

## 1. Einleitung

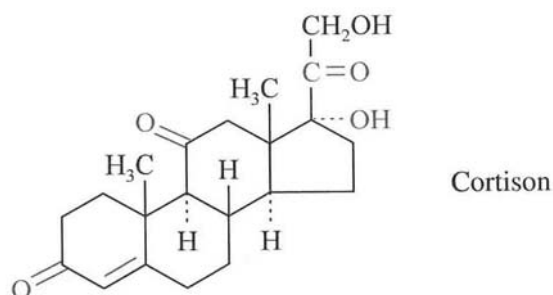
### 1.1. Glucocorticoide

Glucocorticoide sind unverzichtbar für die normale Entwicklung und Wachstum, den Energiestoffwechsel, die Regulation des Immunsystems und bei der Stressreaktion.

Die Isolierung des Cortisons aus der Nebennierenrinde durch Kendall, Wintersteiner und Reichstein im Jahre 1936, ermöglichte es Hench 1948 erstmals diese Substanz zur Behandlung bei der rheumatoiden Arthritis einzusetzen (Wintersteiner, 1936; Reichstein, 1936; Hench et al., 1949; Hench, 1950). Aufgrund ihrer schnellen und stark entzündungshemmenden Wirkung erfolgte ein breiter Einsatz von Cortison bei der Behandlung akuter und chronischer Entzündungen, wodurch jedoch die Zahl der Nebenwirkungen stieg, so dass in den fünfziger Jahren die Ablehnung wuchs. Heute ist Cortison ein unverzichtbares Medikament, welches bei der Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen, wie rheumatologischen und neurologischen Erkrankungen, bei allergischen Reaktionen bei adäquater Dosierung berechenbar und nebenwirkungsarm ist.

#### 1.1.1. Struktur, hormonale Sekretion und Regulation

Bei den Glucocorticoiden handelt es sich um Steroide mit 21 Kohlenstoffatomen, die aus dem Cholesterin in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet werden (Struktur siehe **Abbildung 1**).



**Abbildung 1.** Struktur von Cortison

Unter Ruhebedingungen unterliegt die Sekretion einem zirkadianen Rhythmus, wobei die größte Menge in den frühen Morgenstunden freigesetzt wird. Der zirkadiane Rhythmus

reagiert empfindlich auf Veränderung von Essgewohnheiten, Aktivität und Lichtverhältnissen und kann durch Stress unterbrochen werden. In akuten Stresssituationen kommt es zu einer vermehrten Freisetzung der hypothalamischen Hormone Corticotropin Releasing Hormon (CRH) und Vasopressin (ADH) aus dem Nucleus paraventricularis. Beide Hormone führen zur vermehrten Sekretion vom adrenokortikotropen Hormon (ACTH) aus der Hirnanhangdrüse (Hypophyse). Sezerniertes ACTH wiederum induziert die Produktion von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde. Abhängig vom Stresstyp können aber auch andere Hormone oder Zytokine an der Regulation der Cortisolsekretion beteiligt sein. Der Hypothalamus mit den Hormonen CRH und ADH und das Locus coeruleus-Noradrenalinsystem (zentrales sympathisches System) sind die zentrale Kontrollstation des Stresssystems. Sie aktivieren sich gegenseitig und interagieren gemeinsam mit drei höheren Hirnzentren. Im mesokortikal/mesolimbischen System wird Affekt und Erwartung beeinflusst. Der Amygdala/Hippokampus-Komplex lenkt die Initiierung, Verbreitung und Beendigung der Stressaktivität und der Nucleus arcuatus ist für die Schmerzempfindung verantwortlich (Tsigos und Chrousos, 2002).

Glucocorticoide fungieren als Hauptregulatoren der neuroendokrinen Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und in der Beendigung der Stressantwort. Zwischen den Glucocorticoiden und der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und einigen suprahypothalamischen Strukturen besteht dabei ein negativer Rückkopplungsmechanismus. So führt die Aktivierung des Mineralocorticoidrezeptors im Hippokampus über GABA-erge ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) Hemmung der CRH-Neurone zur negativen Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (Gesing et al., 2001; Reul et al., 2000a; Carrasco und Van de Kar, 2003) .

### **1.1.2. Rezeptoren und molekulare Mechanismen**

Glucocorticoide können ihre Wirkung über zwei verschiedene Corticosteroidrezeptoren, dem Mineralocorticoidrezeptor (MR) und dem Glucocorticoidrezeptor (GR) entfalten. Unter physiologischen Bedingungen haben Glucocorticoide das Potential beide Rezeptortypen zu aktivieren, Mineralocorticoide, wie Aldosteron, dagegen binden nur an den MR. Das endogene Glucocorticoid Corticosteron hat eine zehnfach höhere Bindungsaffinität zum

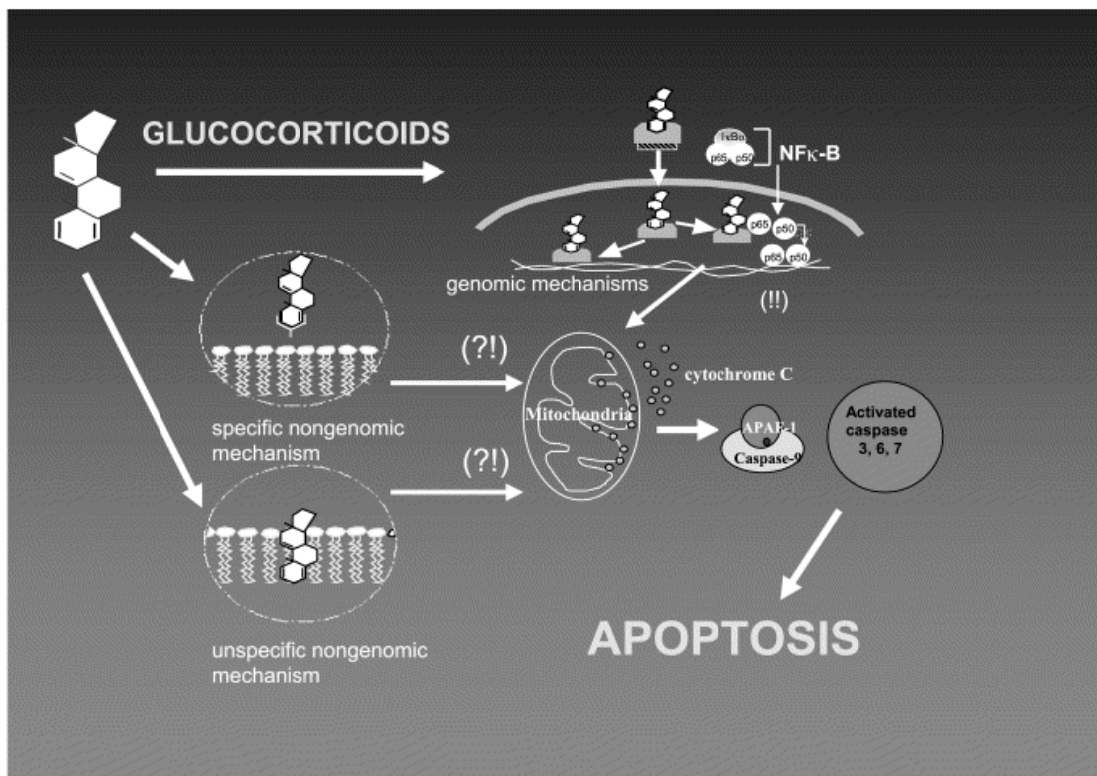
MR als zum GR. Das synthetisch hergestellte Glucocorticoid Dexamethason hat eine höhere Bindungsaffinität zum GR.

GR werden in den meisten Zelltypen exprimiert, wogegen MR hauptsächlich im Gehirn, in den Epithelzellen der Niere und Kolon und in den exokrinen Drüsen zu finden sind. Im Gehirn sind GR ubiquitär verteilt mit hohen Dichten im zerebralen Kortex, Hippokampus, Thalamus sowie im paraventriculären und supraoptischen Kern des Hypothalamus. Die höchsten Dichten an MR sind in den Pyramidenzellen der Cornu ammonis-Regionen 1 und 2 des Hippokampus, den Granulosazellen des Gyrus dentatus und im dorsolateralen Septum exprimiert. Geringere Dichten finden sich im Korpus amygdaloideum und im zerebralen Kortex (Reul et al., 2000b; Kellendonk et al., 2002).

Beide Corticosteroidrezeptortypen der Nebennierenrindenhormone agieren als Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch die Bindung von Steroidhormonen reguliert wird. Die inaktiven Steroidrezeptoren liegen im Zytosol vor und bestehen aus einem Multiproteinkomplex. Ligandenbindung bewirkt die Abspaltung der Proteinkomplexe vom Rezeptor und ermöglicht die Transkription von Zielgenen. Physiologischerweise wird der GR unter basalen Konditionen aktiviert, wohingegen der MR bei höheren Glucocorticoidkonzentrationen besetzt wird. Hohe Konzentrationen werden während des zirkadianen Rhythmus in den frühen Morgenstunden erreicht oder bei Stresssituationen (de Kloet et al., 1993).

Glucocorticoide können ihre Wirkungen über verschiedene Mechanismen entfalten. Ihre antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Effekte erfolgen hauptsächlich über genomische Mechanismen. Sie werden durch zytosolische Rezeptoren vermittelt, die die Expression spezifischer Gene modifizieren. Hierfür reichen niedrige Steroidkonzentrationen aus, welche von endogenen Glucocorticoiden unter basaler Sekretion oder unter niedrigdosierter Glucocorticoidtherapie erreicht werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass weitere Mechanismen mit schnellem Wirkungseintritt bei hohen Glucocorticoiddosen existieren, so dass die Involvierung von Transkriptionsmechanismen unwahrscheinlich ist (Buttgereit, 2000; Buttgereit und Scheffold, 2002; Gold et al., 2001). Sie werden in unspezifische nicht-genomische und spezifische nicht-genomische Wirkungen unterschieden (siehe **Abbildung 2**). Unspezifische nicht-genomische Wirkungen erfolgen über direkte Wechselwirkungen der Glucocorticoide mit der

Zellmembran. Spezifische nicht-genomische Effekte werden durch steroidselektive Membranrezeptoren vermittelt. Membranrezeptoren sind unter anderem bei neuronalen Membranen von Amphibien, humanen Lymphomzellen, bei Monozyten und B-Lymphozyten des Menschen beschrieben worden (Orchinik et al., 1991; Chen et al., 1999; Bartholome et al., 2004). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass schnelle Glucocorticoidwirkungen über den zytosolischen Rezeptor erfolgen, jedoch nicht auf der Transkriptionsebene. So werden sehr rasante Dexamethasonwirkungen beschrieben, die über den GR unabhängig von der Transkription zur Aktivierung der Phosphoinositid 3 (PI 3)-Kinase und endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthetase führen (Limbourg et al., 2002; Hafezi-Moghadam et al., 2002).



**Abbildung 2.** Molekulare Mechanismen der nicht-genomischen und genomischen Steroidwirkungen. APAF=Apoptose Protease aktivierender Faktor (Gold et al., 2001)

Über den genomischen Weg passieren Glucocorticoide die Zellmembran und entfalten über den GR, welcher im Zytosol an einem Multiproteinkomplex gebunden ist, ihre Wirkungen. Dieser Multiproteinkomplex dissoziiert vom Rezeptor, sobald dieser durch Ligandenbindung aktiviert wird. Der aktivierte GR kann im Zellkern unterschiedlich agieren,

einmal als Dimer über GR-response-elements die Transkription induzieren oder blockieren. Zum anderen können aktive GR als Monomere über Protein-Protein-Interaktionen hemmend z.B. mit AP-1 (Jun:Fos heterodimer) oder synergistisch z.B. mit AP-1 (Jun homodimer) wirken (Gottlicher et al., 1998).

Es gibt Hinweise, dass die antiinflammatorische und immunsuppressive Aktivität der Glucocorticoide über eine GR-vermittelte Protein-Protein-Interaktion wie z.B. AP-1 erfolgt, mit nachfolgender Transrepression (Gottlicher et al., 1998; Reichardt et al., 2000a; Reichardt et al., 2000b). Interessanterweise, werden einige Nebenwirkungen der Glucocorticoide hauptsächlich über den genomischen Weg durch Induktion der Transkription vermittelt (Schacke et al., 2004).

### **1.1.3. Einfluss von Glucocorticoiden auf den Zelltod**

In den letzten Jahren zeigte sich, dass Glucocorticoide den Zelltod gegensätzlich beeinflussen können. Zum einen sind sie potente antiinflammatorische Substanzen, indem sie zur Apoptose von Zellen des hämatopoetischen Systems wie Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten führen. Zum anderen gibt es Hinweise, dass Glucocorticoide Zellen in entzündeten Geweben schützen (Amsterdam et al., 2002).

Im Gehirn sind Glucocorticoide sowohl in neurodegenerativen, wie auch in neuroprotektiven Prozessen involviert (Abraham et al., 2001; Lee et al., 2002). Proapoptotische Wirkungen von Glucocorticoiden werden bei hippocampalen Neuronen beschrieben, wobei die Verletzbarkeit der Neurone durch metabolische Schädigung erhöht oder der durch oxidativen Stress induzierte Zelltod gesteigert wird (Behl et al., 1997; Haynes et al., 2001). Antiapoptotische Wirkungen zeigen sich unter Dexamethasonbehandlung, durch welche Neuronen vor hypoxisch-ischämischer Schädigung geschützt werden (Limbourg et al., 2002; Liu et al., 2000; Tuor, 1997). Beim malignen neuroleptischen Syndrom resultiert unter Methylprednisolon-Pulstherapie eine kürzere Krankheitsdauer und deutliche Symptomverbesserung (Sato et al., 2003). Auch bei der offenen Herzchirurgie wurde durch Vorbehandlung mit Corticosteroiden eine Neuroprotektion nach Kreislaufstillstand beobachtet (Shum-Tim et al., 2001). Glucocorticoide haben auch eine fundamentale Bedeutung in der Regulierung des dem

Gehirn eigenen Immunsystems und spielen eine große Rolle für den Schutz des Gehirns gegen die schädigende Wirkung von Lipopolysacchariden der Bakterienzellmembran (Nadeau und Rivest, 2003).

## **1.2. Der neuronale Zelltod**

Bei verschiedenen neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen spielen sowohl der nekrotische als auch der apoptotische Zelltod eine Rolle. Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist eine Form des physiologischen Zelltodes. Sie ist während der Embryogenese in allen Geweben nachweisbar, ebenso bei der Gewebsregeneration und der Zellerneuerung. Apoptose spielt aber auch eine Rolle in der Pathologie von chronischen neurologischen Erkrankungen wie der Alzheimer'schen Krankheit, der Parkinsonschen Krankheit und der Amyothrophen Lateralsklerose (Leist und Nicotera, 1998; Dragunow et al., 1995; Anglade et al., 1997). Auch bei akuten neurologischen Erkrankungen wie nach Schädelhirntraumata, Rückenmarksverletzungen und der zerebralen Ischämie gibt es Hinweise, dass neben dem nekrotischem Zelltod auch apoptotische Merkmale zu finden sind (Honig und Rosenberg, 2000; Ekshyyan und Aw, 2004; Martin, 2001).

Kerr, Wyllie und Currie (1972) beschrieben erstmals die morphologischen Veränderungen, die während der Apoptose auftreten. Charakteristisch ist die Zellschrumpfung, Bläschenbildung an der Zellmembran (Blebbing), Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation in den Zellkernen. Beim Zerfall der Zelle entstehen Fragmente (Apoptose-Körperchen), die phagozytiert werden.

Die Nekrose kann nach endogener oder exogener Noxeneinwirkung auftreten, wenn die Zelle dem schädigenden Reiz lange und stark genug ausgesetzt ist. Üblicherweise gehen reversible Veränderungen wie Zellschwellung oder -verfettung voraus. Die Nekrose ist durch massiven Ioneneinstrom, mitochondriale Schwellung, Zellschwellung, unspezifische DNA-Brüche und Zellmembranruptur charakterisiert.

Immer mehr Befunde zeigen, dass die klassische Apoptose und Nekrose die Extremformen einer Reihe von möglichen morphologischen und biochemischen Formen des Zelltodes präsentieren. Die beiden klassischen Typen können nach Exposition mit dem

gleichen Stimulus simultan in Geweben oder Zellkulturen auftreten. Oft ist die Intensität der gleichen Noxe entscheidend, welcher Zelltod resultiert (Leist und Nicotera, 1997).

Die Erkenntnis, dass die Apoptose ein normaler physiologischer Prozess ist, basiert auf genetischen Studien an der Nematode *Caenorhabditis elegans*. An den sogenannten CED Genen konnte gezeigt werden, dass sie eine Schlüsselrolle im programmierten Zelltod spielen. CED-3 und CED-4 initiieren die Apoptose, wohingegen CED-9 die Apoptose hemmt. Homolog zu den CED-3, welche für Cysteinylproteasen enkodieren, sind bei den Säugetieren die Caspasen. Die Aktivierung kann über die Freisetzung von Cytochrom C und Apoptose induzierendem Faktor aus den Mitochondrien, über die Aktivierung von sogenannten Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche oder über die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum erfolgen (Nakagawa et al., 2000; Mehmet, 2000). Von zentraler Bedeutung ist die Caspase-3, die in den meisten Zellen als Proenzym (Procaspase-3) vorliegt. Die Inaktivierung der Caspase-3 kann direkt über hemmende Proteine (IAP=inhibitor of apoptotic proteins) getriggert werden oder über Interaktion des endogenen Zellzyklusinhibitor p21 mit der Procaspase-3 erfolgen (Suzuki et al., 1998; Suzuki et al., 1999).

Auch die Produkte der Bcl<sub>2</sub>-Familie spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose. Sie sind Strukturhomologe zu CED-9, beinhalten jedoch zwei Subgruppen, welche entweder anti- oder proapoptotisch wirken (Hengartner und Horvitz, 1994a; Hengartner und Horvitz, 1994b).

Interessanterweise sind Apoptose und Zellproliferation eng miteinander verknüpft. Eine Reihe von Befunden weist sogar in postmitotischen neuronalen Zellen auf eine Zellzyklusaktivierung bei der Initiierung der Apoptose hin. Der Zellzyklus wird in vier Phasen eingeteilt, G<sub>1</sub> (1.Gap=Lücke), S (Synthese der DNA), G<sub>2</sub>, M (Mitose)-Phase. Der Ablauf wird durch eine Kaskade von Expression, Aktivierung und Hemmung zellzyklusabhängiger Proteinkinasen (Cdks), Cyclinen und Zellzyklusinhibitoren reguliert. Cdks führen über die Phosphorylierung von Serin- und Threoningruppen bestimmter Substrate zur Progression des Zellzyklus. Ihre Aktivität ist abhängig von der Anwesenheit von aktivierten Untereinheiten, den Cyclinen. Die Zellzyklusinhibitoren können in zwei Familien eingeteilt werden. Mitglieder der Kip/Cip-Familie (p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup>) regulieren die Aktivität aller G1 Cyclin-Cdk-Komplexe und weniger ausgeprägt den Cyclin-

B/CDC2-Komplex. Mitglieder der INK4-Familie (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> und p19<sup>INK4d</sup>) hemmen spezifisch Cdk4 und Cdk6 (Sherr und Roberts 1999). Eines der bestcharakterisierten Substrate der Cdks in der G<sub>1</sub>-Phase ist das Retinoblastomprotein (Rb) und die Rb-verwandten Proteine p107 und p130. Jedes dieser Rb-Familienmitglieder kann zum Zellzyklusstop in der späten G<sub>1</sub>-Phase führen. Dieser Zellzyklusarrest erfolgt über Bindung an E2F-Transkriptionsfaktoren mit Hemmung der Transkription. In ruhenden Zellen (G<sub>0</sub>) liegt das Rb in nichtphosphorylierter aktiver Form vor, der mit E2F-Transkriptionsfaktoren interagiert und deren Aktivität hemmt. Unter mitotischen Stimuli entsteht neusynthetisiertes Cyclin-D, das mit Cdk4 oder Cdk6 einen Komplex bildet und Zellen aus der G<sub>0</sub>-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase führt. Cyclin-D-Cdk4/6 initiiert die Rb-Phosphorylierung und schwächt dessen hemmende Aktivität. In der G<sub>1</sub>-Phase entsteht vermehrt Cyclin-E, das einen Komplex mit Cdk2 eingeht und notwendig für den Übergang in die S-Phase ist. Cyclin-E-Cdk2 hat die Hyperphosphorylierung von Rb zur Folge und komplettiert damit die funktionelle Inaktivität von Rb. Die Folge ist die Aktivierung von E2F-Zielgenen, die für die S-Phase benötigt werden (Liu und Greene, 2001; Kruman et al., 2004).

Der Austrittspunkt aus dem Zellzyklus und Eintritt in die Apoptose variiert und ist vom apoptotischen Stimulus und von der Reife der Neuronen abhängig. Eine Vielzahl von zellzyklusverwandten Ereignissen werden bei neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben. Dazu zählen der Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase, die DNA-Synthese und die Expression von G<sub>2</sub>/M-Markern. Bei der Demenz vom Alzheimer-Typ zeigen zahlreiche Studien, dass es zum Wiedereintritt der Neuronen in den Zellzyklus vor dem apoptotischen Zelltod kommt. Eine Expression von G<sub>1</sub>-Markern wie Cyclin-D, Cdk4/6 und der späten G<sub>1</sub>-Marker Cyclin-E und Cdk2 (Nagy et al., 1998; Nagy et al., 1997), die DNA-Replikation (Yang et al., 2001) und die Expression der mitotischen CDC2/Cyclin-B<sub>1</sub> Kinase (Vincent et al., 1997) werden beschrieben. Auch bei der Amyotrophen Lateralsklerose werden G<sub>1</sub>/S-Phase Proteine wie Cyclin-D, Cdk4, hyperphosphoryliertes Rb und E2F-1 in Motorneuronen des Rückenmarks und motorischen Kortex vorgefunden (Ranganathan und Bowser, 2003).

Bei tierexperimentellen Schlaganfallmodellen ist die Expression von Cyclin-D und -E, Cdk4 und Cdk2, p21, phosphoryliertem Rb und E2F bei fokalen und globalen



zerebralen Ischämien beschrieben worden (Katchanov et al., 2001; Hayashi et al., 2000). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Nervenzellen die DNA-Replikation unter pathophysiologischen Bedingung wieder beginnen. Vor der eigentlichen Zellteilung kommt es jedoch zum neuronalen Zelltod. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass der Cdk-Hemmer Flavopiridol den Zellschaden reduzieren konnte (Osuga et al., 2000; Wang et al., 2002).

### **1.3. Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung von Glucocorticoiden beim apoptotischem Zelltod von Neuronen**

Es wurden verschiedene Mechanismen für die antiapoptotischen Wirkungen von Glucocorticoiden beschrieben. Ein möglicher Weg stellt der Einfluss von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl<sub>2</sub> und Bcl<sub>XL</sub> dar, die unter anderem durch Dexamethasonbehandlung in verschiedenen Zelltypen vermehrt exprimiert werden (Gorman et al., 2000; Sasson et al., 2001; Sasson et al., 2002; Bailly-Maitre et al., 2001; Cardenas et al., 2002). Gegensätzliche Wirkungen von GR und MR auf den Zelltod sind auf die unterschiedliche Beeinflussung der Bcl<sub>2</sub>-Familie und der Regulierung des Tumorsuppressorgens p53 zurückzuführen (Almeida et al., 2000).

Glucocorticoide können möglicherweise auch in den Prozess der Zellzyklusaktivierung bei Initiierung der Apoptose eingreifen. So wurden z.B. Interaktionen zwischen Glucocorticoiden und der Phosphorylierung von Rb mit einer GR-vermittelten Inhibierung des Wiedereintritts in den Zellzyklus beschrieben (Sanchez et al., 1993; Rogatsky et al., 1997; Reil et al., 2000; Singh et al., 2001). Hemmung der Phosphorylierung von Rb resultiert in einer Inaktivierung der E2F-Transkriptionsfamilie und verhindert somit die Apoptose.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass der PI 3-Kinase Weg eine bedeutende Rolle für das Überleben von Neuronen spielt (Brunet et al., 2001). Aktiviert von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, trophischen Faktoren oder Neurotransmittern vermitteln PI 3-Kinasen die Differenzierung und das Überleben von Neuronen. Sie produzieren Inositollipide, welche als „second messenger“ das externe Signal intrazellulär weiterleiten und so die Aktivität von verschiedenen Enzymen kontrollieren. Eine zentrale Rolle spielt

die Familie der Serin-Threonin-Proteinkinasen, die durch die PI 3-Kinase aktiviert werden. Zu ihnen gehören die Proteinkinase Akt und die Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase (SGK). Akt und SGK verhindern die Apoptose über transkriptionsabhängige und -unabhängige Wege.

Es gibt verschiedene Verbindungen zwischen den Glucocorticoiden und der PI 3-Kinase. So kann die unter hochdosierter Glucocorticoidgabe erreichte neuroprotektive Wirkung beim ischämischen Insult und die kardiovaskuläre Protektion beim akuten Myokardinfarkt durch Hemmung der PI 3-Kinase aufgehoben werden. Diese Wirkung ist abhängig von der Aktivierung des GR, jedoch nicht von der Transkription (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Limbourg et al., 2002). Die Aktivierung der SGK durch Glucocorticoide kann aber auch durch einen Mechanismus über den GR auf der Transkriptionsebene erfolgen (Mikosz et al., 2001; Park et al., 1999).

Ein anderer Weg ist in einer hippokampalen Zelllinie beschrieben worden. So potenzieren  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren über die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen und der PI 3-Kinase die GR-abhängige Aktivierung der Transkription (Schmidt et al., 2001).

#### **1.4. *In vitro* Modelle des neuronalen Zelltodes**

In der vorliegenden Arbeit diente als Modell des vorwiegend nekrotischen Zelluntergang der Sauerstoff-Glukose-Entzug (Oxygen and glucose deprivation=OGD), welcher als *in vitro* Modell für Schlaganfall benutzt wurde. Der OGD-induzierte Zelltod erfolgt zu einem großen Teil über den NMDA-Rezeptor. Wird dieser Glutamatrezeptor durch Vorbehandlung mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 blockiert, resultiert ein überwiegend apoptotischer Zelluntergang der kortikalen Neurone (Gwag et al., 1995).

Als exzitotoxisches Modell diente der Glutamat-induzierte Zelltod. Es gibt Hinweise, dass Glutamat sowohl zum nekrotischen Zelluntergang, als auch zum verzögerten apoptotischen Zelltod führen kann. So kommt es unter Glutamatexposition bei einem Teil der Neuronen innerhalb kurzer Zeit zur Nekrose. Diese Zellen sind durch die charakteristischen, morphologischen Zeichen der Nekrose gekennzeichnet. Es kommt zu einer ballonartigen Schwellung des Zytoplasmas und zum raschen Zerfall der Zelle. Neurone, die nicht dem frühen nekrotischen Zelluntergang unterliegen, verfügen über ein

intaktes Mitochondrienpotential und über genügend Energie. Sie versterben später am apoptotischem Zelltod, gekennzeichnet durch Chromatindegradation in große und kleine molekulare Fragmente und durch Formation von apoptotischen Körperchen (Ankarcrona et al., 1995).

Als Apoptosemodelle wurden drei verschiedene Neurodegenerationsmodelle ausgewählt. (1) Staurosporin, ein Mycotoxin, ist ein Proteinkinaseinhibitor mit breitem Spektrum. Staurosporin löst in nahezu allen Zellen eine sich über 24 Stunden entwickelnde Apoptose aus (Koh et al., 1995; Wiesner und Dawson, 1996; Azuma et al., 1995). (2) Camptothecin ist ein zytotoxisches Pflanzenalkaloid, S-Phase-Zellzyklus spezifisch und hemmt die Aktivität der DNA-Topoisomerase-I. Camptothecin führt damit zu irreversiblen DNA-Doppelstrangbrüchen. Dies impliziert, dass es nicht toxisch auf sich nicht teilende Zellen, wie Neuronen wirkt. Camptothecin führt jedoch auch bei postmitotischen neuronalen Zellen zum signifikanten dosisabhängigen Zelltod. Beschrieben wurden caspasenabhängige und -unabhängige Zelluntergänge bei embryonalen kortikalen Neuronen. Die caspasenabhängige Form ereignet sich schnell innerhalb von 6-12 Stunden und zeigt die typischen morphologischen Veränderungen während der Apoptose. Die caspasenunabhängige Form, die nur nach Hemmung der Caspasenaktivität auftritt, zeigt einen verspäteten Zelltod nach 12-48 Stunden, der nicht die klassischen apoptotischen Merkmale präsentiert (Stefanis et al., 1999; Lang-Rollin et al., 2003).

(3) Ethylcholin-Aziridinium (AF64A) ist ein Neurotoxin, welches zur verzögerten sich über 72 Stunden entwickelnden Apoptose führt (Fisher et al., 1982; Lautenschlager et al., 2000). AF64A wird über den nieder- und hochaffinen Cholintransporter in die Zellen aufgenommen. Die Behandlung neuronaler Zellkulturen mit AF64A führt zum frühen Verlust von endogenen Zellzyklusinhibitoren wie p16, p21 und p27 mit nachfolgender Aktivierung von Zellzyklusaktivatoren, wie Cdks und Cyclinen. Die Hinaufregulation der Cdk4/6-Aktivität und die Aktivierung der E2F-Transkriptionsfaktoren sind Schlüsselereignisse in der frühen Phase der neuronalen Apoptose. Sie lassen sich lange bevor morphologische und biochemische Veränderungen auftreten, nachweisen (Harms et al., 2000). Vorbehandlung mit Zellzyklusinhibitoren hingegen schützen kortikale Neuronen vor dem apoptotischen Zelltod (Katchanov et al., 2001).