

Aus der Klinik und Hochschulambulanz für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin,
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Raf Kinase Inhibitor Protein in der neuronalen Differenzierung und
seine Rolle beim alkoholassozierten Differenzierungsschaden im
Modell humaner SH-SY5Y Neuroblastomzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julian David Nicolai Hellmann-Regen

aus Berlin

Gutachter: 1.: Prof. Dr. Hans Rommelspacher
2.: Prof. Dr. Jerzy Samochowiec
3.: Prof. Dr. Norbert A. Dencher

Datum der Promotion: 8.4.2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|---------------|
| 1. ZUSAMMENFASSUNG | - 4 - |
| 1.1 Abstract | - 4 - |
| 1.2 Einleitung | - 5 - |
| 1.3 Methoden | - 7 - |
| 1.4 Ergebnisse | - 8 - |
| 1.4.1 Neuronale Differenzierung und chronische Ethanolexposition | - 8 - |
| 1.4.1.1 Auswirkungen chronischer Ethanolexposition auf die Zellmorphologie | - 8 - |
| 1.4.1.2 Untersuchungen dopaminergischer Charakteristika sowie der Expression neuronaler Marker unter Differenzierung und chronischer Ethanolexposition | - 9 - |
| 1.4.1.3 Signaltransduktion der MAPK-Kaskade unter chronischer Ethanolexposition | - 9 - |
| 1.4.1.4 Expression von Trk-B, Raf-1, MEK, ERK, RKIP und PKC unter chronischer Ethanolexposition | - 9 - |
| 1.4.2 Die Rolle des RKIP in der neuronalen Differenzierung | - 10 - |
| 1.4.2.1 Morphologische Effekte von RKIP-Überexpression und RKIP-Downregulation | - 10 - |
| 1.4.2.2 Expression neuronaler und glialer Markerproteine unter RKIP-Überexpression und RKIP-Downregulation | - 10 - |
| 1.4.2.3 Einfluss der RKIP-Überexpression und RKIP-Downregulation auf die differenzierungsassoziierte Signaltransduktion | - 11 - |
| 1.5 Diskussion | - 11 - |
| 1.5.1 Neuronale Differenzierung und chronische Ethanolexposition | - 11 - |
| 1.5.2 Rolle des RKIP in der neuronalen Differenzierung | - 14 - |
| 1.5.3 Schlussfolgerungen | - 16 - |
| 1.6 Literaturverzeichnis | - 17 - |
| 2. ANTEILSERKLÄRUNG | - 20 - |
| 3. ORIGINALARBEITEN | - 21 - |
| 4. LEBENS LAUF | - 25 - |
| 5. PUBLIKATIONS LISTE | - 26 - |
| 6. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | - 27 - |
| 7. DANKSAGUNG | - 28 - |

1. Zusammenfassung

1.1 Abstract

Für die Entwicklung und Integrität des Nervensystems stellt die neuronale Differenzierung einen wichtigen Prozess dar, welcher gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen wie Alkoholexposition zeitlebens vulnerabel ist. Zur Untersuchung neuronaler Differenzierung zugrunde liegender Prozesse wurde ein humanes, neuronales Zellkulturmodell etabliert. Es wurde auf Ebene der Zellmorphologie, der intrazellulären Signaltransduktion sowie der Expression neuronaler Markerproteine und signaltransduktionsassoziiierter Proteine analysiert sowie hinsichtlich dopaminergischer Eigenschaften charakterisiert. Insbesondere das Raf kinase inhibitor protein (RKIP), ein möglicherweise auch an der neuronalen Signaltransduktion modulierend beteiligtes Protein, und die Proteinkinase C (PKC) wurden hinsichtlich möglicher Beteiligung an neuronaler Differenzierung sowie ethanolbedingten Differenzierungsschäden untersucht.

Hierzu wurden humane Neuroblastomzellen mit Retinsäure bis zu 4 Wochen differenziert, mit Ethanol behandelt und Analysen mittels Phasenkontrastmikroskopie, Immunzytochemie, Western Blot, cAMP-spezifischem ELISA, quantitativer RT-PCR sowie Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie durchgeführt. Weiterhin wurde eine eigene, unabhängig von Ethanoleinflüssen bestehende Rolle des RKIP bei der neuronalen Differenzierung untersucht. Hierzu wurde RKIP mittels gezielter Transfektion überexprimiert und downreguliert.

Unter Ethanolexposition zeigte sich morphologisch eine beeinträchtigte Differenzierung. Entsprechend fanden sich auch im Quotienten der mRNA des prä- und postsynaptischen Dopaminrezeptors eine Störung des differenzierungstypischen Verteilungsmusters sowie eine reduzierte Expression neuronaler Markerproteine. Zudem ergab sich eine signifikant reduzierte Aktivierbarkeit der Mitogen aktivierten Proteinkinase-Kaskade, welche Effekte differenzierungsfördernder Substanzen wie bspw. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) vermittelt. Gleichzeitig lag eine signifikant reduzierte PKC- und RKIP-Expression vor. Die Ergebnisse zu ethanolbedingter Reduktion relevanter neuronaler Proteine sowie der assoziierten Signaltransduktion zeigen einerseits allgemeine Mechanismen zellulärer Toleranzentwicklung auf und geben andererseits Aufschluss über Mechanismen der daraus resultierenden Differenzierungsschäden, wie sie bspw. auch in der Maximalvariante am Phänotyp der Alkoholembryopathie beobachtet werden.

In Transfektionsexperimenten konnte darüber hinaus erstmals eine eigene Rolle des RKIP in

der neuronalen Differenzierung belegt werden: Während die Überexpression von RKIP in verstärkter Signaltransduktion und schließlich beschleunigter neuronaler Differenzierung resultierte, ergab sich nach Downregulation ein glialer Phänotyp bei reduzierter neuronaler Differenzierung.

1.2 Einleitung

Neuronale Differenzierung stellt einen auch im adulten Hirn ablaufenden Prozess während der Entwicklung neuer Neurone dar, welcher der potenziellen Beeinflussung durch diverse Substanzen unterliegt. Insbesondere Schäden durch Alkohol nehmen dabei einen hohen Stellenwert ein. Die Mechanismen der Einflüsse chronischer Ethanolexposition auf neuronale Differenzierung sind jedoch nur unzureichend aufgeklärt.

Bislang wurden zahlreiche allgemeine Effekte insbesondere akuter Ethanolexposition auf zelluläre Signaltransduktion beschrieben. So wurden Interaktionen von Ethanol bspw. mit dem Fettsäuremetabolismus, mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und ihren nachgeschalteten Second Messenger Prozessen, der Protein-Kinase C (PKC), mit der intrazellulären Signaltransduktion der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK; ERK) sowie mit zellulärer Differenzierung im Allgemeinen beschrieben (Aroor und Shukla, 2004; Chandler und Sutton, 2005; Crews et al., 2006; Davis et al., 1999; McIntyre et al., 1999; Nixon und Crews, 2002; Roivainen et al., 1995). Ein diesen Effekten gemeinsamer und für ethanolbedingte gestörte neuronale Differenzierung in Frage kommender Mechanismus ist bislang jedoch nicht bekannt. Interessanterweise findet sich das Raf kinase inhibitor protein (RKIP) als ein cytoplasmatisches, in seiner Aminosäuresequenz evolutionär hoch konserviertes Protein am Schnittpunkt all jener Prozesse (Abb. 1; Hellmann et al., 2009b). RKIP bindet Lipide und hemmt die Raf-1-Kinase-vermittelte Aktivierung der MAP Kinase Kinase (MEK) im Prozess der neurotrophininduzierten Signaltransduktion nach Aktivierung des Trk-B (Tyrosinkinase Rezeptor B) durch Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF). Im selben Prozess wird RKIP von der PKC phosphoryliert und führt nach Translokation zu veränderter Aktivierbarkeit von GPCR (Corbit et al., 2003; Keller et al., 2004a; Trakul und Rosner, 2005; Yeung et al., 1999). Auch wird ein Zusammenhang zwischen veränderter RKIP-Expression und neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. So zeigt sich RKIP spezifisch nitrierbar und damit potenziell in seiner Funktionalität modifizierbar sowie auch bei Patienten mit M. Alzheimer erniedrigt (George et al., 2006; Maki et al., 2002; Reed et al., 2009). Als Vorläuferprotein des HCNP kommt RKIP eine Rolle in der Stimulation cholinergischer Neurone

zu, welche beim M. Alzheimer frühzeitig von Degeneration betroffen sind (Mitake et al., 1997).

Ziel der hier vorgelegten Studien war die Untersuchung der Auswirkungen chronischer Alkoholexposition auf verschiedene Ebenen der neuronalen Differenzierung mit Hilfe eines zuvor etablierten, humanen, neuronalen Zellkulturmodells. Neben Untersuchungen der Zellmorphologie, der differenzierungsassoziierten Signaltransduktion, der Expression neuronaler Markerproteine und dopaminerger Eigenschaften des Differenzierungsmodells unter Ethanolinfluss erfolgte zudem die Untersuchung der Rolle des RKIP für die neuronale Differenzierung unabhängig vom Einfluss des Ethanols (Hellmann et al., 2009a; Hellmann et al., 2009b; Wernicke et al., 2010).

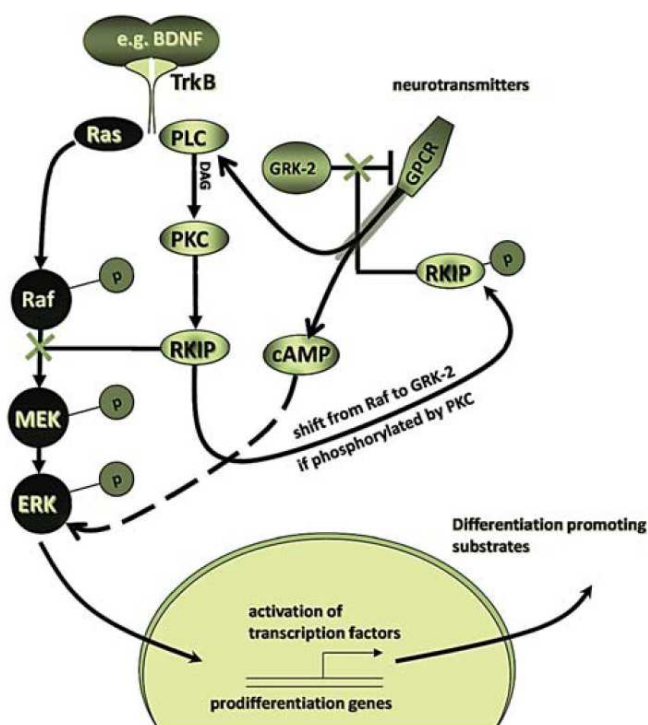


Abb. 1. Stellung des RKIP in der Neurotrophin- und GPCR-assozierten Signaltransduktion (aus Hellmann et al., 2009a). Trk-B = Tyrosinkinase Rezeptor B, BDNF = Brain derived neurotrophic factor, PLC = Phospholipase C, Ras = Rat sarcoma G-Protein, Raf = Rat fibrosarcoma Proteinkinase, cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat, GPCR = G-Protein gekoppelter Rezeptor, GRK-2 = G-Protein gekoppelter Rezeptor-Kinase-2, DAG = Diacylglycerol, PKC = Protein Kinase C, RKIP = Raf Kinase Inhibitor Protein, MEK = MAP Kinase Kinase, ERK = Extracellular regulated Kinase (entspr. auch MAPK), -p = phosphoryliert.

1.3 Methoden

Zellkultur: Humane SH-SY5Y Neuroblastomzellen wurden wie in Hellmann et al. (2009b) ausführlich beschrieben kultiviert. Die Differenzierung der Zellen wurde durch Zugabe von Retinsäure (10 μ M) eingeleitet. Eine Ethanolbehandlung erfolgte in differenzierenden Zellen bis zu 4 Wochen in Konzentrationen von 20 mM bis 100 mM.

Morphologische Auswertungen: Morphologische Effekte an der differenzierenden Zellkultur wurden phasenkontrastmikroskopisch untersucht und mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet (Hellmann et al., 2009a; Hellmann et al., 2009b; Rasband, 1997).

MAPK Aktivitätsassay: Die Aktivität der MAPK ERK wurde in 24h-serumdeprivierten Zellen nach Stimulation mit rekombinantem BDNF und/oder dem Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) mit Hilfe eines radioaktiven Assays und per Western Blotting (vgl. unten) nachgewiesen (Hellmann et al., 2009a; Hellmann et al., 2009b).

Western Blot: Die Proteinanalytik mittels Western Blot erfolgte nach üblichen Protokollen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Hellmann et al., 2009a; Hellmann et al., 2009b).

Immunzytochemie: Immunzytochemische Färbungen erfolgten nach üblichen Protokollen (Wernicke et al., 2010), die Detektion erfolgte mittels eines Epifluoreszenzmikroskops.

Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR): Zur quantitativen Bestimmung von mRNA aus der Zelle wurde nach Umschreiben der mRNA in cDNA (RT-PCR) die Quantifizierung der Zielsequenzen nach der von Pfaffl beschriebenen 2-DDC(t) Methode vorgenommen (Pfaffl, 2001). Die Normalisierung erfolgte relativ zur humanen Porphobilinogendeaminase, einem kaum regulierten „Housekeeping-Gen“ (Hellmann et al., 2009a; Hellmann et al., 2009b; Wernicke et al., 2010).

Untersuchungen des dopaminergen Systems: Die quantitative Bestimmung des intrazellulären Dopamingehalts erfolgte mittels Reversed-Phase Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) nach Trennung an einer C-18-Säule unter isokratischer Elution sowie nachfolgender elektrochemischer Detektion des Dopamins (Wernicke et al., 2010). Die Messung der dopamintransporterspezifischen Dopaminaufnahme wurde mittels tritiummarkierten Dopamins in differenzierten SH-SY5Y-Zellen bestimmt (Wernicke et al., 2010).

Transfektionsstudien zur RKIP-Überexpression und -Downregulation: Um die Expression von RKIP in SH-SY5Y Zellen zu manipulieren wurden Transfektionen nach etablierten molekularbiologischen Verfahren durchgeführt (Hellmann et al., 2009a). Hierbei wurde das Vektorsystem pcDNA 3.1(+) mit Cytomegalievirus-Promotor zur Überexpression des humanen RKIP (RKIP⁺) und eine spezifische short hairpin RNA (shRNA) zur Unterdrückung

der RKIP-Expression (RKIP⁻) per RNA-Interferenz eingesetzt (Hannon und Rossi, 2004; Hellmann et al., 2009a; Meister und Tuschl, 2004; Mello und Conte, 2004). Es erfolgten Kontrollen für unerwünschte Transfektionseffekte durch den Einsatz von Vektoren ohne Insert sowie eines speziellen shRNA-Kontrollvektors mit unspezifischer shRNA-Sequenz. Die resultierenden Zelllinien wurden hinsichtlich der RKIP-Expression analysiert und in weiteren Experimenten bis zu 4 Wochen differenziert.

cAMP Bestimmung: Die Quantifizierung des basalen intrazellulären cAMP-Gehalts und des cAMP-Gehalts nach 15-minütiger Stimulation mit Forskolin erfolgte an Zellextrakten von RKIP-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen und entsprechenden Kontrollen mittels eines spezifischen, nicht-radioaktiven Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Hellmann et al., 2009a).

Statistische Analysen: Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism, Software Version 2.01 für Windows durchgeführt. Unterschiede bei Zeitreihenversuchen zwischen verschiedenen Behandlungen wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA berechnet. Gruppenunterschiede zu einheitlichen Zeitpunkten wurden mit Hilfe eines ungepaarten, zweiseitigen t-Tests bestimmt. Fehlerbalken wurden stets als einfache Standardabweichung dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ gewählt (Hellmann et al., 2009a; Hellmann et al., 2009b).

1.4 Ergebnisse

1.4.1 Neuronale Differenzierung und chronische Ethanolexposition

1.4.1.1 Auswirkungen chronischer Ethanolexposition auf die Zellmorphologie

Im Verlauf der neuronalen Differenzierung bis zu 4 Wochen kam es in Kontrollzellen zur Ausbildung ganglionartiger Cluster, welche mit langen ($>1000\mu\text{m}$), parallel angeordneten neuritischen Faszikeln untereinander verbunden waren, während undifferenzierte Zellen kaum Zellfortsätze von mehr als $30\mu\text{m}$ aufwiesen. Unter Ethanolexposition (100 mM) konnte im Gegensatz zur Kontrollbedingung bereits frühzeitig eine höhere Zelldichte beobachtet werden. Nach 4 Wochen kontinuierlicher Ethanolexposition fanden sich zudem eine signifikant reduzierte Anzahl ganglionartiger Cluster sowie deutlich weniger parallele, neuritische Faszikel (Hellmann et al., 2009b; Wernicke et al., 2010).

1.4.1.2 Untersuchungen dopaminerger Charakteristika sowie der Expression neuronaler Marker unter Differenzierung und chronischer Ethanolexposition

Die Untersuchung von Veränderungen dopaminerger Charakteristika ergab bezüglich der differenzierungsabhängigen Expression des in zwei Splicevarianten als prä- (kurze Variante) und postsynaptischer (lange Variante) Rezeptor vorliegenden D2-Rezeptors (DRD2) mit zunehmender Differenzierung eine Zunahme insbesondere der Splicevariante des präsynaptischen Autorezeptors (Wernicke et al., 2010). Diese charakteristische, differenzierungsassoziierte Änderung des DRD2 zeigte sich durch chronischen Ethanoleinfluss reduziert. Nach 3-tägigem Ethanolentzug fand sich ein Trend zur Normalisierung der kurzen Variante gegenüber den Kontrollbedingungen und eine Zunahme der langen, postsynaptischen Variante. Die Expression des Dopamintransporters (DAT) und korrespondierend die Transportkapazität nahmen, ohne signifikante Beeinflussung durch Ethanolexposition mit zunehmender Differenzierung gegenüber Kontrollbedingungen ab. Bezüglich des intrazellulären Dopamingehalts fand sich im Verlauf der neuronalen Differenzierung eine Zunahme, welche unter Ethanolbehandlung im Vergleich zur Kontrollbedingung einen Trend zur Reduktion zeigte und 24 h nach Beendigung der chronischen Ethanolexposition eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrollbedingung aufwies (Wernicke et al., 2010). Darüber hinaus ergab sich auf Ebene der mit neuronaler Differenzierung assoziierten Markerproteine Synaptophysin und Neurofilament eine signifikante Reduktion unter chronischer Ethanolexposition (Hellmann et al., 2009b).

1.4.1.3 Signaltransduktion der MAPK-Kaskade unter chronischer Ethanolexposition

Hier zeigte sich, nach initial transienter Aktivierung, eine unter chronischer Ethanolexposition signifikant reduzierte Stimulierbarkeit der MAPK ERK durch BDNF (25 ng/ml); gleichzeitig bestand eine durch Ethanolexposition dosisabhängig signifikant reduzierte Aktivierbarkeit von ERK nach Stimulation mit dem Phorbolester PMA (100 nM, 60 min.) (Hellmann et al., 2009b).

1.4.1.4 Expression von Trk-B, Raf-1, MEK, ERK, RKIP und PKC unter chronischer Ethanolexposition

Der Einfluss chronischer Ethanolexposition unter Differenzierungsbedingungen wurde auf die Expression des MAPK-Modulators RKIP, verschiedener Isoformen der PKC sowie weiterer, in der Kette der MAPK-Signaltransduktionskaskade relevanter Proteine (Trk-B, Raf-1, MEK, ERK) untersucht (Hellmann et al, 2009b). Hier ergab sich unter Kontrollbedingungen eine differenzierungsabhängige Zunahme der mRNA-Expression der Proteine Trk-B, MEK und

RKIP bei Reduktion von Raf-1. ERK und PKC hingegen wiesen unter Differenzierung eine unveränderte Expression auf. Chronische Ethanolexposition führte sowohl für das unter Kontrollbedingungen in der Expression zunehmende RKIP als auch für die unter Kontrollbedingungen gleichbleibend exprimierte PKC, hier besonders bei der Neuron-spezifischen Gamma-Isoform der PKC (PKC- γ), jeweils dosisabhängig zu einer signifikanten Reduktion der Expression. Für die PKC ergab sich hierbei initial eine transiente, nicht signifikant erhöhte Expression. Für die weiteren untersuchten Proteine hingegen zeigte sich durch chronische Ethanolexposition keine Beeinflussung der Expression (Hellmann et al., 2009b).

1.4.2 Die Rolle des RKIP in der neuronalen Differenzierung

1.4.2.1 Morphologische Effekte von RKIP-Überexpression und RKIP-Downregulation

Bereits vor Induktion der Differenzierung mit Retinsäure zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle bei Zellen mit gesteigerter RKIP-Expression (RKIP⁺) eine signifikant höhere Frequenz langer neuritischer Fortsätze. Bei Zellen mit reduzierter RKIP-Expression (RKIP⁻) hingegen fand sich eine signifikant niedrigere Frequenz neuritischer Fortsätze bei deutlich flacheren Zellkörpern und kürzeren Fortsätzen (Hellmann et al., 2009a). Diese Unterschiede setzten sich unter Retinsäureinduzierter Differenzierung für RKIP⁺- sowie RKIP⁻-Zellen noch fort. Auch die in Kontrollzellen gegen Ende der Differenzierungsperiode zu beobachtende Tendenz zur Ausbildung ganglionartiger Cluster erwies sich für RKIP⁺-Zellen deutlich gesteigert, für RKIP⁻-Zellen hingegen reduziert (Hellmann et al., 2009a).

1.4.2.2 Expression neuronaler und glialer Markerproteine unter RKIP-Überexpression und RKIP-Downregulation

Um den Differenzierungsstatus von RKIP⁺- und RKIP⁻-Zellen gegenüber Kontrollzellen auch biochemisch zu bestimmen, erfolgte der Nachweis neuronaler und glialer Markerproteine mittels Western Blot. Als Ausdruck neuronaler Differenzierung zeigte sich in Kontrollzellen während der Differenzierungsperiode eine Zunahme der neuronalen Markerproteine SNAP-25 und Neurofilament (Hellmann et al., 2009a). Während sich für RKIP⁺-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine signifikante Zunahme der Expression von SNAP-25 und Neurofilament fand, ergab sich für RKIP⁻-Zellen eine signifikant erniedrigte Expression von Neurofilament bei unveränderter SNAP-25-Expression. Gleichzeitig wiesen RKIP⁻-Zellen eine im Vergleich zu Kontrollen signifikant gesteigerte Expression des glialen Markerproteins GFAP (Gliales-Fibrilläres-Saures Protein) auf (Hellmann et al., 2009a).

1.4.2.3 Einfluss der RKIP-Überexpression und RKIP-Downregulation auf die differenzierungsassoziierte Signaltransduktion

Aus den bisherigen Befunden stellten wir die Hypothese auf, dass die RKIP-Expression die neuronale Differenzierung durch Modulierung der ERK-Signalkaskade beeinflusst. Um diese Hypothese zu prüfen, erfolgte zunächst eine Stimulation der PKC durch den Phorbolester PMA (100 nM, 30 min) mit nachfolgender Bestimmung des aktivierten ERK (Hellmann et al., 2009a; Hellmann et al., 2009b). Hier zeigte sich in RKIP⁺-Zellen eine signifikant gesteigerte Responsivität von ERK im Sinne einer Zunahme des aktivierten ERK im Anschluss an eine Stimulation der PKC, während RKIP⁻-Zellen einen Trend zu reduzierter Stimulierbarkeit gegenüber der Kontrollzelllinie zeigten. Da intuitiv eine erhöhte RKIP-Expression eine Hemmung der ERK-Signalkaskade und in Folge eine verminderte Differenzierung bewirken müsste, stellten wir eine weitere Hypothese auf. Danach wirkt RKIP nach Phosphorylierung durch die PKC und über Hemmung der GRK-2 auch durch Interaktion mit der cAMP-induzierten Signalkaskade. Deshalb wurden die basalen intrazellulären cAMP-Spiegel sowie cAMP-Spiegel nach Stimulation mit Forskolin in RKIP⁺- und Kontrollzellen bestimmt. Hier wiesen RKIP⁺-Zellen neben einem bereits basal deutlich erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel auch eine etwa 200-fach höhere cAMP-Konzentration nach Stimulation mit Forskolin auf (Hellmann et al., 2009a).

1.5 Diskussion

Anhand eines zur Untersuchung der neuronalen Differenzierung optimierten, humanen, neuronalen Zellkulturmodells konnten in den vorgelegten Studien Mechanismen der zellulären Toleranzentwicklung unter chronischer Ethanoexposition und Mechanismen der daraus resultierenden Differenzierungsschäden aufgezeigt werden. Darüber hinaus konnte erstmals eine eigene Rolle des RKIP in der neuronalen Differenzierung belegt und die Interaktion mit mehreren Signalkaskaden gezeigt werden.

1.5.1 Neuronale Differenzierung und chronische Ethanoexposition

Zunächst konnte quantitativ und qualitativ ein Einfluss chronischer Ethanoexposition auf die neuronale Entwicklung des gewählten Zellmodells belegt werden. So zeigte sich unter chronischer Ethanoexposition neben einer auf morphologischer Ebene reduzierten neuronalen Differenzierung eine signifikante, zeit- und dosisabhängige Reduktion des RKIP und der PKC sowie eine reduzierte Expression neuronaler Markerproteine (Hellmann et al., 2009b). Ferner

fanden sich nach chronischer Ethanolexposition signifikante Veränderungen im Bereich differenzierungstypischer Verteilungsmuster dopaminerger Markerproteine sowie Veränderungen des intrazellulären Dopamingehalts exponierter Zellen (Wernicke et al., 2010). Die Ergebnisse zu den morphologischen und biochemischen Veränderungen neuronaler Charakteristika verdeutlichen das Potenzial des gewählten Zellmodells, den Einfluss der chronischen Noxe Ethanol auf die neuronale Entwicklung in-vitro nachzustellen. Während die meisten bisherigen Studien bevorzugt über akute Effekte von Ethanol berichteten und zudem häufig undifferenzierte und damit nicht-neuronale Neuroblastomzellen zum Einsatz kamen, konnten in den eigenen Studien mit Hilfe des gewählten Zellmodells erstmals die Effekte einer chronischen, über einen Zeitraum von bis zu 28 Tagen aufrecht erhaltenen Ethanolexposition auf die neuronale Differenzierung untersucht werden (Hellmann et al., 2009a, Hellmann et al., 2009b, Wernicke et al., 2010).

Auf morphologischer Ebene zeigte sich unter chronischer Ethanolexposition eine deutliche Hemmung differenzierungstypischer Charakteristika wie die Ausbildung neuritischer Fortsätze mit Aggregation zu ganglionartigen Clustern bei gleichzeitig erhöhter Zelldichte (Hellmann et al., 2009b). Dies kann als Beleg für einen Einfluss chronischer Ethanolexposition auf den Prozess der neuronalen Differenzierung im etablierten Zellmodell gewertet werden und demonstriert die Eignung dieses Zellmodells zur Untersuchung chronischer Ethanoleffekte.

Vor dem Hintergrund einer Beteiligung des dopaminergen Systems bei Alkoholabhängigkeit wurden im Weiteren dopaminerge Eigenschaften der sich entwickelnden Zellen untersucht (Wernicke et al., 2010). Das mesolimbische dopaminerge System wird mit den verstärkenden und motivierenden Effekten von Alkoholkonsum, und so mit einer Suchtentstehung, in Zusammenhang gebracht (Heinz et al., 2004; Repo et al., 1999; Wernicke et al., 2010). So konnte im Speziellen in bildgebenden Studien am Menschen eine verminderte Expression des D2-Dopaminrezeptors (DRD2) unter chronischem Alkoholkonsum demonstriert werden (Heinz et al., 2004). In den eigenen Untersuchungen fand sich unter chronischer Ethanolexposition in-vitro neben einem signifikant reduzierten intrazellulären Dopamingehalt ein gestörtes differenzierungstypisches mRNA-Expressionsprofil des prä- und postsynaptischen DRD2 (Wernicke et al., 2010). Diese als mögliche Adaptationsvorgänge zu wertenden Veränderungen, welche sich nach Ethanolentzug bezüglich des präsynaptischen DRD2 reversibel zeigten, beim postsynaptischen DRD2 aber zu gesteigerter Expression führten, geben einerseits Hinweise auf eine möglicherweise direkte Beteiligung von Komponenten des dopaminergen Systems in der Toleranzentwicklung. Andererseits könnten sie auch als Folge einer durch

Ethanolexposition gestörten neuronalen Differenzierung im Allgemeinen gewertet werden. Bezüglich eines spezifischen Effekts chronischer Ethanolexposition auf den Prozess der neuronalen Differenzierung und die daran beteiligte Signaltransduktion konnte eine ethanolbedingt reduzierte Aktivierbarkeit zweier für neuronale Differenzierung relevante Signaltransduktionsmechanismen identifiziert werden (Hellmann et al., 2009b). Neben einer signifikant reduzierten MAPK-Aktivierbarkeit durch BDNF ergab sich insbesondere für den PKC-vermittelten Weg der Aktivierung der MAPK-Kaskade (Abb. 1) eine signifikante Hemmung durch chronische Ethanolexposition. Diese Ergebnisse legen eine Ursache des Ethanolvermittelten Differenzierungsschadens im Bereich veränderter Signaltransduktion nahe, sodass im weiteren Verlauf die Ethanoleffekte auf die daran maßgeblich beteiligten Proteine untersucht wurden (Hellmann et al., 2009b).

Hier konnte sowohl für RKIP als auch die PKC eine signifikante Reduktion der Expression unter chronischer Ethanolbehandlung aufgezeigt werden. Beide Proteine spielen in den betroffenen Signaltransduktionsmechanismen eine entscheidende, modulierende Rolle: RKIP reduziert einerseits den Signaldurchsatz der MAPK-Kaskade durch Hemmung von Raf-1 in der nicht stimulierten Zelle (Abb. 1) und kann auf diese Weise möglicherweise das Signal-Rauschen-Verhältnis der Zelle verbessern. Kommt es jedoch zur Stimulation der Zelle durch Neurotrophine (bspw. BDNF), erfolgt neben einer Aktivierung der MAPK-Kaskade über Raf-1 parallel auch eine Aktivierung der PKC über DAG (Abb.1). Nachfolgend kommt es zur PKC-vermittelten Phosphorylierung des RKIP und einer Translokation des RKIP zur G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase-2 (GRK-2). Diese Translokation hat einerseits den Wegfall einer Hemmung der MAPK-Kaskade, andererseits die indirekte Aktivierung GPCR-assoziiierter Signaltransduktion über eine Hemmung der GRK-2 zur Folge (Corbit et al., 2003; Hellmann et al., 2009b; Keller et al., 2004a; Lorenz et al., 2003). Somit ergibt sich für RKIP in der Zusammenschau der beschriebenen Interaktionen, trotz einer im nicht phosphorylierten Zustand hemmenden Rolle in der MAPK-Kaskade, eine Förderung der neurotrophinvermittelten Signaltransduktion, während die PKC den entscheidenden, für Aktivierung maßgeblichen Schritt darstellt (Abb.1; Hellmann et al., 2009b). Passend zu reduzierter neuronaler Differenzierung und reduzierter Signaltransduktion konnte also unter chronischer Ethanolexposition eine Reduktion sowohl des RKIP als auch der PKC aufgezeigt werden. Ferner konnte eine in vielen Studien nach akuter Ethanolbehandlung berichtete „Aktivierung“ der PKC durch akute Ethanolexposition im Sinne einer transient gesteigerten Aktivierbarkeit der MAPK Kaskade durch BDNF sowie einer transient gesteigerten PKC-Expression reproduziert werden (Hellmann et al., 2009b; Messing et al., 1991; Roivainen et al., 1995). Jede

Fortsetzung der Ethanolbehandlung für mehr als eine Woche resultierte jedoch in reduzierter PKC-Expression (Hellmann et al., 2009b), womit ein zentraler, die Neurotrophin-Responsivität der sich entwickelnden neuronalen Zelle herabsetzender Adaptationsprozess dargestellt werden konnte (Hellmann et al., 2009b).

Um für eine reduzierte Signaltransduktion der Neurotrophine auf Grund möglicherweise veränderter Expression des BDNF-Rezeptors selbst oder anderer, beteiligter Proteinkinasen zu kontrollieren (Abb.1), erfolgte parallel die systematische Untersuchung der Expression von Trk-B, Raf-1, MEK und ERK (Hellmann et al., 2009b). Hier zeigte sich unter chronischer Ethanolexposition keine systematische Beeinflussung der Expression (Hellmann et al., 2009b). Hinsichtlich der unter chronischer Ethanolexposition zu beobachtenden fetalen Entwicklungsdefekte insbesondere des Nervensystems (Alkoholembyopathie) können die hier beobachteten synergistischen Effekte einer reduzierten RKIP- und PKC-Expression als Anhalt für mögliche molekulare Mechanismen in der Entstehung der Defekte gelten.

1.5.2 Rolle des RKIP in der neuronalen Differenzierung

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse ergab sich die Frage nach RKIP-spezifischen Effekten auf den Prozess der neuronalen Differenzierung unabhängig vom Einfluss chronischer Ethanolexposition. Gemäß der Hypothese, dass RKIP neben einer Beteiligung an ethanolvermitteltem Differenzierungsschaden selbst eine wichtige Rolle im Prozess der neuronalen Differenzierung spielt, sollte eine Zunahme der RKIP-Expression mit gesteigerter, ein Mangel an RKIP hingegen mit reduzierter neuronaler Differenzierung assoziiert sein (Hellmann et al., 2009a). Um nun einen direkten, möglicherweise protektiven Effekt von RKIP auf die neuronale Homöostase zu demonstrieren, führten wir die experimentelle Überexpression (RKIP⁺) und Reduktion (RKIP⁻; Downregulation) des Proteins im Modell der differenzierenden SH-SY5Y-Zellen durch (Hellmann et al., 2009a). Hier kam es unter RKIP-Überexpression im Verlauf der Differenzierung rasch zu einer Zunahme der Expression neuronaler Marker, während RKIP⁻-Zellen bei gleichbleibend bis reduzierter Expression neuronaler Marker eine Zunahme des glialen Markerproteins GFAP aufwiesen. Diese Effekte zeigten, dass eine Überexpression von RKIP zu einer verbesserten, eine Suppression von RKIP hingegen zu reduzierter neuronaler Differenzierung, möglicherweise aber gesteigerter glialer Differenzierung führt. Diese Erkenntnis konnte durch die auf morphologischer Ebene beobachteten Veränderungen bestätigt werden. Während RKIP⁻-Zellen bereits initial durch flachere Zellkörper und kürzere neuritische Fortsätze auffielen und sich im Verlauf morphologisch nur wenig veränderten, zeigte sich unter RKIP-Überexpression eine deutlich dynamischere, über den Zeitraum der

Differenzierung stetig zunehmende Ausbildung langer, paralleler neuritischer Fortsätze, nahezu ausschließlich als Verbindung zwischen großen, ganglionartigen Clustern. Derartige morphologische Veränderungen wurden für RKIP⁻-Zellen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte beobachtet und zeigten sich auch in den Kontrollzellen nicht (Hellmann et al., 2009a).

Zur weiteren Evaluation der via alterierter RKIP-Expression beeinflussten Differenzierung erfolgte die Untersuchung der möglicherweise ursächlich damit in Verbindung stehenden Signaltransduktionsprozesse in differenzierter Untersuchung der bereits unter Ethanolexposition veränderten Aktivierbarkeit der MAPK-Kaskade nach Aktivierung der PKC (Hellmann et al. 2009a, b). Hier konnte ein klarer Zusammenhang zwischen der RKIP-Expression und dem Ausmaß der Aktivierbarkeit der Kaskade aufgezeigt werden (Hellmann et al. 2009a). Es ist also davon auszugehen, dass sich RKIP gemäß der Hypothese über eine Modulation der Aktivierbarkeit der für Differenzierungsprozesse essentiellen MAPK-Signalkaskade auf die neuronale Differenzierung auswirkt. Die Ergebnisse zu einerseits gesteigerter neuronaler Differenzierung bei hoher RKIP-Konzentration und andererseits reduzierter neuronaler und möglicherweise gesteigerter glialer Differenzierung bei reduzierter RKIP-Konzentration weisen zudem auf eine mögliche Rolle des RKIP als das Schicksal einer undifferenzierten Vorläuferzelle bestimmendes Steuerungsmolekül in der neuronalen vs. glialen Differenzierung hin.

Neben den Interaktionen des RKIP mit der PKC und der MAPK-Kaskade zeigt sich noch die bereits beschriebene Interaktion von RKIP mit der GRK-2 als weitere, möglicherweise mit neuronaler Differenzierung zusammenhängende Verbindung: Nach GPCR-vermittelter Aktivierung der Adenylatcyclase kommt es zur Generierung des second messengers cAMP (Abb.1), welcher über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors cAMP-response element-binding protein (CREB) zur neuronalen Differenzierung führt. Auch im Modell differenzierender neuronaler Zellen ist ein Zusammenhang zwischen gesteigerter cAMP-Produktion, CREB-Aktivierung und neuronaler Differenzierung beschrieben worden (Ravni et al., 2008). Ferner wird eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors als Marker eines therapeutischen Effekts einiger Antidepressiva diskutiert (Dowlatshahi et al., 1998). Auf Grund der bekannten Interaktion des RKIP mit GPCR-assoziiertes Signaltransduktion führten wir zusätzlich Messungen des intrazellulären cAMP in RKIP⁺-Zellen und Kontrollzellen durch. Hier zeigte sich erwartungsgemäß ein signifikanter Anstieg des basalen intrazellulären cAMP in RKIP⁺-Zellen (Hellmann et al. 2009a). Nach Stimulation mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase, kam es sogar zu einer unerwartet hohen Potenzierung dieses Effekts. Insbesondere die basal erhöhten cAMP-Spiegel können als weiterer differenzierungsfördernder Effekt auf Ebene einer möglicherweise RKIP-bedingt gesteigerten

Aktivität aktivierender GPCR und damit der Adenylatcyclase interpretiert werden. Der Mechanismus Forskolin-induziert gesteigerter Adenylatcyclase-Stimulierbarkeit bedarf dabei noch weiterer Abklärung.

Ursprünglich aus dem Rinderhirn als 21-kDa großes, phospholipidbindendes Protein isoliert, wird für das hochkonservierte RKIP bereits seit längerem eine Rolle in der zellulären Signaltransduktion diskutiert (z.B. Fu et al., 2003; Keller et al., 2004b). An Signaltransduktions- und Differenzierungsprozessen mammalischer Zellen konnte eine maßgebliche Beteiligung des RKIP, bspw. in Form einer Hemmung von Metastasierungseigenschaften maligne entarteter Zellen, nachgewiesen werden (Fu et al., 2003; Keller et al., 2004b). Auch in den Neurowissenschaften zeigten sich interessante Zusammenhänge zwischen neuronaler Homöostase und RKIP: so bindet RKIP nicht nur an polare, negativ geladene Membranen, was eine besondere Rolle für depolarisierende Zellen darstellen könnte, es stellt auch das Vorläuferprotein des Hippocampalen Cholinergen Neurostimulatorischen Peptids (HCNP) dar, welches im Prozess neuronaler Degeneration insbesondere cholinerge Strukturen bei der Alzheimer-schen Erkrankung eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Angelone et al., 2006; George et al., 2006). HCNP wird durch proteolytische Spaltung von bislang unbekanntem cerebralen Proteasen aus RKIP freigesetzt und führt zu gesteigerter Expression der Cholin-Acetyltransferase, einem Schlüsselenzym in der Synthese des Acetylcholins. Darüber hinaus konnte bei Patienten mit Morbus Alzheimer post mortem eine reduzierte cerebrale RKIP-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Maki et al., 2002). Interessanterweise findet sich das HCNP auch in krankheitstypischen Einschlusskörperchen (Hirano-Bodies) in erhöhter Konzentration (Mitake et al., 1997). Zudem zeigten systematische Untersuchungen zur Nitrierbarkeit humaner neuronaler Proteine von Patienten mit Alzheimer-Demenz, dass RKIP als eines von nur wenigen Proteinen in relevantem Ausmaß nitrierbar und damit in seiner Funktion möglicherweise grundlegend zu beeinflussen ist (Reed et al., 2009). Dies stützt die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen oxidativem Stress mit spezifischer Auswirkung (Nitrierung) und nachfolgender Neurodegeneration.

1.5.3 Schlussfolgerungen

Zusammengefasst konnte nach Etablierung eines Modells zur Langzeitdifferenzierung humaner neuronaler Zellen ein differenzierungshemmender Effekt chronischer Ethanolexposition demonstriert werden, dessen Ursache in einer gestörten Signaltransduktion identifiziert werden konnte. Ferner wurde ein Mechanismus zellulärer Toleranzentwicklung als mögliche Ursache längerfristig gestörter Signaltransduktion und damit gestörter zellulärer Homöostase

erkannt, dessen ursächliche Beziehung zu gestörter neuronaler Differenzierung mit Hilfe von Transfektionsexperimenten erfasst werden konnte. Schließlich fand sich sogar eine supportive Rolle des RKIP im Prozess der neuronalen Differenzierung für das verwendete Zellmodell, womit die Hypothese einer bei neurodegenerativen Erkrankungen möglicherweise gestörten RKIP-Funktion weiter gestärkt werden konnte.

1.6 Literaturverzeichnis

- Angelone, T., et al., 2006. The emerging cardio-inhibitory role of the Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP). *J Pharmacol Exp Ther.*
- Aroor, A. R., Shukla, S. D., 2004. MAP kinase signaling in diverse effects of ethanol. *Life Sci.* 74, 2339-64.
- Chandler, L. J., Sutton, G., 2005. Acute ethanol inhibits extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate response element binding protein activity in an age- and brain region-specific manner. *Alcohol Clin Exp Res.* 29, 672-82.
- Corbit, K. C., et al., 2003. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem.* 278, 13061-8.
- Crews, F. T., et al., 2006. Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience.* 137, 437-45.
- Davis, M. I., et al., 1999. In vivo activation and in situ BDNF-stimulated nuclear translocation of mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase is inhibited by ethanol in the developing rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 272, 95-8.
- Dowlatshahi D., et al., 1998. Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet.* 352, 1754-1755.
- Fu, Z., et al., 2003. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 95, 878-89.
- George, A. J., et al., 2006. Decreased phosphatidylethanolamine binding protein expression correlates with Abeta accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 27, 614-23.
- Hannon, G. J., Rossi, J. J., 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature.* 431, 371-8.
- Heinz, A., et al., 2004. Correlation between dopamine D(2) receptors in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving. *Am J Psychiatry.* 161, 1783-9.

- Hellmann, J., et al., 2009a. Raf kinase inhibitor protein enhances neuronal differentiation in human SH-SY5Y cells. *Dev Neurosci.* 32, 33-46.
- Hellmann, J., et al., 2009b. Long-term ethanol exposure impairs neuronal differentiation of human neuroblastoma cells involving neurotrophin-mediated intracellular signaling and in particular protein kinase C. *Alcohol Clin Exp Res.* 33, 538-50.
- Keller, E. T., et al., 2004a. The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol.* 68, 1049-53.
- Keller, E. T., et al., 2004b. Raf kinase inhibitor protein: a prostate cancer metastasis suppressor gene. *Cancer Lett.* 207, 131-7.
- Lorenz, K., et al., 2003. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature.* 426, 574-9.
- Maki, M., et al., 2002. Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61, 176-85.
- McIntyre, T. A., et al., 1999. Ethanol-induced decrease of developmental PKC isoform expression in the embryonic chick brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 117, 191-7.
- Meister, G., Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 431, 343-9.
- Mello, C. C., Conte, D., Jr., 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature.* 431, 338-42.
- Messing, R. O., et al., 1991. Chronic ethanol exposure increases levels of protein kinase C delta and epsilon and protein kinase C-mediated phosphorylation in cultured neural cells. *J Biol Chem.* 266, 23428-32.
- Mitake, S., et al., 1997. Hirano bodies and Alzheimer's disease. *Kaohsiung J Med Sci.* 13, 10-8.
- Nixon, K., Crews, F. T., 2002. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem.* 83, 1087-93.
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Rasband, W. S., 1997. ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Ravni A., et al., 2008. A cAMP-dependent, protein kinase A-independent signaling pathway mediating neuritogenesis through Egr1 in PC12 cells. *Mol Pharmacol* 73, 1688-1708.
- Reed, T. T., et al., 2009. Proteomic identification of nitrated brain proteins in early

- Alzheimer's disease inferior parietal lobule. *J Cell Mol Med.* 13, 2019-29.
- Repo, E., et al., 1999. Dopamine transporter and D2-receptor density in late-onset alcoholism. *Psychopharmacology (Berl).* 147, 314-8.
- Roivainen, R., et al., 1995. Ethanol enhances growth factor activation of mitogen-activated protein kinases by a protein kinase C-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 1891-5.
- Trakul, N., Rosner, M. R., 2005. Modulation of the MAP kinase signaling cascade by Raf kinase inhibitory protein. *Cell Res.* 15, 19-23.
- Wernicke, C., et al., Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells. *Pharmacol Rep* 62, 649-663 (2010).
- Yeung, K., et al., 1999. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature.* 401, 173-7.

2. Anteilserklärung

Julian Hellmann-Regen hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Hellmann, J., Rommelspacher, H. & Wernicke, C. Long-term ethanol exposure impairs neuronal differentiation of human neuroblastoma cells involving neurotrophin-mediated intracellular signaling and in particular protein kinase C. *Alcohol Clin Exp Res* 33, 538-50 (2009). 50 Prozent.

Beitrag im Einzelnen: Entwicklung der zentralen Hypothese der RKIP- / PKC-abhängig gestörten Signaltransduktion durch chronische Ethanolexposition sowie selbstständige Planung des experimentellen Aufbaus einschließlich methodischer Etablierung der morphologischen Studien, des radioaktiven MAP Kinase-Assays und Immunoblottings, Durchführung der Experimente sowie Verfassen des Manuskripts.

Publikation 2: Wernicke, C., Hellmann, J., Finckh, U. & Rommelspacher, H. Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells. *Pharmacol Rep* 62, 649-663 (2010). 10 Prozent.

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung bei Planung und Durchführung der Studien zur Proteinexpression im dopaminergen System sowie der HPLC-Experimente zum Nachweis intrazellulärer Katecholamine. Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts.

Publikation 3: Hellmann, J., Rommelspacher, H., Muhlbauer, E. & Wernicke, C. Raf kinase inhibitor protein enhances neuronal differentiation in human SH-SY5Y cells. *Dev Neurosci* 32, 33-46 (2009). 80 Prozent.

Beitrag im Einzelnen: Entwicklung der zentralen Hypothese einer RKIP-abhängig verbesserten Signaltransduktion und neuronalen Differenzierung. Konzeption des experimentellen Aufbaus einschließlich Planung der molekularbiologischen Experimente zur Überexpression und Downregulation. Methodische Etablierung der morphologischen Studien, der MAPK- / PKC-spezifischen Stimulationsexperimente und des Immunoblottings, Durchführung sämtlicher Experimente sowie Verfassen des Manuskripts.

Berlin, den

Prof. Dr. med. Hans Rommelspacher

Julian Hellmann-Regen

3. Originalarbeiten

1. Hellmann, J., Rommelspacher, H. & Wernicke, C. Long-term ethanol exposure impairs neuronal differentiation of human neuroblastoma cells involving neurotrophin-mediated intracellular signaling and in particular protein kinase C. *Alcohol Clin Exp Res* 33, 538-50 (2009).

Abstract:

BACKGROUND: Revealing the molecular changes in chronic ethanol-impaired neuronal differentiation may be of great importance for understanding ethanol-related pathology in embryonic development but also in the adult brain. In this study, both acute and long-term effects of ethanol on neuronal differentiation of human neuroblastoma cells were investigated. We focused on several aspects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling because BDNF activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade, promoting neuronal differentiation including neurite outgrowth.

METHODS: The effects of ethanol exposure on morphological differentiation, cellular density, neuronal marker proteins, basal ERK activity, and ERK responsiveness to BDNF were measured over 2 to 4 weeks. qRT-PCR and Western blotting were performed to investigate the expression of neurotrophin receptor tyrosin kinase B (TrkB), members of the ERK-cascade, protein kinase C (PKC) isoforms and Raf-Kinase-Inhibitor-Protein (RKIP).

RESULTS: Chronic ethanol interfered with the development of a neuronal network consisting of cell clusters and neuritic bundles. Furthermore, neuronal and synaptic markers were reduced, indicating impaired neuronal differentiation. BDNF-mediated activation of the ERK cascade was found to be continuously impaired by ethanol. This could not be explained by expressional changes monitored for TrkB, Raf-1, MEK, and ERK. However, BDNF also activates PKC signaling which involves RKIP, which finally leads to ERK activation as well. Therefore, we hypothesized that ethanol impairs this branch of BDNF signaling. Indeed, both PKC and RKIP were significantly down-regulated.

CONCLUSIONS: Chronic ethanol exposure impaired neuronal differentiation of neuroblastoma cells and BDNF signaling, particularly the PKC-dependent branch. RKIP, acting as a signaling switch at the merge of the PKC cascade and the Raf/MEK/ERK cascade, was associated with neuronal differentiation and significantly reduced in ethanol treatment. Moreover, PKC expression itself was even more strongly reduced. In contrast, members of the Raf-1/MEK/ERK cascade were less affected and the observed changes were not associated with impaired differentiation. Thus, reduced RKIP and PKC levels and subsequently reduced positive feedback on ERK activation provide an explanation for the striking effects of long-term ethanol exposure on BDNF signal transduction and neuronal differentiation, respectively.

2. Wernicke, C., Hellmann, J., Finckh, U. & Rommelspacher, H. Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells. *Pharmacol Rep* 62, 649-663 (2010).

Abstract:

There is evidence for ethanol-induced impairment of the dopaminergic system in the brain during development. The dopamine D2 receptor (DRD2) and the dopamine transporter (DAT) are decisively involved in dopaminergic signaling. Two splice variants of DRD2 are known, with the short one (DRD2s) representing the autoreceptor and the long one (DRD2l) the postsynaptic receptor. We searched for a model to investigate the impact of chronic ethanol exposure and withdrawal on the expression of these proteins during neuronal differentiation. RA-induced differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells seems to represent such a model. Our real-time RT-PCR, Western blot, and immunocytochemistry analyses of undifferentiated and RA-differentiated cells have demonstrated the enhanced expression of both splice variants of DRD2, with the short one being stronger enhanced than the long one under RA-treatment, and the DRD2 distribution on cell bodies and neurites under both conditions. In contrast, DAT was down-regulated by RA. The DAT is functional both in undifferentiated and RA-differentiated cells as demonstrated by [(3)H]dopamine uptake. Chronic ethanol exposure during differentiation for up to 4 weeks resulted in a delayed up-regulation of DRD2s. Ethanol withdrawal caused an increased expression of DRD2l and a normalization of DRD2s. Thus the DRD2s/DRD2l ratio was still disturbed. The dopamine level was increased by RA-differentiation compared to controls and was diminished under RA/ethanol treatment and ethanol withdrawal compared to RA-only treated cells. In conclusion, chronic ethanol exposure impairs differentiation-dependent adaptation of dopaminergic proteins, specifically of DRD2s. RA-differentiating SH-SY5Y cells are suited to study the impact of chronic ethanol exposure and withdrawal on expression of dopaminergic proteins during neuronal differentiation.

- Hellmann, J., Rommelspacher, H., Muhlbauer, E. & Wernicke, C. Raf kinase inhibitor protein enhances neuronal differentiation in human SH-SY5Y cells. *Dev Neurosci* 32, 33-46 (2009).

Abstract:

Neuronal differentiation has evolved as an essential process even in the adult brain, once disturbed being associated with the pathogenesis of several psychiatric disorders. To study the effects of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) on neuronal differentiation, we generated neuroblastoma cell lines overexpressing RKIP (RKIP(+)) and expressing RKIP-directed short hairpin RNA for downregulation of RKIP (RKIP(-)). During a 4-week time course of continuous differentiation by retinoic acid (RA), expression of neuronal and glial markers, intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels, protein kinase C (PKC) signal transduction to extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK-1/2) and cellular morphology were investigated in relation to RKIP levels. RKIP(+) cells showed accelerated neurite outgrowth, formation of elaborated neuronal networks and increased neuronal marker expression both in RA-induced differentiation and to some extent even in non-RA-treated cells. RKIP(-) cells showed glial-like cell bodies and increased glial fibrillary acidic protein, suggesting a shift from neuronal to glial phenotype. With respect to differentiation-inducing signal pathways, PKC-mediated ERK-1/2 activation significantly correlated with RKIP levels. Furthermore, basal and forskolin-stimulated intracellular cAMP was potently increased in RKIP(+) cells versus controls. In conclusion, the conserved signal transduction modulator RKIP was shown to enhance several aspects of neuronal differentiation via enhanced crosstalk from PKC to ERK-1/2 and enhancement of G-protein-coupled receptor signaling.

4. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

5. Publikationsliste

- Hellmann, J., Heuser, I. & Kronenberg, G. Targeted prevention of posttraumatic stress disorder. *Nervenarzt* 81, 1-7 (2010).
- Hellmann, J., Rommelspacher, H., Muhlbauer, E. & Wernicke, C. Raf kinase inhibitor protein enhances neuronal differentiation in human SH-SY5Y cells. *Dev Neurosci* 32, 33-46 (2009).
- Hellmann, J., Rommelspacher, H. & Wernicke, C. Long-term ethanol exposure impairs neuronal differentiation of human neuroblastoma cells involving neurotrophin-mediated intracellular signaling and in particular protein kinase C. *Alcohol Clin Exp Res* 33, 538-50 (2009).
- Hellmann, J., Wernicke, C. & Rommelspacher, H. Chronic ethanol exposure impairs differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells involving Raf kinase inhibitor protein and protein kinase C. *ALCOHOL Abstracts* (2005).
- Heuser, I. & Hellmann, J. Anti-Aging Strategien: Warum, wofür, womit? *Current Congress*, Georg Thieme Verlag, 8 (2006).
- Rommelspacher, H., Hellmann, J. & Wernicke, C. Befunde zur Neurotoxizität von Cannabis. *Neuro Aktuell* (2008).
- Wernicke, C., Hellmann, J., Finckh, U. & Rommelspacher, H. Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells. *Pharmacol Rep* 62, 649-663 (2010).
- Wernicke C, Hellmann J, Zieba B, Kuter K, Ossowska K, Frenzel M, Dencher NA, Rommelspacher H. 9-Methyl-beta-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacol Rep* 62, 35-53 (2010).
- Wernicke, C., Hellmann, J. & Rommelspacher, H. Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splice variants expression and impairs the cellular organisation during retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cells. *Alcohol Alcohol.* 42, i49-51 (2007).

6. Selbständigkeitserklärung

Ich, Julian David Nicolai Hellmann-Regen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Raf Kinase Inhibitor Protein in der neuronalen Differenzierung und seine Rolle beim alkoholassoziierten Differenzierungsschaden im Modell humaner SH-SY5Y Neuroblastomzellen**“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

7. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Hans Rommelspacher, welcher meine Arbeit stets mit äußerst wertvollen Anregungen, hilfreichen Diskussionen und sehr viel Geduld begleitet hat. Auch möchte ich besonders Frau Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. Isabella Heuser, Direktorin der Klinik, für ihre unkomplizierten und stets hilfreichen Ratschläge sowie ihre kontinuierliche Unterstützung bei der Umsetzung sämtlicher Projekte danken, was insbesondere durch ein Stipendium im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs GK 429 möglich wurde.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung für klinische Neurobiologie danken. Hier gilt mein Dank Frau Dr. Catrin Wernicke für die inhaltliche und technisch-methodische Unterstützung bei der Planung und Durchführung der experimentellen Arbeiten, insbesondere für ihre Hilfe bei der Durchführung der molekularbiologischen Experimente. Ebenfalls danke ich Frau Regina Hill für ihre geduldige Unterstützung und ihren stets geschätzten Rat bei Zellkultur-, Transfektions- und HPLC-Experimenten.

Auch meinen Eltern möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen, welche mich bei dieser Arbeit stets unterstützt haben. Mein ganz besonderer Dank geht an meine Ehefrau, der ich von ganzem Herzen für ihre liebevolle, unermüdliche und geduldige Unterstützung danken möchte.