

Aus dem Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. Krieglstein
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Leiter: Prof. Dr. J. Krieglstein

**Inhibition von Serumentzug- und Staurosporin- induzierter
neuronaler Apoptose durch Ginkgo biloba und seine Inhaltsstoffe**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps–Universität Marburg

vorgelegt von
Anja Karolin Möwes
aus Freiburg im Breisgau

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps - Universität Marburg am 06.03.2003
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. Maisch
Referent: Prof. Dr. Kriegelstein
Korreferent: Prof. Dr. Hemmer

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. ZIEL DER VORLIEGENDEN ARBEIT	14
3. MATERIAL	15
4. METHODEN	24
4.1. ALLGEMEINE ARBEITSTECHNIKEN	24
4.1.1. TELENZEPHALISCHE NEURONENKULTUREN VOM HÜHNEREMBRYO	24
4.1.1.1. Eier und Eierbrut	24
4.1.1.2. Vorbereitung der Kulturgefäße	25
4.1.2. HIPPOCAMPALISCHES MISCHKULTUREN VON NEUGEBORENEN RATTEN	27
4.1.2.1. Tiere und Tierhaltung	27
4.1.3. VITALITÄTSBESTIMMUNG	30
4.1.4. KERNFÄRBUNG MIT HOECHST 33258	30
4.1.5. DNA-ISOLIERUNG	31
4.1.6. TUNEL-FÄRBUNG	35
4.1.7. DIG OLIGONUCLEOTIDE 3'-END LABELING IN VITRO	37
4.1.8. DIG-BLOT-DETECTION	38
5. ERGEBNISSE	42
5.1. WIRKUNG DES GESAMTEXTRAKTES IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN AUF DURCH SERUMENTZUG ODER STAUROSPORINBEHANDLUNG GESCHÄDIGTE NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN	42
5.1.1. VORBEMERKUNG	42
5.1.2. DARSTELLUNG DURCH SERUMENTZUG GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	42
5.1.3. DARSTELLUNG DURCH STAUROSPORIN GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	43
5.1.4. DARSTELLUNG VON APOPTOTISCHEN NEURONEN EINER TELENZEPHALISCHEN	

	HÜHNEREMBRYONENKULTUR DURCH DIE FÄRBUNG MIT HOECHST 33258 NACH SERUMENTZUG BZW. STAUROSPORINBEHANDLUNG	44
5.2.	DARSTELLUNG VON GESCHÄDIGTEN NEURONEN EINER HIPPOCAMPALEN RATTENKULTUR DURCH DIE FÄRBUNG MIT TUNEL	46
5.2.1.	VORBEMERKUNG	46
5.2.2.	WIRKUNG DES GESAMTEXTRAKTES IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN AUF DURCH STAUROSPORINBEHANDLUNG GESCHÄDIGTE NEURONE VON HIPPOCAMPALEN RATTENKULTUREN	47
5.3.	WIRKUNG VON GINKGOLID A IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN AUF DURCH SERUMENTZUG ODER STAUROSPORINBEHANDLUNG GESCHÄDIGTE NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN	48
5.3.1.	VORBEMERKUNG	48
5.3.2.	DARSTELLUNG DURCH SERUMENTZUG GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	48
5.3.3.	DARSTELLUNG DURCH STAUROSPORIN GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	49
5.4.	WIRKUNG VON GINKGOLID B IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN AUF DURCH SERUMENTZUG ODER STAUROSPORINBEHANDLUNG GESCHÄDIGTE NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN	50
5.4.1.	VORBEMERKUNG	50
5.4.2.	DARSTELLUNG DURCH SERUMENTZUG GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	50
5.4.3.	DARSTELLUNG DURCH STAUROSPORIN GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	52
5.4.4.	DARSTELLUNG VON APOPTOTISCHEN NEURONEN EINER TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUR DURCH DIE FÄRBUNG MIT HOECHST 33258 NACH SERUMENTZUG	53
5.4.5.	DARSTELLUNG VON APOPTOTISCHEN NEURONEN EINER TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUR DURCH DIE FÄRBUNG MIT HOECHST 33258 NACH STAUROSPORINBEHANDLUNG	54

5.5. WIRKUNG VON GINGKOLID J IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN AUF DURCH SERUMENTZUG ODER STAUROSPORINBEHANDLUNG GESCHÄDIGTE NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN	57
5.5.1. VORBEMERKUNG	57
5.5.2. DARSTELLUNG DURCH SERUMENTZUG GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	57
5.5.3. DARSTELLUNG DURCH STAUROSPORIN GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	58
5.5.4. DARSTELLUNG VON APOPTOTISCHEN NEURONEN EINER TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUR DURCH DIE FÄRBUNG MIT HOECHST 33258 NACH SERUMENTZUG BZW. STAUROSPORINBEHANDLUNG	59
5.6. WIRKUNG VON BILOBALID IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN AUF DURCH SERUMENTZUG ODER STAUROSPORINBEHANDLUNG GESCHÄDIGTE NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN	62
5.6.1. VORBEMERKUNG	62
5.6.2. DARSTELLUNG DURCH SERUMENTZUG GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	62
5.6.3. DARSTELLUNG DURCH STAUROSPORIN GESCHÄDIGTER NEURONE VON TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUREN DURCH DIE FÄRBUNG MIT TRYPANBLAU	63
5.6.4. DARSTELLUNG VON APOPTOTISCHEN NEURONEN EINER TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUR DURCH DIE FÄRBUNG MIT HOECHST 33258 NACH SERUMENTZUG	65
5.6.5. DARSTELLUNG VON APOPTOTISCHEN NEURONEN EINER TELENZEPHALISCHEN HÜHNEREMBRYONENKULTUR DURCH DIE FÄRBUNG MIT HOECHST 33258 NACH STAUROSPORINBEHANDLUNG	66
5.7. DARSTELLUNG VON GESCHÄDIGTEN NEURONEN EINER HIPPOCAMPALEN RATTENKULTUR DURCH DIE FÄRBUNG MIT TUNEL	67
5.7.1. VORBEMERKUNG	67
5.7.2. WIRKUNG VON BILOBALID IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN AUF DURCH SERUMENTZUG GESCHÄDIGTE NEURONE VON HIPPOCAMPALEN RATTENKULTUREN	67

5.7.3.	WIRKUNG VON BILOBALID IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN AUF DURCH STAUROSPORIN GESCHÄDIGTE NEURONE VON HIPPOCAMPALLEN RATTENKULTUREN	68
5.8.	DARSTELLUNG VON DNA-FRAGMENTEN GESCHÄDIGTER NEURONE NACH STAUROSPORINBEHANDLUNG ODER SERUMENTZUG DURCH DIE GELELEKTROPHORESE	70
5.8.1.	VORBEMERKUNG	70
5.8.2.	ERGEBNISSE DER VERSCHIEDENEN WIRKSTOFFE IN DER GELELEKTROPHORESE NACH STAUROSPORINBEHANDLUNG BZW. NACH SERUMENTZUG	70
6.	DISKUSSION	72
6.1.	DISKUSSION DER VERWENDETEN UNTERSUCHUNGSMODELLE	72
6.1.1.	ZELLKULTURMODELLE	72
6.2.	DISKUSSION DER NEURONALEN APOPTOSE	73
6.2.1.	INDUKTION DER NEURONALEN APOPTOSE DURCH STAUROSPORIN	73
6.2.2.	INDUKTION DER NEURONALEN APOPTOSE DURCH SERUMENTZUG	74
6.3.	DISKUSSION DER METHODEN	75
6.3.1.	TRYPANBLAU- FÄRBUNG	75
6.3.2.	TUNEL- FÄRBUNG	75
6.3.3.	KERNFÄRBUNG MIT HOECHST- 33258	76
6.3.4.	NACHWEIS DER DNA – FRAGMENTIERUNG MITTELS GELELEKTROPHORESE :	76
6.4.	DISKUSSION DER EFFEKTE VON GINKGO BILOBA UND SEINEN INHALTSSTOFFEN	77
6.4.1.	HEMMUNG EINER NEURONALEN APOPTOSE DURCH DEN GESAMTEXTRAKT EGb 761	78
6.4.2.	HEMMUNG EINER NEURONALEN APOPTOSE DURCH DIE EFFEKTE DER INHALTSSTOFFE DES GESAMTEXTRAKTES EGb 761	79
6.4.2.1.	Mögliche Mechanismen der Effekte von Ginkgolid A, B, J und Bilobalid:	80
6.5.	KLINISCHE STUDIEN	82
7.	ZUSAMMENFASSUNG	83
8.	LITERATURVERZEICHNIS	85

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGb 761	Gesamtextrakt aus den Blättern von Ginkgo biloba
H ₂ O	Wasser
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Mol
MEM	Minimum essential medium
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
nm	Nanometer
T	Thymin
V	Volt
µl	Mikroliter

1 Einleitung

Ginkgo Biloba

Dieses Baumes Blatt, der von Osten
Meinem Garten anvertraut,
Gibt geheimen Sinn zu kosten,
Wie's den Wissenden erbaut.



Ist es ein lebendig Wesen,
Das sich in sich selbst getrennt?
Sind es zwei , die sich erlesen,
Daß man sie als eines kennt?



Solche Frage zu erwidern
Fand ich wohl den rechten Sinn;
Fühlst du nicht an meinen Liedern,
Daß ich Eins und doppelt bin?

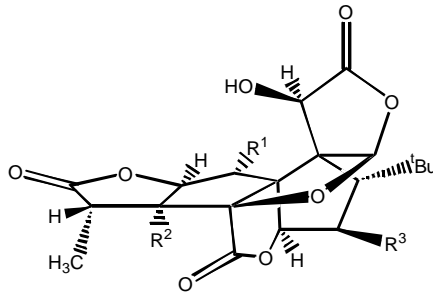
(Goethe, 1815)

Dieses Gedicht über den Baum Ginkgo biloba, das man im Buch „Suleika des West - Östlichen Diwans“ findet, schrieb Johann Wolfgang von Goethe, der als passionierter Botaniker bekannt war, im Jahre 1815 an eine Freundin. Er sah in dem zweilappigen Blatt des Baumes das Sinnbild der Freundschaft: „Die Blätter haben das Eigene, daß in jüngeren ein Einschnitt in dem Fächer kaum angedeutet ist. Dieser Einschnitt aber nimmt an späteren Zweigen zu und zwar endlich dergestalt, daß es zwei Blätter zu sein scheinen.“ (Goethe an den Großherzog Carl August, 10. März 1820) Doch Goethe war nicht der erste, der sich von dem Ginkgo biloba - Baum, der im 18. Jahrhundert nach Europa gebracht wurde, fasziniert zeigte.

Die Ursprünge -Ginkgoales genannt- der heute lebenden Art reichen 300 Millionen Jahre zurück, nahestehende Vorgänger fanden sich bereits vor ca. 150 Millionen Jahren. Die ältesten heute lebenden Ginkgo - Bäume wachsen in China: sie sind schätzungsweise 4000 Jahre alt und dienen meist als Gartenzierde von Palästen oder

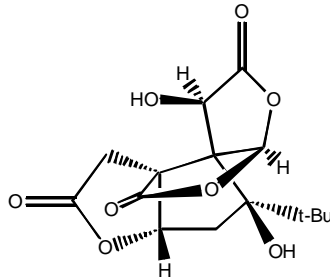
heiligen Stätten. Dabei spielt sicherlich eine Rolle, daß es männliche und weibliche Ginkgo - Bäume gibt. Diese Dialektik - Yin und Yang, Hell und Dunkel, Frau und Mann- begegnet einem überall in der fernöstlichen Kultur. Doch nicht nur als Schmuck oder Symbol wurde der Ginkgo-Baum gewürdigt; bereits die erste Pharmakopoeia „Chen Nong Pen T'sao“, des chinesischen Imperators Chen Nong (2767-2687 v. Chr.) beschreibt die heilende Wirkung der Ginkgo - Blätter als Wundauflage oder bei Asthma bronchiale (Foster, 1996).

Seit fast 40 Jahren wird nun auch in Europa die Wirkung der Ginkgo - Blätter therapeutisch genutzt, nachdem es Dr. Willmar Schwabe in den 60er Jahren gelungen war, einen hochgereinigten Extrakt zu gewinnen (Oberpichler-Schwenk and Krieglstein, 1992). Dieser Extrakt enthält 24 % Flavonoide, die aus Flavonglykosiden (Kaempferol, Quercetin und Isorhamnetin mit Glucose oder Rhamnose) und Proanthocyanidinen bestehen. Die Nicht - Flavonoide - Fraktion, also die Terpenlaktone, setzen sich aus 2.9 % Bilobalid und 3.1 % Ginkgolid A, B, C und J zusammen. Außerdem finden sich organische Säuren wie z.B. Knyrensäure und Hydroxyknyrensäure (De Feudis, 1991; Ahlemeyer and Krieglstein, 1997).



Ginkgolide

	R ¹	R ²	R ³
Ginkgolid A	H	OH	H
Ginkgolid B	OH	OH	H
Ginkgolid C	OH	OH	OH
Ginkgolid J	H	OH	OH



Bilobalid

Abb. 1: Chemische Strukturen der Ginkgolide und Bilobalid

Hauptsächlich werden die auf 24 % Flavonoide und 6 % Terpenlactone standardisierten Gesamtextrakte - wie z.B. EGb 761 oder LI 1370 - zur Behandlung von peripheren Gefäßkrankheiten und zerebraler Insuffizienz bei älteren Patienten eingesetzt (De Veudis, 1991; Kleinjen and Knipschild, 1992).

Wirkung des Gesamtextraktes

Zahlreiche Studien beschreiben die physiologischen Wirkungen des Gesamtextrakts und seinen Inhaltsstoffen auf das Gehirn: eine Dilatation der Gehirngefäße (Chatterjee, 1985), der Atmungskettenschutz in den Mitochondrien (Spinnewyn et al,1986), eine antiödematöse Wirkung (Le Poncin-Lafitte,1980; Etienne et al.,1984) , eine Steigerung des Glucoseumsatzes (Beck and Krieglstein, 1987) und der Hypoxietoleranz (Oberpichler et al, 1988) wurden beobachtet.

Erst in neuester Zeit wurde die Frage aufgeworfen, ob die Wirkung dieser Substanzen auf einer Protektion vor Nekrose oder vor Apoptose beruht.

Apoptose

In multizellulären Organismen wird die Homöostase durch die Balance zwischen Zellteilung bzw. Zellproliferation und Zelltod aufrechterhalten (Thompson, 1995). Das Prinzip Zellteilung (Mitose) wurde schon sehr früh, nämlich 1873, von dem Zoologen Anton Schneider als ein wichtiges Phänomen erkannt (Cremer, 1985) Der Begriff Apoptose (griechisch *apo*-weg, los; *ptosis*-Senkung) wurde erst 1972 in seiner

heutigen Bedeutung von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt. Er bezeichnet den programmierten Zelltod und ist ein physiologischer Prozeß, zu dem jede Zelle befähigt ist. Apoptose ist zur normalen Entwicklung und bei Krankheiten notwendig, um überflüssige, kranke oder alte Zellen zu eliminieren.

Die Apoptose ist ein Vorgang, der sich sowohl morphologisch als auch biochemisch grundlegend von dem der Nekrose unterscheidet (Kerr et al., 1972).

Der seit langem erforschte Vorgang der Nekrose wird durch Verletzung oder anderweitig irreparabler Schädigung z.B. Sauerstoffmangel ausgelöst. Durch den Verlust der intakten Membran kommt es zum Einstrom von Elektrolyten, wie Natrium- und Calcium - Ionen. Hierdurch schwellen die Zellorganellen – v.a. die Mitochondrien – und die Zelle selbst an. Gleichzeitig findet ein Entzündungsprozess statt.

Morphologische Zeichen der Apoptose

Hier beobachtet man folgende Vorgänge: die Zellen schrumpfen, gleichzeitig lösen sie sich aus dem Zellverband und beginnen mit der Bildung von Bläschen, die verschwinden und sofort wieder ersetzt werden. Das Chromatin im Zellkern kondensiert und verschiebt sich in Richtung der Kernhülle. Später fragmentiert zuerst der Nucleus, dann die gesamte Zelle. Dabei entstehen membranumhüllte Bruchstücke, sogenannte apoptotic bodies, die bis in die Endphase ihre Funktion behalten. Sie werden später benachbarten, gesunden Zellen und Makrophagen phagozytiert (Duke et al., 1997).

APOPTOSE	NEKROSE
Morphologische Kriterien	
<ul style="list-style-type: none"> • Deletion einer Zelle • Blasenbildung der Membran (ohne Integritätsverlust) • Zellschrumpfung (Formierung von Apoptosekörperchen) • Keine Entzündungszeichen • Phagozytose durch benachbarte Zellen • Intakte Lysosomen • Chromatinkondensierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Tod von Zellgruppen • Verlust der Membranintegrität • Zellschwellung und -lyse • Entzündungszeichen • Phagozytose durch Makrophagen • Verlust von Lysosomen
Biochemische Kriterien	
<ul style="list-style-type: none"> • Energieverbrauch • erfordert neue Proteinbiosynthese • De novo Gentranskription • Definierte oligonucleosomale Fragmentierung der DNA • Straff regulierter Prozeß mit Synthese- und Aktivierungsschritten 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Elektrolythomöostase • Kein Energieverbrauch • Keine Protein- oder Nukleinsäuresynthese erforderlich • Keine neue Gentranskription • Zufälliger DNA - Verdau

Tabelle 1: Gegenüberstellung von Nekrose und Apoptose hinsichtlich ihrer morphologischen und biochemischen Eigenschaften

1 Einleitung

Ginkgo Biloba

Dieses Baumes Blatt, der von Osten
Meinem Garten anvertraut,
Gibt geheimen Sinn zu kosten,
Wie's den Wissenden erbaut.



Ist es ein lebendig Wesen,
Das sich in sich selbst getrennt?
Sind es zwei , die sich erlesen,
Daß man sie als eines kennt?



Solche Frage zu erwidern
Fand ich wohl den rechten Sinn;
Fühlst du nicht an meinen Liedern,
Daß ich Eins und doppelt bin?

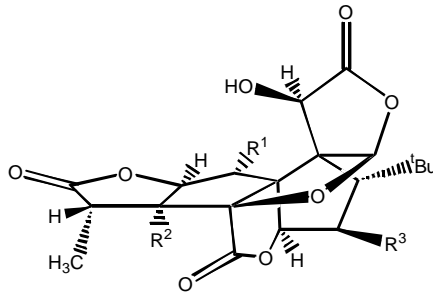
(Goethe, 1815)

Dieses Gedicht über den Baum Ginkgo biloba, das man im Buch „Suleika des West - Östlichen Diwans“ findet, schrieb Johann Wolfgang von Goethe, der als passionierter Botaniker bekannt war, im Jahre 1815 an eine Freundin. Er sah in dem zweilappigen Blatt des Baumes das Sinnbild der Freundschaft: „Die Blätter haben das Eigene, daß in jüngeren ein Einschnitt in dem Fächer kaum angedeutet ist. Dieser Einschnitt aber nimmt an späteren Zweigen zu und zwar endlich dergestalt, daß es zwei Blätter zu sein scheinen.“ (Goethe an den Großherzog Carl August, 10. März 1820) Doch Goethe war nicht der erste, der sich von dem Ginkgo biloba - Baum, der im 18. Jahrhundert nach Europa gebracht wurde, fasziniert zeigte.

Die Ursprünge -Ginkgoales genannt- der heute lebenden Art reichen 300 Millionen Jahre zurück, nahestehende Vorgänger fanden sich bereits vor ca. 150 Millionen Jahren. Die ältesten heute lebenden Ginkgo - Bäume wachsen in China: sie sind schätzungsweise 4000 Jahre alt und dienen meist als Gartenzierde von Palästen oder

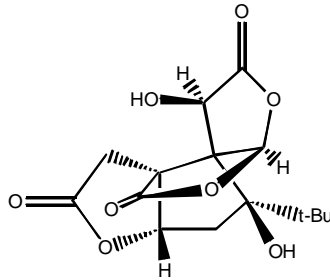
heiligen Stätten. Dabei spielt sicherlich eine Rolle, daß es männliche und weibliche Ginkgo - Bäume gibt. Diese Dialektik - Yin und Yang, Hell und Dunkel, Frau und Mann- begegnet einem überall in der fernöstlichen Kultur. Doch nicht nur als Schmuck oder Symbol wurde der Ginkgo-Baum gewürdigt; bereits die erste Pharmakopoeia „Chen Nong Pen T'sao“, des chinesischen Imperators Chen Nong (2767-2687 v. Chr.) beschreibt die heilende Wirkung der Ginkgo - Blätter als Wundauflage oder bei Asthma bronchiale (Foster, 1996).

Seit fast 40 Jahren wird nun auch in Europa die Wirkung der Ginkgo - Blätter therapeutisch genutzt, nachdem es Dr. Willmar Schwabe in den 60er Jahren gelungen war, einen hochgereinigten Extrakt zu gewinnen (Oberpichler-Schwenk and Krieglstein, 1992). Dieser Extrakt enthält 24 % Flavonoide, die aus Flavonglykosiden (Kaempferol, Quercetin und Isorhamnetin mit Glucose oder Rhamnose) und Proanthocyanidinen bestehen. Die Nicht - Flavonoide - Fraktion, also die Terpenlaktone, setzen sich aus 2.9 % Bilobalid und 3.1 % Ginkgolid A, B, C und J zusammen. Außerdem finden sich organische Säuren wie z.B. Knyrensäure und Hydroxyknyrensäure (De Feudis, 1991; Ahlemeyer and Krieglstein, 1997).



Ginkgolide

	R ¹	R ²	R ³
Ginkgolid A	H	OH	H
Ginkgolid B	OH	OH	H
Ginkgolid C	OH	OH	OH
Ginkgolid J	H	OH	OH



Bilobalid

Abb. 1: Chemische Strukturen der Ginkgolide und Bilobalid

Hauptsächlich werden die auf 24 % Flavonoide und 6 % Terpenlactone standardisierten Gesamtextrakte - wie z.B. EGb 761 oder LI 1370 - zur Behandlung von peripheren Gefäßkrankheiten und zerebraler Insuffizienz bei älteren Patienten eingesetzt (De Veudis, 1991; Kleinjen and Knipschild, 1992).

Wirkung des Gesamtextraktes

Zahlreiche Studien beschreiben die physiologischen Wirkungen des Gesamtextrakts und seinen Inhaltsstoffen auf das Gehirn: eine Dilatation der Gehirngefäße (Chatterjee, 1985), der Atmungskettenschutz in den Mitochondrien (Spinnewyn et al,1986), eine antiödematöse Wirkung (Le Poncin-Lafitte,1980; Etienne et al.,1984) , eine Steigerung des Glucoseumsatzes (Beck and Krieglstein, 1987) und der Hypoxietoleranz (Oberpichler et al, 1988) wurden beobachtet.

Erst in neuester Zeit wurde die Frage aufgeworfen, ob die Wirkung dieser Substanzen auf einer Protektion vor Nekrose oder vor Apoptose beruht.

Apoptose

In multizellulären Organismen wird die Homöostase durch die Balance zwischen Zellteilung bzw. Zellproliferation und Zelltod aufrechterhalten (Thompson, 1995). Das Prinzip Zellteilung (Mitose) wurde schon sehr früh, nämlich 1873, von dem Zoologen Anton Schneider als ein wichtiges Phänomen erkannt (Cremer, 1985) Der Begriff Apoptose (griechisch *apo*-weg, los; *ptosis*-Senkung) wurde erst 1972 in seiner

heutigen Bedeutung von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt. Er bezeichnet den programmierten Zelltod und ist ein physiologischer Prozeß, zu dem jede Zelle befähigt ist. Apoptose ist zur normalen Entwicklung und bei Krankheiten notwendig, um überflüssige, kranke oder alte Zellen zu eliminieren.

Die Apoptose ist ein Vorgang, der sich sowohl morphologisch als auch biochemisch grundlegend von dem der Nekrose unterscheidet (Kerr et al., 1972).

Der seit langem erforschte Vorgang der Nekrose wird durch Verletzung oder anderweitig irreparabler Schädigung z.B. Sauerstoffmangel ausgelöst. Durch den Verlust der intakten Membran kommt es zum Einstrom von Elektrolyten, wie Natrium- und Calcium - Ionen. Hierdurch schwellen die Zellorganellen – v.a. die Mitochondrien – und die Zelle selbst an. Gleichzeitig findet ein Entzündungsprozess statt.

Morphologische Zeichen der Apoptose

Hier beobachtet man folgende Vorgänge: die Zellen schrumpfen, gleichzeitig lösen sie sich aus dem Zellverband und beginnen mit der Bildung von Bläschen, die verschwinden und sofort wieder ersetzt werden. Das Chromatin im Zellkern kondensiert und verschiebt sich in Richtung der Kernhülle. Später fragmentiert zuerst der Nucleus, dann die gesamte Zelle. Dabei entstehen membranumhüllte Bruchstücke, sogenannte apoptotic bodies, die bis in die Endphase ihre Funktion behalten. Sie werden später benachbarten, gesunden Zellen und Makrophagen phagozytiert (Duke et al., 1997).

APOPTOSE	NEKROSE
Morphologische Kriterien	
<ul style="list-style-type: none"> • Deletion einer Zelle • Blasenbildung der Membran (ohne Integritätsverlust) • Zellschrumpfung (Formierung von Apoptosekörperchen) • Keine Entzündungszeichen • Phagozytose durch benachbarte Zellen • Intakte Lysosomen • Chromatinkondensierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Tod von Zellgruppen • Verlust der Membranintegrität • Zellschwellung und -lyse • Entzündungszeichen • Phagozytose durch Makrophagen • Verlust von Lysosomen
Biochemische Kriterien	
<ul style="list-style-type: none"> • Energieverbrauch • erfordert neue Proteinbiosynthese • De novo Gentranskription • Definierte oligonucleosomale Fragmentierung der DNA • Straff regulierter Prozeß mit Synthese- und Aktivierungsschritten 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Elektrolythomöostase • Kein Energieverbrauch • Keine Protein- oder Nukleinsäuresynthese erforderlich • Keine neue Gentranskription • Zufälliger DNA - Verdau

Tabelle 1: Gegenüberstellung von Nekrose und Apoptose hinsichtlich ihrer morphologischen und biochemischen Eigenschaften

Mechanismus der Apoptose in Zellen von Säugetieren

Beispielhaft werden im folgenden bekannte Signalwege der Apoptose aufgezeigt. Jeder Trigger hat seinen eigenen Signalweg, der in verschiedenen Zellen verschieden ablaufen kann.

Der Vorgang der Apoptose läßt sich in drei Stadien einteilen: Einleitung, Latenzphase (engl. commitment) und Ausführung (Mazarakis et al., 1997)

Einleitung

Die Induktion des programmierten Zelltods kann durch extrazelluläre und intrazelluläre Faktoren erfolgen.

Extrazelluläre Faktoren (z.B. UV-Strahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren) penetrieren nicht selbst die Zelle, sondern agieren über Bindung an transmembrane Oberflächenrezeptoren, wie z.B. CD95 (Fas/Apo1), den death receptor 3 (DR3) und den Tumornekrosefaktorrezeptor (TNFR-1).

Die Ligandenbindung an CD95-Rezeptoren beispielsweise bewirkt eine Oligomerisation des intrazellulären Anteils (genannt „death domain“) der Rezeptoren. Dadurch kann die „death domain“ des Signaltransduktors Fas associating death domain protein (FADD/Mort-1), das aus dem Zytoplasma stammt, gebunden werden (Mak et al., 1998). FADD seinerseits hat die Funktion eines Adaptermoleküls, das die Signale der Oberflächenrezeptoren an Enzyme, die am Abbau der Zellproteine beteiligt sind, übermittelt. Dazu trägt das Molekül FADD eine Domäne, die DED („death effector domain“) genannt wird, und an der entsprechenden Domäne der Procaspase-8 binden kann. Procaspase-8 wird dadurch aktiviert und setzt die Aktivierungskaskade der zur Apoptose notwendigen Caspasen in Gang.

Intrazelluläre Trigger (z.B. hohe, intrazelluläre Calciumlevel, mitochondriale Schäden, freie Radikale) der Apoptose stoßen die Kaskade der Caspasen nicht über die Aktivierung der Procaspase-8, sondern über die Aktivierung der Procaspase-9 an.

Das pro-apoptische Protein Apaf-1 („apoptosis protease activating factor“) bindet die Procaspase-9 über eine Domäne, die CARD („caspase recruitment domain“) genannt wird, und in beiden Molekülen ähnlich ist. Diese Interaktion wird durch eine Konformationsänderung in Apaf-1 ermöglicht, die durch zytosoles Cytochrom c und ATP eingeleitet wird. Eine zweite ATP gesteuerte Reaktion führt zu einer

Oligomerisation acht solcher Molekülkomplexe und damit zu einer Aktivierung der Procaspase-9 (Tran et al., 1999).

Freisetzung von Cytochrom c:

Cytochrom c befindet sich normalerweise im intermembranösen Raum der Mitochondrien (Yang et al, 1997). Doch scheinen intrazelluläre Trigger der Apoptose, wie z.B. freie Radikale oder hohe Calcium - Konzentrationen, in der Lage zu sein, aus den Mitochondrien Cytochrom c in das Zytoplasma freizusetzen. Zwei unterschiedliche Mechanismen werden diskutiert: Durch bestimmte Trigger kommt es zum vermehrten Einstrom von Ionen und damit zu einer osmotischen Schwellung der Mitochondrie. Die innere Membran dehnt sich aus bis es schließlich zur Ruptur der äußeren Membran und zum Ausfluß von Cytochrom c und ATP kommt. Dieser Weg führt häufiger zur Nekrose.

Bei dem zweiten Mechanismus steht als wichtiger Signaldecoder ein mitochondrialer Ionenkanal mit dem Namen „mitochondrial permeability transition pore“ oder kurz MPT im Mittelpunkt. Dieser Kanal öffnet und schließt sich bei normalen physiologischen Prozessen. Bestimmte Faktoren, von denen bekannt ist, daß sie apoptotisch wirken können, führen zu einer irreversiblen Öffnung des MPT. ATP und Cytochrom c verlassen in hohen Mengen den mitochondrialen Raum (Green et al, 1998).

Latenzphase:

Vom Zeitpunkt des Apoptose-stimulierenden Signals bis zur tatsächlichen Ausführung der Apoptose können bis zu mehreren Stunden vergehen.

In der Zelle wird durch das Verhältnis von anti- und pro-apoptotischen Faktoren bestimmt, ob die Zelle die Apoptose tatsächlich durchführt. Über den Mechanismus bestehen bis jetzt viele Unklarheiten.

Eine große Rolle spielt eine Familie von anti-apoptotischen Proteinen, deren gemeinsame Strukturen nach dem zuerst entdeckten bcl-2-Onkogen „Bcl-2 homology“ (BH1-BH4) genannt werden. Sie sind an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Orrenius et al., 1997). Diese Proteine sind in der Lage, die äußere Mitochondrienmembran zu stabilisieren, so daß kein Cytochrom c in das Zytoplasma

freigesetzt wird (Kroemer, 1997) und sie binden den Apaf-1-Procaspase-9-Komplex, der dadurch nicht mehr oligomerisieren kann. Folglich findet keine Aktivierung der Caspase-9 statt.

Die pro-apoptotischen Proteine in der Zelle, wie z.B. bad und bik, gehören zu einem eigenen Zweig der bcl-2-Familie, dessen Struktur nur den BH-3-Abschnitt als Gemeinsamkeit aufweist. Diese, wie auch die Subfamilie der bax-Proteine, können freies bcl-2 binden oder bereits an Apaf-1-Procaspase-9 gebundenes bcl-2 verdrängen. Sie ermöglichen so eine Oligomerisation des Komplexes. Es kann wieder aktive Caspase-9 produziert werden und die apoptotische Kaskade wird gestartet (Adams et al., 1998).

Ausführung:

Die apoptotische Kaskade besteht aus Caspasen, einer Familie von Zysteinproteasen, die am Aspartat-Rest spalten (Alnemri et al., 1996). Bisher sind 13 Mitglieder dieser Proteasen-Familie identifiziert. Einige sind für Entzündungsvorgänge bedeutend, andere für die Apoptose maßgeblich. Sie liegen als Proenzyme (30 bis 50 kD) in der Zelle vor und bestehen aus drei Einheiten: einem N-terminalen Bereich und zwei Untereinheiten von 20 bzw. 10 kD (Thornberry et al., 1998). Die Proenzyme werden durch proteolytische Spaltung zwischen den Einheiten zu aktiven Caspasen. Man unterscheidet sie in Initiator- und Effektor-Caspasen. Vereinfacht erklärt man sich, daß die Initiatoren, wie Caspase 8 und 9, durch verschiedene pro - apoptotische Signale aktiviert werden. Die Effektor-Caspasen (z.B. Caspase 6, 3 und 7) werden wiederum durch die Initiatoren aktiviert.

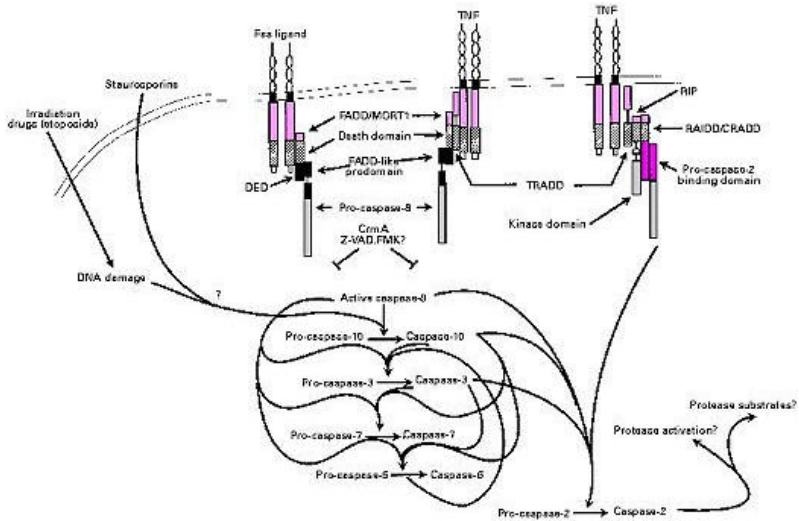


Abb. 2: Hypothetische Kaskade der Caspasen (Cohen 1997).

Es mag weiterhin die Möglichkeit bestehen, daß die Effektor-Caspasen durch autokatalytische Prozesse, die durch die Cofaktoren angestoßen werden, aktiviert werden (Thornberry et al., 1998). Mit der Aktivierung der Caspasen beginnt die Stilllegung zellspezifischer Leistungen wie z.B. die Spaltung der für die DNA-Reparatur zuständigen Poly-ADP-Ribose-Polymerase. Nachdem die Funktionen der Zelle aufgehoben sind, spalten bis jetzt nicht identifizierte Endonucleasen die DNA zwischen den Nucleosomen in Fragmente von 180 bp und Vielfachen davon, die schließlich in der Gelelektrophorese zu den für die Apoptose typischen DNA-Leitern führen (Mazarakis et al., 1997).

Dysregulation der Apoptose bei neurodegenerativen Krankheiten am Beispiel des Morbus Alzheimer

Eine Dysregulation der Apoptose liegt dann vor, wenn der ursprünglich physiologische Prozeß zu Krankheiten führt. Dies geschieht, wenn eine notwendige Apoptose kranker, geschädigter Zellen unterbleibt oder wenn es zu einer überschießenden Apoptose-Aktivität kommt, bei der auch gesunde Zellen mitbetroffen sein können (Duke et al, 1997).

Morbus Alzheimer:

Ein Drittel der Menschen über 85 Jahre sind von starken Einschränkungen der intellektuellen Leistungen betroffen. Die häufigste Ursache ist der Morbus Alzheimer, eine degenerative Hirnerkrankung, die zur Demenz führt. Sie tritt in 90% der Fälle spontan ab dem 6. Lebensjahrzehnt auf. In 10% findet sich eine familiäre Häufung. Die Symptome manifestieren sich dann meist in jüngerem Alter. Erste Anzeichen können Apathie, Rückzug, Reizbarkeit und Stimmungslabilität sein, bevor es zu kognitiven Ausfällen wie aphasischen Sprachstörungen (Echolalien, Neologismen bis hin zu Logoklonien), bilateraler und konstruktiver Apraxie, Gedächtnisverlust und Orientierungslosigkeit kommt (Poeck et al., 1998). Die Krankheit verläuft progredient und führt zum Tod. Makroskopisch zeigt sich eine Atrophie der Hirnrinde, eine Degeneration des Nucleus Basalis Meynert, der cholinerge Neurone zur Großhirnrinde abgibt, sowie eine Schädigung des serotonergen und noradrenergen Systems aus dem Locus coeruleus. Histopathologisch findet sich schon früh im Assoziationskortex eine Abnahme der Synapsendichte und ein starker Neuronenverlust (Castano und Frangione, 1988) und später eine intrazelluläre neurofibrilläre Degeneration, d.h. es bilden sich 'paired helical filaments', die vor allem aus hyperphosphoryliertem tau-Protein bestehen. Im Übermaß erkennt man außerdem auf neuronaler Ebene im Bereich der Hirnrinde die für alte Menschen typischen extrazellulären senilen Plaques aus β -Amyloidablagerungen, einem proteolytischen Produkt des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), welches ein normaler Bestandteil von Zellmembranen ist. Die Anzahl der β -Amyloidablagerungen korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung (Gleixner et al., 1998; Brunnhuber et al., 1996). Sie ist jedoch nur dann als diagnostisches Kriterium zu verwenden, wenn der Patient dementsprechende Symptome zeigt.

Im Falle der hereditären Form des Morbus Alzheimer wurden bis jetzt Mutationen von drei Genen auf Chromosom 21, 14 und 1 identifiziert. In 70% der Fälle sind verschiedene „Missense-Mutationen“ von Präsenilin 1 (PS-1) auf dem Chromosom 14 verantwortlich, nur wenige Fälle von familiärem Morbus Alzheimer lassen sich auf Veränderungen des Präsenilin 2 auf Chromosom 1 zurückführen. Die eng verwandten Präseniline codieren für Proteine von 450 Aminosäuren mit sieben transmembranären Domänen.

Mutationen des für das β -Amyloid-Precursor-Protein codierende Gen auf Chromosom 21 (10% der hereditären Fälle) führen zu einer längeren, stärker amyloidogenen Form

des A β -Peptids. Es kommt durch vermehrte Aggregation zu übermäßiger Amyloidablagerung in neuritischen Plaques.

Die Missense-Mutationen werden distal von ihren normalen Spaltungsorten von einer der Caspase-3 –Familie zugehörigen Protease bzw. von den apoptose- assoziierten Caspasen-6 und –8 gespalten. Außerdem interferieren die Missense-Mutationen vermutlich mit Kompartimentalisierung und Prozessierung des β -APP-Genproduktes.

(Kim et al., 1997; Uetsuki et al., 1999; Pellegrini et al., 1999).

Weitaus häufiger ist die spontane Form des Morbus Alzheimer, bei der keine Genmutationen bekannt sind. Man propagiert als wesentlichen Pathomechanismus ein Ungleichgewicht der das β -APP spaltenden α -, β - und gamma-Sekretasen. Überwiegen die β - und gamma-Sekretasen, kommt es zur vermehrten Freisetzung und nachfolgender Aggregation des A β -Peptids.

Ein weiterer Risikofaktor für die Erkrankung des Morbus Alzheimer scheint das Tragen des ϵ 4-Allels des Apolipoproteins E zu sein, das mit β -APP interagiert und beschleunigend auf die Bildung von Amyloidablagerungen wirkt.

In vitro Versuche mit kultivierten Neuronen demonstrierten den starken Einfluß des bei Morbus Alzheimer im Übermaß gebildeten Amyloid- β -Peptids auf die Apoptose und die DNA-Fragmentierung. *In vivo* Arbeiten mit transgenen Mäusen bestätigten, daß gerade die intraneuronale Expression von A β -Peptid zu vehementer Apoptose und reaktiver Gliose im ZNS der Tiere – bis hin zum Tod - führt (Herdegen et al., 1997).

Als eine der Ursachen für den β -Amyloid-Ablagerungen ausgelösten neuronalen programmierten Zelltod gilt die dadurch stattfindende Expression von Prostate apoptosis response-4 proteins (par-4). Diese Proteine wurden zuerst vermehrt in apoptotischen Prostatazellen gefunden. In vitro und in vivo Versuchen zeigte sich ein Zusammenhang mit der Apoptose. Guo et al. (1998) behandelten Neuronen mit β -Amyloid und par-4 Antisense-Oligonucleotiden. Dies hatte eine verminderte Expression von par-4 Proteinen und gleichzeitig eine Reduktion der apoptotischen Neurone zur Folge. Bei einem Teil der Alzheimer Patienten ist die Expression von par-4 Proteinen im Hippocampus, dem hauptsächlich vom programmierten Zelltod betroffenen Hirnareal bei dieser Erkrankung, um ein bis zu 20faches erhöht. Diese Patienten tragen eine sgp-2-Gen Mutation, die die DNA-Sequenz für das par-4 Protein trägt (Duguid et al., 1989). Es konnte auch gezeigt werden, daß die neurotoxische Wirkung der aggregierten β -Amyloid-Peptide über eine erhöhte Produktion freier Radikale (Behl et al., 1994) und über die Störung des Calcium-Haushaltes zur Induktion der Apoptose

führt (Loo et al., 1993). Zudem ermöglicht die Aggregation der β -Amyloid-Peptide dem Signaltransduktor FADD als Adaptermolekül für die Procaspase-8 zu fungieren und diese zu aktivieren. Dieser Vorgang initiiert den Weg der extrazellulären Apoptose.

Su et al. untersuchten 1994 *in vitro* und *in vivo* die Hippocampi und entorhinalen Kortices von Alzheimer-Patienten und fanden zahlreiche neuronale Kerne, die die typischen morphologischen Charakteristika der Apoptose wie Kernschrumpfung, Chromatinkondensation und DNA- Fragmentierung aufwiesen. Kontrollhirne zeigten keine solchen Veränderungen. Dieses Ergebnis wurde später von anderen Forschungsgruppen bestätigt (Smale et al., 1995). Kritisch sahen diese Ergebnisse Cotman und Su (1996), die zwar einen erhöhten Anteil an TUNEL- positiven DNA-Fragmenten neuronaler Zellen in Alzheimer- Gehirnen fanden, aber nur selten eine Caspase- Aktivierung oder eine Chromatinkondensation beobachteten. Noch immer zweifeln einige Publikationen an, ob bei der Alzheimer- Erkrankung überhaupt eine Apoptose stattfindet. Da es sich um eine über Jahrzehnte fortschreitende Erkrankung handelt, eine Apoptose jedoch im Durchschnitt in bis zu 24 Stunden vollzogen wird, liegt die Wahrscheinlichkeit, daß sich eine Gehirnzelle bei Beobachtung im apoptotischen Prozess befindet, bei 1: 4000. Eine sichere Beobachtung ist somit bei einer solchen chronischen Erkrankung nicht durchzuführen (Perry et al., 1998). Die Gruppe Stadelmann et al. (1998) zeigten, daß im Gehirn von Patienten mit pontosibulärer neuronaler Nekrose, einem rein apoptotischen Tod von Neuronen, zytoplasmatische und Kernkondensation, Kernfragmentierung und die vermehrte Expression von apoptotisch spezifischen Proteinen gefunden wurden. Dies war nicht der Fall in Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer. Daraus schlossen Stadelmann et al., daß bei der Alzheimer- Erkrankung keine relevante Apoptose stattfindet.

Auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten wie z.B. Morbus Parkinson, Chorea Huntington und amyotropher Lateralsklerose (ALS) scheint eine Fehlsteuerung der Apoptose vorzuliegen. Es werden genetische Mutationen dafür verantwortlich gemacht, wie z. B. die Mutation des Enzyms Superoxiddismutase bei der ALS oder die unphysiologische Vervielfachung des Basentriplets CAG bei der Chorea Huntington. Bei diesen Erkrankungen bilden die mutierten Proteine lange Aggregate im Nucleus oder Zytoplasma. Wie beim Morbus Alzheimer kann FADD als Adaptermolekül für die Procaspase-8 fungieren und diese aktivieren (Tran et al., 1999). Als ein weiteres relevantes Beispiel bei dem Neurone den apoptotischen Tod sterben, ist der

Schlaganfall. Zahlreiche Tierversuche demonstrierten inzwischen, daß eine zerebrale Ischämie zur Apoptose führt (McManus und Linnik, 1997; Barinaga, 1998).

Nachweismethoden der Apoptose

Inzwischen gibt es zahlreiche Methoden, mit denen Apoptose nachgewiesen werden kann. Sie setzen an verschiedenen Stellen des Apoptoseprozesses an, der typische morphologische und biochemische Veränderungen der Zelle bewirkt.

An der einzelnen Zelle lassen sich die bereits oben beschriebenen morphologischen Veränderungen während der Apoptose unter dem Licht- oder Elektronenmikroskop beobachten.

Für Gewebe- oder Zellkulturen, bei denen die Frage nach der Quantität der apoptotischen Zellen im Vordergrund steht, eignen sich diverse Färbemethoden:

Im frühen und im späten Stadium der Apoptose wird ein Verlust der Membranassymetrie bei Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran beobachtet. Der Farbstoff Annexin V geht eine Bindung mit Phosphatidylserin ein und kann als Indikator der Apoptose verwendet werden.

Bei anderen Nachweismethoden nutzt man die während der Apoptose stattfindenden morphologischen Veränderungen wie die Kernschrumpfung, die Kernfragmentierung oder die Kondensierung des Chromatins im Zellkern, die durch fluoreszierende, mit der DNA interkalierende Farbstoffe oder durch Einzelzell-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann.

Eine weitere Möglichkeit ist das Prinzip der TUNEL Färbung, bei der die während der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente an den 3' OH-Enden mit Hilfe des Enzyms Terminale Desoxyribonucleotid-Transferase (TdT) mit Digoxigenin markiert und in einer zweiten Reaktion durch peroxidasegekoppelten Antidigoxigeninantikörpern sichtbar gemacht werden. machen.

Eine weitverbreitete Methode, Apoptose in Zellkulturen nachzuweisen, ist das DNA-laddering: In späteren Stadien der Apoptose entstehen durch internucleosomale Spaltung von DNA typischerweise Fragmente von 180 Basenpaaren und ihren Vielfachen. In der Gelelektrophorese bilden diese Fragmente eine als „Leiter“ bezeichnete Struktur.

Des weiteren existieren kolorimetrische und fluorimetrische Analysen, die die erhöhte enzymatische Aktivität von Proteasen der Klasse Caspasen 2, 3, 6, 8 oder 9 in Zellen

ermitteln und die Möglichkeit, Procaspasen und deren Spaltprodukte mit Hilfe des Western Blots darzustellen.

Welcher Nachweis gewählt wird, hängt letztendlich von der Fragestellung, dem zu analysierendem Gewebe- oder Zelltyp und der zur Induktion der Apoptose verwandten Methode ab (R&D Systems, 1999).

2 Ziel der vorliegenden Arbeit

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist es zu zeigen, ob der Gesamtextrakt von Ginkgo biloba und seine Inhaltsstoffe Ginkgolid A, B, J und Bilobalid in Neuronenkulturen in der Lage sind eine Apoptose zu verzögern oder sogar zu verhindern. Damit wird zum ersten Mal die anti-apoptotische Eigenschaft der genannten Wirkstoffe überprüft.

ermitteln und die Möglichkeit, Procaspasen und deren Spaltprodukte mit Hilfe des Western Blots darzustellen.

Welcher Nachweis gewählt wird, hängt letztendlich von der Fragestellung, dem zu analysierendem Gewebe- oder Zelltyp und der zur Induktion der Apoptose verwandten Methode ab (R&D Systems, 1999).

2 Ziel der vorliegenden Arbeit

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist es zu zeigen, ob der Gesamtextrakt von *Ginkgo biloba* und seine Inhaltsstoffe Ginkgolid A, B, J und Bilobalid in Neuronenkulturen in der Lage sind eine Apoptose zu verzögern oder sogar zu verhindern. Damit wird zum ersten Mal die anti-apoptotische Eigenschaft der genannten Wirkstoffe überprüft.

3 Material

Tiere

Ratten:	Fischer-344-Ratten Institutseigene Zucht
Hühner:	Weißer Leghorn" Geflügelfarm C. Thoma, Biedenkopf-Wallau

Tierzucht

Ratten:	Tierstall vollklimatisiert Trinkwasser Standardfutter Altromin ^R	Lage/Lippe
Hühner:	Eierbrutschrank Vomo 3/Vomo 0	Schuhmacher, Grünberg- Lardenbach

Zellkultur

Kulturmedien:

DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)	Gibco/Life Technologies, Eggenstein
MEM (Minimum essential medium)	Gibco/Life Technologies, Eggenstein
Leibovitz's L-15 medium	Gibco/Life Technologies, Eggenstein

Zusammensetzung der verschiedenen Kulturmedien:

Inhaltsstoffe	MEM (10x) mg/L	DMEM mg/L	Leibovitz's Medium mg/L	L-15
<i>Anorganische Salze</i>				
CaCl ₂ -2H ₂ O	2640,00	264,00	185,00	
KCl	4000,00	400,00	400,00	
MgSO ₄ -7 H ₂ O	2000,00	200,00	200,00	
NaCl	68000,00	6400,00	8000,00	
NaHCO ₃		3700,00	190,00	
NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O	1580,00	141,00		
Na ₂ HPO ₄			190,00	
<i>Vitamine</i>				
D-Ca-Pantothenat	10,00	4,00	1,00	
Cholinchlorid	10,00	4,00	1,00	
Folsäure	10,00	4,00	1,00	
i-Inositol	20,00	7,20	2,00	
Nikotinamid	10,00	4,00	1,00	
Pyridoxal*HCl	10,00	4,00	1,00	
Riboflavin	1,00	0,40		
Flavin-Mononukleotid			0,10	
Thiamin*HCl	10,00	4,00		
Thiaminmonophosphat *HCl			1,00	
<i>Sonstige Komponenten</i>				
D-Glukose	10000,00	100,00		
D-Galaktose			900,00	
Phenolrot	100,00	15,00	10,00	
Natriumpyruvat		110,00	550,00	

<i>Aminosäuren</i>			
<i>DL</i> -Alanin			450,00
<i>L</i> -Arginin			500,00
<i>L</i> -Arginin*HCL	1260,00	84,00	
<i>L</i> -Asperagin			250,00
<i>L</i> -Cystin	240,00	48,00	120,00
<i>L</i> -Glutamin		580,00	300,00
Glycin		30,00	200,00
<i>L</i> -Histidin			250,00
<i>L</i> -Histidin HCl*2H ₂ O	420,00	42,00	
<i>L</i> -Isoleucin	520,00	105,00	250,00
<i>L</i> -Leucin	520,00	105,00	125,00
<i>L</i> -Lysin			75,00
<i>L</i> -Lysin*HCl	730,00	146,00	
<i>L</i> -Methionin	150,00	30,00	
<i>DL</i> -Methionin			150,00
<i>L</i> -Phenylalanin	320,00	66,00	
<i>DL</i> -Phenylalanin			250,00
<i>L</i> -Serin		42,00	200,00
<i>L</i> -Threonin	480,00	95,00	
<i>DL</i> -Threonin			600,00
<i>L</i> -Tryptophan	100,00	16,00	20,00
<i>L</i> -Tyrosin	360,00	72,00	300,00
<i>L</i> -Valin	460,00	94,00	
<i>DL</i> -Valin			200,00

Weitere Bestandteile der Kulturmedien:

Penicillin-Streptomycin Lösung (10000 I.E. bzw 10 mg/ml)	Gibco/Eggenstein
Fötales Kälberserum (FCS)	Serva/Heidelberg
NU-Serum	PAA/Marburg

Kulturgefäße:

Gewebekulturschalen,	10 cm ² , Falcon ^R	Becton Dickinson/ Heidelberg
Gewebekulturflaschen,	25 cm ² , Falcon ^R (Gefäß A)	Becton Dickinson/ Heidelberg
Gewebekulturflaschen,	185 cm ² , Falcon ^R (Gefäß B)	Becton Dickinson/ Heidelberg
Multiwellplatten Nunclon TM Delta,6 Wells á 10 cm ² (Gefäß C)		Nunc/Wiesbaden

Testsubstanzen

Die Testsubstanzen werden bei -20°C gelagert.

Ginkgo-Gesamtextrakt (LI 1370)	Lichtwer Pharma/Berlin
Ginkgolid A	Schwabe/Karlsruhe
Ginkgolid B	Schwabe/Karlsruhe
Ginkgolid J	Schwabe/Karlsruhe
Bilobalid	Sigma/Deisenhofen

Apoptose-induzierende Substanz

Staurosporin	Sigma/Deisenhofen
--------------	-------------------

Enzyme und Reaktionspuffer

Die Enzyme werden bei -20°C gelagert.

<u>Dig-Oligonucleotide-Labeling-Kit</u> -Reaktionspuffer	Boehringer/Mannheim
---	---------------------

-CoCl ₂ -Lösung	
-DIG-ddUTP-Lösung	
-Terminale Transferase	
-Oligonucleotide, DIG-ddUTP markiert	
-Glycogen-Lösung	
<u>In-situ-Apoptosis-Detection-Kit (Apop Tag)</u>	Oncor/Gaithersburg
-Anti-Digoxigenin-Peroxidase	
-Equilibration-Puffer	
-Reaktions-Puffer	
-Stop/Wash-Puffer	
-Terminale Transferase	
Proteinase K	Boehringer Mannheim
<u>Protein Assay-Kit</u>	Sigma/Deisenhofen
-Folin-Ciocalteu's Phenol	
-Lowry-Reagenz	
Proteinstandard (BSA)	Sigma/Deisenhofen
RNase	Boehringer Mannheim

Sonstige Chemikalien

Agarose	Eurobio
Anti-DIG-Antikörper/ ALP	Boehringer Mannheim
Bisbenzimidide (Hoechst 33258)	Sigma/Deisenhofen
Blue/Orange Loading Dye	Promega/USA
Borsäure	Riedel de Haen/ Seelze
Buthanol 100%	Roth/Karlsruhe
Chloroform	Merck/Darmstadt
CSPD-Lösung	Boehringer Mannheim
Cytosin- <i>D</i> -arabinofuranosid	Sigma/Deisenhofen
Diaminobenzidine (DAB)	Sigma/Deisenhofen
Digoxigenin-markierter DNA-Leiter	Boehringer Mannheim
Dihydrorhodamin 123	Molecular Probes/ Eugene USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma/Deisenhofen

DNA-Leiter (100bp)	Promega/USA
Eisessig	Riedl-de Haen
Entwicklerlösung	Sigma/Deisenhofen
Ethanol 99,8%	Roth/Karlsruhe
Ethanol 70%	Roth/Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure-Tetranatriumsalz (EDTA)	Sigma/Deisenhofen
Fixierlösung	Sigma/Deisenhofen
Formaldehyd	Merck/Darmstadt
Glucose	Merck/Darmstadt
HEPES	Sigma/Deisenhofen
Hydroxychinolin	Sigma/Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck/Darmstadt
lambda DNA	Boehringer Mannheim
Lithiumchlorid	Merck/Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma/Deisenhofen
Maleinsäure	Fluka/Buchs
Natriumazid	Sigma/Deisenhofen
Natriumcitrat	Sigma/Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth/Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Sigma/Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Riedl-de Haen
Natriumhydrogenphosphat	Merck/Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck/Darmstadt
Papain	Gibco/Eggenstein
Phenol	Roth/Karlsruhe
Poly- <i>L</i> -Lysin-Hydrobromid (MG 30000-70000)	Sigma/Deisenhofen
Poly- <i>L</i> -Lysin-Hydrobromid (MG 70000-150000)	Sigma/Deisenhofen
Serumalbumin vom Rind (BSA)	Behring/Marburg
Tris-Base	Sigma/Deisenhofen
Tris-HCL	Sigma/Deisenhofen
Trockenmilch	Heirler
Trypanblau	Merck/Darmstadt
Trypsin-Inhibitor, Typ H-O (aus Hühnereiweiß)	Sigma/Deisenhofen
Tween 20	Sigma/Deisenhofen

Wasserstoffperoxid (30%)
Xylen

Sigma/Deisenhofen
Merck/Darmstadt

Geräteausstattung am Arbeitsplatz

Autoklav 11210

Deutsch&Neumann/Berlin

Brutschränke:

-Cytoperm

Heraeus/Hanau

-Funktion Line, Typ B 66

Heraeus/Hanau

Dunkelkammer

Viessmann

Film (DIG-Blot): x-omat

Kodak

Filterpapier

Fachhandel

Fluoreszenzspektrometer: FL 500

Bio-Tek Instruments/USA

Gelelektrophoresegerät:

-Electrophoresis Power Supply EPS 600

Pharmacia

Gelelektrophoresekammer

MWG-Biotech

Entkeimungsfilter: Minisart^R, 0,2 µm

Sartorius/Göttingen

Gelprinter: Gelprint 2000 i

MWG-Biotech

Graphikprinter

Sony

Kolbenspritzen (10,20,50 ml)

B.Braun/Melsungen

Kühlschränke

Liebherr

Magnetrührer

IKA-Combimag

Membran-Vakuumpumpe

Vacubrand GMBH

Metallkanülen, Durchmesser 1.5 mm

Kobe

Mikroskope:

-Phasenkontrast-Umkehrmikroskop Diavert

Leitz/Wetzlar

-inverses Forschungsmikroskop IMT-2

Olympus/Japan

-Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 135

Zeiss/Oberkochen

Mikrotiterplatten

Costar, Nunc

Mikrowellenherd

Panasonic

Nylonnetze, Porengröße 48 µm	Tripette & Renaud/ Villeneuve-La-Garonne
pH-Meter: Digital-pH-Meter 646	Knick
Pipetten	Eppendorf/Hamburg
Pipettenspitzen: Art 100 E	Molecular Bio Products
Präparierbesteck	A. Dumont/Schweiz
Spektralphotometer/Plattenreader	Shimadzu/Japan
Sterilfilter: Acrodisc	Gelman Sciences
Stoppuhren	Junghans
Tiefkühlschrank: Herafreeze	Heraeus/Hanau
Transilluminator:	MWG-Biotech
Trockenschrank TV 40 UT	Memmert/Emmendingen
Vortex-Geräte	Heidolph
Waagen:	
-Mettler P 1210	Mettler
-Mettler P 162	Mettler
-Feinwaage	Sauter/Albstadt
Wasserbäder	Rottermann
Wasserfiltrationsanlage: Milli Q	Millipore
Werkbänke mit horizontaler bzw vertikaler Luftführung:	
-Lamin Air ELB 2448	Heraeus/Hanau
-Envirco C 424 H	Ceag Schirp/Borken
-Prett ^R Typ H-1 06.12	Reinraumtechnik GmbH/ Pfullingen
Zentrifugen:	
-Minifuge	Heraeus/Hanau
-Biofuge 13	Heraeus/Hanau
Zellschaber	Sigma/Deisenhofen
Zentrifugenröhrchen: Falcon (50, 15 ml)	Becton/Dickinson

Photodokumentation

Filmmaterial: Ilford HP (400 ASA), Agfa (200 ASA) Ilford, Agfa

Fotoapparate:

-Contax 116 MT Olympus/Japan

-A 1 Canon/Japan

4 Methoden

4.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Die Vorbereitung der Kulturgefäße, die Präparation der Primärkulturen, Medienwechsel, Behandlung der Kulturen sowie die Herstellung aller während der Kultivierungsdauer mit den Zellen in Kontakt kommenden Lösungen werden auf sterilen Werkbänken mit vertikaler oder horizontaler Luftführung durchgeführt. Glasgeräte und Metallkanülen werden bei 180°C für zwei Stunden im Trockenschrank hitzesterilisiert. Die für die Kultivierung und Behandlung der Kulturen verwendeten wäßrigen Lösungen werden mit Reinstwasser (Millipore) hergestellt. Wasser, Schraubdeckel für Flaschen, Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipetten und Nylonnetze werden bei 120°C und 2 bar für 25 min autoklaviert. Zur Sterifiltration von Lösungen werden Membranfilter der Porengröße 0.2 µm bzw. bei Volumina größer als 50 ml Einmal-Vakuum-Filtrationsgeräte verwendet. Das Präparationsbesteck zum Anlegen der Kulturen wird vor der Präparation für mindestens 30 min in 70 % Ethanol eingelegt und außerdem während der Präparation nach nochmaligem Eintauchen in 70 % Ethanol zusätzlich flammensterilisiert. Alle Nährmedien, Medienzusätze und Kulturgefäße werden steril bezogen. Nährmedien sowie Lösungen, die direkt mit Zellen in Kontakt kamen, werden vorher in einem Wasserbad auf 37°C temperiert.

4.1.1 Telenzephalische Neuronenkulturen vom Hühnerembryo

4.1.1.1 Eier und Eierbrut

Für die Anlage neuronaler telenzephalischer Primärkulturen aus Hühnerembryonen werden befruchtete Hühnereier der Rasse 'Weiße Leghorn' von der Geflügelfarm Ch. Thome, Biedenkopf-Wallau bezogen. Die Eier werden bei 18-20°C bis zu vier Tagen zwischengelagert und dann bei 37.8°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-65 % in einem Eierbrutschrank sieben Tage lang angebrütet.

Die Kultivierung primärer telenzephalischer Kulturen vom Hühnerembryo erfolgt nach der Methode von Pettmann et al (1979).

4.1.1.2 Vorbereitung der KulturgefäÙe

Zur besseren Haftung der Zellen werden die KulturgefäÙe zunäÙst mit einer Lösung folgender Zusammensetzung bodenbedeckend beschichtet:

Poly-L- Lysin -Lösung:	5 mg Poly-L-Lysin Hydrobromid (MG 70000-100000) 3.09 mg BorsäÙre ad 500 ml Millipore H ₂ O
------------------------	--

pH 8.48 (mit 1 M NaCl eingestellt)

Die verschlossenen KulturgefäÙe werden 15-24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Poly-L-Lysin-Lösung abgesaugt, die KulturgefäÙe zweimal mit DMEM gespült. Nach gründlichem Absaugen werden die KulturgefäÙe mit Kulturmedium beschickt und in den Brutschrank (37°C) gestellt, um sich der Temperatur und dem pH-Wert der Kultivierungsbedingung anzupassen.

Volumina der verwendeten KulturgefäÙe (in ml):

GefäÙtyp	Poly-L-Lysin	DMEM	Kulturmedium
GefäÙ A	4	4	4
GefäÙ B	25	25	25
GefäÙ C	2	2	2

Kulturmedium für telenzephalische Kulturen:

DMEM	500 ml
Fötales Kälberserum (30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert)	100 ml
Penicillin-Streptomycin-Lösung	5 ml

Präparation telenzephalischer Kulturen:

Die 7 Tage bebrüteten Hühnereier werden mit 70%igem Ethanol desinfiziert und an der stumpfen Seite über dem Luftsack vorsichtig mit einer Pinzette geöffnet. Der Embryo wird freigelegt, entnommen und in einer mit DMEM gefüllte Petrischale expedit. Dann werden die Telenzephalon-Hemisphären isoliert und in eine zweite, ebenfalls mit DMEM gefüllte Petrischale überführt, wo sie von anhaftenden Meningen befreit werden. Anschließend erfolgt die mechanische Dissoziation durch ein Nylonnetz in ein steriles Becherglas, das etwa 20 ml Kulturmedium enthält. Die so erhaltene Primärsuspension wird durch viermaliges Trituieren mit einer Metallkanüle (Durchmesser 1.5 mm) und einer sterilen 50 ml Kolbenspritze homogenisiert und mit einer Aussaatdichte von 4×10^4 Zellen/cm² in die Kulturgefäße überführt.

Kultivierung:

Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, 95 % Luft und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90-95 % kultiviert. Nach zwei Kulturtagen erfolgt ein Wechsel des Kulturmediums. Unter diesen Bedingungen bestehen die Kulturen bis zum siebten Kulturtag nahezu ausschließlich aus Neuronen (98 % der Zellen binden Tetanus-Toxin, ein typische Eigenschaft von Neuronen, die restlichen 2% sind Gliazellen, Pettmann et al., 1979).

4.2 Hippocampale Mischkulturen von neugeborenen Ratten

4.2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Zur Kultivierung primärer hippocampaler Neurone werden neugeborene, maximal 24 Stunden alte Ratten verwendet, die aus der institutseigenen Zucht stammen. Die Tiere werden in einem vollklimatisierten Tierstall bei 23°C, einer relativen Luftfeuchte von 55 % sowie einem zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Elterntiere haben freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter.

Primäre hippocampale Kulturen von neugeborenen Ratten wurden modifiziert nach der Methode von Bernd Sengpiel (1998).

Vorbereitung der Kulturgefäße:

Vor der Beschichtung werden Glasdeckgläschen (25 mm Durchmesser) in die Petrischalen eingelegt. Die Deckgläschen sind UV-durchlässig und können daher zur fluorimetrischen Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies eingesetzt werden. Am Tag vor der Präparation werden die Kulturgefäße zur besseren Haftung der Zellen mit einer frisch hergestellten Poly-*L*-Lysin-Lösung der folgenden Zusammensetzung beschichtet:

Poly- <i>L</i> - Lysin - Lösung:	1 mg Poly- <i>L</i> -Lysin Hydrobromid (MG 30000-70000)
	5 ml Borsäure- Lösung (1.25 %)
	5 ml Natriumborat- Lösung (1.91 %)

Die Kulturgefäße werden bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wird die Poly-*L*-Lysin-Lösung entfernt und die Schalen viermal mit 2 ml sterilem Wasser gespült. Dabei wird zwischen den ersten beiden Spülvorgängen 20 min gewartet; nach erneuter Zugabe von 2 ml sterilem Wasser wird nach einer Wartezeit von mindestens 6 Stunden der Spülvorgang nochmals wiederholt. Danach werden die Schalen trockengesaugt und kurz vor der Präparation mit 2 ml MEM II beschickt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Auf diese Weise werden Temperatur und pH-Wert des Mediums den Kultivierungsbedingungen angepaßt.

Kulturmedium:

MEM II (serumhaltig mit *L*-Glutamin)

MEM	10 ml
<i>D</i> -Glucose-Lösung (20 %)	2.5 ml
NaHCO ₃ -Lösung (4.4 %)	5.0 ml
Penicillin-Streptomycin-Lösung	0.2 ml
<i>L</i> -Glutamin-Lösung	1.0 ml
NU-Serum ^R	10 ml
Millipore H ₂ O	ad 100 ml

Präparation:

Während der Präparation werden drei verschiedene Präparationslösungen verwendet:

Lösung 1:	3 ml Serumalbumin vom Rind (BSA) 15 ml Leibovitz's L-15 Medium
Lösung 2:	3 mg Papain 3 ml Lösung 1
Lösung 3:	50 mg BSA 50 mg Trypsin-Inhibitor 5 ml MEM II

Lösung 1 wird auf zwei Petrischalen verteilt: eine große Schale zur Zwischenlagerung der entnommenen Gehirne und eine paraffinbeschichtete Schale zur Isolierung der Hippocampi. Die maximal 24 Stunden alten Ratten werden mit Ethanol abgespritzt und dekapitiert. Nachdem die Schädelkalotte aufgeschnitten und das Gehirn freipräpariert worden ist, erfolgt die Überführung des Gehirns in eine Schale mit Lösung 1. Nach der Isolierung des Gehirns wird dieses in eine größere paraffinbeschichtete Petrischale überführt. Das Cerebellum wird mit einer Mikroschere entfernt, die beiden Hemisphären voneinander gelöst und das Striatum abgetrennt. Der nun als halbmondförmige Struktur sichtbar gewordene Hippocampus kann jetzt am Stück

isoliert und in der sauberen Schale mit Lösung 1 gesammelt werden. Anschließend werden noch anhaftende Blutgefäße entfernt, die gesäuberten Hippocampi in die vorgewärmte Papainlösung überführt und 20 min bei 37°C unter einmaligem Umschwenken in einem Wasserbad inkubiert. Danach wird die Papainlösung abgezogen und das Gewebe wird daraufhin mit Pasteurpipetten durch Triturieren in MEM II mechanisch dissoziiert. Die scharf geschnittene Schnittkante an der Öffnung der Pasteurpipette wird zuvor in der Flamme des Bunsenbrenners rundgeschmolzen, wobei darauf geachtet wird Pipetten mit unterschiedlicher Öffnungsweite zu erhalten. In der ersten Stufe der Trituration werden die Gewebstücke in einer weitlumigen Pasteurpipette langsam achtmal hochpipettiert und wieder ausgeblasen. Nach fünfminütiger Wartezeit, in der sich noch nicht dissoziierte Gewebeteile am Boden absetzen, wird der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Dissoziation des Bodensatzes wird der beschriebene Triturationsvorgang noch zweimal mit englumigeren Pasteurpipetten wiederholt. Die Zellsuspension aus den gesammelten Überständen wird dann vorsichtig mit der auf Raumtemperatur eingestellten Lösung 3 überschichtet und für 10 min bei 600 x g und 20°C in der Minifuge zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellsediment mit ca. 5 ml MEM II aufgeschwemmt. Mit Hilfe eines Neubauer-Hämozytometers wird die Zellzahl in 0.1 µl bestimmt und die Zellsuspension gegebenenfalls noch so verdünnt, daß schließlich 120 bis 160 Zellen in 0.1 µl gezählt werden. In die vorbereiteten Kulturschalen (10 cm²) werden jeweils 200 µl dieser Suspension ausgesät, was einer Zahl von 2.5 -3 x 10⁴ Zellen/cm² entspricht.

Kultivierung:

Die Zellen werden im Brutschrank in einer Atmosphäre aus 5 % CO₂, 95% Luft, 90-95% relativer Luftfeuchte und 37°C kultiviert. Um einer starken Gliaproliferation entgegenzuwirken, wird den Kulturen am 2. Kulturtag für 48 Stunden Cytosin-β-D-arabinofuranosid zugesetzt. Die Behandlung wird durch Austausch des Kulturmediums beendet. Es erfolgte kein weiterer Medienwechsel. Die Zellen werden bis zu einer Kultivierungsdauer von maximal 14 Tagen verwendet.

4.2.2 Vitalitätsbestimmung

Die Vitalität der Neurone wurde mit Hilfe der Farbstoffausschlußmethode (Paul, 1975) bestimmt. Trypanblau kann als saurer Farbstoff die Zellmembran intakter Zellen nicht penetrieren und vitale Zellen bleiben daher farblos. Bei geschädigten Zellen ist die Zellmembran jedoch permeabel für den Farbstoff und die Zellkörper färben sich blau.

Zusammensetzung der Trypanblau-Lösung:

Trypanblau-Lösung:	400 mg Trypanblau
	810 mg NaCl
	60 mg K ₂ HPO ₄
	ad 100 ml H ₂ O

12 bzw. 24 Stunden nach Wirkstoffbehandlung wird das Medium der Kulturflaschen (25 cm² Wachstumsfläche) abgesaugt und die Zellen für 5 min mit 5 ml 0,4 %iger Trypanblau-Lösung bei 37°C inkubiert. Die Farbstoffinkubation wird durch vorsichtigen Austausch der Trypanblau-Lösung gegen PBS-Lösung beendet. Unter einem Phasenkontrast-Umkehrmikroskop wird dann bei 200facher Vergrößerung die Vitalität der Neurone mit Hilfe eines Zellquadrats bestimmt. Es werden pro Kulturflasche randomisiert 8 Stellen ausgezählt. Die Schädigung in einem Kulturgefäß werden in Prozent gefärbter Neurone in Bezug auf die Gesamtneuronenzahl angegeben.

4.2.3 Kernfärbung mit Hoechst 33258

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 wird zuerst in H₂O bidest (1 mg/ml) und dann in Methanol (10 µg/ml) aufgelöst. Mit dieser Lösung werden die für 12 bzw. 24 Stunden mit Wirkstoff behandelten Kulturflaschen nach Absaugen des Mediums einmal gespült, dann für 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Zellen einmal mit Methanol und einmal mit phosphatgepufferter Salzlösung pH 7.4 (PBS) gespült. Nach Zugabe von 4 ml PBS werden die Neuronen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (EX=345-360 nm) untersucht. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit der DNA der Zellen und macht so die Morphologie der Kerne sichtbar. Zellen, deren Kern verkleinert ist, die eine intensive Fluoreszenz aufweisen (welche durch die Chromatinkondensation verursacht wird) oder deren Kern fragmentiert erscheint, werden als apoptotische Zellen betrachtet.

4.2.4 DNA-Isolierung

Das Medium aus der Kulturgewebeflasche wird bis auf ca. 8 ml in ein 50 ml-Eppendorf-Röhrchen abgegossen. Der Zellrasen wird mit Hilfe eines sterilen Zellschabers (Sigma) sorgfältig abgelöst und mit dem verbliebenen Restmedium ebenfalls in das Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Unter dem Mikroskop wird die Kulturflasche auf ev. haftengebliebene Zellen inspiziert, gegebenenfalls noch einmal mit ca. 5 ml DMEM angefüllt, ausgeschabt und die Zellsuspension in das Röhrchen pipettiert. Dieses wird bei 3000 x g für 15 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgezogen worden ist, werden 15 ml Vorwaschpuffer in das Röhrchen gegeben und das Pellet mehrmals aufpipettiert.

Zusammensetzung des Vorwaschpuffers (für 100ml):

Vorwaschpuffer (100 ml):	0.1 M EDTA (20 ml/100 ml)
	2 M Tris-Cl (20 ml/100 ml)
	60 ml H ₂ O
	pH-Wert 8.0

Die in dem Vorwaschpuffer gelösten Zellen werden wieder 15 min bei 3000 x g zentrifugiert, der Vorwaschpuffer wird abgegossen (Vorgang ev. wiederholen). Nun fügt man Lysispuffer zu dem Zellpellet hinzu und löst es durch mehrmaliges auf- und abpipettieren, bevor Proteinase K (25 mg/ml bidest) beigegeben wird.

Zusammensetzung des Lysispuffers (100 ml):

Lysispuffer (100 ml):	0.1 M EDTA (20 ml/100 ml)
	0.2 M Tris-Cl (20 ml/100 ml)
	pH-Wert 8.0
	10 ml SDS 10 %
	50 ml H ₂ O bidest

Herstellung 10%iger SDS-Lösung:

SDS-Lösung (10 ml):	120 µl Natriumdodecylsulfat (10%)
	4 ml Polyacrylamid
	2.4 ml Tris-HCl
	5.48 ml H ₂ O bidest

Die Menge des Lysispuffers und der Proteinase K ist abhängig von der Größe bzw. des Gewichts des Zellpellets.

Menge an Gewebe (in mg)	15	20	30	40
Gesamtmenge (in µl)	1200	1600	2400	3200
Lysispuffer (ohne SDS)	1020	1360	2040	2720
10 % SDS	120	160	240	320
Proteinase K (25 mg/ml)	60	80	120	160

Diese Lösung wird über Nacht bei 37°C inkubiert.

Phenolextraktion:

Als nächster Schritt erfolgt die Phenolextraktion, die der Entfernung von verunreinigenden Proteinen in der DNA dient und enzymatische Reaktionen verhindern hilft. Das hinzugefügte Hydroxychinolin färbt die Phenolphase gelb und wirkt außerdem als Antioxidanz, Teilinhibitor der RNAse und Metallionenchelator (Kirby, 1956).

Herstellung der Phenol-/TE-Stammlösung:

250 g Phenol in 200 ml 1 M Tris-HCl (<i>pH</i> 8.0) lösen
250 mg Hydroxychinolin hinzufügen
1x Unterphase (= Phenolphase) mit 200 ml 1M Tris-HCl (<i>pH</i> 7.0) extrahieren
2x mit 200 ml 10 mM Tris-HCl (<i>pH</i> 7.0) extrahieren
mit Tris-HCl (<i>pH</i> 7.0) überschichten

Bei der Phenolextraktion von DNA wird der wässrigen Phase ein gleiches Volumen Phenol/TE zugesetzt, die beiden Phasen mittels Vortex emulgiert und durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 3000 x g wieder aufgetrennt. Ausgefällene Proteine sammeln sich in der Phenol- und Interphase. Die wässrige Oberphase wird vorsichtig abgenommen und in einem neuen Eppendorf-Röhrchen mit halbem Volumen Phenol/TE und halbem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol erneut aufgeschüttelt. Wiederum schließt sich ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 3000 x g an, um die Phasentrennung zu beschleunigen. Das Chloroform verbessert die Trennung von wäßriger Oberphase und Interphase. Ein weiteres Mal wird die wässrige DNA-haltige Oberphase vorsichtig abgenommen und in einem neuen Eppendorf-Röhrchen mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Phenolreste bleiben in der organischen Unterphase zurück. Cave: Während Original-Eppendorf-Röhrchen die Chloroformhaltigen-Zentrifugationsschritte schadlos überstehen, platzen Billig-Imitate hierbei regelmäßig! Die wässrige Oberphase wird abgenommen und in zweifachem Volumen eiskaltem Ethanol abs. 5 min bei -80°C gefällt. Die gefällte DNA wird dann entweder für 10min bei 13000 x g pelletiert, der Überstand abgenommen und verworfen oder – bei ausreichend großer Flocke – mittels einer unter der Flamme gebogenen und vorne dichtgeschlossenen Glaspipette aus dem Eppendorf-Röhrchen gefischt. Das Pellet wird nochmals in 70 % Ethanol gereinigt, getrocknet und in ca. 100 μl TE-Puffer gelöst.

Gelelektrophorese:

Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Makromolekülen: Abhängig von ihrer Masse, ihrer Ladung und ihrer Konformation bewegen sie sich unterschiedlich schnell im elektrischen Feld durch die Poren des Gels. DNA-Moleküle sind durch ihre Phosphatgruppe negativ geladen und wandern daher zum Pluspol (Anode, erhält per definitionem rote Stecker, Kabel und Buchsen). Kleine Fragmente laufen schneller als große, Supercoil-Konformationen schneller als lineare DNA und relaxierte zirkuläre DNA. Die Konzentration des Gels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle: je kleiner ihre Größe, desto höher muß die Gel-Konzentration gewählt werden. Für die vorliegenden Versuche wurden 1.8%ige Agarose-Gele hergestellt.

DNA-Agarosegel:

1.8 g Agarose werden abgewogen und in einem Erlenmeyer-Kolben in 100 ml 1xTAE suspendiert, bei 100°C aufgekocht und unter laufendem Wasser auf 63°C abgekühlt. Die Fuge zwischen Gelrahmen und Kammerboden wird zunächst mit flüssiger Agarose abgedichtet. Wenn sie erhärtet ist, wird der Kamm in Position gebracht und das Gel in die Elektrophoresekammer gegossen. Luftblasen stören die Wanderung der später aufgetragenen DNA und müssen daher vermieden werden. Das Gel ist nach ca. 30 min fest und wird bis etwa 0.5 cm über der Geloberfläche mit 1x TAE-Puffer als Laufpuffer überschichtet.

TAE-Puffer (1000 ml):	48.4 g Tris
	20 ml EDTA (0.5 M)
	11.4 ml Eisessig
	ad 1000 ml aqua bidest
	pH-Wert 8.3

Dann können vorsichtig Rahmen und Kamm entfernt werden. Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen wird 1/10 des Probenvolumens an Auftragsmischung (loading dye, enthält Bromphenolblau und Glycerin) zur Probe pipettiert. Dieser erhöht das spezifische Gewicht der Probe und soll dadurch beim Einlaufen ins Gel das Diffundieren der Probe aus der Geltasche reduzieren. Bromphenolblau als Farbkomponente im Gel-Auftrag-Mix läßt erkennen, wie weit die DNA im Gel gelaufen ist. Die DNA soll rasch ins Gel einlaufen. Es wurde eine Spannung von 100 V gewählt.

Anfärben des Gels:

Nach beendetem Lauf auf dem Gel wird die DNA in wäßriger Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 1 µg/ml) angefärbt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA-Helix und wird als Fluoreszenzfarbstoff im UV-Licht bei 254 nm oder 306 nm sichtbar. Zur Dokumentation können die so sichtbaren DNA-Banden unter UV-Durchlicht mit einer Spiegelreflex- oder Sofortbildkamera mit vorgeschaltetem Orangefilter photographiert werden. Er löscht die UV-Strahlung und ist für die Fluoreszenz des Ethidiumbromids durchlässig.

4.2.5 TUNEL-Färbung

In der fortgeschrittenen Phase der Apoptose wird die DNA durch Endonucleasen zwischen den Nucleosomen gespalten. Dabei entstehen Fragmente von 180 bp und deren Vielfachen mit 3'-OH-Enden, die in den Nuclei der Zellen lokalisiert sind. Diese 3'-OH-Enden werden durch die TUNEL-Färbung (Gavrieli et al., 1992) sichtbar gemacht: an die Enden wird d-UTP-Digoxigenin durch die Terminale Desoxyribonucleotid-Transferase (TdT) angehängt. TdT ist ein Enzym, welches eine von 'templates' unabhängige Anlagerung von Desoxyribonucleotid-Triphosphaten an 3'-OH-Enden einzel- oder doppelsträngiger DNA katalysiert. Die eingebauten Nucleotide bilden ein zufälliges Heteropolymer aus Digoxigenin-11-dUTP und -dATP. Die Ratio daraus wurde für die Anti-Digoxigenin-Antikörper-Bindung optimiert. Danach wird ein Anti-Digoxigenin-Antikörper - konjugiert mit Peroxidase - zugegeben. Die Peroxidase -gekoppelte Reaktion wurde mit Diamenzobenzidin durchgeführt. Unmittelbar vor dem Versuch sind einige Lösungen frisch herzustellen:

TdT -Lösung	-Verdünnung des TdT -Enzyms mit Reaktionspuffer im Verhältnis 1:3 (z.B. 1 Tropfen (32 µl) TdT -Enzym + 2 Tropfen (64 µl) Reaktionspuffer/ 2 Areale im Zellmonolayer -TdT -Lösung auf Eis stellen
Stop/Wash -Puffer	-Verdünnung des Stop/Wash-Puffer-Konzentrats mit H ₂ O: 1 ml Puffer + 34 ml H ₂ O bidest -Stop/Wash -Puffer bei 37°C inkubieren
PBS-Puffer (TUNEL-spezifisch):	50 mM NaH ₂ PO ₄ (7.8 g/l) 200 mM NaCl (11.76 g/l) pH-Wert 7.4

Diaminobenzidin- Peroxidase-Lösung:	-0.05% Diaminobenzidin (DAB) in PBS (im Dunkeln aufbewahren) -filtrieren -H ₂ O ₂ hinzugeben (Endkonzentration von H ₂ O ₂ 0.02%)
--	---

Die für diesen Versuch verwendeten hippocampalen Rattenzellkulturen werden für 10 Tage kultiviert. 24 bzw. 12 Stunden nach Zugabe der Testsubstanzen wird das Medium abgesaugt und der Zellmonolayer bei -20°C in Methanol fixiert. Nach 20 min wäscht man den Zellrasen zweimal für 5 min in PBS. Zum quenchen der endogenen Peroxidase inkubiert man die Zellen für 5 min bei 20°C in 2%igem H₂O₂ in PBS (1 ml 30% H₂O₂ + 5 ml PBS). Nochmals erfolgt zweimal 5-minütiges Waschen des Zellmonolayers mit PBS. Die Flüssigkeit muß gründlich abgesaugt werden und der Zellrasen wird getrocknet, bevor ein Areal im Zellmonolayer mit Pap-pen umkreist wird. (Der Pap-pen verhindert durch seine lipophile Eigenschaft das Diffundieren der aufzutragenden Lösungen). Pro Areal werden 2 Tropfen Equilibration-Puffer (Apop Tag-Detection-Kit, Oncor) aufgetragen. Nach 30 min Inkubation bei 20°C wird der Equilibration-Puffer entfernt und 50 µl TdT -Lösung zupipettiert. Bei der Negativkontrolle wird anstelle der TdT -Lösung 1 Tropfen H₂O und 2 Tropfen Reaktionspuffer verwendet. Die Zellmonolayer werden für mindestens 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Absaugen der TdT -Lösung wird den Zellmonolayern ca. 60 µl Stop/Wash-Puffer zugegeben, der 10 min bei 20°C einwirken muß, bevor die Zellrasen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen werden. Im Anschluß erfolgt die 30-minütige Inkubation bei 20°C mit 2 Tropfen Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Lösung (Apop Tag-Detection-Kit, Oncor) pro Areal. Erneut werden die Zellen 3mal für 5 min mit PBS gewaschen. Danach wird die 0.05%ige DAB-Lösung auf die Areale pipettiert. Unter dem Durchlicht-Mikroskop beobachtet man nach 3-6 min eine Braunfärbung einiger Zellen; zu diesem Zeitpunkt muß die Lösung durch 3maliges Waschen mit PBS (jeweils ca. 1 min.) entfernt werden.

4.2.6 DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling und gelelektrophoretische Auftrennung nach Molekulargewicht

Oligonucleotide werden enzymatisch durch Terminale Transferase an ihren 3'-OH-Enden durch Einfügen von Digoxigenin-markierten Dideoxyuridin-Triphosphat (DIG-ddUTP) markiert, anschließend bindet daran ein anti-Digoxigenin-Antikörper, gekoppelt mit alkalische-Phosphatase. Die Detektion erfolgt durch Chemolumineszenz mit CSPD-Lösung [Dinatrium 3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chlor)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat].

In Mikrozentrifugen-Röhrchen (0.6 ml), die in Eis stehen, wird die Probe (isolierte DNA) folgendermaßen gemischt:

Proben-Gemisch:	4 µl Reaktionspuffer 4 µl CoCl ₂ -Lösung 10 µl Probe 1 µl Terminale Transferase 1 µl Digoxigenin markiertes Dideoxyuridin-Triphosphat (DIG-ddUTP)
Positivkontrolle:	4 µl Reaktionspuffer 4 µl CoCl ₂ -Lösung 5 µl nicht-markierte Oligonucleotide 1 µl Terminale Transferase 1 µl Digoxigenin markiertes Dideoxyuridin-Triphosphat (DIG-ddUTP) 5 µl H ₂ O

Negativkontrolle:	4 µl Reaktionspuffer
	4 µl CoCl ₂ -Lösung
	5 µl nicht-markierte Oligonucleotide
	1 µl Digoxigenin markiertes Dideoxyuridin-Triphosphat (DIG-ddUTP)
	6 µl H ₂ O

Die Gemische werden bei 37°C für 15 min inkubiert. Um die Reaktion nach dieser Zeit zu stoppen, verdünnt man 1 µl Glycogen-Lösung mit 200 µl 0.2 mM EDTA-Lösung und gibt zu jeder Probe 2 µl der Verdünnung. Zur Fällung der Oligonucleotide pipettiert man 2.5 µl 4 M LiCl-Lösung und 75 µl 100%iges Ethanol, das auf -20°C vorgekühlt wurde, in jedes Tube und mischt gut durch. Über Nacht werden die Proben bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen werden sie bei 12000 x g zentrifugiert, die Pellets mit 50 µl 70%igem Ethanol gewaschen und so lange getrocknet, bis definitiv keine Ethanol Reste mehr vorhanden sind. Sie werden in einer geeigneten Menge destilliertem Wasser resuspendiert und in ein Elektrophorese-Gel eingebracht. (Vorgehen s. unter Gelelektrophorese).

4.2.7 DIG-Blot-Detection

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel 30 min bei 20°C in Denaturierungspuffer inkubiert.

Denaturierungspuffer:	0.5 M NaOH (20 g/l)
	1.5 M NaCl (88.2 g/l)

Danach inkubiert man es 2x 15 min in Neutralisationspuffer, da der Denaturierungspuffer sehr alkalisch ist:

Neutralisationspuffer:	0.5 M Tris-HCl (78.5 g/l)
	3 M NaCl (176.4 g/l)
	pH-Wert < 9!

Für den Blot wird das Filterpapier genau nach den Maßen des Gels zurechtgeschnitten. Zuerst werden 20 dicke Filter, 8 dünne Filter, 2 feuchte dicke Filter und eine feuchte Transfermembran übereinandergestapelt. Dann wird das Gel aufgelegt und mit 3 dünnen Filtern überschichtet. Die feuchten Filter wurden vorher in 20x SSC eingelegt.

SSC:	175 g/l NaCl
	88.2 g/l Na-citrat
	pH-Wert 7.0

Das Gel wird über Nacht geblottet. Zur Fixierung wird die Membran am nächsten Tag für 2-3 Minuten unter UV-Licht (254 nm) gelegt.

Detektion:

Um unspezifische Enden zu blocken wird die Transfermembran für 30 min in Blockreagenz inkubiert.

Blockreagenz:	3% Milchpulver in PBS
---------------	-----------------------

Für weitere 30 min wird die Transfermembran im Blockreagenz, zu dem man im Verhältnis 1:10000 Anti-DIG-Antikörper-ALP (Boehringer Mannheim) hinzugefügt hat, inkubiert. Danach erfolgt die 2 x 15 minütige Inkubation in Waschpuffer.

Waschpuffer:	0.1 M Maleinsäure (11.6 g/l)
	0.15 M NaCl (8.76 g/l)
	3% Tween 20
	pH-Wert 7.5 (mit NaOH einstellen)

Während dieser Zeit stellt man den Detektionspuffer her, in dem die Transfermembran wieder für 2 x 15 min inkubiert wird.

Detektionspuffer:	0.1 M Tris-HCl (3.14 g/200 ml)
	0.1 M NaCl (1.17 g/200 ml)
	0.05 M MgCl ₂ wasserfrei (0.95 g/200 ml)
	pH-Wert 9.5

In einer Verdünnung von 1: 100 wird CSPD-Lösung in Detektionspuffer gemischt. Die Transfermembran wird in eine Plastikhülle mit CSPD-Lösung eingeschweißt. Die Membran wird für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Plastikhülle entfernt, die Transfermembran auf einer Glasplatte gelagert und eine Folie faltenlos über die Membran gezogen. Auf die Membran wird ein lichtempfindlicher Film gelegt, so daß an allen Digoxigenin-markierten Stellen eine Schwarzfärbung des Films erfolgt.

Filmentwicklung:

In der Dunkelkammer wird nun ein Film (X-omat, Kodak) für 12-24 Std. aufgelegt, der dann 4 min in Entwicklerlösung, 1 min in H₂O und 10 min in Fixierlösung inkubiert wird.

4.3 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus n Versuchen angegeben.

Bei homogenen Varianzen wurde die einfache Varianzanalyse mit nachfolgendem ANOVA und post – hoc - Scheffé – Test durchgeführt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind folgendermaßen dargestellt:

Irrtumswahrscheinlichkeit p:	<0.05	<0.01	<0.001
Symbol:	*	**	***

5 Ergebnisse

5.1 Wirkung des Gesamtextraktes in verschiedenen Konzentrationen auf durch Serumentzug oder Staurosporinbehandlung geschädigte Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen

5.1.1 Vorbemerkung

Als erstes screening wurde die Trypanblau-Farbstoffausschlußmethode angewandt, bei der der Farbstoff nicht durch intakte Zellmembranen penetriert und dadurch nur geschädigte Zellen anfärbt. Es ist nicht möglich, bei dieser Methode zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen zu unterscheiden.

In neuronalen Primärkulturen von telenzephalischen Hühnerembryonen wurde nach 5 Tagen durch Serumentzug der Zelltod induziert. Gleichzeitig wurde eine Behandlung mit dem Gesamtextrakt EGb 761 in ansteigender Konzentration von 0.1 – 100µM durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten in den ursprünglichen Bedingungen gewachsene Hühnerembryonenkulturen, denen Gesamtextrakt hinzugefügt wurde. Nach 24 Stunden erfolgte die Färbung mit Trypanblau und die Auszählung der toten Zellen unter dem Lichtmikroskop.

5.1.2 Darstellung durch Serumentzug geschädigter Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Es zeigt sich, daß eine Zugabe von 100 µM EGb signifikant einen neuronalen Schaden bei Serumentzug vermindert.

Behandlung	Gesamtextrakt (μM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	0	24.01 \pm 4.78
	0.1	21.85 \pm 1.95
	1.0	18.43 \pm 7.75
	10	11.97 \pm 2.88
	100	12.45 \pm 6.10
Medium ohne Serum	0	35.21 \pm 9.54
	0.1	32.21 \pm 5.37
	1.0	29.12 \pm 4.88
	10	27.85 \pm 2.59
	100	22.31 \pm 4.30 **

Tabelle 2: EGb schützt kultivierte Hühnerneurone vor einer Schädigung durch Serumentzug. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Serum in An- und Abwesenheit von Egb inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlußmethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

5.1.3 Darstellung durch Staurosporin geschädigter Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Unter denselben Versuchsbedingungen wurden die Neuronen mit Staurosporin, einem starkem Induktor der Apoptose (Koh et al., 1995, Wiesner and Dawson, 1996), geschädigt. Es zeigt sich bereits bei einer Konzentration von 0.1 μM eine signifikante Abnahme des neuronalen Schadens. Eine noch stärkere Signifikanz der neuronalen Schädigung zeigte sich bei einer Zugabe von 10 bzw. 100 μM EGb.

Auch eine Behandlung mit dem Gesamtextrakt in Konzentrationen von 1, 10 und 100 μM drei Stunden vor Beginn einer neuronalen Schädigung durch Staurosporin führte zu einem signifikanten Rückgang der geschädigten Neuronen.

Behandlung	Gesamtextrakt (μM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	0	24.92 \pm 7.08
Medium mit Staurosporin	0	83.09 \pm 2.97
	0.1	77.28 \pm 3.50 *
	1.0	79.28 \pm 1.98
	10	71.06 \pm 2.51 ***
	100	59.30 \pm 1.83 ***
<hr/>		
Vorbehandlung		
mit EGb	1.0	68.47 \pm 4.28 ***
	10	53.73 \pm 3.04 ***
	100	50.06 \pm 1.69 ***

Tabelle 3: EGb schützt kultivierte Hühnerneurone vor einer Schädigung durch Staurosporinbehandlung. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Staurosporinbehandlung in An- und Abwesenheit von EGb inkubiert. Außerdem wurde eine Versuchsreihe drei Stunden vor der Staurosporinbehandlung mit EGb in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlußmethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

5.1.4 Darstellung von apoptotischen Neuronen einer telenzephalischen Hühnerembryonenkultur durch die Färbung mit Hoechst 33258 nach Serumentzug bzw. Staurosporinbehandlung

Den fünf Tage alten telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen wurde Serum entzogen bzw. Staurosporin zugegeben, siehe oben. Gleichzeitig wurde eine Behandlung mit dem Gesamtextrakt EGb (0.1 – 100 μM) durchgeführt. Gesamtextrakt wurde auch den Kontrollgruppen zugegeben.. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung durch die Färbung mit Hoechst 33258 und die Auszählung der Zellen mit apoptotisch veränderten Kernen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die graue Säule zeigt mit Staurosporin geschädigte Neuronen, die mit Gesamtextrakt 10 μM vorbehandelt worden waren.

Bereits in geringer Konzentration (1.0 μM) ist Egb in der Lage den Prozentsatz apoptotischer Neurone zu senken.

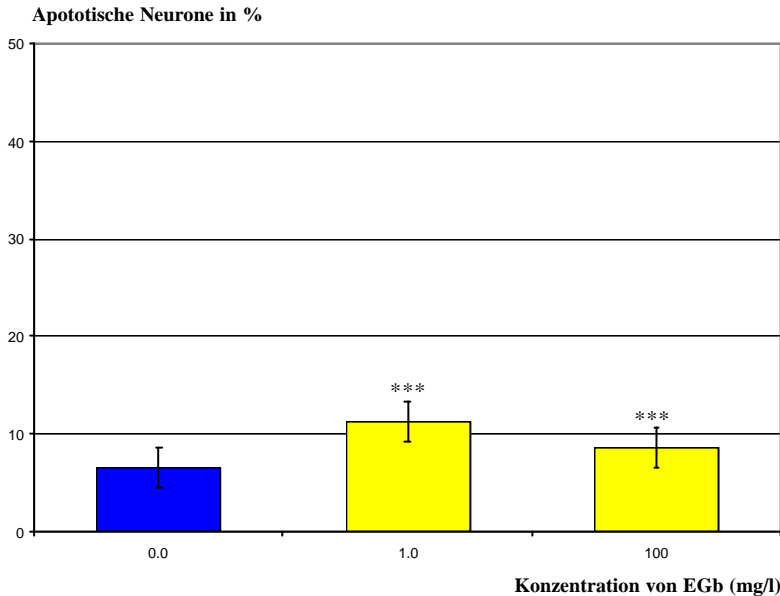


Abb. 3: EGb reduziert eine durch Serumentzug induzierte neuronale Apoptose. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen (gelbe Säulen) in An- und Abwesenheit von EGb inkubiert. Der Prozentsatz apoptotischer Neurone wurde nach Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

Es zeigt sich, daß Konzentrationen von 10 bzw. 100 μM Gesamtextrakt bei einer Staurosporinschädigung den Prozentsatz apoptotischer Neurone signifikant vermindern können. Auch mit 10 μM Gesamtextrakt vorbehandelte Neuronen senken signifikant den Prozentsatz apoptotischer Neurone. Es wird jedoch keine Verbesserung im Vergleich zu Neuronenkulturen gesehen, die mit derselben Konzentration des Gesamtextraktes behandelt wurden, jedoch ohne Vorbehandlung.

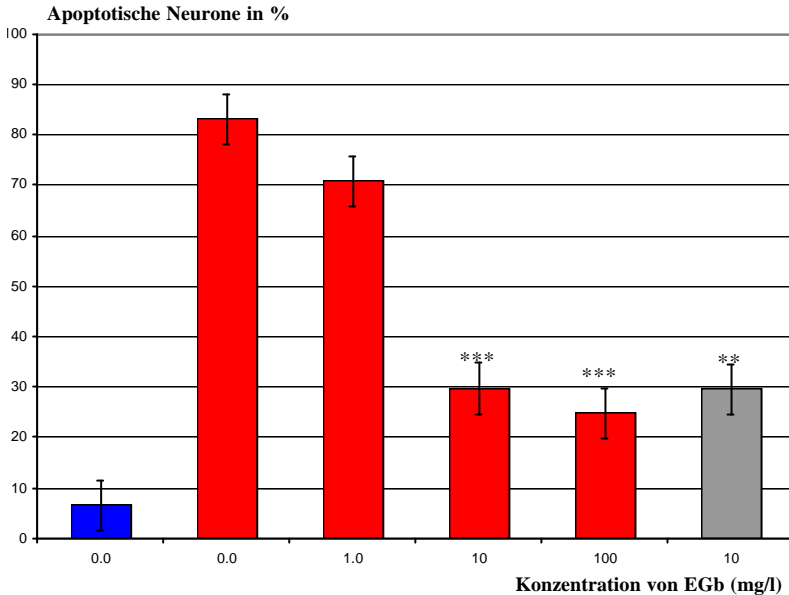


Abb. 4: EGb reduziert eine Staurosporin induzierte neuronale Apoptose. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen und mit 200 nM Staurosporin (rote Säulen) in An- und Abwesenheit von EGb inkubiert. Die graue Säule zeigt eine Versuchsreihe, die drei Stunden vor der Staurosporinbehandlung mit Egb in behandelt wurde. Der Prozentsatz apoptotischer Neurone wurde nach Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

5.2 Darstellung von geschädigten Neuronen einer hippocampalen Rattenkultur durch die Färbung mit TUNEL

5.2.1 Vorbemerkung

Die TUNEL- Färbung interkaliert an 3' OH-Enden fragmentierter DNA. Brüche der DNA kommen nicht nur bei der Apoptose, sondern z.B. auch bei Mitose und der späten Phase der Nekrose vor.

Da die Neuronen der Rattenkulturen nur mit Staurosporin geschädigt wurden, welches eine reine Apoptose provoziert, kann man davon ausgehen, daß der erhebliche Anteil gefärbter Zellen apoptotisch ist.

5.2.2 Wirkung des Gesamtexttraktes in verschiedenen Konzentrationen auf durch Staurosporinbehandlung geschädigte Neurone von hippocampalen Rattenkulturen

Es zeigt sich, daß Konzentrationen von 100 µM Gesamtextrakt auch bei mit Staurosporin geschädigten Neuronen der hippocampalen Rattenkulturen die Rate der apoptotischen Neurone (siehe oben) signifikant vermindern können.

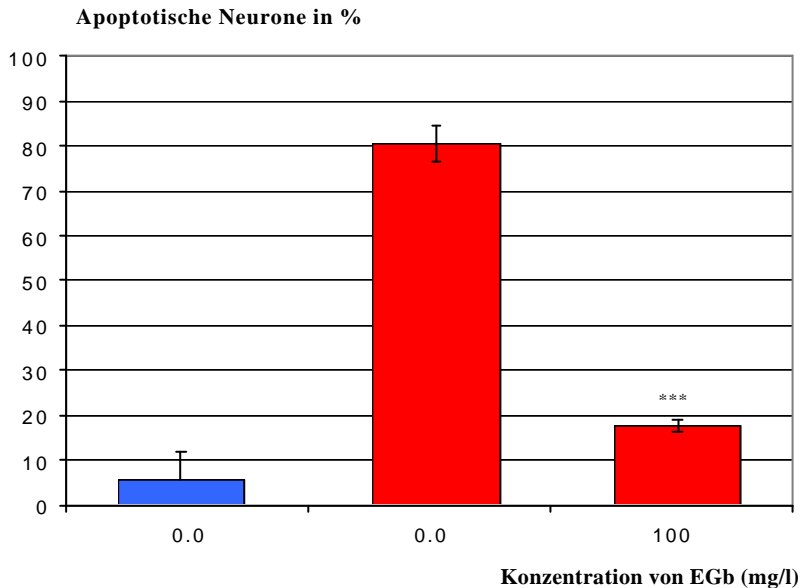


Abb. 5: EGb schützt hippocampale Kulturen von Ratten vor einer Schädigung durch Staurosporinbehandlung. Kultivierte hippocampale Neurone von Ratten wurden nach 10 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Staurosporinbehandlung in An- und Abwesenheit von Egb inkubiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil geschädigter Neurone durch die TUNEL – Färbung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** p<0.01 im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

5.3 Wirkung von Ginkgolid A auf durch Serumentzug oder Staurosporinbehandlung geschädigte Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen

5.3.1 Vorbemerkung

Es galten dieselben Versuchsbedingungen der Vitalitätsmessung wie bei dem Versuch 5.1.1 mit dem Gesamtextrakt.

5.3.2 Darstellung durch Serumentzug geschädigter Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Ginkgolid A führte auch in der höchsten gewählten Konzentration nicht zu einer Verbesserung der Zellvitalität nach Serumentzug (Tabelle 5).

Induktion von Apoptose	Ginkgolid A (μM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	0	14.99 \pm 4.10
	0.01	13.90 \pm 3.68
	0.1	12.71 \pm 4.50
	1.0	12.83 \pm 1.56
	10	16.42 \pm 3.88
	100	13.71 \pm 2.70
Medium ohne Serum	0	26.13 \pm 4.67
	0.01	28.70 \pm 9.85
	0.1	22.56 \pm 6.63
	1.0	20.36 \pm 2.21
	10	19.68 \pm 5.53
	100	16.09 \pm 5.16

Tabelle 4: Darstellung der Wirkung von Ginkgolid A nach Serumentzug. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Serum in An- und Abwesenheit von Ginkgolid A inkubiert. Anschließend wurde

die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlußmethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

5.3.3 Darstellung durch Staurosporin geschädigter Neurone von telencephalischen Hühnerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Auch durch Staurosporin geschädigte Zellen zeigten keine Verbesserung der Vitalitätsrate durch Zugabe von Ginkgolid A in den Konzentrationen von 0.01- 100 μM .

Induktion von Apoptose	Ginkgolid A (μM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	0	11.68 \pm 2.51
	0.01	12.55 \pm 1.54
	0.1	11.97 \pm 3.66
	1.0	13.09 \pm 2.79
	10	13.26 \pm 4.58
	100	15.26 \pm 3.82
Medium mit Staurosporin	0	77.03 \pm 15.78
	0.01	84.28 \pm 9.15
	0.1	83.38 \pm 11.89
	1.0	82.24 \pm 6.21
	10	75.49 \pm 11.61
	100	85.51 \pm 4.39

Tabelle 5: Darstellung der Wirkung von Ginkgolid A nach Staurosporinbehandlung. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen und mit 200 nM Staurosporin in An- und Abwesenheit von Ginkgolid A inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlußmethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé–Test ermittelt.

Da bereits diese als screening gewählte Methode keine signifikanten Ergebnisse aufwies, wurden keine weiteren Versuche mit Ginkgolid A durchgeführt.

5.4 Wirkung von Ginkgolid B in verschiedenen Konzentrationen auf durch Serumentzug oder Staurosporinbehandlung geschädigte Neuronen von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen

5.4.1 Vorbemerkung

Es galten dieselben Versuchsbedingungen der Vitalitätsmessung wie bei dem Versuch 5.1.1 mit dem Gesamtextrakt.

5.4.2 Darstellung durch Serumentzug geschädigter Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen.

Es zeigt sich, daß Ginkgolid B schon bei einer Konzentration von 0.1 μM eine signifikante Verbesserung der Vitalitätsrate bewirkt.

Induktion von Apoptose	Ginkgolid B (μM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	0	10.29 ± 2.00
	0.1	11.57 ± 1.85
	1.0	7.28 ± 0.97
	10	3.55 ± 1.59
	100	5.55 ± 2.29
Medium ohne Serum	0	22.51 ± 8.28
	0.1	$13.90 \pm 5.41^{**}$
	1.0	$9.69 \pm 1.58^{***}$
	10	$8.75 \pm 4.21^{***}$
	100	$4.39 \pm 3.49^{***}$

Tabelle 6: Darstellung der Wirkung von Ginkgolid B nach Serumentzug. Kultivierte Hunerneurone wurden nach 5 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Serum in An- und Abwesenheit von Ginkgolid B inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlumethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

Aufgrund dieses Ergebnis wurde der Versuch mit geringeren Konzentrationen von 0.001 – 0.1 μM Ginkgolid B durchgeführt. Auch hier zeigt sich eine relevante Abnahme der geschädigten Zellen ab einer Konzentration von 0.001 μM Ginkgolid B.

Induktion von Apoptose	Ginkgolid B (μM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	0	10.86 ± 2.68
	0.0001	12.28 ± 2.14
	0.001	10.00 ± 1.75
	0.01	8.55 ± 2.29
	0.1	9.80 ± 2.92
Medium ohne Serum	0	18.50 ± 5.59
	0.0001	16.61 ± 5.73
	0.001	$10.53 \pm 3.25^*$
	0.01	$8.67 \pm 2.19^{***}$
	0.1	$8.22 \pm 2.32^{***}$

Tabelle 7: Darstellung der Wirkung von Ginkgolid B nach Serumentzug. Kultivierte Hunerneurone wurden nach 5 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Serum in An- und Abwesenheit von Ginkgolid B inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlumethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt

5.4.3 Darstellung durch Staurosporin geschädigter Neurone von telencephalischen Hunerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Ginkgolid B kann die Vitalitätsrate der Neuronen von telencephalischen Hunerembryonenkulturen nach einer Schädigung durch Staurosporin bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ verbessern. Eine höhere Konzentration von Ginkgolid B vermag diesen Effekt zu steigern.b

Induktion von Apoptose	Ginkgolid B (μM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	0	11.38 \pm 2.24
	0.01	12.25 \pm 3.53
	0.1	10.73 \pm 2.49
	1.0	5.46 \pm 0.84
	10	7.78 \pm 1.05
	100	7.63 \pm 0.98
Serum mit Staurosporin	0	76.39 \pm 4.43
	0.01	71.60 \pm 6.72
	0.1	69.29 \pm 6.21
	1.0	62.69 \pm 8.89
	10	58.05 \pm 7.95 **
	100	52.60 \pm 7.83 ***

Tabelle 8: Darstellung des protektiven Effekts von Ginkgolid B nach Staurosporinbehandlung. Kultivierte Hunerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen und mit 200 nM Staurosporin in An- und Abwesenheit von Ginkgolid B inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlumethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé-Test ermittelt.

5.4.4 Darstellung von apoptotischen Neuronen einer telenzephalischen Hunerembryonenkultur durch die Färbung mit Hoechst 33258 nach Serumentzug

Den fünf Tage alten telenzephalischen Hunerembryonenkulturen wurde Serum entzogen, siehe oben. Gleichzeitig wurde eine Behandlung mit Ginkgolid B (0.1-100 μM) durchgeführt. Ginkgolid B wurde auch den Kontrollgruppen zugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung durch die Färbung mit Hoechst 33258 und die Auszählung der Zellen mit apoptotisch veränderten Kernen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Es zeigt sich, daß Konzentrationen von 0,1-100 μM Ginkgolid B bei durch Serumentzug geschädigten Neuronen die Apoptoserate signifikant vermindern können.

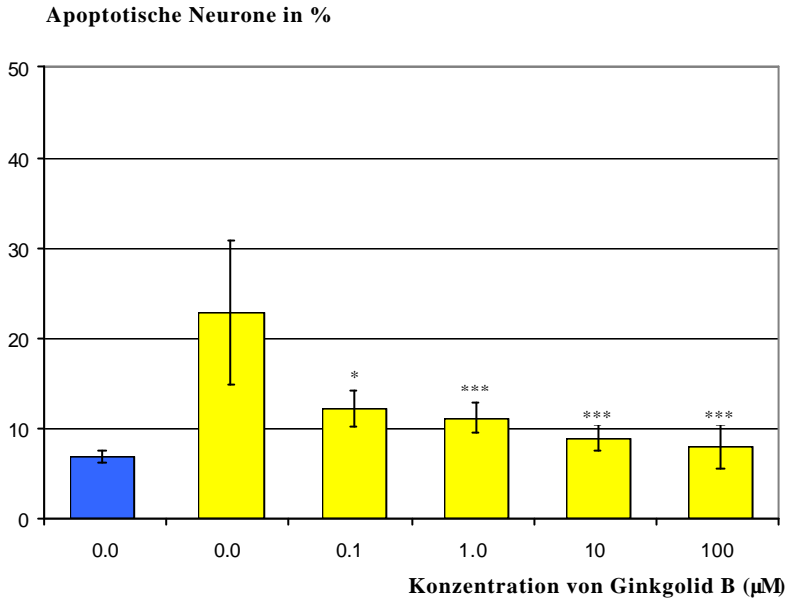


Abb. 6: Ginkgolid B reduziert eine durch Serumentzug-induzierte neuronale Apoptose. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen (gelbe Säulen) und in An- und Abwesenheit von Ginkgolid B inkubiert. Der Prozentsatz apoptotischer Neurone wurde nach Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé-Test ermittelt.

5.4.5 Darstellung von apoptotischen Neuronen einer telencephalischen Hühnerembryonenkultur durch die Färbung mit Hoechst 33258 nach Staurosporinbehandlung

Die fünf Tage alten telencephalischen Hühnerembryonenkulturen wurden mit Staurosporin behandelt, siehe oben. Gleichzeitig wurde Ginkgolid B (0.1-100 μM) zugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung durch die Färbung mit Hoechst

33258 und die Auszählung der Zellen mit apoptotisch veränderten Kernen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Apoptoserate bei den in dieser Arbeit gewählten Konzentrationen von 1,0-100 μM von Ginkgolid B und gleichzeitiger Zugabe von Staurosporin.

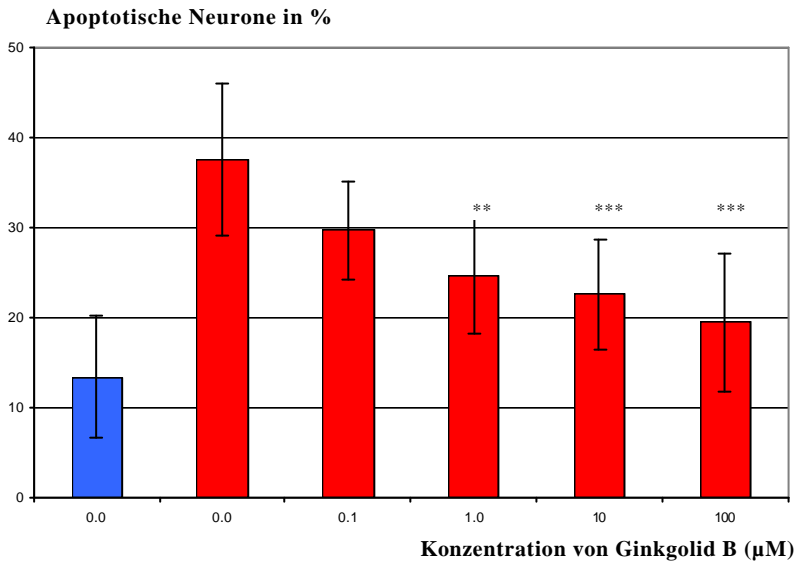


Abb. 7: Ginkgolid B reduziert eine Staurosporin-induzierte neuronale Apoptose. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen und mit 200 μM Staurosporin (rote Säulen) in An- und Abwesenheit von Ginkgolid B inkubiert. Der Prozentsatz apoptotischer Neurone wurde nach Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé-Test ermittelt.

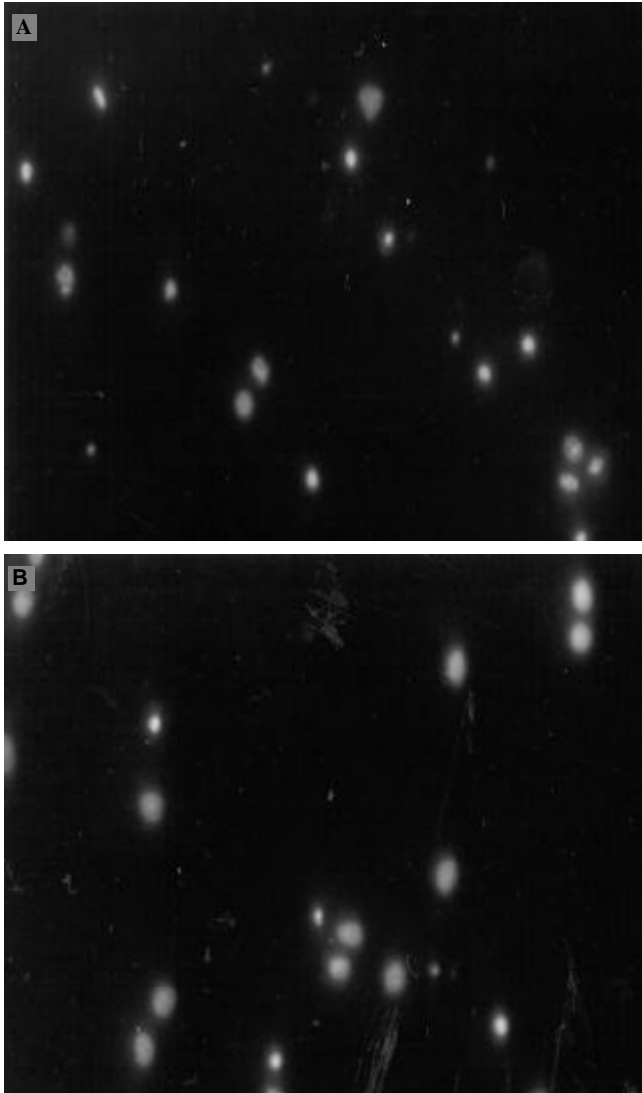


Abb. 8: Fotografische Aufnahme von Neuronen telencephalischer Hühnerembryonenkulturen behandelt mit der Kernfärbung nach Hoechst 33258 nach 24 stündiger Inkubation mit Staurosporin (A) bzw. Staurosporin plus 10 μ M Ginkgolide B (B). Apoptotische Neuronen erscheinen fragmentiert und intensiv fluoreszierend.

5.5 Wirkung von Ginkgolid J in verschiedenen Konzentrationen auf durch Serumentzug oder Staurosporinbehandlung geschädigte Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen

5.5.1 Vorbemerkung

Als erstes screening wurde die Trypanblau – Methode angewandt Das Vorgehen entspricht der Beschreibung unter Vorbemerkung 5.1.1.

5.5.2 Darstellung durch Serumentzug geschädigter Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. Signifikanzen im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle werden durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

Es zeigt sich nur im Wiederholungsversuch (s. Tabelle 10), daß eine Zugabe von 100 μM EGb 761 signifikant einen neuronalen Schaden vermindert.

Induktion von Apoptose	Ginkgolid J (μM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	-	14.48 \pm 6.86
	1.0	21.97 \pm 6.60
	10	13.63 \pm 3.35
	100	8.78 \pm 5.58

Medium ohne Serum	-	27.41 ± 5.68
	1.0	19.36 ± 4.79
	10	14.29 ± 4.67
	100	12.07 ± 2.87

Tabelle 9: Darstellung der Wirkung von Ginkgolid J nach Schädigung von kultivierten Hühnerneuronen durch Serumentzug: Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Serum in An- und Abwesenheit von Ginkgolid J inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlußmethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** p < 0.01 im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé-Test ermittelt.

5.5.3 Darstellung durch Staurosporin geschädigter Neurone von telencephalischen Hühnerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Unter denselben Versuchsbedingungen wurden die Neuronen mit Staurosporin, einem anerkanntermaßen starkem Induktor der Apoptose, geschädigt.

Es zeigt sich bereits bei einer Konzentration von 0.1 µM eine signifikante Abnahme des neuronalen Schadens. Eine noch stärkere Signifikanz der neuronalen Schädigung zeigen sich bei 1, 10 bzw. 100 µM Zugabe von Ginkgolid J.

Induktion von Apoptose	Ginkgolid J (µM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	-	9.73 ± 3.32
	0.1	9.70 ± 3.28
	1.0	8.47 ± 2.99
	10	7.10 ± 0.93
	100	7.40 ± 1.84
Medium ohne Serum	-	17.22 ± 2.11
	100	11.57 ± 4.84 ***

Medium mit Staurosporin	-	78.26 ± 4.01
	0.1	64.00 ± 8.71 **
	1.0	51.77 ± 5.39 ***
	10	43.66 ± 5.71 ***
	100	43.64 ± 6.54 ***

Tabelle 10: Ginkgolid J schützt kultivierte Hühnerneurone vor einer Schädigung durch Staurosporinbehandlung und nach Serumentzug. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Staurosporinbehandlung in An- und Abwesenheit von Ginkgolid J inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlußmethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

5.5.4 Darstellung von apoptotischen Neuronen einer telenzephalischen Hühnerembryonenkultur durch die Färbung mit Hoechst 33258 nach Serumentzug bzw. Staurosporinbehandlung

Den sieben Tage alten telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen wurde Serum entzogen bzw. Staurosporin zugegeben, siehe oben. Gleichzeitig wurde eine Behandlung mit Ginkgolid J (0.1 – 100 μ M) durchgeführt. Ginkgolid J wurde auch den Kontrollgruppen zugegeben, siehe oben. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung durch die Färbung mit Hoechst 33258 und die Auszählung der Zellen mit apoptotisch veränderten Kernen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Es zeigt sich, daß eine Konzentration von 100 μ M Ginkgolid J den Prozentsatz durch Serumentzug geschädigter Neurone signifikant vermindern kann

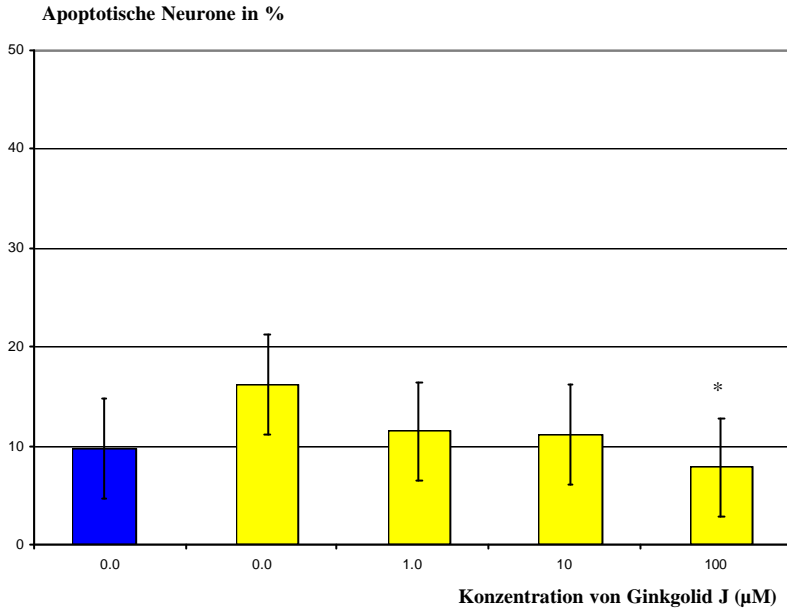


Abb. 9: Ginkgolid J reduziert eine durch Serumentzug induzierte neuronale Apoptose. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen (gelbe Säulen) in An- und Abwesenheit von Ginkgolid J inkubiert. Der Prozentsatz apoptotischer Neurone wurde nach Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé-Test ermittelt.

Es zeigt sich, daß eine Konzentration von 100 µM Ginkgolid J den Prozentsatz durch Staurosporin geschädigter Neurone nicht signifikant vermindern kann.

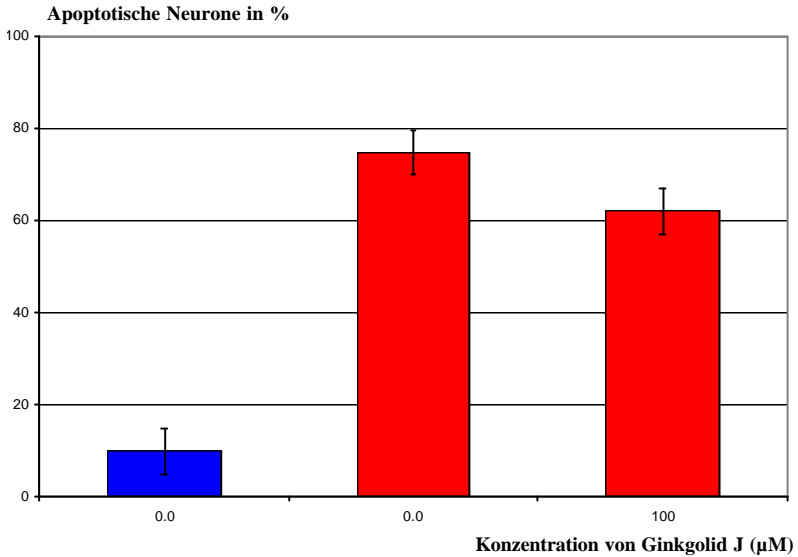


Abb. 10: Ginkgolid J reduziert nicht eine durch Staurosporin induzierte neuronale Apoptose. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen und mit 200 nM Staurosporin (rote Säulen) in An- und Abwesenheit von Ginkgolid J inkubiert. Der Prozentsatz apoptotischer Neurone wurde nach Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

5.6 Wirkung von Bilobalid in verschiedenen Konzentrationen auf durch Serumentzug oder Staurosporinbehandlung geschädigte Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen

5.6.1 Vorbemerkung

Als erstes screening wurde die Trypanblau – Methode angewandt, siehe Vorbemerkung 5.1.1.

5.6.2 Darstellung durch Serumentzug geschädigter Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Es zeigt sich, daß bereits eine Zugabe von 0.01 μM Bilobalid signifikant einen neuronalen Schaden vermindert.

Induktion von Apoptose	Bilobalid (μM)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	-	11.39 \pm 2.32
	0.01	12.39 \pm 4.90
	0.1	10.92 \pm 2.36
	1.0	8.59 \pm 1.04
	10	9.22 \pm 1.91
	100	6.58 \pm 1.70

Medium ohne Serum	-	29.73 ± 8.05
	0.01	19.28 ± 5.31 *
	0.1	12.90 ± 2.93 ***
	1.0	13.11 ± 4.19 ***
	10	10.31 ± 5.01 ***
	100	10.66 ± 2.86 ***

Tabelle 11: Bilobalid schützt kultivierte Hühnerneurone vor einer Schädigung durch Serumentzug. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Serum in An- und Abwesenheit von Bilobalid inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlußmethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** p< 0.01 im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé – Test ermittelt.

5.6.3 Darstellung durch Staurosporin geschädigter Neurone von telenzephalischen Hühnerembryonenkulturen durch die Färbung mit Trypanblau

Unter etwas veränderten Versuchsbedingungen wurden die Neuronen mit Staurosporin, geschädigt. Da die Ergebnisse der durch Serumentzug geschädigten Neuronen, die mit Bilobalid behandelt wurden, hochsignifikant waren, wurde getestet, ob bereits eine Zugabe von Bilobalid in den verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von acht Stunden zu einem signifikanten Ergebnis führt.

Es zeigt sich bereits bei einer Konzentration von 0.01 µM eine signifikante Abnahme * p< 0.1 des neuronalen Schadens. Eine noch stärkere Signifikanz der Abnahme der neuronalen Schädigung zeigen sich bei 0.1, 1, 10 bzw. 100 µM Zugabe von Bilobalid.

Induktion von Apoptose	Bilobalid (8 Std.Versuch/ μ M)	Tote Zellen (%)
Medium mit Serum	-	7.73 \pm 0.70
	0.01	6.21 \pm 1.42
	0.1	7.27 \pm 2.81
	1.0	6.49 \pm 2.74
	10	6.69 \pm 2.01
	100	7.37 \pm 3.69
Medium ohne Serum	-	16.13 \pm 2.96
	0.01	13.48 \pm 3.79
	0.1	10.20 \pm 4.17
	1.0	9.93 \pm 3.57
	10	11.43 \pm 3.41
	100	6.88 \pm 1.47
Medium mit Staurosporin	-	58.64 \pm 8.41
	0.01	46.44 \pm 8.23 *
	0.1	30.38 \pm 5.69 ***
	1.0	25.03 \pm 4.08 ***
	10	16.88 \pm 4.38 ***
	100	20.94 \pm 6.94 ***

Tabelle 12: Bilobalid schützt kultivierte Hühnerneurone vor einer Schädigung durch Staurosporinbehandlung. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen für 8 h in DMEM mit und ohne Staurosporinbehandlung in An- und Abwesenheit von Bilobalid inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität durch die Trypanblaufarbstoffausschlußmethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** p < 0.01 im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé–Test ermittelt.

5.6.4 Darstellung von apoptotischen Neuronen einer telencephalischen Hühnerembryonenkultur durch die Färbung mit Hoechst 33258 nach Serumentzug

Den fünf Tage alten telencephalischen Hühnerembryonenkulturen wurde Serum entzogen, siehe oben. Gleichzeitig wurde eine Behandlung mit Bilobalid (0.1 – 100 μ M) durchgeführt. Bilobalid wurde auch den Kontrollgruppen zugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung durch die Färbung mit Hoechst 33258 und die Auszählung der toten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Es zeigt sich, daß Konzentrationen von 10 bzw. 100 μ M Bilobalid den Prozentsatz durch Serumentzug geschädigter Neurone signifikant vermindern können.

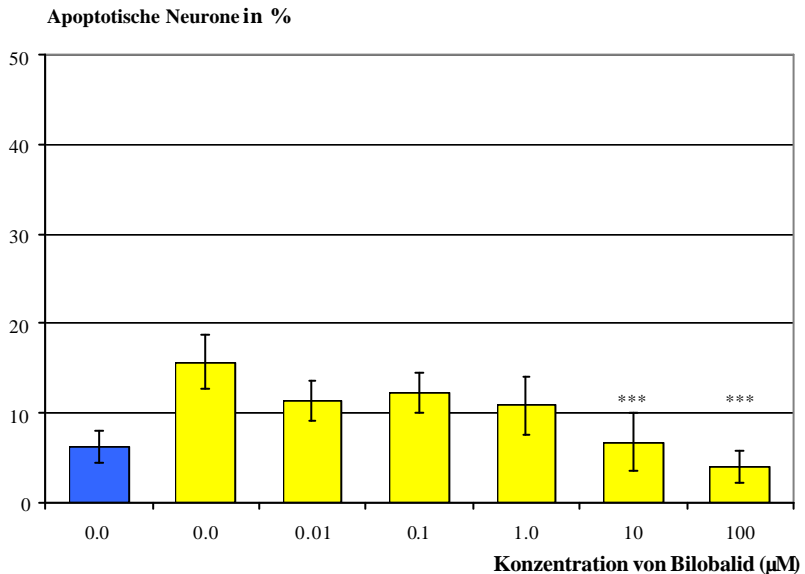


Abb. 11: Bilobalid reduziert eine durch Serumentzug-induzierte neuronale Apoptose. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen (gelbe Säulen) und in An- und Abwesenheit von Bilobalid inkubiert. Der Prozentsatz apoptotischer Neurone wurde nach Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé-Test ermittelt.

5.6.5 Darstellung von apoptotischen Neuronen einer telencephalischen Hühnerembryonenkultur durch die Färbung mit Hoechst 33258 nach Staurosporinbehandlung

Die fünf Tage alten telencephalischen Hühnerembryonenkulturen wurden mit Staurosporin behandelt. Gleichzeitig wurde eine Behandlung mit Bilobalid (0.1 – 100 μ M) durchgeführt. Bilobalid wurde auch den Kontrollgruppen zugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung durch die Färbung mit Hoechst 33258 und die Auszählung der toten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Es zeigt sich, daß Konzentrationen von 10 bzw. 100 μ M Bilobalid den Prozentsatz mit Staurosporin geschädigter Neurone signifikant vermindern können.

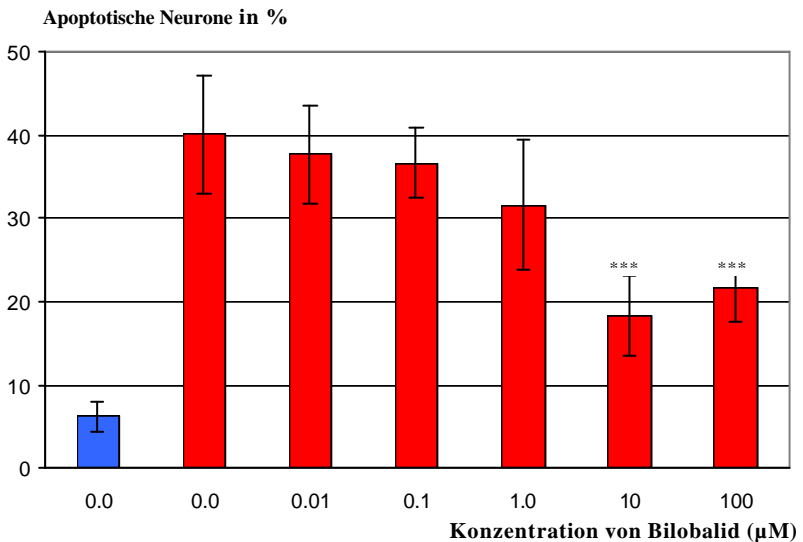


Abb. 12: Bilobalid reduziert eine Staurosporin-induzierte neuronale Apoptose. Kultivierte Hühnerneurone wurden nach 5 Tagen in Kultur für 24 h das Serum entzogen und mit 200 μ M Staurosporin (rote Säulen) in An- und Abwesenheit von Bilobalid inkubiert. Der Prozentsatz apoptotischer Neurone wurde nach Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé-Test ermittelt.

5.7 Darstellung von geschädigten Neuronen einer hippocampalen Rattenkultur durch die Färbung mit TUNEL

5.7.1 Vorbemerkung

Die Vorgehensweise entspricht den vorangegangenen Versuchen, siehe Vorbemerkung 5.2.1.

5.7.2 Wirkung von Bilobalid in verschiedenen Konzentrationen auf durch Serumentzug geschädigte Neurone von hippocampalen Rattenkulturen

Es zeigt sich, daß eine Konzentration von 100 μM Bilobalid den Prozentsatz durch Serumentzug geschädigter Neurone der hippocampalen Rattenkulturen signifikant vermindern kann.

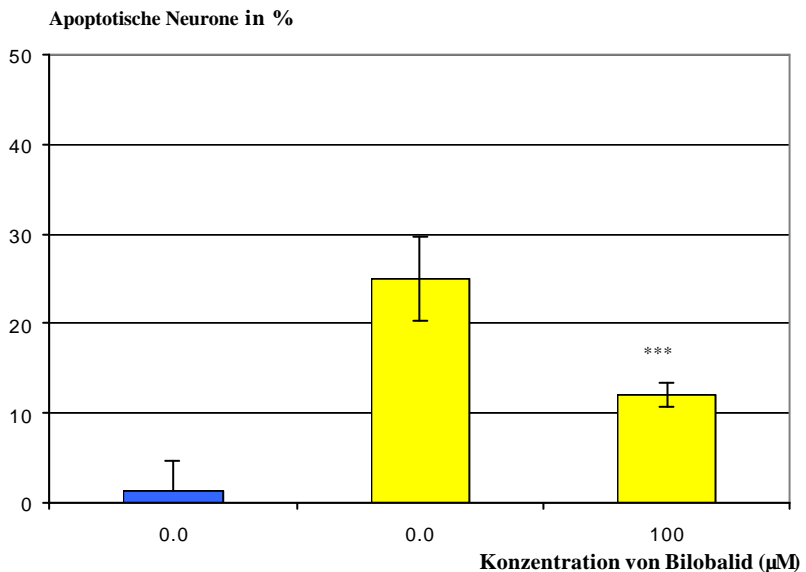


Abb. 13: Bilobalid schützt hippocampale Kulturen von Ratten vor einer Schädigung durch Serumentzug. Kultivierte hippocampale Neurone von Ratten wurden nach 10 Tagen Kultur für 24 h das Nährmedium entzogen in An- und Abwesenheit von Bilobalid. Anschließend wurde der prozentuale Anteil geschädigter Neurone durch die TUNEL – Färbung bestimmt. Dargestellt sind die

Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé-Test ermittelt.

5.7.3 Wirkung von Bilobalid in verschiedenen Konzentrationen auf durch Staurosporin geschädigte Neurone von hippocampalen Rattenkulturen

Es zeigt sich, daß eine Konzentration von 10 bzw. 100 μM Bilobalid den Prozentsatz durch Staurosporin geschädigter Neurone der hippocampalen Rattenkulturen signifikant vermindern kann.

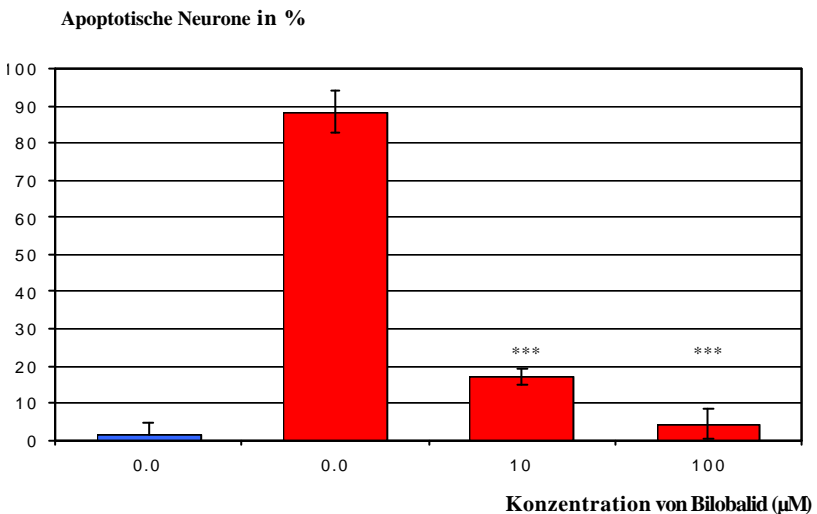


Abb. 14: Bilobalid schützt hippocampale Kulturen von Ratten vor einer Schädigung durch Staurosporinbehandlung. Kultivierte hippocampale Neurone von Ratten wurden nach 10 Tagen für 24 h in DMEM mit und ohne Staurosporinbehandlung in An- und Abwesenheit von Bilobalid inkubiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil geschädigter Neurone durch die TUNEL - Färbung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht Versuchen. ** $p < 0.01$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle wurde durch die Varianzanalyse, Scheffé-Test ermittelt.

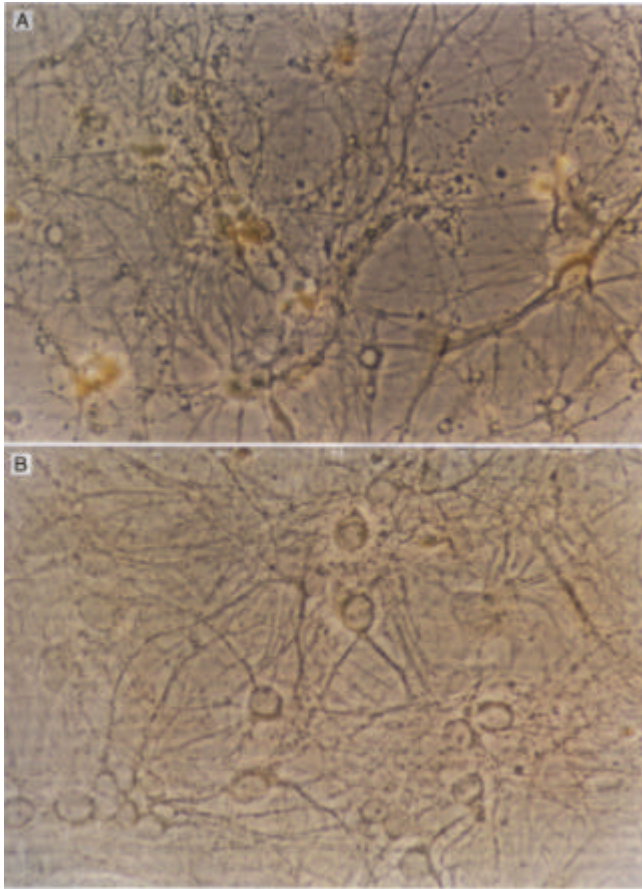


Abb. 15: Fotografische Aufnahme von Mischkulturen bestehend aus Neuronen und Astrozyten nach 12 stündiger Inkubation mit Staurosporin (A) bzw. Staurosporin plus 100 μ M Bilobalid (B). Die braune Farbe zeigt TUNEL-positive Neurone.

5.8 Darstellung von oligonucleosomaln Fragmenten geschädigter Neurone nach Staurosporinbehandlung oder Serumentzug durch die Gelelektrophorese

5.8.1 Vorbemerkung

Wie bereits in der Einleitung geschildert, ist eines der morphologischen Merkmale der Apoptose die Fragmentierung der DNA in Bruchstücke von 180 bp und die Vielfachen davon. Dies führt dazu, daß in der Gelelektrophorese eine typische DNA-Leiter zu sehen ist, im Gegensatz zum nekrotischen sog. Smear, der keine erkennbare Struktur zeigt (Gong et al., 1994). Die Ergebnisse dieser Methode erlauben nur eine semiquantitative Auswertung.

In der ersten Gelelektrophorese lief die DNA von sechs Zellkulturen nach unterschiedlicher Behandlung. Diese Behandlung wurde analog den vorangegangenen Versuchen an fünf Tage alten telenzephalischen Kulturen von Hühnerembryonen vorgenommen, denen für 24 Stunden das Serum entzogen worden war bzw. die mit Staurosporin geschädigt wurden und dabei eine ebenfalls 24-stündige Behandlung mit dem Gesamtextrakt in verschiedenen Konzentrationen erhielten.

5.8.2 Ergebnisse der verschiedenen Wirkstoffe in der Gelelektrophorese nach Staurosporinbehandlung bzw. nach Serumentzug

Die Reihen 1 und 2 waren mit Staurosporin geschädigte Zellen, denen der Gesamtextrakt in einer Konzentration von 100 bzw. 10 mg/l Medium hinzugefügt war. Die Reihen 3 und 4 zeigen durch Serumentzug behandelte Zellen. Die Zellen der Reihe 3 erhielten außerdem 100 mg/l Gesamtextrakt. Bei den Zellen der 5. Reihe handelt es sich um durch Staurosporin geschädigte Zellen, bei Reihe 6 um eine Kontrolle, d. h. Zellen, die in einem serumhaltigen Medium gezüchtet wurden.

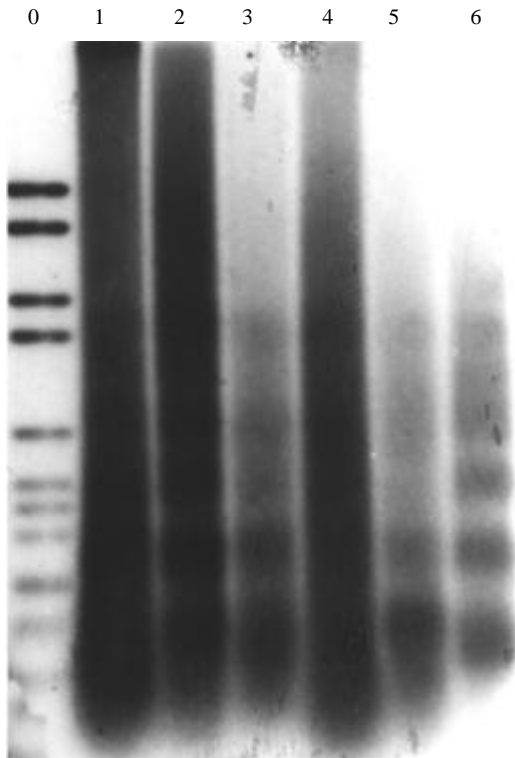


Abb. 16: Die Abbildung zeigt von nekrotischem smear überlagerte DNA-Leitern, die typischerweise bei der Apoptose entstehen. Die unterschiedliche Gesamtintensität der Reihen zeigt, daß nicht die identische Menge an DNA in den einzelnen Proben vorhanden ist. Reihe 1 und 2 zeigen mit Staurosporin geschädigte Zellen, denen der Gesamtextrakt in einer Konzentration von 100 bzw. 10 mg/l Medium hinzugefügt wurde. Die Reihen 3 und 4 zeigen durch Serumentzug behandelte Zellen. Die Zellen der Reihe 3 erhielten außerdem 100 mg/l Gesamtextrakt. Bei den Zellen der 5. Reihe handelt es sich um durch Staurosporin geschädigte Zellen, Reihe 6 ein zeigt das Vehikel. Die Proben werden mit einem Standard – Marker verglichen (Reihe 0).

Die Abbildung zeigt andeutungsweise die zu erwartenden DNA-Leitern, jedoch auch deutlichen smear. Die unterschiedliche Gesamtintensität der Reihen zeigt, daß nicht die identische Menge an DNA in den einzelnen Proben vorhanden ist.

Der Versuch sollte nun auch mit Kulturen, die mit Bilobalid oder Ginkgolid B und Staurosporin 12 bzw. 24 Stunden behandelt worden waren, durchgeführt werden.

Trotz intensiver Versuchsreihen und Änderungen im Versuchsprotokoll ließen sich jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielen.

6 DISKUSSION

6.1 Diskussion der verwendeten Untersuchungsmodelle

6.1.1 Zellkulturmodelle

Bei der Verwendung von Neuronenkulturen ist es, im Gegensatz zu den in-vivo Modellen, möglich definierte experimentelle Bedingungen zu erreichen. So werden die Pharmaka in das Kulturmedium gegeben und wirken dadurch direkt auf die Neuronen ohne systemische oder vaskuläre Nebenwirkungen. Auch kann durch die Umgehung der Blut-Hirn-Schranke eine genaue Aussage über die Konzentration der applizierten Substanzen am Wirkort getroffen werden.

Um die Ergebnisse einer in-vitro Untersuchung auf in vivo Bedingungen übertragen zu können, sollten die Eigenschaften der Neurone in Zellkulturen mit denen der in-vivo Neuronen übereinstimmen (Dotti et. al., 1988; Müller, 1995). Die unbegrenzt teilungsfähigen Zellen neuronaler Zelllinien haben viele Eigenschaften des Ursprungsgewebes verloren. Für neuronale Primärkulturen, die direkt aus dem Gehirn gewonnen werden, ist jedoch eine hohe Übereinstimmung mit den in vivo-Eigenschaften nachgewiesen worden.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene neuronale Primärkulturen verwendet: telenzephalische Kulturen von sieben Tage alte Hühnerembryonen und hippocampale Kulturen von neugeborenen Ratten. Die telenzephalischen Kulturen vom Hühnerembryo sind reine neuronale Kulturen (Pettmann et al., 1979). Beobachtete pharmakologische Effekte können als direkte Wirkung der applizierten Substanz auf Neurone interpretiert werden. Bei den hippocampalen Kulturen von Ratten handelt es sich um gemischte Kulturen: sie enthalten meist 70% Neurone und 30% Astrozyten. Zu beobachtende Effekte auf Neurone können also direkt, als auch über Astrozyten vermittelt sein.

Der Hippocampus reagiert auf hypoxämische Zustände sehr empfindlich. Ischämie-Versuche an der Ratte demonstrierten eine Übereinstimmung der selektiven neuronalen Schädigung des Hippocampus mit der Schädigung derselben Region beim Menschen (Pusinelli et al., 1982; Petito et al., 1987). Die hippocampalen Kulturen- wie auch

andere Neuronenkulturen- eignen sich offensichtlich, um die Wirksamkeit von Neuroprotektiva zu untersuchen und können erste Hinweise auf eine mögliche humanmedizinische Relevanz geben.

6.2 Diskussion der neuronalen Apoptose

6.2.1 Induktion der neuronalen Apoptose durch Staurosporin

Staurosporin ist ein nicht-selektiver Proteinkinaseinhibitor. Falcieri et al., (1993), Bertrand et al., (1994) und Koh et al., (1995) konnten zeigen, daß Staurosporin im Konzentrationsbereich zwischen 10 – 100 nM auch in neuronalen Zellen eine Apoptose mit den typischen morphologischen Veränderungen wie der Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und Kernfragmentierung induziert. Dabei erscheint eine Exposition der neuronalen Zellen durch Staurosporin über 24 Stunden als sinnvoll, da in diesem Zeitraum ein signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellen zu verzeichnen ist, danach jedoch fast ein „steady state“ erreicht scheint (Prehn et al., 1997).

In neuronalen Zellen kommt es bereits 30 Minuten nach Exposition mit Staurosporin zu einer maximalen Aktivierung der Caspase-1 (Krohn et al., 1998). Es wird diskutiert, ob sie den Ca²⁺-abhängigen Anstieg der intrazellulären Superoxid – Radikalanionen Produktion vermittelt (Prehn et al., 1997; Kruman et al.) oder ob es sich um unabhängig voneinander ablaufende Prozesse handelt (Ahlemeyer et al. 2001). Dieser Anstieg der Superoxid-Produktion wird als wichtigster „downstream“ Effektor der Staurosporin-induzierten Apoptose gewertet. Krohn et al. (1998) registrierten vor oder während der erhöhten Superoxid - Radikalanionen Produktion keine Senkung des mitochondrialen Membranpotentials, die von Zamzami et al. (1995) als Voraussetzung der erhöhten Superoxid- Radikalanionen Produktion interpretiert worden war. Kruman et al. (1998) dahingegen beobachteten auch bei Staurosporin-induzierter Apoptose an PC12-Zellen eine Depolarisation der Mitochondrienmembran. Von Bossy-Wetzel et al. (1998) wurde bei einer Staurosporin-induzierten Apoptose eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol beobachtet, das die Caspase-9-Aktivierung und nachfolgend die Aktivierung der Caspase-3 triggert. Wiesner et al. (1996) vermuteten, daß Staurosporin eine Kinase aktiviert, die ihrerseits ein System aktiviert, in dem Sphingomyelinase Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin hydrolysiert. Der langsame intrazelluläre Anstieg von Ceramid scheint hier wichtig für

die Induktion der Apoptose zu sein. Auch eine Abnahme des intrazellulären Gluthathions (GHS, Ahlemeyer and Krieglstein, 2000) und des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase (Ahlemeyer et al., 2001), welche toxischen freien Radikale inaktivieren, scheinen für die Induktion der Apoptose nach Behandlung mit Staurosporin mitverantwortlich zu sein.

Die ebenfalls nachgewiesene erhöhte Aktivität der Caspase-3, die 8 Stunden nach Staurosporin-Exposition am stärksten ist, scheint keinen direkten Einfluß auf die Ausführung des Staurosporin-induzierten Zelltods zu haben. So zeigten Krohn et al. (1998), daß bei einer Inhibierung der Caspase-3 zwar die apoptosetypischen, morphologische Veränderungen fehlten - das Ausmaß des Zelltods wurde jedoch nicht verzögert oder vermindert.

6.2.2 Induktion der neuronalen Apoptose durch Serumentzug

Auch Serumentzug löst bei Zellkulturen eine erhöhte Apoptoserate aus (Behl et al., 1994). Es wurden eine frühe mitochondriale Schädigung, sowie eine späte Fragmentierung der DNA beobachtet, also intrazelluläre Vorgänge, die auf eine Apoptose hinweisen.

Für die Apoptose scheint gerade in Neuronen ein erhöhter oxidativer Streß eine wichtige Rolle zu spielen (Atabay et al., 1996). So kann eine Überexpression bcl-2 eine Apoptose durch antioxidative Mechanismen verhindern (Hockenberry et al., 1993), wohingegen Lipidperoxide in Zellen, die einen Mangel an Antioxidantien aufweisen, eine Apoptose triggern können (Sandstorm et al., 1994). Im Gegensatz dazu diskutieren Ratan et al. (1996), daß oxidativer Streß kein allgemeiner Mediator der neuronalen Apoptose sei.

1999 entdeckten Chan et al., daß es nach Serumentzug in kultivierten hippocampalen Zellen von Rattenembryonen zu einem signifikanten Anstieg von Par-4 (prostate apoptosis response-4) kommt, was eine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies, einhergehend mit mitochondrialer Depolarisation, Caspase-Aktivierung und DNA-Fragmentierung zur Folge hat Während Liu et al.(1999) und Isahara et al. (1999) vor allem eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität fanden, machten LeBlanc et al. (1999) die Caspase-6 für die Apoptose nach Serumentzug verantwortlich.

Durch Serumentzug kommt es auch zur Akkumulation von Ceramid, wodurch Proteasen der Interleucin-converting-enzyme-Familie aktiviert werden, die eine Apoptose induzieren (Barroso et al., 1997).

6.3 Diskussion der Methoden

In dieser Arbeit wurden insgesamt vier Methoden der Charakterisierung des neuronalen Zelltods verwendet: die Trypanblau-Farbstoffausschlussmethode, die TUNEL-Färbung, die Färbung der nukleären DNA mit Hoechst-33258 und die Darstellung der fragmentierten DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung.

6.3.1 Trypanblau-Färbung

Trypanblau kann als saurer Farbstoff die Zellmembran intakter Zellen nicht penetrieren: vitale Zellen bleiben daher farblos. Bei geschädigten Zellen ist die Zellmembran jedoch permeabel für den Farbstoff und die Zellkörper färben sich blau an (Paul, 1975). Dieser Effekt detektiert sowohl Membranschäden, die bei der Nekrose als auch als Sekundäreffekt bei der Apoptose vorkommen. Da man deswegen allein mit der Farbausschlussmethode nicht zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod unterscheiden kann, wurde diese Methode für ein erstes screening gewählt.

6.3.2 TUNEL-Färbung

Während der Apoptose wird die DNA durch Endonucleasen, die typischerweise bei der Apoptose auftreten, gespalten. Dabei entstehen 180 bp große Fragmenten mit 3'-OH-Enden und ihre Vielfachen davon (Arends und Wyllie, 1991). Diese 3'-OH-Enden von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA werden durch die TUNEL-Färbung sichtbar gemacht. Brüche der DNA kommen nicht nur während der Apoptose vor, sondern auch während der Replikation, Rekombination, Mitose oder in der späten Phase der Nekrose (Charriat-Marlangue und Ben-Ari, 1995; Labat-Moleur et al., 1998), weshalb diese Methode nicht uneingeschränkt als apoptose-spezifisch bezeichnet werden kann. In dieser Arbeit wurden die Zellen durch Serumentzug und durch Staurosporin geschädigt. Serumentzug bewirkt eine Mischung aus Nekrose und Apoptose, so daß eine Überprüfung durch spezifischere Methoden angezeigt war. Staurosporin bewirkt eine

reine Apoptose (Koh et al., 1995), so daß man davon ausgehen kann, daß die durch TUNEL gefärbten Zellen tatsächlich apoptotisch sind.

6.3.3 Kernfärbung mit Hoechst- 33258

Apoptotische Zellen zeigen morphologische Veränderungen des Zellkerns: er schrumpft, das Heterochromatin kondensiert und fragmentiert, bis letztendlich der ganze Kern fragmentiert ist und daraus die sogenannten apoptotischen Körperchen entstanden sind (Wyllie et al., 1980). Diese morphologischen Veränderungen werden durch den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst-33258, der vor allem die AT-Basenpaare der DNA bindet, sichtbar und sind deutlich von normalen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden (Gschwind und Huber, 1997). Diese Methode gilt als zuverlässig. Fluoreszenzmikroskopie ist außerdem technisch einfach zu handhaben, gibt schnelle Informationen über die Art des Zelltodes und es ist möglich, der Kinetik von Apoptose oder Nekrose zu folgen (Lizard et al., 1995).

6.3.4 Nachweis der DNA – Fragmentierung mittels Gelelektrophorese

Wie bereits beschrieben, wird die DNA während der Apoptose durch Endonucleasen in Fragmente von ca. 180 Basenpaaren und ihre Vielfachen gespalten. Diese Fragmentierung läßt sich in der Gelelektrophorese als für die Apoptose charakteristische Leiter darstellen (Ioannou und Chen, 1996). In dieser Arbeit führte diese Methode nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Es ist bekannt, daß in einigen Fällen die konventionelle Färbung mit Ethidiumbromid nicht sensitiv genug ist, um eine klassische DNA-Leiter zu erhalten und sichtbar zu machen. Der „smear“ der nekrotischen Zellen oder ungespaltene DNA kann die Leiter der apoptotischen Fragmente verdecken. Auch ein Mangel an DNA – Fragmenten insgesamt kann zu einem negativen Ergebnis führen (Eldadah et al., 1996). Die Fragmentierung scheint darüber hinaus in vielen Experimenten ein sehr frühes Ereignis der Apoptose zu sein, das nur dann erfaßt werden kann. Einige Studien zeigten außerdem, daß nicht alle Zellarten eine exzessive DNA Fragmentierung während der Apoptose durchlaufen (Ioannou und Chen, 1996).

In dieser Arbeit wurden bei jedem Modell alle beschriebenen Apoptosenachweise geführt. Dadurch wurde es möglich, die Ergebnisse abzusichern und insgesamt eine

höhere Spezifität zu erlangen. Da in der Regel 24 Stunden nach Induktion der Apoptose durch Serumentzug oder Staurosporinbehandlung die Ergebnisse ausgezählt wurden, sind die frühen Stadien der Apoptose nicht erfaßt worden.

6.4 Diskussion der Effekte von Ginkgo biloba und seinen Inhaltsstoffen auf eine neuronale Apoptose

Verschiedene in vitro und in vivo Experimente konnten die neuroprotektive Wirkung des Gesamtextraktes und seiner Inhaltsstoffe demonstrieren:

Als einer der Ersten konnten Karcher et al. (1984) und Oberpichler et al. (1988) an Ratten zeigen, daß sich die Überlebenszeit der Tiere durch eine Behandlung mit EGb unter einer Hypoxie verlängerte. In späteren Arbeiten konnte die nicht-flavonoide Fraktion des Gesamtextraktes für die Neuroprotektion verantwortlich gemacht werden (Kleijnen and Knipschild, 1992). Ginkgolid A und B hatten einen protektiven Effekt bei globaler Ischämie des Rattenhirns. In neuronalen Primärkulturen von telenzephalischen Hühnerembryonen zeigten sie ebenfalls einen protektiven Effekt bei Schädigung durch Glutamat und bei fokaler Ischämie am Gehirn der Maus. Auch Bilobalid kann Neuronen gegen ischämische Schädigung schützen (Prehn und Krieglstein, 1993; Krieglstein et al., 1995). Der Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von EGb ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde gezeigt, daß EGb in vivo die zerebrale Durchblutung sowohl unter normalen, als auch unter ischämischen Bedingungen steigert, vermutlich durch eine erhöhte Sympathikusaktivierung und Venendilatation (Krieglstein et al., 1995). Es werden Effekte auf Neurotransmittersysteme, wie z. B. das serotoninerge und adrenerge System beschrieben (Petkov et al., 1993). Des weiteren kann EGb unter hypoxischen Bedingungen den zerebralen Lactatanstieg und einen Verlust von Energie in Form von ATP und Glucose- verhindern (Ahlemeyer und Krieglstein, 1998; Le Poncin- Lafitte, 1980).

Diese Studien unterschieden jedoch nicht zwischen einem nekrotischen und apoptotischen Zelltod, so daß ungeklärt blieb, ob EGb und seine Inhaltsstoffe eine neuronale Apoptose verzögern oder sogar verhindern können.

6.4.1 Hemmung einer neuronalen Apoptose durch EGb

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß sowohl eine durch Staurosporin, als auch eine durch Serumentzug induzierte Apoptose in neuronalen Primärkulturen von telenzephalischen Hühnerembryonen durch die Zugabe von Gesamtextrakt vermindert werden kann. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Didier et al., 1996, überein. Diese Autoren beschrieben einen anti-apoptotischen Effekt bei Durchtrennung von Riechnerven der Ratten, wenn diese mit 100mg/kg EGb vorbehandelt wurden. Die Hemmung der Apoptose wurde durch Messen der Neuritendicke und durch den Nachweis der DNA-Fragmentierung gezeigt. Es wurde vermutet, daß die antioxidative Eigenschaft des Gesamtextrakts für den Effekt verantwortlich sei.

In dieser Arbeit wurde *in vitro* an Primärkulturen von telenzephalischen Hühnerembryonen eine neuronale Apoptose durch Serumentzug oder Zugabe von Staurosporin induziert. Wie bereits beschrieben, führen beide Behandlungen zu einer Produktionssteigerung von reaktiven Sauerstoffverbindungen, also oxidativem Streß, einem Effekt, der durch Antioxidantien geblockt werden kann (Ahlemeyer and Krieglstein, 2000). Reaktive Sauerstoffverbindungen spielen eine dominante Rolle in der neuronalen Apoptose (Barroso et al., 1997): sie agieren vermutlich „upstream“ der Caspasen als „second messengers“ in den komplexen Signal-Transduktionswegen der Apoptose. Auch endogene antioxidative Systeme wie das Protoonkogen bcl-2 (Hockenberry et al., 1993) oder die Superoxiddismutase (Greenlund et al., 1995) können bei Überexpression einer Apoptose vorbeugen.

Die Ursache für den anti-apoptotischen Effekt des EGb könnte in seinen antioxidativen Eigenschaften begründet sein (Bastianetto et al., 2000; Calapai et al., 2000). Der Gesamtextrakt kann Superoxid-Anionen, Hydroxyl- und Peroxyl-Radikale abfangen (*siehe oben*).

Freie Radikale wie $\text{OH}_2\cdot$, $\text{OH}\cdot$ oder $\text{ROO}\cdot$ spielen als oxidativer Streß eine große Rolle bei Alterungsprozessen und Gewebeschäden. Besonders die Hydroxyl-Radikale gelten als verantwortlich für die peroxidative Degradation, die mit der strukturellen Desorganisation von Membranen verbunden ist (Wei et al., 2000). EGb wirkt durch seine Eigenschaft als Radikalfänger membranstabilisierend (Droy-Lefaix, 1997). Prozesse „downstream“ des antioxidativen Effekts von EGb schützen die Zellen vor

einer Apoptose. Eine Minderung der Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen hat eine Reduktion der Bildung von Lipidperoxiden und der Membranviskosität, sowie eine erhöhte Membranfluidität zur Folge (Heron et al., 1980). Während der Exekutionsphase der Apoptose ändert sich die Verteilung der Membranlipide – Phosphatidylserin wechselt von der inneren zur äußeren Seite der Zellmembran. Dieser Vorgang ist ein Erkennungssignal für Phagozyten (Reutlingsperger und van Heerde, 1997) und wird durch EGb verhindert. Eine vermehrte ROS-Bildung ist häufig die Folge einer mitochondrialen Dysfunktion. Die ROS können dann wiederum die Mitochondrienfunktion stören. Die mitochondriale Dysfunktion ist ein Schlüsselereignis der neuronalen Apoptose und wird durch EGb vermindert, indem unter anderem die Oxidation von Glutathion verhindert wird (Sastre et al., 1998).

6.4.2 Hemmung einer neuronalen Apoptose durch die Effekte der Inhaltsstoffe des Gesamtextraktes EGb

Die neuroprotektiven Effekte des Gesamtextraktes EGb werden bestimmten Inhaltsstoffen zugeschrieben.

Flavonoide, die 24% des Gesamtextraktes ausmachen, haben antioxidative Eigenschaften, indem sie Superoxid-Anionen (Robak und Gryglewski, 1988) und Hydroxyl-Radikale abfangen und die Lipidperoxidation verhindern (Droy-Lefaix, 1997; Sastre et al., 1998). Der Gesamtextrakt besteht zu 6% aus Terpenlactonen. Zu ihnen gehören die in dieser Arbeit untersuchten Ginkgolide A, B und J, sowie Bilobalid. Es konnte gezeigt werden, daß Ginkgolid B und J und Bilobalid anti-apoptotische Effekte haben, nicht aber Ginkgolid A. Jedoch scheint die Fähigkeit der Substanzen, eine Apoptose zu verhindern, von diversen Faktoren abhängig zu sein: Bilobalid zeigte in beiden verwendeten Zellkultur- und Apoptosemodellen protektive Effekte. Ginkgolid J dahingegen war wirksam bei den Neuronenkulturen des Telenzephalons von Hühnerembryonen, nicht aber bei den Mischkulturen des Hippocampus neugeborener Ratten. Eine Behandlung mit Ginkgolid B konnte in kultivierten Hühnerneuronen nach Induktion der Apoptose durch Staurosporin und Serumentzug die Zahl der apoptotischen Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen vermindern, in hippocampalen Mischkulturen zeigte Ginkgolid B nur nach der Behandlung mit Staurosporin protektive Effekte, während keine Verminderung des apoptotischen Zelltodes im Serumentzugsmodell zu finden war. Die Diskrepanz der protektiven

Effekte des Gesamtextraktes und seinen Inhaltsstoffen in verschiedenen in vivo und in vitro Modellen ist auch von Krieglstein et al. (1995) beobachtet worden.

6.4.2.1 Mögliche Mechanismen der anti-apoptischen Effekte von Ginkgolid A, B, J und Bilobalid

Ginkgolid A:

Ginkgolid A zeigte, wie bereits beschrieben, in den Modellen dieser Arbeit keinen anti-apoptischen Effekt. Scholtyssek et al. (1997) haben spektroskopisch die Reaktion der Ginkgolide A, B, C, J und M mit Superoxidradikalanion und Hydroperoxyradikale bestimmt und konnten zeigen, daß Ginkgolid B,C und J, aber nicht Ginkgolid A, Radikalfängereigenschaften besitzen.

Ginkgolid B und J:

Das Alkylphospholipid platelet-activating factor (PAF) ist ein neurochemischer Mediator, der unter hypoxischen Bedingungen im Gehirn ansteigt, sich an Rezeptoren bindet und so einen intrazellulären Calciumanstieg zur Folge hat (Braquet et al., 1991). Ginkgolid B kann als PAF-Rezeptor-Antagonist neuronale Schäden, die in vivo durch eine Hypoxie oder in vitro durch Gabe von Glutamat (Prenn und Krieglstein, 1993) entstehen, mindern. Vermutlich wird dabei der Calciumeinstrom in die Zelle reduziert (MacLennan et al., 1996).

Rapin und seine Mitarbeiter induzierten 1998 durch 2,2'-azobis 2 Amidinopropan (AAHP), einem Erzeuger von Peroxyl-Radikalen, eine Apoptose an hippocampalen Neuronenkulturen der Ratte. Durch Zugabe von 0.2-0.4 µg/ml Ginkgolid B reduzierte sich die Anzahl apoptotischer Zellen. Diese Ergebnisse bestätigten sich bei in vivo Versuchen an Ratten und wurden auf die antilipoperoxidativen Eigenschaften von Ginkgolid B zurückgeführt.

Ginkgolid B kann nicht nur Peroxyl-Radikale fangen, sondern reagiert- ebenso wie das im Gesamtextrakt in geringer Konzentration vorkommende Ginkgolid J- ebenfalls mit Superoxidradikalanionen und Hydroperoxidradikalen. Scholtyssek und Mitarbeiter (1997) formulierten die Hypothese, daß die Geschwindigkeit der Reaktion der Ginkgolide mit Superoxidanionen und Hydroperoxid-Radikalen von der Anzahl der Hydroxyl-Gruppen pro Molekül abhänge. Ginkgolid B und J besitzen drei, Ginkgolid A,

das nicht reagiert, nur zwei Hydroxyl-Gruppen. Die Unfähigkeit von Ginkgolid A mit Superoxiden zu reagieren, untermauert die These, daß der Abbau der Superoxide in der Gegenwart von Ginkgoliden nicht nur von der Protonierung der Superoxide durch die Hydroxylgruppen der Ginkgolide und nachfolgender Dismutation abhängig ist. Allerdings läßt sich kein Mechanismus festlegen und es bleibt ebenfalls offen, ob der protektive Effekt der Ginkgolide B und J auf ihren PAF-Antagonismus, die Radikalfängereigenschaften oder beides zurückzuführen ist (Scholtyssek et al., 1997)

Bilobalid:

In vivo Untersuchungen über Bilobalid ergaben, daß dieses Terpenlacton neuroprotektiv ist. Zwar wirkte es nicht wie die Ginkgolide als PAF-Rezeptor-Antagonist, zeigte aber anti-ödematöse Effekte in Modellen mit fokaler Ischämie. Kriegelstein und Mitarbeiter (1995) schlugen nach in vitro Experimenten an kultivierten Hühnerneuronen - und Mischkulturen vor, daß Bilobalid außerdem direkt an Neuronen wirkt.

Wie die Ginkgolide B, C, J und M ist Bilobalid fähig, mit Superoxiden, sowie seiner protonierten Form, dem Hydroperoxyl-Radikal, zu reagieren. Es kann also als Antioxidanz in hydrophoben Regionen wie Membranen wirken. Diese antioxidative Wirkung sei aber schwächer ausgeprägt als bei den genannten Ginkgoliden (Scholtyssek et al., 1997). Auch Zou et al. (2000) konnten zeigen, daß Bilobalid Neurone vor oxidativem Streß schützt: Offensichtlich blockt Bilobalid die durch reaktive Sauerstoffverbindungen induzierte Apoptose in einer frühen Phase, was zur Folge hat, daß für die Apoptose typisch auftretenden Regulator- und Effektorproteine wie bax und die Caspase-3 bei mit Bilobalid und reaktiven Sauerstoffverbindungen gleichzeitig behandelten PC12 Zellen nur in geringem Maße nachgewiesen wurden.

Im Gegensatz dazu zeigten Rapin et al. (1998) in hippocampalen Mischkulturen von Ratten, daß Bilobalid kein effizienter Fänger der Peroxyl-Radikale ist.

Durch eine Hypoxie des Gehirns kommt es zu nekrotischen und apoptotischen Zelltod. Es finden sich ein zellulärer Energieabfall und eine Depolarisation, die mit einem intrazellulären Calciumanstieg verbunden ist. Dadurch werden Phospholipasen aktiviert, unter anderen die Calcium-abhängige Phospholipase A_2 (PLA₂), die ein wichtiger posthypoxischer Mediator ist. Wird PLA₂ durch Hypoxie aktiviert, werden nachfolgend auch vermehrt freie Fettsäuren und Cholin, ein Hydrolyseprodukt von Phosphatidylcholin gefunden.

Bilobalid verhindert die gesteigerte Freisetzung von Cholin und posthypoxische Schäden werden gemindert. Die genaue Wirkungsweise von Bilobalid ist nicht bekannt. Es wird vermutet, daß Energiespeicher bewahrt werden, der Calciueinstrom geblockt oder PLA₂ direkt inhibiert wird (Klein et al., 1997).

Studien berichteten, daß eine gesteigerte Erregbarkeit von hippocampalen pyramidalen Neuronen mit verbessertem Lernen und erhöhter Gedächtnisleistung korreliert. Sasaki und Mitarbeiter (1999) schlossen aus ihren in vitro Untersuchungen an hippocampalem Rattengewebe, daß Bilobalid die Erregbarkeit von pyramidalen CA1- Neuronen steigert und zumindest teilweise eine GABAerge Inhibition reduziert (Sasaki et al., 1999)

6.5 Klinische Studien:

Inzwischen gibt es fast 50 klinische Studien, die die neuroprotektive Wirksamkeit des Gesamtextrakts untersucht haben, jedoch nur zwei von ihnen entsprechen den neuen methodischen Anforderungen des Beratungsausschusses A und B3 der Deutschen Gesundheitsbehörde. Das bedeutet, daß in die Studie nur leichte und mittelschwere Fälle von Demenz aufgenommen werden durften und die Effekte mußten auf der psychometrischen, psychopathologischen und der psychosozialen Ebene statistisch signifikant sein.

Für diese Arbeit von Bedeutung ist die Studie, die Kanowsky et al. 1996 in Pharmacopsychiatry veröffentlichten: 216 Patienten mit Alzheimer-Demenz erhielten über 24 Wochen 240 mg EGb bzw. ein Placebo per os. Die multi-zentrische Studie war prospektiv, randomisiert und doppelt-blind angelegt. Zur Beurteilung der Aufmerksamkeit und der Gedächtnisleistung wurde der Syndrom-Kurztest benutzt; psychosoziale (Inter-)Aktionen im Alltag wurden mit Hilfe der Nürnberger-Beobachtungsskala eingeschätzt und die psychische Entwicklung durch globale klinische Eindrücke bewertet. Die Effektivität des Gesamtextrakts zur Behandlung von Patienten, die an Alzheimer-Demenz leiden, wurde als gegeben betrachtet.

7 Zusammenfassung

Schon vor Jahrtausenden wurde Ginkgo biloba eine heilende Wirkung zugeschrieben. Seit den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts, nachdem der Extrakt des Ginkgo biloba und seine Inhaltsstoffe isoliert worden waren, erfolgten zahlreiche Studien und Experimente, die zeigen konnten, daß Ginkgo biloba unter anderem eine neuroprotektive Wirkung besitzt.

Neuroprotektiven Stoffen wird ein immer größeres Interesse entgegengebracht, denn bedingt durch die demographische Entwicklung zeigt sich eine Zunahme von Hirnleistungsstörungen, z. B. des Morbus Alzheimer.

Als eine der grundlegenden Mechanismen dieser Erkrankung wird die Apoptose diskutiert. Apoptose, der programmierte Zelltod, wurde erstmalig 1972 von Kerr, Wyllie und Curie beschrieben, und ist im Gegensatz zur Nekrose ein zunächst physiologischer Prozess, zu dem alle Zellen befähigt sind, um alte und kranke Zellen zu eliminieren. Eine überschießende Apoptose führt jedoch zu Erkrankungen wie dem M. Alzheimer.

Die bereits vorliegenden Studien über den Extrakt von Ginkgo biloba und seine Inhaltsstoffe demonstrierten zwar seine neuroprotektive Wirkung, zeigten jedoch nicht, ob Ginkgo biloba und seine Inhaltsstoffe Ginkgolid A, B, J und Bilobalid in der Lage sind, den programmierten Zelltod in Neuronen zu verzögern oder sogar zu verhindern. Das nachzuweisen, war Ziel der vorliegenden Arbeit.

Dazu wurden in vitro Untersuchungen an 5 Tage alten telencephalischen Neuronenkulturen vom Hühnerembryo und an Mischkulturen von Neuronen und Astrocyten neugeborener, hippocampaler Rattenhirne durchgeführt.

Die neuronale Apoptose wurde durch Entzug von Serum bzw. durch eine Behandlung mit Staurosporin- induziert.

Als erste screening – Methode wurde die Vitalitätsmessung mit Trypanblau durchgeführt, zur Spezifizierung der Ergebnisse erfolgten Nachweise mit der Hoechst- und TUNEL- Färbung, sowie dem DNA – laddering in der Gelelektrophorese.

Der Gesamtextrakt erwies sich in beiden in dieser Arbeit untersuchten Versuchs- und Tiermodellen als protektiv. Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls für Ginkgolid B und Bilobalid. Ginkgolid J erwies sich an telenzephalischen Neuronen von Hühnerembryonen als neuroprotektiv. Ginkgolid A zeigte in keinem Versuch eine Minderung der apoptotischen Neurone.

Zusammenfassend zeigten der Gesamtextrakt von Ginkgo biloba und einige seiner Inhaltsstoffe in unseren Experimenten anti-apoptotische Eigenschaften - bei Bilobalid war diese Eigenschaft am stärksten ausgeprägt. Als Mechanismus des anti-apoptotischen Effekts des Gesamtextrakts und seiner Inhaltsstoffe werden eine Hemmung der mitochondrialen Dysfunktion und reaktiver Sauerstoffverbindungen diskutiert. Ob diese Mechanismen auch in unseren Experimenten für die beobachteten protektive Wirkungen verantwortlich sind, muß durch weitere Studien geklärt werden.

Zum jetzigen Standpunkt der Forschung kann keine Aussage über die humanmedizinische Relevanz der Ergebnisse gemacht werden. Diese lassen jedoch hoffen, daß Ginkgo biloba-Präparate, die bereits als Antidementiva eingesetzt werden und die eine gute Verträglichkeit aufweisen, in Zukunft gezielt bei bestimmten Hirnleistungsstörungen des Menschen als Therapieansatz berücksichtigt werden könnten.

8 Literaturverzeichnis

Adams, J. M., Cory, S. (1998)

The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival
Science 28. August 1998, Vol 281

Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. (2000)

Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine-induced oxidative stress and apoptosis
Neurochemistry International 36 (2000) 1- 5

Ahlemeyer, B., Krieglstein, J.

Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract

In: L. D. Lawsen, R. Bauer (Eds.)

Phytomedicine of Europe: Chemistry and Biological activity.

ACS Symposium Series 691, American Chemical Society,

Washington DC, pp. 210-220 (1999)

Ahlemeyer, B., Bauerbach E., Plath, M., Steuber, M., Heers, C., Tegtmeier, F., Krieglstein, J.

Retinoic acid reduces apoptosis and oxidative stress by preservation of SOD protein level

Free Rad. Biol. Med. 30 (2001) 1067-1077.

Alnemrie, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W. et al. (1996)

Human ICE/CED 3 Protease nomenclature

Cell 1996; 87: 171

Arends, M. J., Wyllie, A. H. (1991)

Apoptosis: mechanisms and roles in pathology.

Int. Rev. Exp. Pathol. 32: 223- 254

- Atabay, A., Cagnoli, C. M., Kharlamov, E., Ikonovic, M. D., Manev, H. (1996)
Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists
Journal of Neuroscience Research 43: 465- 475 (1996)
- Barroso, M. P., Gomez-Diaz, C., Villalba, J., Buron, M., Lopez-Lluch, G., Navas, P. (1997)
Plasma membrane ubiquinone controls ceramide production and prevents cell death induced by serum withdrawal
Journal of Bioenergetics and Biomembranes, Vol. 29, No. 3, 1997
- Bastianetto, S., Zeng, W., Quirion, R. (2000)
The Ginkgo biloba extract (EGB 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity
Journal of Neurochemistry, Vol 74, No 6, 2000, 2268-2277
- Behl, C., Davis, J. B., Klier, F. G., Schubert, D. (1994)
Amyloid β peptide induces necrosis rather than apoptosis.
Brain research 645: 235- 264
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R., Schubert, D. (1994)
Hydrogen peroxidase mediates β -amyloid protein toxicity
Cell 1994 June 17; 77 (6): 817-27
- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., Pommier, Y. (1994)
Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine
Exp Cell Res 1994 April; 211 (2) : 314-321
- Braquet, P., Esanu, A., Buisine, E., Hosford, D., Broquet, C., Koltai, M. (1991)
Recent progress in ginkgolide research
Med. Res. Rev., 11: 295-355

Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D., Green, D. R. (1998)

Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization
The EMBO Journal Vol. 17 No. 1 pp. 37-49, 1998

Calapai, G., Crupi, A., Firenzuoli, F., Marciano, M. C., Squadrito, F., Inferrera, G., Parisi, A., Rizzo, A., Crisafulli, C., Fiore, A., Caputi, A. P.

Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis

Life Science 2000 Oct 20, 67(22):2673-83

Chan, S., Tammariello, S. P., Estus, S., Mattson, M. P.

Prostate apoptosis response-4 mediates trophic factor withdrawal-induced apoptosis of hippocampal neurons: actions prior to mitochondrial dysfunction and caspase activation
J Neurochemistry 1999 Aug; 73 (2) : 502- 512

Charriaut- Marlangue, C., Ben- Ari, Y. (1995)

A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis
NeuroReport 7, 61- 64 (1995)

Cremer, T. (1985)

Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie

Springer Verlag, 1985, 1. Auflage, Kap. 2.7, S. 122-138

Didier, A., Rouillier, D., Coronas, V., Jourdan, F., Droy- Lefaix, M. T.

Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on apoptosis and regeneration of primary neurons following target ,lesioning‘ in rats

In: Christen, Y., Droy- Lefaix, M. T., Macias- Nunez, J. F. (Eds.)

Advances in Ginkgo biloba Extract Research, vol 5.

Effeccts of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on neuronal plasticity
Elsevier, Paris, pp. 45- 52

Dotti, C. G., Sullivan, C. A., Banker, G. A. (1988)

The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture

J Neuroscience 13: 623-631

Droy- Lefaix, M. T. (1997)

Effect of the antioxidant action of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on aging and oxidative stress

Age, Vol. 20, 141- 149, 1997

Duke, R., Ojcius, D., Young, J. (1997)

Die Apoptose; Regeln und Fehler beim Zellselbstmord

Spektrum der Wissenschaft, 12 Februar 1997

Eldadah, B., Yakovlev, A., Faden, A. (1996)

A new approach for the electrophoretic detection of apoptosis

Nucleic Acids Research, 1996, Vol. 24, No. 20; 4092- 4093

Falcieri, E., Martelli, A. M., Bareggi, R., Cataldi, A., Cocco, L. (1993)

The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation

Biochem Biophys Res Commun 1993 May 28; 193 (1) : 19-25

De Feudis, F. v. (1991)

Pharmacological effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761)

Elsevier, Paris 1991

Foster, S. (1996)

Ginkgo biloba-a living fossil for todays health need.

Better Nutrition. April 1996

Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben- Sasson, S. A. (1992)

Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.

J. Cell Biol. 119: 493- 501

Goethe, J. W. v. (1815)

Buch der Suleika; West-Östlicher Divan

Manesse-Verlag, Stuttgart

Gong, J., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. (1994)

A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry

Analytic Biochemistry 218, 314-319 (1994)

Green, D. R., Reed, J. C. (1998)

Mitochondria and Apoptosis

Science 28 August 1998, Vol 281

Greenlund, L. J. S., Deckwerth, T. L., Johnson, E. M. (1995)

Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in neuronal programmed cell death.

Neuron 14, 303- 315

Gschwind, M., Huber, G. (1997)

Detection of apoptotic or necrotic death in neuronal cells by morphological, biochemical and molecular analysis

Neuromethods, Vol. 29: Apoptosis techniques and protocols; Ed: J. Poirier;

Humana Press Inc. 1997

Guo, K. Q., Mattson, M. P. (1998)

Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells

J Neuroscience Res 1998 Feb 1; 51 (3) : 293-308

Herdegen, T., Tölle, T., Bähr, M. (Hrsg.)

Klinische Neurobiologie

Molekulare Pathogenese und Therapie von neurobiologischen Erkrankungen

Spektrum Verlag, 1997, Auflage 1, Kap. 8, S. 221-228

Heron, D. S., Schinitzky, M., Hershkowitz, M., Samuel, D. (1980)

Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7463- 7467

Hockenberry, D. M., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D., Korsmeyer, S. J. (1993)

Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death
Nature 348, 334- 336 (1993)

Hockenberry, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X.-M., Millman, C., Korsmeyer, S. J. (1993)

Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis
Cell 75, 241- 251

Intersan-Institut für Pharmazeutische u. Klinische Forschung GMBH

Ginkgo biloba-Abenteuer eines Baumes

Ioannou, Y., Chen, F. (1996)

Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis
Nucleic Acids Research, 1996, Vol. 24, No. 5; 992- 993

Isahara, K., Ohsawa, Y., Kanamori, S., Shibata, M., Waguri, S., Sato, N., Gotow, T.,
Watanabe, T., Momoi, T., Urase, K., Kominami, E., Uchiyama, Y.

Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine
proteinases

Neuroscience 1999; 91 (1) : 233-49

Kanowsky, S., Herrmann, W. M., Stephan, K., Wierich, W., Hörr, R.

Proof of efficacy of the Ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering
from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-
infarkt dementia

Pharmacopsychiat. 29 (1996) 47-56

Karcher, L., Zagermann, P., Krieglstein, J. (1984)

Effect of an extract of Ginkgo biloba on rat brain energy metabolism in hypoxia
Naunyn- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 327 (1984), 31- 35

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics

British journal of cancer 1972; 26: 239-57

Kim, T. W., Pettingell, W. H., Jung, Y. K., Kovacs, D. M., Tanzi, R. E. (1997)

Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease

Science. 1997 Jul 18; 277 (5324): 373-6

Kleijnen, J., Knipschild, P. (1992)

Ginkgo biloba

Lancet 340, 1136-1139, 1992

Klein, J., Chatterjee, S., Löffelholz, K. (1997)

Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba

Brain Research 755 (1997) 347- 350

Koh, J. Y., Wie, M. B., Gwag, B. J., Sensi, S. L., Canzoniero, L. M., Demaro, J., Csernansky, C., Choi, D. W. (1995)

Staurosporine-induced neuronal apoptosis

Exp Neurol 1995 Oct; 135 (2) : 153-159

Kriegelstein, J., Ausmeier, F., El-Abhar, H., Lippert, K., Welsch, M., Rupalla, K., Henrich- Noack, P. (1995)

Neuroprotective effects of Ginkgo biloba constituents

European Journal of Pharmaceutical Sciences 3 (1995) 39- 48

Kroemer, Guido (1997)

Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution

Cell Death and Differentiation 4

Krohn, A. J., Preis, E., Prehn, J. (1998)

Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector

J Neuroscience, October 15, 1998, 18(20):8186-8197

Labat- Moleur, F., Guillermet, C., Lorimier, P., Robert, C., Lantuejoul, S., Brambilla, E., Neguescu, A. (1998)

TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement

J Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 46 (3); 327- 334, 1998

LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., Bergeron, C., Hammond, J.

Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease

J Biol. Chem.1999 Aug 13; 274 (33) : 23426- 36

Lieberthal, W., Triaca, V., Koh, J., Pagano, P., Levine, J. (1998)

Role of superoxide in apoptosis induced by growth factor withdrawal

Am. J. Physiol. 275 (Renal Physiol. 44): F 691-F 702, 1998

Liu, X., Zhu, X.

Roles of p53, ϵ Myc, bax and caspases in serum deprivation- induced neuronal apoptosis: a possible neuroprotective mechanism of basic fibroblast growth factor

Neuroreport 1999 Sep 29; 10 (14) : 3087-91

Lizard, G., Fournel, S., Genestier, L., Dhedin, N., Chaput, C., Flacher, M., Mutin, M., Panaye, G., Revillard, J.-P. (1995)

Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis.

Cytometry 21: 275- 283 (1995)

Loo, D. T., Copani, A., Pike, L. J., Whittmore, E. R., Walencewicz, A. J., Cotman, C. W. (1993)

Apoptosis is induced by β -amyloid in cultured central nervous system neurons
Proc-Natl-Acad-sci-U-S-A-1993 sep 1; 90 (17): 7951-5

Maclenan, K., Smith, P., Darlington, C. (1996)

The effects of ginkgolide B (BN 52021) on guinea pig vestibular neurons in vitro: importance of controlling for effects of dimethylsulphoxide (DMSO) vehicles
Neuroscience Research 26 (1996), 395- 399

Mak et al. (1998)

FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis
Science, 20 März 1998; 279/5358: 1954-8

Mazarakis, N., Edwards, D., Mehmet, N.

Apoptosis in neural development and disease
reprinted from Fetal and Neonatal, März 1995, Vol. 77, No. 3, p F 165-F 170

Müller, U. (1995)

Antioxidantien als Neuroprotektiva: in vitro- und in vivo-Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung der α -Liponsäure
Dissertation im Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg, S.113, 1995

Oberpichler-Schwenk, H., Krieglstein, J. (1992)

Pharmakologische Wirkungen von Ginkgo biloba-Extrakt und –Inhaltsstoffen
Pharmazie in unserer Zeit/21. Jahrgang 1992

Oberpichler, H., Beck, T., Abdel- Rahman, M., Bielenberg, G. W., Krieglstein, J. (1988)

Effects of Ginkgo biloba constituents related to protection against brain damage caused by hypoxia.
Pharmacol. Res. Commun. 20 (1988), 349-368

Orrenius, S., Burgess, D., Hampton, M., Zhivotovski, B. (1997)

Mitochondria as the focus of apoptosis research

Cell Death and Differentiation 4

Paul, J. (1975)

Cell and Tissue Culture. 5th ed. Edinburgh: Curchill Livingstone; 368

Pellegrini, L., Passer, B. J., Tabaton, M., Ganjei, J. K., D'Adamio, L. (1999)

Alternative, non-secretase processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein during apoptosis by caspase-6 and -8

Biol. Chem. 1999 Jul 23; 274(30): 21011-6

Petito, C. K., Feldmann, E., Pulsinelli, W. A., Plum, F. (1987)

Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest

Neurology 37: 1281-1286

Petkov, V. D., Hadjiivanova, C., Petkov, V. V., Milanov, S., Visheva, N., Boyadjieva, N.

Phyto. Res. 1993, 7, 139- 145

Pettmann, B., Louis, J. C., Sensenbrenner, M. (1979)

Morphological and biochemical maturationsof neurons in the absences of glial cells

Nature 281: 378-380

Le Poncin-Lafitte, M., Rapin, J., Rapin, J. R. (1980)

Effects of Ginkgo biloba on changes induced by quantitative cerebral microembolization in rats

Arch. Int. Pharmacodyn. 243 (1980), 236-244

Prehn, J., Jordan, J., Ghadge, G. D., Preis, E., Galindo, M. F., Roos, R. P., Kriegelstein, J., Miller, R. J. (1997)

Calcium and reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis

J Neurochem 68: 1679-1685

Prehn, J. H., Kriegstein, J. (1993)

Platelet-activating factor antagonists reduce excitotoxic damage in cultured neurons from embryonic chick telencephalon and protect the rat hippocampus and neocortex from ischemic injury in vivo.

J. Neuroscience Res. 34, 179

Pulsinelli, W. A., Duffy, T. E. (1983)

Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia

J Neuroscience 40: 1500-1503

R&D Systems (1999)

Das Absterben Nachweisen...Apoptose

Service Informations., R&D Systems GmbH, Februar 1999

Rabin, J., Zaibi, M., Drieu, K. (1998)

In vitro and in vivo effects of an extract of Ginkgo biloba (EGb 761), Ginkgolide B and Bilobalide on apoptosis in primary cultures of rat hippocampal neurons

Drug Development Research 45: 23- 29 (1998)

Robak, J., Gryglewski, R. (1988)

Flavonoids are scavengers of superoxide anions

Biochem. Pharmacol. 1988 Mar 1; 37 (5): 837- 41

Sandstorm, P. A., Tebbey, P. W., Van Cleave, S., Buttke, T. M. (1994)

J. Biol. Chemistry 269, 798- 801

Sasaki, K., Oota, I., Wada, K., Inomata, K., Ohshika, H., Haga, M. (1999)

Effects of Ginkgo biloba leaves, on population spikes in rat hippocampal slices

Comparative Biochemistry and Physiology Part C 124 (1999) 315- 321

- Sastre, J., Millan, A., Garcia de la Asuncion, J., Pla, R., Juan, G., Pallardo, F., O'Connor, E., Martin, J., Droy- Lefaix, M. T., Vina, J. (1998)
A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress
Free Radical Biology and Medicine, Vol. 24, No. 2, pp. 298- 304, 1998
- Scholtyssek, H., Damerau, W., Wessel, R., Schimke, I. (1997)
Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment
Chemico-Biological Interacciones 106 (1997) 183- 190
- Sengpiel B, Preis E, Krieglstein, J, Prehn JHM (1998)
NMDA-induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria.
Eur. J. Neurosci. 10, 1903-1910
- Smale et al. (1995)
Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease
Exp-Neurolog, Juni 1995
- Su et al. (1994)
Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease
Neuroreport, Dezember 1994
- Thompson, C. B.
Apoptosis in the pathogenesis of disease
Science, 10. März 1995; 267/203: 1456-62
- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. (1998)
Caspases: Enemies within
Science 28 August 1998, Vol 281
- Tran, P. B., Miller, R. J. (1999)
Apoptosis: Death and Transfiguration
Science & Medicine May/June 1999

Uetsuki, T., Takemoto, K., Nishimura, I., Okamoto, M., Niinobe, M., Momoi, T., Miura, M., Yoshikawa, K. (1999)

Activation of neuronal caspase-3 by intracellular accumulation of wild-type Alzheimer amyloid precursor protein

Neuroscience 1999 Aug 15; 19(16): 6955-64

Wie, T., Ni, Y., Hou, J., Chen, C., Zhao, B., Xin, W., (2000)

Hydrogen peroxide-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: protection by ginkgo biloba extract

Pharmacological Research, Vol. 41, No. 4, 2000

Wiesner, D. A., Dawson, G. (1996)

Staurosporine induces programmed cell death in embryonic neurons and activation of the ceramide pathway

Journal of Neurochemistry, Vol. 66, No. 4, 1996

Wyllie, A. H., Kerr, J. F., Currie, A. R. (1980)

Cell death: the significance of apoptosis

Int. Rev. Cytol. 68, 251- 306

Yang et al (1997)

Prevention of apoptosis by bcl 2: release of cytochrome c from mitochondria blocked

Science, 21 Februar 1997

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., Kroemer, G. (1995)

Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death

J. Exp. Med. 182: 367-377

Zhou, L. J., Zhu, X. Z. (2000)

Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide

J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000 Jun; 293 (3): 982-8

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Publikationen:

A. Möwes, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein

„The extract of Ginkgo biloba and Ginkgolide B inhibited apoptosis in primary cultures of chick neurons“

Pharmazie 3, 28 (1998)

B. Ahlemeyer, A. Möwes, J. Krieglstein

„The inhibition of neuronal apoptosis by the extract of Ginkgo biloba and its constituents Ginkgolide B, Ginkgolide J and Bilobalide“

7th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia

B. Ahlemeyer, A. Möwes, J. Krieglstein

„Inhibition of serum deprivation- and staurosporine-induced neuronal apoptosis by Ginkgo biloba and some of its constituents“

European Journal of Pharmacology 367 (1999) 423-430

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg/Kassel:

Arnold, Aumüller, Austermann, Basler, Baum, Beato, Feuser, Gemsa, Gerdes, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Grzeschik, Happle, Hesterberg, Joseph, Kern, Klose, Koolman, Kretschmer, Lang, Lennartz, Leppek, Maisch, Müller, Pohlen, Remschmidt, Rothmund, Schachtschabel, Schüffel, Schwarz, Seifart, Seitz, Siebert, Steiniger, Villarroel, Vohland, Weitz, Werner, Westermann, Wichert

Mein Dank gilt

Herrn Professor Dr. Josef Krieglstein für die freundliche Aufnahme am Institut, Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie sein Interesse an der Arbeit.

Frau Professor Dr. Barbara Ahlemeyer für die intensive Betreuung, unermüdliche Beantwortung aller Fragen und Hilfestellung;

dem gesamten Arbeitskreis für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere Fr. Renate Hartmannsgruber, Fr. Elke Preiss und Fr. Sandra Engel für ihre Hilfe bei neuen Arbeitstechniken und am Computer;

Professor Dr. Thomas Cremer und ganz besonders Fr. Dr. Marion Cremer für zahlreiche Gespräche und die intensive Anleitung bei der DNA-Extraktion.

meinen Eltern, die mich immer – sei es beruflich oder privat - unterstützt haben.

Karsten Menzel, der mir durch seine Computerkenntnisse und die Betreuung unserer Tochter Hannah Jael die Vollendung der Arbeit möglich gemacht hat.