mit A. bidest. verdünnt. Jeweils 20 µl der verdünnten Proteinlösungen wurden in eine Einmalküvette aus Kunststoff pipettiert und mit 1 ml der Färbelösung versetzt. Die Lösungen wurden mit Hilfe eines Vortex vermischt und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor ihre Extinktion bei $\lambda = 595$ nm im Photometer (U-2000, Hitachi, Wiesbaden) gemessen wurde.

Die Proteinkonzentration einer Probe [K(P)] wurde aus den Extinktionen der Probe [E(P)] und des Standards [E(S)] sowie der Proteinkonzentration des Standards [K(S)] nach Gleichung 2.8.1. berechnet:

$$K(P) = \frac{E(P) \times K(S)}{E(S)}$$

Gleichung 2.8.1.: Berechnung der Proteinkonzentration K(P).

2.7 Immunpräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, geht auf das System ImmunoCruz™ IP/WB Optima System (Santa Cruz Biotechnology) zurück.

2.7.1 Pre-Cleaning

In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 150 µg Protein-Lysat mit Lysispuffer auf 200 µl aufgefüllt. Dazu wurden 10 µl Pre-Clearing-Matrix gegeben. Das Ganze wurde bei 4°C für 30 Min. geschüttelt. Anschließend wurde die Pre-Clearing-Matrix bei 13000 UpM für 30 Sek. abzentrifugiert. Der Überstand musste in eine neues Röhrchen pipettiert und kurz bei 4 °C gelagert werden.

2.7.2 Bildung des Antikörper-Matrix-Komplexes

In ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 40 µl IP-Matrix, 0,5 µg Antikörper und 500 µl PBS pipettiert. Alles wurde bei 4°C für mindestens 1 h geschüttelt und anschließend für 30 Sek. bei 13000 UpM zentrifugiert. Hinterher musste der dabei entstandene Überstand verworfen werden. Die Matrix wurde zweimal mit 500 µl PBS gewaschen.

2.7.3 Immunpräzipitation und Western-Blot

Das vorgereinigte Lysat wurde auf die pelletierte Matrix übertragen. Über Nacht wurde das Ganze bei 4°C geschüttelt. Anschließend zentrifugierte man für 30 Sek. und der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Danach wurde die pelletierte Matrix dreimal mit PBS gewaschen. Das Pellet musste dann in 20 µl A. bidest resuspendiert werden. Anschließend fügte man 10µl *sample buffer* hinzu und inkubierte alles für 5 Min. bei 95°C im Heizblock. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand auf das Western-Blot-Gel aufgetragen.

2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer (4 ×)

Tris 0,5 M (St.: 1 M,
pH 6,8)
SDS 0,4 % (St.: 10 %)

Bei 4 °C gelagert.

Trenngelpuffer (4 ×)

Tris 1,5 M (St.: 2 M,
pH 8,8)
SDS 0,4 % (St.: 10 %)

Bei 4 °C gelagert.

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (10 ×)

Tris 0,25 M
Glycin 2 M
SDS 0,03 M

Beladungspuffer

Tris 0,06 M (St.: 1 M;
pH 6,8)
Glycerol 27,5 % (St.: 50 %)

Bei Raumtemperatur gelagert.

SDS 2,2 % (St.: 10 %)

β -Mercaptoethanol 5,5 %

Bromphenolblau 0,1 % (St.: 1 %)

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, da diese Abschnitte eine unterschiedliche Zusammensetzungen und Funktionen haben: Das Sammelgel komprimiert die Proteine zu Banden. Im Trenngel werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurde das Gelkammersystem Mini Protein III™ (BioRad, München) und ein diskontinuierliches Puffersystem nach LÄMMLI (1970) in einer vertikalen Anordnung verwendet. Die Proteine wurden je nach Größe in 10-15 %igen Gelen aufgetrennt. Die eingesetzten Mengen der Gelkomponenten (abhängig von der Geldicke) sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt.

Die zwei 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. Diese sorgten für einen geraden Übergang zwischen Sammel- und Trenngel. Nach der vollständigen Polymerisation der Gelmatrizes wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1 × Elektrophoresepuffer gefüllt. Nach dem Entfernen des Kamms wurden alle Gelreste sorgfältig mit Hilfe einer Pipette aus den puffergefüllten Geldaschen entfernt.

Tab. 2.2: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die SDS-PAGE.

Substanzen	Trenngel		
	10%	12%	15%
Acrylamid (30 %)	3,33 ml	4 ml	5,025 ml
A. bidest.	4,17 ml	3,5 ml	2,48 ml
Trenngelpuffer (4 ×)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
APS (10 %)	50 µl	80 µl	80 µl
TEMED (100 %)	9 µl	9 µl	9 µl
		Sammelgel	
Acrylamid (30 %)		670 µl	
A. bidest.		2,3 ml	
Sammelgelpuffer (4 ×)		1 ml	
APS (10 %)		30 µl	
TEMED (100 %)		9 µl	

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 5:1 mit Beladungspuffer versetzt. Der Größenmarker (Prestained SDS-PAGE Standards, broad range; BioRad, München) wurde im Verhältnis 1:5 mit A. bidest verdünnt. Anschließend wurden die Proben für 5 Min. bei 95 °C im Heizblock (Thermomixer 543, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Allerdings wurde der Marker nur für 1 Min bei 95° im Heizblock (Thermomixer 543, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die Geltaschen wurden je nach Geldicke mit einer Probenmenge von 10-40 µl aufgefüllt. 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.

2.8.2 Western-Blot

10 × TBS (Stammlösung)

Tris/HCl 1 M; pH 7,5

NaCl 1,5 M

Bei 4 °C gelagert.

TTBS

TBS 1 ×

Tween-20 0,1 %

Frisch angesetzt.

Kathodenpuffer

Tris 25 mM

Blocking solution

Magermilchpulver

Aminhexansäure	40 mM	in TTBS	4 %
SDS	0,01 % (St.: 10 %)	<i>Bei 4 °C gelagert.</i>	
Methanol	20 %		

Bei Raumtemperatur gelagert.

Anodenpuffer I

Tris	30 mM
Methanol	20 %

Bei Raumtemperatur gelagert.

Anodenpuffer II

Tris	300 mM
Methanol	20 %

Bei Raumtemperatur gelagert.

Nach einer SDS-PAGE im 12 %-Gel (Kap. 2.6.1.) wurden die untersuchten Proteine im Western-Blot qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Um alle Proteine nachweisen zu können, wurden 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 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 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.

Jetzt wurden die Proteine bei 0,8 mA/cm² für 50-90 Min. geblottet. Anschließend wurde die Blotmembran in eine geringe Menge TTBS auf einer Plexiglasplatte überführt, wo überflüssige Teile der Membran mit Hilfe eines Skalpells 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* 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 Peroxidase-gekoppelten-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 (Luminol Reagent, Santa Cruz) 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.

2.9 Antikörper

In der Tabelle 2.3 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 2.3 Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller
<i>anti-actetylated α-Tubulin</i> (monoklonal, Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti-β-Actin</i> (monoklonal, Maus)	Sigma, Deisenhofen
<i>anti-Akt</i> (polyklonal, Kaninchen)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>anti-Caspase 3</i> (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti-cl. Caspase 3</i> (polyklonal, Kaninchen)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>anti-ERK1/2</i> (polyklonal, Kaninchen)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>anti-JIP1</i> (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti-JIP3</i> (monoklonal, Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti-JNK</i> (polyklonal, Kaninchen)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>anti-MEK1</i> (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti-MEKK1</i> (monoklonal, Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti-MKK4</i> (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti-MKK7</i> (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti-MKP1</i> (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg

<i>anti</i> -Neurofilament (monoklonal, Maus)	Sigma, Deisenhofen
<i>anti</i> -p38 (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti</i> -PARP (polyklonal, Kaninchen)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>anti</i> -phospho-Akt (polyklonal, Kaninchen)	Promega, Mannheim
<i>anti</i> -phospho-ERK1/2 (polyklonal, Kaninchen)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>anti</i> -phospho-JNK (polyklonal, Kaninchen)	Promega, Mannheim
<i>anti</i> -phospho-MEK1/2 (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti</i> -phospho-MKK4 (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti</i> -phospho-MKK7 (polyklonal, Kaninchen)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>anti</i> -phospho-p38 (polyklonal, Kaninchen)	Promega, Mannheim
<i>anti</i> -SCG10 (monoklonal, Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
<i>anti</i> -tyrosine Tubulin (monoklonal, Maus)	Sigma, Deisenhofen

2.10 Strippen von Western-Blot-Membranen

Stripping Solution

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 Proteine wieder für einen Primärantikörper zugänglich zu machen, in dem die Komplexe aus Primär- und Sekundärantikörpern von der Membranen entfernt wurden. Erstmals wurde die Membran für 30 Min. bei 50 °C auf einem Schüttler in der *stripping solution* inkubiert. Anschließend wurde die *stripping solution* vorsichtig entfernt und die Membran zweimal für 10 Min. in TTBS (Kap. 2.6.2) gewaschen. Die gewaschene Membran wurde für 60 Min. in *blocking solution* inkubiert und war bereit für eine erneute Primärantikörper-Inkubation.

2.11 Statistische Auswertung der Überlebensversuche und des Neuritenwachstums

Bei der statistischen Analyse der Daten aus den Überlebensversuchen und den mikroskopischen Auswertungen der Neuriten-tragenden Zellen wurden zunächst die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen berechnet. Für die statistische Analyse wurde das Programm *GraphPad Prism 5* verwendet. Die Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe der *one-way analysis of variance with repeated measures* (ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-

Post-Test überprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft.

3 ERGEBNISSE

3.1 Neuritenstabilisierung

3.1.1 Inkubation von PC12-Zellen mit SP600125, U0126, Wortmannin

Um die Vorgänge, die zum Umbau von Neuriten führen, besser zu verstehen, war es notwendig, vorher deren Stabilisierung zu untersuchen. Dazu wurden PC12-Zellen, die für 7 Tage mit NGF (50 ng/ml) differenziert wurden, mit folgenden Inhibitoren inkubiert: JNK- Blockade durch SP600125 (2 μ M), ERK1/2-Blockade durch U0126 (5 μ M) und Akt-Blockade durch Wortmannin (500 nM). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Überleben der Zellen durch die Gabe von SP600125 und U0126 signifikant abnahm, während Wortmannin keine Änderung hervorrief (Abb. 3.1 A). Die Zellzahl wurde mit Hilfe von WST-1-Assays untersucht. Ob apoptotischer Zelltod für die Reduktion der Zellzahl verantwortlich war, wurde mit Western-Blots zur Aktivierung der Caspase 3 überprüft (Abb. 3.1 B). Nach 24-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren war eine Spaltung der Caspase 3 durch SP600125 und U0126 nachweisbar, während die Proteinmenge konstant blieb.

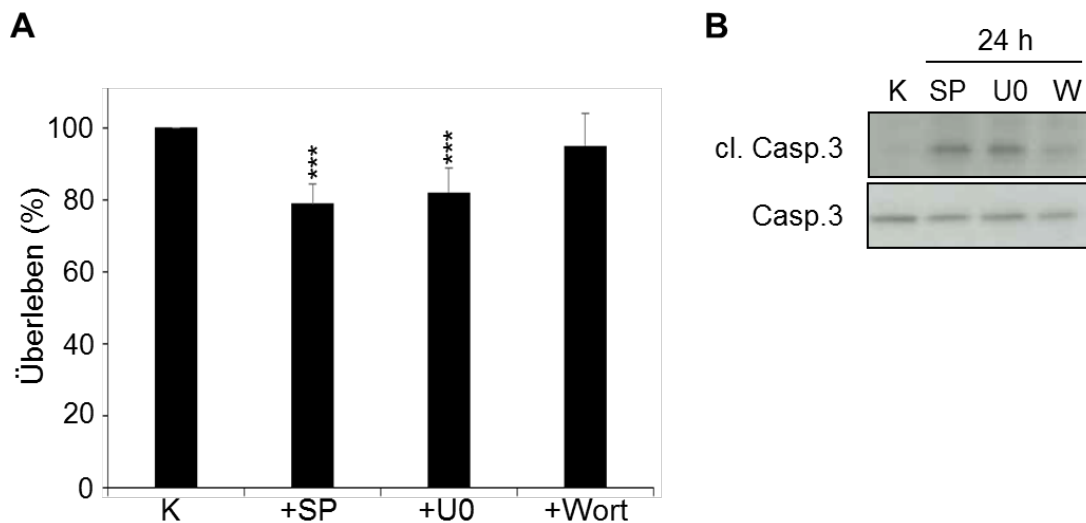


Abb. 3.1: SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (Wort/W, 500 nM) reduzierten das Überleben von PC12-Zellen. A, WST-1-Assays zeigten eine reduzierte Zellzahl nach 24 h; B, Detektion von Caspase-3-Aktivierung mit Western-Blots; K: Kontrolle. *** $p < 0,0001$ zur Kontrolle.

Zusätzlich zum Überleben reduzierte die Gabe der Inhibitoren SP600125, U0126 und Wortmannin nach 24-stündiger Inkubation auch die Anzahl der Neuriten-tragenden Zellen

(Abb. 3.2, Abb. 3.3 A). Als differenziert galt eine Zelle, wenn ihr Ausläufer mehr als das 1,5-Fache des Zelldurchmessers besaß.

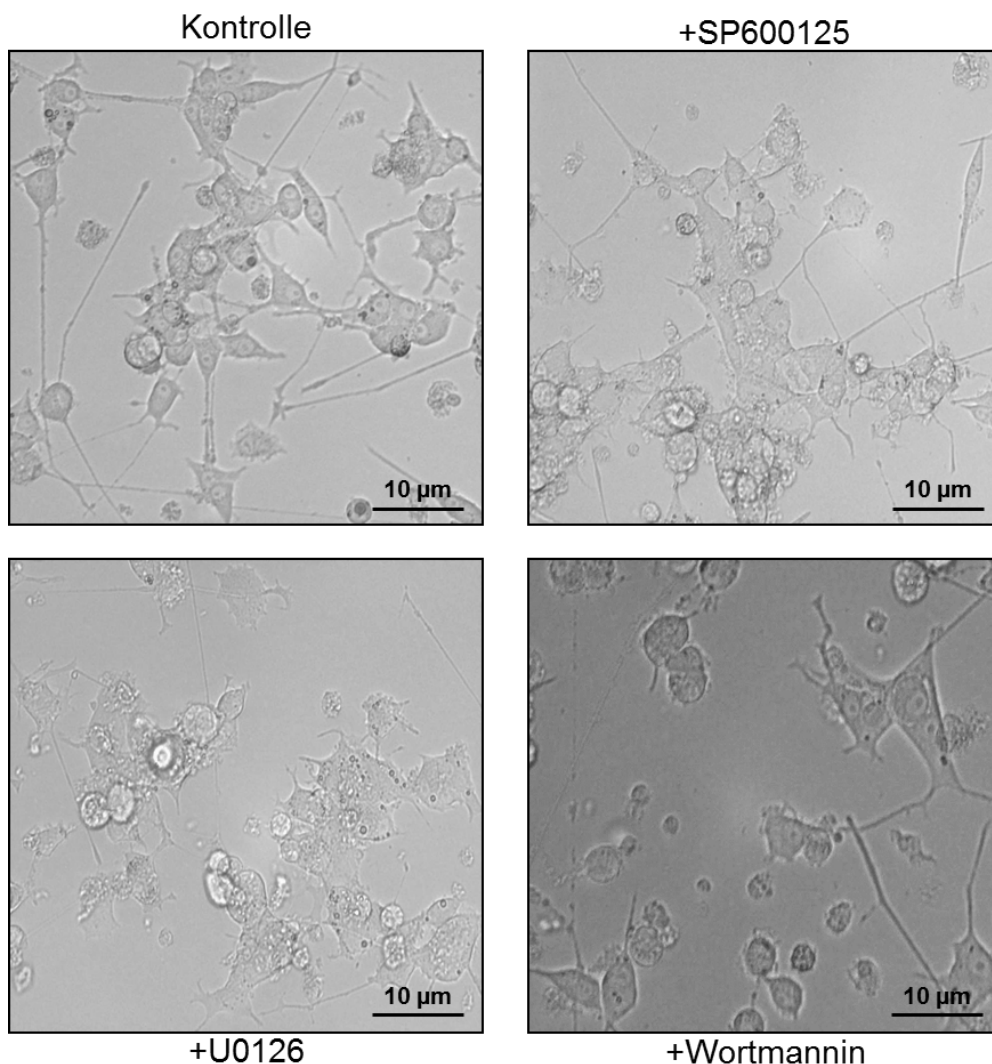


Abb. 3.2: Eine 24-stündige Inkubation mit SP600125 (2 µM), U0126 (5 µM), Wortmannin (500 nM) reduzierte die Anzahl Neuriten-tragender PC12-Zellen.

Die Auswertung von jeweils 5 unabhängigen Experimenten zeigte, dass mehr als die Hälfte (53 %) der Kontrollzellen nach 8-tägiger NGF-Behandlung ausdifferenziert war (Abb. 3.3 A). Die Gabe des JNK-Inhibitors SP600125 reduzierte die Zahl der Neuriten-tragenden Zellen auf 37 % nach 24-stündiger Inkubation. Vergleichbar war der Effekt durch den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit 35 %. Der Inhibitor der PI3-Kinase Wortmannin reduzierte die Zahl der ausdifferenzierten Zellen nach 24-stündiger Inkubation auf 37 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.3 A). Um die abnehmende Stabilisierung der Neuriten durch einen weiteren Marker abzubilden, wurde das zu den Intermediärfilamenten gehörende Protein Neurofilament als Indikator gewählt, da seine essentielle Rolle in der Neuritenstabilisierung und im axonalen

Wachstum bereits gezeigt wurde (S. Lee and Shea, 2014). Nach einem Tag Inkubation mit den Inhibitoren waren Phosphorylierung und Expression durchweg reduziert (Abb. 3.3 B).

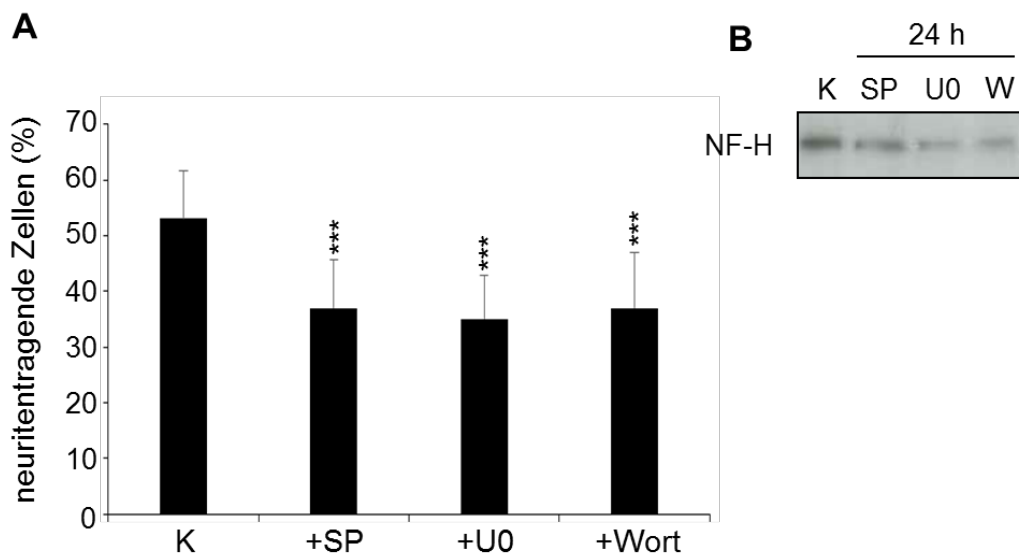


Abb. 3.3: SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (Wort/W, 500 nM) reduzierten die Anzahl Neuriten-tragenden PC12-Zellen. A, Mikroskopische Auswertung von 5 unabhängigen Experimenten; B, Detektion von der schweren Untereinheit des Neurofilament-Proteins mit Western-Blots; K: Kontrolle. *** $p < 0,0001$ zur Kontrolle.

3.1.2 Aktivierung und Expression von MAP-Kinasen und Akt nach Gabe von SP600125, U0126 und Wortmannin

Die Inhibition von ERK1/2, JNK und Akt verringerte das Überleben der Zellen und die Anzahl ihrer Neuriten. In den folgenden Experimenten sollte festgestellt werden, ob und wie stark SP600125, U0126 und Wortmannin möglicherweise auch andere Signalwege beeinflussten. Dazu wurden Ganzzell-Lysate hergestellt und mit Western-Blots die aktivierte Kinase und deren Proteinexpression untersucht. Wie erwartet, reduzierte die Gabe von U0126 die Phosphorylierung von ERK1/2 sowie Wortmannin die Phosphorylierung von Akt (Abb. 3.4 A). SP600125 hemmte, wie ebenfalls beschrieben, nicht die Aktivität von JNK, sondern nur die Phosphorylierung von c-Jun (nicht gezeigt). In den Kontrollzellen zeigte sich generell eine Basalaktivität der einzelnen Kinasen. Die Proteinexpression änderte sich durch Inhibitorgabe nicht.

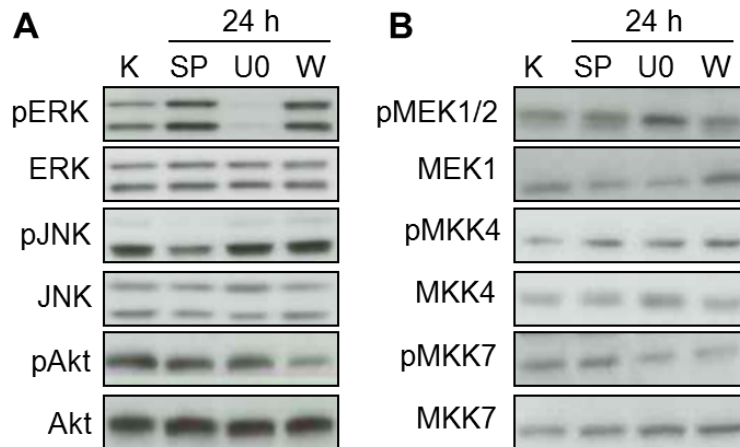


Abb. 3.4: Western-Blots zur Aktivierung und Expression verschiedener Kinasen nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM). A, Die Inhibitoren veränderten das Aktivierungsmuster von ERK1/2, JNK, Akt. B, Phosphorylierungsmuster von MEK1, MKK4 und MKK7; K: Kontrolle.

Insgesamt fiel auf, dass die drei Inhibitoren auch die Aktivierungsmuster der jeweils anderen Kinasen veränderten. So verstärkte SP600125 die Phosphorylierung von ERK1/2, während die Aktivierung von Akt wenig beeinflusst wurde (Abb. 3.4 A). Der MEK1-Inhibitor U0126 hemmte die Phosphorylierung von ERK1/2, veränderte die Aktivitäten von JNK und Akt jedoch nicht. Wortmannin verringerte die Aktivität von Akt und erhöhte die Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 3.4 A).

Auch die direkten Aktivatoren von ERK1/2 und JNK zeigten ein verändertes Aktivitätsmuster nach Inhibitorgabe (Abb. 3.4 B). Die Phosphorylierung von MEK1/2 war nach U0126 erhöht, jedoch ansonsten wenig beeinflusst im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Aktivierung von MKK4, die MAP2K von p38 und JNK, wurde durch die Gabe aller drei Inhibitoren verstärkt phosphoryliert. Bei dem JNK-Aktivator MKK7 blieb die Phosphorylierung nach der Gabe von SP600125 auf Kontrollniveau, die Blockade von ERK1/2 und Akt reduzierte die Aktivität. Die Proteinexpression aller Kinasen schwankte leicht, blieb jedoch insgesamt konstant.

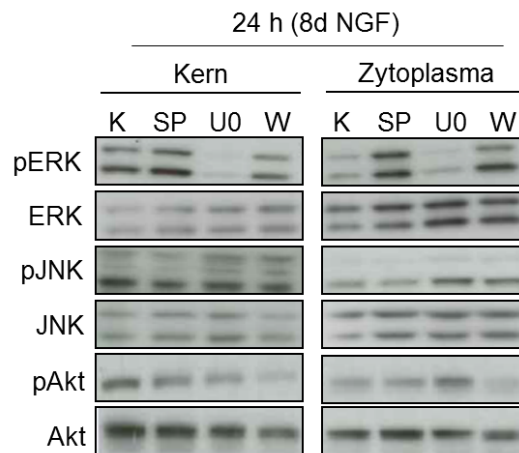


Abb. 3.5: Western-Blots zur Aktivierung und Expression verschiedener Kinasen in Kern- und Zytoplasma-Extrakten nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM). K: Kontrolle.

Da die Lokalisierung der einzelnen Kinasen wichtig ist für deren Funktion, wurde ihre Verteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma untersucht (Abb. 3.5). Zunächst fiel auf, dass die alle drei untersuchten Kinasen gerade im Kern eine auffällige Basalaktivität aufwiesen. Die Proteinmenge war dagegen im Zytoplasma höher, mit Ausnahme von Akt, dessen Proteinexpression gleichmäßiger verteilt war. Ansonsten bot sich nur bei ERK1/2 ein ähnliches Muster wie in den Ganzell-Lysaten (Abb. 3.4 A): Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde durch U0126 inhibiert und durch SP600125 sowie Wortmannin verstärkt, wobei die Akt-Inhibition nur im Zytoplasma zu einer erhöhten Aktivierung führte (Abb. 3.5). Die Aktivität von JNK wurde im Kern wenig verändert, im Zytoplasma durch SP600125 reduziert und durch U0126 und Wortmannin leicht verstärkt. Akt, dessen Phosphorylierung in Ganzell-Lysaten durch ERK1/2- bzw. JNK-Inhibition nicht verändert wurde (Abb. 3.4 A), zeigte in Kern und Zytoplasma eine gegenläufige Regulation: Im Kern wurde die Phosphorylierung durch SP600125 und U0126 vermindert, im Zytoplasma erhöht (Abb. 3.5), woraus ein weitgehend gleichmäßiges Phosphorylierungsmuster resultiert, wenn man die Kompartimente nicht getrennt betrachtet.

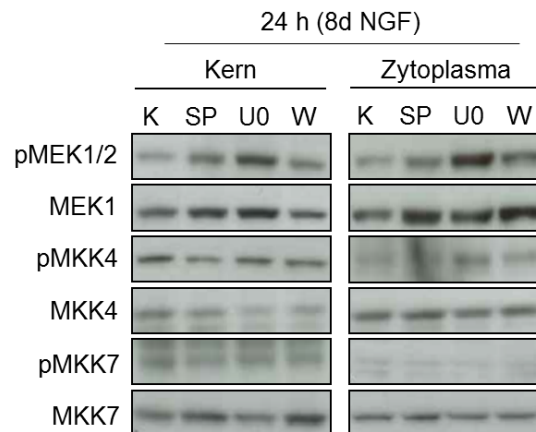


Abb. 3.6: Western-Blots zur Aktivierung und Expression verschiedener Kinasen in Kern- und Zytoplasma-Extrakten nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM). K: Kontrolle.

Bei der Analyse der MAP2-Kinasen zeigte sich für MEK1/2 eine generell verstärkte Phosphorylierung durch U0126, nach SP600125 und Wortmannin eine Erhöhung (Abb. 3.6). MKK4 besaß im Kern eine Basalaktivität, die durch JNK-Inhibition reduziert wurde. Zytoplasmatisch konnte nach U0126 und Wortmannin eine verstärkte Aktivität detektiert werden (Abb. 3.6). Auch die nukleäre Phosphorylierung von MKK7 war stärker als die zytoplasmatische; beides zeigte allerdings keine auffällige Regulierung durch die unterschiedlichen Inhibitoren. Die Proteinmenge schwankten innerhalb der Experimente, insgesamt deutete jedoch nichts auf eine Induktion, einen verstärkten Transport oder Abbau hin (Abb. 3.6).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Stabilität der Neuriten einem komplexen Regulationsmuster unterliegt, wobei sich die einzelnen Signalwege gegenseitig zu beeinflussen scheinen. Auffällig war besonders, dass die Hemmung von Akt und ERK1/2 zu einer erhöhten JNK-Aktivierung führte, während die JNK-Inhibition die Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 verstärkte.

3.1.3 Interaktion von ERK1/2, JNK und Akt

Um die möglichen Interaktionen zwischen den einzelnen Signalwegen zu untersuchen, wurden zusätzliche Regulatoren der unterschiedlichen Kinasen hinzugezogen.

Zunächst wurde die Möglichkeit einer indirekten Regulation von JNKs durch ERK1/2 und Akt in Betracht gezogen. Dazu wurde die Expression der JNK-Phosphatase MKP1 untersucht. Da

deren Induktion durch die MAPK p38 erfolgen kann, wurden auch Phosphorylierung und Expression von p38 überprüft.

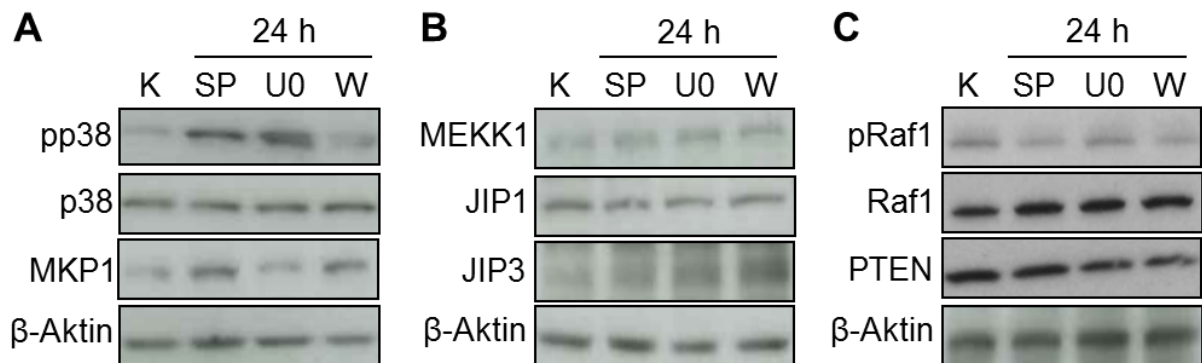


Abb. 3.7: Western-Blots zur Aktivierung und Expression verschiedener Gerüst-Proteine und Kinasen nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM). A, p38 wurde nach SP600125 und U0126 stärker phosphoryliert, die Expression von MKP1 war durch SP600125 leicht erhöht und durch U0126 reduziert. B, Während sich die Expression von MEKK1 und JIP1 nicht änderte, war die Menge von JIP3 nach Inhibitorgabe erhöht. C, Die Kinase Raf-1 wurde nach SP600125 und Wortmannin weniger stark an Ser295 phosphoryliert, die Phosphatase PTEN durch U0126 und Wortmannin weniger stark exprimiert; K: Kontrolle.

Nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 und U0126 war die Phosphorylierung von p38 erhöht (Abb. 3.7 A), während sich die Proteinmenge nicht veränderte. Die Phosphatase MKP1 wurde nach der Gabe von SP600125 verstärkt exprimiert und durch U0126 reduziert, was nur eine teilweise Induktion durch p38 nahelegt. Eine zusätzliche Dephosphorylierung von JNK durch MKP1 nach SP600125 ist möglich, eine verminderte Deaktivierung durch die geringere Expression von MKP1 durch U0126 auch. Beta-Aktin wurde als Auftragskontrolle verwendet. Bei direkten Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Signalwegen kann die Aktivität eines Mediators über die Veränderung von Signalkomplexen die Aktivität eines anderen Moleküls beeinflussen. Für die Zusammensetzung von Signalkomplexen sind die Gerüst-Proteine, die so genannten *scaffold*-Proteine, wichtig (Coffey, 2014). Deshalb wurde die Expression von MEKK1, JIP1 und JIP3 untersucht, da sie die Signalwege von ERK1/2, JNK und Akt verbinden. Veränderungen der Proteinmenge konnten nur bei JIP3 detektiert werden, das insbesondere durch U0126 und Wortmannin in seiner Expression zunahm (Abb. 3.7 B). Da JIP3 insbesondere zytoplasmatisch lokalisiert ist (Davis, 2000), könnte die erhöhte Expression zu einer verstärkten Phosphorylierung von MKK4 und JNK in diesem Kompartiment führen. Weder MEKK1 noch JIP1 wurden reguliert.

Die Signalwege von ERK1/2 und Akt haben unterschiedliche Interaktionspunkte. So kann beispielsweise Akt die Kinase Raf-1 an Serin295 phosphorylieren und dadurch deren Aktivität inhibieren, was wiederum die Aktivität von ERK1/2 reduziert. Durch die Gabe von SP600125 und Wortmannin wurde die inhibitorische Phosphorylierung von Raf-1 vermindert (Abb. 3.7 C), was die erhöhte Aktivität von ERK1/2 erklären könnte. Die Phosphatase PTEN hemmt die Aktivierung von Akt und kann durch ERK1/2 reguliert werden. Gerade durch U0126 war die Proteinmenge von PTEN reduziert (Abb. 3.7 C), was mit der verstärkten zytoplasmatischen Aktivität von Akt korrespondiert.

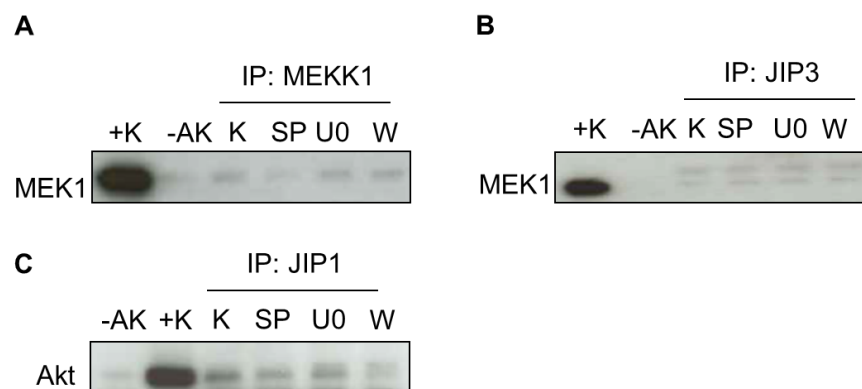


Abb. 3.8: Western-Blots nach Co-Immunopräzipitation mit MEKK1 nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM). A, Die Bindung von MEK1 an MEKK1 wurde durch die Gabe von SP600125 schwächer. B, Die Bindung von MEK1 an JIP3 blieb unter allen Bedingungen gleich. C, Die Interaktion zwischen Akt und JIP1 war durch SP600125 und Wortmannin schwächer als in der Kontrolle. K: Kontrolle.

Zusätzlich wurde überprüft, ob bei der Regulation von ERK1/2 die stärkere Phosphorylierung durch die Gabe von SP600125 und Wortmannin auf veränderte Zusammensetzung der beteiligten Signalosomen zurückzuführen war. Die Co-Immunopräzipitation mit MEKK1 und MEK1 zeigte, dass die Bindung von MEK1 an MEKK1 durch SP600125 vermindert wurde (Abb. 3.8 A). Die Interaktion unter U0126 und Wortmannin veränderte sich im Vergleich zur Kontrolle nicht. Die Bindung von MEK1 an JIP3 führt zu einer Hemmung von ERK1/2. Hier blieb die Bindung von MEK1 an JIP3 jedoch unter allen Bedingungen gleich (Abb. 3.8 B). Die Signalwege von Akt und JNKs können über JIP1 interagieren. Durch die Gabe von SP600125 und Wortmannin wurde die Bindung von Akt an JIP1 reduziert, während U0126 nur eine geringe Reduktion im Vergleich zur Kontrolle hervorrief (Abb. 3.8 C). Das könnte die erhöhte zytoplasmatische Phosphorylierung von Akt nach der Gabe von SP600125 erklären.

3.2 Neuritenretraktion und Neuritenregeneration

3.2.1 PC12-Zellmodelle zur Retraktion und Regeneration von Neuriten

Da in der vorliegenden Arbeit die physiologischen von den degenerativen JNK-Funktionen getrennt untersuchen sollte, wurden unterschiedliche Modelle entwickelt, in denen Retraktion und Regeneration der Neuriten entweder mit einem proapoptotischen Insult assoziiert waren oder mit einem physiologischen Stimulus.

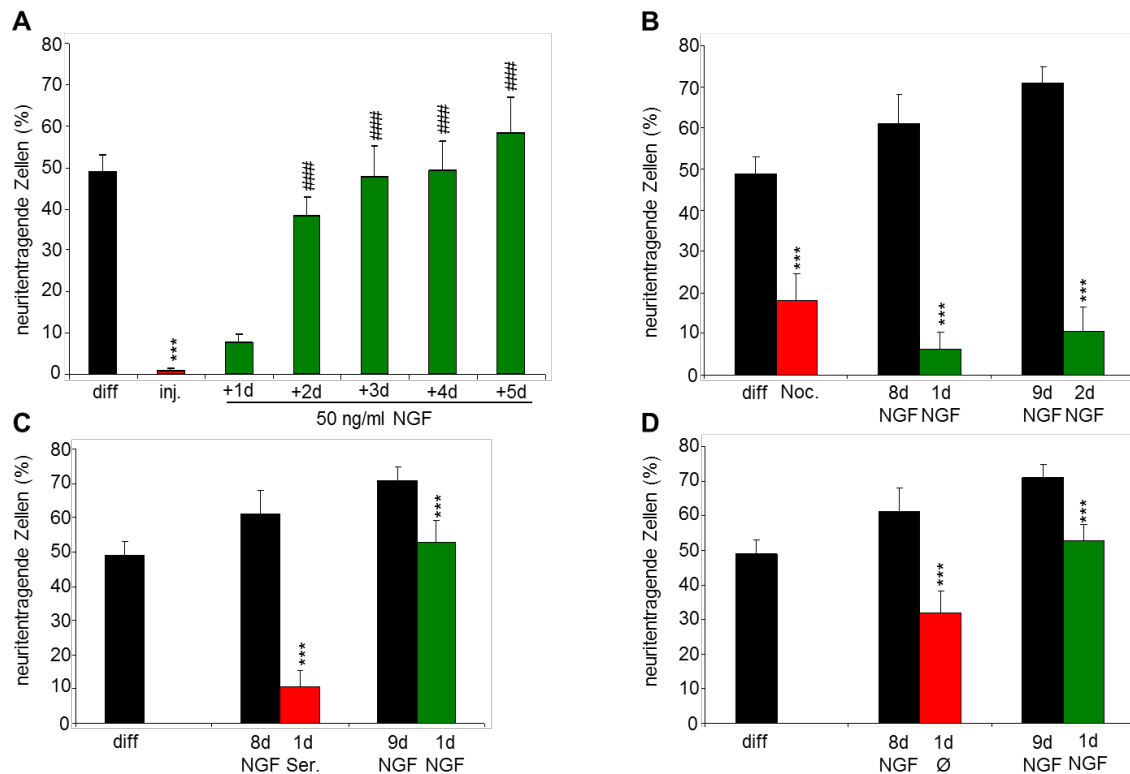


Abb. 3.9: Verschiedene PC12-Zellmodelle zur Retraktion und Regeneration von Neuriten. A, Mechanische Entfernung von Neuriten über 5 Tage nach Insult. B, Behandlung mit Nocodazol (Noc, 1 μ M), C, 1 Tag Vollmedium (ser), D, 1 Tag NGF-Entzug (\emptyset). diff: 7 Tage NGF. ***p<0,001 zur Kontrolle; ###p<0,0001 zu Tag 1.

Bei der mechanischen Entfernung von Neuriten (Abb. 3.9 A) wurden den PC12-Zellen nach Ausdifferenzierung, die Neuriten durch das Resuspendieren mit Hilfe einer Glaspipette abgetrennt (Kap. 2.3.9.). Ein erneutes Aussäen in einem NGF-haltigen Medium führte zu einem schnellen Ausdifferenzieren innerhalb der nächsten 5 Tage. Am Ende der Beobachtungszeit war das Kontrollniveau bereits wieder erreicht (Abb. 3.9 A).

Nocodazol induzierte eine Depolymerisierung von Mikrotubuli. Bereits eine einstündige Inkubation verursachte eine massive Reduktion von Neuriten-tragenden Zellen (Abb. 3.9 B). Die Neuriten der behandelten Zellen haben sich nur sehr langsam zurückgebildet.

Durch Inkubation mit Vollmedium für einen Tag wurden Neuriten rasch zurückgezogen und ließen sich durch eine erneute NGF-Gabe wieder zurückbilden (Abb. 3.9 C). Die Neuritenretraktion nach einem NGF-Entzug ist langsamer als nach Serumgabe. Nach einem weiteren Tag mit NGF-haltigem Medium fand eine Neubildung der Neuriten statt, die jedoch nicht ganz das Niveau der Kontrollzellen erreichte (Abb. 3.9 D).

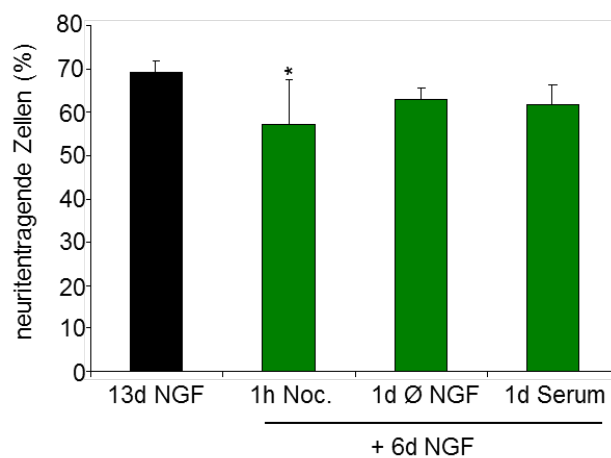


Abb. 3.10: Neubildung von Neuriten. Die mikroskopische Auswertung von 5 unabhängigen Experimenten zeigte, dass nach allen Stimuli zur Retraktion von Neuriten eine Neubildung möglich war nach weiteren 6 Tagen NGF; K: Kontrolle, ø: NGF-Entzug. * $p < 0,01$ zur Kontrolle.

Um abschätzen zu können, ob eine vollständige Regeneration der Neuriten möglich war, wurden die Zellen nach der Retraktion für 6 Tage mit NGF behandelt. Sowohl nach NGF-Entzug als auch nach Serumgabe erreichten die Zellen fast das Kontrollniveau (Abb. 3.10). Nur die Inkubation mit Nocodazol führte dazu, dass die Zellen selbst nach einer 6-tägigen Behandlung mit NGF signifikant weniger Neuriten hatten als die Kontrollzellen.

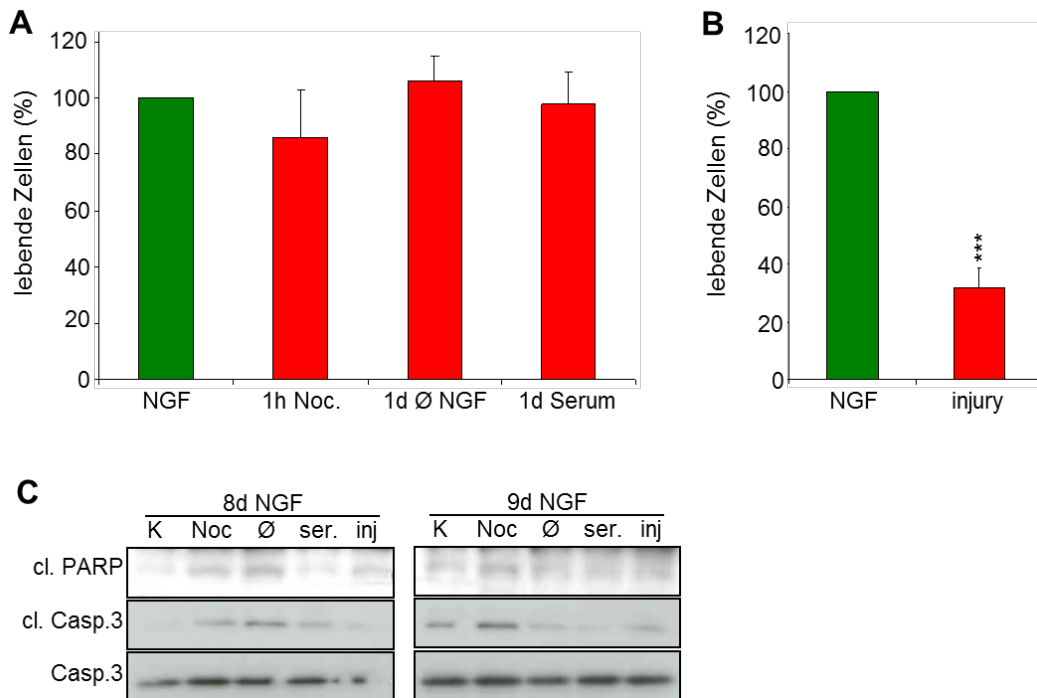


Abb. 3.11.: Zelltod nach Neuritenretraktion. A, B, Zellzählungen 24 h nach Stimulation mit Trypanblau zeigten, dass die Zellzahl nur nach mechanischer Neuritenentfernung (injury/inj) signifikant abnahm. C, Mit Western-Blots wurde eine Spaltung von PARP und Caspase 3 sichtbar gemacht. K: Kontrolle, ø: NGF-Entzug, ser: Serumgabe. *** $p < 0,0001$ zur Kontrolle.

Da die Fähigkeit zur Neuritenbildung eng mit dem Zellüberleben verknüpft ist, wurde das Überleben der Zellen 24 h nach Stimulation untersucht. Zellzählungen mit Trypanblau zeigten, dass die Inkubation mit Nocodazol zwar die Zellzahl reduzierte, die Abnahme jedoch nicht signifikant war (Abb. 3.11 A). Die Zellzahlen nach NGF-Entzug und Serumgabe über 24 h blieben auf Kontrollniveau. Nur die mechanische Entfernung von Neuriten verringerte das Zellüberleben signifikant, was von einer Spaltung von PARP und Caspase 3 begleitet war. (Abb. 3.11 B, C).

Dass die Stimulation mit Nocodazol durchaus Zelltod induzieren kann, zeigte die Aktivierung von PARP und Caspase 3 (Abb. 3.11 C). Eine daraus resultierende Abnahme der Zellzahl wäre vermutlich später als 24 h nach Stimulation zu erwarten. Auch NGF-Entzug führte zu einer vorübergehenden Spaltung von PARP und Caspase 3, die jedoch nach einer erneuten NGF-Gabe rückgängig gemacht werden konnte (Abb. 3.11 C). Die Neuritenretraktion bei Zusatz von Serum verlief ohne Verlust von Zellen und Aktivierung von pro-apoptischen Mediatoren (Abb. 3.11 A, C).

Bei den Aktivierungsmustern der unterschiedlichen Kinasen während der Neuritenretraktion und -Neubildung stand die entgegengesetzte Regulation von JNK und ERK1/2 bzw. Akt im Vordergrund. Am stärksten war der Effekt nach Stimulation mit Nocodazol während der Retraktion sichtbar: eine starke JNK-Phosphorylierung mit gleichzeitig abgeschwächter Aktivierung von ERK1/2 und Akt (Abb. 3.12 A). NGF-Entzug erhöhte die JNK-Aktivität ähnlich stark wie die Serumgabe, veränderte allerdings die Signale von ERK1/2 und Akt kaum, während der Zusatz von Serum zusätzlich die Phosphorylierung von ERK1/2 stimulierte (Abb. 3.12 A). Die MAP2Ks zeigten ein ähnliches Muster, wobei die Aktivierung von JNK nach Serumgabe eher von MKK7 vermittelt wurde, nach NGF-Entzug jedoch durch MKK4 (Abb. 3.12 B).

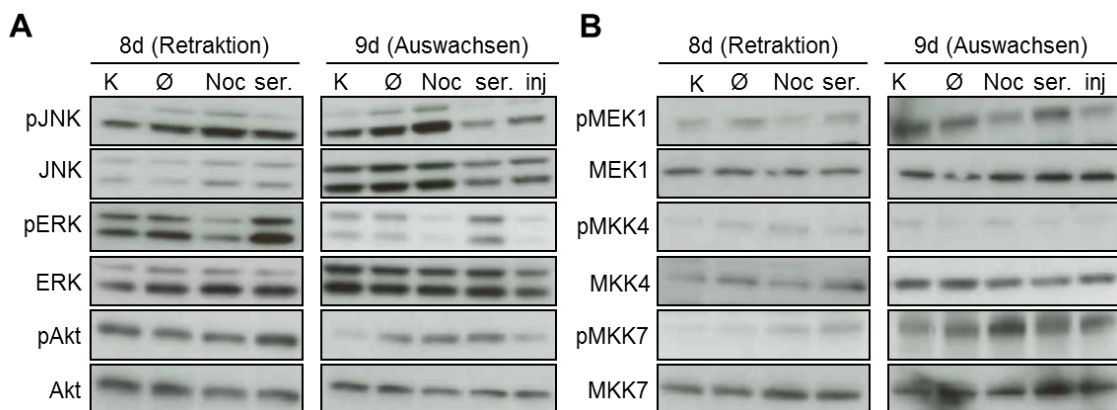


Abb. 3.12: Western-Blots zu den Kinase-Aktivitäten während Neuriten-Retraktion und – Regeneration nach Nocodazol (Noc), Vollmedium (ser), NGF-Entzug (\emptyset) und mechanischer Neuritenentfernung (inj). A, Phosphorylierung und Expression von ERK1/2, JNK, Akt. B, Phosphorylierung und Expression von MEK1, MKK4 und MKK7. K: Kontrolle.

Die mit Serum stimulierten Zellen differenzierten schnell wieder, allerdings mit einer abgeschwächten JNK-Aktivierung und erhöhter Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt. Eine erneute Neuritenbildung nach NGF-Entzug wurde begleitet von einer erhöhten JNK-Phosphorylierung und einer ERK1/2-Aktivität auf Kontrollniveau. Die Aktivierung von Akt war in allen drei Situationen vergleichbar erhöht (Abb. 3.15 A). Einen Tag nach der mechanischen Entfernung von Neuriten war lediglich eine moderate Aktivität aller drei Kinasen sichtbar (Abb. 3.12 A). Die vorgeschalteten Kinasen zeigten ein der Retraktion vergleichbares Bild, nur war die Aktivierung von MKK4 insgesamt sehr schwach, während MKK7 eine stärkere Phosphorylierung zeigte (Abb. 3.12 B).

3.3 Neuritenretraktion nach Serungabe bzw. NGF-Entzug

3.3.1 Neuritenretraktion und Überleben

Bei der Charakterisierung der einzelnen Modelle zeigte sich bereits, dass NGF-Entzug und der Zusatz von Serum einen ähnlichen Effekt auf die Retraktion von Neuriten hatten, allerdings begleitet von unterschiedlichen zellulären Mechanismen. Um Vorgänge zum Umbau des Zytoskeletts von Zelltod-induzierenden Ereignissen möglicherweise trennen zu können, wurden diese Modelle für weitere Untersuchungen verwendet.

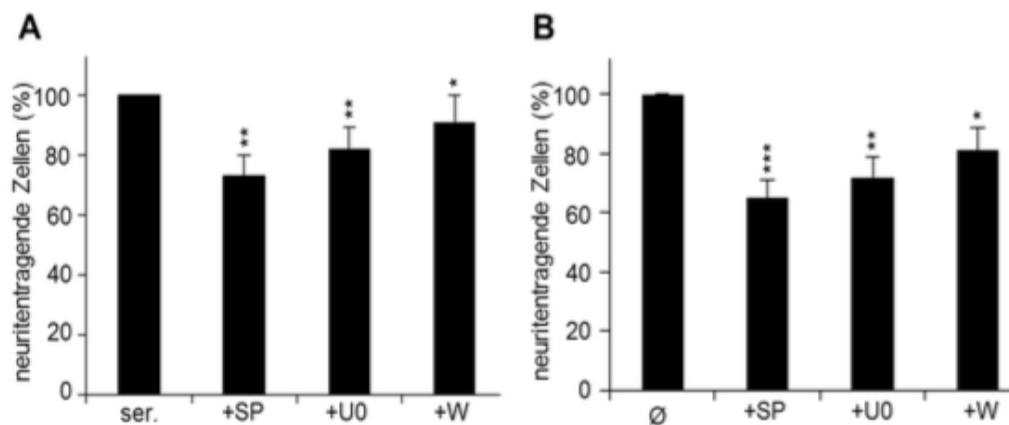


Abb. 3.13: Retraktion von Neuriten mit zusätzlicher Gabe von SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM) nach 24 h. Die Gabe der einzelnen Inhibitoren reduzierte die Anzahl der Neuriten-tragenden Zellen bei Stimulation durch Serungabe (A) oder NGF-Entzug (\emptyset , B). ***p<0,0001 zur Kontrolle, **p<0,001 zur Kontrolle, *p<0,05 zur Kontrolle

Zunächst sollte die Bedeutung von JNK, ERK1/2 und Akt für die Retraktion der Neuriten ermittelt werden. Gleichzeitig mit der Gabe von Serum bzw. dem Entzug von NGF wurden Inhibitoren für JNK (SP600125, 2 μ M), ERK1/2 (U0126, 5 μ M) und Akt (Wortmannin, 500 nM) verwendet. Die mikroskopische Analyse nach 24 h zeigte, dass alle Inhibitoren die Zahl der Neuriten-tragenden Zellen zusätzlich reduzierten (Abb. 3.13 A, B). Insgesamt war der Effekt nach NGF-Entzug stärker als nach Serungabe. Die JNK-Inhibition durch SP600125 führte zur deutlichsten Reduktion der Neuriten-tragenden Zellen (Abb. 3.13 A, B).

Wie bereits bei der Charakterisierung der Zellmodelle beobachtet, induzierten weder die Gabe von Serum noch der Entzug von NGF sofort Zelltod (Abb. 3.11 A). Auch die gleichzeitige Gabe der Inhibitoren SP600125, U0126 und Wortmannin verursachten lediglich leichte Schwankungen der Zellzahl, jedoch keine signifikante Abnahme (Abb. 3.14 A, B).

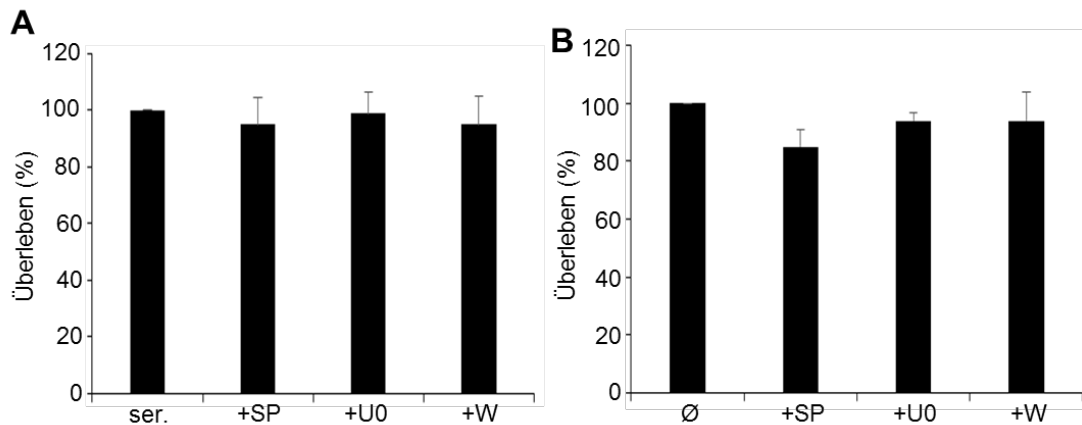


Abb. 3.14: Zelltod nach Neuritenretraktion nach 24 h. A, WST1-Assays zeigten, dass die Anzahl metabolisch aktiver Zellen durch SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM) im Vergleich zu Serumgabe (ser, A) bzw. NGF-Entzug (\emptyset , B) nicht weiter abnahm.

3.3.2 Kinase-Aktivitäten während Neuriten-Retraktion nach Vollmedium, NGF-Entzug

Das Aktivierungsmuster der Kinasen unterschied sich auffällig zwischen den Zellen mit Vollmedium und denen nach NGF-Entzug. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde durch U0126 bei Serum-behandelten Zellen reduziert, bei NGF-Entzug dagegen durch SP600125 stark erhöht (Abb. 3.15 A). Die JNK-Aktivität wurde sowohl durch Serumgabe als auch durch NGF-Entzug generell leicht verstärkt (Abb. 3.18 A, Abb. 3.15 A). Während die Inhibitoren nach Serumbehandlung wenig am Signal veränderten, sank die JNK-Phosphorylierung durch SP600125 und U0126 auf Kontrollniveau nach NGF-Entzug. Interessanterweise war die Akt-Aktivität bei Serum-behandelten Zellen durch U0126 am höchsten, nach NGF-Deprivation durch JNK- und ERK1/2-Inhibition (Abb. 3.15 A). Wortmannin beeinflusste die anderen Kinasen nach Serumgabe kaum, erhöhte jedoch nach NGF-Entzug leicht die Aktivität von ERK1/2 und JNK. Die Expression der Kinasen blieb unverändert.

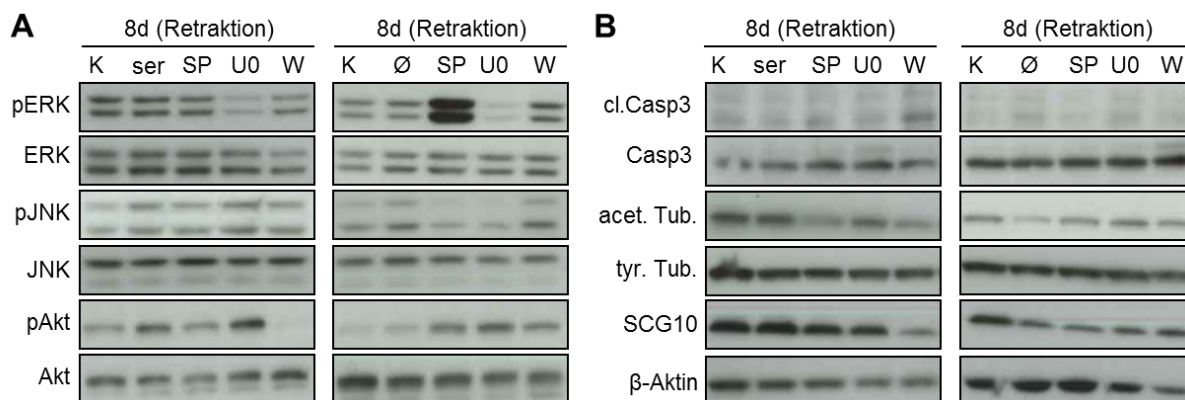


Abb. 3.15: Western-Blots zu den Kinase-Aktivitäten während Neuriten-Retraktion nach Vollmedium (ser), NGF-Entzug (\emptyset) mit zusätzlicher Gabe von SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM). A, Phosphorylierung und Expression von ERK1/2, JNK, Akt. B, Aktivierung und Expression von Caspase 3, Expression von Tubulinformen, SCG10 und β -Aktin. K: Kontrolle.

Wie bereits beobachtet, induzierte die Neuriten-Retraktion durch Serumgabe keine Aktivierung von Caspase 3 (Abb. 3.11 C), und nur Wortmannin konnte eine Spaltung hervorrufen (Abb. 15B), die jedoch nicht zu einem unmittelbaren Zelltod führte (Abb. 3.15 A). Nach NGF-Entzug war eine Caspase-3-Aktivierung sichtbar, die durch SP600125 vermindert wurde (Abb. 3.15 B).

Außerdem wurde die Retraktion der Neuriten begleitet von Veränderungen verschiedener Zytoskelettproteine (Abb. 3.15 B). Azetyliertes Tubulin als Marker für Stabilisierung des Tubulins nahm ab, insbesondere durch die Inhibitoren in Serum-behandelten Zellen. Nach NGF-Entzug blieb die Menge des azetylierten Tubulins nach SP600125 und U0126 jedoch auf Kontrollniveau. Die Menge an tyrosiniertem Tubulin wurde nicht verändert. SCG10, das destabilisierend wirkt und an Umbauprozessen des neuronalen Zytoskeletts beteiligt ist (Mori and Morii, 2002), war reduziert in seiner Expression, wenn gleichzeitig Caspase 3 aktiviert wurde (Abb. 3.15 B). In beiden Modellen und nach U0126 sowie Wortmannin nahm außerdem die Menge an β -Aktin ab (Abb. 3.15 B).

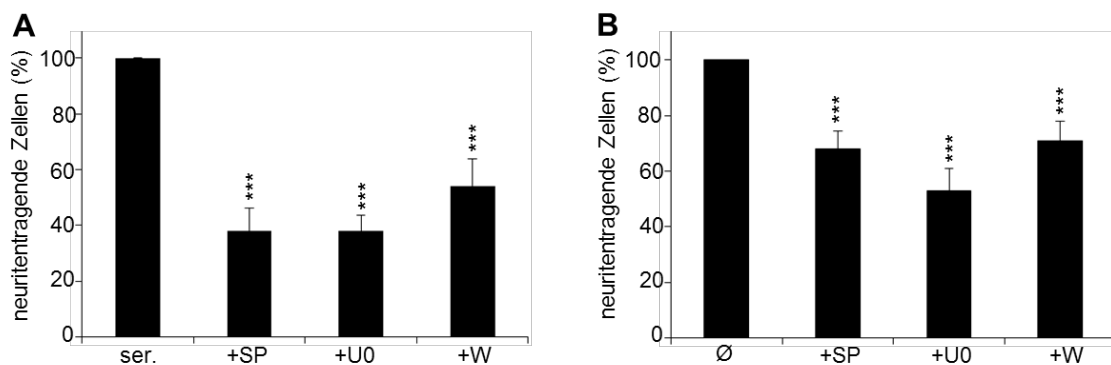
Der Vergleich zellulärer Vorgänge während der Neuriten-Retraktion zeigt, dass die einzelnen Signalwege in sehr unterschiedlicher Art und Weise modifiziert werden, vermutlich abhängig von begleitenden, Zelltod-induzierenden Prozessen.

3.4 Neuritenneubildung nach Serungabe bzw. NGF-Entzug

3.4.1 Neuritenbildung und Überleben

Wurden die Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Serum bzw. ohne NGF wieder für 24 h in NGF-haltigem Medium kultiviert, bildeten sich die Neuriten teilweise zurück (Abb. 3.9 C, D). In welchem Ausmaß die Signalwege von JNK, ERK1/2 und Akt daran beteiligt waren, zeigte sich bei Inhibitorversuchen. Dazu wurde SP600125 (2 μ M), U0126 (5 μ M) oder Wortmannin (500 nM) dem Differenzierungsmedium hinzugefügt und nach 24 h die Neuriten-tragenden Zellen gezählt. Sowohl nach Serungabe als auch nach NGF-Entzug wurde die Neubildung der Neuriten durch alle drei Inhibitoren signifikant reduziert (Abb. 3.16 A, B).

Abb. 3.16: Neuriten-Regeneration nach Serungabe (ser, A) und NGF-Entzug (\emptyset , B) mit



zusätzlicher Gabe von SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM) nach 24-stündiger Inkubation in NGF-haltigem Medium; Neuriten der Zellen mit ser und \emptyset = 100%; K: Kontrolle. ***p<0,0001 zur Kontrolle.

Ob die Gabe der Inhibitoren gleichzeitig die Zahl der lebenden Zellen reduzierte, wurde mit Hilfe von WST1-Assays überprüft. Insgesamt sank die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen leicht, wenn sie nach Serungabe wieder für 24 h in Differenzierungsmedium kultiviert wurden und gleichzeitig mit SP600125, U0126 oder Wortmannin behandelt wurden. Allerdings war dieser Effekt nur bei JNK-Inhibition durch SP600125 leicht signifikant (Abb. 3.17 A).

Wurden die Zellen nach NGF-Entzug wieder für 24 h in Differenzierungsmedium inkubiert und gleichzeitig mit den Inhibitoren behandelt, zeigte sich nur durch SP600125 eine leichte Abnahme an metabolisch aktiven Zellen (Abb. 3.17 B), während U0126 und Wortmannin die Zellen nicht wesentlich beeinflussten.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass gehemmtes Neuritenwachstum sich nicht in unmittelbarem Zelltod widerspiegelt.

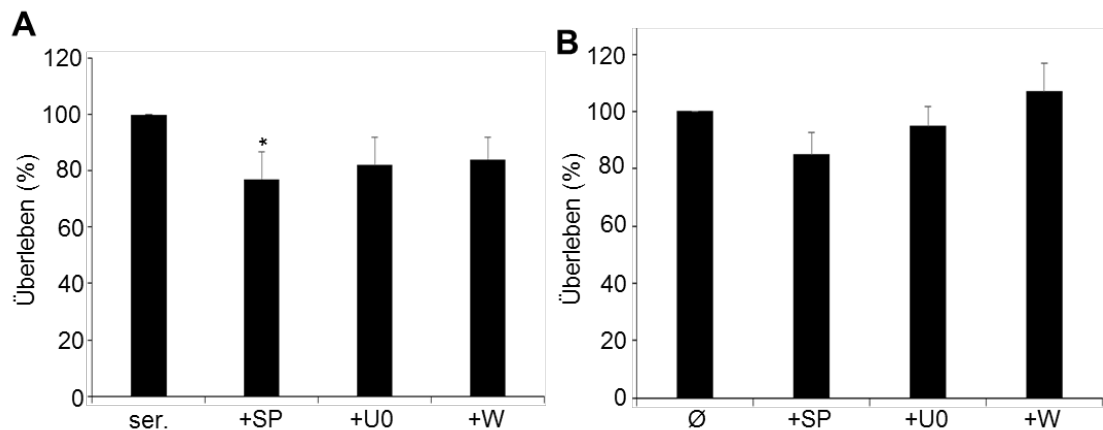


Abb. 3.17: Überleben (WST1-Assays) bei der Neubildung von Neuriten nach Vollmedium (ser, A), NGF-Entzug (ø, B) mit zusätzlicher Gabe von SP600125 (SP, 2 µM), U0126 (U0, 5 µM), Wortmannin (W, 500 nM) nach 24-stündiger Inkubation in NGF-haltigem Medium; metabolische Aktivität der Zellen mit ser und ø = 100%; K: Kontrolle. *p<0,05 zur Kontrolle.

3.4.2 Kinase-Aktivitäten während der Neuritenregeneration nach Vollmedium und NGF-Entzug

Betrachtet man die Phosphorylierungen der einzelnen Kinasen, sieht man eine ähnlich komplexe Regulation wie unter den bislang beschriebenen Bedingungen. Die Aktivität von ERK1/2 wurde nach Serumgabe gesteigert und blieb auch bei der Neubildung der Neuriten in NGF-haltigem Medium im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb. 3.18 A). Wie zu erwarten, reduzierte U0126 die Phosphorylierung von ERK1/2 stark, jedoch auch SP600125 und Wortmannin verminderten die Phosphorylierung leicht. Nach NGF-Entzug und erneutem Auswachsen der Neuriten blieb die ERK1/2-Aktivität auf Kontrollniveau (Abb. 3.18 A), wurde durch SP600125 erhöht, durch U0126 stark reduziert und blieb unter Wortmannin unverändert. Die Phosphorylierung von JNK wurde in beiden Modellen durch Wortmannin erhöht und durch SP600125 reduziert (Abb. 3.18 A). U0126 steigerte hingegen die JNK-Aktivierung nach Serumgabe und senkte sie nach NGF-Entzug. Auch das Aktivierungsmuster von Akt war unterschiedlich: Während U0126 die Phosphorylierung von Akt in beiden Modellen erhöhte, wurde sie durch SP600125 nach Serumgabe reduziert, blieb jedoch nach NGF-Entzug unter JNK-Inhibition konstant. Die Expression der einzelnen Kinasen wurde nicht verändert.

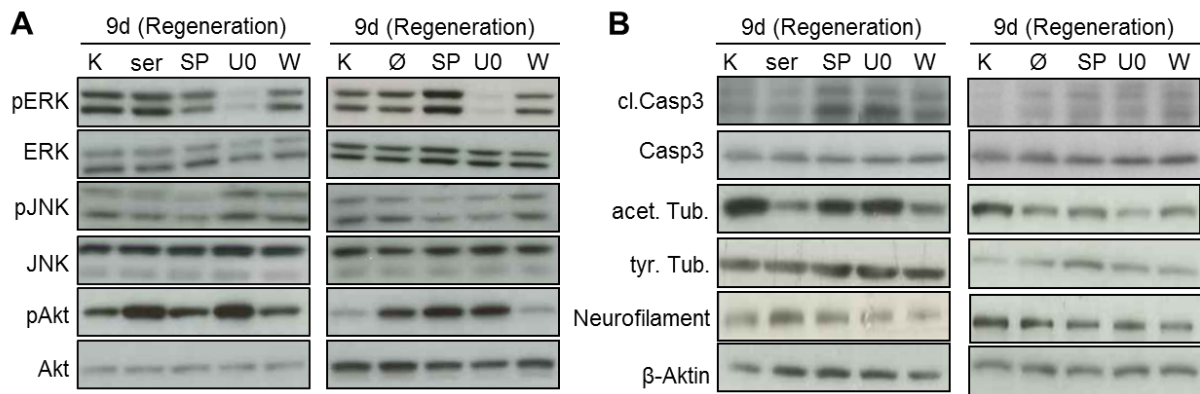


Abb. 3.18: Western-Blots zu den Kinase-Aktivitäten während Neuriten-Regeneration nach Vollmedium (ser), NGF-Entzug (ø). A, Phosphorylierung und Expression von ERK1/2, JNK, Akt mit zusätzlicher Gabe von SP600125 (SP, 2 µM), U0126 (U0, 5 µM), Wortmannin (W, 500 nM). B, Aktivierung und Expression von Caspase 3, Expression von Tubulinformen, Neurofilament und β-Aktin. K: Kontrolle.

Western-Blots zur Aktivierung der Caspase 3 spiegelten die Daten zur Anzahl lebender Zellen wider (Abb. 3.18 B). Nach Serumbehandlung und erneuter Inkubation in NGF-haltigem Medium erhöhten die Inhibitoren die Aktivierung der Caspase 3 (Abb. 3.18 B). Die Neubildung der Neuriten nach NGF-Entzug war ohnehin begleitet von einer leichten Spaltung der Caspase 3, konnte jedoch durch die Gabe von SP600125, U0126 oder Wortmannin kaum gesteigert werden. Azetyliertes Tubulin war im Vergleich zu den differenzierten Kontrollzellen insgesamt reduziert. Allerdings erhöhten SP600125 und U0126 dessen Menge bei der Neubildung von Neuriten nach Serumbehandlung (Abb. 3.18 B). Ein weiterer Marker für Neuritenstabilität, Neurofilament, war nur bei Serum-behandelten Zellen erhöht. Tyrosiniertes Tubulin zeigt die Menge an labilem Tubulin an. Seine Expression wurde nach Serumbehandlung kaum verändert. Während der Neuritenbildung nach NGF-Entzug konnte nur bei gleichzeitiger Gabe von SP600125 eine erhöhte Menge detektiert werden.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Neuritenstabilität als auch die Neuritenregeneration und –retraktion einer komplizierten Regulation von Kinasen vorliegen, die teilweise auch in einen Umbau des Zytoskeletts resultieren.

Vor allem die Neuritenstabilität konnte durch die Gabe der verschiedenen Inhibitoren stark verändert werden. Die Zellmodelle zur Retraktion und Neubildung von PC12-Zellen konnten verschiedene Aspekte nachweisen. So zeigte sich nach mechanischer Entfernung der Neuriten das schnelle, komplette Ausdifferenzieren von vitalen Zellen. Durch die Behandlung mit Nocodazol konnte auf eine wahrscheinliche Degeneration von Neuriten geschlossen werden, die zu einer Zelltodinduktion führt und somit auch zu einer sehr langsamen bzw. unvollständige Regeneration. Zu einer schnellen Retraktion und Neubildung von Neuriten kam es durch Serumgabe, ohne dass Zelltod induziert wurde, wohingegen der NGF-Entzug zu einem Umbau von Neuriten mit der Induktion von Zelltod während der Retraktion geführt hat.

4.1 Neuritenstabilisierung und Zelltod

Die Untersuchung der Stabilisierung in den Neuriten ist von großer Bedeutung, um die Vorgänge, die zu einem Umbau von Neuriten führen, besser einordnen zu können.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurden die PC12-Zellen mit NGF differenziert und anschließend mit den Inhibitoren SP600125, U0126 und Wortmannin inkubiert.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass sowohl das Überleben, als auch die Anzahl der Neuriten-tragenden Zellen nach Gabe der unterschiedlichen Inhibitoren signifikant abnahmen. Bekannt ist, dass ERK1/2 und Akt für das Überleben von Neuronen nach Stress oder Verletzung wichtig sind (Chan et al., 2014; Xia et al., 1995b). Die Aktivierung von ERK1/2 supprimiert dabei proapoptotische Mediatoren wie JNK oder p38 (Xia et al., 1995b). In unserem Modell konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von ERK1/2 und Akt auch ohne neuronaler Schädigung für das Überleben der Zellen wichtig waren. Überraschend war jedoch, dass der JNK-Inhibitor SP600125 das Überleben und die Neuritenzahl ähnlich stark einschränkte wie U0126, was unterstreicht, dass JNK-abhängige Vorgänge nicht nur nach Verletzung oder während der neuronalen Entwicklung wichtig sind, sondern eine protektive Funktion haben können, die zu neuronaler Stabilität führt (L. Chen et al., 2012; Coffey, 2014). Eine Neuriten-stabilisierende Funktion durch JNK konnte bisher sowohl in *Drosophila* (Rallis et al., 2010) als auch in Hinterwurzelganglien nachgewiesen werden (Barnat et al., 2010).

Da Neurofilamente, die zu den Intermediärfilamenten gehören, bekannt für die stabilisierende Wirkung von Axonen sind (S. Lee and Shea, 2014), wurde mit der schweren Einheit des

Neurofilamentproteins (NF-H) der Stabilisierungsgrad der Neuriten durch Inhibitorgabe abgebildet. Nach 24-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren waren Phosphorylierung und Expression generell reduziert. Bekannt ist eine direkte Phosphorylierung von NF-H durch ERK1/2 und JNK während der Neuritenbildung oder auch unter degenerativen Bedingungen (Brownlee et al., 2000; Veeranna et al., 1998). Unsere Ergebnisse zeigten allerdings, dass auch zur Stabilisierung der Neuritenstruktur eine konstante Aktivität von ERK1/2 und JNK notwendig war. Für Akt ist lediglich eine indirekte Rolle bei der Phosphorylierung von NF-H beschrieben, die sich auf das Neuritenwachstum beschränkt (Ueno et al., 2012). Nichtsdestotrotz kann auch in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass Akt für die Stabilität neuronaler Ausläufer unter normalen Kulturbedingungen wichtig ist.

In den Western-Blots zur Aktivierung und Expression der verschiedenen Kinasen, konnte gezeigt werden, dass SP600125, U0126 und Wortmannin das Aktivierungsmuster von ERK1/2, JNK, Akt und MKK4 veränderten. MKK7 wurde in seiner Aktivität wenig beeinflusst. Insgesamt fiel auf, dass die drei Inhibitoren auch die Aktivität der jeweils anderen Kinasen veränderten.

Es sind zahlreiche Interaktionen zwischen den Signalwegen von ERK1/2 und JNK beschrieben (Dirk et al., 2012; Fey et al., 2012), wie z.B. über die differentielle Expression unterschiedlicher Phosphatasen (Dirk et al., 2012). Ein wichtiger Mediator ist in diesem Zusammenhang die JNK-Phosphatase MKP-1 (Patterson et al., 2009), die durch ERK1/2 und die MAPK p38 induziert werden kann (Bavaria et al., 2014; Hu et al., 2007). Nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 war sowohl die Phosphorylierung von p38 erhöht als auch die Expression von MKP1, was eine Induktion durch p38 nahelegt. Eine Dephosphorylierung von JNK durch MKP1 nach SP600125 ist möglich. Nach U0126 war die Menge von MKP1 geringer und kann die erhöhte JNK-Phosphorylierung erklären.

Eine andere Möglichkeit sind direkte Interaktionen zwischen unterschiedlichen Signalwegen über die Veränderung von Signalkomplexen (Kuboki et al., 2000; Waetzig and Herdegen, 2005). Für die Bildung von Signalkomplexen sind die Gerüst-Proteine, die so genannten *scaffold*-Proteine, wichtig (Coffey, 2014). Gerade das scaffold-Protein JIP-3 verbindet die Signalwege von ERK1/2 und JNK (Kuboki et al., 2000), dessen Expression durch U0126 und Wortmannin zunahm. Da JIP3 insbesondere zytoplasmatisch lokalisiert ist (Kelkar et al., 2000), könnte die erhöhte Expression zu einer verstärkten Phosphorylierung von MKK4 und JNK in diesem Kompartiment führen (Matsuura et al., 2002) und so die Aktivitätserhöhung nach U0126 erklären.

Eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 nach JNK-Inhibition ist bereits nach zellulärem Stress bekannt (Xia et al., 1995a). Außerdem konnte in kortikalen Neuronen gezeigt werden,

dass eine JNK-Hemmung auch unter physiologischen Bedingungen die Aktivierung von MEK1 und ERK1/2 erhöht (Repici et al., 2009). Ein ähnlicher Effekt wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, was auf eine reduzierte Bindung von MEK1 an MEKK1 nach Gabe von SP600125 zurückzuführen sein kann; denn eine verstärkte Interaktion von MEK1 und MEKK1 reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2 (Waetzig and Herdegen, 2005).

Nach Inkubation mit U0126 wurde die Aktivität von Akt erhöht. Da MEK1 über die Phosphatase PTEN die Menge von Phosphatidylinositol-3-Phosphat und damit auch die Akt Aktivierung regulieren kann, führt eine Hemmung von MEK1 in verschiedenen Zellmodellen zu einer verstärkten Aktivierung und Stabilität von Akt (Zmajkovicova et al., 2013). Eine vergleichbare Regulation konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Der Inhibitor Wortmannin verringerte die Aktivität von Akt, erhöhte jedoch die Phosphorylierung von ERK1/2. Da Akt direkt den MEK1-Aktivator Raf-1 durch Phosphorylierung von Ser259 hemmen kann (Okalang et al., 2013), kommt es durch Wortmannin zu einer verstärkten ERK1/2 Phosphorylierung. In der vorliegenden Arbeit wurde nach 24-stündiger Inkubation mit Wortmannin eine verminderte Phosphorylierung von Raf-1 beobachtet, was die verstärkte Aktivität von ERK1/2 erklärt.

Die Interaktion zwischen Akt und JNK kann direkt sein, wobei Akt die MAP2-Kinase MKK4 hemmt (Park et al., 2002) und damit die JNK-Phosphorylierung reduziert. In differenzierten PC12-Zellen war sowohl die nukleäre als auch die zytoplasmatische Phosphorylierung von MKK4 und JNK nach der Gabe von Wortmannin erhöht, was für dargestellte Regulation spricht.

Die Gabe von SP600125 erhöhte nur die zytoplasmatische Aktivität von Akt leicht. Da die Bindung von Akt an das JNK-*scaffold*-Protein JIP-1 durch SP600125 reduziert war, könnte dadurch seine zytoplasmatische Aktivität erhöht sein (Song and Y. J. Lee, 2005)

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Stabilität der Neuriten einem komplexen Regulationsmuster unterliegt, welches durch die Gabe einzelner Inhibitoren stark verändert werden kann.

4.2 Zelluläre Modelle zur Retraktion und Regeneration von Neuriten

Bei der Retraktion und Regeneration von Neuriten sollte in der vorliegenden Arbeit ein klarer Unterschied zwischen physiologischen proapoptotischen Prozessen gemacht werden. Dazu wurden verschiedene Modelle verwendet. Nach der mechanischen Entfernung von Neuriten führte erneutes Aussäen in einem NGF-haltigen Medium zu einem zügigen Ausdifferenzieren innerhalb von 5 Tagen, wie bereits beschrieben (Waetzig and Herdegen, 2005). Nur die Entfernung der Neuriten reduzierte die Zellzahl, das Auswachsen der Neuriten jedoch wurde

nicht von Zelltod begleitet. So war bereits zwei Tage nach Neuritenentfernung die Spaltung von Caspase 3 unterhalb des Kontrollniveaus. Dieses Modell kann daher vorwiegend für die Untersuchung des regenerativen Neuritenwachstums ohne Induktion von Apoptose verwendet werden.

Die Inkubation mit Nocodazol induzierte eine Depolymerisierung von Mikrotubuli, welche zu einer massiven Reduktion von Neuriten-tragenden Zellen führte. Nach Entfernung der Substanz erfolgte die Regeneration nur langsam und nicht vollständig wie in den anderen Modellen. Vermutlich wurde das erneute Auswachsen der Neuriten durch die Zelltodinduktion eingeschränkt, da Nocodazol zu einer Degeneration von Neuriten mit anschließender Apoptose führt (Volbracht et al., 1999).

Nach einer Inkubation mit serumhaltigem Vollmedium für einen Tag wurden die Neuriten rasch zurückgebildet. In den Zellen konnten keine Anzeichen von Apoptose festgestellt werden, da das im Vollmedium erhaltene Serum lediglich Proliferation induzierte. Sowohl für PC12-Zellen als auch für andere Zellmodelle wurde der Zusatz von Serum zur Rückbildung von Neuriten verwendet, wenn nicht die Induktion von Zelltod im Vordergrund standen, sondern Vorgänge der Neuritenumbildung (Dyer et al., 1992; Smalheiser, 1993). Eine erneute NGF-Gabe in serumreduziertem Medium induzierte eine schnelle Neubildung der Neuriten, was die Flexibilität des untersuchten Modells zeigt. Warum die Zellen nach erneuter Inkubation mit NGF schneller Neuriten ausbilden als bei der initialen Differenzierung, ist noch ungeklärt.

Im Vergleich dazu war die Neuritenretraktion nach einem NGF-Entzug langsamer. Dass es sich dabei um einen proapoptischen Stimulus handelte, wurde durch die Aktivierung von Caspase 3 sichtbar. NGF-Deprivation von differenzierten PC12-Zellen gilt als gängiger Versuchsansatz zur Beschreibung von Zelltod, der mit der Retraktion von Neuriten assoziiert ist (Greene, 1978; Seeley and Greene, 1983). Ein erneutes Auswachsen der Neuriten durch NGF in den verbleibenden Zellen und die daran beteiligten Vorgänge wurden bislang nicht untersucht.

Bei den Aktivierungsmustern der unterschiedlichen Kinasen während der Neuritenretraktion, war gut ablesbar, ob Zelltod induziert wurde oder nicht. Im Vordergrund stand dabei die entgegengesetzte Regulation von JNK einerseits und ERK1/2 bzw. Akt andererseits (Park et al., 2002; Xia et al., 1995b). Wohingegen Akt und ERK1/2 über verschiedene Wachstumsfaktoren Signalwege für Zellstress und Zelluntergang supprimieren und zum Zellüberleben führen (Park et al., 2002; Xia et al., 1995b), ist die Phosphorylierung von JNK häufig mit Neurodegeneration assoziiert (Savage et al., 2002). Interessanterweise verminderte in PC12-Zellen die verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 die Aktivierung von JNK und dadurch die Induktion von Apoptose (Xia et al., 1995b). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Je höher die JNK-Phosphorylierung und je niedriger die

Aktivierung von ERK1/2 und Akt, desto wahrscheinlicher war der Zelltod, was auf die mit Nocodazol behandelten Zellen zutraf und in geringerem Ausmaß auch auf die Zellen unter NGF-Entzug.

An der initialen Neuritenbildung von undifferenzierten PC12-Zellen können sowohl ERK1/2 und Akt als auch JNK beteiligt sein, da die Inhibition von ERK1/2 und JNK das Auswachsen von Neuriten signifikant reduzierte (Waetzig and Herdegen, 2003a). Die Neubildung von Neuriten in den untersuchten Modellen war jedoch von ganz unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern der Kinasen begleitet. Im Vordergrund standen bei den Nocodazol-behandelten Zellen proapoptotische Prozesse. Es zeigte sich eine starke Aktivierung von JNK und MKK7 und eine stark reduzierte ERK1/2-Phosphorylierung. Insbesondere diese gegenläufige Regulation scheint zum Zelltod nach Nocodazol beizutragen. Eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 kann in diesem Zusammenhang protektiv sein (Wales et al., 2015), ist jedoch vor dem Hintergrund einer starken MKK7-JNK-Aktivierung selten (Chiu et al., 2012; Yujiri et al., 1998).

Die Neuritenregeneration nach Inkubation mit Vollmedium war begleitet von einer abgeschwächten JNK-Aktivierung und einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt. Dieses Aktivierungsmuster ist charakteristisch für die NGF-gesteuerte Signalkaskade über den NGF-Rezeptor TrkA in PC12-Zellen (Y. L. Chen et al., 2006; Zhang et al., 2000), was möglicherweise ein Grund für das besonders zügige Auswachsen der Neuriten ist.

Nach NGF-Entzug war die Aktivierung von ERK1/2 auf Kontrollniveau, die Phosphorylierung von JNK und Akt etwas höher als in den Kontrollzellen. Dabei kann die erhöhte Aktivität von Akt zu einem verbesserten Zellüberleben führen (Park et al., 2002) und die der JNK zu einem erneuten Ausdifferenzieren der PC12-Zellen (Waetzig and Herdegen, 2003a). Dass ERK1/2 nicht verstärkt phosphoryliert wurde, schien die Regenerationsfähigkeit der Zellen in dieser Situation nicht einzuschränken.

Einen Tag nach der mechanischen Entfernung von Neuriten, war keine Aktivierung von Caspase 3 sichtbar, auch das Neuritenwachstum war gering, begleitet von einer moderaten Aktivität von JNK, ERK1/2 und Akt, was zu erwarten war, da die Neubildung der Neuriten gerade erst begonnen hatte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der verschiedenen Modelle zur Retraktion und Neubildung von Neuriten in PC12-Zellen unterschiedliche Aspekte der Signaltransduktion untersucht werden können: (i) das schnelle, komplette Ausdifferenzieren von vitalen Zellen nach mechanischer Neuritenentfernung, (ii) der apoptotische Verlust und langsame sowie unvollständige Regeneration von Neuriten durch die Behandlung mit Nocodazol, (iii) rasche Retraktion und Neubildung von Neuriten durch Serungabe ohne Anzeichen von Zelltod und

(iv) unter NGF-Deprivation hervorgerufener Umbau von Neuriten mit Induktion von Zelltod während der Retraktion.

4.3 Retraktion von Neuriten

Um Vorgänge zum Umbau des Zytoskeletts von Zelltod-induzierenden Ereignissen besser trennen zu können, wurden Retraktion und Neubildung von Neuriten nach Serumgabe bzw. NGF-Deprivation parallel charakterisiert. Dabei sollte die Verwendung von verschiedenen Inhibitoren (SP600125 für die Inhibition von JNK, U0126 für die Inhibition von ERK1/2, Wortmannin für die Inhibition von Akt) Einblicke in mögliche Interaktionen der Signalwege liefern. Es zeigte sich, dass alle Substanzen die Anzahl der Neuriten-tragenden Zellen signifikant reduzierten, vor allem jedoch der JNK-Inhibitor SP600125. Ein ähnlicher Effekt wurde in Hinterwurzelganglien beobachtet, wo es durch JNK-Inhibition zu einer aktiven Retraktion von Neuriten kam (Barnat et al., 2010). Die Rolle von ERK1/2 ist weniger genau beschrieben. Während die Aktivierung von ERK1/2 nach Gabe von Organophosphaten zu einer Neuritenretraktion beitragen kann (Sindi et al., 2016), scheint ERK1/2 ohne zusätzliche Schädigung von Neuronen eher die Neuritenstabilität zu fördern (Tie et al., 2008). Letzteres unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wo die Inhibition von ERK1/2 die Anzahl der Neuriten-tragenden Zellen reduzierte. Der Effekt der Wortmannin-Behandlung war am schwächsten verglichen mit den anderen Inhibitoren. Wie bereits beschrieben, hat Akt vermutlich einen indirekten Effekt auf die Stabilität von Neuriten (Ueno et al., 2012) und ist direkt am Umbau des Zytoskeletts beteiligt (Andjelković et al., 1998).

Das Zellüberleben wurde 24 h nach Serumgabe bzw. NGF-Entzug durch die zusätzliche Gabe der unterschiedlichen Inhibitoren nicht signifikant verändert. Diese Ergebnisse waren überraschend, da die Inhibitoren auf differenzierte Zellen ohne zusätzlichen Stimulus die Zellviabilität reduzierten (siehe 3.1.1). Im Fall der Serumgabe bzw. des NGF-Entzugs kann man vermutlich davon ausgehen, dass die Effekte der Inhibitorgabe und zellulärem Umbau sich überlagern und nach 24 h noch nicht sichtbar waren.

Auffällig waren die Unterschiede bei den Aktivierungsmustern der Kinasen zwischen den beiden Modellen. Bei den Zellen, die mit Serum behandelt wurden, veränderten die Inhibitoren die Phosphorylierung von JNK kaum. Nach NGF-Entzug zeigte sich jedoch eine verminderte JNK-Phosphorylierung durch SP600125 sowie durch U0126. Eine reduzierte JNK-Aktivität durch SP600125 wurde bereits in anderen Situationen beschrieben (Bennett et al., 2001). Warum allerdings derselbe Effekt nicht bei der Inkubation mit Serum beobachtet wurde, ist unklar. Die geringere JNK-Phosphorylierung durch Behandlung mit U0126 kann mit der erhöhten Akt-Aktivierung erklärt werden, da Akt die MAP2-Kinase MKK4 hemmen kann

(Park et al., 2002) und damit die JNK-Phosphorylierung reduziert. Allerdings stellt sich auch hier die Frage, warum die Aktivität von JNK nur nach NGF-Entzug reduziert war und nicht bei Serumgabe.

Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde während der Inkubation mit Serum nur durch die gleichzeitige Gabe von U0126 reduziert. Nach NGF-Entzug verursachte der Inhibitor SP600125 jedoch eine auffällige Aktivierung von ERK1/2, was vermutlich über die bereits dargestellte Aktivierung von MEK1 und ERK1/2 reguliert wird (Repici et al., 2009).

Die Aktivität von Akt wurde durch Serumgabe verstärkt (s.o.). Die zusätzliche Inkubation mit SP600125 senkte die Phosphorylierung auf Kontrollniveau, was ungewöhnlich ist, da eine JNK-Inhibition normalerweise die Akt-Phosphorylierung erhöht (Song and Y. J. Lee, 2005), wie es auch nach NGF-Entzug und gleichzeitiger Gabe von SP600125 zu beobachten war. Möglicherweise war die Phosphorylierung von ERK1/2 verantwortlich für den beobachteten Unterschied. Während die gleichzeitige Inkubation mit Vollmedium und SP600125 nicht zu einer verstärkten ERK1/2-Aktivierung führte, konnte der JNK-Inhibitor bei NGF-Entzug die Phosphorylierung erhöhen, was gleichzeitig die Akt-Phosphorylierung steigern könnte (Niba et al., 2013). Die zusätzliche Inkubation mit U0126 führte in beiden Modellen zu einer verstärkten Akt-Phosphorylierung, was auf Kompensation von ERK1/2 durch Akt zurückgehen kann, wie bereits bei der Neuritenstabilisierung beschrieben (Zmajkovicova et al., 2013).

Durch die Neuritenretraktion kam es auch zu Veränderungen verschiedener Zytoskelettproteine. Azetyliertes Tubulin, welches als Marker für die Stabilisierung von Mikrotubuli dient (Black and Keyser, 1987), nahm insbesondere nach NGF-Entzug ab, nicht jedoch durch die Gabe von Serum. Grundsätzlich zeigen PC12-Zellen nur nach Differenzierung eine Azetylierung von Tubulin (Black and Keyser, 1987), was auf eine bevorzugte Tubulin-Modifikation von stabiliertem Tubulin hindeutet. Die Abnahme nach NGF-Entzug unterstreicht damit den Umbau des Zytoskeletts bei Retraktion bzw. dessen Destabilisierung. Warum keine Änderung durch Serumgabe zu beobachten war, ist unklar. Interessanterweise reduzierte die gleichzeitige Gabe von Serum und SP600125 sowie Wortmannin die Menge des azetylierten Tubulins, während alle Inhibitoren dessen Menge bei NGF-Deprivation stabilisierten. Auch hierzu liegen bislang keine Untersuchungen vor.

Die Menge an tyronisiertem Tubulin, das als Marker für dynamisches Tubulin verwendet wurde (Infante et al., 2000), blieb in seiner Menge weitgehend konstant und wurde durch Inhibitorgabe kaum verändert, auch wenn man eine Erhöhung bei der Retraktion erwartet hätte. Allerdings erhöhen PC12-Zellen während ihrer Differenzierung nicht nur die Tubulinmenge insgesamt, sondern auch die Menge an tyronisiertem Tubulin (Webster et al., 1992), was eine Anpassung an das insgesamt veränderte Zytoskelett sein kann. Vor diesem Hintergrund ist es nicht

erstaunlich, wenn die Menge des tyronisiertem Tubulins bei einem weiteren Umbau der Neuriten weitgehend konstant bleibt.

SCG10 war in seiner Expression bei Serungabe reduziert, wenn die Aktivität von Akt gehemmt wurde. Normalerweise wird der Abbau von SCG10 durch JNK-abhängige Phosphorylierung induziert (Shin et al., 2012), was in diesem Fall durch die leicht erhöhte JNK-Aktivität unterstützt werden kann. Allerdings war die SCG10-Menge nach NGF-Entzug und zusätzlicher Inhibitorgabe ebenfalls reduziert, was nicht als JNK-abhängiger Prozess erklärt werden kann, da die JNK-Phosphorylierung ebenfalls vermindert war. Unter neurodegenerativen Bedingungen ist allerdings auch Spyl ein möglicher Regulator der SCG10-Stabilität (Liu et al., 2015).

4.4 Regeneration von Neuriten

Wurden PC12-Zellen nach 24-stündiger Serungabe bzw. NGF-Deprivation wieder in NGF-haltigem Medium kultiviert, wurde die Neubildung von Neuriten stimuliert (siehe 3.2.1). Die gleichzeitige Behandlung mit den Inhibitoren SP60125, U0126 und Wortmannin reduzierte sowohl die Anzahl an Neuriten-tragenden Zellen als auch das Überleben (siehe 3.4.1). Die Bedeutung der JNK für die neuronale Regeneration wurde bereits in verschiedenen zellulären Systemen und in Tierversuchen gezeigt (Antoniu and Borsello, 2012). Ihre neuritenstabilisierende Wirkung ist neuroprotektiv (L. Chen et al., 2012; Coffey, 2014) und wird direkt über Mikrotubuli-assoziierte Proteine vermittelt (Barnat et al., 2010). Auch ERK1/2 fördert die neuronale Regeneration nach Verletzung peripherer Neurone, allerdings ohne Einfluss auf das Überleben (Agthong et al., 2009), was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht. Die Aktivität der PI3-Kinase erhöht ebenfalls das Neuritenwachstum in Hinterwurzelganglien (Christie et al., 2010; Saijilafu et al., 2013). Allerdings scheint Akt dabei keine zentrale Rolle zu spielen, sondern eher GSK3 als Substrat der PI3-Kinase (Saijilafu et al., 2013). Dass die Gabe der unterschiedlichen Inhibitoren die Zellzahl nicht stärker reduzierte, war überraschend, zumal eine deutliche Spaltung von Caspase 3 sichtbar war. Diese Diskrepanz kann aus der Methode der Zellzahlmessung resultieren, da WST-Assays weniger sensitiv sind als Zählungen mit Trypanblau. Entsprechend wäre eine Veränderung erst bei längerer Inkubation messbar.

Die Regulation der Kinasen während der Neuritenregeneration nach Serungabe bzw. NGF-Entzug und zusätzlicher Inkubation mit den unterschiedlichen Inhibitoren war komplex. Beim Auswachsen der Neuriten nach Serungabe wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 durch alle drei Inhibitoren gehemmt, am stärksten durch U0126. Wie es zu einer reduzierten Aktivierung von ERK1/2 durch JNK-Inhibition kommen kann, ist bislang noch nicht beschrieben und bedarf

weiterer Untersuchungen. Nicht ungewöhnlich dagegen ist die verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 nach Inhibition der PI3-Kinase (Ha et al., 2013), was dafür spricht, dass bei der Neubildung von Neuriten nach Serumgabe ERK1/2 in die Signalkaskade der PI3-Kinase eingebunden ist. Die Phosphorylierung von JNK ist durch SP600125 reduziert, was beschrieben ist (Bennett et al., 2001), nach der Gabe von U0126 und Wortmannin leicht erhöht, was auf eine ähnliche Regulation hindeutet wie bei der Stabilisierung (siehe 4.1). Auch das Phosphorylierungsmuster von Akt ist dem während der Neuritenstabilisierung sehr ähnlich und lässt daher auf vergleichbare Interaktionen schließen (siehe 4.1).

Bei der Neuritenregeneration nach NGF-Entzug wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 durch die zusätzliche Gabe von SP600125 erhöht. Das legt eine ähnliche Regulation wie bei der Neuritenstabilisierung nahe (siehe 4.1) und ist eine mögliche Erklärung für eine geringere Aktivierung der Caspase 3 als bei der Regeneration nach Serumgabe. Die verminderte Phosphorylierung von JNK nach Gabe von U0126 ist ungewöhnlich, da die Inhibition von ERK1/2 normalerweise zu einer erhöhten JNK-Aktivität führen (Xia et al., 1995b). Welche Mechanismen zu dieser Regulation führen, muss durch weitere Untersuchungen beantwortet werden. Das Phosphorylierungsmuster von Akt deutet darauf hin, dass vergleichbare Interaktionen stattfinden wie bei der Neuritenstabilisierung, auch wenn die Aktivität nach Gabe von SP600125 und U0126 stärker war, was an der zusätzlichen Stimulation zum Umbau des Zytoskeletts liegen kann.

Die Analyse verschiedener Zytoskelettproteine sollte zeigen, welchen Stabilisierungsgrad die Neuriten nach einem Tag Kultivierung in NGF-haltigem Medium hatten. Die schwere Einheit des Neurofilamentproteins (NF-H) war nach Serumgabe nur in der Serumkontrolle erhöht. Da diese Zellen auch die meisten Neuriten-tragenden Zellen aufwiesen im Vergleich zu den Zellen, die zusätzlich mit den verschiedenen Inhibitoren behandelt wurden, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die Neuriten auch die stabilsten waren. Eine verminderte Phosphorylierung bzw. Expression nach Inhibition von JNK und ERK1/2 ist bereits beschrieben (Brownlee et al., 2000; Veeranna et al., 1998), für Akt indirekt (Ueno et al., 2012). Die Menge an tyrosiniertem Tubulin blieb während der Neubildung von Neuriten nach Serumgabe gleich, was auch bei der Retraktion zu beobachten war. Das azetylierte Tubulin schwankte in seiner Menge stark, wobei mehr azetyliertes Tubulin nach der zusätzlichen Gabe von SP600125 und U0126 zu sehen war. Bislang ist nicht bekannt, ob JNK die Azetylierung beeinflusst. Auch bei den Enzymen, die die Deazetylierung katalysieren gibt es bis jetzt keine Interaktion, in der die JNK eine regulierende Funktion ausüben würden. Für ERK1/2 hingegen konnte gezeigt werden, dass beide deazetylierenden Enzyme, Histon-Deacetylase 6 und Sirtuin 2, in ihrer Aktivität durch ERK1/2 stimuliert werden können (Choi et al., 2013; Haakenson et al., 2015; Williams et al.,

2013). Eine Inhibition von ERK1/2 würde entsprechend zu einer erhöhten Menge von azetyliertem Tubulin führen.

Bei der Neubildung von Neuriten nach NGF-Entzug war die Menge der schweren Untereinheit des Neurofilamentproteins (NF-H) insgesamt geringer als in den unbehandelten Kontrollzellen, was auf eine verzögerte Neubildung und Stabilisierung von Neuriten hindeutet. Dasselbe traf auf das azetylierte Tubulin zu. Warum die Abnahme nach der zusätzlichen Gabe von U0126 besonders stark war, lässt sich mit den bisherigen Erkenntnissen nicht erklären. Die Menge an tyronisiertem Tubulin war weitgehend unverändert. Nur die zusätzliche JNK-Inhibition verstärkte das Signal. Zur Zeit liegen keine Daten vor, die auf eine Regulation der Tubulin-Ligase oder der Carboxypeptidase durch JNK hindeuten. Eine weitere Möglichkeit wäre eine gestörte Assoziation der modifizierenden Enzyme durch die verminderte JNK-Aktivität, doch auch dazu gibt es bislang noch keine Untersuchungen.

Insgesamt hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass Stabilität, Retraktion und Regeneration von Neuriten einer komplexen Regulation von Kinasen unterliegt. Es konnten direkte Interaktionen zwischen den einzelnen Signalwegen nachgewiesen werden oder weitere Mediatoren, die zwischen den Signalmolekülen vermittelten. Grundsätzlich demonstrieren die Ergebnisse, dass das Verständnis elementarer Signaltransduktionsprozesse unerlässlich ist, um entscheiden zu können, welche Mediatoren wichtig sind für den Erhalt und die Regeneration von Neuriten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Aktivität und Interaktion relevanter neuronaler Signalmoleküle wie der MAPKs sowie Akt bei der Stabilisierung und Umbauprozessen von Neuriten zu bestimmen und damit mögliche Ansatzpunkte zu finden, die das Überleben von verletzten Neuronen verbessern. Da Stabilisierung, Retraktion und Regeneration von Neuriten eng miteinander verknüpft sind, wurden alle Teilaspekte untersucht.

Eine ausreichende Neuritenstabilität setzte eine basale Aktivität von JNK, ERK1/2 und Akt voraus. Durch die Inhibition dieser Signalwege kam es zum Zelltod bzw. einer Abnahme von Neuriten-tragenden Zellen. Folgende Interaktionen konnten beobachtet werden: ERK1/2 und JNKs hemmten die Aktivität des jeweils anderen Signalwegs. Auch die Kaskaden von ERK1/2 und Akt waren über eine gegenläufige Regulation miteinander verbunden. Akt reduzierte die Phosphorylierung der JNKs über eine Hemmung der MAP2K MKK4, während die JNKs die Aktivität von Akt über die Bindung an JIP1 zu beeinflussen scheinen.

Die Untersuchung der Neuritenretraktion und Regeneration erfolgte anhand von vier Modellen, in denen der Umbau von Neuriten unterschiedlich stark mit dem Zelltod korrelierte. Anhand der parallel durchgeführten Untersuchungen durch Serumgabe bzw. NGF-Entzug konnten unterschiedliche JNK-abhängige Regulationen bezüglich der Retraktion identifiziert werden. Zelltod wurde bei Serumgabe durch die erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt verhindert. Allerdings verstärkte ausgerechnet die Hemmung von JNK bei NGF-Entzug den Zelltod und reduzierte in beiden Fällen die Anzahl der Neuriten-tragenden Zellen besonders stark, was für eine wichtige physiologische Funktion spricht.

Auch die Neuritenregeneration wurde durch die parallel durchgeführten Untersuchungen mit Serumgabe bzw. NGF-Entzug näher analysiert. In beiden Fällen kam es in ähnlichem Ausmaß zur Neubildung von Neuriten. Allerdings führte die Inhibition von JNK, ERK1/2 und Akt zum Zelltod und zu einem eingeschränkten regenerativen Wachstum. Die Phosphorylierung von JNK war insgesamt schwach, die Aktivität von ERK1/2 korrelierte dagegen gut mit der Neubildung von Neuriten.

Insgesamt konnten wichtige Aspekte der Signaltransduktion von Stabilisierung, Retraktion und Regeneration von Neuriten innerhalb des Projektes geklärt werden.

I REFERENZEN

- Agthong, S., Koonam, J., Kaewsema, A., Chentanez, V., 2009. Inhibition of MAPK ERK impairs axonal regeneration without an effect on neuronal loss after nerve injury. *Neurol. Res.* 31, 1068–1074. doi:10.1179/174313209X380883
- Andjelković, M., Suidan, H.S., Meier, R., Frech, M., Alessi, D.R., Hemmings, B.A., 1998. Nerve growth factor promotes activation of the alpha, beta and gamma isoforms of protein kinase B in PC12 pheochromocytoma cells. *Eur. J. Biochem.* 251, 195–200.
- Antoniou, X., Borsello, T., 2012. The JNK signalling transduction pathway in the brain. *Front Biosci (Elite Ed)* 4, 2110–2120.
- Ashwell, J.D., 2006. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6, 532–540. doi:10.1038/nri1865
- Ballif, B.A., Blenis, J., 2001. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.* 12, 397–408.
- Barnat, M., Enslin, H., Propst, F., Davis, R.J., Soares, S., 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.0372-10.2010
- Bavaria, M.N., Jin, S., Ray, R.M., Johnson, L.R., 2014. The mechanism by which MEK/ERK regulates JNK and p38 activity in polyamine depleted IEC-6 cells during apoptosis. *Apoptosis* 19, 467–479. doi:10.1007/s10495-013-0944-1
- Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M., Anderson, D.W., 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 13681–13686. doi:10.1073/pnas.251194298
- Black, M.M., Keyser, P., 1987. Acetylation of alpha-tubulin in cultured neurons and the induction of alpha-tubulin acetylation in PC12 cells by treatment with nerve growth factor. *J. Neurosci.* 7, 1833–1842.
- Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Gregory, J.S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., Cobb, M.H., 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249, 64–67.
- Brownlees, J., Yates, A., Bajaj, N.P., Davis, D., Anderton, B.H., Leigh, P.N., Shaw, C.E., Miller, C.C., 2000. Phosphorylation of neurofilament heavy chain side-arms by stress activated protein kinase-1b/Jun N-terminal kinase-3. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 3), 401–407.
- Casaccia-Bonnel, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T., Chao, M.V., 1996. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383, 716–719. doi:10.1038/383716a0
- Chan, K.M., Gordon, T., Zochodne, D.W., Power, H.A., 2014. Improving peripheral nerve regeneration: from molecular mechanisms to potential therapeutic targets. *Experimental Neurology* 261, 826–835. doi:10.1016/j.expneurol.2014.09.006
- Chen, L., Stone, M.C., Tao, J., Rolls, M.M., 2012. Axon injury and stress trigger a microtubule-based neuroprotective pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11842–11847. doi:10.1073/pnas.1121180109
- Chen, Y.L., Law, P.-Y., Loh, H.H., 2006. Sustained activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor kappaB signaling mediates G protein-coupled delta-opioid receptor gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 281, 3067–3074. doi:10.1074/jbc.M506721200
- Chiu, W.-H., Luo, S.-J., Chen, C.-L., Cheng, J.-H., Hsieh, C.-Y., Wang, C.-Y., Huang, W.-C., Su, W.-C., Lin, C.-F., 2012. Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1159–1171. doi:10.1016/j.bcp.2012.01.016

- Choi, Y.H., Kim, H., Lee, S.H., Jin, Y.-H., Lee, K.Y., 2013. ERK1/2 regulates SIRT2 deacetylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 245–249. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.053
- Christie, K.J., Webber, C.A., Martinez, J.A., Singh, B., Zochodne, D.W., 2010. PTEN inhibition to facilitate intrinsic regenerative outgrowth of adult peripheral axons. *J. Neurosci.* 30, 9306–9315. doi:10.1523/JNEUROSCI.6271-09.2010
- Coffey, E.T., 2014. Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nature Publishing Group* 15, 285–299. doi:10.1038/nrn3729
- Davis, R.J., 2000. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* 103, 239–252. doi:10.1016/s0092-8674(00)00116-1
- Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P., May, W.S., 2001. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 23681–23688. doi:10.1074/jbc.M100279200
- Dirk, F., Croucher, D.R., Kolch, W., Kholodenko, B.N., 2012. Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Frontiers in Physiology* 3, 1–21. doi:10.3389/fphys.2012.00355/abstract
- Doron-Mandel, E., Fainzilber, M., Terenzio, M., 2015. Growth control mechanisms in neuronal regeneration. *FEBS Letters* 589, 1669–1677. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.046
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., Greenberg, M.E., 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661–665.
- Dyer, D., Tigyi, G., Miledi, R., 1992. The effect of active serum albumin on PC12 cells: II. Intracellular Ca²⁺ transients and their role in neurite retraction. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 14, 302–309.
- Efimova, T., Broome, A.-M., Eckert, R.L., 2003. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 34277–34285. doi:10.1074/jbc.M302759200
- Fey, D., Croucher, D.R., Kolch, W., Kholodenko, B.N., 2012. Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Frontiers in Physiology* 3, 355. doi:10.3389/fphys.2012.00355
- Friedman, W.J., 2000. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J. Neurosci.* 20, 6340–6346.
- Gauthier, M.L., Pickering, C.R., Miller, C.J., Fordyce, C.A., Chew, K.L., Berman, H.K., Tlsty, T.D., 2005. p38 regulates cyclooxygenase-2 in human mammary epithelial cells and is activated in premalignant tissue. *Cancer Res.* 65, 1792–1799. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3507
- Greenberg, A.K., Basu, S., Hu, J., Yie, T.-A., Tchou-Wong, K.M., Rom, W.N., Lee, T.C., 2002. Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 558–564. doi:10.1165/ajrcmb.26.5.4689
- Greene, L.A., 1978. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *The Journal of Cell Biology* 78, 747–755. doi:10.1083/jcb.78.3.747
- Greene, L.A., Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 2424–2428. doi:10.1073/pnas.73.7.2424
- Gundersen, R.W., Barrett, J.N., 1979. Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science* 206, 1079–1080.
- Ha, J.S., Kwon, K.-S., Park, S.S., 2013. PI3K γ contributes to MEK1/2 activation in oxidative glutamate toxicity via PDK1. *Journal of Neurochemistry* 127, 139–148. doi:10.1111/jnc.12364
- Haakenson, J., Wu, J.-Y., Xiang, S., Williams, K.A., Bai, W., Zhang, X., 2015. HDAC6-Dependent Functions in Tumor Cells: Crossroad with the MAPK Pathways. *Crit Rev*

- Oncog 20, 65–81.
- Hu, J.-H., Chen, T., Zhuang, Z.-H., Kong, L., Yu, M.-C., Liu, Y., Zang, J.-W., Ge, B.-X., 2007. Feedback control of MKP-1 expression by p38. *Cellular Signalling* 19, 393–400. doi:10.1016/j.cellsig.2006.07.010
- Ide, C., 1996. Peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Research* 25, 101–121. doi:10.1016/s0168-0102(96)01042-5
- Infante, A.S., Stein, M.S., Zhai, Y., Borisy, G.G., Gundersen, G.G., 2000. Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 22), 3907–3919.
- Junttila, M.R., Ala-aho, R., Jokilehto, T., Peltonen, J., Kallajoki, M., Grenman, R., Jaakkola, P., Westermarck, J., Kähäri, V.-M., 2007. p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* 26, 5267–5279. doi:10.1038/sj.onc.1210332
- Junttila, M.R., Li, S.-P., Westermarck, J., 2008. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 22, 954–965. doi:10.1096/fj.06-7859rev
- Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 10, 381–391. doi:10.1016/s0959-4388(00)00092-1
- Kaplan, D.R., Miller, F.D., 1997. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 213–221. doi:10.1016/s0955-0674(97)80065-8
- Kelkar, N., Gupta, S., Dickens, M., Davis, R.J., 2000. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Molecular and Cellular Biology* 20, 1030–1043.
- Kita, Y., Kimura, K.D., Kobayashi, M., Ihara, S., Kaibuchi, K., Kuroda, S., Ui, M., Iba, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Nagata, S., Fukui, Y., 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.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Barbacid, M., 1991. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189–197.
- Kobayashi, M., Nagata, S., Kita, Y., Nakatsu, N., Ihara, S., Kaibuchi, K., Kuroda, S., Ui, M., Iba, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Saitoh, I., Fukui, Y., 1997. Expression of a Constitutively Active Phosphatidylinositol 3-Kinase Induces Process Formation in Rat PC12 Cells: USE OF Cre/loxP RECOMBINATION SYSTEM. *Journal of Biological Chemistry* 272, 16089–16092. doi:10.1074/jbc.272.26.16089
- Kuboki, Y., Ito, M., Takamatsu, N., Yamamoto, K.I., Shiba, T., Yoshioka, K., 2000. A scaffold protein in the c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathways suppresses the extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 275, 39815–39818. doi:10.1074/jbc.C000403200
- Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., Claret, F.X., Green, D.R., 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. *Molecular and Cellular Biology* 19, 751–763.
- Lee, S., Shea, T.B., 2014. The high molecular weight neurofilament subunit plays an essential role in axonal outgrowth and stabilization. *Biology Open* 3, 974–981. doi:10.1242/bio.20149779
- Levi, A., Eldridge, J.D., Paterson, B.M., 1985. Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* 229, 393–395.
- Liu, Y., Wang, Y., Chen, Y., Li, X., Yang, J., Liu, Y., Shen, A., 2015. Spyl Protein Mediates Phosphorylation and Degradation of SCG10 Protein in Axonal Degeneration. *J. Biol. Chem.* 290, 13888–13894. doi:10.1074/jbc.M114.611574
- Lundborg, G., 1987. Nerve regeneration and repair: A review. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 58, 145–169. doi:10.3109/17453678709146461

- Makwana, M., Raivich, G., 2005. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J.* 272, 2628–2638. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04699.x
- Matsuura, H., Nishitoh, H., Takeda, K., Matsuzawa, A., Amagasa, T., Ito, M., Yoshioka, K., Ichijo, H., 2002. Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway. A new mode of regulation of the MAP kinase cascade. *Journal of Biological Chemistry* 277, 40703–40709. doi:10.1074/jbc.M202004200
- McKay, M.M., Morrison, D.K., 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26, 3113–3121. doi:10.1038/sj.onc.1210394
- Meloche, S., Pouyssegur, J., 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227–3239. doi:10.1038/sj.onc.1210414
- Miller, F.D., Kaplan, D.R., 2001. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1045–1053. doi:10.1007/PL00000919
- Mori, N., Morii, H., 2002. SCG10-related neuronal growth-associated proteins in neural development, plasticity, degeneration, and aging. *J. Neurosci. Res.* 70, 264–273. doi:10.1002/jnr.10353
- Neri, L.M., Borgatti, P., Capitani, S., Martelli, A.M., 2002. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim. Biophys. Acta* 1584, 73–80.
- Niba, E.T.E., Nagaya, H., Kanno, T., Tsuchiya, A., Gotoh, A., Tabata, C., Kuribayashi, K., Nakano, T., Nishizaki, T., 2013. Crosstalk between PI3 kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways downstream PDGF receptor. *Cell Physiol Biochem* 31, 905–913. doi:10.1159/000350108
- Okalang, U., Nanteza, A., Matovu, E., Lubega, G.W., 2013. Identification of coding sequences from a freshly prepared *Trypanosoma brucei brucei* expression library by polymerase chain reaction. *Int J Biochem Mol Biol* 4, 73–82.
- Park, H.-S., Kim, M.-S., Huh, S.-H., Park, J., Chung, J., Kang, S.S., Choi, E.-J., 2002. Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 2573–2578. doi:10.1074/jbc.M110299200
- Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M., Daly, R.J., 2009. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochemical Journal* 418, 475–489. doi:10.1042/bj20082234
- Philo, J.S., Rosenfeld, R., Arakawa, T., Wen, J., Narhi, L.O., 1993. Refolding of brain-derived neurotrophic factor from guanidine hydrochloride: Kinetic trapping in a collapsed form which is incompetent for dimerization. *Biochemistry* 32, 10812–10818. doi:10.1021/bi00091a036
- Rallis, A., Moore, C., Ng, J., 2010. Signal strength and signal duration define two distinct aspects of JNK-regulated axon stability. *Developmental Biology* 339, 65–77. doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.016
- Repici, M., Mare, L., Colombo, A., Ploia, C., Scip, A., Bonny, C., Nicod, P., Salmona, M., Borsello, T., 2009. c-Jun N-terminal kinase binding domain-dependent phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 and mitogen-activated protein kinase kinase 7 and balancing cross-talk between c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways in cortical neurons. *Neuroscience* 159, 94–103. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.11.049
- Roux, P.P., Blenis, J., 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 320–344. doi:10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004
- Rubinfeld, H., Seger, R., 2005. The ERK Cascade: A Prototype of MAPK Signaling. *Molecular Biotechnology* 31, 151–174. doi:10.1385/mb:31:2:151
- Saijilafu, Hur, E.-M., Liu, C.-M., Jiao, Z., Xu, W.-L., Zhou, F.-Q., 2013. PI3K-GSK3 signalling regulates mammalian axon regeneration by inducing the expression of Smad1.

- Nat Commun 4, 2690. doi:10.1038/ncomms3690
- Savage, M.J., Lin, Y.-G., Ciallella, J.R., Flood, D.G., Scott, R.W., 2002. Activation of c-Jun N-Terminal Kinase and p38 in an Alzheimer's Disease Model Is Associated with Amyloid Deposition. *the journal of neuroscience* 9, 3376–3385.
- Seddon, H.J., 1943. Three Types of Nerve Injury. *Brain* 66, 237–288. doi:10.1093/brain/66.4.237
- Seeley, P.J., Greene, L.A., 1983. Short-latency local actions of nerve growth factor at the growth cone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 2789–2793.
- Shin, J.E., Miller, B.R., Babetto, E., Cho, Y., Sasaki, Y., Qayum, S., Russler, E.V., Cavalli, V., Milbrandt, J., DiAntonio, A., 2012. SCG10 is a JNK target in the axonal degeneration pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E3696–705. doi:10.1073/pnas.1216204109
- Sindi, R.A., Harris, W., Arnott, G., Flaskos, J., Lloyd Mills, C., Hargreaves, A.J., 2016. Chlorpyrifos- and chlorpyrifos oxon-induced neurite retraction in pre-differentiated N2a cells is associated with transient hyperphosphorylation of neurofilament heavy chain and ERK 1/2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 308, 20–31. doi:10.1016/j.taap.2016.08.008
- Smalheiser, N.R., 1993. Acute neurite retraction elicited by diverse agents is prevented by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. *Journal of Neurochemistry* 61, 340–343.
- Song, J.J., Lee, Y.J., 2005. Dissociation of Akt1 from its negative regulator JIP1 is mediated through the ASK1-MEK-JNK signal transduction pathway during metabolic oxidative stress: a negative feedback loop. *The Journal of Cell Biology* 170, 61–72. doi:10.1083/jcb.200502070
- Stoll, G., Müller, H.W., 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.* 9, 313–325.
- Sun, Y., Liu, W.-Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N., Zhou, H.-F., 2015. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 35, 600–604. doi:10.3109/10799893.2015.1030412
- Tararuk, T., Ostman, N., Li, W., Björkblom, B., Padzik, A., Zdrojewska, J., Hongisto, V., Herdegen, T., Konopka, W., Courtney, M.J., Coffey, E.T., 2006. JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *The Journal of Cell Biology* 173, 265–277. doi:10.1083/jcb.200511055
- Tie, L., Zhang, J.-Z., Lin, Y.-H., Su, T.-H., Li, Y.-H., Wu, H.-L., Zhang, Y.-Y., Yu, H.-M., Li, X.-J., 2008. Epinephrine increases phosphorylation of MAP-2c in rat pheochromocytoma cells (PC12 Cells) via a protein kinase C- and mitogen activated protein kinase-dependent mechanism. *J. Proteome Res.* 7, 1704–1711. doi:10.1021/pr700711s
- Ueno, Y., Chopp, M., Zhang, L., Buller, B., Liu, Z., Lehman, N.L., Liu, X.S., Zhang, Y., Roberts, C., Zhang, Z.G., 2012. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke* 43, 2221–2228. doi:10.1161/STROKEAHA.111.646224
- Veeranna, Amin, N.D., Ahn, N.G., Jaffe, H., Winters, C.A., Grant, P., Pant, H.C., 1998. Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J. Neurosci.* 18, 4008–4021.
- Volbracht, C., Leist, M., Nicotera, P., 1999. ATP controls neuronal apoptosis triggered by microtubule breakdown or potassium deprivation. *Mol. Med.* 5, 477–489.
- Waetzig, V., Belzer, M., Haeusgen, W., Boehm, R., Cascorbi, I., Herdegen, T., 2017. Crosstalk control and limits of physiological c-Jun N-terminal kinase activity for cell viability and neurite stability in differentiated PC12 cells. *Mol. Cell. Neurosci.* doi:10.1016/j.mcn.2017.04.004
- Waetzig, V., Herdegen, T., 2005. MEKK1 controls neurite regrowth after experimental injury by balancing ERK1/2 and JNK2 signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* 30, 67–78. doi:10.1016/j.mcn.2005.06.001
- Waetzig, V., Herdegen, T., 2003a. The concerted signaling of ERK1/2 and JNKs is essential

- for PC12 cell neurogenesis and converges at the level of target proteins. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 238–249. doi:10.1016/S1044-7431(03)00126-X
- Waetzig, V., Herdegen, T., 2003b. A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death. *Journal of Biological Chemistry* 278, 567–572. doi:10.1074/jbc.M207391200
- Wales, C.T.K., Taylor, F.R., Higa, A.T., McAllister, H.A., Jacobs, A.T., 2015. ERK-dependent phosphorylation of HSF1 mediates chemotherapeutic resistance to benzimidazole carbamates in colorectal cancer cells. *Anticancer Drugs* 1. doi:10.1097/cad.0000000000000231
- Waller, A., 1843. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Proceedings of the Royal Society of London* 5, 924–925. doi:10.1098/rspl.1843.0224
- Webster, D.R., Modesti, N.M., Bulinski, J.C., 1992. Regulation of cytoplasmic tubulin carboxypeptidase activity during neural and muscle differentiation: characterization using a microtubule-based assay. *Biochemistry* 31, 5849–5856.
- Weston, C.R., Davis, R.J., 2007. The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 19, 142–149. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.001
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L., 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79, 143–180.
- Williams, K.A., Zhang, M., Xiang, S., Hu, C., Wu, J.-Y., Zhang, S., Ryan, M., Cox, A.D., Der, C.J., Fang, B., Koomen, J., Haura, E., Bepler, G., Nicosia, S.V., Matthias, P., Wang, C., Bai, W., Zhang, X., 2013. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylates histone deacetylase 6 (HDAC6) at serine 1035 to stimulate cell migration. *J. Biol. Chem.* 288, 33156–33170. doi:10.1074/jbc.M113.472506
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E., 1995a. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326–1331.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J.L., Davis, R.J., Greenberg, M.E., 1995b. Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. *Science* 270, 1326–1331. doi:10.1126/science.270.5240.1326
- Yao, R., Yoshihara, M., Osada, H., 1997. Specific Activation of a c-Jun NH2-terminal Kinase Isoform and Induction of Neurite Outgrowth in PC-12 Cells by Staurosporine. *Journal of Biological Chemistry* 272, 18261–18266. doi:10.1074/jbc.272.29.18261
- Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G.R., Johnson, G.L., 1998. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* 282, 1911–1914.
- Zhang, Y., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A., Segal, R.A., 2000. Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J. Neurosci.* 20, 5671–5678.
- Zmajkovicova, K., Jesenberger, V., Catalanotti, F., Baumgartner, C., Reyes, G., Baccarini, M., 2013. MEK1 is required for PTEN membrane recruitment, AKT regulation, and the maintenance of peripheral tolerance. *Molecular Cell* 50, 43–55. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.037

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1.1: Der PI3K-Akt Signalweg.
- Abbildung 3.1: SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (Wort/W, 500 nM) reduzierten das Überleben von PC12-Zellen.
- Abbildung 3.2: Eine 24-stündige Inkubation mit SP600125 (2 μ M), U0126 (5 μ M), Wortmannin (500 nM) reduzierte die Anzahl Neuriten-tragender PC12-Zellen.
- Abbildung 3.3: SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (Wort/W, 500 nM) reduzierten die Anzahl Neuriten-tragenden PC12-Zellen.
- Abbildung 3.4: Western-Blots zur Aktivierung und Expression verschiedener Kinasen nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM).
- Abbildung 3.5: Western-Blots zur Aktivierung und Expression verschiedener Kinasen in Kern- und Zytoplasma-Extrakten nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM).
- Abbildung 3.6: Western-Blots zur Aktivierung und Expression verschiedener Kinasen in Kern- und Zytoplasma-Extrakten nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM).
- Abbildung 3.7: Western-Blots zur Aktivierung und Expression verschiedener Gerüst-Proteine und Kinasen nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM).
- Abbildung 3.8: Western-Blots nach Co-Immunopräzipitation mit MEKK1 nach 24-stündiger Inkubation mit SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM).
- Abbildung 3.9: Verschiedene PC12-Zellmodelle zur Retraktion und Regeneration von Neuriten.
- Abbildung 3.10: Neubildung von Neuriten.
- Abbildung 3.11: Zelltod nach Neuritenretraktion.
- Abbildung 3.12: Western-Blots zu den Kinase-Aktivitäten während Neuriten-Retraktion und –Regeneration nach Nocodazol (Noc), Vollmedium (ser), NGF-Entzug (\emptyset) und mechanischer Neuritenentfernung (inj).
- Abbildung 3.13: Retraktion von Neuriten mit zusätzlicher Gabe von SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM) nach 24 h.
- Abbildung 3.14: Zelltod nach Neuritenretraktion nach 24 h.

- Abbildung 3.15: Western-Blots zu den Kinase-Aktivitäten während Neuriten-Retraktion nach Vollmedium (ser), NGF-Entzug (\emptyset) mit zusätzlicher Gabe von SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM).
- Abbildung 3.16: Neuriten-Regeneration nach Serumgabe (ser, A) und NGF-Entzug (\emptyset , B) mit zusätzlicher Gabe von SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM) nach 24-stündiger Inkubation in NGF-haltigem Medium.
- Abbildung 3.17: Überleben (WST1-Assays) bei der Neubildung von Neuriten nach Vollmedium (ser, A), NGF-Entzug (\emptyset , B) mit zusätzlicher Gabe von SP600125 (SP, 2 μ M), U0126 (U0, 5 μ M), Wortmannin (W, 500 nM) nach 24-stündiger Inkubation in NGF-haltigem Medium.
- Abbildung 3.18: Western-Blots zu den Kinase-Aktivitäten während Neuriten-Regeneration nach Vollmedium (ser), NGF-Entzug (\emptyset).

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die SDS-PAGE.

Tabelle 2.3 Primärantikörper.

IV PUBLIKATIONEN

Vicki Waetzig, Milana Belzer, Wiebke Haeusgen, Ruwen Boehm, Ingolf Cascorbi and Thomas Herdegen

Crosstalk control and limits of physiological c-Jun N-terminal kinase activity for cell viability and neurite stability in differentiated PC12 cells. (Waetzig et al., 2017)