

---

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mechanismen, die nach NMDA-Rezeptor-Blockade  
zur disseminierten Apoptose im sich entwickelnden  
Rattengehirn führen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tim Benjamin Briem  
aus Bad Homburg v.d.H.

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. H. Ikonomidou
2. Priv.-Doz. Dr. med. A. L. Oberholzer
3. Priv.-Doz. Dr. med. P. Bittigau

**Datum der Promotion: 13.03.2008**

**Für Julia**

---

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1.1. ASPEKTE DER GEHIRNENTWICKLUNG.....	7
1.1.1. Die Phase des rapiden Hirnwachstums.....	7
1.1.2. Plastizität und Apoptose während der Entwicklung.....	8
1.1.3. Trophische Moleküle während der Entwicklung.....	9
1.1.4. Entwicklungsbedingte Unterschiede bei Mensch und Ratte.....	10
1.2. APOPTOSE.....	11
1.2.1. Allgemeines zur Apoptose.....	11
1.2.2. Morphologie der Apoptose.....	12
1.2.3. Genetische Regulation der Apoptose.....	13
1.2.3.1. Extrinsischer Signalweg.....	13
1.2.3.2. Intrinsischer Signalweg.....	14
1.3. NEUROTROPHINE.....	15
1.3.1. Neurotrophine als Wachstumsfaktoren.....	15
1.3.2. Neurotrophine und Rezeptoren.....	16
1.3.3. Neuronale Antwort auf Rezeptor-Aktivierung.....	18
1.3.4. Neurotrophine in der Entwicklung.....	21
1.4. N-METHYL-D-ASPARTAT-REZEPTOREN (NMDA).....	21
1.4.1. Glutamat als Neurotransmitter.....	21
1.4.2. Glutamat und seine Rezeptoren.....	22
1.4.3. Der NMDA-Rezeptor und seine Regulation.....	22
1.4.4. Der NMDA-Rezeptor und Signaltransduktion.....	24
1.5. MK-801 (DIZOCILPIN).....	24
1.6. ZENTRALE FRAGESTELLUNG DER ARBEIT.....	26
<b>2. MATERIAL.....</b>	<b>27</b>
2.1. GERÄTE.....	27
2.2. CHEMIKALIEN.....	27
2.3. HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN.....	29
2.4. TESTKITS.....	31
2.5. ENZYME.....	32

---

2.6. TIERE.....	32
2.7. OLIGONUKLEOTIDE.....	32
2.8. MOLEKULARGEWICHTSMARKER.....	33
2.9. AUSWERTUNGSSOFTWARE.....	33
2.10. SONSTIGE HILFS- UND VERBRAUCHSMITTEL.....	34
<b>3. METHODEN.....</b>	<b>35</b>
3.1. APPLIKATION DES MEDIKAMENTES.....	35
3.2. PRÄPARATION DER RATTENGEHIRNE.....	35
3.3. EXTRAKTION DER GESAMT-RNA MIT RNA-CLEAN.....	36
3.4. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	36
3.5. RNA-KONTROLL-ELEKTROPHORESE.....	36
3.6. SEMIQUANTITATIVE REVERSE TRANSKRIPTION-POLYMERASE- KETTEN-REAKTION (RT-PCR).....	37
3.6.1. Reverse Transkription spezifischer Gene.....	38
3.6.2. cDNA Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	39
3.7. NICHTDENATURIERENDE GEL-ELEKTROPHORESE (PAGE).....	41
3.7.1. Herstellung des Gels.....	41
3.7.2. Vorbereitung der Proben.....	42
3.7.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
3.8. SILBERFÄRBUNG.....	43
3.9. DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG.....	44
3.10. EXTRAKTION DER PROTEINFRAKTIONEN.....	44
3.11. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER PROTEINFRAKTIONEN.....	45
3.12. WESTERN BLOT.....	46
3.12.1 Vorbereitung des Gels.....	46
3.12.2. Vorbereitung der Proben.....	46
3.12.3. Elektrophorese.....	47
3.12.4. Blotten und Hybridisieren.....	47
3.12.5. Immunoreaktion.....	48
3.12.6. Entwicklung und Stripping.....	49
3.12.7. Densitometrische Auswertung der Filme.....	49
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>50</b>

---

4.1. NMDA-REZEPTOR-BLOCKADE INDUZIERT EINE UNTER- REGULATION DER NEUROTROPHIN-SYNTHESE.....	50
4.2. MK-801 EXPOSITION FÜHRT ZU EINER HERABGESETZTEN AKTIVIERUNG VON AKT UND CREB.....	52
4.3. NMDA-REZEPTOR-BLOCKADE FÜHRT ZU EINER VERSTÄRKTEN AKTIVIERUNG DER PRO-APOPTOTISCHEN JNK.....	55
4.4. NEONATALE BLOCKADE DER NMDA-FUNKTION INDUZIERT EINE UNTERREGULATION DER BCL <sub>2</sub> -mRNA EXPRESSION.....	55
4.5. NEONATALE MK-801 EXPOSITION FÜHRT ZU EINER HOCH- REGULATION DES TODESREZEPTORS FAS.....	57
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>58</b>
5.1. ALLGEMEINE BETRACHTUNGEN.....	58
5.2. MK-801 UND NEUROTROPHINE.....	59
5.2.1. NMDA-Rezeptor-Blockade induziert eine Unterregulation der Neurotrophine.....	59
5.2.2. Weitere Mechanismen der Apoptose-Induktion.....	61
5.3. MK-801 UND SIGNALPROTEINE.....	63
5.3.1. NMDA-Rezeptor-Blockade führt zu reduzierter Aktivität von Erk 1/2, CREB und Bcl <sub>2</sub> .....	63
5.3.2. Die Rolle der Transkriptionsfaktoren CREB und NFκB.....	63
5.3.3. Entkopplung der Signalkaskade um Erk1/2 und CREB induziert Apoptose.....	65
5.4. KLINISCHE ASPEKTE.....	67
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>70</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>72</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>76</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>87</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>88</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>89</b>

## 1. Einleitung

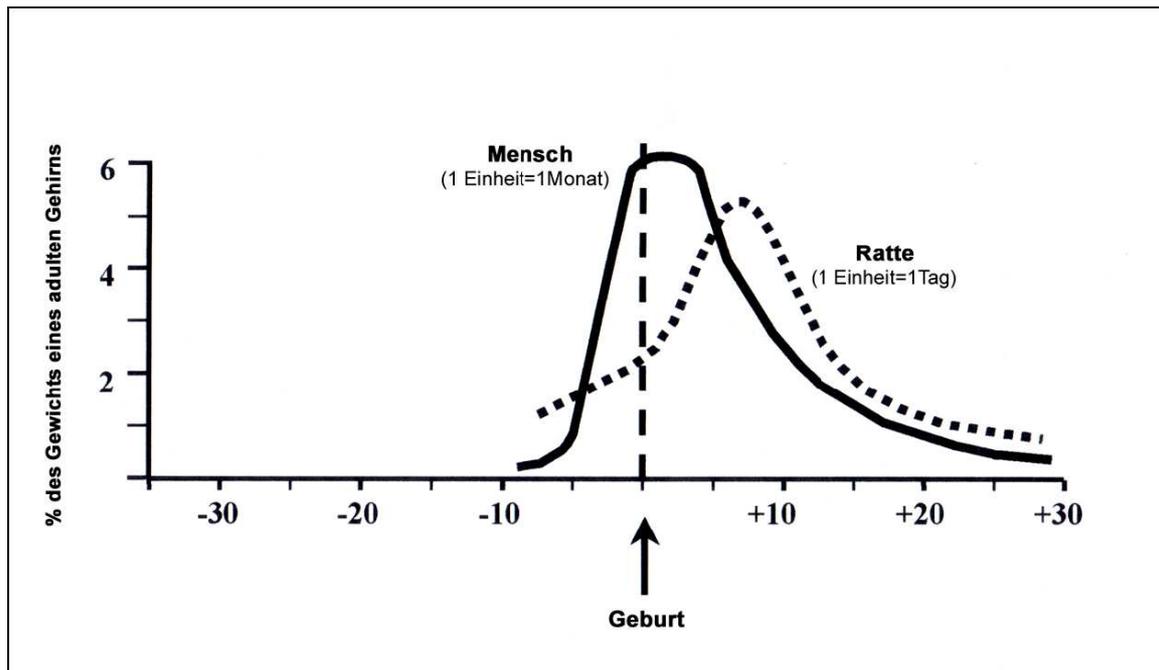
### 1.1. Aspekte der Gehirnentwicklung

#### 1.1.1. Die Phase des rapiden Hirnwachstums

Das Neuroepithel enthält anfangs undifferenzierte Stammzellen. Diese sind aber in der Lage, später alle Haupt- und Nebenlinien neuronale und glialer Zellen zu generieren <sup>[1]</sup>. Bevor dies geschieht, unterzieht sich das Neuroepithel einer Reihe transformierender Veränderungen bezüglich Form und Komposition. In einer sowohl räumlichen wie auch zeitlichen Funktion ist es dazu bestimmt, Neurone für bestimmte Hirnstrukturen zu fest definierten Zeitpunkten zu generieren. Da tatsächlich jede neuronale Population während eines spezifischen Zeitfensters gebildet wird, wurde die Neurogenese mit dem Begriff des „chronoarchitektonischen Musters“ assoziiert <sup>[2]</sup>.

Das Gehirn eines jeden Säugers durchläuft im Rahmen seiner Entwicklung eine Phase verstärkten Wachstums. Dobbing und Sands, die diesen Vorgang 1974 erstmals beschrieben haben, nannten ihn „brain growth spurt period“ <sup>[3]</sup>. Die Lebensphase, die mit diesem rapiden Hirnwachstum korreliert, findet bei verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Zeiten statt. Beim Menschen fängt sie bereits im sechsten Schwangerschaftsmonat an und endet zu Beginn des dritten Lebensjahres. Die Hirnwachstumsgeschwindigkeit folgt einem sigmoidalen Kurvenverlauf und ist zum Zeitpunkt der Geburt am höchsten.

Viele wichtige Vorgänge spielen sich während der Phase des rapiden Hirnwachstums im Gehirn ab. Migration und Differenzierung von Nervenzellen sowie Synaptogenese finden genauso statt wie programmierter Zelltod oder Apoptose, die für die Ausbildung adäquater Plastizität unerlässlich ist. Während der Phase des „brain growth spurt“ vollzieht sich eine große Zahl an entwicklungsbedingten Veränderungen, die metabolischer wie auch anatomischer Natur sind. Dies beinhaltet aber auch, dass es sich um eine Phase verstärkter Vulnerabilität handelt <sup>[3]</sup>.



**Abb. 1:** Die Periode des rapiden Hirnwachstums („brain growth spurt period“) (modifiziert nach Dobbing und Sands '74)<sup>[3]</sup>

Um Phänomene zu modellieren, die sich im menschlichen Gehirn während der Periode des rapiden Hirnwachstums abspielen, wird die Ratte während der vergleichbaren ontogenetischen Phase als Tiermodell benutzt. Bei der Ratte beginnt die Phase des rapiden Hirnwachstums postnatal und umfasst die drei ersten Lebenswochen. Die maximale Hirnwachstumsgeschwindigkeit bei der Ratte wird zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag beobachtet.

### 1.1.2. Plastizität und Apoptose während der Entwicklung

Um ein derart komplexes biologisches System wie das Gehirn zu kreieren, ist wird initial ein Überschuß an Neuronen gebildet. Im Verlauf wird durch eine Reihe von selektiven Maßnahmen bestimmt, welche davon durch Apoptose entfernt werden. Diese Strategie wird während der Hirnentwicklung genutzt. So kann das gitternetzartige Muster aus komplexen kortikalen Kreisen erst aus der Verbindung von Nervenzellwachstum und der Synapsenbildung entstehen, wobei diese Vorgänge gleichzeitig an regressive Ereignisse wie Apoptose, Axon- und Synapseneliminierung gebunden sind <sup>[1]</sup>. Im gewissen Sinne ist die Apoptose folglich

als Funktion der Plastizität aufzufassen, sie „formt“ das sich entwickelnde Gehirn durch diese Art des kontrollierten physiologischen Zelltod.

Die Neumodellierung von Synapsen und den verbundenen neuronalen Netzen, mitgebildet durch die genannten regressiven Vorgänge, findet aber im infantilen wie im adulten Gehirn statt. Dies geschieht konstant als Antwort auf sensorische Stimuli, wie z.B. beim Erlernen einer neuen Tätigkeit. Gleichzeitig gibt es zunehmend Hinweise, dass die Apoptose mitverantwortlich ist für neuronale Verluste im Rahmen des physiologischen Alterns <sup>[4]</sup>. Grundsätzlich läßt sich sagen, daß die neuronale Plastizität umso ausgeprägter ist, je komplexer die sie mitbestimmende Umwelt ist <sup>[1]</sup>.

### **1.1.3. Trophische Moleküle während der Entwicklung**

Zu den trophischen Molekülen gehören die Wachstumsfaktoren wie z.B. NGF, BDNF, NT-3 und NT-4, deren Beteiligung an Vorgängen wie Wachstum, Plastizität und Überleben unerlässlich ist. Des Weiteren haben auch exzitatorische Aminosäuren, wie zum Beispiel Glutamat, während der Entwicklung eine elementar wichtige Rolle in der Regulation dieser Prozesse <sup>[5, 6]</sup>. Dies wurde nicht zuletzt aus der Beobachtung geschlossen, dass diese Neurotransmitter schon sehr früh innerhalb der Entwicklung im Gehirn zu finden sind <sup>[5, 6]</sup>.

Die Überlebensfähigkeit der Neuronen hängt vom Zugang zu trophischen Faktoren ab, die als Antwort auf einen Zell-Zell-Stimulus gebildet werden. Durch neuronale Erregbarkeit, welche der Schlüsselreiz zur Ausschüttung der Faktoren ist, wird der synaptische Zusammenhalt zwischen den beteiligten Zellen gefestigt. Es gibt morphologische oder biochemische Eigenschaften, die es einer Zelle ermöglichen, besseren Zugang zu den Überlebenssignalen zu erlangen, wie z.B. eine höhere Zahl an Synapsen oder verstärktes axonales Verzweigen <sup>[7]</sup>. Jedoch werden nicht alle Zellen mit einer ausreichenden Menge an trophischen Signalen versorgt, so dass viele Zellen der apoptotischen Neurodegeneration unterliegen.

Neuronale Erregung ist der Schlüssel zum Überleben während der Entwicklung. Mehrere Autoren beschreiben den Zusammenhang zwischen zellulärer Erregung und möglichem Überleben nach einem Schema, was sich durch „Exzitation bedingt Transkription“ <sup>[8]</sup> beschreiben läßt <sup>[9, 10]</sup>. Hierbei kommt es durch depolarisierende

Reize zu einer selbstverstärkenden Schleife an transkriptionellen Vorgängen, die ihrerseits wieder Depolarisation und damit gleichzeitig Überleben fördern. Neben den Neuronen existieren noch weitere Syntheseorte für Wachstumsfaktoren. So hat der aus Gliazellen stammende glia-cell-line-derived-neurotrophic factor (GDNF) an den Regulationsvorgängen ebenso teil wie der klassische, durch Zielinteraktion entstandene Faktor NGF <sup>[11]</sup>. Ungeklärt ist allerdings noch, ob Neurone tatsächlich um eine limitierte Menge an Wachstumsfaktoren wettstreiten. Eine andere These geht davon aus, dass verstärkte synaptische Aktivität die Fähigkeit der Zelle erhöht, ausgeschüttete Faktoren zu erreichen <sup>[11]</sup>.

Einige Autoren berichten, dass sich die Ansprüche der Nervenzellen im Bezug auf trophische Unterstützung im Laufe der Entwicklung verändern. So verschwinde zunehmend die Abhängigkeit von exogenen Faktoren, da eine ausreichende intrinsische Produktion an überlebensnotwendigen Signalen stattfindet <sup>[12, 13]</sup>. Im gleichen Maße könnten auch altersabhängige Veränderungen im exzitatorischen Transmittersystem gefunden werden, in dem besonders die frühe Hirnentwicklung eine Phase kontinuierlicher Veränderung darstellt <sup>[7]</sup>. Anhand dieser Ergebnisse wird die Bedeutung trophischer Unterstützung für eine adäquate Hirnentwicklung deutlich.

#### **1.1.4. Entwicklungsbedingte Unterschiede bei Mensch und Ratte**

Die Schwangerschaft dauert beim Menschen etwa 40 Wochen, die der Ratte etwa 3 Wochen. Rattenjunge werden zu einem Zeitpunkt geboren, an dem eine Großzahl zerebellärer Körnerzellen erst noch gebildet wird. Im Gegensatz dazu ist die Neurogenese dieser Zellpopulation zum Zeitpunkt der Geburt beim Menschen schon abgeschlossen. Selbst wenn man die ersten drei postnatalen Lebenswochen der Ratte als vergleichbare Periode zur mittleren und späten pränatalen Phase beim Menschen erachtet (siehe Abbildung 1), erreicht doch das Rattengehirn seinen adulten Zustand innerhalb von etwa 6 Wochen nach der Befruchtung. Um dieses Niveau zu erreichen, bedarf es beim Menschen ein Vielfaches dieses Zeitraumes.

Untersuchungen von Hochstetter zeigten deutliche Ähnlichkeiten in der Entwicklung bei Mensch und Ratte, die umso ausgeprägter sind, je früher die untersuchte Entwicklungsstufe ist. Allerdings machen sich mit zunehmender Zeit deutlich Unterschiede bemerkbar <sup>[14]</sup>. Die Ontogenese dieser beiden Spezies lässt sich aber

vergleichen, da entscheidende anatomische Eigenschaften und histologische Gegebenheiten ähnlich in ihrer Erscheinung sind, selbst wenn die chronologischen Zeitpunkte hierbei verschieden sind.

## 1.2. Apoptose

### 1.2.1 Allgemeines zur Apoptose

Im sich entwickelnden Gehirn gibt es passive und aktive Formen des Zelltodes. Exzitotoxizität ist eine passive, Apoptose eine aktive Form des Zelltod. Die Apoptose ist ein Mechanismus, nach welchem Zellen in einem gleichsam stereotypen molekularen und zellulären Muster aktiv sterben. 1972 beschrieben Kerr et. al. die morphologischen Eigenschaften dieses Phänomens und unterstrichen die Bedeutung des kontrollierten Zelltodes für die Regulation der Größe von Zell-Populationen <sup>[15]</sup>. Die Apoptose ist ein hochkomplexer und gleichsam sehr koordiniert ablaufender Prozess. ATP wird benötigt, um diesen Prozess kontrolliert ablaufen zu lassen <sup>[16]</sup>. Während der Entwicklung eines Organismus ist es ein essentieller Mechanismus zur Kontrolle über die letztendliche Zahl an gewünschten Neuronen. Überschüssige oder funktionsunfähige Zellen gehen unter und werden entfernt.

Nahezu alle Zellpopulationen unterziehen sich einem natürlich vorkommenden oder „programmierten Zelltod“, bei dem jeder Zellverband einem typischen Grad an Zellverlust durch Apoptose unterliegt. Während manche Gruppen relativ konstant in ihrer Zahl bleiben, verlieren andere bis zu 2/3 ihrer Zellzahl <sup>[1, 11]</sup>.

Es gibt mehrere Kriterien, nach denen sich entscheidet, ob sich eine Zelle der Apoptose unterzieht. Von grundsätzlicher Bedeutung ist dabei die Verfügbarkeit von trophischen Faktoren, die ein Überleben unterstützen (s. 1.1.3.). Eine Zelle unterliegt umso wahrscheinlicher einer apoptotischen Degeneration, je weniger afferente oder postsynaptische Interaktion sie eingeht. Die Anzahl der Zellen, die die PCD-Phase überleben, ist somit proportional zu ihrer jeweiligen Zielprojektion bzw. der Anzahl ihrer Zielzellen <sup>[17, 18]</sup>. Auf diese Art und Weise wird wechselseitig die Anzahl präsynaptischer Neurone der Anzahl ihrer jeweiligen Efferenzen angepasst und umgekehrt die Zahl postsynaptischer Neurone entsprechend der Anzahl ihrer afferenten Projektionen reduziert <sup>[11]</sup>.

Allerdings erfüllt die Apoptose noch eine Reihe weiterer biologischer Funktionen, die für eine reguläre Entwicklung unerlässlich sind: sie eliminiert Neurone, die nur entwicklungsbedingte Funktion haben oder als vorübergehende Ziele früher Afferenzen dienten <sup>[19, 20]</sup>. Zellen mit inadäquatem Phänotyp oder unpassenden Projektionszielen werden durch Apoptose entfernt <sup>[21-25]</sup>. Des Weiteren ist sie für die Ausbildung regional spezifischer Muster oder für die Etablierung geschlechtsbedingter Unterschiede von Bedeutung <sup>[26]</sup>. White et al. schlussfolgern, dass das Ausmaß der Apoptose innerhalb einer spezifischen Region einen inversen Indikator für den Reifegrad darstellt <sup>[27]</sup>. Weiterhin spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle in der Pathogenese akuter und chronisch neurodegenerativer Erkrankungen.

Auslösende Reize für den kontrollierten Zelltod sind u.a. Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schädigung, Aktivierung von Todes-Rezeptoren oder die Ausschüttung von Cytochrom C in das Cytoplasma <sup>[28-30]</sup>.

### **1.2.2. Morphologie der Apoptose**

Die Apoptose folgt einem stereotypen Ablauf aus morphologisch gut unterscheidbaren Phasen: nukleäre und cytoplasmatische Kondensation, Zell-Fragmentierung mit Bildung von apoptotischen Körperchen und deren Phagozytose <sup>[15]</sup>. Eine Entzündungsreaktion der Umgebung bleibt im Gegensatz zur Nekrose aus. Die von Kerr et. al. zuerst beschriebenen Veränderungen zeigen sich zuerst im Nukleoplasma in Form einer Chromatin-Kondensation und Zusammenballung. Die ursprünglich homogene Masse verklumpt und flockt aus. Durch den Zerfall der Kernmembran kommt es zur Vermischung von Zyto- und Nukleoplasma, die nukleären Chromatinklumpen verteilen sich in der ganzen Zelle. Durch die Erhöhung der cytoplasmatischen Dichte werden Vakuolen erkennbar, die einzelnen Organellen bleiben intakt, wenn auch dicht gedrängt stehend. Es kommt lediglich zu einem Anschwellen der Mitochondrien.

Letztlich kommt zu einem Abschnüren von Zellfragmenten, so genannter apoptotic bodies, die nach wie vor eine klare Unterteilung in kondensiertes Chromatin und gut erhaltene Organellen erlauben. Diese apoptotic bodies verbleiben im Neuropil und werden dort abgebaut.

### 1.2.3. Zur genetischen Regulation der Apoptose

Als auslösender Reiz für die apoptotische Kaskade kann ein extra- wie auch ein intrazellulärer Stimulus dienen. Daher erfolgt auch die Unterscheidung des vorangehenden Signalweges in eine extrinsische und eine intrinsische Kaskade. Beide Wege führen über die Aktivierung von Proteasen zum programmierten Zelltod. Die morphologisch sichtbaren Veränderungen innerhalb einer Zelle, welche die Apoptose durchläuft, werden durch eine Gruppe von Cysteinproteasen hervorgerufen.

Diese homologen Proteasen sind Teil einer großen Proteinfamilie und bekannt als Caspasen. Jede Caspase wird als Pro-Enzym synthetisiert und bedarf des proteolytischen Processing zur Aktivierung<sup>[31]</sup>. Sie spielen bei der Zerstörung einer Zelle als Effektoren eine zentrale Rolle. Durch die Elimination der Caspase-Aktivität (durch Mutation oder pharmakologische Hemmstoffe) kann die Apoptose verlangsamt oder ganz aufgehalten werden<sup>[32]</sup>. Die heute bekannten Caspasen lassen sich anhand ihrer Pro-Domain in drei Klassen einteilen.

In Abhängigkeit des jeweiligen pro-apoptischen Stimulus wird ein anderes Set an Caspasen aktiviert. Die Caspasen 3, 6 und 8 zum Beispiel sind Teil des Fas/TNF-vermittelten extrinsischen Signalweges. Der so genannte „Todesrezeptor“ Fas ist an der Zelloberfläche lokalisiert und ist Teil der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Familie. Über Aktivierung der Caspase-8 kommt es zum Zelltod.

Die Caspasen 9 und 3 hingegen sind, zusammen mit APAF-1 (apoptosis protease activated factor 1) und Cytochrome C Teil der intrinsischen, Mitochondrium-assoziierten Zelltod-Kaskade<sup>[33]</sup>. Diese beiden Signalwege sind voneinander nicht völlig unabhängig. Eine Verbindung wird über das Protein BID vermutet, welches als Antwort auf die Aktivierung der membranständigen Todesrezeptoren die Cytochrom C Freisetzung aus dem Mitochondrium vermittelt<sup>[34]</sup>.

#### 1.2.3.1. Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische, oder Todesrezeptor-vermittelte Signalweg, spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebs-Homöostase. Ligandenbindung an einen solchen Todesrezeptor wie Fas (synonym mit APO-1 oder CD95) resultiert in der

Aktivierung der Procaspase-8. Eine hohe lokale Konzentration von Procaspase-8 führt zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-8. Diese interagiert mit dem Protein BID, welches die pro-apoptotischen Faktoren BAX und BAK zu deren Oligomerisierung anregt <sup>[35]</sup>. Es wird vermutet, dass dieses Oligomer neue Kanäle in der äußeren mitochondrialen Membran formt, oder bestehende Kanäle modifiziert, welches die Freisetzung von Cytochrom C ermöglichen soll <sup>[36, 37]</sup>.

Im extrinsischen Signalweg scheint eine alleinige Aktivierung der Caspase-8 zur Aktivierung der Apoptose ausreichend zu sein, da sie bereits die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktivieren kann <sup>[38]</sup>. In manchen Zelltypen scheint die Freisetzung von Cytochrom C ein verstärkender Schritt zu sein.

### 1.2.3.2. Intrinsischer Signalweg

Dieser Mitochondrien-gebundene Weg findet vorrangig als Reaktion auf extrazelluläre Noxen und interne Störungen statt. Dies können z.B. ultraviolette Strahlung <sup>[39]</sup> oder der Entzug von Wachstumsfaktoren sein <sup>[40]</sup>. Ein Schlüsselereignis in diesem Signalweg ist die Freisetzung von Cytochrom C aus dem intermembranösen Raum in das Cytosol. Dort bindet es an das Adapterprotein Apaf-1, welches nun oligomerisiert. In dieser Form bindet es Procaspase-9 in Anwesenheit von ATP und ermöglicht seine Selbst-Processierung und Aktivierung <sup>[41-43]</sup>. Dieser molekulare Komplex wird als das Apoptosom bezeichnet, welches für die Aktivierung der wichtigsten Effektorcaspase-3 durch Caspase-9 benötigt wird und damit zur apoptotischen Kaskade führt.

In der Folge werden verschiedene Proteinkinasen aktiviert und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Beispielhaft seien hier die c-Jun N-terminal-Kinasen (JNKs) erwähnt. Diese Enzyme phosphorylieren nach ihrer Aktivierung den Transkriptionsfaktor c-Jun, der nun seinerseits die Transkription proapoptotischer Gene auslöst <sup>[44]</sup>. In dieser Kaskade ist auch eine intrazelluläre Kontroll- und Modifikationsphase enthalten, in der die Proteine der bcl-Familie eine Schlüsselrolle spielen <sup>[45]</sup>. Über Wachstumsfaktoren kommt es zu einer gesteigerten Aktivität von CREB (cAMP responsive element binding protein), Bcl-xL und Bcl-2, was eine Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und damit den intrinsischen Weg der Apoptose verhindert.

Mittels der verschiedenen Caspasen kommt es im Folgenden zu den beschriebenen zellulären und morphologischen Veränderungen, die im Tod der Zelle münden.

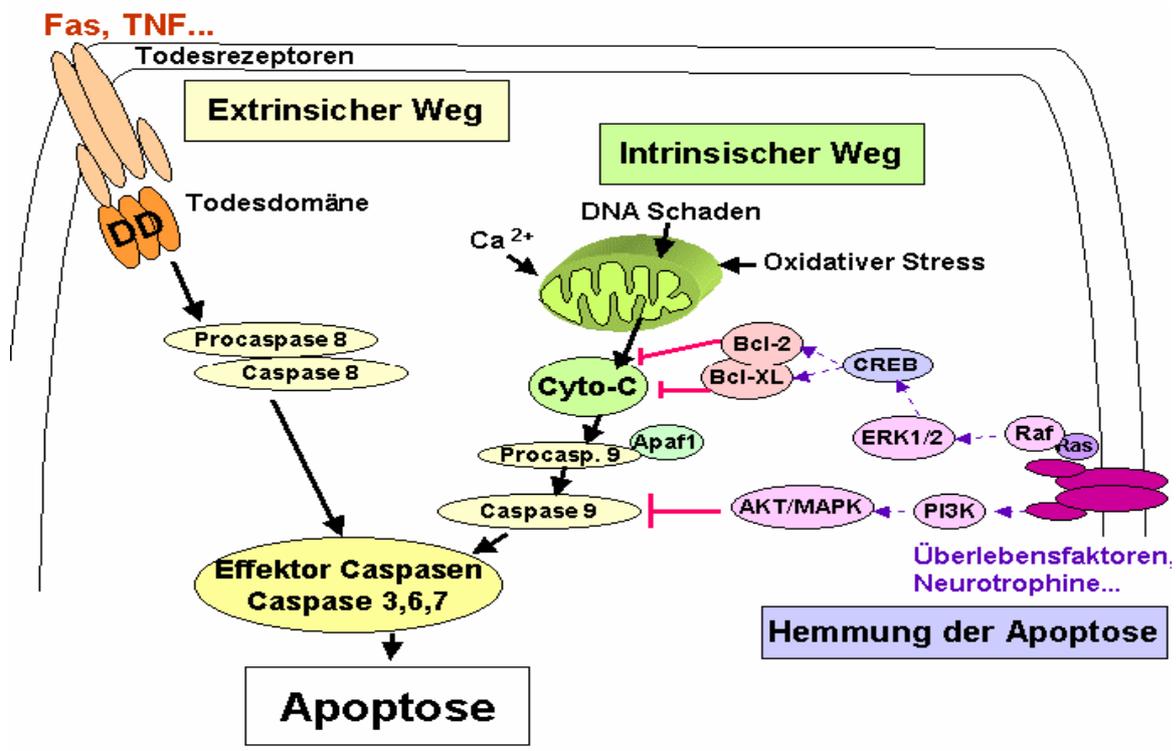


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung der apoptotischen Kaskade

### 1.3. Neurotrophine

#### 1.3.1 Neurotrophine als Wachstumsfaktoren

Diffusionsfähige Wachstumsfaktoren kontrollieren den Prozess der Proliferation, Migration und Differenzierung neuronaler Zellen. Zur Familie dieser Faktoren, die wegen ihrer Eigenschaft, Neurone „nährend“ zu unterstützen auch Neurotrophine genannt werden, zählen unter anderem NGF (*nerve-growth-factor*), BDNF (*brain-derived-neurotrophic-factor*) sowie die Neurotrophine 3, 4 und 5. In den frühen fünfziger Jahren wurde zuerst NGF entdeckt. Stellvertretend für die Anderen seien hier anhand des NGF einige Charakteristika erläutert.

Nach Behandlung mit NGF tritt eine Kaskade cytoplasmatischer und nukleärer Ereignisse ein, deren zeitlicher Verlauf sich von einigen Sekunden bis zu mehreren

Tagen erstreckt. Eine Behandlung von PC 12 Zellen (Zellen aus einer Phäochromozytom-Zelllinie) beispielsweise führt zu vermehrter Bildung des second-messengers cAMP und einer Induktion des Na<sup>+</sup>-Influges. Innerhalb von Minuten kommt es zu Änderungen der Protein-Phosphorylierung und verstärkter Gen-Transkription. Mittelfristig führt NGF unter anderem zur verstärkten Verzweigung, bzw. Wachstum von Nervenzellfortsätzen. Langfristig werden diese extensiv gebildet, ebenso kommt es zur Bildung von funktionellen Synapsen.

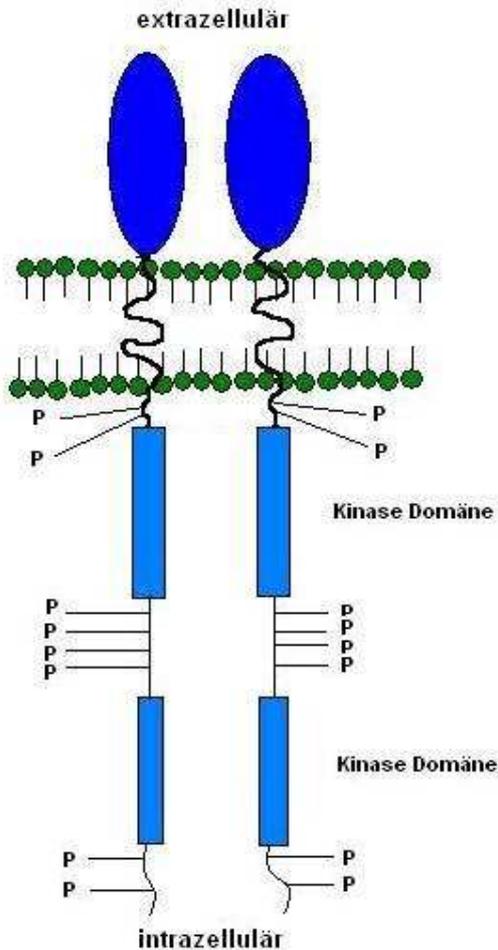
Physiologische Effekte von NGF können eingeordnet werden in: a) einen essentiellen neurotrophen oder „nährenden“ Einfluss während der Entwicklung, der zu selektivem neuronalen Überleben führt; b) einen Einfluss auf die neuronale Differenzierung; und c) einen neurotrophen, führenden Einfluss auf das Richtungs-wachsen eines Neuriten <sup>[1]</sup>.

### 1.3.2. Neurotrophine und Rezeptoren

Neurotrophine vermitteln Überleben, Differenzierung, Wachstum und Apoptose von sich entwickelnden Neuronen durch Bindung an zwei Typen von Zelloberflächen-Rezeptoren: den Trk (Tyrosin-Kinase-Rezeptor) <sup>[46, 47]</sup> und den p75 Neurotrophin-Rezeptor <sup>[48, 49]</sup>.

NGF bindet ausschliesslich an den TrkA-Subtyp, ursprünglich Trk oder p140<sup>trk</sup> genannt. BDNF bindet nur an den TrkB-Rezeptor, wohingegen NT-3 an alle drei Subtypen binden kann, allerdings eine Präferenz für TrkC <sup>[50-54]</sup> aufweist. Die Faktoren NT-4/5 binden sowohl an TrkA wie TrkB <sup>[55, 56]</sup>. Der gesamtzelluläre Kontext bestimmt die spätere Spezifität in der Ligand-Rezeptor-Bindung <sup>[57-59]</sup>.

Trk ist ein einzelner, transmembranärer Rezeptor mit intrinsischer Protein-Tyrosin Kinase Aktivität an seinem C-terminalen Ende. Die extrazelluläre Domäne besteht aus fünf Untereinheiten, von denen in der Literatur sowohl die IgGL-Untereinheiten, als auch die Leu-rich-motif (LRM) triad-Untereinheiten als wichtige Bindungsstellen für Neurotrophine angesehen werden <sup>[60]</sup>. Die intrazelluläre Domäne wird durch die Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) repräsentiert <sup>[60]</sup>. Man geht von der Annahme aus, dass große Teile der gesamten Neurotrophin-Oberfläche mit dem Rezeptor interagieren. Daher sind mehrere Untereinheiten nötig, um diese Bindungskapazitäten abzudecken <sup>[60]</sup>.



**Abb. 3:** Tyrosinkinase-Rezeptor. P entspricht der Phosphorylierungsstelle für Tyrosin an der cytoplasmatischen Domäne nach Dimerisierung<sup>[61]</sup>

Ligandenbindung an Trk führt zur Dimerisation des Rezeptors mit konsekutiver Auto-phosphorylierung zwischen den Monomeren an Tyrosinseitenketten der cytoplasmatischen Domäne. Die gebildeten Phosphoprotein-Domänen können spezifische Enzyme der Signalkette rekrutieren und aktivieren, wie z.B. Phospholipase C, Src oder Adaptermoleküle wie Grb2, welches Ras aktiviert. Hierzu kommt es zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade über Erk1/2.

Der  $p75^{\text{NTR}}$  ist ein 75 kDa grosses transmembranäres Glykoprotein, das alle Neurotrophine binden kann. Während der Trk vorrangig positive Signale übermittelt, die zelluläres Überleben fördern, vermittelt der  $p75^{\text{NTR}}$  sowohl positive wie negative Signale<sup>[62]</sup>. Er war das zuerst entdeckte Mitglied der Fas/Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptor-Familie, das zelluläre Differenzierung und Apoptose vermittelt<sup>[48, 49, 63]</sup>. Für bestimmte biologische Antworten wie z.B. Apoptose<sup>[64-67]</sup> scheint er essentiell zu sein. Er ist in der Lage, die Reaktion einer Trk-Aktivierung auf Signalebene zu modulieren<sup>[68-70]</sup>. Der  $p75^{\text{NTR}}$  besteht aus vier Cystein-reichen Untereinheiten in der

extrazellulären Domäne und mindestens einer intrazellulären „death domain“. Extrazellulär wird die zweite Cys-Untereinheit als die für die Ligandenbindung essentielle angenommen <sup>[71, 72]</sup>.

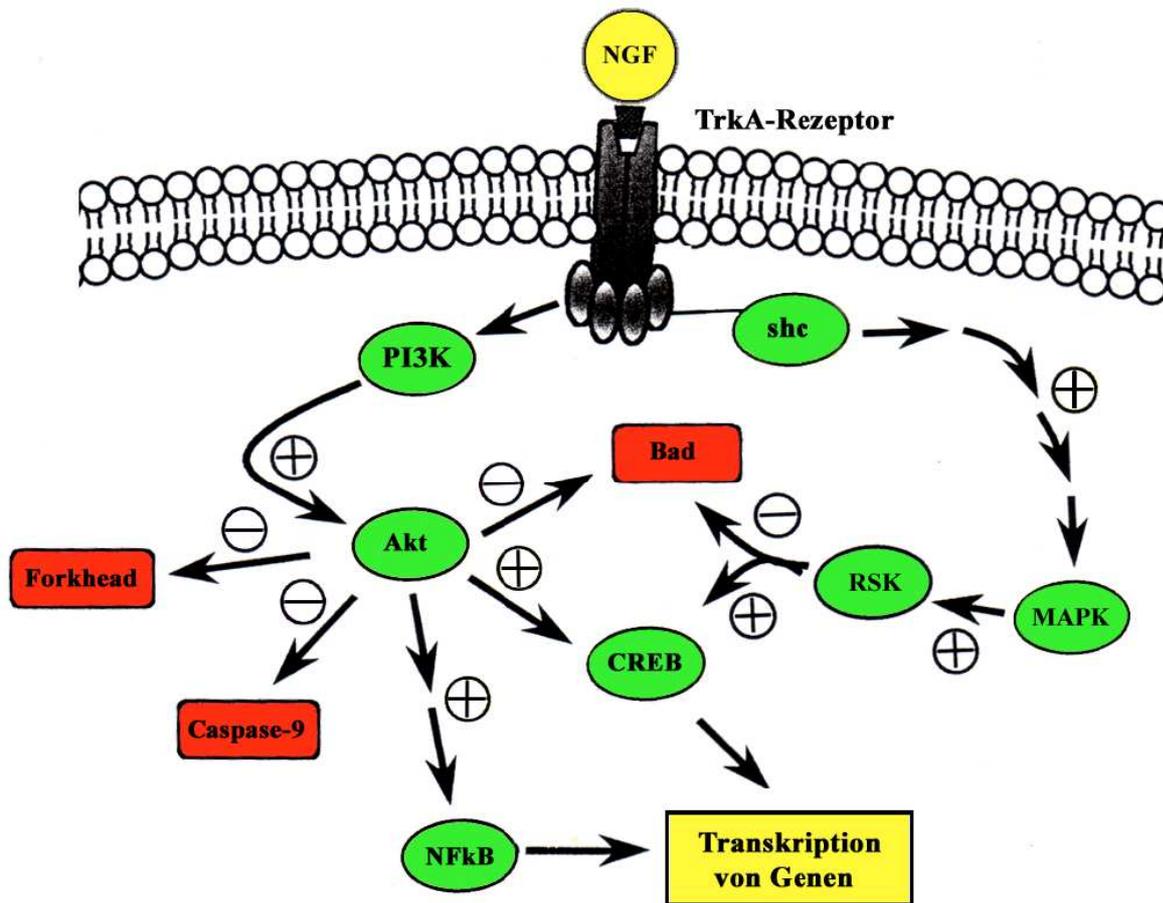
Die Interaktionsmöglichkeiten der Rezeptoren untereinander zeigen bisweilen komplexe kinetische Bindungsphänomene. Kommt es zur Interaktion mehrerer „niederaffiner“ Rezeptoren, können sie sich zusammenlagern und zu hochaffinen Rezeptoren mit völlig anderen kinetischen Eigenschaften transformieren <sup>[73]</sup>. Somit ist für die Ausprägung einer hochaffinen Ligandenbindung die Coexpression von p75<sup>NTR</sup> und Trk unerlässlich <sup>[73-77]</sup>.

### 1.3.3. Neuronale Antwort auf Rezeptor-Aktivierung

Ligandenbindung am Tyrosinkinase-Rezeptor führt zu Dimerisation und zu einer Autophosphorylierung an der cytoplasmatischen Domäne. Die daraus resultierenden Phosphoprotein-Domänen ermöglichen spezifische Interaktionen mit Enzymen, die eine src-Homologie besitzen (sog. SH2-Domänen).

Bisher sind zwei gut erforschte Signalwege, die durch Neurotrophinbindung initiiert werden, bekannt <sup>[30, 32]</sup>. Charakteristisch für diese Signalwege ist die Verwendung von sogenannten Kinasen, d.h. Proteinen, die durch Phosphorylierung anderer Proteine/Kinasen aktivieren oder inhibieren können. Beide Signalwege (s.u.) beinhalten jeweils die Aktivierung wichtiger Signalproteine, die für das Überleben der Zelle unerlässlich sind.

Der erste Signalweg beginnt durch Interaktion des Grb2-Adapterproteins mit dem aktiven Trk. Grb2 liegt im Komplex mit dem Protein Sos vor, welches in seiner Funktion als GTP-Austauscher das kleine G-Protein Ras aktiviert. Dieses wiederum vermag die Kinase Raf an die Zellmembran zu rekrutieren, wo es aktiviert wird. Raf kann mittels seines Substrats MEK das erste der beiden erwähnten Schlüsselproteine aktivieren, die Map-Kinase (mitogen-activated protein kinase), auch ERK genannt <sup>[78]</sup>. Map vermittelt sein anti-apoptotisches Signal durch Inhibierung des pro-apoptotischen Bad und Aktivierung des Transkriptionsfaktors cAMP-response-element-binding protein (CREB), der nach Translokation in den Nukleus die Transkription von Zielgenen für das Überleben anstößt <sup>[79]</sup>.



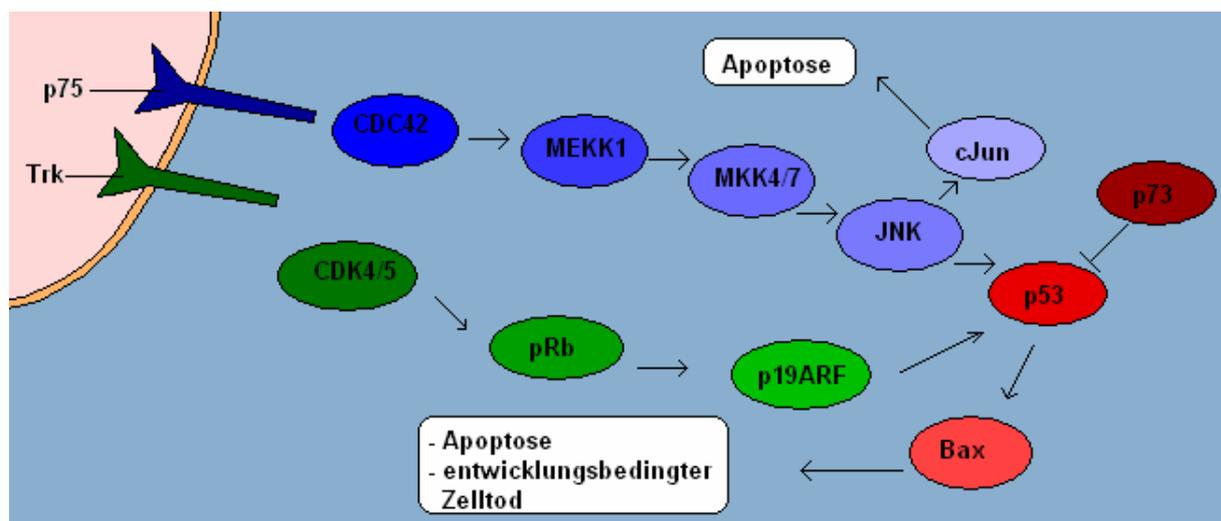
**Abb. 4:** Signalwege des neuronalen Überlebens, in diesem Beispiel induziert durch Bindung von NGF an den TrkA-Rezeptor <sup>[80]</sup>

Die zweite Kaskade wird durch Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) getriggert. Auch hier kommt es nach diversen Zwischenschritten zur Aktivierung eines Proteins mit Schlüsselfunktion, der Protein-Kinase B, auch Akt genannt. Wie auch Map, fördert Akt das Überleben, indem es eine Reihe von pro-apoptotischen Faktoren phosphoryliert und damit inaktiviert, u.a. Caspase-9 und das bereits erwähnte Bad-Protein. Umgekehrt aktiviert es überlebensfördernde Proteine wie z.B. nuclear factor kappa B (NFκB) oder CREB. Beide genannten Proteine sind Transkriptionsfaktoren, wie auch die „immediate early genes“ fos und jun. Transkriptionsfaktoren nehmen durch Veränderung der Initiations-wahrscheinlichkeit eines RNA-Polymerase-Komplexes regulierend Einfluss auf die Transkriptionsrate spezifischer Genabschnitte, zu denen auch die der Neurotrophine wie z.B. BDNF gehören <sup>[1, 81]</sup>.

Beide Signalwege arbeiten zusammen, bzw. laufen durchaus parallel zueinander, um mögliche intrazelluläre apoptotische Kräfte des sich entwickelnden neonatalen Gehirns zu inhibieren. Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, daß diese Kaskaden strikt linear ablaufen, vielmehr ist ein hohes Maß an Interaktion mit anderen Signalkaskaden nicht nur möglich, sondern im Rahmen feinsten regulatorischer Möglichkeiten auch unabdingbar.

Der  $p75^{\text{NTR}}$  vermittelt, wie auch andere Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie, eine Vielzahl biologischer Antworten, wie z.B. auch zelluläre Migration <sup>[82]</sup>. Er ist auch in der Lage, Trk-vermittelte Überlebenssignale zu verstärken. Vom  $p75^{\text{NTR}}$  wurde anfangs angenommen, dass seine Aufgabe vorrangig in der positiven Regulation der TrkA-Funktion bestünde <sup>[59, 74, 83, 84]</sup>.

Jüngere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß  $p75^{\text{NTR}}$  eine eigenständige, unabhängige Signalfunktion innehat, die in Abhängigkeit vom zellulären Kontext auch zur Apoptose führen kann. Ein Teil dieser Widersprüchlichkeiten läßt sich durch das Expressionsmuster für Neurotrophin-Rezeptoren an der Zelloberfläche erklären. So vermittelt  $p75^{\text{NTR}}$  nur dann Apoptose, wenn Trk inaktiv oder nicht ausreichend exprimiert wird.



**Abb. 5:** Apoptotische Signalkaskade, induziert durch NGF-Mangel oder selektive  $p75^{\text{NTR}}$ -Aktivierung <sup>[62]</sup>

### 1.3.4. Neurotrophine in der Entwicklung

Innerhalb der Phase des rapiden Hirnwachstums ist das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, die das Überleben und die Plastizität des sich entwickelnden Organs gewährleisten, von besonderer Bedeutung. Die Wachstumsfaktor-Expression innerhalb eines einzelnen Neurons ist von dessen Aktivität abhängig <sup>[1]</sup>. Durch den Einfluss des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat lässt sich ein Anstieg an NGF und BDNF mRNA nachweisen, wohingegen durch den inhibitorischen Transmitter GABA eine Verminderung derselben stattfindet <sup>[1]</sup>.

Marini postulierte die These, daß die einem Glutamat-Stimulus folgende Neurotrophin-Freisetzung zu einer autokrinen Stimulation des Neurons führt, was dem zellulären Überleben dienlich ist <sup>[10]</sup>. Das morphologische Korrelat dieses Überlebenssignals besteht in einer Neurotrophin-induzierten Expression des Proteins bcl-2, wobei CREB wiederum der Mediator dieser Expression ist <sup>[85, 86]</sup>. Gleichzeitig vermögen Neurotrophine die inhärenten Apoptose-Signale zu unterbinden, indem sie mittels der Protein Kinase B / Akt die proapoptischen Faktoren BAD und Caspase 9 phosphorylieren und damit inhibieren <sup>[87-89]</sup>.

## 1.4. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA)

### 1.4.1. Glutamat als Neurotransmitter

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS. Es findet sich in vielen Neuronensystemen u.a. im Neokortex, Hippocampus und Cerebellum <sup>[90]</sup>. Glutamat und Aspartat werden von ca. 40% der präsynaptischen Endigungen freigesetzt. Über die Aktivierung ihrer jeweiligen Rezeptoren vermitteln sie höhere kognitive Funktionen, Gedächtnisformierung und beeinflussen die Plastizität neuronaler Synapsen. Glutamat ist noch an vielen anderen Funktionen wie z.B. Einbau in Proteinen oder als Vorläufer für GABA beteiligt, insgesamt ist es die am häufigsten vorkommende Aminosäure im ZNS. Seine Konzentration ist ungefähr sechsfach höher als die der inhibitorischen Aminosäure GABA, wobei der Anteil des Transmitterpools etwa 30 % hiervon ausmacht <sup>[1]</sup>.

### 1.4.2. Glutamat und seine Rezeptoren

Glutamat vermittelt seine exzitatorische Wirkung über die Bindung an Rezeptoren. Diese können, je nach Art der Signaltransduktion, in ionotrope und metabotrope Rezeptoren unterteilt werden.

Ionotrope Rezeptoren sind in ihrer Wirkung an Ionenkanäle gebunden und lassen sich nach den jeweiligen Agonisten weiter in sogenannte N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und non-NMDA Rezeptoren aufteilen. Zu den letzteren gehören die  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-isoxazol-4-Propionsäure (AMPA) und die Kainat Rezeptoren. Diese drei Rezeptor-Typen gehören alle zur Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle, zu der auch u.a. der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor, GABA<sub>A</sub>, und der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor zählen.

Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren sind an cytoplasmatische Enzyme mittels G-Proteinen gekoppelt. Zu ihnen werden der I-AP4 und der ACPD-Rezeptor gerechnet. Eingeteilt werden sie in drei Klassen (I-III), gemäß ihren Untereinheiten mGluR1-8.

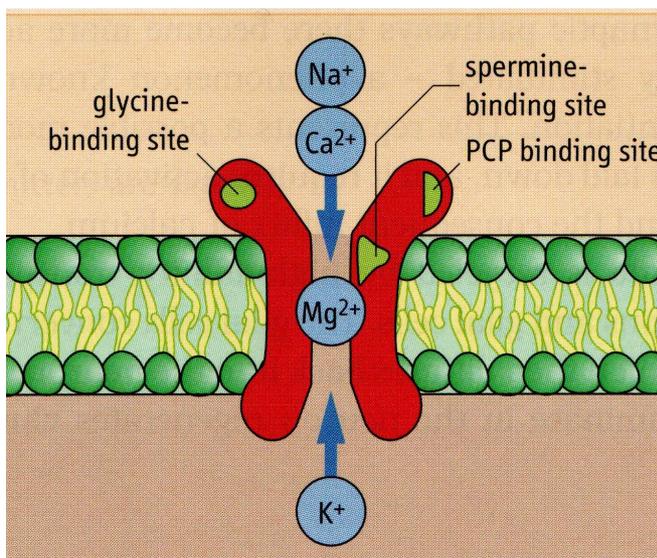
Bei allen Rezeptoren trifft zu, daß sie multimere Zusammenstellungen individueller Untereinheiten sind. Der NMDA-Rezeptor ist eine pentamere Struktur, die sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt. Unterschiede in der Rezeptorkomposition bedingen grundlegend verschiedene pharmakokinetische Eigenschaften des resultierenden Kanals, z.B. im Bezug auf die Sensitivität für den Agonisten oder die Leitfähigkeit für die zu transportierenden Kationen <sup>[91]</sup>. Die mit zunehmendem Alter einhergehenden Veränderungen der kinetischen Eigenschaften korrelieren mit Perioden verstärkter Synaptogenese bzw. auch neuronaler Elimination <sup>[92]</sup>.

### 1.4.3. Der NMDA-Rezeptor und seine Regulation

Der NR unterliegt einer sehr straffen Regulation. Er hat fünf Bindungsstellen für endogene Liganden, die alle die Öffnungswahrscheinlichkeit beeinflussen. Zu diesen gehören zwei verschiedene Agonisten-Erkennungsstellen, jeweils für Glutamat und Glycin sowie eine regulatorische Bindestelle für Polyamine, die Rezeptor-Aktivierung vermitteln. Weiterhin finden sich jeweils Bindungsstellen für Mg<sup>++</sup> und Zn<sup>++</sup>, die einen Ionenflux verhindern können.

Agonisten am NR sind, in der Reihenfolge absteigender Potenz: Glutamat, I-Homocystein, Aspartat, Cysteinsulfat und Quinolinat <sup>[93]</sup>. NMDA selbst ist, trotz hoher Selektivität an diesem Rezeptor, nur ungefähr 1/30 so potent wie Glutamat. Der NMDA-Rezeptor ist der einzige Rezeptor, der für eine Aktivierung die simultane Bindung zweier verschiedener Agonisten benötigt. Neben Glutamat ist die Bindung von Glycin für eine Kanalöffnung unerlässlich <sup>[93-96]</sup>.

Die Polyamin-Bindungsstelle hat nur modulierenden Charakter <sup>[97]</sup>. Eine hohe Polyamin-Konzentration führt zu einer spannungsabhängigen Blockade des Rezeptors <sup>[98]</sup>. Im Kontrast dazu steht extrazelluläres  $Mg^{2+}$ . Es übt eine inhibierende Funktion aus, indem es eine ebenfalls spannungsabhängige Blockade des NR bedingt <sup>[99]</sup>. Weitere spannungsabhängige Kanalblocker sind u.a. MK-801 (s.u.), das Anästhetikum Ketamin sowie Phencyclidin (PCP). Sie alle weisen unter-



**Abb. 6:** NMDA-Rezeptor und seine Regulation. Er beinhaltet verschiedenste modulatorische Bindungsstellen, z.B für Glutamat, Glycin oder PCP <sup>[100]</sup>.

schiedliche Charakteristika in ihrem Blockverhalten auf. Daher geht man davon aus, dass sie an jeweils verschiedenen Domänen des Rezeptors angreifen <sup>[1]</sup>. Zusätzlich zu den oben angegebenen Regulationsmöglichkeiten wird die Fähigkeit der Agonisten, den Kanal zu öffnen, entscheidend vom extrazellulären pH-Wert beeinflusst. Je alkaliner der pH im Medium (im Bereich von 6,8-8,4), umso höher ist die Öffnungsfrequenz in Anwesenheit entsprechender Agonisten <sup>[101]</sup>.

#### 1.4.4. Der NMDA-Rezeptor und Signaltransduktion

Wie auch der AMPA-Rezeptor führt ein NMDA-Stimulus zu einem unspezifischen Anstieg der Leitfähigkeit für monovalente Kationen (z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). Die Funktion der NMDA-Rezeptoren besteht in der Injektion von  $\text{Ca}^{2+}$  in die postsynaptische Membran. Tatsächlich sind NR höchst permeabel für divalente Kationen, die Leitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  ist etwa 10-fach höher als für  $\text{Na}^+$  [1].

Ein Glutamat-Stimulus via NMDA steuert zwei verschiedene molekulare Ziele an, die denen eines Neurotrophin-Reizes gleich sind: die Signalproteine MAP und AKT (s.o.). Im Gegensatz zu einer Aktivierung durch Wachstumsfaktoren ist aber für den Start dieser Kaskaden via NR die Beteiligung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3) unabdingbar [102]. Die verschiedenen Liganden bedienen sich dabei unterschiedlicher Mechanismen.

Weiterhin ist die Aktivierung der genannten Proteine via NR neben PI3 vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux abhängig. Für den Signalweg zu Erk1/2 ist die Beteiligung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin abhängigen Kinase von Bedeutung [91].

In einigen Zelltypen konvergieren die Signale von MAP wie auch von AKT in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB und NF $\kappa$ B [81], was letztlich zur Inhibierung zentraler pro-apoptotischer Proteine wie zB. BAD oder Caspasen führt [85, 88]. Zu den hierbei transkribierten Proteinen zählen u.a. BDNF [81] oder bcl-2 [102].

#### 1.5. MK 801 (Dizocilpin)

Glutamat hat neben seiner für die Entwicklung und Reifung der Zelle förderliche Funktion auch neurotoxische Potenz. Bei Mäusen, denen systemisch Glutamat verabreicht wurde, zeigte sich als toxischer Effekt eine Degeneration der Retina [103], was später terminologisch als Exzitotoxizität bezeichnet wurde [104]. Sedativa, Tranquilizer, Antikonvulsiva und Anästhetika finden ihren Einsatz auch in der Pädiatrie an neonatalen Organsystemen. Der pharmakologische Effekt dieser Medikamente beruht auf ihrer Fähigkeit, durch NMDA-Blockade oder  $\text{GABA}_A$ -Verstärkung die neuronale Erregbarkeit zu reduzieren.

MK-801 (oder Dizocilpin) ist ein klassisch hoch-affiner, selektiver, nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist. Im Jahr 1989 wurde durch Olney et. al. die Entdeckung gemacht, dass die Gabe von MK-801 Dosis-abhängig zu reversiblen bis irreversiblen Schäden am adulten Rattengehirnen führt und wurde seitdem als „Olney-Läsion“ bezeichnet <sup>[105]</sup>. Olney beschrieb die licht- und elektronenmikroskopischen Veränderungen, die die Neuronen durchlaufen.

Es war bekannt, dass die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren in vivo <sup>[106]</sup> und in vitro <sup>[107]</sup> neuronales Überleben vermitteln kann. Dass die Blockade des NMDA-R neurotoxische Wirkung nach sich zieht, wurde in Studien um die Arbeitsgruppe von Ikonomidou et al. gezeigt. Ein apoptotischer Zelluntergang konnte nur beobachtet werden, sofern die Blockade mittels MK-801 in bestimmten Abschnitten der Hirnentwicklung, und zwar während der Hypersensitivität der NMDA-Rezeptoren, erfolgte. Dieser Effekt wurde auch für weitere „dämpfende“ Agentien wie GABA-Mimetika <sup>[108]</sup> und Ethanol, einen gemischten NMDA-Antagonisten und GABA-Agonisten <sup>[109]</sup>, beobachtet. Sie alle verursachen weitreichenden apoptotischen Zell-Untergang im jungen Rattengehirn, sobald sie kurz postnatal verabreicht wurden.

Es konnte festgestellt werden, dass das Ausmaß des Zelluntergangs deutlich vom ontogenetischen Entwicklungsstand des Rattengehirns abhängig ist. Die entwicklungsbedingt vulnerabelste Phase beginnt mit der Geburt und umfasst die ersten drei postnatalen Wochen <sup>[110]</sup>. Dieser Zeitraum fällt mit der Periode der Synaptogenese und dem rapiden Hirnwachstum zusammen. Exakt hier fällt die Apoptose am stärksten aus <sup>[110]</sup>.

Hieraus folgt, dass in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Verabreichung die Gabe von NMDA-Antagonisten das Risiko eines diffusen Hirnschadens in sich trägt. Dieser wird in früher Kindheit meistens noch nicht erkannt, könnte sich aber im späteren Leben in einem breiten Spektrum neuro-psychiatrischer Erkrankungen manifestieren.

## 1.6. Zentrale Fragestellung der Arbeit

Es wurde die Hypothese formuliert, dass es durch Blockade der NMDA-Rezeptoren mittels (+)MK-801 zu einer verminderten Neurotrophin-Synthese kommt, die zur apoptotischen Neurodegeneration im neonatalen Rattengehirn führen kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die durch MK-801 induzierte apoptotische Neurodegeneration molekularbiologisch hinsichtlich einer verringerten Neurotrophin-Synthese sowie der Expression ausgesuchter pro- und anti-apoptotischer Faktoren zu untersuchen.

Zu diesem Zweck werden die intrazellulären Signalschritte der Hirnregionen einer Analyse unterzogen, die bekanntermassen sensibel auf die proapoptotischen Effekte von NMDA-Antagonisten reagieren. Mittels des Western-Blot-Verfahrens wird das Verhältnis pro- und antiapoptotischer Proteine untersucht. Die Expression der Protein-kodierenden mRNA, im Speziellen der Neurotrophine, wird durch die Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion untersucht.

Es soll die Korrelation zwischen NMDA-Rezeptor-Blockade, der Verringerung der Neurotrophin-Synthese und dem Ansteigen proapoptotischer Faktoren mit der daraus resultierenden Neurodegeneration untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

Blotting Box	Biometra, Göttingen
Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Entwicklungsmaschine X-OMAT 5000RA	Kodak, Stuttgart
Feinwaage MC 210 S	Sartorius, Göttingen
Konzentrator T301	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellenherd (M706)	Philips, Hamburg
Multilabelcounter	Wallac,
PCR-Maschine GeneAmp 2400	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Präzisionsküvette SUPRASIL <sup>®</sup>	Hellma, Mühlheim
RNA/ DNA Calculator Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Stromversorgungsgerät EPS 3500	Pharmacia Biotech, Freiburg
TGGE-Gelkammer	Diagen, Hilden
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank B12	Heraeus, Hanau
UV-Transilluminator TI 1	Biometra, Göttingen
Vortexgerät Genie 2	Scientific Industries, Bohemia USA
Waage BL 1500 S	Sartorius, Göttingen
Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

### 2.2. Chemikalien

Acrylamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose (ultra pure)	Gibco BRL, Eggenstein
Aqua-Spüllösung	Delta-Pharma, Pfullingen
APS	Serva, Heidelberg

---

β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs/ Schweiz
Bromphenolblau	Fluka, Buchs/ Schweiz
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chirurgisches Instrumentarium	Aesculap, Tuttlingen
Chloroform	J.T. Baker, Deventer/ Holland
Coumarin-Säure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Promega, Madison/USA
DMSO	Fluka, Buchs/ Schweiz
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer/ Holland
Ethanol, unvergällt	J.T. Baker, Deventer/ Holland
Ethanol, vergällt	Herbeta, Berlin
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	ICN Biomedicals, Aurora/ USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Luminol	Fluka, Buchs/ Schweiz
Magermilchpulver	Nöll, Büren
(+)MK 801-Maleat	Tocris Cookson, Ellisville/USA
Natriumcarbonat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid, 0,9%	Merck, Darmstadt
Oligo-d(T)-Primer	Promega, Mannheim
PBS-Puffer	Gibco, Paisley/Schottland
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rnasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison/USA
RT-Puffer	Promega, Madison/USA
Salpetersäure (65%)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (37%, rauchend)	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Silan	Amresco, Solon/USA
Silbernitrat	Fluka, Neu-Ulm
Temed	Serva, Heidelberg
Tris	Carl Roth, Darmstadt
Triton	Sigma, St. Louis/ USA

Tween 20	Fluka, Buchs/ Schweiz
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

### 2.3. Verwendete Lösungen

Blotting Transferpuffer	0,04M Tris 0,306M Glycin 20% (v/v) Ethanol 0,1% SDS
Coumarinsäure Ansatzlösung	90mM Coumarinsäure, gelöst in DMSO 0,15g/10ml
DNA-Probenpuffer	0,1% Bromphenolblau 10mM EDTA (pH 8,0) 60% Glycerin 100mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1% Xylencyanol
ECL-Lösung 1	1ml Luminol-Ansatzlösung 0,44ml Coumarin-Ansatzlösung <u>10ml 1M Tris-HCl, pH 8,5</u> auf 100ml mit aqua dest. auffüllen
ECL-Lösung 2	<u>10ml 1M Tris-HCL, pH 8,5</u> auf 100ml mit aqua dest. auffüllen
Essigsäurelösung 1%	5 ml 100 % Essigsäure auf 500 ml mit aqua dest. auffüllen
Laemmli-Puffer	2ml 0,625M Tris/ HCl pH 6,8 0,2g SDS

---

	5ml Glycerin 0,5ml $\beta$ -Mercaptoethanol 0,1ml Bromphenolblau 2,4ml dest. Wasser
Laufpuffer 10x (für Blotting El.phorese)	72,0g Glycerin 15,15g Tris <u>5g SDS</u> auf 500ml mit aqua dest. auffüllen
Luminol Ansatzlösung	250mM Luminol, gelöst in DMSO 0,44g/10ml
Lysispuffer, pH 7,6 (Extraktionspuffer)	50 mM Tris 166 mM KCl 5 mM EDTA 1% Triton X-100
Magermilchlösung	2,5g Magermilchpulver auf 50ml TBS-T
Natriumcarbonatlösung	59,36 g $\text{Na}^2\text{CO}^3$ <u>0,968 ml Formalin</u> auf 2000 ml mit aqua dest. auffüllen
PAGE Laufpuffer	90 ml 10x TBE-Puffer <u>50 ml Glycerol</u> auf 1000ml mit aqua dest. auffüllen
Salpetersäure 2%	15 ml 65% Salpetersäure auf 500 ml mit aqua dest. auffüllen

Sammelgelpuffer 4x, pH 6,8	30,3g Tris <u>2g SDS</u> auf 500ml mit aqua dest auffüllen
Silbernitratlösung	0,6 g Silbernitrat auf 300 ml mit aqua dest. auffüllen
Strippingpuffer	100µl HCl 37% in 50ml Glycin, 100mM
TAE-Puffer 10x, pH 7,7	10 mM EDTA 2,3 % (v/v) Eisessig 0,5M Tris
TBE 10x, pH 8,3	1M Borsäure 20mM EDTA 0,5 M Tris
TBS 10x	88g Natriumchlorid <u>100ml Tris/ HCl (1M/l), pH 7,4</u> auf 1000ml mit aqua dest. auffüllen
TBS-Tween 0,1%	100ml 1xTBS <u>1ml Tween 20</u> auf 1000ml mit aqua dest. auffüllen
Trenngelpuffer 4x, pH 8,8	90,8g Tris <u>2g SDS</u> auf 500ml mit aqua dest. auffüllen

#### 2.4. Testkits

Bicinchoninic Acid Kit

Interchim, Cedex/Frankreich

RNAClean™

AGS, Heidelberg

## 2.5. Enzyme

AmpliTaq® DNA Polymerase

Perkin Elmer, Weiterstadt

MMLV-RT

Promega, Madison/USA

## 2.6. Tiere

Zur Gewinnung der primären Neurone wurden sieben Tage alte Wistar-Ratten (p7), welche von der Tierzucht BgVV Berlin bezogen wurden, verwendet.

## 2.7. Oligonukleotide

Die in dieser Studie zum Einsatz gekommenen, synthetischen Oligonukleotide wurden bei TIB Molbiol (Berlin), bzw. bei BioTeZ Berlin-Buch bezogen. Sie wurden aufgrund von Vorstudien ausgewählt, bzw. mittels eines Primerdesignprogrammes ermittelt. Die verwendeten Primer erfüllen dabei bestimmte Kriterien:

- Vorgegebene gleiche Nukleotidlänge;
- der G/C-Gehalt liegt zwischen 50 und 60%;
- definierte Schmelztemperatur;
- kein Auftreten unerwünschter Sekundärstrukturen (z.B. Haarnadel-Strukturen und Primerdimere).

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Genbank Acs.No.</i>	<i>Produkt</i>
-------------	------------------------	------------------------	----------------

### Apoptotische Gene:

<b>Bcl-2</b>		U34964	347 bp
b2-F	TTATAAGCTGTCGCAGAGG		
b2-R	TGAAGAGTTCCTCCACCAC		
<b>Bcl-x<sub>L</sub></b>		U34963	700 bp
bx-F	AATGTCTCAGAGCAACCGG		
bx-R	CTCCGACTGAAGAGTGAG		
<b>Fas</b>		D26112	227 bp
Fs-F	CCGACAACAACCTGCTCAGA		
Fs-R	GCACCTGCACTTGGTATTC		

**Neurotrophe Faktoren:**

<b>BDNF</b>	D10938	491 bp
BD-F	CGACGTCCCTGGCTGACACTTTT	
BD-R	AGTAAGGGCCCGAACATACGATTGG	
<b>GDNF</b>	L15305	654 bp
GD-F	CGGGACTCTAAGATGAAGTT	
GD-R	CCAGGGTCAGATACATCCAC	
<b>IGF-1</b>	X06043	367 bp
IG-F	GACGCTCTTCAGTTCGTGT	
IG-R	GTGTTCCGATGTTTTGCAGG	
<b>NGF</b>	M36589	491 bp
NG-F	CTGAACCAATAGCTGCCCGTGTGAC	
NG-R	GGCAGCCTGTTTGTCTGTTGTC	
<b>NT-3</b>	M34643	484 bp
NT-F	GGTCAGAATTCCAGCCGATGATTGC	
NT-R	CAGCGCCAGCCTACGAGTTTGTGT	

**Kontrollgene ("Housekeeping genes") als interne Standards:**

<b><math>\beta</math>-Actin</b>	V01217	433 bp (cDNA) /
$\beta$ -F	CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG	897 bp (DNA)
$\beta$ -R	GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG	

**2.8. Molekulargewichtsmarker**M $\phi$ X 174 DNA/Hae III Marker

Promega, Mannheim

**2.9. Auswertungssoftware**

Die Polyacrylamidgele wurden vor der Auswertung einer Silberfärbung unterzogen, um dann densitometrisch mittels der BioDoc-Analyze® Software von Whatman Biometra, Göttingen ausgewertet zu werden.

Die belichteten Röntgenbilder wurden nach Einscannen mittels der Software Tina 2.09 G (Fa. Raytest) gemäß den Angaben des Herstellers ausgewertet.

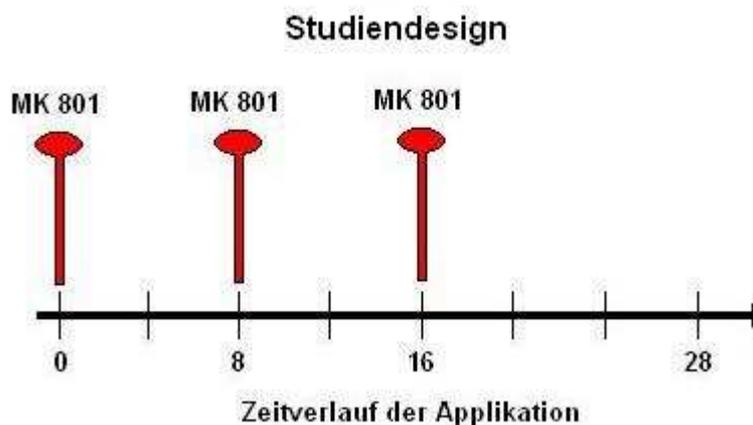
### 2.10. Sonstige Hilfs- und Verbrauchsmittel

Chromatographiepapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Glasplatten (verschied. Größen)	Diagen, Hilden
Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell/USA
Inkubationsboxen	Genhunter, Nashville/USA
Nitrocellulose-Blottingmembranen	Schleicher & Schuell, Dassel
PCR-Reaktionsgefäße (0.2ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen (10, 200, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0.5, 2.0ml)	Eppendorf, Hamburg
Roentgenfilm	Amersham, Buckinghamshire/UK
Spacer	Qiagen, Hilden

### 3. Methoden

#### 3.1. Applikation des Medikamentes

7 Tage alten Wistar-Ratten wird einmal (zum Zeitpunkt 0 h), zweimal (0 h und 8 h) oder dreimal (0 h, 8 h und 16 h) die Substanz (+)MK 801 (Dizocilpine Maleat, Tocris Cookson, Ellisville/USA) intraperitoneal verabreicht. Eine Dosis entspricht 0,5 mg/kg. Das Injektionsvolumen entspricht hierbei 10 ml/kg Körpergewicht, als Lösungsmittel dient 0,9% NaCl. Die Tiere sind der Medikamentenwirkung bis zu 28 h nach der ersten Injektion ausgesetzt. Eine Tiergruppe besteht aus 6 Tieren: eine Test-Gruppe, die MK 801 erhält sowie die Kontroll-Gruppe, die ausschließlich NaCl erhält. Dadurch lässt sich ein Vergleich zwischen MK 801 und einer im Zeitverlauf zugehörigen Kontrolle erstellen.



**Abb.7:** Applikationsschema für Dizocilpin (MK-801 = Dosiseneinheit von 0,5 mg/kg)

#### 3.2. Präparation der Rattengehirne

Unmittelbar nach Beendigung der Medikamentenexposition wird nach vorheriger Aethernarkose jeweils eine Tiergruppe durch Dekapitation getötet. Mittels eines Spatels wird das Gehirn entnommen und die Hirnregion des Cortex retrosplenialis sowie der Gyrus cinguli freipräpariert. Die Präparation erfolgt auf beiden Hemisphärenseiten. Das gewonnene Material wird in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

### 3.3. Extraktion der Gesamt-RNA mit RNAClean

Die RNA-Präparation aus Hirngewebe verfolgt das Prinzip der sauren Guanidiniso-thio-cyanat-Phenol-Chloroform Extraktionsmethode. Hierbei wird das bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerte Gewebe zuerst homogenisiert. Dazu wird es in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit der etwa 10-fachen Menge an RNAClean versetzt. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren und anschließendes Vortexen wird es homogenisiert. Die jetzt folgende RNA-Extraktion wird durch Zugabe von Chloroform eingeleitet (etwa 1/10 der RNAClean-Lösung). Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 12.000 g wird die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von Isopropanol und erneuter Zentrifugation kommt es zur RNA-Präzipitation. Es entsteht ein gelartiges Pellet. Es folgen einige Waschschrirte gemäß den Herstellerangaben. Nach vorherigem Trocknen der Pellets werden diese nun in 50  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser resuspendiert und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mittels eines Photometers wird bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) die RNA-Konzentration der einzelnen Proben bestimmt. Die Nukleotide weisen bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum auf. Im Gegensatz dazu zeigen Proteine ein Maximum bei 280 nm ( $A_{280}$ ). Dadurch lässt sich mit Hilfe des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmen. Angestrebt wird bei nicht verunreinigter Lösung ein Wert zwischen 1,65 und 2,0.

### 3.5. RNA-Kontrollelektrophorese

Eine Kontrollelektrophorese erlaubt Aussagen über die Integrität der gewonnenen RNA innerhalb der einzelnen Proben, mögliche Verunreinigungen durch genomische DNA werden untersucht. Durchgeführt wird sie in Form einer Agarose-Elektrophorese. Mittels eines Agarosegels lassen sich Moleküle mit einer Größe  $>10\text{nm}$  separieren. In Abhängigkeit vom Probenmaterial wird die Konzentration des

Agarosegels bestimmt: für ein 2,0-%iges Gel werden 2,0 g Agarose in 100ml 1x TAE-Puffer pH 7,7 (10 mM EDTA, 2,3 % (v/v) Eisessig, 0,5M Tris entspricht 10x TAE) gelöst und in der Mikrowelle erhitzt, bis eine gleichmäßige Lösung einsetzt. Die Gellösung wird in eine Kammer gefüllt, bis ca. 1/3 der Zähne des Kamms gleichmäßig und ohne Luftblasen bedeckt sind. Nach Abkühlung des Gels wird der 1xTAE-Puffer als Laufpuffer dazugegeben.

Von jeder Probe werden 500 ng RNA mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 9µl verdünnt und anschließend mit 1 µl RNA-Probenpuffer versehen. Analog dazu wird auch ein Gewichts-Marker erstellt (9µl MφX-Marker von Promega, Mannheim + 1 µl Puffer). Anschließend werden alle Proben, mit Ausnahme des thermolabilen Markers, für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt. Dies dient dazu, unerwünschte Sekundärstrukturen zu eliminieren.

Nach dem Auftrag der Proben auf das Gel wird initial für 10 Minuten eine Spannung von 50 V angelegt, um die Nukleotidbande zu konzentrieren. Anschließend wird die Spannung auf 80 V gesteigert, bis eine angemessene Laufstrecke absolviert ist (ca. 30-60 min). Nachfolgend wird das Gel für 30 Minuten in Ethidiumbromidlösung 1:10.000 entwickelt. Nach kurzem Waschen des Gels in destilliertem Wasser können die RNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels eines Photos dokumentiert werden.

### **3.6. Semiquantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion erlaubt es, selbst geringste Mengen an DNA einer Analyse zu unterziehen, da mit ihrer Hilfe eine quantitative Amplifikation des Ausgangsmaterials möglich wird. Mit der Einführung der Reversen Transkription läßt sich auch RNA amplifizieren. Da die Taq-Polymerase einzelsträngige RNA nicht als Matrize verwenden kann, muß die beinhaltete Information erst in einen DNA-Strang umgeschrieben werden. Dies geschieht unter Zuhilfenahme einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase. Sie synthetisiert an der Ausgangs-RNA einen komplementären DNA-Strang, der durch die Taq-Polymerase zum Doppelstrang (cDNA) vervollständigt wird.

Zur tatsächlichen Mengenabschätzung jeder Probe wird ein unabhängiger Standard, der innerhalb jeder Zelle konstant bleibt, bestimmt. Diese Funktion übernehmen die

sogenannten Housekeeping-Gene. Ihre Genprodukte werden in jeder Zelle zu jeder Zeit in gleichem Maße exprimiert. Somit ist auch das Signal nach Amplifikation konstant. Somit wird die RNA eines Housekeeping-Gens, in diesem Fall  $\beta$ -Actin, zusätzlich in der Probe revers transkribiert und in der PCR coamplifiziert. Nun lassen sich beide Signale zueinander ins Verhältnis setzen und somit semiquantitative Abschätzungen vornehmen. Bezeichnet wird dieses Verfahren auch als Prinzip der internen endogenen Standardisierung.

Das eingesetzte Probenmaterial wird in der PCR nicht linear vervielfältigt. Vielmehr verläuft dieser Prozeß in zwei aufeinanderfolgenden Phasen: zuerst kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation, die später in einem Plateau mündet. Somit ist eine reale semiquantitative Abschätzung nur in der exponentiellen Phase zulässig, da ansonsten die aufzuzeigenden Unterschiede nivelliert würden.

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgt mittels der Gelelektrophorese. Hierbei wird ein Polyacrylamidgel nach vollzogener Elektrophorese einer Silberfärbung unterzogen, photographiert und densitometrisch ausgewertet.

### **3.6.1. Reverse Transkription spezifischer Gene**

Das gewonnene Probenmaterial kann in Form von RNA nicht im PCR-Verfahren bearbeitet werden. Hierzu ist erst der Schritt der reversen Transkription notwendig, um cDNA zu gewinnen. Von jeder Probe wird ein Volumenäquivalent von 500 ng in ein Eppendorfgefäß eingesetzt, mit PCR-Wasser auf 13,5  $\mu$ l aufgefüllt und mit 1  $\mu$ l des oligo-d(T)-Primers (Promega, Mannheim) versetzt. Dieser Primer dient dem RT-Enzym später in Form eines poly-A-Schwanzes als Startpunkt. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert, für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und danach für einige Minuten auf Eis gelegt. Hiermit wird sichergestellt, daß innerhalb der RNA keine Doppelstränge mehr vorliegen. Währenddessen kann der RT-Prämix vorbereitet werden. Dieser setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen (Mengenangaben pro Ansatz):

- 0,5  $\mu$ l RNasin (ein RNase-Inhibitor)
- 5,0  $\mu$ l dNTP (2mM),  
Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 5,0  $\mu$ l 5x RT-Puffer
- 1,0  $\mu$ l RT Enzym (alle Produkte von Promega, Madison/USA)

Durch Zugabe des RT-Enzyms wird die reverse Transkription gestartet. Alle Proben werden für eine Stunde bei 42°C, der optimalen Temperatur für cDNA-Produktion, inkubiert. Hierauf werden alle Proben kurz zentrifugiert und für fünf Minuten in ein 95°C Wasserbad gegeben, um das RT-Enzym zu denaturieren. Danach kommen die Proben wieder auf Eis.

### **3.6.2. cDNA Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die in der reversen Transkription gewonnene cDNA dient nun als Matrize (Template) für die Polymerase Kettenreaktion. Hier werden gezielt cDNA-Abschnitte vervielfältigt. Um diese Spezifität zu gewährleisten, benötigt man sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer), die sich während der PCR an den entsprechenden Abschnitt anlagern. Neben dem Template und den Primern werden noch temperaturstabile DNA-Polymerasen gebraucht.

Jede PCR verläuft nach einem vergleichbaren Schema, das sich innerhalb spezieller Zyklen bewegt. Begonnen wird mit einem Denaturierungszyklus, in welchem die doppelsträngige cDNA auf 92-95°C erhitzt wird. Dieses Vorgehen ermöglicht erst die Anlagerung komplementärer Nukleotide an die DNA-Stränge im nächsten Zyklus (Annealing), der bei einer Temperatur von 50-60°C abläuft. Die angelagerten Oligonukleotide werden im nächsten Zyklus durch die DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Die optimale Temperatur hierfür liegt bei 72°C.

Unter Umständen denaturiert doppelsträngige DNA schon bei nichtoptimalen Temperaturen, was zu unspezifischen Primeranlagerungen führen kann. Um dies zu vermeiden, wird die PCR nach dem „Hotstart“-Prinzip durchgeführt: es basiert auf dem Einsatz modifizierter DNA-Polymerasen, die ihre Elongationsaktivität erst nach Erhitzen auf 94°C erlangen. Sie lassen sich direkt im PCR-Ansatz mit allen übrigen Komponenten vermengen, wobei keine unspezifische Elongation vor dem ersten Denaturierungsschritt möglich ist.

Aus dem PCR-Puffer, den dNTPs, Primern und der DNA-Polymerase wird unter Zugabe von Wasser erst ein sog. Mastermix erstellt, der dann in die 0,2 ml PCR-Tubes vorgelegt werden kann. Alle Pipettierschritte werden stets auf Eis durchgeführt. Die Zusammenstellung erfolgt nach folgendem Pipettierschema (Mengenangaben pro Sample):

- 5  $\mu$ l 10x PCR-Puffer
- 5  $\mu$ l dNTPs (2mM)
- je x  $\mu$ l F- (**F**orward) und R- (**R**everse) Primer, spezifisch für den zu untersuchenden Genabschnitt
- je y  $\mu$ l F- und R-Primer des Housekeeping-Genes  $\beta$ -Actin
- 0,3  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- ad 49  $\mu$ l PCR-H<sub>2</sub>O

Nach kurzem Zentrifugieren wird in jedes PCR-Gefäß ein Volumen von 49  $\mu$ l des Mastermix vorgelegt und 1  $\mu$ l der jeweiligen cDNA hinzugefügt, womit das Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l erreicht wird. Die PCR wird im "hot start" begonnen, d.h. die Proben werden erst in den Thermocycler gestellt, sobald sich dieser auf 94°C vorgeheizt hat. Die Bedingungen der einzelnen PCR-Ansätze sowie die eingesetzten Primermengen lassen sich den Tabellen auf der folgenden Seite entnehmen.

Gen	Menge an Gen F- und R-Primer	Menge an $\beta$ -Actin F-und R-Primer
BDNF	0,5	0,5
NT3	0,5	0,5
NGF	3	0,75
GDNF	1,5	0,5
IGF-1	1,5	1
Fas	1	1
TNF- $\alpha$	1	1

(Angaben in  $\mu$ l )

**Tab.1:** Eingesetzte Primermengen für das jeweilige Gen und den internen Standard.

Primer	BDNF/NT <sub>3</sub> / NGF	GDNF	IGF-1	Fas	TNF- $\alpha$
Initiale Denaturierung	94°C/ 2 min	94°C/ 5 min	92°C/ 2 min	94°C/ 2 min	94°C/ 4 min
Denaturierung	94°C/ 30 sec	94°C/ 30 sec	94°C/ 30 sec	94°C/ 30 sec	94°C/ 30 sec
Annealing	56°C/ 1 min	54°C/ 1 min	56°C/ 1 min	56°C/ 1 min	56°C/ 1min
Primer Elongation	72°C/ 1 min	72°C/ 1 min	72°C/ 1 min	72°C/ 1 min	72°C/ 1min
Zyklen	30	32	28	28	30
Extension	72°C/ 7 min	72°C/ 7 min	72°C/ 7 min	72°C/ 7 min	72°C/ 7min
Abkühlung	4°C/ $\infty$	4°C/ $\infty$	4°C/ $\infty$	4°C/ $\infty$	4°C/ $\infty$

**Tab. 2:** Bedingungen der jeweiligen PCR-Ansätze

### 3.7. Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

#### 3.7.1. Herstellung des Gels

Zur Herstellung des ca. 1 mm dicken Gels werden zwei Glasplatten benötigt, die vor Gebrauch mit Ethanol gereinigt werden. Eine der beiden Platten ist mit kleinen „Taschen“ zum Probenauftrag versehen. Auf diese sog. Spacerplatte wird nun eine kleine Menge an Silanlösung (Amresco, Solon/USA) aufgebracht und sorgfältig verrieben. Somit wird ein Festkleben des Gels an der Glasoberfläche verhindert. Nun kann der Silikon-Spacer, der das Auslaufen von Flüssigkeit verhindert, aufgelegt werden. Auf die Oberfläche der zweiten Platte werden einige Tropfen destillierten Wassers aufgebracht, auf die wiederum die Gelträgerfolie gelegt wird. Durch Abdecken mit Zellstoff und anschließendem Anpressen des Films an das Glas durch eine Rolle wird der Trägerfilm an die Platte fixiert. Jetzt werden beide Glasplatten passend aufeinander gelegt und mittels Klammern befestigt. Überschüssige Trägerfolie wird abgeschnitten.

Für ein 5%iges Polyacrylamid-Gel benötigt man 4,5 ml 10x TBE-Puffer pH 8,3 (1M Borsäure, 20mM EDTA, 0,5 M Tris), 2,5 ml Glycerol und 12,5 ml 20%

Acrylamidlösung. Dies wird auf 50 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und durch die Zugabe von 100 µl 30% Ammoniumpersulfat (APS) und 45 µl Temed binnen Minuten zum Auspolymerisieren gebracht. Innerhalb dieses Zeitraumes kann die Gellösung vorsichtig zwischen die beiden Glasplatten gegossen werden, ohne dabei Luftblasen zu erzeugen. Zur kompletten Polymerisation belässt man das Gel mindestens 45 Minuten. Generell zeichnen sich Polyacrylamidgele im Vergleich zu Agarosegelen durch ein höheres Auflösungsvermögen bei der Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten aus. Sie weisen eine hohe Gelfestigkeit auf, und zeigen während der Silberfärbung (s.u.) eine gute Auflösung und reduzierte Hintergrundfärbung.

### **3.7.2. Vorbereitung der Proben**

Alle einzusetzenden Proben werden analog vorbereitet: jeweils 9 µl des PCR-Produkts werden mit 1 µl des blauen DNA-Probenpuffers (0,1% Bromphenolblau, 10mM EDTA (pH 8,0), 60% Glycerin, 100mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1% Xylencyanol) versetzt. Gleichermaßen wird der Gewichtsmarker zur Größenabschätzung der einzelnen Fragmente erstellt. Zu 9 µl des M $\phi$ X-Markers wird 1 µl des Puffers hinzugegeben. Mit Ausnahme des thermosensiblen Markers werden alle Proben vor dem Auftragen auf das Gel noch 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend für zwei Minuten auf Eis gelagert.

### **3.7.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Elektrophorese wird in einer TGGE-Gelkammer durchgeführt. Hierbei ist zwischen den Pufferbehältern eine auf 15°C temperierbare Kühlplatte integriert, die vor Benutzung eingeschaltet wird. 0,1% Tritonlösung (Sigma, St. Louis/ USA) wird luftblasenfrei zwischen Platte und Gel pipettiert, anschliessend wird das auspolymerisierte Gel auf die Kühlplatte gelegt. Sie dient als Wärmeleiter. Generell sollen durch das Kühlsystem lokale Aufheizungen bzw. Temperaturgradienten innerhalb des Gels vermieden werden, da diese das Probenlaufverhalten negativ beeinflussen könnten. In die Pufferbehälter wird jeweils 500 ml PAGE-Laufpuffer (90 ml 10x TBE-Puffer, 50 ml Glycerol, auf 1000ml mit aqua dest. auffüllen) gegeben. Mittels zweier puffergetränkter Baumwolltücher kann nun zwischen den Reservoirs

und dem Gel ein elektrischer Kontakt hergestellt werden, wobei die Tücher die Ränder des Gels möglichst gleichmäßig bedecken sollten. Als Kondensationsschutz wird das Gel von oben mit einer Glasplatte versehen.

Um alle noch vorhandenen ionischen Kräfte innerhalb des Gels zu eliminieren, ist ein kurzer Vorlauf der Elektrophorese ohne Proben vonnöten. Hierbei wird eine Leistung von 10 Watt für 10 Minuten an das Gel angelegt. Hiernach kann der Probenauftrag stattfinden, maximal können inklusive des Markers 27 Proben zeitgleich untersucht werden. Nach erneutem Verschluss des Gels durch die Glasplatte wird ein zweites Mal eine Leistung von 10 W an das Gel angelegt. Hierdurch erreicht man innerhalb von etwa 10 Minuten eine ausreichende optische Trennung der Farbstoffbanden des Probenpuffers. Nun kann die eigentliche Elektrophorese stattfinden, d.h. eine Leistung von 25 W wird angelegt. Die Banden erreichen das untere Ende des Gels nach einer Laufzeit von ca. 90 Minuten. Danach wird das Gel entnommen und kurz in destilliertem Wasser gewaschen.

### 3.8. Silberfärbung

Die Silberfärbung dient der optischen Darstellung der einzelnen Banden. Für Nukleinsäuren gehört sie zu den sensitivsten Methoden. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,003 ng/mm<sup>2</sup>. Die Nukleinsäuren führen dabei zu einem veränderten Redoxpotential, so daß sich elementares Silber abscheidet.

Das Gel wird, nachdem es kurz gewaschen wurde, mit verschiedenen Lösungen auf einem Kipptisch inkubiert. Hierzu dient eine auf einem Wipptisch stehende Kunststoffwanne. Versuchsablauf:

- 3 Minuten 2% ige Salpetersäure
- 3x mit destilliertem Wasser spülen
- 20 Minuten Silbernitratlösung (Inkubation)
- 3x mit destilliertem Wasser spülen
- Natriumcarbonatlösung ca. 15 Minuten einwirken lassen, beobachten und ggf. wechseln, wenn diese zu "schlammig" erscheint (entspricht der eigentlichen Entwicklung)
- 3x mit destilliertem Wasser spülen (neutralisiert pH, dient daher als Stopper-Lösung)
- 3 Minuten 1% ige Essigsäure (Fixierung der Färbung)

- 3x mit destilliertem Wasser spülen
- 4 Minuten aqua dest.
- 5 Minuten 2 % ige Glycerollösung (Konservierung)

Silberbeläge werden nach dem letzten Schritt mit einem weichen, tropfnassen Schwamm vorsichtig abgewischt. Anschließend wird das Gel über Nacht im Wärmeschrank getrocknet.

### 3.9. Densitometrische Auswertung

Nach erfolgter Silberfärbung werden die Gele mittels der BioDocAnalyse® Software (What-man Biometra, Göttingen) ausgewertet. Anhand der Fläche einer Bande und ihrer jeweiligen Intensität wird ihr ein entsprechender, relativer Volumenanteil zugewiesen. Dieser Wert kann als semiquantitatives Maß genutzt werden.

Als Grundlage für diese Berechnung dient der Vergleich zwischen der zu untersuchenden Genbande und ihrer entsprechenden Kontrollbande in Form von  $\beta$ -Actin. Nach den Kriterien, die ein interner Standard zu erfüllen hat, sollte seine Expression unter allen Umständen gleichmäßig sein. Da aber durch die hohe Sensitivität der PCR Amplifikationsschwankungen auftreten können, müssen die für  $\beta$ -Actin erhaltenen Werte stets nach einem Korrekturschema gemittelt werden, um als Referenzwert dienen zu können. Dazu wird der hierfür erhaltene Wert mit 100% gleichgesetzt. So erhält man für die zu untersuchenden Banden prozentuale Angaben, die sich im Vergleich auf den internen Standard beziehen. Unterschiede im mRNA-Gehalt der einzelnen Proben lassen sich als Veränderung dieser prozentualen Werte ablesen.

### 3.10. Extraktion der Proteinfractionen

Wie für die Durchführung der PCR die Extraktion von RNA nötig ist, so muss für den Western Blot der Proteinanteil extrahiert werden. Während die Proben hierfür gewogen werden müssen, kann der Extraktionspuffer pH 7,6 (entspricht dem Lysis Puffer: 50 mM Tris, 166 mM KCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) angesetzt werden. Dieser Puffer beinhaltet eine Mischung aus Protease- und Phosphataseinhibitoren: 1

mM Phenylmethan-Sulphonyl- fluoride (PMSF), 0.5 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 2 mg/ml Aprotinin sowie 1 mM Natrium- Orthovanadate. Die tiefgefrorenen Gewebeproben werden in eine Phiole gegeben und mit 10x Extraktionspuffer versetzt. Mit einem hochfrequent drehenden Stab wird das Gewebe bei 900 rpm homogenisiert und dann zurück in das Eppendorfgefäß gegeben.

Für zehn Minuten werden die Proben bei 1050 xg zentrifugiert. Dabei entsteht ein Überstand, der die cytosolische und die mitochondriale Proteinfraction enthält. Im Pellet bleiben die nukleären Anteile. Der Überstand wird vorsichtig in ein neues Gefäß transferiert und für 20 Minuten bei 17.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der neu entstandene Überstand besteht ausschließlich aus cytosolischem Material, das zu resuspendierende Pellet aus dem mitochondrialen Anteil der Zellen. Alle Fraktionen werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.11. Konzentrationsbestimmung der Proteinfractionen**

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels des Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit® (Interchim, Cedex/Frankreich). Das Verfahren basiert auf der kolorimetrischen Detektion und Quantifizierung des Gesamtproteingehalts. Die Methode kombiniert die bekannte Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine innerhalb eines alkalischen Mediums mit der hochsensitiven und selektiven Detektion eines  $\text{Cu}^+$ -Kations. Das purpurfarbene Reaktionsprodukt wird durch einen Chelatkomplex aus zwei BCA-Molekülen mit einem zentralen Cu-Ion gebildet.

Dieser wasserlösliche Komplex zeigt bei 562 nm eine starke Absorptionsrate, die linear zur Proteinkonzentration ansteigt. Zur Durchführung wird BSA als Standardprotein herangezogen. Alle Samples, inklusive BSA, werden in PBS-Puffer (Gibco, Paisley/Schottland) gelöst und auf Mikroplatten verteilt. Hierzu wird das vorbereitete Arbeitsreagenz gegeben. Nach kurzem Schütteln werden die Proben für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird im Wallac Multilabelcounter bei 562 nm die entsprechende Absorptionsrate als Farbumschlag ermittelt.

## 3.12. Western Blot Analysen

### 3.12.1. Vorbereitung des Gels

Vergleichbar zur Vorbereitung des PAGE-Gels werden auch hier 2 Glasplatten benötigt, die zuvor mit Ethanol gereinigt werden. Auf eine der beiden Platten wird am Rand der Silikon-Spacer aufgelegt, der ein Auslaufen von Flüssigkeit verhindert. Beide Platten können durch Clips miteinander fixiert werden. Auf die Glasplatte sollte 2 cm unterhalb des Randes eine Markierung angebracht werden, die die Grenze zwischen Sammel- und Laufgel darstellt.

Für das Laufgel (10,5 %) benötigt man 5 ml des Laufgelpuffers (pH 8,8), 5,75ml destillierten Wassers und 4 ml Acrylamid. Mit zwei Pipetten wird gleichzeitig 50 µl Temed und 200 µl APS hinzugegeben, das sofort zur Polymerisation führt. Die Gellösung wird nun bis zum Erreichen der Markierung vorsichtig zwischen die Glasplatten gegossen. Unmittelbar darauf wird auf die Lösung ein wenig Isopropanol aufgetragen, um eventuell vorhandene Luftblasen zu eliminieren. Während des Zeitraumes von ca. 30 Minuten, die das Gel zur Polymerisation benötigt, kann nach dem gleichen Schema das Sammelgel (4 %) vorbereitet werden: 2,5 ml Sammelgelpuffer (pH 6,8), 3,75 ml destilliertes Wasser und 1 ml Acrylamid werden mit 30 µl Temed und 80 µl APS zur Polymerisation gebracht. Nach Entfernen des Isopropanol kann die Lösung zwischen die Platten gegossen werden. Sofort danach sollten Luftblasen mittels einer kleinen Kanüle entfernt und ein kleiner Kamm, dessen Zinken die Probenaschen formen, in das Gel eingebracht werden. Bis zur weiteren Verwendung benötigt das Gel etwa 30 Minuten.

### 3.12.2. Vorbereitung der Proben

Die Proben werden, auf Eis liegend, langsam zur Verwendung aufgetaut. Aus jeder Probe wird ein Proteinäquivalent von 20 µg entnommen und in ein separates Eppendorfgefäß überführt. Das entsprechende Volumen wird mit PCR-Wasser auf insgesamt 9µl aufgefüllt, danach dieselbe Menge an Lämmli-Puffer (2ml 0,625M Tris/HCl pH 6,8; 0,2g SDS; 5ml Glycerin, 0,5ml β-Mercaptoethanol; 0,1ml Bromphenolblau; 2,4ml dest. Wasser) dazugegeben, so dass das Gesamtvolumen 18 µl beträgt. Ebenso wird zur Herstellung des Protein-Gewichtsmarkers verfahren:

3 $\mu$ l des Markers + 6 $\mu$ l PCR-Wasser + 9 $\mu$ l Lämmli-Puffer. Alle Proben, inclusive des Markers, werden im Thermomixer für 5 Minuten bei 95°C inkubiert, danach für weitere 2-3 Minuten auf Eis gelegt.

### **3.12.3. Elektrophorese**

Die Biometra-Elektrophoresekammern beinhalten ein oberes und ein unteres Pufferreservoir. Ein Teil des Laufpuffers (10x Laufpuffer: 72,0g Glycerin, 15,15g Tris, 5g SDS, auf 500ml mit aqua dest. auffüllen) wird vorab in das untere Reservoir gefüllt. Von den Glasplatten können die Clips und Silikonspacer wieder vorsichtig entfernt werden, die Platten selbst werden inklusive des Gels in aufrechter Position an die Kammer fixiert. Nun kann der Rest des Laufpuffers unter Vermeidung von Luftblasen in das obere Reservoir gegeben werden. Der Kunststoffkamm wird vorsichtig entfernt, mit einer Nadel die Taschenwände in aufrechte Position gebracht. Ebenso werden mittels einer Nadel alle Gelreste entfernt.

Alle Proben werden kurz zentrifugiert und dann aufgetragen. Hierbei sollte zwischen jeder Probe eine leere Tasche sein, um einen ausreichenden Abstand zu gewährleisten. Für die Dauer von 30 Minuten wird jetzt eine Spannung von 100 Volt angelegt, um die Proteinbanden zu konzentrieren. Hierbei durchlaufen sie den Bereich des Sammelgels. Danach wird eine Spannung von 160 Volt angelegt. Nach ca. 90 Minuten ist die Elektrophorese beendet.

### **3.12.4. Blotten und Hybridisieren**

Unmittelbar vor Beendigung der Elektrophorese wird der Blotting Transfer-Puffer (0,04M Tris, 0,306M Glycin, 20% (v/v) Ethanol, 0,1% SDS) angesetzt. In diesem werden die aus den Glasplatten vorsichtig gelösten Gele für 20 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Pro Gel wird ein Stück Nitrocellulosemembran gleicher Größe und einige Stücke Chromatographiepapier zurechtgeschnitten und zusammen mit den Schwämmen im Puffer inkubiert. In der Reihenfolge Schwamm, 2x Chromatographiepapier, Gel, Nitrocellulosemembran, 2x Chromatographiepapier (bei 2 Gelen ggf. wiederholen) und Schwamm werden die einzelnen Komponenten in die Gelkassette gelegt, fixiert und in den Biometra-Blottingtank gehängt. Für etwa 90 Minuten wird eine Stromstärke von 150 mA angelegt. Ziel ist es, mit dieser Methode

die elektrophoretisch getrennten Proteine von dem Gel auf die Nitrocellulosemembran zu übertragen.

Nach Ablauf des Blots werden die Membranen kurz gewaschen und die Markerbanden eingezeichnet. Um eine gleiche Menge an Protein pro Bande zu beweisen, werden die Membranen für ca. 10 Minuten in Ponceau-Rot-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) inkubiert. Durch die Anfärbung können die Banden in gleicher Intensität sichtbar gemacht werden. Nach kurzem Waschen in dest. Wasser können die Membranen durch waschen in TBS-Tween (Fluka, Buchs/ Schweiz) wieder entfärbt werden.

Die Membranen werden für zwei Stunden in einer 5% igen Magermilchlösung, gelöst in TBS-Tween, bei Raumtemperatur inkubiert. Dies hat den Zweck, alle noch freien Bindungen, die sich negativ auf die Immunreaktion auswirken könnten, zu blockieren. Anschließend folgen noch einige Waschvorgänge in TBS-Tween.

### **3.12.5. Immunreaktion**

Durch die Immunreaktion werden die auf der Membran befindlichen Proteine mit spe-zifischen Antikörpern inkubiert. Dadurch lassen sich die gesuchten Proteine später durch eine gekoppelte Enzymreaktion optisch auf einem Röntgenfilm darstellen.

Der erste Antikörper, mit dem inkubiert wird, richtet sich spezifisch gegen das zu unter-suchende Protein. Für diesen Vorgang wird der Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:2000 (in Abhängigkeit vom Protein) in eine 0,1% ige TBS-Tween-Lösung mit 1% BSA gegeben. Die Membran wird zusammen mit der Lösung in eine kleine Inkubationsbox gegeben und über Nacht bei +4°C unter leichtem Schütteln belassen. Nach einigen Waschsritten in TBS-Tween kann die Membran mit dem zweiten Antikörper behandelt werden. Dieser ist, um die Entwicklungsreaktion zu gewährleisten, mit einer Peroxidase gekoppelt. Es handelt sich bei diesem Antikörper um einen IgG Anti-Kaninchen oder Anti-Hasen Antikörper. Dieser Inkubationsschritt verläuft analog zum ersten: der Antikörper wird in 0,1 % TBS-Tween Lösung mit 1% BSA gegeben, darauf wird die Membran in der Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Anschließend folgen erneut einige Waschvorgänge in TBS-Tween.

### 3.12.6. Entwicklung und Stripping

Der Entwicklungsvorgang wird mit Hilfe der beiden ECL-Lösungen durchgeführt. In ihnen ist Luminol enthalten, was bei Reaktion mit der Peroxidase, die mit dem zweiten Antikörper konjugiert ist, Licht erzeugt. So entsteht auf dem Röntgenfilm eine photographische Abbildung der gesuchten Proteinbanden.

Mit Beginn der Entwicklung wird die Membran für etwa 1 Minute getrocknet. Währenddessen wird zu 3 ml der ECL-Lösung II (10ml 1M Tris-HCl, pH 8,5; auf 100ml mit aqua dest. auffüllen) 1,8 µl Wasserstoffperoxid hinzugegeben und kräftig geschüttelt. Danach werden 3 ml der ECL-Lösung I (1ml Luminol-Ansatzlösung, 0,44ml Coumarin-Ansatzlösung, 10ml 1M Tris-HCl, pH 8,5, auf 100ml mit aqua dest. auffüllen) hinzugefügt. Die Membran wird in einer Entwicklungsbox platziert, eine Minute mit der ECL-Lösung inkubiert und darauf in Klarsichtfolie gewickelt in die Filmkassette gegeben. Unter Rotlicht wird ein Röntgenfilm auf der Membran platziert, die Kassette geschlossen und somit die Belichtung gestartet. Die Expositionsdauer richtet sich individuell nach dem gesuchten Protein und seinem Aktivitätszustand, in der Regel zwischen einigen Sekunden bis zu mehreren Minuten. Der belichtete Film wird von der Entwicklungsmaschine fertig entwickelt ausgegeben.

Nach einigen Waschvorgängen kann die Membran ggf. gestrippt werden, d.h. die vorhandenen Antikörper werden wieder gewaschen und eine erneute Hybridisierung mit anderen Antikörpern ist möglich. Hierzu wird die Membran in 50 ml 100 mM Glycinlösung mit 100 µl HCl (37%) für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Nachdem die gestrippte Membran noch einige Male in TBS-Tween gewaschen wurde, kann sie erneut verwendet werden.

### 3.12.7. Densitometrische Auswertung der Filme

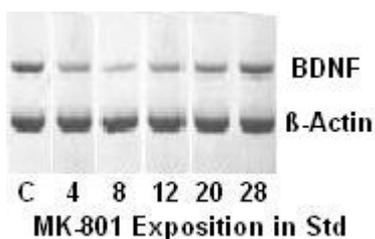
Der belichtete Film wird nach Einlesen durch einen Scanner durch das Softwareprogramm Tina 2.09 G ausgewertet. Das Auswertungsverfahren verläuft nach Angaben des Herstellers. Auch hier wird der Vergleich zu dem internen Standard  $\beta$ -Actin herangezogen, um semi-quantitative Aussagen zu ermöglichen.

## 4. Ergebnisse

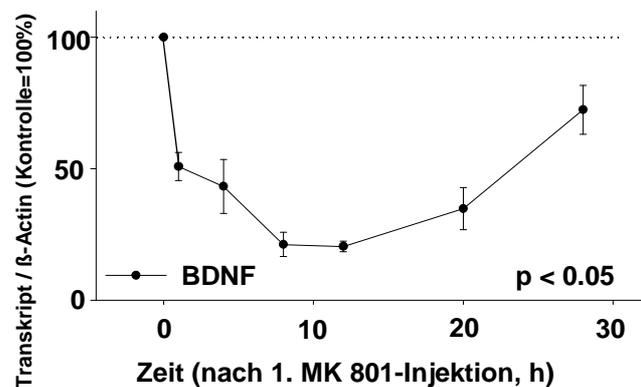
### 4.1. NMDA-Rezeptor-Blockade induziert eine Unterregulation der Neurotrophin-Synthese

Um mögliche Mechanismen zu untersuchen, die an der Pathogenese der MK-801-induzierten apoptotischen Neurodegeneration involviert sind, wurde getestet, ob und wie dieser NMDA-Antagonist die Expression von BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3 (*neurotrophin 3*), GDNF (*glial cell derived neurotrophic factor*) und NGF (*nerve growth factor*) im sich entwickelnden Rattengehirn beeinflusst. Die Gabe von MK-801 bewirkt eine deutliche Reduktion des kortikalen m-RNA-Levels von BDNF, wie sich im scharfen und anhaltenden Abfall der der Gen-Expression ablesen lässt ( $p < 0.05$ , Abb. 8a). Ebenfalls kann eine Unterregulation für m-RNA-Level von NT-3 (Abb. 8b) sowie von GDNF ( $p < 0.001$ , Abb. 8c) gezeigt werden. Das Maximum der Herab-Regulation für die untersuchten Neurotrophine zeigte sich zu einem Zeitpunkt von 8-12 Stunden nach MK-801-Exposition. Gleichbleibende m-RNA-Level zeigten sich während des Experimentes für NGF, hier ist keine Reduktion erkennbar (Abb. 8d).

a)

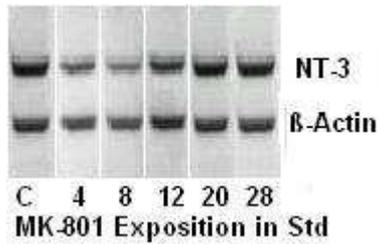


b)

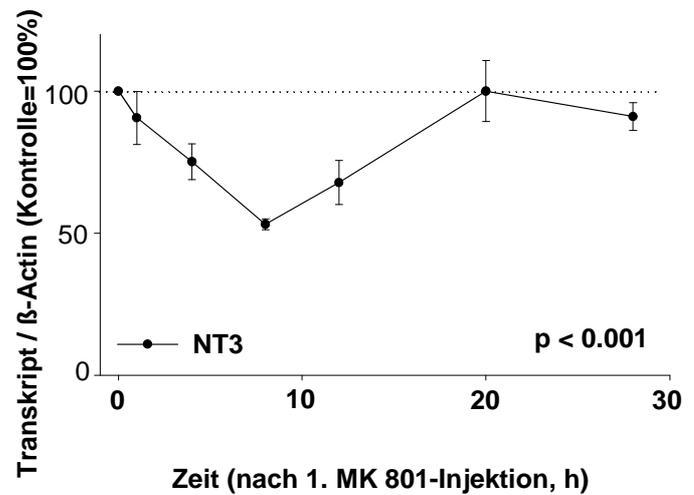


**Abb. 8a:** Einfluss von MK-801 auf die Expression von BDNF mRNA im Cortex cinguli / retrosplenialis

a)

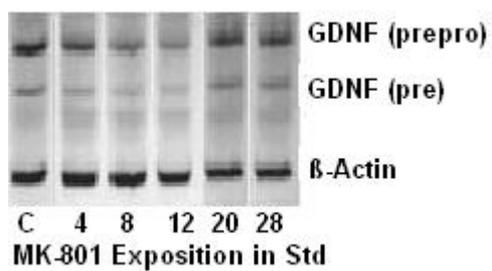


b)

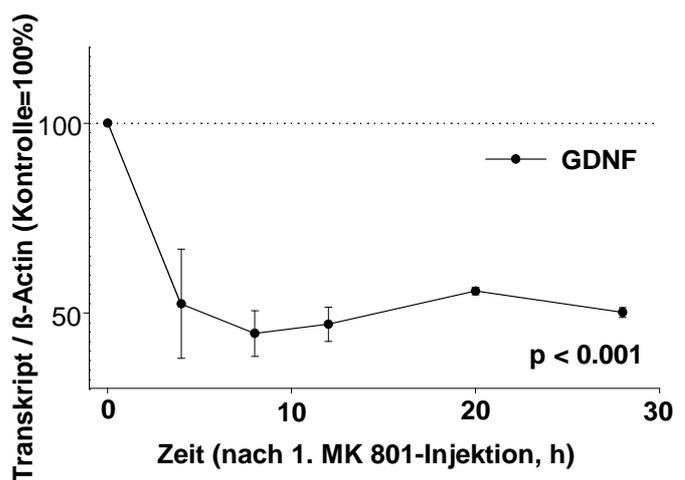


**Abb. 8b:** Einfluss von MK-801 auf die Expression von NT-3 mRNA im Cortex cinguli / retrosplenialis

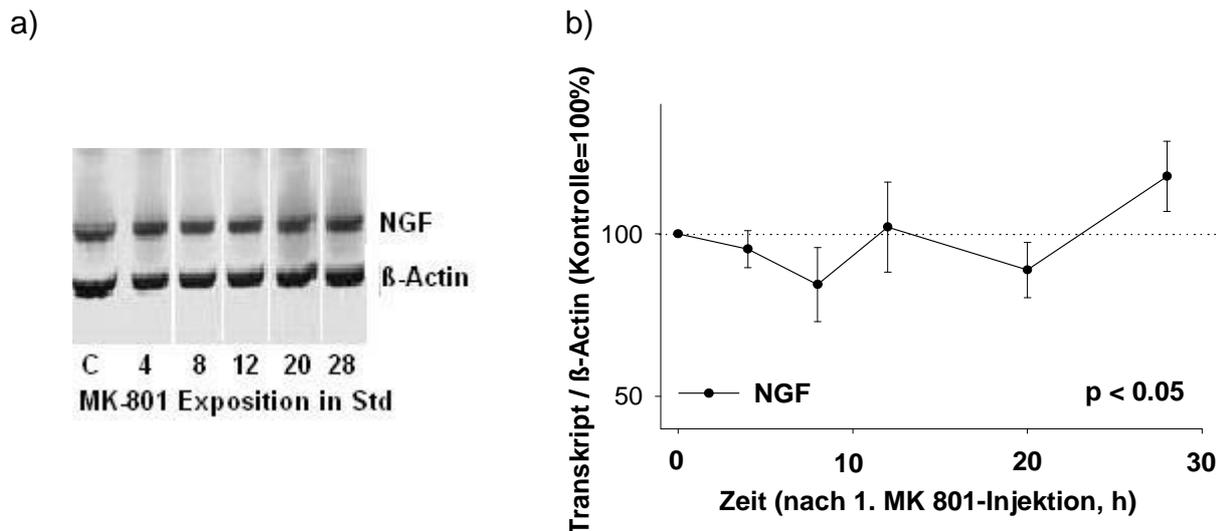
a)



b)



**Abb.8c:** Einfluss von MK-801 auf die Expression von GDNF mRNA im Cortex cinguli / retrosplenialis



**Abb. 8d:** Einfluss von MK-801 auf die Expression von NGF mRNA im Cortex cinguli / retrosplenialis

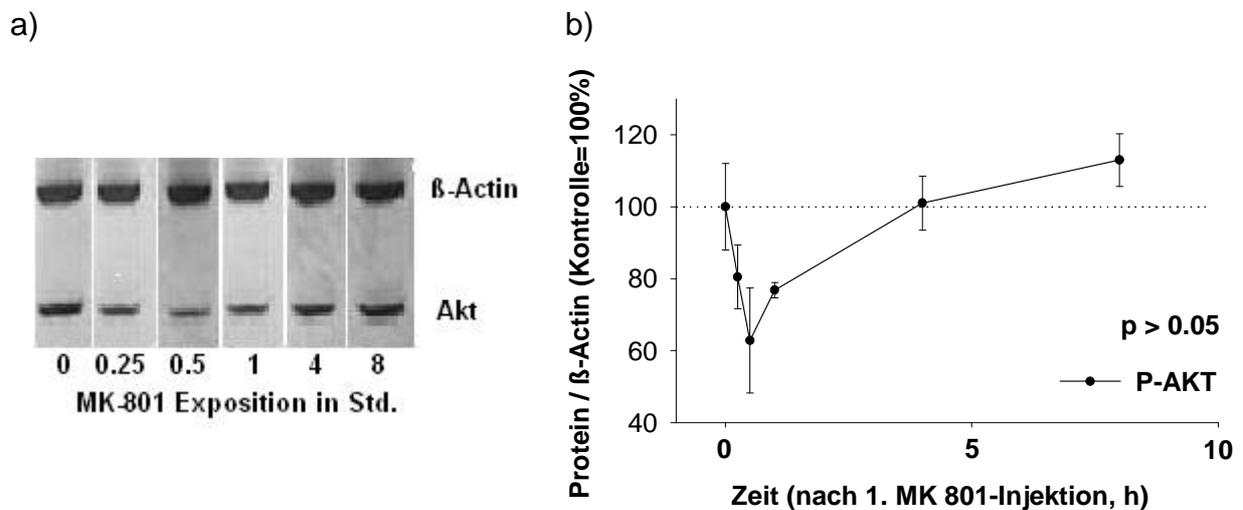
**Abbildung 8a-d:** dargestellt ist der Einfluss von MK-801 auf die Expression von Neurotrophinen. a) die Polyacrylamidgele zeigen, mit Ausnahme für NGF, eine Herab-Regulation der mRNA-Expression der genannten Wachstumsfaktoren im Gehirn neonataler Ratten b) es wurden die m-RNA-Expressionen für die Wachstumsfaktoren a) BDNF (*brain-derived-neurotrophic-factor*), b) NT-3 (*neurotrophic-factor 3*), c) GDNF (*glia-cell-line-derived-neurotrophic-factor*) und d) NGF (*nerve-growth-factor*) nach 4, 8, 12, 20 und 28 Stunden im retrosplenialen Kortex sowie im Cingulum bestimmt. Der GDNF-Primer deckt den Bereich der GDNF cDNA ab, welcher den enkodierenden Bereich für reifes GDNF (pre, 576-bp Fragment) wie auch für das Präprotein (prepro, 654-bp Fragment) beinhaltet. Das Dichteverhältnis der untersuchten Faktoren wurde in Relation zum internen Standard  $\beta$ -Actin (Kontrolle = 100%) bestimmt. Die statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA durchgeführt.

#### 4.2. MK-801-Exposition führt zu einer herabgesetzten Aktivierung von Akt und von CREB

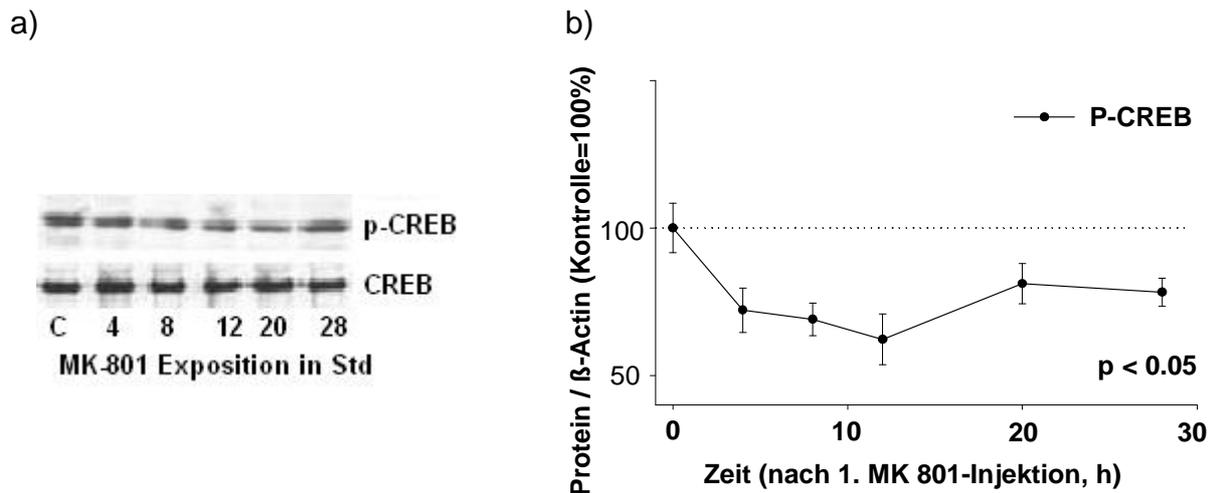
Mittels des Western-Blot-Verfahren konnte festgestellt werden, dass die Unterregulation der Neurotrophine BDNF, NT-3 und GDNF auf mRNA-Ebene mit einer geringen Abnahme der Konzentration der aktivierten, phosphorylierten Isoform

der Serin-Threonin-Kinase Akt (p-Akt, Protein-Kinase B) einhergeht (Abb. 9a). Diese ist ein Mediator der intrazellulären Signalwege, die der Aktivierung der Tyrosin-Rezeptor-Kinase (Trk) durch Wachstumsfaktoren folgen.

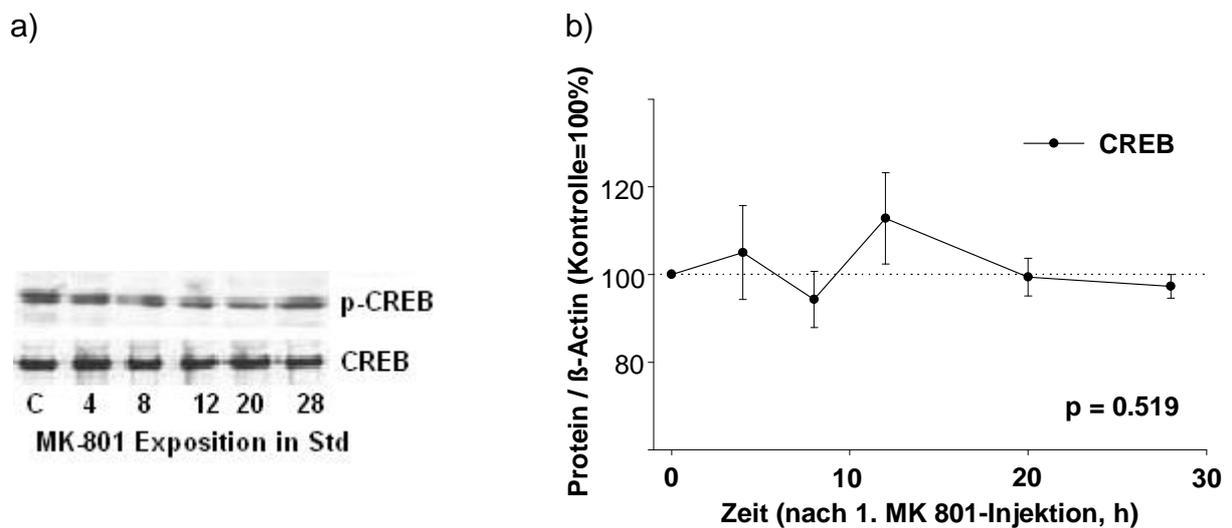
Darüber hinaus zeigt die Analyse mittels Western-Blot, dass MK-801 zu einer signifikanten Reduzierung der p-CREB-Level in einem Zeitraum von 8-20 Stunden nach Exposition führte ( $p < 0.05$ , Abb. 9b). Unverändert blieben die Level für die nicht-phosphorylierte Form von CREB ( $p = 0.519$ , Abb. 9c). Der Anti-phospho-CREB-Antikörper kann auch mit der phosphorylierten Form von ATF-1 (*activating transcription factor 1*) und mit CREM-1 (*CRE-modulator protein 1*) reagieren. In der Western-Blot-Analyse zeigte sich jedoch lediglich eine Bande bei 42 kDa (p-CREB), weitere Banden bei 35 kDa (ATF-1) und 36 kDa (CREM-1) sind nicht erkennbar. Mögliche Kreuzreaktionen des verwendeten Antikörpers können somit ausgeschlossen werden.



**Abb. 9a:** Einfluss von MK-801 auf die Menge von p-Akt im Cortex cinguli / retrosplenialis



**Abb. 9b:** Einfluss von MK-801 auf die Menge von p-CREB im Cortex cinguli / retrosplenialis

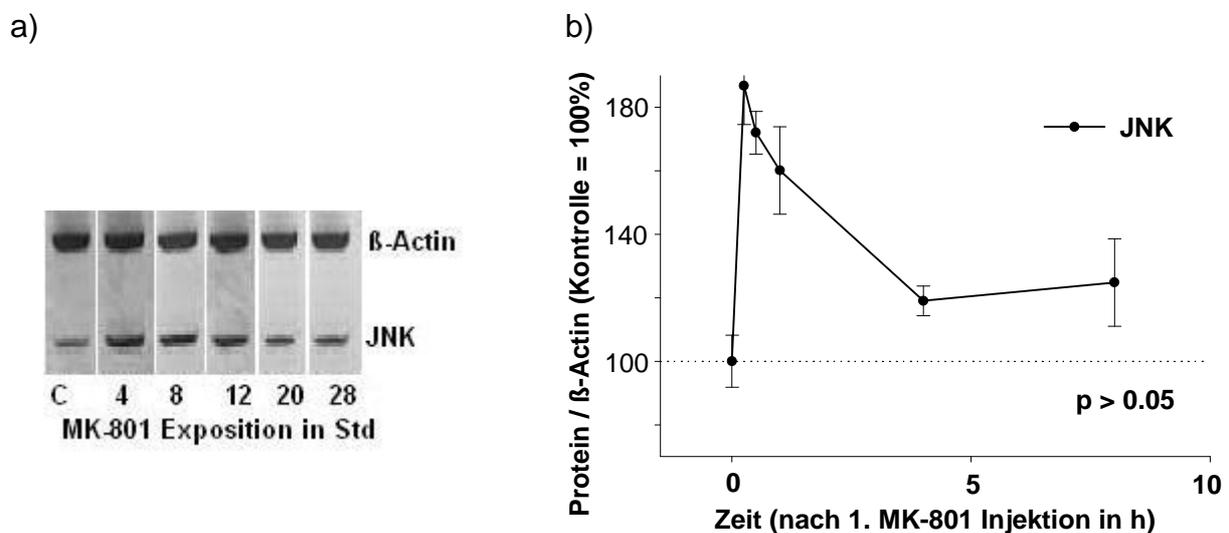


**Abb. 9c:** CREB-Protein im Verlauf nach MK-801-Exposition im Cortex cinguli / retrosplenialis

**Abb. 9:** Die Untersuchungen mittels Western-Blot zeigten eine gering anhaltende Abnahme der Konzentration des Proteins Akt sowie einen länger anhaltenden Abfall von CREB im retrosplenialen Kortex sowie im Cingulum. Die oben genannten Proteine wurden bei Kontrolltieren und solchen, die MK-801 ausgesetzt waren, untersucht (n=6 pro Zeiteinheit). Die Proteinexpression wurde berechnet in Bezug auf das jeweilige Protein in den Kontrolltieren. Die statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA durchgeführt.

### 4.3. NMDA-Rezeptor-Blockade führt zu einer verstärkten Aktivierung der pro-apoptotischen JNK

Die Analyse der Western-Blots zeigt eine partielle Inaktivierung der anti-apoptotischen Proteine p-Akt und p-CREB nach NMDA-Rezeptor-Blockade. Des Weiteren zeigt sich auch eine gering verstärkte Aktivierung der JNK (c-Jun N-terminal Kinase). Dieses Enzym, welches im intrinsischen Signalweg der Apoptose agiert, phosphoryliert nach seiner Aktivierung den Transkriptionsfaktor c-Jun, der seinerseits die Transkription pro-apoptotischer Gene auslöst.



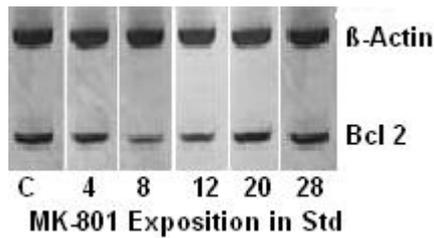
**Abb.10:** Einfluss von MK-801 auf die Menge der JNK. Das Protein wurde bei Kontrolltieren und solchen, die MK-801 ausgesetzt waren, im Cortex cinguli / retrosplenialis untersucht (n=6 pro Zeiteinheit). Die Proteinexpression, bezogen auf  $\beta$ -Actin, wurde berechnet in Bezug auf die Proteinmenge in den Kontrolltieren (n=6 pro Zeiteinheit).

### 4.4. Eine neonatale Blockade der NMDA-Rezeptoren induziert eine Unterregulation der Bcl<sub>2</sub> m-RNA Expression

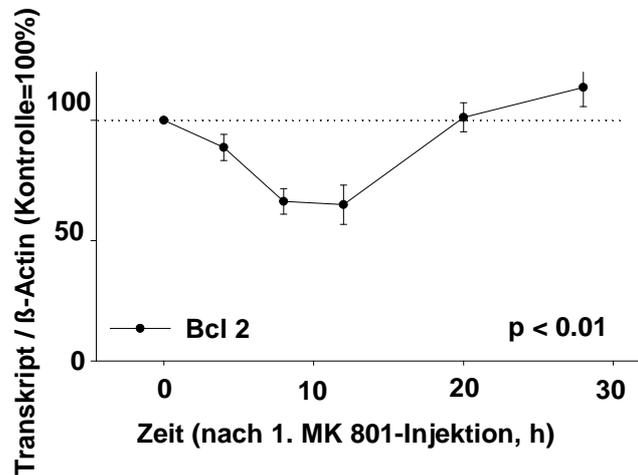
Eine die Apoptose modifizierende Funktion kommt den Proteinen der Bcl-Familie zu. Das Protein Bcl<sub>2</sub> verhindert eine Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium im Rahmen des intrinsischen Signalweges. Eine neonatale Exposition mit MK-801 führte zu einer Erniedrigung der m-RNA-Level von Bcl<sub>2</sub> ( $p < 0.01$ ). Der

Rückgang der Bcl<sub>2</sub> m-RNA hielt bis 12 Stunden nach der ersten MK-801-Injektion an und erreichte nach etwa 20 Stunden wieder Ausgangswerte (Abb. 11a). Bezüglich der Expression der m-RNA von Bcl<sub>XL</sub> konnte kein Unterschied festgestellt werden (p= 0.1082, Abb. 11b).

a)

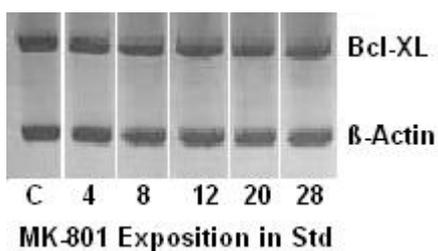


b)

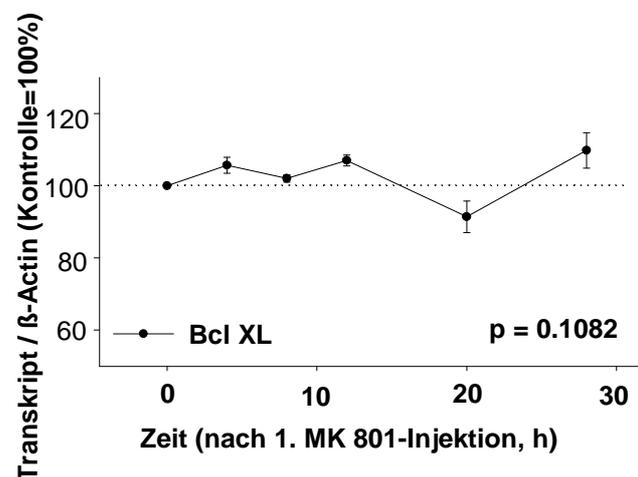


**Abb. 11a:** Einfluss von MK-801 auf die Expression von Bcl<sub>2</sub> im Cortex cinguli / retrosplenialis

a)



b)



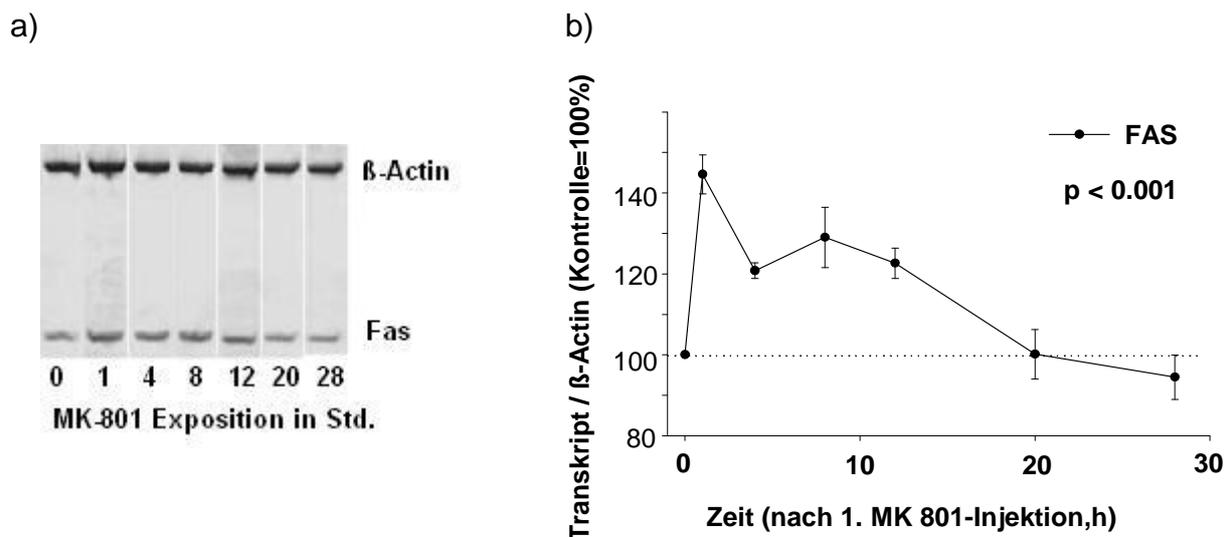
**Abb. 11b:** Bcl<sub>XL</sub> im Verlauf nach MK-801-Exposition im Cortex cinguli / retrosplenialis

**Abb. 11:** Eine neonatale NMDA-Blockade führt zu Unterregulation der Bcl<sub>2</sub>-, aber nicht der Bcl<sub>XL</sub>-mRNA-Expression. Dargestellt ist die RT-PCR Analyse des mRNA-Transkripts aus dem MK-801-exponierten retrosplenialen Kortex sowie dem

Cingulum. Das Dichteverhältnis der untersuchten Proteine wurde in Relation zum internen Standard  $\beta$ -Actin (Kontrolle = 100%) bestimmt. Die statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA durchgeführt.

#### 4.5. Neonatale MK-801 Exposition führt zu einer Hoch-Regulation des Todes-Rezeptors Fas

Um herauszufinden, ob es durch NMDA-Rezeptor-Blockade zu einer Aktivierung des extrinsischen Signalweges der Apoptose über Fas kommt, wurde der Zusammenhang zwischen MK-801-Gabe und der Expression der Fas-mRNA im Rattengehirn mit Hilfe des RT-PCR-Verfahrens untersucht. Signifikant erhöhte Transkriptionslevel sind bereits 4 Stunden nach der ersten Exposition erkennbar, die Werte normalisierten sich nach einem Zeitpunkt von etwa 20 Stunden ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 12:** Einfluss von MK-801 auf die Expression von Fas im Cortex cinguli / retrosplenialis

**Abb. 12:** Das Polyacrylamid-Gel (a) der RT-PCR zeigt eine Hochregulierung von Fas auf mRNA-Ebene, um erst nach circa 20 Stunden auf normale Level zurückzukehren (b). Das Dichteverhältnis der untersuchten Faktoren wurde in Relation zum internen Standard  $\beta$ -Actin (Kontrolle = 100%) bestimmt. Die statistische Auswertung wurde mittels one-way ANOVA durchgeführt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Allgemeine Betrachtungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden an einem Tiermodell die Auswirkungen des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 auf Signalwege untersucht, die den Vorgang der Apoptose im unreifen Gehirn regulieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Exposition des sich entwickelnden Gehirns mit MK-801 binnen Stunden zu einer massiven Hemmung der anti-apoptotischen Signale führt, was eine apoptotische Neurodegeneration verursachen kann.

Eine physiologische NMDA Rezeptor Aktivität ist unerlässlich, um im sich entwickelnden Gehirn eine adäquate synaptische Übertragung und eine funktionierende Netzwerk-Struktur aufrechtzuerhalten <sup>[111-114]</sup>. Weiterhin spielen synaptische NMDA-Rezeptoren für die Reifung und Funktionalität von Synapsen eine wichtige Rolle <sup>[92, 115-117]</sup>. Eine fehlerhafte Synchronisation der prä-synaptischen Glutamat-Ausschüttung und der post-synaptischen NMDA-Rezeptor-induzierten Depolarisation führen zu einer fehlerhaften synaptischen Übertragung <sup>[118-121]</sup> oder gegebenenfalls zu einer apoptotischen Elimination der defizitären Zellen <sup>[122-125]</sup>.

Eine neonatale pharmakologische Blockade von NMDA-Rezeptoren zum Zeitpunkt der extensiven Synaptogenese und des Hirnwachstums führt zu einer schweren, disseminierten apoptotischen Neurodegeneration <sup>[110, 126, 127]</sup>. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die während der Synaptogenese durch MK-801 ausgelöste apoptotische Neurodegeneration mit einer Runterregulation verschiedener, für das Überleben unerlässlicher Faktoren einhergeht. Mittels RT-PCR und Western-Blot konnte hier gezeigt werden, dass es durch MK-801-Exposition zu Veränderungen der Gen-Expression und Phosphorylierung von Proteinen kommt, die das Überleben während der Entwicklung steuern. So führt eine neonatale NMDA-Rezeptor-Blockade zu einer verminderten Synthese von BDNF, NT-3 sowie GDNF und reduziert auf Proteinebene die aktivierte Form von CREB und Bcl<sub>2</sub> in einem zeitabhängigen Modus, was ein Ungleichgewicht zwischen neuroprotektiven und neurodestruktiven Mechanismen zur Folge hat. In der Periode des rapiden Hirnwachstums kann ein solches Ungleichgewicht zu einer pathologisch vermehrten apoptotischen

Neurodegeneration führen. Als weiteres Indiz für die Aktivierung der apoptotischen Kaskade findet sich eine signifikante Erhöhung für den Todesrezeptor Fas.

## 5.2. MK-801 und Neurotrophine

### 5.2.1. NMDA-Rezeptor-Blockade induziert eine Unterregulation der Neurotrophine

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die MK-801 induzierte Neurodegeneration mit einem Unterbinden der Neurotrophin-assoziierten Signalkaskade einhergeht. Demgemäß induzierte MK-801-Exposition eine Unterregulation der mRNA-Transkription für die Synthese von BDNF, GDNF sowie in geringerem Ausmaß von NT-3. Der Verlust an Neurotrophin mRNA war ein rapide fortschreitender Prozess, die Verringerung der Gen-Expression für BDNF und GDNF hielt über den Zeitraum der neonatalen NMDA-Rezeptor-Blockade an. Das Maximum der Herabregulation für die untersuchten Neurotrophine zeigte sich zu einem Zeitpunkt von 8-12 Stunden nach Beginn der MK-801-Exposition.

Hansen et al. konnten zeigen, dass ein solcher Effekt nicht nur im sich entwickelnden Gehirn stattfindet, sondern auch in neuronalen Zellkulturen nachweisbar war <sup>[79]</sup>. Zellkulturen mit neonatalen, kortikalen Ratten-Neuronen wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Dosen gegenüber MK-801 exponiert, was einen signifikanten und dosis-abhängigen Zelltod zur Folge hatte. Die neuronale Apoptose ließ sich durch die TUNEL-Färbung nachweisen. Wie auch im sich entwickelnden Nager-Gehirn zeigte sich innerhalb der Zellkulturen ein signifikanter transkriptioneller Verlust an BDNF nach MK-801-Exposition. Der negative Effekt auf die BDNF-Levels wurde bei mikromolaren Konzentrationen von 5  $\mu$ M induziert und konnte nicht durch höhere Konzentrationen von MK-801 bis zu 50  $\mu$ M verstärkt werden. Darüber hinaus wurde versucht, eine Assoziation zwischen MK-801 induzierter Neurodegeneration und vermindertem neurotrophen Einfluss aufzuzeigen. Hierzu wurde BDNF Zellkulturen hinzugegeben, welche mit neurotoxischen Dosen von MK-801 inkubiert waren. Der toxische Effekt konnte hierdurch völlig aufgehoben werden <sup>[79]</sup>.

Die Bedeutung von MK-801 für die Induktion eines neurotoxischen Effektes ließ sich in einem weiteren Experiment von Hansen et al. darstellen. Das Protein Ras ist ein wichtiger Signaltransduktor in der Erk 1/2 (*extracellular-signal-related-kinase*) Kaskade. Transgene Mäuse, die durch Nutzen eines Synapsin-1 Promoter (synRas) ein konstitutionell aktives V12Ha-Ras-Protein exprimierten, zeigten einen deutlichen Schutz gegenüber einer MK-801 induzierten Apoptose. Mittels der TUNEL-Färbung, welche apoptotische Zellen nachweist, wurde das Ausmaß der MK-801 induzierten Apoptose innerhalb sieben verschiedener Hirnregionen bei Wildtyp-Mäusen und Tieren mit dieser transgenen Veränderung untersucht und verglichen. Hierbei waren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ohne syn-Ras deutlich höhere m-RNA Level für BDNF messbar <sup>[79]</sup>. In nahezu allen untersuchten kortikalen Regionen zeigte sich ein neuroprotektiver Effekt der verstärkten Ras-Aktivität, die Dichte apoptotischer Zellen war deutlich geringer. Lediglich im Cerebellum war die Neuroprotektion geringer ausgeprägt, wobei sich diese Tatsache aus dem regionalen Verteilungsmuster von endogener Synapsin-Promoter-Aktivität im Gehirn erklärt <sup>[128]</sup>. Martins et. al. konnten in ihrer Arbeit einen vergleichbaren Zusammenhang zwischen NMDA-induzierter Neuroprotektion und der Rolle von BDNF erstellen. Die Gabe eines BDNF-neutralisierenden Antikörpers blockierte in Abhängigkeit von der Konzentration vollständig eine NMDA-vermittelte Neuroprotektion innerhalb retinaler Zellen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Gabe von NMDA zu einer signifikanten Erhöhung der m-RNA sowie dem Proteintranskript von BDNF führte <sup>[129]</sup>.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sowie die Ergebnisse der oben genannten Autoren deuten darauf hin, dass eine NMDA-Rezeptor-Blockade im neonatalen Rattengehirn einen Ausfall des Neurotrophin-Inputs zur Folge haben könnte. Weiterhin scheint die substantielle Reduktion der Neurotrophin-Synthese eine entscheidende Determinante dieses Effektes zu sein. Der Ausfall des Inputs an Neurotrophinen hat weit reichende Folgen für die nachgeschalteten Signalkaskaden. Die Neurotrophine haben untereinander ein hochkomplexes und kaskadenartiges Regulationsmuster, so dass der Ausfall eines Faktors auch Folgen für andere Neurotrophine hat. So führt in manchen Zelllinien erst die Wirkung des fibroblast growth factors 2 (FGF-2) zur Induktion von funktionell aktiven Rezeptoren für NGF <sup>[1]</sup>. Ebenso zeigt sich auf Einfluß von NT-4/5 eine Erhöhung der BDNF-mRNA <sup>[130]</sup>. Anhand der Tatsache, dass die Signalwege für exzitatorische Transmitter und

Neurotrophine eng miteinander verknüpft sind, zeigt sich, wie sehr Überleben von der zellulären Erregbarkeit abhängig ist.

Diese Daten unterstützen die Hypothese, daß entwicklungsbedingter Zelltod zum Teil dem konstitutiven Apoptose-Signal geschuldet ist, das durch Sequestration des entsprechenden Wachstumsfaktors überlagert werden kann. Aus oben erwähnten Daten wird aber deutlich, daß Neurotrophine nur aus funktionell aktiven Zell-zu-Zell Verbindungen ausgeschüttet werden, eben um eine korrekte Zielinnervation zu gewährleisten. Erreicht ein Neuron, respektive sein Axon, sein Ziel zu spät oder gar nicht, kann es im Streben um ausreichende Mengen an Wachstumsfaktoren nicht mithalten und ist aus ebendiesem Grund zur apoptotischen Zelldegeneration „verurteilt“ [131, 132].

### 5.2.2. Weitere Mechanismen der Apoptose-Induktion

Ein möglicher Weg, der im vorliegenden Modell zur Induktion der Apoptose beiträgt, könnte in der Signalkaskade über den  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor liegen. Vom  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor nahm man anfangs an, daß seine Aufgabe vorrangig in der positiven Regulation der TrkA-Funktion bestünde [59, 74, 83, 84]. Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor eine eigenständige, unabhängige Signalfunktion innehat, die in Abhängigkeit vom zellulären Kontext auch zur Apoptose führen kann. Ligandenbindung führt zur Bildung von Ceramiden [133-135], reguliert seine Assoziation mit einer Reihe von teils proapoptotischen Proteinen wie z.B. NUAGE [136] und führt zur Aktivierung des JNK-Signalweges [136-142]. Ein Hinweis auf die Aktivierung dieses Signalweges findet sich in den Ergebnissen dieser Arbeit. So zeigt sich ein Anstieg der Proteinexpression für JNK. Der JNK-Signalweg, der letztlich zur Apoptose führt, verläuft anfangs durch den aktiven  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor zu JNK, einer Familie stressaktivierter Kinasen. Nun folgt ein weiterer, wichtiger Zwischenschritt, der durch p53 vermittelt wird. p53 aktiviert den Effektor Bax, der durch mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C letztlich die apoptotische Kaskade in Gang setzt (siehe Abb. 6). Die Bedeutung von p53 zeigt sich an der Tatsache, daß eine alleinige Überexpression selbst in Anwesenheit von NGF zum Zelltod führt [143].

Die durch ein exzitotoxisches Ereignis ausgelöste Apoptose geht mit einer Induktion von p75<sup>NTR</sup>-Rezeptoren in den sterbenden Neuronen einher [144]. Der p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor vermittelt aber nur dann Apoptose, wenn der Trk-Rezeptor inaktiv oder nicht ausreichend exprimiert wird. Insgesamt hängt der Ausgang eines p75<sup>NTR</sup>-Signals vom Expressionsstatus der Trk-Rezeptoren auf der entsprechenden Zelle ab [62]. Die Datenlage bezüglich der potentiellen Mechanismen ergibt teils widersprüchliche Aussagen. So legen Daten aus jüngeren Studien den Schluss nahe, dass der p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor bei Wachstumsfaktorentzug innerhalb einiger Zelllinien Apoptose vermittelt, d.h. ohne dass ein entsprechender Ligand vorhanden wäre [145]. Durch diese Erkenntnisse und mit Hilfe von double-knockout-Modellen konnten Miller und Majdan an sympathischen Neuronen zeigen, daß Zellen durch konstante p75<sup>NTR</sup>-Signale zum Sterben „verurteilt“ sind, sofern es ihnen nicht gelingt, entsprechende Mengen an NGF zu sequestrieren, um TrkA zu aktivieren [146]. Lu et al. konnten in ihrer Arbeit eine neurodegenerative Antwort im neonatalen Gehirn durch Exposition mit Anästhetika induzieren, wobei sich hier in Abhängigkeit von der untersuchten Hirnregion sogar signifikante Anstiege von BDNF fanden. Diese fanden sich in Hirnregionen, in welchen die Induktion der Apoptose vorrangig p75<sup>NTR</sup>-vermittelt war ([147]. Anhand der vorliegenden Daten erscheint die Varianz der Neurotrophin-Rezeptor-Expression und Funktion während der Entwicklung verschiedener Hirnregionen abhängig vom jeweiligen Stand der Entwicklung zu sein. Dies könnte zumindest ein Erklärungsansatz für die regionale Unterschiedlichkeit der aktivierten Apoptose-Kaskaden sein.

Der p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor stellt einen Mechanismus dar, der eine schnelle und zuverlässige Apoptose gewährleisten kann. Miller beschreibt die Funktion des p75<sup>NTR</sup> als eine Form von „Schalter“ innerhalb von Neuronen. In Abwesenheit von Trk oder dessen Input, wie es durch die Exposition mit MK-801 gegeben ist, führt er zielstrebig zur Apoptose, wohingegen er andernfalls Trk-vermitteltes Überleben verstärkt [62]. Hierdurch ist ein natürlicher Mechanismus zur Wahrung adäquater neuronaler Plastizität gewährleistet.

Ein weiterer Mechanismus, der nach MK-801-Gabe pro-apoptotisch zu wirken scheint, wird in der Induktion einer erhöhten NO-Synthese vermutet. In adulten Ratten förderte die NMDA-Rezeptor-Blockade erwartungsgemäß eine neuro-

degenerative Antwort im Cortex retrosplenialis, wobei in inhibitorischen Interneuronen eine erhöhte Synthese für NO gefunden wurde. Die Gabe des selektiven NO-Inhibitors BRNI vermochte die MK-801 induzierte Apoptose abzuschwächen <sup>[148]</sup>.

### 5.3. MK-801 und Signalproteine

#### 5.3.1. NMDA-Rezeptor-Blockade führt zu reduzierter Aktivität von Erk 1/2, CREB und Bcl<sub>2</sub>

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass wiederholte Gabe von MK-801 zur Unterregulation der aktiven, phosphorylierten Form von CREB in einem Zeitraum von 8-20 Stunden nach Exposition führt. Ein weiterer Effekt ist, dass die m-RNA-Transkription des anti-apoptischen Proteins Bcl<sub>2</sub> innerhalb eines vergleichbaren Zeitraumes ebenfalls abnimmt. Ergänzt werden diese Ergebnisse durch Hansen et.al, der mittels eines Kinase-Aktivitäts-Assay zeigen konnte, dass die katalytische Aktivität von Erk 1/2 in einer Zeitspanne von 4-28 Stunden nach initialer NMDA-Rezeptor-Blockade signifikant abnahm <sup>[79]</sup>. Diese regulatorischen Schritte ereigneten sich zeitlich parallel zum Abfall der Neurotrophin-Expression, was eventuell auf eine Kausalität hindeuten könnte.

Diese Annahme wird durch eine weitere Beobachtung gestützt. P7 syn-Ras Mäuse (7. postnataler Tag), die weniger anfällig für eine MK-801 induzierte neuronale Apoptose waren, wiesen deutlich höhere Level für die phosphorylierte Form von CREB und Erk 1/2 auf <sup>[128]</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die Ras-induzierte Neuroprotektion mit einer Verstärkung der Signalkaskade über Erk1/2-CREB assoziiert ist.

#### 5.3.2. Die Rolle der Transkriptionsfaktoren CREB und NFκB

Die Erkenntnis, dass eine neonatale NMDA-Rezeptor-Blockade zu einer verminderten Aktivität des Erk1/2-CREB-Signalweges führt, liegt in Übereinstimmung mit der zunehmenden Gewissheit, dass CREB für ein neuronales Überleben während der Gehirnentwicklung essentiell ist. Konstitutionell aktiviertes CREB, welches über eine Gen-Mutation erzeugt wurde, förderte die Zell-Proliferation <sup>[149]</sup>. Andererseits führte eine Überexpression von dominant-negativem CREB in

verschiedensten Zellkulturen von Säugern, neuronale Kulturen mit inbegriffen, zu einer verminderten Lebensfähigkeit [85, 86, 150, 151]. Mäuse ohne CREB-1 (einem Mitglied der CREB-Familie) erlitten eine deutlich verstärkte apoptotische Neurodegeneration während der postnatalen Hirnentwicklung [152].

Es ist bekannt, dass eine NMDA-Rezeptor-induzierte Depolarisation neuronale Gen-Expression stimuliert. Dies geschieht mittels einer Calcium-abhängigen Signaltransduktion über die phosphorylierte Form von Erk1/2 [153-155] oder die Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Kinase (CaMKIV) [156, 157]. Die Aktivierung dieser Signalwege führt zu einer verstärkten, CREB-vermittelten Gen-Transkription [157-161].

Insbesondere die Rolle des Transkriptionsfaktors CREB wurde intensiv erforscht, da er entscheidenden Einfluss auf die dauerhafte Synapsenplastizität, das Lernen und das Gedächtnis hat [162, 163]. Die Funktionsweise von CREB in solch lang anhaltenden Prozessen spiegelt sich auch in der Vermittlung einer lang anhaltenden Neuroprotektion wieder. So konnten Papadia et. al. in ihrer Arbeit aufzeigen, dass NMDA-Rezeptor-vermittelte Neuroprotektion sich zwei völlig verschiedener Mechanismen zu bedienen vermag. Bei anhaltender synaptischer Aktivität verläuft die Signalkaskade über PI3-Akt. Eine durch Exzitation ausgelöste Neuroprotektion vermag aber länger anzuhalten als der auslösende synaptische Stimulus, dieser Mechanismus basiert auf einer Gen-Expression, welche über CREB vermittelt wird [164]. In jüngerer Zeit wurde deutlich, dass CREB auch die Transkription vieler Faktoren, die für neuronales Überleben unerlässlich sind, reguliert [165]. Dies gilt zum Beispiel für BDNF [158, 166] und für Bcl2 [85, 150, 158, 166]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der Exposition von sich entwickelnden Neuronen gegenüber MK-801 und einer signifikanten Erniedrigung der m-RNA-Level von Bcl<sub>2</sub> aufgezeigt werden. Der Rückgang hielt bis zu 12 Stunden nach der ersten MK-801-Injektion an. Somit erscheint es möglich, dass einer der Apoptose-auslösenden Mechanismen in der Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium liegt, ein Prozess, der durch physiologische Mengen von Bcl<sub>2</sub> verhindert würde.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch NMDA-Stimulus verstärkt aktiviert wird, ist NFκB [81]. Obwohl NFκB auch schon pro-apoptotische Wirkung gezeigt hat [167],

gibt es zunehmend Hinweise, dass er auch verschiedene neuroprotektive Mechanismen aktiviert. So führt ein NMDA-Rezeptor-Stimulus in cerebellären Körnerzellen zu einer Aktivierung von NFκB, was seinerseits eine verstärkte Transkription von BDNF bewirkte<sup>[81]</sup>. In Studien, die sich mit Expressionsmustern bei Anfallsleiden beschäftigen, konnte gezeigt werden, daß nach einem epileptischen Anfall im Kortex und Hippocampus die Level von NFκB signifikant anstiegen<sup>[168]</sup>. Dies unterstützt die These einer aktivitätsabhängigen Expression von Überlebensfaktoren im Sinne von „Exzitation bedingt Transkription“<sup>[8]</sup>.

Marini et al. konnten nachweisen, daß NMDA in physiologischen Mengen neuroprotektiv wirkt, indem es via NFκB<sup>[81]</sup> die Level von BDNF und dessen Rezeptor TrkB ansteigen lässt<sup>[10]</sup>. Im Gegenzug konnte aber auch gezeigt werden, daß Neurotrophine regulierend Einfluß nehmen auf den Glutamat-Stoffwechsel. So bewirken BDNF und NT-3 eine Freisetzung von Glutamat<sup>[130]</sup>. Weiterhin induziert BDNF auch noch die Expression von spezifischen Glutamat-Rezeptoren, den Subtypen GluR1 und GluR2<sup>[130]</sup>.

Daher ist die Annahme nahe liegend, dass die enge Assoziation des NMDA-Rezeptors zu Signal-Proteinen wie Erk1/2-CREB und CaMKIV-CREB eine entscheidende Bedeutung hat für die Vermittlung von trophischen Effekten während der Gehirn-Entwicklung<sup>[9, 10, 169]</sup>.

### **5.3.3. Entkopplung der Signalkaskade um Erk1/2 und CREB induziert Apoptose**

Hansen et. al. konnten in ihrer Arbeit letztlich keinen regulatorischen Effekt von MK-801 auf die phosphorylierende Aktivität der CaMKIV nachweisen, wohl aber eine reduzierte katalytische Aktivität von Erk1/2<sup>[79]</sup>. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass die durch NMDA-Rezeptor-Blockade ausgelöste Apoptose im sich entwickelnden neonatalen Gehirn spezifisch durch Entkopplung des NMDA-Rezeptors von der Signalkaskade um Erk1/2-CREB bedingt wird. Diese Annahme wird durch Ergebnisse um Bittigau et. al. gestützt. Hier wurde P7-Ratten intracerebro-ventrikulär der spezifische MEK-Inhibitor U0126 verabreicht, der eine vorgeschaltete Blockade der Erk1/2-Funktion bedingt. Dies löste eine deutliche apoptotische Degeneration im Gehirn aus<sup>[108]</sup>. Darüber hinaus kann die Gabe von Erythropoietin neugeborene Ratten vor einer MK-801-induzierten Gehirnschädigung

zum Teil bewahren, indem es die Produktion von BDNF und GDNF verstärkt sowie die Integrität der Signalkaskade über Erk1/2 wiederherstellt <sup>[170]</sup>. All dies ist ein deutlicher Hinweis, dass die partielle Deaktivierung der Signalkaskade um Erk1/2-CREB eng mit der Pathogenese des MK-801-induzierten Zelltodes assoziiert ist und nicht nur ein zufällig auftretendes Phänomen darstellt.

Auch andere neonatale in vivo Rattenmodelle, bei welchen sich nach Pharmaka-Exposition neurodegenerative Antworten fanden, zeigten deutliche Runter-Regulation der Neurotrophine und von Kinasen wie Erk1/2 sowie Akt. Bittigau et. al. behandelten P7-Ratten mit Antikonvulsiva, so zum Beispiel mit den GABA-Mimetika Phenobarbital und Valproat oder dem Natrium-Kanal-Blocker Phenytoin. Der hierauf folgenden disseminierten apoptotischen Neurodegeneration ging eine fortschreitende Unterregulation der kortikalen und thalamischen BDNF- und NT-3 m-RNA voraus. Ebenso ließen sich signifikant erniedrigte Mengen für die aktivierte, phosphorylierte Form von Erk1/2 und Akt nachweisen <sup>[108]</sup>. Ebenfalls verringern auf kortikale BDNF m-RNA Mengen wirkt eine postnatale Ethanol-Intoxikation <sup>[171]</sup>, wobei Ethanol als ein kombinierter NMDA-Rezeptor-Antagonist und GABA-Agonist fungiert.

Die Ergebnisse der Tierstudien über die Neurotrophin-Expression unter pathologischen Bedingungen sind aber teilweise kontrovers und abhängig von der Schädigungsart und von dem verwendeten abhängigen Modell. So konnte auch gezeigt werden, dass es bei durch Pilocarpin-induzierten Krampfanfällen und traumatischen Verletzungen zu einer Hochregulierung der Neurotrophine kam <sup>[172, 173]</sup>. Viele Arbeiten weisen jedoch übereinstimmend darauf hin, dass die Runter-Regulation der Neurotrophin-assoziierten Kinase-Aktivität (wie z.B. Erk1/2) eine Gemeinsamkeit der Pharmaka mit Exzitations-dämpfendem Effekt ist.

Der Anstieg der Expression der Wachstumsfaktoren sowie der aktiven Formen von CREB und Erk1/2 zurück auf Ausgangsniveau nach etwa 24-28 Stunden ist möglicherweise auf endogene Kompensationsmechanismen zurückzuführen. Zu diskutieren ist eine gesteigerte Neurotrophin-Expression umliegender, nicht geschädigter Neurone. Der exakte Mechanismus bleibt aber in dieser Arbeit ungeklärt.

## 5.4. Klinische Aspekte

Mit Beginn des dritten Trimesters, etwa zwischen der 20. und 22. Schwangerschaftswoche, zeigt sich im humanen fetalen Vorderhirn das Maximum der NMDA-Rezeptor-Expression<sup>[174]</sup>. Zu diesem Zeitpunkt setzt die rapide Hirnwachstumsphase ein, welche weit in die postnatale Phase hinein reicht. Die höchste Expression für den NR1-Subtyp findet im Rattengehirn in der ersten postnatalen Woche statt, während auch hier die Spurtphase des Hirnwachstums einsetzt. Geht man von einer vergleichbaren Anfälligkeit des menschlichen Vorderhirns für die pro-apoptotische Wirkung von NMDA-Antagonisten wie für das Rattengehirn aus, so schließt die potentiell vulnerable Phase das komplette letzte Trimester der Schwangerschaft für den humanen Fetus mit ein.

Viele der hier genannten Pharmaka werden regelhaft innerhalb der Geburtshilfe oder Neonatologie als Sedativa, Tranquilizier, Antikonvulsiva oder Anästhetika eingesetzt. So findet Ketamin, früher auch Stickstoffmonoxid (Lachgas), zwei potente NMDA-Antagonisten, ihre Anwendung in der pädiatrischen Anästhesie<sup>[175, 176]</sup>. Für Lachgas ist, ähnlich wie für Ketamin, eine apoptose-fördernde Wirkung beschrieben<sup>[175]</sup>, eine länger dauernde Narkose mit Ketamin oder Lachgas ist entsprechend potentiell neurotoxisch. Untersuchungen am Rattenmodell zeigten, dass eine gewisse Mindestdauer der NMDA-Blockade vonnöten ist, um eine apoptotische Antwort hervorzurufen<sup>[110]</sup>. Bis dato gibt es nur unzureichende Kenntnisse über die schädigenden Mechanismen dieser beiden Präparate in Bezug auf das neonatale Gehirn.

Darüber hinaus haben einige Substanzen, wie zum Beispiel Phencyclidin (PCP), Ketamin, Ethanol oder Barbiturate aufgrund ihres pharmakologischen Profils ein hohes Missbrauchs-Potential. Durch Abusus exponieren werdende Mütter das ungeborene Kind mit potentiell toxischen Mengen dieser Substanzen. PCP (Phenyl-Cyclohexyl-Piperidin) und heutzutage verstärkt Ketamin werden wegen ihres analgetischen und halluzinatorischen Charakters oral oder inhalativ aufgenommen. Ebenfalls antagonistische Eigenschaften am NMDA-Rezeptor zeigt die gesellschaftlich am weitesten verbreitete Droge Ethanol<sup>[177]</sup>. Nachdem in den 70er Jahren der schädliche Einfluss auf das sich entwickelnde Gehirn entdeckt wurde<sup>[178]</sup>,

<sup>179]</sup>, konnten danach zwei syndromale Krankheitsbilder als Folge von präpartalem Alkohol-Missbrauch beschrieben werden: das fetale Alkoholsyndrom (FAS) und die fetalen Alkoholeffekte (FAE). Bei letzterem imponieren die Kinder mit Lernbehinderungen, verminderter Intelligenz, Hyperaktivität sowie Depression und Psychosen im Erwachsenenalter. Ungleich schwerer sind die Symptome, die im Rahmen des FAS beschrieben werden: Herzfehler, kraniofaziale Anomalien, Deformitäten der Extremitäten, Mikrozephalie sowie schwere neurologische Defizite. Ikonomidou et. al. beschrieben bei neonatalen Ratten, die gegenüber Ethanol exponiert wurden, eine apoptotische Neuro-degeneration, die einer durch MK-801 induzierten ähnlich war <sup>[109]</sup>. Allerdings ist eine durch Ethanol induzierte Apoptose weitreichender gewesen als eine durch MK-801 induzierte, was sich neben der NMDA-antagonistischen Eigenschaft des Ethanol durch die gleichzeitig vorhandene GABA-agonistische Wirkung erklärt.

Im Rahmen des neuronalen Zelltodes spielt die Exzitotoxizität eine wesentliche Rolle. Ihr kommt in der Pathogenese einiger akuter wie chronischer neurodegenerativer Erkrankungen eine zentrale Rolle zu. Störungen im intrazellulären Energie-Stoffwechsel können bei chronisch degenerativen Erkrankungen die Empfindlichkeit der Neuronen gegenüber Glutamat erhöhen, so dass schon physiologische Konzentrationen zu einer Neurodegeneration führen können. Störungen im Energiestoffwechsel wurden zum Beispiel bei der amyotrophen Lateralsklerose <sup>[180]</sup>, der Chorea Huntington und dem Morbus Parkinson gefunden <sup>[181]</sup>.

Bezüglich der akuten neurodegenerativen Erkrankungen wurden Untersuchungen am Tiermodell für ischämische und traumatische Ereignisse durchgeführt. Bei adulten Tieren konnte in diesen Fällen mit NMDA-Antagonisten ein neuroprotektiver Effekt erzielt werden <sup>[182-185]</sup>. Klinische Studien mit erwachsenen Patienten konnten aber keine Wirksamkeit dieses Therapie-Ansatzes beweisen und mussten aufgrund begleitender Nebenwirkungen abgebrochen werden <sup>[186, 187]</sup>.

Beeinträchtigungen der Entwicklungsprozesse im ZNS, welche eine integere NMDA-Rezeptor-Aktivität benötigen, könnten in verschiedenste klinische Erkrankungen (z.B. Schizophrenie, Lernstörungen oder Hyperaktivität) münden <sup>[188]</sup>. So beschreiben

Lema Tomé et. al. in ihrer Arbeit, dass eine perinatale NMDA-Blockade mit MK-801 zu einer reduzierten Expression von zytoskeletalen Proteinen wie MAP2 und Tau führt. Neben dem bekannten neurodegenerativen Effekt könnte ein solcher Verlust von Elementen, die für funktionierende Zell-Zell-Kontakte wichtig sind, zu einer neuronalen Umstrukturierung im ZNS führen, welche z. B. im juvenilen oder adulten Alter für die Entwicklung einer Schizophrenie förderlich sein könnte <sup>[189]</sup>. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mahnen zum umsichtigen klinischen Umgang mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten innerhalb der Neonatologie und Pädiatrie. Deren Einsatz ist aber zuweilen unerlässlich, daher sollten begleitende Maßnahmen entwickelt werden, die den potentiell neurotoxischen Effekt dieser Präparate mildern. Für deren Entwicklung ist aber eine möglichst genaue Kenntnis der zugrundeliegenden Mechanismen innerhalb der Pathogenese vonnöten.

Neuere Arbeiten beschreiben protektive Maßnahmen, die sich auf die Unterbrechung der apoptotischen Kaskade geschädigter Neurone fokussieren. Ein Ansatz hierzu ergibt sich aus dem möglichen Einsatz von Caspase-Inhibitoren, welche auch auf neuronaler Ebene wirksam sind. Adulte Tiermodelle konnten einen neuroprotektiven Effekt demonstrieren <sup>[190]</sup>, im unreifen Gehirn sind diese Substanzen bislang noch nicht ausreichend getestet. Joly et. al. konnte in Arbeiten mit einem neonatalen Hypoxie-Ischämie-Modell keine Verbesserung im klinischen Outcome nach Gabe des Caspase-Inhibitors BAF (Boc-Aspartat-Fluoromethyl-Keton) aufzeigen <sup>[191]</sup>.

Jüngste Forschungsergebnisse beschreiben, dass neurodegenerative Effekte, welche NMDA-Rezeptor- oder Hyperoxie-vermittelt sind, durch die Gabe von Estradiol vermindert werden konnten <sup>[192, 193]</sup>. Darüber hinaus scheint dieser Effekt über eine Unterregulation von Caspase-3 und einem Verhindern der Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium vermittelt zu werden <sup>[194]</sup>. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Neurosteroiden wie Allopregnanolon und Dehydroepiandrosteron neuroprotektiv bei NMDA-Rezeptor vermittelte Exzitotoxizität wirken <sup>[195]</sup>.

Die Entwicklung neuroprotektiver Ansätze, die auf einer Verstärkung neurotrophischer Signale basieren, erscheint aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein logischer Weg, der weiter erforscht werden sollte.

## 6. Zusammenfassung

Das Gehirn eines jeden Säugers durchläuft im Rahmen seiner Entwicklung eine Phase verstärkten Wachstums. Viele wichtige Vorgänge wie Migration und Differenzierung von Nervenzellen sowie Synaptogenese und Apoptose spielen sich während der Phase des rapiden Hirnwachstums im Gehirn ab. Letztere ist für die Ausbildung adäquater neuronaler Plastizität unerlässlich. Ein spezieller Subtyp des Glutamat-Rezeptors, der N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor, scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Kommt es in der neonatalen Periode zu einer Exposition mit dem selektiven NMDA-Antagonisten Diczolipine (MK-801), so ist eine disseminierte apoptotische Neurodegeneration im sich entwickelnden Ratten-Gehirn die Folge. Parallel zur maximalen Synaptogenese im Rattengehirn ist dieser Effekt am siebten postpartalen Tag am stärksten ausgeprägt.

Neuronale Exzitation ist der Schlüssel zum Überleben während der Entwicklung. Die Überlebensfähigkeit der Neuronen hängt vom Zugang zu trophischen Faktoren wie zum Beispiel *brain-derived-neurotrophic-factor* (BDNF), *neurotrophic-factor-3* (NT-3) sowie *glia-cell-line-derived-neurotrophic-factor* (GDNF) ab, die als Antwort auf einen Zell-Zell-Stimulus gebildet werden. Durch neuronale Erregbarkeit, welches der Schlüsselreiz zur Ausschüttung der genannten Faktoren ist, wird der synaptische Zusammenhalt zwischen den beteiligten Zellen gefestigt. Letztlich werden aber nicht alle Zellen mit einer ausreichenden Menge an trophischen Signalen versorgt, so dass sie der apoptotischen Neurodegeneration zugeführt werden. Somit kommt dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat eine entscheidende Rolle in der Regulation des neuronalen Überlebens während der Entwicklung zu.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die während der Synaptogenese durch MK-801 ausgelöste apoptotische Neurodegeneration mit einer Unterregulation verschiedener, für das Überleben unerlässlicher Faktoren assoziiert ist. Mittels RT-PCR und Western-Blot konnte hier gezeigt werden, dass es durch MK-801-Exposition zu Veränderungen der Gen-Expression und Phosphorylierung von Proteinen kommt, die das neuronale Überleben während der Entwicklung steuern. So führt eine neonatale NMDA-Rezeptor-Blockade zu einer verminderten Synthese von BDNF, NT-3 sowie GDNF. Die maximale Verminderung der Expression der

untersuchten Neurotrophine zeigte sich zu einem Zeitpunkt von 8-12 Stunden nach Beginn der MK-801-Exposition.

Die Analyse mittels Western-Blot zeigte, dass MK-801 zu einer signifikanten Reduktion der p-CREB-Menge in einem Zeitraum von 8-20 Stunden nach Exposition führte. Ebenfalls verminderte Mengen auf Proteinebene wurden für die Signalproteine innerhalb der anti-apoptotischen Kaskade, Akt und Erk 1/2 gefunden. Ebenso vermindert fand sich auch Bcl<sub>2</sub>, welches im Rahmen des intrinsischen Signalweges der Apoptose eine Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium verhindern soll. Als Zeichen der Verschiebung der intrazellulären Prozesse in Richtung Apoptose fanden sich gering erhöhte Protein-Mengen für JNK sowie eine Erhöhung der mRNA –Werte für den Todes-Rezeptor Fas.

All diese Ergebnisse zeigen das Überwiegen der neurodestruktiven gegenüber den neuroprotektiven Mechanismen. In der Periode des rapiden Hirnwachstums kann ein solches Ungleichgewicht zu einer pathologisch vermehrten apoptotischen Neurodegeneration führen.

Hieraus folgt, dass in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Verabreichung die Gabe von NMDA-Antagonisten, die ihre Anwendung im klinischen Alltag haben, das Risiko eines diffusen Hirnschadens in sich trägt. Dieser mag in früher Kindheit noch nicht erkannt werden, kann sich aber im späteren Leben in einem breiten Spektrum neuropsychiatrischer Erkrankungen manifestieren. Einige klinische Aspekte der fetalen Alkoholeffekte (FAE) sowie des fetalen Alkoholsyndroms (FAS) können durch diese Mechanismen erklärt werden.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-isoxazol-4-Propionsäure
APAF-1	<i>apoptosis protease activated factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Akt	Protein Kinase B
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAD	pro-apoptotisches Protein der <i>bcl<sub>2</sub></i> -Familie
BAF	Boc-Aspartat-Fluoromethyl-Keton
BAK	<i>bcl<sub>2</sub> homologous antagonist / killer</i>
BAX	<i>bcl<sub>2</sub> associated X protein</i>
Bcl <sub>2</sub>	<i>b-cell lymphoma / leukaemia-2</i>
Bcl <sub>XL</sub>	<i>bcl-x (long form)</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
°C	Celsius
CaMKIV	Ca <sup>+</sup> -Calmodulin-Kinase
c-AMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
Ca <sup>++</sup>	Calcium
CREM-1	<i>CRE-modulator protein 1</i>
Cu <sup>+</sup>	Kupfer
Cys	Cystein
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonuklein-Säure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
E	embryonisches Alter in Tagen
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

---

Erk	extrazellulär regulierte Kinase, synonym zu MAPK
et al.	et altera
etc.	et cetera
FAE	fetale Alkoholeffekte
Fas	Zelltodrezeptor, synonym mit APO-1 und CD95
FAS	fetale Alkoholsyndrom
FGF-2	<i>fibroblast growth factors 2</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GABA	gamma-amino-Buttersäure
GDNF	<i>glia derived neurotrophic factor</i>
Grb2	<i>growth receptor binding protein 2</i>
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	<i>hours</i> , Stunden
HCl	Salzsäure
IGF	<i>insulin like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IgGL	Immunglobulin-G-Leichtkette
JNK	c-Jun N-terminal-Kinasen
kg	Kilogramm
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo-Dalton
K <sup>+</sup>	Kalium
LRM	Leu-rich-motif
LTP	<i>long term potentiation</i>
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase</i>
MEK	= MAPKK
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mA	Milliampère
mg	Milligramm

---

min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MK-801	Dizocilpin, ein selektiver NMDA-Antagonist
mV	Millivolt
Mg <sup>++</sup>	Magnesium
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRAGE	<i>neurotrophin receptor interacting MAGE homolog</i>
NT	Neurotrophin
p	phosphoryliert
P	post-natales Alter in Tagen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC-Zellen	Zellen aus einer Phäochromozytom-Zelllinie
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> (Phosphatpuffer)
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCP	Phencyclidin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKB	Protein-Kinase B, synonym zu Akt
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
p75 <sup>NTR</sup>	p75 Neurotrophin-Rezeptor
p140 <sup>trk</sup>	synonym mit Trk
Raf	= MAPKKK
Ras	Ras-Protein
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardabweichung

---

SH2	<i>src-homology-2</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Trk	Tyrosin-Kinase-Rezeptor
TrkA / B / C	Subtypen des Tyrosin-Kinase-Rezeptor
UV	Ultraviolett
u.a.	unter anderem
V	Volt
ZNS	Zentralnervensystem
Zn <sup>++</sup>	Zink
z.B.	zum Beispiel
5-HT	Hydoxy-Tryptamin, synonym mit Serotonin

## 8. Literaturverzeichnis

1. George J. Siegel, B.W.A., *Basic Neurochemistry*. 1994, New York: Raven Press Ltd.
2. Bayer, S.A., et al., *Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat*. *Neurotoxicology*, 1993. 14(1): p. 83-144.
3. Dobbing, J. and J. Sands, *Comparative aspects of the brain growth spurt*. *Early Hum Dev*, 1979. 3(1): p. 79-83.
4. Tagliatalata, G., et al., *Evidence for DNA fragmentation in the CNS of aged Fischer-344 rats*. *Neuroreport*, 1996. 7(5): p. 977-80.
5. Lipton, S.A. and S.B. Kater, *Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival*. *Trends Neurosci*, 1989. 12(7): p. 265-70.
6. Mattson, M.P., *Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture*. *Brain Res*, 1988. 472(2): p. 179-212.
7. Retz, W., J. Kornhuber, and P. Riederer, *Neurotransmission and the ontogeny of human brain*. *J Neural Transm*, 1996. 103(4): p. 403-19.
8. O'Neill, L.A. and C. Kaltschmidt, *NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function*. *Trends Neurosci*, 1997. 20(6): p. 252-8.
9. Hardingham, G.E. and H. Bading, *Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1600(1-2): p. 148-53.
10. Marini, A.M., et al., *Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate*. *J Biol Chem*, 1998. 273(45): p. 29394-9.
11. Burek, M.J. and R.W. Oppenheim, *Programmed cell death in the developing nervous system*. *Brain Pathol*, 1996. 6(4): p. 427-46.
12. Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, *Sensory neurons in culture: changing requirements for survival factors during embryonic development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. 77(2): p. 1199-203.
13. Buchman, V.L. and A.M. Davies, *Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival of embryonic sensory neurons*. *Development*, 1993. 118(3): p. 989-1001.
14. Hochstetter, F., *Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des menschlichen Gehirns*. Vol. Teil I. 1919, Vienna and Leipzig: Franz Deuticke Verlag.
15. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. 26(4): p. 239-57.
16. Eguchi, Y., S. Shimizu, and Y. Tsujimoto, *Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis*. *Cancer Res*, 1997. 57(10): p. 1835-40.
17. Herrup, K. and K. Sunter, *Numerical matching during cerebellar development: quantitative analysis of granule cell death in staggerer mouse chimeras*. *J Neurosci*, 1987. 7(3): p. 829-36.
18. Tanaka, H. and L.T. Landmesser, *Cell death of lumbosacral motoneurons in chick, quail, and chick-quail chimera embryos: a test of the quantitative matching hypothesis of neuronal cell death*. *J Neurosci*, 1986. 6(10): p. 2889-99.
19. Lushkin, *Neurogenesis of the cat's primary visual cortex*. *J Comp Neurol*, 1985. 242: p. 611-631.

20. Lushkin, *Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex*. J Neurosci, 1985. 5: p. 1062-1075.
21. Blaschke, A.J., K. Staley, and J. Chun, *Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex*. Development, 1996. 122(4): p. 1165-74.
22. Catsicas, S., S. Thanos, and P.G. Clarke, *Major role for neuronal death during brain development: refinement of topographical connections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(22): p. 8165-8.
23. Chalupa, *High precision systems require high precision blueprints*. J Cognit Neurosci, 1991. 3: p. 209-219.
24. Homma, S., H. Yaginuma, and R.W. Oppenheim, *Programmed cell death during the earliest stages of spinal cord development in the chick embryo: a possible means of early phenotypic selection*. J Comp Neurol, 1994. 345(3): p. 377-95.
25. O'Leary, *Topographic targeting errors in the retino-cllicular projections and their elimination by selective ganglion cell death*. J Neurosci, 1986. 6: p. 3692-3705.
26. Breedlove, S.M., *Sexual dimorphism in the vertebrate nervous system*. J Neurosci, 1992. 12(11): p. 4133-42.
27. White, L.D. and S. Barone, Jr., *Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain*. Cell Death Differ, 2001. 8(4): p. 345-56.
28. Meier, P., A. Finch, and G. Evan, *Apoptosis in development*. Nature, 2000. 407(6805): p. 796-801.
29. Rich, T., R.L. Allen, and A.H. Wyllie, *Defying death after DNA damage*. Nature, 2000. 407(6805): p. 777-83.
30. Yuan, J. and B.A. Yankner, *Apoptosis in the nervous system*. Nature, 2000. 407(6805): p. 802-9.
31. Stennicke, H.R. and G.S. Salvesen, *Catalytic properties of the caspases*. Cell Death Differ, 1999. 6(11): p. 1054-9.
32. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. 407(6805): p. 770-6.
33. Zimmermann, K.C., C. Bonzon, and D.R. Green, *The machinery of programmed cell death*. Pharmacol Ther, 2001. 92(1): p. 57-70.
34. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. 94(4): p. 491-501.
35. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. 7(12): p. 1166-73.
36. Martinou, J.C., S. Desagher, and B. Antonsson, *Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing*. Nat Cell Biol, 2000. 2(3): p. E41-3.
37. Scorrano, L., et al., *A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis*. Dev Cell, 2002. 2(1): p. 55-67.
38. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. 281(5381): p. 1312-6.
39. Borovitskaya, A.E., V.I. Evtushenko, and S.L. Sabol, *Gamma-radiation-induced cell death in the fetal rat brain possesses molecular characteristics of apoptosis and is associated with specific messenger RNA elevations*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. 35(1-2): p. 19-30.
40. Mesner, P.W., et al., *A timetable of events during programmed cell death induced by trophic factor withdrawal from neuronal PC12 cells*. J Neurosci, 1995. 15(11): p. 7357-66.

41. Acehan, D., et al., *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation*. Mol Cell, 2002. 9(2): p. 423-32.
42. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. 91(4): p. 479-89.
43. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. 90(3): p. 405-13.
44. Eilers, A., et al., *Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons*. J Neurosci, 1998. 18(5): p. 1713-24.
45. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science, 1998. 281(5381): p. 1322-6.
46. Barbacid, M., *The Trk family of neurotrophin receptors*. J Neurobiol, 1994. 25(11): p. 1386-403.
47. Kaplan, D.R. and R.M. Stephens, *Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor*. J Neurobiol, 1994. 25(11): p. 1404-17.
48. Johnson, D., et al., *Expression and structure of the human NGF receptor*. Cell, 1986. 47(4): p. 545-54.
49. Radeke, M.J., et al., *Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor*. Nature, 1987. 325(6105): p. 593-7.
50. Bothwell, M., *Keeping track of neurotrophin receptors*. Cell, 1991. 65(6): p. 915-8.
51. Klein, R., et al., *The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3*. Cell, 1991. 66(2): p. 395-403.
52. Lamballe, F., R. Klein, and M. Barbacid, *trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3*. Cell, 1991. 66(5): p. 967-79.
53. Soppet, D., et al., *The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor*. Cell, 1991. 65(5): p. 895-903.
54. Squinto, S.P., et al., *trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor*. Cell, 1991. 65(5): p. 885-93.
55. Ip, N.Y., et al., *Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(7): p. 3060-4.
56. Klein, R., et al., *The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4*. Neuron, 1992. 8(5): p. 947-56.
57. Belliveau, D.J., et al., *NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis*. J Cell Biol, 1997. 136(2): p. 375-88.
58. Brennan, C., K. Rivas-Plata, and S.C. Landis, *The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo*. Nat Neurosci, 1999. 2(8): p. 699-705.
59. Ip, N.Y., et al., *Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells*. Neuron, 1993. 10(2): p. 137-49.
60. Neet, K.E. and R.B. Campenot, *Receptor binding, internalization, and retrograde transport of neurotrophic factors*. Cell Mol Life Sci, 2001. 58(8): p. 1021-35.
61. Berg, J.T., J; Stryer, L, *Biochemie*. 2007, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 1224.
62. Miller, F.D. and D.R. Kaplan, *Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 2001. 58(8): p. 1045-53.

63. Chao, M.V., *The p75 neurotrophin receptor*. J Neurobiol, 1994. 25(11): p. 1373-85.
64. Bothwell, M., *p75NTR: a receptor after all*. Science, 1996. 272(5261): p. 506-7.
65. Bredesen, D.E. and S. Rabizadeh, *p75NTR and apoptosis: Trk-dependent and Trk-independent effects*. Trends Neurosci, 1997. 20(7): p. 287-90.
66. Frade, J.M. and Y.A. Barde, *Nerve growth factor: two receptors, multiple functions*. Bioessays, 1998. 20(2): p. 137-45.
67. Rabizadeh, S., et al., *Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor*. Science, 1993. 261(5119): p. 345-8.
68. Bibel, M., E. Hoppe, and Y.A. Barde, *Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR*. Embo J, 1999. 18(3): p. 616-22.
69. Friedman, W.J. and L.A. Greene, *Neurotrophin signaling via Trks and p75*. Exp Cell Res, 1999. 253(1): p. 131-42.
70. Hantzopoulos, P.A., et al., *The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins*. Neuron, 1994. 13(1): p. 187-201.
71. Chapman, B.S. and I.D. Kuntz, *Modeled structure of the 75-kDa neurotrophin receptor*. Protein Sci, 1995. 4(9): p. 1696-707.
72. Shamovsky, I.L., et al., *The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study*. Protein Sci, 1999. 8(11): p. 2223-33.
73. Mahadeo, D., et al., *High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors*. J Biol Chem, 1994. 269(9): p. 6884-91.
74. Benedetti, M., A. Levi, and M.V. Chao, *Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(16): p. 7859-63.
75. Hempstead, B.L., et al., *High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor*. Nature, 1991. 350(6320): p. 678-83.
76. Kaplan, D.R., et al., *The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor*. Science, 1991. 252(5005): p. 554-8.
77. Kaplan, D.R., D. Martin-Zanca, and L.F. Parada, *Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF*. Nature, 1991. 350(6314): p. 158-60.
78. Hagemann, C. and J.L. Blank, *The ups and downs of MEK kinase interactions*. Cell Signal, 2001. 13(12): p. 863-75.
79. Hansen, H.H., et al., *Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain*. Neurobiol Dis, 2004. 16(2): p. 440-53.
80. Felderhoff-Mueser, U., *Die Bedeutung apoptotischer Signaltransduktionsmechanismen in klinischen und experimentellen Schädigungsmodellen des unreifen Gehirns*, in *Klinik für Neonatologie, Charité Campus Virchow Klinikum*. Juni 2003, Charité Campus Virchow Klinikum Berlin. p. 65.
81. Lipsky, R.H., et al., *Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection*. J Neurochem, 2001. 78(2): p. 254-64.

82. Anton, E.S., et al., *Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(7): p. 2795-9.
83. Barker, P.A. and E.M. Shooter, *Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells*. Neuron, 1994. 13(1): p. 203-15.
84. Verdi, J.M., et al., *p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells*. Neuron, 1994. 12(4): p. 733-45.
85. Bonni, A., et al., *Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms*. Science, 1999. 286(5443): p. 1358-62.
86. Finkbeiner, S., *CREB couples neurotrophin signals to survival messages*. Neuron, 2000. 25(1): p. 11-4.
87. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. 282(5392): p. 1318-21.
88. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. 91(2): p. 231-41.
89. del Peso, L., et al., *Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt*. Science, 1997. 278(5338): p. 687-9.
90. Schiebler, *Anatomie*. 7 ed. 1997, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
91. Vallano, M.L., *Developmental aspects of NMDA receptor function*. Crit Rev Neurobiol, 1998. 12(3): p. 177-204.
92. Aamodt, S.M. and M. Constantine-Paton, *The role of neural activity in synaptic development and its implications for adult brain function*. Adv Neurol, 1999. 79: p. 133-44.
93. Patneau, D.K. and M.L. Mayer, *Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors*. J Neurosci, 1990. 10(7): p. 2385-99.
94. Benveniste, M. and M.L. Mayer, *Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine*. Biophys J, 1991. 59(3): p. 560-73.
95. Clements, J.D. and G.L. Westbrook, *Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor*. Neuron, 1991. 7(4): p. 605-13.
96. Kleckner, N.W. and R. Dingledine, *Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in Xenopus oocytes*. Science, 1988. 241(4867): p. 835-7.
97. Williams, K., et al., *Modulation of the NMDA receptor by polyamines*. Life Sci, 1991. 48(6): p. 469-98.
98. Rock, *The polyamine spermine has multiple actions on NMDA receptor single channel currents in cultured cortical neurons*. Mol. Pharmacol., 1991. 41: p. 83-88.
99. Nowak, L., et al., *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones*. Nature, 1984. 307(5950): p. 462-5.
100. Baynes, J., *Medical Biochemistry*. 2005, Philadelphia: Elsevier.
101. Traynelis, S.F. and S.G. Cull-Candy, *Pharmacological properties and H<sup>+</sup> sensitivity of excitatory amino acid receptor channels in rat cerebellar granule neurones*. J Physiol, 1991. 433: p. 727-63.

102. Perkinton, M.S., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones*. J Neurochem, 2002. 80(2): p. 239-54.
103. Lucas, *The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina*. Arch. Ophthalmol. , 1958. 58: p. 193-201.
104. Olney, J.W., *Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate*. Science, 1969. 164(880): p. 719-21.
105. Olney, J.W., J. Labruyere, and M.T. Price, *Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs*. Science, 1989. 244(4910): p. 1360-2.
106. Gould, E., H.A. Cameron, and B.S. McEwen, *Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus*. J Comp Neurol, 1994. 340(4): p. 551-65.
107. Balazs, R., N. Hack, and O.S. Jorgensen, *Interactive effects involving different classes of excitatory amino acid receptors and the survival of cerebellar granule cells in culture*. Int J Dev Neurosci, 1990. 8(4): p. 347-59.
108. Bittigau, P., et al., *Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(23): p. 15089-94.
109. Ikonomidou, C., et al., *Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome*. Science, 2000. 287(5455): p. 1056-60.
110. Ikonomidou, C., et al., *Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. Science, 1999. 283(5398): p. 70-4.
111. Agmon, A. and D.K. O'Dowd, *NMDA receptor-mediated currents are prominent in the thalamocortical synaptic response before maturation of inhibition*. J Neurophysiol, 1992. 68(1): p. 345-9.
112. Gaiarsa, J.L., et al., *The allosteric glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor modulates GABAergic-mediated synaptic events in neonatal rat CA3 hippocampal neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(1): p. 343-6.
113. Hestrin, S., *Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse*. Nature, 1992. 357(6380): p. 686-9.
114. Tsumoto, T., et al., *NMDA receptors in the visual cortex of young kittens are more effective than those of adult cats*. Nature, 1987. 327(6122): p. 513-4.
115. Friedman, H.V., et al., *Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment*. Neuron, 2000. 27(1): p. 57-69.
116. Wu, G., R. Malinow, and H.T. Cline, *Maturation of a central glutamatergic synapse*. Science, 1996. 274(5289): p. 972-6.
117. Yen, L.H., J.T. Sibley, and M. Constantine-Paton, *Fine-structural alterations and clustering of developing synapses after chronic treatments with low levels of NMDA*. J Neurosci, 1993. 13(11): p. 4949-60.
118. Bellinger, F.P., et al., *Long-lasting synaptic modification in the rat hippocampus resulting from NMDA receptor blockade during development*. Synapse, 2002. 43(2): p. 95-101.
119. Bourne, H.R. and R. Nicoll, *Molecular machines integrate coincident synaptic signals*. Cell, 1993. 72 Suppl: p. 65-75.

120. Brooks, W.J., T.L. Petit, and J.C. LeBoutillier, *Effect of chronic administration of NMDA antagonists on synaptic development*. Synapse, 1997. 26(2): p. 104-13.
121. Rauschecker, J.P., U. Egert, and A. Kossel, *Effects of NMDA antagonists on developmental plasticity in kitten visual cortex*. Int J Dev Neurosci, 1990. 8(4): p. 425-35.
122. Bhave, S.V. and P.L. Hoffman, *Ethanol promotes apoptosis in cerebellar granule cells by inhibiting the trophic effect of NMDA*. J Neurochem, 1997. 68(2): p. 578-86.
123. Hwang, J.Y., et al., *N-Methyl-D-aspartate receptor blockade induces neuronal apoptosis in cortical culture*. Exp Neurol, 1999. 159(1): p. 124-30.
124. Simon, D.K., et al., *N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(22): p. 10593-7.
125. Yoon, W.J., et al., *Blockade of ionotropic glutamate receptors produces neuronal apoptosis through the Bax-cytochrome C-caspase pathway: the causative role of Ca<sup>2+</sup> deficiency*. J Neurochem, 2003. 85(2): p. 525-33.
126. Dikranian, K., et al., *Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain*. Neurobiol Dis, 2001. 8(3): p. 359-79.
127. Ishimaru, M.J., et al., *Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain*. J Comp Neurol, 1999. 408(4): p. 461-76.
128. Heumann, R., et al., *Transgenic activation of Ras in neurons promotes hypertrophy and protects from lesion-induced degeneration*. J Cell Biol, 2000. 151(7): p. 1537-48.
129. Martins, R.A., et al., *NMDA receptor activation modulates programmed cell death during early post-natal retinal development: a BDNF-dependent mechanism*. J Neurochem, 2005. 95(1): p. 244-53.
130. Xiong, H., et al., *Neurotrophins induce BDNF expression through the glutamate receptor pathway in neocortical neurons*. Neuropharmacology, 2002. 42(7): p. 903-12.
131. Johnson, E.M., Jr. and T.L. Deckwerth, *Molecular mechanisms of developmental neuronal death*. Annu Rev Neurosci, 1993. 16: p. 31-46.
132. McDonald, J.W. and M.V. Johnston, *Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development*. Brain Res Brain Res Rev, 1990. 15(1): p. 41-70.
133. Casaccia-Bonnel, P., et al., *Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75*. Nature, 1996. 383(6602): p. 716-9.
134. Dobrowsky, R.T., G.M. Jenkins, and Y.A. Hannun, *Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors*. J Biol Chem, 1995. 270(38): p. 22135-42.
135. Dobrowsky, R.T., et al., *Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor*. Science, 1994. 265(5178): p. 1596-9.
136. Salehi, A.H., et al., *NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis*. Neuron, 2000. 27(2): p. 279-88.
137. Casademunt, E., et al., *The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death*. Embo J, 1999. 18(21): p. 6050-61.

138. Chittka, A. and M.V. Chao, *Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(19): p. 10705-10.
139. Khursigara, G., J.R. Orlinick, and M.V. Chao, *Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6*. J Biol Chem, 1999. 274(5): p. 2597-600.
140. Mukai, J., et al., *NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR*. J Biol Chem, 2000. 275(23): p. 17566-70.
141. Yamashita, T., K.L. Tucker, and Y.A. Barde, *Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth*. Neuron, 1999. 24(3): p. 585-93.
142. Ye, X., et al., *TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction*. J Biol Chem, 1999. 274(42): p. 30202-8.
143. Slack, R.S., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer of the tumor suppressor, p53, induces apoptosis in postmitotic neurons*. J Cell Biol, 1996. 135(4): p. 1085-96.
144. Roux, P.P., et al., *p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure*. J Neurosci, 1999. 19(16): p. 6887-96.
145. Bredesen, D.E., et al., *p75NTR and the concept of cellular dependence: seeing how the other half die*. Cell Death Differ, 1998. 5(5): p. 365-71.
146. Majdan, M., et al., *TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal*. J Cell Biol, 2001. 155(7): p. 1275-85.
147. Lu, L.X., et al., *General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain*. Apoptosis, 2006. 11(9): p. 1603-15.
148. Zhou, L., et al., *NMDA inhibitors cause apoptosis of pyramidal neurons in mature piriform cortex: Evidence for a nitric oxide-mediated effect involving inhibitory interneurons*. Neuropharmacology, 2007. 52: p. 1528-1537.
149. Du, K., et al., *Characterization of a CREB gain-of-function mutant with constitutive transcriptional activity in vivo*. Mol Cell Biol, 2000. 20(12): p. 4320-7.
150. Riccio, A., et al., *Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons*. Science, 1999. 286(5448): p. 2358-61.
151. Somers, J.P., J.A. DeLoia, and A.J. Zeleznik, *Adenovirus-directed expression of a nonphosphorylatable mutant of CREB (cAMP response element-binding protein) adversely affects the survival, but not the differentiation, of rat granulosa cells*. Mol Endocrinol, 1999. 13(8): p. 1364-72.
152. Mantamadiotis, T., et al., *Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration*. Nat Genet, 2002. 31(1): p. 47-54.
153. Hardingham, G.E., F.J. Arnold, and H. Bading, *A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication*. Nat Neurosci, 2001. 4(6): p. 565-6.
154. Kornhauser, J.M., et al., *CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events*. Neuron, 2002. 34(2): p. 221-33.

155. Paul, S., et al., *NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling*. Nat Neurosci, 2003. 6(1): p. 34-42.
156. Impey, S., et al., *Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV*. Neuron, 2002. 34(2): p. 235-44.
157. Wu, G.Y., K. Deisseroth, and R.W. Tsien, *Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(5): p. 2808-13.
158. Hardingham, G.E., Y. Fukunaga, and H. Bading, *Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways*. Nat Neurosci, 2002. 5(5): p. 405-14.
159. Mayr, B. and M. Montminy, *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(8): p. 599-609.
160. Shaywitz, A.J. and M.E. Greenberg, *CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals*. Annu Rev Biochem, 1999. 68: p. 821-61.
161. Shieh, P.B., et al., *Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression*. Neuron, 1998. 20(4): p. 727-40.
162. Barco, A., J.M. Alarcon, and E.R. Kandel, *Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture*. Cell, 2002. 108(5): p. 689-703.
163. Silva, A.J., et al., *CREB and memory*. Annu Rev Neurosci, 1998. 21: p. 127-48.
164. Papadia, S., et al., *Nuclear Ca<sup>2+</sup> and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection*. J Neurosci, 2005. 25(17): p. 4279-87.
165. Walton, M.R. and I. Dragunow, *Is CREB a key to neuronal survival?* Trends Neurosci, 2000. 23(2): p. 48-53.
166. West, A.E., et al., *Calcium regulation of neuronal gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(20): p. 11024-31.
167. Mattson, M.P. and S. Camandola, *NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders*. J Clin Invest, 2001. 107(3): p. 247-54.
168. Rong, Y. and M. Baudry, *Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures*. J Neurochem, 1996. 67(2): p. 662-8.
169. Finkbeiner, S., *Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene*. Cell Mol Life Sci, 2000. 57(3): p. 394-401.
170. Dzielko, M., et al., *Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity*. Neurobiol Dis, 2004. 15(2): p. 177-87.
171. Climent, E., et al., *Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways*. J Neurosci Res, 2002. 68(2): p. 213-25.
172. Felderhoff-Mueser, U., et al., *Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain*. Neurobiol Dis, 2002. 11(2): p. 231-45.
173. Kornblum, H.I., et al., *Induction of brain derived neurotrophic factor mRNA by seizures in neonatal and juvenile rat brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1997. 44(2): p. 219-28.

174. Lee, H. and B.H. Choi, *Density and distribution of excitatory amino acid receptors in the developing human fetal brain: a quantitative autoradiographic study*. Exp Neurol, 1992. 118(3): p. 284-90.
175. Jevtovic-Todorovic, V., et al., *Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin*. Nat Med, 1998. 4(4): p. 460-3.
176. White, P.F., W.L. Way, and A.J. Trevor, *Ketamine--its pharmacology and therapeutic uses*. Anesthesiology, 1982. 56(2): p. 119-36.
177. Lovinger, D.M., G. White, and F.F. Weight, *Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons*. Science, 1989. 243(4899): p. 1721-4.
178. Coles, C.D., I.E. Smith, and A. Falek, *Prenatal alcohol exposure and infant behavior: immediate effects and implications for later development*. Adv Alcohol Subst Abuse, 1987. 6(4): p. 87-104.
179. Jones, K.L. and D.W. Smith, *Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy*. Lancet, 1973. 2(7836): p. 999-1001.
180. Hatazawa, J., et al., *Cortical motor-sensory hypometabolism in amyotrophic lateral sclerosis: a PET study*. J Comput Assist Tomogr, 1988. 12(4): p. 630-6.
181. Blass, J.P., R.K. Sheu, and J.M. Cedarbaum, *Energy metabolism in disorders of the nervous system*. Rev Neurol (Paris), 1988. 144(10): p. 543-63.
182. Ford, L.M., et al., *MK-801 prevents hippocampal neurodegeneration in neonatal hypoxic-ischemic rats*. Arch Neurol, 1989. 46(10): p. 1090-6.
183. Hattori, H., et al., *Posthypoxic treatment with MK-801 reduces hypoxic-ischemic damage in the neonatal rat*. Neurology, 1989. 39(5): p. 713-8.
184. McDonald, J.W., F.S. Silverstein, and M.V. Johnston, *MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage*. Eur J Pharmacol, 1987. 140(3): p. 359-61.
185. Olney, J.W., et al., *MK-801 prevents hypobaric-ischemic neuronal degeneration in infant rat brain*. J Neurosci, 1989. 9(5): p. 1701-4.
186. Davis, S.M., et al., *Termination of Acute Stroke Studies Involving Selfotel Treatment. ASSIST Steering Committed*. Lancet, 1997. 349(9044): p. 32.
187. McBurney, R.N., *Development of the NMDA ion-channel blocker, aptiganel hydrochloride, as a neuroprotective agent for acute CNS injury*. Int Rev Neurobiol, 1997. 40: p. 173-95.
188. Olney, J.W., et al., *Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. Brain Pathol, 2002. 12(4): p. 488-98.
189. Lema Tomé, C., et al., *Neonatal exposure to MK801 induces structural reorganization of the central nervous system*. Neuroreport, 2006. 17(8): p. 779783.
190. Braun, J.S., et al., *Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis*. Nat Med, 1999. 5(3): p. 298-302.
191. Joly, L.M., et al., *Caspase inhibition after neonatal ischemia in the rat brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. 24(1): p. 124-31.
192. Asimiadou, S., et al., *Protection with estradiol in developmental models of apoptotic neurodegeneration* Ann Neurol, 2005. 58: p. 266-276.

193. Gerstner, B., et al., *Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter*. Ann Neurol, 2007. 61: p. 562-573.
194. Zhang, Y. and B.R. Bhavnani, *Glutamat-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release*. BMC Neuroscience, 2005. 6(13): p. 1-23.
195. Xilouri, M., et al., *Neuroprotective effects of steroid analogues on P19-N neurons*. Neurochemistry International, 2007. 50: p. 660-670.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Erklärung an Eides statt**

Ich, Tim Benjamin Briem, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „*Mechanismen, die nach NMDA-Rezeptor-Blockade zur disseminierten Apoptose im sich entwickelnden Rattengehirn führen*“ ohne die Hilfe Dritter selbst verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt.

Berlin, 17.09.07

Tim B. Briem

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt allen, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Im Besonderen sind dies:

Meine Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Chrysanthy Ikonomidou - für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die vielfältige Unterstützung sowie die exzellente Betreuung.

Herr Dr. Henrik Hansen – für die Einarbeitung in die Methodik, die unermüdliche und stets geduldige Hilfestellung und Betreuung über den gesamten Verlauf dieser Arbeit.

Herr Marco Sifringer – für die umfangreiche und vielseitige Hilfe während der täglichen Laborarbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Ikonomidou des NWFZ – für das freundschaftliche und konstruktive Miteinander sowie für die stets guten Ratschläge.

Meine Eltern Gabriele und Wilfried Briem sowie meinen Geschwistern Stefanie und Daniel - für die kontinuierliche Unterstützung während des Studiums.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin und Partnerin Julia Janin Krüger, ohne deren unermüdliche Motivation und liebevolle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.