

**Neuroprotektion und Aktivierung von Neurotrophin-
Signaltransduktionswegen durch Hemmung von
Protein-Tyrosin-Phosphatasen und
durch NO-Donatoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Norbert Gerling

aus Holdorf

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg als
Dissertation am 04.12.2003 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein

Zweitgutachter: Prof. Dr. S. Klumpp

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2004

Die vorliegende Arbeit
entstand auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Dr. Josef Krieglstein

am Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität Marburg

**meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet**

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Josef Krieglstein danke ich recht herzlich für die wohlwollende Förderung und Unterstützung, für seine freundliche Motivation, für die zahlreichen Anregungen zur Durchführung erfolgreicher Projekte und nicht zuletzt für seine stete Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen. Insbesondere möchte ich ihm für die Bereitstellung von optimalen wissenschaftlichen Arbeitsbedingungen danken, die es mir ermöglichten, an zahlreichen internationalen Kongressen teil zu nehmen und zu publizieren.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Professor Dr. Susanne Klumpp vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität aus Münster für ihre stete Diskussionsbereitschaft, für die zahlreichen Anregungen und für das kritische Durchschauen der Manuskripte. Aufgrund ihrer Kompetenz auf dem Gebiet der Phosphatasen konnte sie mir bei zahlreichen Experimenten beratend zur Seite stehen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Carsten Culmsee für seine Einführung in das naturwissenschaftliche Arbeiten, für das kritische Durchsehen der Manuskripte, für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und für die vielen gemeinsamen Projekte. Insbesondere möchte ich ihm an dieser Stelle für seine wohlwollende Unterstützung und Motivation und die sehr angenehme Zusammenarbeit danken.

Herzlich danken möchte ich allen Freunden und Kollegen am Institut für die überaus gute Zusammenarbeit, für die fruchtbaren Diskussionen und die äußerst angenehme und freundschaftliche Atmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Sandra Engel und bei Frau Michaela Stumpf für die hervorragende Unterstützung beim Anlegen der Zellkulturen und für die ausgezeichnete technische Hilfe. Ein Dankeschön möchte ich auch an Frau Emma Esser, Frau Julia Michaelis und Frau Bärbel Wilhelm richten, die mich in vielen organisatorischen Dingen unterstützt haben.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern, insbesondere bei Herrn Professor Kazuo Umezawa von der Abteilung Angewandte Chemie, Fachbereich Naturwissenschaften und Technologie, Keio Universität, Yokohama, Japan, für die Synthese der Dephostatin-Derivate, bei Frau Bianca Rickerts und Herrn Professor Hans-Jürgen

Duchstein vom Institut für Pharmazeutische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg für die Messungen der NO-Freisetzung und bei Herrn Professor Zhong-Yin Zhang von der Abteilung Pharmakologie und Biochemie der Albert Einstein Hochschule für Medizin, New York, USA, für die Synthese der Compound 2.

Frau Marlen Krieglstein möchte ich recht herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Bundesbrüdern der K.St.V. Thuringia und bei allen Freunden bedanken, die mir durch deren unermüdliche Unterstützung und tiefe Freundschaft die Durchführung der Dissertation erleichterten.

Ganz herzlich danke ich meiner lieben Freundin Anna für ihr Verständnis und ihre Geduld. Sie hat mir in vielen Situationen immer wieder Kraft gegeben und besonders in schwierigen Zeiten war sie eine große Unterstützung für mich. Nicht zuletzt danke ich ihr für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Onkel Dr. Josef Landwehr, der während des Pharmaziestudiums und der Promotion immer ein Vorbild und eine sehr große Unterstützung für mich war.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meiner lieben Schwester Stefanie und meinen lieben Eltern bedanken. Sie haben mir durch ihre familiäre Prägung, durch ihre finanzielle Unterstützung während der Absolvierung des Pharmaziestudiums und durch das stetige Kraftgeben diese Dissertation erst ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Methoden.....	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	<i>Tiere und Tierhaltung.....</i>	20
2.1.2	<i>Pharmaka</i>	20
2.1.3	<i>Materialien für die Zellkultur.....</i>	21
2.1.3.1	Bestandteile der verwendeten Kulturmedien	21
2.1.3.2	Kulturgefäße	24
2.1.3.3	Sonstige Materialien in der Zellkultur	25
2.1.4	<i>Materialien zur Bestimmung der neuronalen Apoptose.....</i>	25
2.1.5	<i>Materialien für die Proteinbestimmung</i>	26
2.1.6	<i>Materialien für SDS-PAGE und Western Blotting</i>	26
2.1.7	<i>Materialien für die Immunzytochemie.....</i>	28
2.1.8	<i>Materialien zur Messung der Phosphataseaktivität</i>	29
2.1.9	<i>Materialien zur Messung der NO-Freisetzung.....</i>	29
2.2	Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur.....	30
2.3	Anlage und Kultivierung von Primärkulturen.....	31
2.3.1	<i>Staurosporinschädigung von hippokampalen Primärkulturen</i>	34
2.3.2	<i>NMDA-Schädigung von hippokampalen Neuronenkulturen</i>	35
2.3.3	<i>Bestimmung der neuronalen Apoptose.....</i>	36
2.4	Anlegen und Kultivierung von PC12- und PC12nr5-Zelllinien.....	38
2.5	Proteinbestimmung	39
2.5.1	<i>Proteinextraktion aus hippokampalen Primärkulturen.....</i>	39
2.5.2	<i>Proteinextraktion aus PC12 und PC12nr5-Zelllinien.....</i>	40
2.5.3	<i>Bestimmung der Proteinmenge</i>	40
2.6	SDS-PAGE und Western Blotting	41
2.6.1	<i>Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele</i>	41
2.6.2	<i>SDS-PAGE</i>	42
2.6.3	<i>Western Blotting.....</i>	43
2.6.4	<i>PTP-1B Behandlung.....</i>	45
2.7	Immunzytochemie	46
2.8	Phosphataseaktivitätsmessung.....	47

2.9	Messung der NO-Freisetzung.....	48
2.10	Herstellung der Natriumorthovanadat-Lösung	49
2.11	Statistik.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmung durch Natriumorthovanadat induziert NGF-vermittelte neuroprotektive Effekte.....	50
3.1.1	<i>Natriumorthovanadat als Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor.....</i>	50
3.1.2	<i>Erhöhung des Phosphorylierungsgrades des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA durch Natriumorthovanadat.....</i>	51
3.1.2.1	Orthovanadat erhöht den Phosphorylierungsgrad von Tyrosinresten.....	51
3.1.2.2	Orthovanadat-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in PC12-Zellen	53
3.1.2.3	Orthovanadat-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in embryonalen, hippocampalen Neuronen.....	55
3.1.2.4	Einfluss von Okadainsäure auf die TrkA-Aktivierung	57
3.1.3	<i>Natriumorthovanadat-vermittelte Neuroprotektion</i>	58
3.1.3.1	Natriumorthovanadat schützt konzentrationsabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose	58
3.1.3.2	Natriumorthovanadat schützt zeitabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose	62
3.1.4	<i>Neuroprotektion und TrkA-Aktivierung durch Orthovanadat sind unabhängig von der NGF-Bindung an den TrkA-Rezeptor.....</i>	63
3.1.5	<i>Die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt- und des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges vermittelt die neuroprotektive Wirkung von Orthovanadat.....</i>	69
3.1.5.1	Orthovanadat-vermittelte Akt-Phosphorylierung in embryonalen, hippocampalen Neuronen.....	70
3.1.5.2	Beteiligung der PI3-Kinase an Orthovanadat-vermittelten neuroprotektiven Effekten.....	71
3.1.5.3	Orthovanadat-vermittelte Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 in hippocampalen Neuronen.....	73
3.1.5.4	Beteiligung der MEK an Orthovanadat-vermittelten neuroprotektiven Effekten...	74
3.2	Die Rolle der Protein-Tyrosin-Phosphatase-1B bei der TrkA-vermittelten Neuroprotektion	76
3.2.1	<i>Einfluss von Compound 2 auf NGF-induzierte TrkA-Phosphorylierung</i>	77
3.2.2	<i>Einfluss der rekombinanten PTP-1B auf NGF-induzierte TrkA-Phosphorylierung ...</i>	80

3.2.2.1	Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die TrkA-Phosphorylierung	80
3.2.2.2	Einfluss der Inkubationszeit auf die TrkA-Phosphorylierung	82
3.2.2.3	Einfluss der PTP-1B Proteinkonzentration auf die TrkA-Phosphorylierung.....	83
3.3	Neuroprotektive Effekte durch Dephostatin-Derivate und die beteiligten Signaltransduktionswege	84
3.3.1	<i>Neuroprotektive Effekte durch Dephostatin-Derivate gegen Staurosporin-induzierte Apoptose in hippocampalen Neuronen.....</i>	<i>84</i>
3.3.1.1	Neuroprotektion durch Ethyl-3,4-dephostatin gegen Staurosporin-induzierte Apoptose	84
3.3.1.2	Neuroprotektion durch 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin gegen Staurosporin-induzierte Apoptose	87
3.3.1.3	Methoxim-3,4-dephostatin schützt nicht vor Staurosporin-induzierter Apoptose ..	88
3.3.2	<i>Dephostatin-Derivate als NO-Donatoren</i>	<i>90</i>
3.3.2.1	Ethyl-3,4-dephostatin als NO-Donator	90
3.3.2.2	4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin als NO-Donator.....	92
3.3.2.3	Methoxim-3,4-dephostatin setzt kein NO frei	93
3.3.3	<i>Erhöhung des Phosphorylierungsgrades des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA nach Behandlung mit Dephostatin-Derivaten.....</i>	<i>94</i>
3.3.3.1	Ethyl-3,4-dephostatin erhöht den Phosphorylierungsgrad von Tyrosinresten.....	94
3.3.3.2	4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin erhöht den Phosphorylierungsgrad von Tyrosinresten	96
3.3.3.3	Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen.....	97
3.3.3.4	4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen	99
3.3.4	<i>Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges vermittelt die neuroprotektive Wirkung von Ethyl-3,4-dephostatin</i>	<i>99</i>
3.3.4.1	Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte Akt-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen.....	100
3.3.4.2	Beteiligung der PI3-Kinase an Ethyl-3,4-dephostatin-induzierten neuroprotektiven Effekten.....	101
3.3.5	<i>Aktivierung des MEK/Erk1/2-Signaltransduktionsweges vermittelt die neuroprotektive Wirkung von Ethyl-3,4-dephostatin</i>	<i>103</i>
3.3.5.1	Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte Erk1- und Erk2-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen	103

3.3.5.2	Beteiligung der MEK an Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelten neuroprotektiven Effekten.....	105
3.3.6	<i>Beteiligung der löslichen Guanylatcyclase an Ethyl-3,4-dephostatin-und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelter Neuroprotektion.....</i>	<i>106</i>
3.3.6.1	Hemmung der Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelten Neuroprotektion durch ODQ	106
3.3.6.2	Hemmung der 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelten Neuroprotektion durch ODQ.....	108
3.4	Mechanismen der NO-vermittelten Neuroprotektion in hippocampalen Neuronen	109
3.4.1	<i>SNAP-vermittelte neuroprotektive Effekte.....</i>	<i>109</i>
3.4.2	<i>Erhöhung des Phosphorylierungsgrades des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA durch SNAP</i>	<i>111</i>
3.4.3	<i>Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges vermittelt die neuroprotektive Wirkung von SNAP.....</i>	<i>113</i>
3.4.3.1	SNAP-vermittelte Akt-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen.....	113
3.4.3.2	Beteiligung der PI3-Kinase an SNAP-vermittelten neuroprotektiven Effekten ...	115
3.4.4	<i>Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 vermittelt die neuroprotektive Wirkung von SNAP</i>	<i>116</i>
3.4.4.1	SNAP-vermittelte Erk1/2-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen.....	116
3.4.4.2	Beteiligung der MEK an SNAP-vermittelten neuroprotektiven Effekten	118
3.4.5	<i>Beteiligung der Guanylatcyclase an SNAP-vermittelter Neuroprotektion.....</i>	<i>120</i>
4	Diskussion.....	121
4.1	Diskussion der verwendeten neuronalen Zellkultur und des Schädigungsmodelles	121
4.2	Diskussion der Natriumorthovanadat-vermittelten neuroprotektiven Effekte und der beteiligten Signaltransduktionswege.....	122
4.2.1	<i>Natriumorthovanadat-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in Abwesenheit von NGF....</i>	<i>122</i>
4.2.2	<i>Natriumorthovanadat-vermittelte Neuroprotektion</i>	<i>125</i>
4.2.3	<i>Beteiligung des PI3-K/Akt- und des MAPK-Signaltransduktionsweges an Natriumorthovanadat-vermittelter Neuroprotektion.....</i>	<i>129</i>

4.3	Diskussion des Einflusses der PTP-1B hinsichtlich der TrkA-Dephosphorylierung	132
4.3.1	<i>Die Rolle der Compound 2 und der rekombinanten PTP-1B</i>	132
4.3.2	<i>Die Rolle der Dephostatin-Derivate</i>	135
4.4	Diskussion der Stickstoffmonoxid-vermittelten Neuroprotektion und der beteiligten Signaltransduktionswege	137
4.4.1	<i>Dephostatin-Derivate als NO-Donatoren</i>	137
4.4.2	<i>SNAP-vermittelte Neuroprotektion</i>	139
4.4.3	<i>Der Einfluss der NO-Donatoren auf die TrkA-Phosphorylierung</i>	140
4.4.4	<i>Aktivierung des PI3-K/Akt- und des MEK/MAPK-Signaltransduktionsweges durch NO-Donatoren</i>	142
4.4.5	<i>Die Rolle der löslichen Guanylatcyclase bei der NO-vermittelten Neuroprotektion</i>	145
5	Zusammenfassung	149
6	Literaturverzeichnis	155
7	Anhang	195
7.1	Abbildungsverzeichnis	195
7.2	Tabellenverzeichnis	199
7.3	Publikationen	200

Abkürzungsverzeichnis

Akt/PKB	V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1/Proteinkinase B
Apaf-1	Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor-1
Apo-1	Apoptose-induzierender Rezeptor
APP	β -Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-assoziierter Todespromotor
Bax	Bcl-assoziertes X-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-x _L	Bcl-extra long
BDNF	Brain-derived Growth Factor
bFGF	Basic Fibroblastic Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumine
Caspase	Cystein/Aspartat-spezifische Protease
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CREB	cAMP-response Element-binding Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
E18	Embryonaltag 18
ECL	Enhanced chemiluminescent
EDRF	Endothelium-derived Relaxation Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-1	Epidermal-like Growth Factor-1
EGTA	Ethylenglycol-bis(2aminoethylether)tetraessigsäure
FAK	Focal Adhesion Kinase
Gab1	Growth Factor Receptor-bound Protein 2-associated binder 1
GFAP	saures gliales fibrilläres Protein
Gsk-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase-3 β
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IAP	Inhibitor of Apoptosis

IGF	Insulin-like Growth Factor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDM-2	Murine Double Minute-2
MEK	MAPK-Kinase
MEM	Minimal Essential Medium
NBS	Neurobasal
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid, Stickoxid
NOA	Nitric Oxide Analyzer
NOS	Nitric Oxide Synthase
NP-40	Nonidet P-40
NT	Neurotrophin
ODQ	1- <i>H</i> -[1,2,4]oxadiazolo[4,3- <i>a</i>]quinoxalin-1-on
p75 ^{LNGFR}	p75 Low affinity NGF Receptor
p75 ^{NTR}	p75 Neurotrophin Receptor
PAGE	Polyacramidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PEI	Polyethylenimin
PI3-K	Phosphoinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC- γ 1	Phospholipase- γ 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
S.D.	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecylsulfate
sGC	lösliche Guanylatcyclase

SHP-1/2	Src homology-containing Protein-Tyrosin-Phosphatase-1/2
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
SNP	Sodium nitroprusside
STS	Staurosporin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TTBS	Tween-haltige Tris gepufferte Salzlösung
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,2-propandiol
Trk	Tropomyosin-related kinase
U	Einheit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VH1	Vaccinia open reading frame H1

1 Einleitung

Bedingt durch den enormen medizinischen und technischen Fortschritt der Medizin ist die durchschnittliche Lebenserwartung der Bevölkerung in den hochentwickelten Industrieländern im vergangenen Jahrhundert stetig angestiegen. Zudem trug die verbesserte medizinische Diagnostik und Therapie vor allem bei den altersbedingten Erkrankungen wie z. B. den kardiovaskulären Erkrankungen zu einer erhöhten Lebensqualität in unserer Gesellschaft bei. Mit dem zunehmenden Alter der Menschen kommt es aber auch vermehrt zu altersbedingten, **neurodegenerativen Erkrankungen**. Hierzu zählen insbesondere die chronischen neurologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson. Aber auch akute altersbedingte Erkrankungen wie der Schlaganfall treten immer häufiger auf: So zählt der Schlaganfall in den Industrienationen nach den kardiovaskulären Erkrankungen und den Krebserkrankungen zu der dritthäufigsten Todesursache (American Heart Association, 2001). Die wohl bekannteste und häufigste Form der mit Demenz einhergehenden Erkrankung ist Morbus Alzheimer. Weltweit sind 15 bis 25 Millionen und in Deutschland ca. 1 Million Patienten erkrankt. So leiden in Deutschland 5 % der über 65-jährigen und mehr als ein Drittel der über 85-jährigen an den Folgen der fortschreitenden Demenz wie Verlust des Kurzzeitgedächtnisses, Sprachstörungen, räumliche und zeitliche Desorientiertheit und Persönlichkeitsstörungen wie gesteigerte Aggressivität und Depressionen. Aufgrund der demographischen Entwicklung wird in den kommenden Jahren mit einer dramatischen Zunahme der Patienten mit Morbus Alzheimer gerechnet, so dass diese Erkrankung bald die häufigste Ursache für Pflegebedürftigkeit im Alter sein wird (Antuono und Beyer, 1999; Palmer, 2002). Die Kosten für Pflege und Behandlung der an Morbus Alzheimer erkrankten Patienten liegen für das deutsche Gesundheitssystem schon heute bei über 30 Milliarden Euro pro Jahr mit stark steigender Tendenz.

Verantwortlich für die Symptome des **Morbus Alzheimer** ist die Degeneration von kortikalen und hippokampalen Neuronen (Mattson, 2000). Ablagerungen, die sogenannten amyloiden Plaques – zuerst von Virchow im Jahre 1853 beschrieben und durch Spaltung von APP (β -Amyloid Precursor Protein) durch β - oder γ -Sekretasen entstanden (Nussbaum und Ellis, 2003) – und aus hyperphosphorylierten Tau gebildete neurofibrilläre Bündel sind die histopathologischen Kennzeichen der Alzheimer-Erkrankung (Cutler und Sramek, 2001). Anfang des 20. Jahrhunderts begann die Suche nach einer krankhaften Ursache des menschlichen Alterns durch den deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer,

der mit der Beschreibung seines ersten Falles – Auguste D. – die Forschung der nach ihm benannten Krankheit Morbus Alzheimer einleitete (Alzheimer, 1906). Auch 100 Jahre später sind die derzeitigen therapeutischen Ansätze zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung immer noch dürftig. Zwar kann der progressive Krankheitsverlauf durch die Behandlung verzögert werden, ein Aufhalten der Erkrankung oder vielmehr eine Heilung des Morbus Alzheimer liegt momentan aber leider noch in weiter Ferne.

Wenn man sich obige Fakten vor Augen hält, wird ersichtlich, wie wichtig die Erforschung der Mechanismen des neuronalen Zelltodes und den damit verbundenen neurodegenerativen Erkrankungen für die Lebensqualität des Patienten und für unser Gesundheitssystem ist. Die Forschung an den pathophysiologischen Mechanismen des neuronalen Zelltods ist daher unabdingbar für dringend benötigte neue Ansätze zur Therapie der neurodegenerativen Erkrankungen.

Der bei den chronisch neurodegenerativen Erkrankungen stattfindende neuronale Zelltod ist weitestgehend eine Mischform aus dem aktiven Selbstmordprogramm, der Apoptose, und einem durch metabolischen Kollaps ausgelösten passiven Zelltod, der Nekrose (Nicotera et al., 1999). Im Gegensatz zur Apoptose ist die **Nekrose** ein energieunabhängiger, passiver und schnell ablaufender Prozess (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997), bei dem es zu einem starken Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration mit Schädigung der Mitochondrien kommt. Das Chromatin verklumpt zu ungleichmäßig geformten Stücken (Kerr et al., 1995), und die Ribosomen können sich vom endoplasmatischen Retikulum ablösen. Die Zelle und die Zellorganellen schwellen an und werden im Laufe der Nekrose zerstört, die Plasmamembran reißt und löst sich später auf, und der Zellinhalt wird in das extrazelluläre Milieu freigegeben (Kerr et al., 1994), was eine inflammatorische Reaktion mit Ödembildung und Gewebeschädigung zur Folge hat.

Apoptose ist eine Form des Zelltodes, welche sowohl während der Entwicklung eines Organismus als auch unter pathologischen Bedingungen eine Rolle spielt und häufig in der Literatur unter dem Synonym „programmierter Zelltod“ zu finden ist (Graham und Cehn, 2001; Martin, 2001). Grund hierfür sind die vergleichbaren biochemischen Mechanismen, die bei diesen Prozessen eine Rolle spielen. Während der Entwicklung eines neuen Organismus ist der programmierte Zelltod unabdingbar bei der Bildung von Organen und Gewebe. Hierbei entscheidet ein genau festgelegter genetischer Plan, welche Zellen weiter differenzieren und welche absterben. Im post-mortem-Gewebe von Morbus Alzheimer-Patienten und in

geschädigten Gehirngewebe von experimentellen Trauma- oder Schlaganfallmodellen konnten Anzeichen von Apoptose gefunden werden (Jellinger und Stadelmann, 2001; Johnson et al., 1995; Nolan et al., 2000). Physiologisch gesehen findet bei dem programmierten Zelltod bzw. bei der neuronalen Apoptose eine Phagozytose statt. Eine Auflösung der apoptotischen Zelle mit Freisetzung des Zytoplasmas ist nicht festzustellen. Vor der Phagozytose läuft aber eine Kaskade verschiedener Reaktionen ab: Das Chromatin kondensiert zu einer scharf abgrenzenden Masse, die sich an die Kernmembran anlagert oder eine glatte runde Masse im Zellkern bildet, während es zu einer Schrumpfung der Zelle kommt (Majno und Joris, 1995). Häufig entstehen dabei zytoplasmatische Vakuolen. Plasmamembran und die Struktur der Mitochondrien bleiben hingegen intakt, so dass der Zellinhalt nicht freigesetzt wird und inflammatorische Prozesse ausbleiben (Kerr und Harmon, 1991). Nach einiger Zeit kommt es zu DNA-Doppelstrangbrüchen mit einer charakteristischen Größe von 180 Basenpaaren und einem Vielfachen davon, ausgelöst durch $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonukleasen (Arends et al., 1990; Wyllie, 1980). Diese Fragmente können isoliert werden und zeigen in der Elektrophorese das typische Bild einer DNA-Leiter (Masters et al., 1989; Shi et al., 1990). Im weiteren Verlauf der Apoptose bilden sich dann die sogenannten apoptotischen Körperchen, die kleine fragmentierte Chromatinstücke, intakte Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum enthalten und von einer Membran umgeben sind. Diese Membran-umhüllten apoptotischen Körperchen werden von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert (Kerr et al., 1995). Die Apoptose findet dabei ohne inflammatorische Reaktionen statt (Wyllie et al., 1980).

Im Folgenden seien einige Kaskaden genannt, die die neuronale Apoptose auslösen können:

Überaktivierung von Glutamatrezeptoren induziert Apoptose durch einen gesteigerten Calciumeinstrom in die Zelle, welcher durch gestörte Calciumhomöostase zur Exzitotoxizität führt und bei verschiedenen Krankheiten wie Trauma, Schlaganfall und Morbus Alzheimer involviert ist (Choi, 1992).

Oxidativer Stress schädigt Lipide, Proteine und Nucleinsäuren durch freigesetzte Radikale (Mattson, 2000).

Mitglieder der B-cell lymphoma-2-Familie (Bcl-2-Familie) induzieren neuronalen Zelltod über verschiedene Signaltransduktionswege. Zu den 25 Mitgliedern der Bcl-2-Familie gehören sowohl apoptotische als auch antiapoptotische Mitglieder (Reed, 2002). Zu den am besten untersuchten antiapoptotischen Mitgliedern zählen Bcl-2 und Bcl-extra long (Bcl-x_L) und zu den apoptotischen das Bcl-assozierte X-Protein (Bax) und der Bcl-assozierte

Todespromotor (Bad). Überexpression von Bcl-2 in neuronalen Zellkulturen und transgenen Mäusen schützt vor neuronalem Zelltod – induziert durch exzitotoxische bzw. oxidative Schädigungen (Martinou, 1994) – oder vor Wachstumsfaktorentzug (Garcia et al., 1992). Des Weiteren sind Neurone von Bax^{-/-}-Mäusen vor Apoptose geschützt (White et al., 1998) und Bcl-2-Bindung durch Bad hemmt die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 (Zha et al., 1997). Eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran mit anschließender Cytochrom C-Freisetzung wird unter Schädigungsbedingungen durch die Aktivierung der apoptotischen Mitglieder der Onkogen-Proteinfamilie ausgelöst. Vor allem Bid und Bax führen hierdurch zu einer verstärkten Caspaseaktivierung mit anschließendem neuronalem Zelltod (Plesnila et al., 2002; Putcha et al., 1999).

Caspasen (Cystein/Aspartat-spezifische Proteasen) werden sowohl zu den Initiatoren als auch zu den Effektoren des apoptotischen Zelltods gezählt. So wird Caspase-8 zum Beispiel durch den Apoptose-induzierenden Rezeptor Apo-1 oder durch den Todesrezeptor Fas aktiviert (Raoul et al., 2000; Roth, 2001). Die Aktivierung der Todesrezeptoren kann dabei über den extrinsischen Todesweg zu Apoptose durch Aktivierung der sogenannten Effektorcaspasen wie Caspase-3 führen (Ashe und Berry, 2003), ohne dass eine Veränderung der Mitochondrienmembran oder eine Freisetzung mitochondrialer Faktoren messbar ist (Scaffidi et al., 1998). Aber Caspasen sind nicht nur im extrinsischen Todesweg involviert, sondern auch in den durch gestörte Ionenpermeabilität-induzierten intrinsischen, Mitochondrien-abhängigen Todesweg, bei dem aus den Mitochondrien Cytochrom C freigesetzt wird (Chan und Mattson, 1999, Cheng et al., 2001). Dieses bildet mit dem Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) und Procaspase-9, das sogenannte Apoptosom. Im Apoptosom liegt die Caspase-9 in der aktiven Form vor, die dann mehrere Effektorcaspasen, z. B. Caspase-3 aktiviert und so die Endphase der Apoptose einleitet (Zou et al., 1999).

Betrachtet man die komplexe Organisation des Nervensystems wird deutlich, welche vielfältigen Aufgaben unser Gehirn übernimmt. Hält man sich vor Augen, dass Neurone im Gegensatz zu proliferierenden Zellen ein ganzes Leben lang überleben müssen und dabei lebenswichtige Funktionen übernehmen, wird ersichtlich, wie wichtig die Erforschung neuroprotektiver Mechanismen ist. Obwohl die Forschung auf dem Bereich der Neurowissenschaften in den letzten Jahren stetig zugenommen hat, ist bislang der entscheidende Durchbruch bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen unterschiedlichster Genese nicht gelungen. So fehlt bis heute eine kausale Therapie, um den

durch neuronalen Zelltod ausgelösten Verlust einzelner Gehirnfunktionen wie beim Schlaganfall oder Morbus Alzheimer zu behandeln. Um diese neurodegenerativen Erkrankungen in Zukunft vollkommen therapieren zu können, ist die Erforschung alter und neuer neuroprotektiver Transduktionswege unabdingbar.

Neurotrophe Faktoren gehören zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren, die neuroprotektiv wirken können und vor Apoptose durch Aktivierung verschiedenster Rezeptoren und Signaltransduktionskaskaden schützen. So vermindern Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), Nerve Growth Factor (NGF), Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) und Basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF) neuronalen Zelltod durch Induktion von endogenen protektiven Faktoren wie Antioxidantien, protektiven Mitgliedern der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 und Bcl-x_L oder Calbindin (Mattson et al., 1995). Aber auch die Gruppe der Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) schützen in experimentellen Methoden vor neuronalem Zelltod (Hagg und Varon, 1993; Semkova et al., 1999; Semkova und Krieglstein, 1999a; Tamatani et al., 1999).

Neurotrophine bilden eine Familie der Wachstumsfaktoren und fördern die Entwicklung und Differenzierung, das Überleben der Zellen und das Wachstum verschiedenster Neurone im zentralen und peripheren Nervensystem (Klesse et al., 1999; Patapoutian und Reichardt, 2000). Zu den Neurotrophinen werden u. a. BDNF, NGF, Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) gezählt. Sie binden mit unterschiedlicher Affinität an verschiedenen, membranständigen Rezeptoren, zum einen an hochaffine Tyrosinkinase-rezeptoren, Tropomyosin-related kinase (Trk) genannt, und an den niedrigaffinen Neurotrophinrezeptor p75^{NTR}, einem Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie (Kaplan und Miller, 2000; Klesse und Parada, 1999). Bislang wurden drei verschiedene Trk-Rezeptoren charakterisiert, an denen die Neurotrophine mit unterschiedlicher Bindungsaffinität binden: NGF bindet mit hoher Affinität an TrkA, BDNF und NT-4/5 an TrkB und NT-3 an TrkC und mit niedriger Affinität an TrkA und TrkB (Abb. 1.1; Cordon-Cardo et al., 1991; Klein et al., 1991a,b; Thoenen und Sendtner, 2002). Alle Neurotrophine binden mit gleicher Affinität aber unterschiedlicher Kinetik an p75^{NTR} (Bibel und Barde, 2000; Hempstead, 2002). Neurotrophin-6 (NT-6) und Neurotrophin-7 (NT-7) sind bislang nur im Zebrafisch beschrieben worden und binden mit hoher Affinität an TrkA (Gotz et al., 1994; Nilsson et al., 1998).

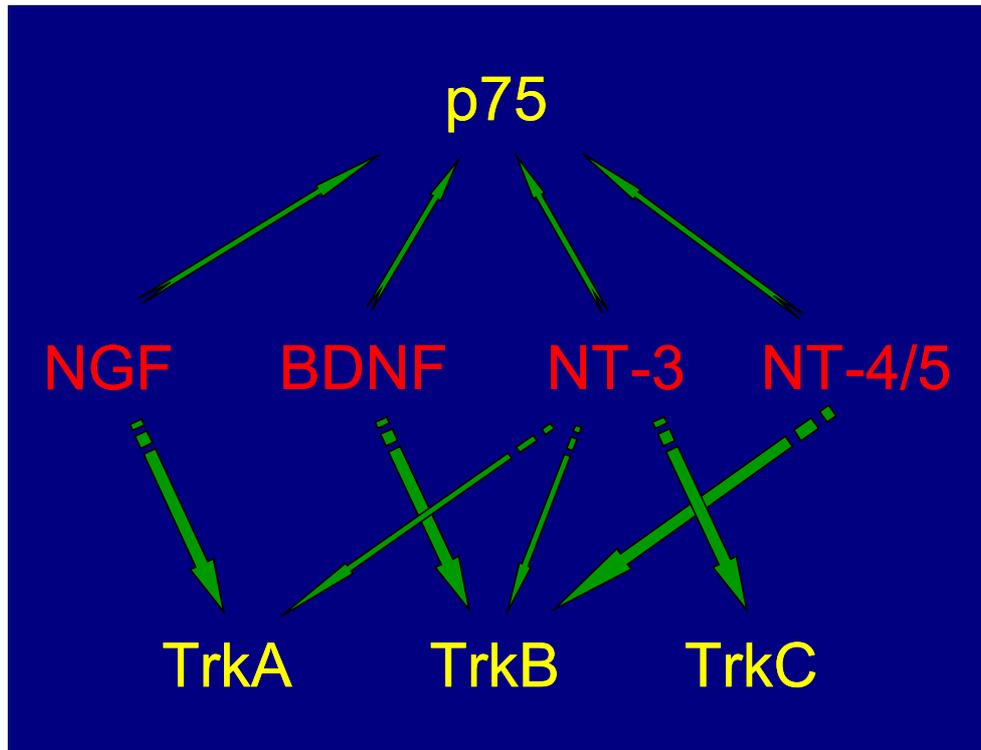


Abb. 1.1: Interaktionen der Neurotrophine mit ihren Rezeptoren

Wechselwirkung der Neurotrophine Nerve Growth Factor (NGF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/-5 (NT-4/5) mit den entsprechenden hochaffinen Tropomyosin-related Kinase (Trk)-Rezeptoren und dem niedrigaffinen $p75^{NTR}$ -Rezeptor. Die dicken Pfeile symbolisieren die bevorzugten Interaktionen der Neurotrophine und die dünnen Pfeile ein niedrigaffines Bindungsverhalten.

Die Entdeckung des Nervenwachstumsfaktors NGF durch Levi-Montalcini, die 1986 den Nobelpreis für Medizin erhielt, und Angeletti in den 50iger Jahren war der Ausgangspunkt für die Erforschung der Neurotrophine (Levi-Montalcini und Angeletti, 1968; Levi-Montalcini, 1987). NGF leitet die Differenzierung und das Wachstum während der Entwicklung ein (Lewin und Barde, 1996) und vermittelt neuroprotektive Effekte sowohl cholinerger Neurone im basalen Vorderhirn als auch hippocampaler Neurone nach Ischämie (Fischer et al., 1987; Hefti und Weiner, 1986; Semkova et al., 1996a,b). NGF ist aus α -, β -, γ -NGF Untereinheiten aufgebaut. Die α -Untereinheit stellt dabei eine inaktive Zymogenform dar (Bax et al., 1997). γ -NGF ist eine aktive Protease, die Pro-NGF zu NGF prozessiert (Jongstra-Bilen et al., 1989) und β -NGF ist die eigentliche Wirkform – auch als 2.5S NGF bezeichnet (Perez-Polo et al., 1972). 2.5S NGF reagiert mit 2 Arten von Rezeptoren, dem hochaffinen NGF-Rezeptor TrkA

und den niedrigaffinen NGF-Rezeptor p75^{LNGFR}. α - und γ -NGF blockieren die Bindestelle für β -NGF am TrkA- und am p75-Rezeptor (Wiesmann und de Vos, 2001).

Die Rolle des niedrigaffinen NGF-Rezeptors p75^{LNGFR} wird kontrovers diskutiert (Carter und Lewin, 1997). So vermittelt der niedrigaffine NGF-Rezeptor in Abwesenheit des TrkA-Rezeptors neuronalen Zelltod während der Entwicklung (Barrett, 2000; Casaccia-Bonnel et al., 1999) oder in hippocampalen Neuronen nach Inkubation mit NGF (Friedman, 2000). Andererseits zeigen andere Studien, dass der p75-Rezeptor nicht nur NGF-induzierte Differenzierung (Hempstead et al., 1991; Verdi et al., 1994) vermittelt, sondern auch Neuroprotektion über diverse Signaltransduktionswege in verschiedenen Kulturen wie kortikalen und hippocampalen Kulturen und in PC12-Zellen (Bui et al., 2002; Culmsee et al., 2002; Greene und Kaplan, 1995; Lachyankar et al., 2003; Mamidipudi et al., 2002; Roux et al., 2001). Ferner konnte gezeigt werden, dass der niedrigaffine NGF-Rezeptor p75 mit dem hochaffinen NGF-Rezeptor TrkA interagiert: Co-Expression beider Rezeptoren steigert sowohl die Bindungsaffinität (Benedetti et al., 1993; Hempstead et al., 1991; Mahadeo et al., 1994) als auch die Ligandenspezifität von NGF an den Trk-Rezeptor (Lee et al., 1994), so dass die NGF-induzierte TrkA-Aktivität gesteigert wird (Barker und Shooter, 1994; Hantzopoulos, 1994; Lad und Neet, 2003).

Das Vorkommen des hochaffinen NGF-Rezeptors **TrkA** in hippocampalen Neuronen wird in der Literatur widersprüchlich beschrieben. Während in einigen Studien ein Vorkommen des TrkA-Rezeptors in hippocampalen Neuronen nicht nachgewiesen werden konnte (Friedman, 2000; Ip et al., 1993), zeigten andere Arbeitsgruppen die Expression von TrkA – neben TrkB und TrkC – in hippocampalen Zellen (Cellerino, 1993; Culmsee et al., 2002; Lee et al., 1998a,b). Der hochaffine NGF-Rezeptor TrkA, der neben einer Tropomyosin-Gensequenz auch eine Tyrosinkinasedomäne besitzt, wurde zuerst im humanen Colonkarzinom entdeckt (Martin-Zanca et al., 1986) und wird daher auch zu den Protoonkogenen gezählt (Descamps et al., 2001). Die Tatsache, dass das Expressionsprofil für *trka* mit der Lokalisation der Neurone, die auf NGF ansprechen, identisch war und gleichzeitig eine Größe des Proteins von 140 kDa festgestellt werden konnte, veranlasste 1991 die Arbeitsgruppe von Barbacid TrkA als Rezeptor für NGF zu deklarieren (Klein et al., 1991a). Der hochaffine NGF-Rezeptor kommt in drei verschiedenen Splice-Varianten vor, die ihrerseits unterschiedliche Aufgaben in der Zelle verrichten. A) Eine 84 kDa große TrkA-Form, die unglykosyliert ist und deren Aufgabe bis dato unbekannt ist (Meakin et al., 1992). B) Eine internalisierte, intrazelluläre

und „unreife“ 110 kDa große TrkA-Form, die im Vergleich zur 140 kDa-Variante nur teilweise glykosyliert ist und für die NGF-induzierte Differenzierung zuständig ist und C) eine membranständige, extrazelluläre und reife 140 kDa große TrkA-Variante, die glykosyliert ist und die NGF-vermittelte Neuroprotektion induziert (Clary und Reichardt, 1994; Leoni und Valtorta, 2002; Martin-Zanca et al., 1989; Zhang et al., 2000). Die Arbeitsgruppe von Segal konnte zeigen, dass die Glykosylierung die Lokalisation und Aktivität des TrkA-Rezeptors regelt. Nicht-glykolisierte TrkA-Rezeptoren translozieren nicht an die Zelloberfläche, und können somit weder den Ras/Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK)/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signaltransduktionsweg aktivieren noch Differenzierung von Neuronen induzieren (Watson et al., 1999).

Ähnlich wie an den Rezeptoren für Insulin-like Growth Factor (IGF) und Epidermal-like Growth Factor-1 (EGF-1) und Platelet-derived Growth Factor (PDGF) (Schlessinger, 1988; Ullrich und Schlessinger, 1990) führt die Bindung von NGF an den TrkA-Rezeptor zu einer mit trans-Autophosphorylierung einhergehenden Dimerisierung (Cunningham et al., 1997) und nachfolgender Aktivierung des Rezeptors (Jing et al., 1992; Kaplan et al., 1991a,b) und nachgeschalteter Transduktionswege (Abb. 1.2; Klesse et al., 1999). Hierzu gehören der **Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K)-Signalweg** mit anschließender Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase Akt/Proteinkinase B (PKB) und Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B)-Aktivierung (Maggirwar et al., 1998; Yuan und Yankner, 2000) und der **Ras/MEK/MAPK-Signalweg** (Gomez und Cohen, 1991; Nobes et al., 1996). Sechs der TrkA-Autophosphorylierungsstellen sind bis jetzt identifiziert worden: drei innerhalb der katalytischen Domäne – Tyr-670, Tyr-674 und Tyr-675 – und drei außerhalb der katalytischen Domäne – Tyr-490, Tyr-751, Tyr-785 (Segal et al., 1996). Der Tyr-490 Rest und der C-terminale Rest Tyr-751 sind für Differenzierung und Neuroprotektion die wichtigsten Phosphorylierungsstellen, die nach Bindung von NGF an den TrkA-Rezeptor aktiviert werden und ihrerseits Signalproteine wie PI3-K, Shc und Phospholipase- γ 1 (PLC- γ 1) aktivieren (Kaplan und Stephens, 1994). Nach NGF-Bindung an den hochaffinen NGF-Rezeptor bindet die 85 kDa-Untereinheit der PI3-K an Tyr-751 (Obermeier et al., 1993b) mit anschließender Aktivierung der PI3-K (Soltoff et al., 1992) und der PKB/Akt, welche wiederum über verschiedene Signaltransduktionswege antiapoptotische Effekte vermitteln (Brunet et al., 2001; Yao und Cooper, 1995). Eine Bindung und Aktivierung von Shc (Van der Geer et al., 1995) und der damit verbundenen Aktivierung des Ras/MEK/MAPK-Signalweges mit nachfolgender Differenzierung oder Neuroprotektion (Baxter et al., 1995) und eine nachfolgend Ras-vermittelte Bindung und Aktivierung der PI3-K (Obermeier et al.,

NGF bindet an den hochaffinen NGF-Rezeptor TrkA. Nach Phosphorylierung des Rezeptors – welche durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) inhibiert wird – und Bildung eines Heterotetramerkomplexes mit dem niedrigaffinen NGF-Rezeptor p75 verläuft die intrazelluläre NGF-Signaltransduktion über die Aktivierung zweier Signalwege: A.) Nach Bindung der 85 kDa-Untereinheit der Phosphoinositol3-Kinase (PI3-K) an Tyr-751 des TrkA-Rezeptors vermittelt der PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweg Neuroprotektion u. a. über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B) – der eine Induktion der Mangan-abhängigen Superoxiddismutase (MnSOD) und der antiapoptotischen Onkogene B-Cell lymphoma-2 (Bcl-2) und B-Cell lymphoma extra long (Bcl-x_L) einleitet – über eine Aktivierung von cAMP response Element-binding Protein (CREB), über eine Hemmung des Bcl-assoziierten Todespromotor (Bad), der Glykogensynthasekinase-3 β (Gsk-3 β) und der p53-vermittelten Cystein/Aspartat-spezifischen Protease-3 (Caspase-3) Aktivierung. B.) Shc bindet an Tyr-490 des TrkA-Rezeptors und aktiviert den Ras/Raf/Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK)/MAPK-Signaltransduktionsweg, der Neuroprotektion über eine Aktivierung von Akt und CREB und über eine Hemmung von Bad vermittelt. Eine Inhibition der neuroprotektiven Signalwege kann über den PI3-K-Inhibitor Wortmannin (WM) und den MEK-Inhibitor UO126 induziert werden. (Abbildung modifiziert nach Yuan und Yankner, 2000)

Zwar wurde NGF bisher in einigen klinischen Studien gegen Morbus Alzheimer (Seiger et al., 1993) eingesetzt, die therapeutische Anwendung von NGF ist jedoch problematisch. Es handelt sich hierbei um ein hochmolekulares Molekül, welches die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann und somit ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften vorliegen. Bei der direkten Injektion in das Gehirngewebe waren ferner erhebliche Nebenwirkungen wie Myalgien, Hyperalgesien (Petty et al., 1994) und Gewichtsreduzierungen (Eriksdotter Jonhagen et al., 1998) zu verzeichnen, von der durch die intracerebrale Injektion auftretenden hohen Belastung für den Patienten erst gar nicht zu sprechen. Eine Standardapplikation von NGF zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen liegt derzeit nicht vor. Ein möglicher Ansatz stellt daher die Stimulation der Synthese und Freisetzung von endogenen, neurotrophen Substanzen durch oral applizierbare, niedermolekulare lipophile Substanzen dar, die in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. So konnten Kuhn und Mueller (1995) zeigen, dass die NGF-Synthese durch Catecholamine stimuliert wird und die Arbeitsgruppe um Thoenen, dass eine Stimulation der cholinergen Aktivität durch Pilocarpin die NGF- und BDNF-Synthese anregt (Da Penha et al., 1993). Auch mit Glukocorticoiden wie Dexamethason konnte die NGF mRNA in hippokampalen Neuronen hochreguliert werden (Lindolm et al., 1992). Frühere Studien in unserem Labor konnten zeigen, dass eine Induktion von NGF durch das β_2 -Sympathomimetikum Clenbuterol sowohl in vitro als auch

in vivo zur Neuroprotektion gegenüber verschiedenen Schädigungsmodellen führt (Culmsee et al., 1999a,b; Krieglstein et al., 1999; Semkova et al., 1996a; Zhu et al., 1998; Zhu und Krieglstein, 1999). Es scheint, dass die NGF-induzierenden Substanzen an verschiedenen Zelltypen wie Neurone und Gliazellen angreifen und dort über verschiedene Signaltransduktionswege die NGF-Freisetzung induzieren (Culmsee et al., 1999a,b; Houlgatte et al., 1989; Semkova et al., 1996b).

Eine Möglichkeit die NGF-induzierten, neuroprotektiven Signaltransduktionswege zu imitieren, ist die Aktivierung des TrkA-Rezeptors durch Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren. Der Tyrosinphosphorylierungsgrad von zellulären Proteinen wird durch Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) und **Protein-Tyrosin-Phosphatasen** (PTP) reguliert (Barford, 1995; Barford et al., 1995). Die PTK transferieren dabei γ -Phosphat von Adenosintriphosphat (ATP) auf Tyrosinreste und PTP spalten dieses wieder ab (Hunter, 1995). Reversible Tyrosinphosphorylierung ist in verschiedenen, durch Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktionswege involviert. Beispielsweise interagiert SHP-1 mit dem Tyrosinkinase-Rezeptor TrkA und SHP-2 mit dem Rezeptor für CNTF (Arregui et al., 2000). Dabei spielt die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung mittels Dephosphorylierung von Protein-Tyrosinresten der autophosphorylierten Wachstumsfaktorrezeptoren eine zentrale Rolle, z. B. bei der Regulation von verschiedensten Proteinen (Li und Dixon, 2000; Mustelin et al., 2002; Neel und Tonks, 1997; Schlessinger und Ullrich, 1990; Van Vector, 1998), die in zellulären Prozessen und neuroprotektiven Signalwegen involviert sind (Faure et al., 1992; Boehmer et al., 1993). PTP stimulieren oder inhibieren diese zellschützenden Signaltransduktionswege (Ostman und Boehmer, 2001). Dies geschieht zum einen durch Aktivierung von sogenannten „Rezeptor gebundenen PTK“, auch Rezeptortyrosinkinasen (RTK) genannt, oder „nicht Rezeptor gebundenen PTK“ (Zheng et al., 1992), welche neuroprotektive Signale vermitteln (Mustelin et al., 2002). Zum anderen laufen die Prozesse mittels Inaktivierung der RTK und der ungebundenen PTK oder deren Substrate ab (Brautigam et al., 1981; Tonks und Neel, 2001). So haben zum Beispiel frühere Studien gezeigt, dass die Src homology-containing Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (SHP-2, oder auch PTP-1D genannt) Ischämie-induzierte Schädigung des Gehirns vermindert (Aoki et al., 2000), die dual-spezifische Protein-Tyrosin-Phosphatase PTEN aber den neuroprotektiven PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweg mittels Inhibierung der 85 kDa Untereinheit der PI3-K über eine Dephosphorylierung hemmt (Wu et al., 1998).

Die Gruppe der PTP umfasst nahezu 100 Enzyme (Ostman und Boehmer, 2001), hierzu gehören die rezeptorgebundenen, die rezeptorungebundenen und die dualspezifischen Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Die rezeptorgebundenen PTP – z. B. CD45 und LAR – enthalten eine extrazelluläre Domäne unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung, eine sogenannte Transmembrandomäne und eine oder zwei intrazelluläre katalytische Domänen (Neel und Tonks, 1997). Die intrazellulären PTP – z. B. PTP-1B, SHP-1 und SHP-2 – besitzen eine katalytische Domäne und verschiedene Amino- und Carboxy-terminale Regionen mit Interaktions- und Regulationsfunktionen (Mauro und Dixon, 1994). Dual spezifische PTP dephosphorylieren nicht nur an Tyrosinresten, sondern auch an Serin/Threoninresten. Sie besitzen große Sequenzähnlichkeit mit VH1 (vaccinia open reading frame H1) (Stone und Dixon, 1994). Allen Protein-Tyrosin-Phosphatasen sind die PTP-Domäne und die 'flankierende Domäne', welche die katalytische Aktivität reguliert (Tonks und Neel, 2001), gemeinsam. Die PTP-Domäne besteht aus 240 bis 250 Aminosäuren, wobei eines der enthaltenen Cysteine für die katalytische Aktivität entscheidend ist (Jia et al., 1995). Die Tiefe der hydrophoben, katalytischen Tasche der PTP ist verantwortlich für die Spezifität, denn nur Tyrosinphosphatreste besitzen die notwendige Länge, um in der katalytischen Tasche zu binden (Barford et al., 1994; Pannifer et al., 1998). Charakteristisch ist auch die Konformationsänderung der katalytischen Tasche nach Substratbindung. Dabei protoniert die Asparaginsäure das freiwerdende, negativ geladene Phosphat (Tonks und Neel, 2001). Des Weiteren ist die Asparaginsäure für die Regeneration der PTP verantwortlich (Denu et al., 1996). Reguliert werden die Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch Protein-Protein-Interaktionen oder durch posttranslationale Modifikationen wie z. B. Phosphorylierungen (Van Vector et al., 1998). So wird z. B. die PTP-1B unter Stress an Ser-352 und Ser-386 (Shifrin et al., 1997) oder nach Interaktion mit dem Rezeptor für EGF an Tyr-66 phosphoryliert und aktiviert (Liu und Chernoff, 1997). Insulin stimuliert die SHP-1 durch Phosphorylierung an Tyr-538 (Uchida, 1994). Inhibiert werden die PTP z. B. durch reversible Oxidation an Cysteinresten des katalytischen Zentrums (Barrett et al., 1999; Gross et al., 1999) oder durch Ligandenbindung (Peles et al., 1998) mit nachfolgender Dimerisierung der PTP (Desai et al., 1993; Jiang et al., 1999; Majeti et al., 1998).

Natriumorthovanadat ist ein unspezifischer PTP-Inhibitor (Leis und Kaplan, 1982; Swarup et al., 1992), der reversibel an die Thiolgruppe des im katalytischen Zentrum sitzenden Cysteins bindet und somit inaktiviert (Denu et al., 1993; Huyer et al., 1997). Frühere experimentelle und klinische Studien haben zeigen können, dass Orthovanadat Insulin-

mimetische Eigenschaften besitzt. Der PTP-Inhibitor aktiviert dabei indirekt über Phosphatasehemmung den Insulinrezeptor, woraus eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung und damit eine erhöhte Kinaseaktivität des Insulinrezeptors mit nachfolgenden Insulinmimetischen Effekten resultiert (Etcheverry und Cortizo, 1998; Shechter, 1990; Stern et al., 1993). Zudem induziert Orthovanadat die Zellproliferation (Salice et al., 1999) und die Zelldifferenzierung (Rogers et al., 1994). Andererseits konnte gezeigt werden, dass Orthovanadat in Konzentrationen größer 100 μM neuronalen Zelltod durch p53-Aktivierung induziert (Figiel und Kaczmarek, 1997; Huang et al., 2000) und NGF-abhängiges Wachstum in PC12-Zellen hemmt (Wu und Bradshaw, 1993). Nähere Untersuchungen zu möglichen neuroprotektiven Eigenschaften durch Orthovanadat-vermittelte PTP-Hemmung gab es zu Beginn der hier durchgeführten Arbeit keine. In der vorliegenden Arbeit wurde Orthovanadat als unspezifischer PTP-Inhibitor verwendet, um zu untersuchen, ob eine Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphataseaktivität die TrkA-vermittelten Transduktionswege, insbesondere den PI3-K/Akt- und den Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg, aktivieren kann und somit NGF-vermittelte neuroprotektive Effekte imitiert.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die **PTP-1B** verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren wie z. B. die Rezeptoren für EGF (Flint et al., 1997), IGF (Kenner et al., 1996) und PDGF (Lammers et al., 1993) dephosphoryliert und infolge dessen inaktiviert (Haj et al., 2003). Es ist daher anzunehmen, dass die PTP-1B auch andere RTK und somit auch den hochaffinen NGF-Rezeptor TrkA inhibiert. Die Mg^{2+} -abhängige PTP-1B (Zipser und Kosower, 1996) ist eine nicht-Rezeptor-gebundene Protein-Tyrosin-Phosphatase, die in vielen Geweben exprimiert wird (Chernoff et al., 1990). Sie besitzt im Gegensatz zu anderen PTP keine SH₂-Domänen und ist als negativer Regulator im Insulin-vermittelten Signaltransduktionsweg involviert, wobei die PTP-1B den Insulinrezeptor (Ahmad et al., 1995; Seely et al., 1996) und das Insulinrezeptorsubstrat (IRS) (Goldstein et al., 2000) dephosphoryliert. So zeigen frühere Studien, dass peroral aufgenommene PTP-1B-Inhibitoren die Plasmaglukosewerte normalisieren (Malamas et al., 2000; Wrobel et al., 1999). Zudem zeigen PTP-1B^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Insulinempfindlichkeit (Elchebly et al., 1999). Andererseits aktiviert die PTP-1B aber auch mittels Dephosphorylierung Proteine wie z. B. c-Src (Bjorge et al., 2000). Es sind bislang verschiedene Inhibitoren der PTP-1B synthetisiert worden, um die negativ regulatorische Wirkung der PTP-1B bezüglich der Insulin-induzierten Signalwege zu hemmen und den Diabetes mellitus zu behandeln (Liu, 2003; Moller et al., 2000). Hierzu gehören z. B. die Dephostatin-Derivate (Umezawa et al., 2003) wie z. B. Ethyl-3,4-

dephostatin (Suzuki et al., 2001) und Methoxim-3,4-dephostatin (Hiroki et al., 2002) und die Fmoc-Derivate mit Compound 2 (Shen et al., 2001; Sun et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde mit diesen Derivaten untersucht, ob und welche Rolle die PTP-1B hinsichtlich der TrkA-Dephosphorylierung und den dadurch vermittelten Signaltransduktionswegen spielt. So zeigen frühere Studien, dass eine Hemmung der PTP-1B Wachstumsfaktor-vermittelte Effekte fördert: Der PTP-Inhibitor 3,4-Dephostatin induziert EGF-vermittelte Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von MAPK (Fujiwara et al., 1997). Es sollte daher untersucht werden, ob mit den PTP-Inhibitoren vergleichbare Effekte auf die TrkA und NGF-vermittelten protektiven Signaltransduktionswege in Neuronen erreicht werden können.

Die Ausgangssubstanz für die hier verwendeten Dephostatin-Derivate war das Dephostatin. Es wurde vor 10 Jahren zunächst aus dem Bakterium *Streptomyces sp.* isoliert (Imoto et al., 1993; Kakeya et al., 1993) und ein Jahr später synthetisch hergestellt (Watanabe et al., 1994; Yu et al., 1995). Inhibitorische Eigenschaften besitzt Dephostatin gegen die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 aus humanen T-Zellleukämiezellen (Imoto et al., 1993; Kakeya et al., 1993). Eine Hemmung von Serin/Threonin-Phosphatasen konnte hingegen nicht festgestellt werden (Watanabe et al., 1995). Während der letzten Jahre wurden mehr als 20 weitere Dephostatin-Derivate synthetisiert (Umezawa et al., 2003), die im Vergleich zur Ausgangssubstanz im Zellkulturmedium über einen längeren Zeitraum stabil sind und neben der CD45 auch die SHP-1 und die PTP-1B mittels Interaktion mit der katalytischen Domäne hemmen (Tab. 3.2; Suzuki et al., 2001; Watanabe et al., 2000). So bleibt beispielsweise Me-3,4-dephostatin im Zellkulturmedium über 12 h stabil, während sich Dephostatin innerhalb 2 h zersetzt (Umezawa et al., 2003).

Das monomere Gas **Stickstoffmonoxid** (NO) besitzt als endogener Transmitter eine zentrale Bedeutung hinsichtlich der Regulation biologischer Prozesse in verschiedenen Geweben und Organen. Hierzu gehören u. a. die Vasodilatation (Furchgott und Zawadzki, 1980; Gruetter et al., 1979; Ignarro et al., 1997; Palmer et al., 1987), die Neurotransmission (Sanders und Ward, 1992), die Inflammation (Eisenstein, 2001; Nathan und Shiloh, 2000) und die Thrombozytenaggregation (Cheung et al., 1998; Radomski et al., 1990; Salvemini et al., 1989). Im Jahre 1998 erhielten die amerikanischen Wissenschaftler R. F. Furchgott, L. J. Ignarro und F. Murad für die Erforschung der Wirkungen von Stickstoffmonoxid als Signalmolekül im menschlichen Herz-Kreislauf- und Gefäßsystem. Stickstoffmonoxid ist wasserlöslich und kann biologische Membranen frei passieren. Stickstoffmonoxid wird aus L-

Arginin mit Hilfe von Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) in Gegenwart von Cofaktoren wie Nicotinamiddinucleotidphosphat, Flavindinucleotid, Flavinmononucleid und Tetrahydrobiopterin unter Freisetzung von L-Citrullin synthetisiert (Ignarro, 1996; Palacios et al., 1989; Palmer und Moncada, 1988; Wilmot und Bath, 2003). Die lokale Konzentration von NO ist dabei abhängig von der Expression, dem Aktivierungsstatus, der zellulären Konzentration und subzellulären Lokalisation der NOS (Boyd und Cadenas, 2002). Drei verschiedene NOS sind bislang bekannt (Forstermann et al., 1994): die konstitutiv vorhandene und Ca^{2+} -abhängige endotheliale NOS (eNOS, NOS-3) und neuronale NOS (nNOS, oder auch NOS-1 genannt) und die Ca^{2+} -unabhängige induzierbare NOS (iNOS, NOS-2) (Alderton et al., 2001; Bredt und Snyder, 1990). Neuronale und endotheliale NOS produzieren schnell transiente, geringe physiologische Mengen an Stickstoffmonoxid, wohingegen die iNOS nach Aktivierung durch Zytokine und Endotoxine (Bredt und Snyder, 1994; Dimmeler und Zeiher, 1999; Wong und Billiar, 1995) über Tage hohe, toxische Mengen an NO produziert (Billiar, 1995). Es wird daher postuliert, dass eNOS eher neuroprotektiv wirkt (Albrecht et al., 2003; Dawson et al., 1998; Dimmeler und Zeiher, 1999), während iNOS eher toxische Effekte induziert (Ignarro, 1996; Morishita et al., 2002; Sugimoto und Iadecola, 2002). Viele Studien belegen die gegensätzlichen Eigenschaften der NOS auf neuronaler Ebene: Für die nNOS und iNOS sind Belege für Zelltod-induzierende Effekte zu finden (Atochin et al., 2003; Choi und Kim, 1998; Eliasson et al., 1999; Hewett et al., 1994), wohingegen die eNOS – z. B. induziert durch Statine – eher neuroprotektive Eigenschaften besitzt (Endres et al., 1998; Laufs et al., 2000a,b, 2002). Aktiviert werden die NOS durch Proteininteraktionen wie z. B. Phosphorylierung der eNOS durch Akt an Ser-1177 (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999) oder im Fall der eNOS und nNOS durch Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Knowles et al., 1989; Palmer und Moncada, 1989) mit nachfolgender Bindung an Calmodulin (Bredt und Snyder, 1990; Pollock et al., 1991).

Stickstoffmonoxid-induzierter Zelltod findet durch Aktivierung verschiedenster Signalwege statt. So berichten Messmer und Bruene (1996) von einer p53-vermittelten DNA-Fragmentierung durch den NO-Donator S-Nitroglutathion. Aber auch eine Bax- und Caspase-vermittelte Neurotoxizität (Canals et al., 2001; Uchiyama et al., 2002; Wang et al., 2003) und die Bildung von Radikalen wie Peroxynitrit mit anschließender Schädigung der Mitochondrien induzieren Stickstoffmonoxid-vermittelten Zelltod (Bolanos et al., 1995). Verschiedene neuroprotektive Mechanismen werden für Stickstoffmonoxid diskutiert: Zum einen wirkt Stickstoffmonoxid neuroprotektiv aufgrund der antioxidativen Eigenschaften

(Chiueh, 1999). NO hemmt aber auch Caspasen durch Nitrosierung oder durch direkte, reversible S-Nitrosylierung an dem für die Aktivität des Enzyms essentiellen Cystein des aktiven Zentrums (Dimmeler et al., 1997; Li et al., 1997; Kim et al., 1998; Rossig et al., 1999), die durch reduzierende Substanzen wie Glutathion und Dithiothreitol (DTT) wieder aufgehoben werden kann. Des Weiteren wurde eine indirekte Caspasehemmung über den sGC (löslichen Guanylatcyclase)/cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP)-Signalweg beschrieben (Kim et al., 1997). Durch diese Hemmung der Caspasen werden u. a. die Spaltung von Bcl-2 und die Aktivierung von Bax verhindert (Kim et al., 1998; Thippeswamy et al., 2001), so dass die Cytochrom C-Freisetzung vermindert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die MAPK Erk1 und Erk2 durch Stickstoffmonoxid p21Ras-abhängig (Lander et al., 1995a,b, 1997; Schaeffer und Weber, 1999) aktiviert werden, was nachfolgend zu einer neuroprotektiven NF- κ B-Aktivierung (Lander et al., 1996) oder ischämischen Präkonditionierung (Gonzalez-Zulueta et al., 2000) führt. Zudem konnte eine indirekte Aktivierung des Ras/MAPK/Erk-Signalweges über den sGC/cGMP/PKG-Transduktionsweg in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden (Gu et al., 2000; Hood und Granger, 1998; Komalavilas et al., 1999).

Neben der Freisetzung von Neurotransmittern wie z. B. Acetylcholin, Catecholaminen, Aminosäuren, Serotonin, Histamin und Adenosin (Prast und Philippu, 2001) induziert Stickstoffmonoxid die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC). Für diese Aktivierung reichen Konzentrationen im nanomolaren Bereich aus, wohingegen alle anderen, NO-vermittelten Effekte höhere Konzentrationen benötigen (Davis et al., 2001). Die Aktivierung der sGC und die damit verbundene Synthese von cGMP wurden weitaus früher entdeckt als der vasodilatatorische Effekt von NO (DeRubertis und Craven, 1976; Arnold et al., 1977). Hierbei bindet Stickstoffmonoxid an die Hämgruppe der löslichen Guanylatcyclase und interagiert mit dieser (Archer et al., 1993), so dass es zur Aktivierung der sGC und nachfolgend der Proteinkinase G (PKG) kommt (Ignarro et al., 1982a,b; Wall et al., 2003; Wolin et al., 1982). Diese Enzymaktivierung führt dann über verschiedene Mechanismen wie die oben beschriebene Caspase-3- und Cytochrom C-Inaktivierung (Kim et al., 1997, 1999; Tejedo et al., 2001) oder Src-Aktivierung (Tejedo et al., 2001) zur Protektion gegenüber Apoptose- und Nekrose-induzierenden Signalwegen. Ebenso wird die PKG durch die lösliche Guanylatcyclase aktiviert (Fiscus, 2002), was ebenfalls Protektion z. B. durch Akt-Aktivierung (Ha et al., 2003; Kook et al., 2003) oder CREB-Aktivierung (Ciani et al., 2002) induziert.

Auch ein anderer, neuroprotektiver Mechanismus könnte eine wichtige Rolle bei der Stickstoffmonoxid-induzierten Neuroprotektion spielen. So zeigte die Arbeitsgruppe um Ramponi, dass Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch eine Stickstoffmonoxid-vermittelte Oxidation des für die Phosphataseaktivität essentiellen Cysteins gehemmt werden (Caselli et al., 1994, 1995). Diese Hemmung der PTP durch Stickstoffmonoxid hat zur Folge, dass die Dephosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wie z. B. EGF inhibiert wird, so dass eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrades an den neurotrophen Rezeptoren (Monteiro et al., 2000; Ruano et al., 2003) sowie eine Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege wie z. B. dem Ras/Raf/MAPK-Signalweg resultiert (Callsen et al., 1999). Die Hemmung von PTP durch NO könnte daher eine neue Strategie sein, um auch in Neuronen Neurotrophin-Rezeptoren und nachgeschaltete neuroprotektive Signalwege zu aktivieren.

Fragestellungen

Die Suche nach neuen und wirksamen Ansätzen zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen erfordert die Erforschung pathophysiologischer Mechanismen des neuronalen Zelltods und die Entwicklung möglicher Strategien zum Eingriff in die ablaufenden Signalwege. In diesem Zusammenhang haben frühere Studien in unserem und in anderen Laboren gezeigt, dass NGF durch die Aktivierung von TrkA und der nachgeordneten neuroprotektiven Signaltransduktionswege Neurone in Modellen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wirksam schützt (Cassacia-Bonnet et al., 1999; Culmsee et al., 2002; Semkova und Kriegstein, 1999a,b; Sofroniew et al., 2001; Zhu und Kriegstein, 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob Hemmstoffe von PTP in Neuronen solche neuroprotektiven Effekte von Neurotrophinen nachahmen können. Am Beispiel des NGF-Signaltransduktionswegs wurde in embryonalen hippocampalen Rattenneuronen untersucht, ob die Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen zu einer verstärkten Phosphorylierung von TrkA führt und damit die Aktivierung TrkA-vermittelter neuroprotektiver Signaltransduktionswege über PI3-K/Akt oder MEK/MAPK induziert wird. Um in Neuronen eine Hemmung von PTP zu erreichen, wurde der PTP-Inhibitor Natriumorthovanadat eingesetzt.

Eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die für die Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA in Frage kommt, ist die nicht-Rezeptor gebundene PTP-1B. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die PTP-1B verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren wie z. B. die Rezeptoren für EGF (Flint et al., 1997), IGF (Insulin-like Growth Factor; Kenner et al., 1996) und PDGF (Lammers et al., 1993) dephosphoryliert und infolge dessen inaktiviert (Haj et al., 2003). Es ist daher wahrscheinlich, dass die PTP-1B auch den hochaffinen NGF-Rezeptor TrkA dephosphoryliert und dessen vermittelte, neuroprotektiven Signalwege inhibiert. Um dieses zu testen, sollte der Einfluss verschiedener PTP-1B-Inhibitoren auf die Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors und auf die hierdurch vermittelten neuroprotektiven Eigenschaften untersucht werden.

Einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liefern die eingehenden Untersuchungen zur Neuroprotektion durch Stickstoffmonoxidendonatoren. Die Rolle von Stickstoffmonoxid und der NOS auf den neuronalen Zelltod wird kontrovers diskutiert. Einerseits induziert NO vor allem in hohen Dosen sowohl in vitro als auch in vivo neuronalen Zelltod (Canals et al., 2001; Schulz et al., 1995), andererseits konnten aber auch neuroprotektive Eigenschaften des monomeren Gases nachgewiesen werden (Fiscus, 2002). Für die NO-vermittelte Neuroprotektion werden verschiedene Mechanismen diskutiert, u. a. eine Hemmung von Caspasen (Kim et al., 1997) und eine Aktivierung des sGC/cGMP/PKG-Signaltransduktionsweges (Wang und Robinson, 1997). Li und Whorton (2003) konnten eine Stickstoffmonoxid-induzierte Hemmung der EGF-Rezeptordepshosphorylierung durch Inaktivierung der PTP-1B nachweisen, woraus sich schließen lässt, dass Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmung zu einer Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren führt. Um den Einfluss von NO-Donatoren auf die Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors und auf die neuroprotektiven, Wachstumsfaktor-induzierten Signaltransduktionswege zu untersuchen, wurden hippokampale Kulturen mit verschiedenen NO-Donatoren behandelt, und der Einfluss auf die PI3-K/Akt- und MEK/MAPK- Signalwege untersucht.

Folgende Fragestellungen sollen daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

1. Welchen Einfluss haben PTP-Inhibitoren auf den hochaffinen NGF-Rezeptor TrkA und die nachgeschalteten protektiven Signaltransduktionskaskaden?
2. Sind die NGF-mimetischen Effekte relevant für das Überleben der Neurone? Sind sie dabei abhängig von der Anwesenheit des Wachstumsfaktors?
3. Welche Protein-Tyrosin-Phosphatase ist bei der Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors involviert?
4. Ist die Aktivierung von TrkA, dessen nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden und die vermittelte neuroprotektive Wirkung auch durch NO-Donatoren induzierbar?

2 Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Anlage der primären hippokampalen Zellkulturen wurden embryonale Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld) vom Embryonaltag 18 (E18) verwendet. Die Gewinnung der neuronalen Primärkulturen aus embryonalem Gehirngewebe von Ratten wurde unter Beachtung des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland und den davon abgeleiteten Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Beeinträchtigung der Tiere möglichst gering war und kurz andauerte. Alle Tiere wurden in einem vollklimatisierten Tierstall unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $23 \pm 1^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchte $55 \pm 5\%$, zwölfstündiger Hell-Dunkel Rhythmus) mit freiem Zugang zu Futter (Altromin[®], Lage) und Trinkwasser gehalten.

2.1.2 Pharmaka

8-Bromo-cGMP, Natrium-Salz	Tocris Cookson, Ellisville, USA
Fluothane	Eurim-Pharm Arzneimittel, Piding
K-252a	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
2.5S NGF	Sigma, Taufkirchen
NMDA	Sigma, Taufkirchen
ODQ	Tocris Cookson, Ellisville, USA
SNAP	Sigma, Taufkirchen
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen
UO126	Calbiochem, San Diego, USA
Wortmannin	Calbiochem, San Diego, USA

Folgende Substanzen wurden von Herrn Prof. Kazuo Umezawa von der Abteilung Angewandte Chemie, Fachbereich Naturwissenschaften und Technologie, Keio Universität, Yokohama, Japan, zur Verfügung gestellt:

Et-3,4-dephostatin,
4-O-Me-Et-3,4-dephostatin
Methoxim-3,4-dephostatin

Herr Prof. Zhong-Yin Zhang von der Abteilung Pharmakologie und Biochemie der Albert Einstein Hochschule für Medizin, New York, USA, stellte uns den PTP-1B-Inhibitor

Compound 2

für unsere Studien zur Verfügung.

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

2.1.3.1 Bestandteile der verwendeten Kulturmedien

Antibiotika/Antimykotika-Lösung (10000 I.E. Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin und 25 µg/ml Amphotericin B)	Gibco, Eggenstein
B27 Supplement	Gibco, Eggenstein
Calciumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum	PAA, Marburg
Gentamicinsulfat	Sigma, Taufkirchen
Glukose	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Kälberserum	PAA, Marburg
Kaliumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen

Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
MEM	Gibco, Eggenstein
mit Earle's Salzen, ohne Glutamin und Natriumhydrogencarbonat	
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Sigma, Taufkirchen
Neurobasal TM Medium	Gibco, Eggenstein
Pferdeserum	PAA, Marburg
Phenolrot	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Gibco, Eggenstein
mit L-Glutamin, ohne Natriumhydrogencarbonat	
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

Inhaltsstoffe in mg/ml	MEM	Neurobasal TM	RPMI 1640
Anorganische Salze			
CaCl ₂	200,00	-----	200,00
Ca(NO ₃) ₃ x 4 H ₂ O	-----	100,00	-----
Fe(NO ₃) ₃ x 9 H ₂ O	-----	-----	0,10
KCl	400,00	400,00	400,00
MgCl ₂	-----	-----	77,30
MgSO ₄	97,67	48,84	-----
NaCl	6800,00	6000,00	3000,00
NaHCO ₃	-----	-----	2200,00
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	140,00	-----	125,0
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	-----	-----	125,00
Na ₂ HPO ₄	-----	800,00	-----

Aminosäuren			
L-Alanin	-----	-----	2,00
L-Arginin HCl	126,00	241,86	84,00
L-Asparagin (freie Base)	-----	50,00	-----
L-Asparaginsäure	-----	20,00	0,83
L-Cystin	-----	-----	1,21
L-Cystin x 2 HCl	31,00	65,15	-----
L-Glutamin	-----	300,00	73,50
L-Glutaminsäure	-----	20,00	-----
Glycin	-----	10,00	30,00
L-Histidin (freie Base)	-----	15,00	-----
L-Histidin HCl x H ₂ O	42,00	-----	-----
L-Histidin HCl x 2 H ₂ O	-----	-----	42,00
L-Hydroxyprolin	-----	20,00	-----
L-Isoleucin	52,00	50,00	105,00
L-Leucin	52,00	50,00	105,00
L-Lysin HCl	72,50	40,00	146,00
L-Methionin	15,00	15,00	30,00
L-Phenylalanin	32,00	15,00	66,00
L-Prolin	-----	20,00	7,76
L-Serin	-----	30,00	42,00
L-Threonin	48,00	20,00	95,00
L-Tryptophan	10,00	5,00	16,00
L-Tyrosin	36,00	-----	72,00
L-Tyrosin (Di-Natrium-Salz)	-----	28,94	-----
L-Valin	46,00	20,00	94,00
Vitamine			
d-Biotin	-----	0,20	-----
D-Ca Panthenol	1,00	0,25	4,00
Cholinbitartrat	1,80	-----	-----

Cholinchlorid	-----	3,00	4,00
Folsäure	1,00	1,00	4,00
i-Inositol	2,00	35,00	7,20
Nikotinamid	1,00	1,00	4,00
Para-Aminobenzoessäure	-----	1,00	-----
Pyridoxal HCl	1,00	1,00	4,00
Riboflavin	0,10	0,20	0,40
Thiamin HCl	1,00	1,00	4,00
Vitamin B12	-----	0,005	0,34
Andere Komponenten			
Bernsteinsäure	75,00	-----	-----
D-Glukose	1000,00	2000,00	4500,00
Glutathion (reduziert)	-----	1,00	-----
HEPES	-----	-----	2600,00
Natriumpyruvat	-----	-----	25,00
Natriumsuccinat	100,00	-----	-----
Phenolrot	6,00	5,00	6,00

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien MEM, NeurobasalTM und RPMI 1640

2.1.3.2 Kulturgefäße

Falcon [®] Easy Grip TM Zellkulturschalen 10 x 35 mm	Becton Dickinson Labware, New York, USA
Falcon [®] Easy Grip TM Zellkulturschalen 15 x 60 mm	Becton Dickinson Labware, New York, USA
Falcon [®] Zellkulturflaschen 50 ml mit Schräghals und Gasaustauschkappe (0,2 µm)	Becton Dickinson Labware, New York, USA
Falcon [®] Zellkulturflaschen 250 ml mit Schräghals und Gasaustauschkappe (0,2 µm)	Becton Dickinson Labware, New York, USA

2.1.3.3 Sonstige Materialien in der Zellkultur

Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Cellstar [®] Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar [®] Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Corning [®] Sterilfilter (0,22 µm)	Corning, New York, USA
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Ethanol, 96 %	Lenz Chemie, Westerburg
Millex [®] Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore, Bedford, USA
Natriumtetraborat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenimmin	Sigma, Taufkirchen
Sterilium [®]	Bode Chemie, Hamburg
Trypsin 1:250, aus Schweinepankreas	Sigma, Taufkirchen
Trypsininhibitor Type II-O Chicken egg white	Sigma, Taufkirchen

2.1.4 Materialien zur Bestimmung der neuronalen Apoptose

Axiovert 100	Zeiss, Jena
Axiovert 135 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat x 7 H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
NMDA	Sigma, Taufkirchen
Olympus [®] OM-4Ti	Olympus, Tokio, Japan
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

2.1.5 Materialien für die Proteinbestimmung

BSA-Standard	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
MicroBC Assay System	Interchim, Montlucon, Frankreich
Mikrotiterplatte Nunc-Immuno™	Nunc, Roskilde, Dänemark
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 enthält Microcystin LR, Cantharidin und (-)-p-Bromotetramisol	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 enthält Natriumorthovanadat, Natriumtartrat, Imidazol und Natriummolybdat	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail enthält Aprotinin, Bestatin, Leupeptin, E-64 und Pepstatin A	Sigma, Taufkirchen

2.1.6 Materialien für SDS-PAGE und Western Blotting

Agar	Sigma, Taufkirchen
Amersham ECL Kit	Amersham, Buckinghamshire, England
APS	AppliChem, Gatersleben
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
GBX Developer/Replenisher	Sigma, Taufkirchen
GBX Fixer/Replenisher	Eastman Kodak Company, New York, USA
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Sigma, Taufkirchen

Hybond Nitrocellulosemembran	Amersham, Buckinghamshire, England
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Kodak X-OMAT AR Film	Eastman Kodak Company, New York, USA
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Maus- Antikörper	Amersham, Buckinghamshire, England
Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Maus Antikörper	Promega, Madison, USA
Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Kaninchen- Antikörper	Amersham, Buckinghamshire, England
Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Kaninchen- Antikörper	Promega, Madison, USA
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Monoklonaler anti-NGF-Antikörper	Chemicon International, Hofheim
Monoklonaler anti-phospho-TrkA-Antikörper	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
PMSF	
Polyklonaler anti-Akt-Antikörper	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyklonaler anti-Erk1/2-Antikörper	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyklonaler anti-phospho-Akt-Antikörper	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyklonaler anti-phospho-Erk1/2-Antikörper	Cell Signaling, Beverly, USA
Ponceau S rot	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
PTP-1B, human, rekombinant	Calbiochem, Darmstadt
Rotiphorese [®] 30 (30 % Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	
Salzsäure	Merck, Darmstadt

SDS	Sigma, Taufkirchen
Super Signal West Pico Chemilumiscent Kit	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Sigma, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.7 Materialien für die Immunzytochemie

Biotinylierter anti-Maus-Antikörper, produziert im Pferd	Vector Labs., Burlingame, USA
Biotinylierter anti-Kaninchen-Antikörper, produziert in der Ziege	Vector Labs., Burlingame, USA
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser, 24 mm ø	Kobe, Marburg
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Monoklonaler anti-NGF-Antikörper	Chemicon International, Hofheim
Monoklonaler anti-phospho-TrkA-Antikörper	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA
Monoklonaler anti-Tyrosin-Antikörper	Zymed Labs., San Francisco, USA
Objektträger, 76 x 26 mm	IDL, Nidderau
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Pferdeserum	PAA, Marburg
Polyklonaler anti-phospho-Akt-Antikörper	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyklonaler anti-phospho-Erk1/2-Antikörper	Cell Signaling, Beverly, USA
Streptavidin Orgon Green [®]	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Texas Red [®] anti-Maus-Antikörper, produziert im Pferd	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Texas Red [®] anti-Kaninchen-Antikörper, produziert in der Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Triton [®] X-100	Sigma, Taufkirchen
Ziegenserum	PAA, Marburg

2.1.8 Materialien zur Messung der Phosphataseaktivität

Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Sigma, Taufkirchen
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Mikrotiterplatte Nunc-Immuno [™]	Nunc, Roskilde, Dänemark
p-NPP	Calbiochem, Darmstadt
PTPase, <i>Y. enterocolitica</i> , rekombinant	Calbiochem, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

2.1.9 Materialien zur Messung der NO-Freisetzung

Ethanol, 96 %	Lenz Chemie, Westerburg
Iodosobenzoesäure	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat x 7 H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
NOA 280	Sievers Instruments, Boulder, USA
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg

2.2 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur

Die Vorbereitung der Kulturgefäße, Herstellung der sterilen Kulturmedien und Lösungen, Präparation der embryonalen hippokampalen Primärkultur, Anlage der PC12 und PC12nr5-Zelllinien, Medienwechsel, sowie die Behandlung der Zellkulturen wurden auf einer sterilen Werkbank (Laminar Flow) mit laminar horizontaler (Enviroco C 424 H, Ceag Schirp, Borken) oder vertikaler Luftführung (Lamin Air ELB 2448, Heraeus, Hanau) durchgeführt.

Die für die Zellkultur verwendeten Glasgeräte wurden in einem Trockenschrank für zwei Stunden bei 180°C (TV 40 UT, Memmert, Emmendingen) hitzesterilisiert. Wasser, Schraubdeckel für Flaschen, sowie Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipetten wurden zur Sterilisation 60 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert (HICLAVE HV-110 L, HMC, Tokio Japan). Die Herstellung wässriger Lösungen erfolgte mit Reinstwasser (Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg). Für die Sterilisation von Lösungen wurden Millex[®] Sterilfilter (Millipore, Bedford, USA) mit 0,22 µm Porengröße und für Volumina größer 50 ml Corning[®] Einmal-Vakuum-Filter (Corning, New York, USA) mit einer Porengröße von 0,22 µm verwendet.

Das Präparierbesteck zum Anlegen der hippokampalen Neuronenkulturen wurde mindestens 30 min in 70 %igen Ethanol eingelegt. Alle Basislösungen zur Herstellung der Kulturmedien sind steril bezogen worden. Zellkulturmedien wurden vor ihrer Verwendung in einem Wasserbad auf 37° erwärmt. Die Kultivierung der primären hippokampalen Zellkulturen der PC12 und PC12nr5-Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank (Wärmebrutschrank BB 16, Heraeus, Hanau) bei 37°C in einer Atmosphäre aus 95 % Luft/5 % CO₂ bei 90 bis 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

2.3 Anlage und Kultivierung von Primärkulturen

Die Anlage und Kultivierung von embryonalen, hippokampalen Neuronen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Mattson et al., 1993.

Vorbereitung der Kulturschalen

Um eine bessere Haftung der Zellen auf dem Boden der Kulturgefäße zu erreichen, wurden die Kulturschalen einen Tag vor der Präparation mit einer PEI-(Polyethylenimin)-Beschichtungslösung nach folgender Methode und Zusammensetzung beschichtet:

Boratpuffer

Borsäure	1,24 g
Natriumtetraborat	1,9 g
H ₂ O	ad 400 ml
pH 8,4 (eingestellt mit NaOH)	

PEI 5 %

PEI (50 %) 1:10 mit H₂O verdünnen

PEI-Beschichtungslösung

PEI 5 %	0,4 ml
Boratpuffer	ad 400 ml

Jeweils 1,5 (Ø 35 mm) bzw. 2 ml (Ø 60 mm) der PEI-Beschichtungslösung wurden 2 h auf die Kulturschalen gegeben. Anschließend wurde die PEI-Beschichtungslösung abgesaugt und die Kulturschalen dreimal mit 1,5 bis 2 ml sterilem Wasser gespült. Die geöffneten Kulturschalen wurden unter der sterilen Werkbank 30 min mit UV-Licht bestrahlt. Auf die sterilen Kulturschalen wurde MEM-(Minimal Essential Medium)-Lösung gegeben (Ø 35 mm: 1 ml, Ø 60 mm: 2 ml) und über Nacht bei 37°C und in einer Atmosphäre aus 95 % Luft/5 % CO₂ bei 90 bis 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank aufbewahrt.

Präparation embryonaler, hippokampaler Primärkulturen

Die Präparation wurde unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle verwendeten Instrumente, das Präparationsbesteck, die Stereolupe, Trypsin und Trypsininhibitor, sowie verwendete Kulturschalen wurden zuvor 20 min mit UV-Licht bestrahlt.

Zur Anlage der Kulturen wurden die Hippokampi von embryonalen Sprague-Dawley Ratten herangezogen. Weibliche Sprague-Dawley Ratten, Gestationstag 18 wurden mit Halothan tief narkotisiert, durch Genickbruch getötet und mit 70 %igen Ethanol desinfiziert. Nach Öffnen des Abdomens mit einer chirurgischen Schere wurde der Uterus entnommen und in eine sterilisierte Kulturschale (Ø 90 mm) gelegt. Die Embryonen wurden aus dem Uterus entnommen und dekapitiert. Die Gehirne wurden mit einer Schere und einer Pinzette vorsichtig frei präpariert und in mit kalten HBSS (Hank's Buffered Saline Solution) befüllten Kulturschalen überführt. Anschließend wurden die Hippokampi unter einer Stereolupe sezirt und 15 min mit einer Trypsinlösung (1 mg/ml in HBSS) behandelt. Nach Verwerfen des Überstandes und einmaligem Spülen mit 10 ml HBSS wurden die Hippokampi mit einer Trypsininhibitor-Lösung (1 mg/ml in HBSS) inkubiert und danach zweimal mit 10 ml HBSS gewaschen. Mit Hilfe einer Glaspipette wurden die Hippokampi mehrfach luftblasenfrei trituriert bis eine einheitliche Zellsuspension entstand. Die Zellzahl pro ml wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Anlage der Zellkultur wurde eine berechnete Menge der Zellsuspension in die mit MEM befüllten Kulturschalen gegeben, so dass folgende Aussaatdichte erreicht wurde:

2,0 x 10⁴ Zellen/cm² für die in der Immunzytochemie verwendeten Kulturschalen

2,5 x 10⁴ Zellen/cm² für die zur Bestimmung der neuronalen Apoptose verwendeten Kulturschalen und

3,0 x 10⁴ Zellen/cm² für die zur Proteinsammlung verwendeten Kulturschalen.

Die Kultivierung der hippokampalen Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, in einer Atmosphäre von 95 % Luft/5 % CO₂ und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 bis 95 %. Nach 6 h wurde das MEM-Medium abgesaugt, die Primärkulturen einmal mit Neurobasalmedium (NBS) gewaschen und bis zur Behandlung in Neurobasalmedium unter oben beschriebenen Bedingungen im Brutschrank gelagert. Am 5. Kulturtag erfolgte ein Medienwechsel.

Alle Kulturmedien wurden zuvor in einem Wasserbad auf 37°C temperiert, bevor die Zellen damit inkubiert wurden.

*Kulturmedien für hippocampale Neuronenkulturen***HBSS (10 x)**

KCl	4 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
NaCl	80 g
NaHCO ₃	3,5 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,6 g
Glukose	10 g
Phenolrot	0,1 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,2 (eingestellt mit HCl)	

HBSS

Gentamicinsulfat	5 mg
HEPES	1,2 g
HBSS (10 x)	50 ml
H ₂ O	ad 500 ml
pH 7,2 (eingestellt mit HCl)	

MEM - Medium

MEM	4,685 g
HEPES	0,119 g
Glukose	5 g
NaHCO ₃	1,1 g
KCl	0,605 g
Natriumpyruvat	0,06 g
L-Glutamin	0,088 g
Gentamicinsulfat	5 mg
Fötale Kälberserum	50 ml
H ₂ O	ad 500 ml
pH 7,2	

Neurobasalmedium

HEPES	0,573 g
L-Glutamin	0,088 g
Gentamicinsulfat	5 mg
B27 Supplement	10 ml
Neurobasalmedium	500 ml
pH 7,2 (eingestellt mit NaOH)	

2.3.1 Staurosporinschädigung von hippokampalen Primärkulturen

Zur Induktion der neuronalen Apoptose wurde Staurosporin (STS; Abb. 2.1), ein nicht-selektiver Proteinkinase-Inhibitor (Lazarovici et al., 1997a), verwendet.

Staurosporin wurde als 1 mM Stammlösung bei -20°C – in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst – aufbewahrt. Nachdem die Neuronenkulturen mit den entsprechenden Pharmaka vorbehandelt worden waren, wurde die Staurosporinstammlösung 1:100 in Neurobasal gelöst und anschließend in einem Verdünnungsschritt von 1:500 auf die Neuronenkulturen gegeben. Hierdurch ergab sich eine Endkonzentration von 200 nM Staurosporin. Vierundzwanzig Stunden später wurde die Behandlung gestoppt und eine Färbung des Zellkernes mit Hoechst 33258 (siehe Punkt 2.3.3) durchgeführt.

Kontrollkulturen unterlagen den gleichen Behandlungsschritten wurden aber ausschließlich mit Staurosporin-freiem Neurobasalmedium behandelt.

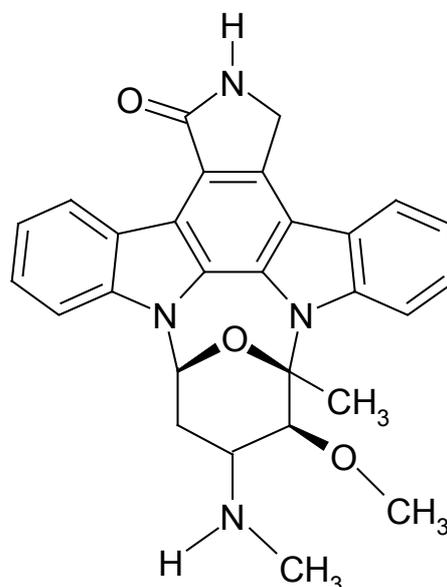


Abb. 2.1: Strukturformel von Staurosporin.

2.3.2 NMDA-Schädigung von hippokampalen Neuronenkulturen

Hippokampale Kulturen wurden durch eine Inkubation mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA; Abb. 2.2) über die exzitotoxische Stimulation des NMDA-Rezeptors mit nachfolgendem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration geschädigt.

Hierzu wurde das Neurobasalmedium abgesaugt und die Kulturen einmal mit Locke's Lösung gewaschen und mit den entsprechenden Pharmaka in Locke's Lösung behandelt. Anschließend wurden die Kulturen in einer Locke's Lösung inkubiert, die 10 μM NMDA enthielt. Vierundzwanzig Stunden später wurde die Behandlung gestoppt und eine Hoechst-Färbung (siehe Punkt 2.3.3) durchgeführt.

Kontrollkulturen unterlagen den gleichen Behandlungsschritten, wurden aber ausschließlich mit NMDA-freier Locke's Lösung behandelt.

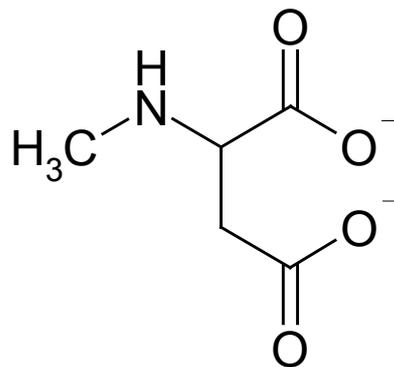


Abb. 2.2 : Strukturformel von NMDA

Locke's Lösung

NaCl	4,495 g
Glukose	0,9 g
HEPES	0,595 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,169 g
KCl	0,208 g
NaHCO_3	0,501 g
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,102 g
Phenolrot	5 mg
Gentamicin	5 mg
H_2O	ad 500 ml
pH 7,2 (eingestellt mit HCl)	

2.3.3 Bestimmung der neuronalen Apoptose

Hoechst 33258, ein lipophiler, kationischer Farbstoff durchdringt die Zellmembran von intakten und geschädigten Zellen und färbt die DNS des Nucleus durch eine Bindung an AT-reichen Sequenzen an (Araki et al., 1985; Labarca und Paigen, 1980; Latt und Stetten, 1976; Latt und Wohlleb, 1975). Die Hoechst-Färbung erlaubt die Erkennung apoptotischer Zellen, die einen pyknotisch geschrumpften oder fragmentierten Zellkern mit kondensiertem Chromatin aufweisen. Von diesen apoptotisch veränderten Zellkernen mit starker Fluoreszenz lassen sich ungeschädigte Zellen mit intaktem Nucleus schwacher Fluoreszenz und unverändertem Chromatin leicht unterscheiden.

Zwanzig Stunden nach Staurosporin- oder NMDA-Behandlung wurden die Kulturen einmal mit eisgekühlter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und anschließend 30 min mit Methanol fixiert. Danach wurde 1 ml des Hoechstfarbstoffes 33258 (Abb. 2.3), gelöst zu einer Konzentration von 10 µg/ml in Methanol, auf die Kulturen gegeben. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde die Kernmorphologie unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die Neuronenkulturen nach oben erwähnten Kriterien ausgezählt. Zur Auswertung des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen wurden mindestens 8 Stellen und 200 Zellkerne pro Kulturschale ausgezählt. Die Analyse der Neuronenschädigung erfolgte ohne Kenntnis der Behandlung.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der neuronalen Apoptose (Abb. 2.4) wurden die Zellen wie oben beschrieben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 angefärbt. Anschließend erfolgte die Dokumentation mit einem konfokalen Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop mit einem 40 x Immersionsöl-Objektiv bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 bis 520 nm.

PBS-Lösung

KH ₂ PO ₄	0,144 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,526 g
NaCl	9 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)	

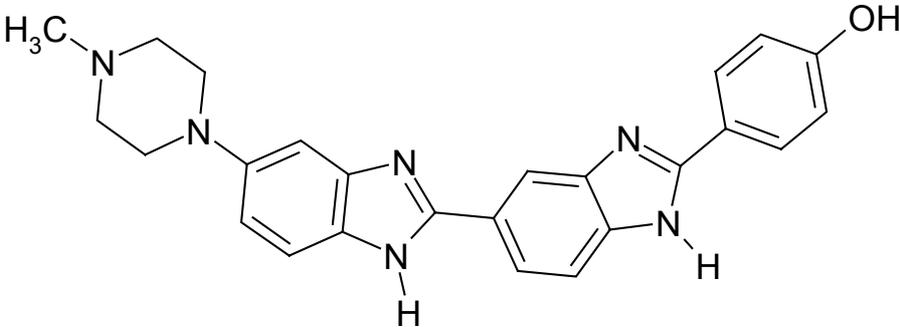


Abb. 2.3: Strukturformel des Kernfarbstoffs Hoechst 33258.

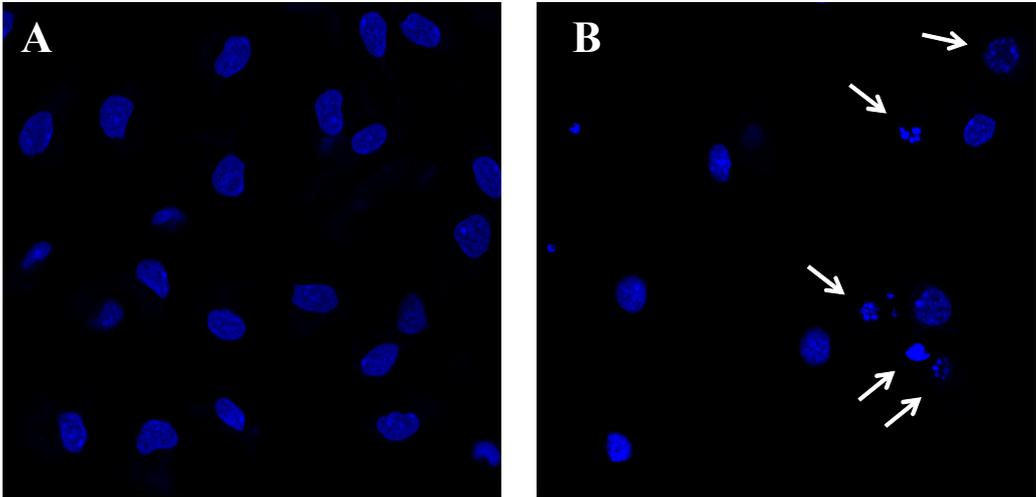


Abb. 2.4: Kerne lebender und apoptotischer Zellen nach Hoechstfärbung

2.4 Anlegen und Kultivierung von PC12- und PC12nr5-Zelllinien

Die Phäochromozytomzelllinien PC12 und PC12nr5, die kein TrkA exprimieren, wurden in RPMI 1640+ Medium in Falcon[®] Zellkulturflaschen (250 ml) kultiviert. Alle 2 Tage erfolgte ein Medienwechsel. Sobald die Zellen in den Gewebekulturflaschen bis zur Konfluenz proliferiert waren, wurden die Zellen 1:2 oder 1:3 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen einmal mit 10 ml RPMI 1640 Medium gewaschen und 5 min bei 37°C mit 5 ml trypsinhaltigem (0,5 mg/ml) RPMI 1640 Medium inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Cellstar[®] Röhrchen überführt, mit RPMI 1640+ Medium ad 15 ml aufgefüllt und 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 3 ml RPMI 1640+ Medium mit einer Pasteurpipette trituriert und in mit 10 ml RPMI 1640+ Medium befüllten Falcon[®] Zellkulturflaschen (250 ml) überführt. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die Zellen in Cryoröhrchen in Einfriermedium einen Tag bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Alle Medien, die mit den Zellen in Kontakt traten, wurden zuvor in einem Wasserbad auf 37°C temperiert.

RPMI 1640 Medium

Antibiotika/Antimykotika-Lösung	5 ml
L-Glutamin	5 ml
RPMI 1640 Medium	ad 500 ml

RPMI 1640+ Medium

Antibiotika/Antimykotika-Lösung	5 ml
L-Glutamin	5 ml
Pferdeserum	50 ml
Kälberserum	10 ml
RPMI 1640 Medium	ad 500 ml

Einfriermedium

DMSO	1 ml
Antibiotika/Antimykotika-Lösung	0,1 ml
L-Glutamin	0,1 ml
RPMI 1640 Medium	ad 10 ml

2.5 Proteinbestimmung**2.5.1 Proteinextraktion aus hippokampalen Primärkulturen**

Für die Proteinextraktion wurden die Neuronenkulturen nach der Behandlung einmal mit eiskaltem Homogenisierungspuffer gewaschen und dann mit Hilfe eines Zellschabers in eiskaltem Homogenisierungspuffer + Inhibitoren gesammelt. Zum Aufschließen der Zellen wurde die Zellsuspension 5 sec mit Ultraschall behandelt oder zehnmal mit einer 24 G Injektionsnadel trituriert und anschließend 6 min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Verwendung für die Immunoblotanalyse bei -80°C eingefroren.

Homogenisierungspuffer

NaCl	87,75 mg
Tris	24,25 mg
EGTA	3,8 mg
Na ₃ VO ₄ -Lösung (1 mM)	10 ml
pH 7,4 (eingestellt mit HCl)	

Herstellung der Na₃VO₄-Lösung → *siehe 2.10*

Homogenisierungspuffer + Inhibitoren

Phosphatase Inhibitor Cocktail I	10 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	10 µl
Protease Inhibitor Cocktail	10 µl
Homogenisierungspuffer	ad 1 ml

2.5.2 Proteinextraktion aus PC12 und PC12nr5-Zelllinien

Wie bei den embryonalen hippokampalen Neuronenkulturen wurden die PC12 und PC12nr5-Zellen nach der Behandlung einmal mit eiskaltem Homogenisierungspuffer gewaschen und dann mit Hilfe eines Zellschabers in eiskaltem Homogenisierungspuffer + Inhibitoren gesammelt. Zum Aufschließen der Zellen wurde die Zellsuspension zehnmal mit einer 24 G Injektionsnadel trituriert und anschließend 6 min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Verwendung für die Immunoblotanalyse bei -80°C eingefroren.

Homogenisierungspuffer → siehe 2.5.1

Homogenisierungspuffer + Inhibitoren → siehe 2.5.1

2.5.3 Bestimmung der Proteinmenge

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde mit Hilfe des Pierce BCA-Kits photometrisch bestimmt. Hierzu wurden 5 µl des Zellextraktes in 95 µl PBS gelöst und BSA-(Bovine Serum Albumine)-Standardlösungen aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml) in Konzentrationen von 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 und 0,5 µg/µl PBS zur Erstellung der Eichgerade hergestellt. Zu 100 µl der so hergestellten Proteinlösungen wurden 500 µl der frischen und nach Vorschrift hergestellten BCA-Lösung pipetiert und anschließend 30 min bei 60°C inkubiert. 150 µl jeder Probe und der Standardproben wurden auf eine Mikrotiterplatte übertragen und bei 570 nm photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentrationen der vermessenen Zellextrakte wurden mit Hilfe der Standardproben und des Verdünnungsfaktors berechnet. Sie betragen üblicherweise 1 bis 5 mg/ml.

PBS-Lösung → siehe 2.3.3

2.6 SDS-PAGE und Western Blotting

2.6.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Die SDS-(Sodium dodecylsulfate)-Polyacrylamidgele unterschiedlicher Konzentrationen wurden nach folgender Zusammensetzung hergestellt:

APS (10 %)

APS	100 mg
H ₂ O	ad 1 ml

Sammelgel (für 10 Gele)

Rotiphorese [®] 30	3 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
H ₂ O	12 ml
TEMED	30 µl
APS (10 %)	120 µl

Sammelgelpuffer

Tris	60,5 g
SDS	4 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 6,8 (eingestellt mit HCl)	

Trenngel (7,5 %, für 10 Gele)

Rotiphorese [®] 30	15 ml
Trenngelpuffer	15 ml
H ₂ O	30 ml
TEMED	50 µl
APS (10 %)	200 µl

Trenngel (12,5 %, für 10 Gele)

Rotiphorese [®] 30	25 ml
Trenngelpuffer	15 ml
H ₂ O	20 ml
TEMED	50 µl
APS (10 %)	200 µl

Trenngelpuffer

Tris	182 g
SDS	4 g
H ₂ O	ad 1000 ml

pH 8,8 (eingestellt mit HCl)

2.6.2 SDS-PAGE

Die bei -80°C eingefrorenen Zellextrakte wurden auf Eis aufgetaut. Zur Analyse der Proteinregulation wurden gleiche Proteinmengen (30-100 µg/Bahn) mit Probenpuffer im Verhältnis 1:5 versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt.

Probenpuffer

Tris	157,5 mg
SDS	1 g
2-Mercaptoethanol	1 ml
Glycerin	2 ml
Bromphenolblau	6 mg

pH 6,8 (eingestellt mit HCl vor Bromphenolblauzugabe)

Elektrophoresepuffer

Tris	3 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml

2.6.3 Western Blotting

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Gel in Transferpuffer gewaschen und eine Nitrocellulosemembran in Transferpuffer eingelegt. Das Gel, die Nitrocellulosemembran und das Whatman-Papier wurden wie folgt in die Blotting-Apparatur übertragen:



Die Proteine wurden bei 6 Watt für 75 min (bei 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen) bzw. für 50 min (bei 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen) auf die Nitrocellulosemembran übertragen und danach mittels Ponceau Rot-Lösung angefärbt und fixiert. Die Nitrocellulosemembran wurde dreimal mit TTBS gewaschen und entfärbt, 60 min mit Blockpuffer (5 % Magermilchpulver in TTBS) bei Raumtemperatur behandelt und anschließend bei 4°C mit den entsprechenden primären Antikörpern - gelöst in Blockpuffer – über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TTBS wurde die Nitrocellulosemembran für 90 min bei Raumtemperatur mit entsprechenden Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörpern inkubiert, anschließend drei- bis viermal mit TTBS gewaschen und dann 90 sec mit Chemilumineszenz-Lösung (ECL-Lösung) inkubiert, um die spezifischen Signale durch eine Exposition mit einem Kodak-Film in einer Dunkelkammer sichtbar zu machen. Die Expositionszeit hing von der jeweiligen Stärke der erreichten Signale ab. Der belichtete Film wurde in Entwicklerlösung gelegt, kurz in Wasser gewaschen, mit Fixierlösung fixiert, erneut gewaschen und getrocknet.

Blockpuffer und verwendete Antikörper

Die Zusammensetzung des Blockpuffers wurde abhängig von den primären und von den sekundären Antikörpern gewählt:

Primäre Antikörper:

Monoklonaler anti-phospho-TrkA-Antikörper (1:500) in 5 % Magermilchpulver in TTBS

Polyklonaler anti-Akt-Antikörper (1:1000) in 5 % BSA in TTBS

Polyklonaler anti-Erk1/2-Antikörper (1:1000) in 5 % BSA in TTBS

Polyklonaler anti-phospho-Akt-Antikörper (1:1000) in 5 % BSA in TTBS

Polyklonaler anti-phospho-Erk1/2-Antikörper (1:1000) in 5 % BSA in TTBS

Sekundäre Antikörper:

Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Maus-Antikörper (Amersham, 1:2000) in 5 % BSA in TTBS

Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Maus-Antikörper (Promega, 1:2000) in 5 % Magermilchpulver in TTBS

Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper (Amersham, 1:2000) in 5 % BSA in TTBS

Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper (Promega, 1:2000) in 5 % Magermilchpulver in TTBS

Ponceau Rot-Lösung

Ponceau S rot 2 g

Trichloressigsäure 15 g

H₂O ad 1000 ml

Transferpuffer

Tris 3,027 g

Glycin 14,4 g

Methanol 100 ml

H₂O ad 1000 ml

TTBS

Tris	1,211 g
NaCl	8,765 g
Tween 20	1 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

pH 7,5 (eingestellt mit HCl)

2.6.4 PTP-1B Behandlung

Die PC12-Zellen wurden gemäß Punkt 2.4 angelegt und kultiviert. Konfluente Kulturen wurden 10 min mit 2.5S NGF behandelt und eine Proteinextraktion (2.5.2) mit unten aufgeführtem Homogenisierungspuffer durchgeführt. Um den Einfluss der PTP-1B auf die TrkA-Phosphorylierung zu messen, wurden unterschiedliche Magnesiumchloridlösungen (20 – 100 mM in H₂O) und der PTP-1B Puffer vorgelegt. Anschließend wurden nacheinander die PC12-Zellextrakte und die PTP-1B zugesetzt. Die angegebenen Einheiten (U) beziehen sich dabei jeweils auf einen Reaktionsansatz. Der so erhaltene Reaktionsansatz wurde 15 bis 60 min bei 37°C inkubiert, mit Probenpuffer 5 min bei 95°C erhitzt und eine Immunoblotanalyse gemäß Punkt 2.6.1 bis 2.6.3 durchgeführt.

Die Aktivität der PTP-1B betrug ≥ 50 U/mg Protein. Dabei entspricht eine Aktivitätseinheit PTP-1B der Menge des Enzyms in mg, die 1,0 μ mol des PTP-1B Substrats (Calbiochem, 539737) bei einer Temperatur von 30°C und einem pH-Wert von 7,2 sowie einer Ausgangskonzentration von 150 μ mol Substrat in einer Minute umsetzt.

PTP-1B Puffer

Dithiothreitol	1 mM
EDTA	1 mM
HEPES	50 mM
NP-40	0,05 %

pH 7,2 (eingestellt mit HCl)

Probenpuffer → siehe 2.6.2

Homogenisierungspuffer

NaCl	87,75 mg
Tris	24,25 mg
EGTA	3,8 mg
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	10 μ l
Protease Inhibitor Cocktail	10 μ l
H ₂ O	10 ml
pH 7,4 (eingestellt mit HCl)	

2.7 Immunzytochemie

Die auf Deckgläschen (\varnothing 24 mm) in Falcon[®] Easy Grip[™] Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm) kultivierten Zellen wurden nach Behandlung 30 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS 30 min bei Raumtemperatur fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und dann zur Permeabilisierung 5 min mit 0,2 % Triton[®] X-100 in PBS behandelt. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 30 min bei Raumtemperatur in Blockpuffer (PBS mit 5 % Pferdeserum für monoklonale Antikörper und PBS mit 5 % Ziegen Serum für polyklonale Antikörper) inkubiert. Über Nacht wurden die Zellen mit einer Lösung des primären Antikörpers (1:100 bis 1:200) im entsprechenden Blockpuffer bei 4°C behandelt, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und 60 min in einer Lösung aus Blockpuffer und entsprechendem biotinyliertem anti-Maus- bzw. biotinyliertem anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde den Zellen für 60 min eine Lösung aus dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green[®] in PBS (6 μ l/ml PBS) zugesetzt. Anstelle der biotinylierten sekundären Antikörper und des Fluoreszenzfarbstoffes Streptavidin Oregon Green[®] wurden bei diversen Experimenten die an die entsprechenden sekundären Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe Texas Red[®] anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-Antikörper in Blockpuffer (1:100 bis 1:200) für 60 min auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde das Deckgläschen mit den angefärbten Zellen auf einen Glasobjektträger aufgebracht und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Die Immunreaktivität wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mit einem 40 x Immersionsöl-Objektiv bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (für Oregon Green[®]) bzw. von 543 nm (für die Texas Red[®] Antikörper) und einer Emissionswellenlänge von 505 bis 550 nm (für Oregon Green[®]) bzw. größer 585 nm (für die Texas Red[®] Antikörper) dokumentiert.

Alle fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen eines Versuches wurden mit der gleichen Laserintensität und der gleichen Detektorsensitivität aufgenommen, um die Immunreaktivität zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen vergleichen zu können.

PBS-Lösung → siehe 2.3.3

2.8 Phosphataseaktivitätsmessung

Dem Test lag standardmäßig folgender Reaktionsansatz zu Grunde:

Reaktionspuffer:	10 μ l
Substrat (5 mg pNPP/ml H ₂ O)	10 μ l
Enzym (PTPase, <i>Y. enterocolitica</i> , rekombinant, 1 U/ μ l.)	10 μ l
DMSO oder Testsubstanz	10 μ l
H ₂ O	60 μ l

Reaktionspuffer

Tris	200 mM
Glycerol	10 %
Mercaptoethanol	1 %
pH 7,5 (eingestellt mit HCl)	

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats gestartet, 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 25 μ l 13 %iger K₂HPO₄-Lösung gestoppt. 100 μ l dieser so erhaltenen Lösung wurden auf eine Mikrotiterplatte übertragen und bei 405 nm photometrisch vermessen.

Die gemessenen Aktivitäten wurden – bezogen auf den Kontrollwert (DMSO statt Testsubstanz) – in Anteilen von Hundert umgerechnet. Allen Werten wurde der Basiswert der Aktivität (H₂O statt Substrat) abgezogen.

Wenn nicht anders angegeben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und durch mindestens zwei weitere Tests verifiziert.

2.9 Messung der NO-Freisetzung

Die Messung der NO-Freisetzung aus den Dephostatin-Derivaten Ethyl-3,4-dephostatin, 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin und Methoxim-3,4-dephostatin erfolgte am Institut für Pharmazeutische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg durch Frau Bianca Rickerts unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein.

Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Iodosobenzen	(6 mM, gelöst in 1 M NaOH-Lösung)	200 µl
Dephostatin-Derivat	(6 mM, gelöst in Ethanol)	200 µl
PBS		ad 2 ml

Iodosobenzen wurde nach der Methode von Lucas et al. (1995) aus Iodosobenzoessäure hergestellt.

Das Reaktionsvolumen betrug 2 ml und die Reaktion lief bei 37°C unter anaeroben Bedingungen und unter ständigem Umrühren ab. Zwanzig Stunden später wurde 1 ml der sich über der Reaktionslösung befindlichen Gasphase mittels einer Glasspritze in den NO-Analysator (NOA 280) übertragen und das freigesetzte Stickstoffoxid mittels Reaktion mit Ozon chemiluminometrisch vermessen.

PBS-Lösung → siehe 2.3.3

2.10 Herstellung der Natriumorthovanadat-Lösung

Die Herstellung einer Stammlösung (1 mM) von Natriumorthovanadat erfolgte nach einer modifizierten Methode von Gordon (1991). Hierzu wurden 183,9 mg Natriumorthovanadat in einem Liter demineralisiertem Wasser gelöst. Mit einer 1-normalen Salzsäure-Lösung wurde anschließend der pH-Wert auf 10,0 eingestellt. Eine auftretende Gelbfärbung resultiert aus einer Polymerisierung von Orthovanadat zu Decavanadat. Durch Kochen der Lösung bildeten sich wieder Orthovanadatmonomere, gleichzeitig entfärbte sich die Lösung. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der pH-Wert erneut mit einer 1-normalen Salzsäure-Lösung auf 10,0 eingestellt. Die Stammlösung wurde bei 4° C aufbewahrt.

2.11 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (S.D.) aus n Versuchen angegeben. Für die Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), kombiniert mit dem Scheffé-Test durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde wie folgt dargestellt:

Irrtumswahrscheinlichkeit	Symbol
$p < 0,05$	*
$p < 0,01$	**
$p < 0,001$	***

3 Ergebnisse

3.1 Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmung durch Natriumorthovanadat induziert NGF-vermittelte neuroprotektive Effekte

3.1.1 Natriumorthovanadat als Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor

Orthovanadat wird in zahlreichen Literaturstellen als unspezifischer Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor beschrieben (Leis und Kaplan, 1982). Um zu testen, ob und bei welcher Konzentration eine Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch die unter Punkt 2.10 hergestellten Natriumorthovanadat-Lösung auftritt, erfolgte die Phosphataseaktivitätsmessung der rekombinanten PTP aus *Yersinia enterocolitica* mit dem unter Punkt 2.8 beschriebenen pNPP-Assay.

Abbildung 3.1 zeigt, dass 100 nM Natriumorthovanadat zu einer Reduzierung der Phosphataseaktivität auf 57 % führten. 1 und 10 μ M Natriumorthovanadat reduzierten die Aktivität der PTP auf 15 bzw. 5 % des Ausgangswertes.

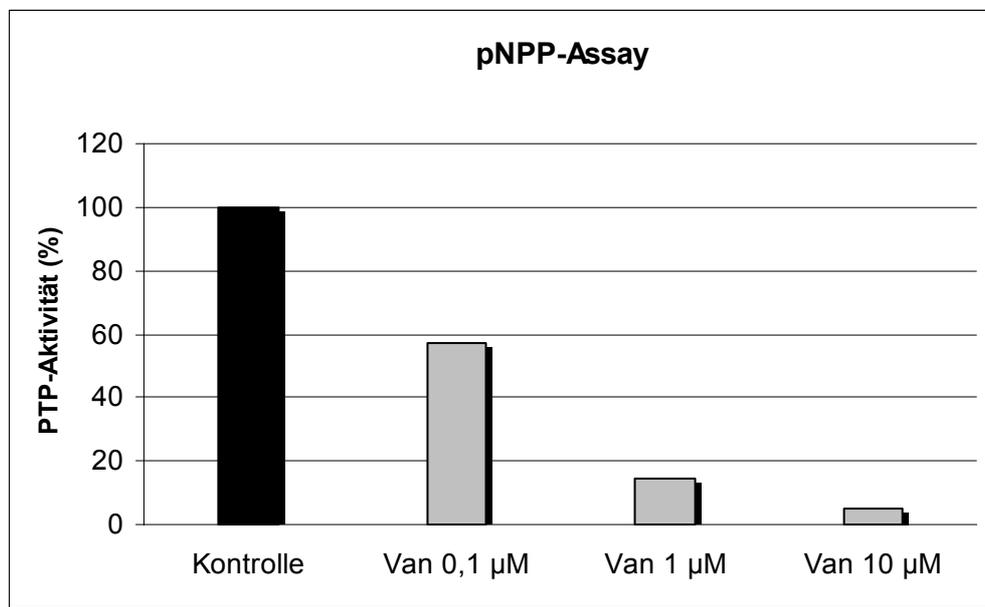


Abb. 3.1: Konzentrationsabhängige Hemmung der PTP-Aktivität durch Natriumorthovanadat
Orthovanadat (Van, 0,1 – 10 μ M) senkt die Aktivität der rekombinanten PTP aus *Yersinia enterocolitica* konzentrationsabhängig. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 37°C. Der Kontrollwert wurde in Abwesenheit von Natriumorthovanadat gemessen und auf 100 % gesetzt.

3.1.2 Erhöhung des Phosphorylierungsgrades des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA durch Natriumorthovanadat

Nachdem in vorhergehenden Versuchen in unserem Labor gezeigt werden konnte, dass der hochaffine NGF-Rezeptor in hippokampalen Rattenkulturen exprimiert ist (Culmsee et al., 2002), wurde in den folgenden Experimenten der Frage nachgegangen, ob durch Hemmung der PTP eine Steigerung des Phosphorylierungsgrades am TrkA-Rezeptor erreicht werden konnte.

3.1.2.1 Orthovanadat erhöht den Phosphorylierungsgrad von Tyrosinresten

Wie der folgende Versuch belegte, zeigte sich eine transiente Steigerung des Phosphorylierungsgrades an Tyrosinresten nach einer Behandlung mit Orthovanadat. Hierzu wurden hippokampale Neurone der Ratte unterschiedlich lange mit dem PTP-Inhibitor Orthovanadat (1 μM) inkubiert und anschließend mittels Immunzytochemie am konfokalen Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop vermessen. In Abbildung 3.2 ist zu sehen, dass eine Steigerung der Tyrosinphosphorylierung bereits nach 10 min zu verzeichnen ist und nach 1 h wieder abnimmt. Nach einer Vorbehandlungszeit mit Orthovanadat von 3 h war keine verstärkte Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle mehr zu sehen.

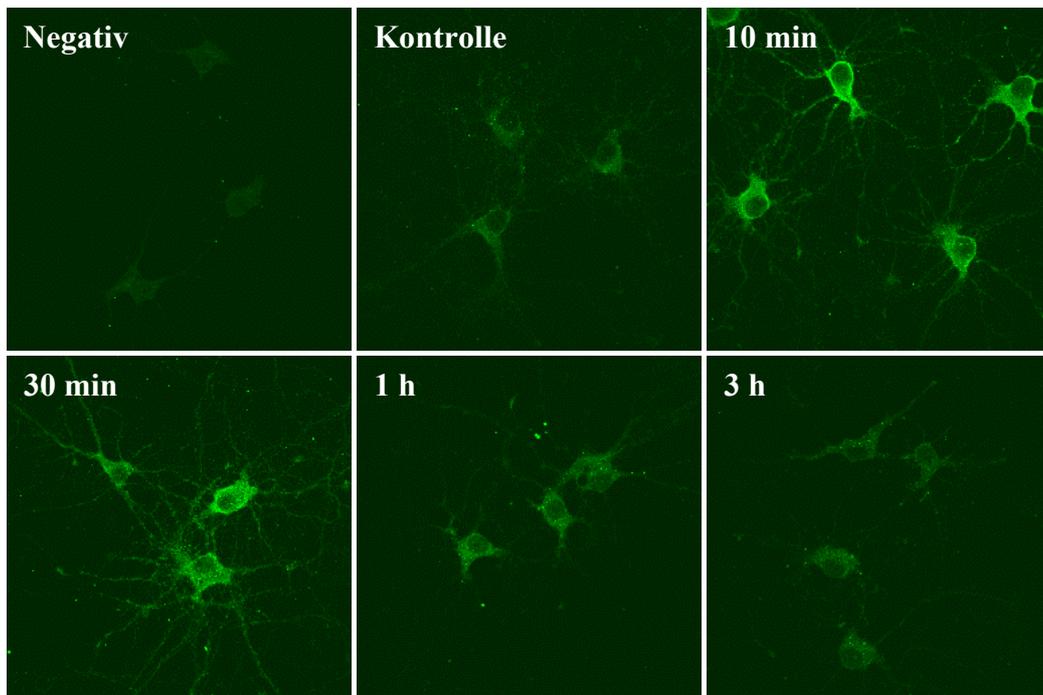


Abb. 3.2: Transiente Phosphorylierung von Tyrosinresten nach Orthovanadatbehandlung

Messungen mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop zeigen eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung nach Behandlung mit Orthovanadat ($1 \mu\text{M}$) für unterschiedliche Behandlungszeiten (10 min – 3 h). Als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, bei denen während der Immunzytochemie der Primärantikörper weggelassen wurde. Kontrollen sind mit Vehikel (H_2O) anstatt Orthovanadat behandelt worden.

3.1.2.2 Orthovanadat-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in PC12-Zellen

Auf Grundlage obiger Befunde wurde als nächstes der Einfluss von Orthovanadat auf den Phosphorylierungsgrad des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine Behandlung von PC12-Zellen mit dem PTP-Inhibitor Orthovanadat ($1 \mu\text{M}$) zu einer transienten Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors führt (Abb. 3.3). So zeigen die Zellen im Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop eine verstärkte Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors bereits 10 min nach Orthovanadatbehandlung. Dieser Anstieg war auch noch bei Inkubationszeiten von bis zu 1 h zu sehen, wohingegen nach 6 h wieder Kontrollniveau erreicht wurde.

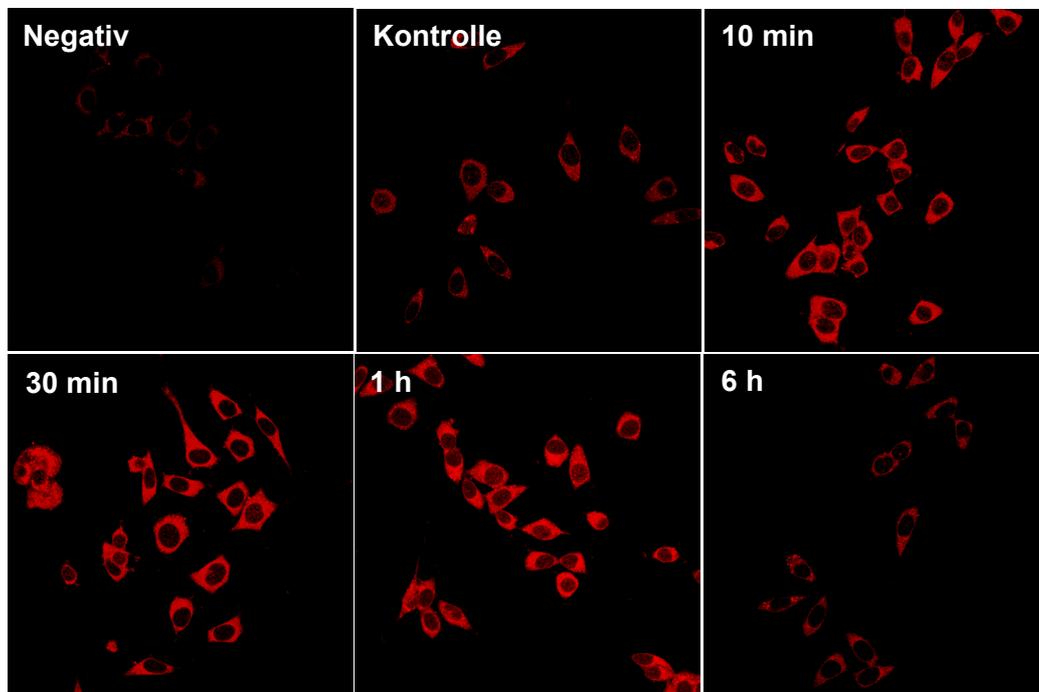


Abb. 3.3: Transiente TrkA-Phosphorylierung in PC12-Zellen nach Orthovanadatbehandlung
Transiente Phosphorylierung von TrkA wurde mittels Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Orthovanadat ($1 \mu\text{M}$) gemessen. Ein Anstieg der Phosphorylierung konnte innerhalb von 10 min nach Inkubation mit dem PTP-Inhibitor nachgewiesen werden. Nach 6 h nahm die phospho-TrkA-Menge wieder bis auf das Kontrollniveau ab. Negativkontrollen wurden unter Weglassen des Primärantikörpers vermessen. Kontrollen wurden mit Vehikel (H_2O) anstatt Orthovanadat behandelt.

Um die Spezifität des monoklonalen phospho-TrkA-Antikörpers zu überprüfen, wurde ein Western Blot mit Proteinextrakten von PC12- und PC12nnr5-Zellen, welche den TrkA Rezeptor nicht exprimieren (Lazarovici et al., 1997b; Loeb und Greene, 1993), durchgeführt. Abbildung 3.4 zeigt, dass im Gegensatz zu den PC12-Zellen bei den PC12nnr5-Zellen kein phospho-TrkA detektierbar war.

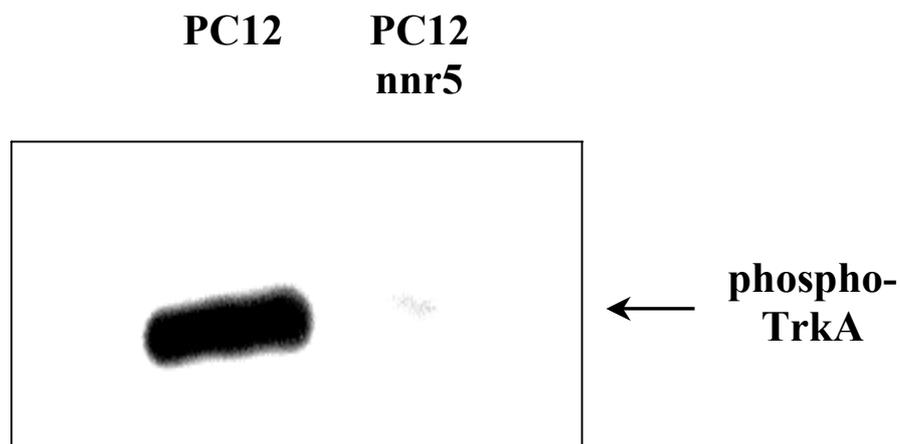


Abb. 3.4: Überprüfung der Spezifität des monoklonalen phospho-TrkA-Antikörpers

Die Spezifität des monoklonalen phospho-TrkA-Antikörpers wurde mit Hilfe der Immunoblotanalyse nachgewiesen. Ein phospho-TrkA Signal war nur bei den PC12-Zellen zu sehen, während bei den PC12nnr5-Zellen kein Signal detektierbar war.

3.1.2.3 Orthovanadat-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in embryonalen, hippokampalen Neuronen

Eine verstärkte TrkA-Phosphorylierung war nicht nur in PC12-Zellen immunzytochemisch zu messen, sondern auch in hippokampalen Rattenneuronen. Wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, führte Orthovanadat ($1 \mu\text{M}$) bereits nach 5 min zu einer Erhöhung des Phosphorylierungsgrades und erreichte das Maximum bei einer Inkubationszeit von 10 bis 30 min. Erst nach 6 h wurde das Kontrollniveau wieder erreicht.

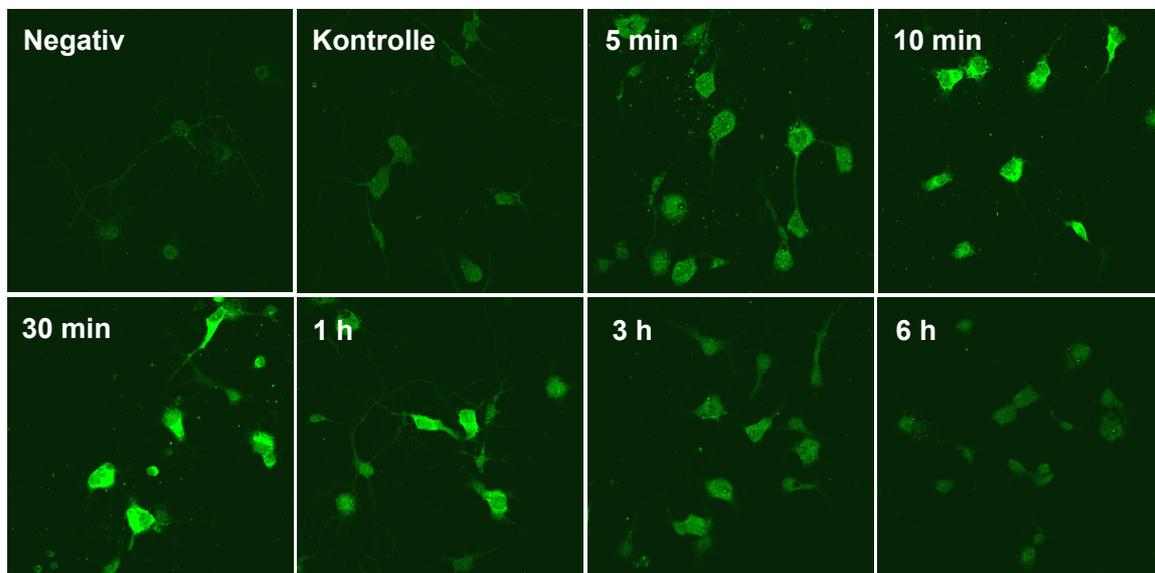


Abb. 3.5: Transiente TrkA-Phosphorylierung in hippokampalen Rattenzellen nach Orthovanadat-behandlung

Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop zeigen eine verstärkte TrkA-Phosphorylierung nach Behandlung mit Orthovanadat ($1 \mu\text{M}$) für unterschiedliche Behandlungszeiten (10 min – 6 h). Als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, bei denen während der Immunzytochemie der Primärantikörper weggelassen wurde. Kontrollen sind mit Vehikel (H_2O) anstatt Orthovanadat behandelt worden.

Eine Erhöhung der TrkA Phosphorylierung konnte ebenso durch Western Blot Analyse von Proteinextrakten aus hippocampalen Rattenzellen nachgewiesen werden. Abbildung 3.6 zeigt, dass bereits eine 10-minütige Behandlung mit dem PTP-Inhibitor Orthovanadat ($1 \mu\text{M}$) zu einer erhöhten TrkA-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle führt und dass der Effekt der erhöhten Phosphorylierung bis 180 min nach Orthovanadatbehandlung anhält.

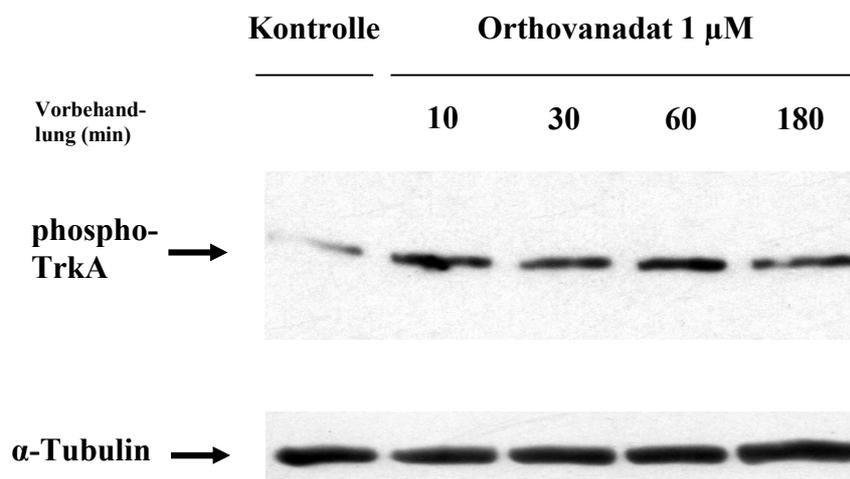


Abb. 3.6: Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA durch Orthovanadat

Hippokampale Rattenneurone wurden mit Orthovanadat ($1 \mu\text{M}$) behandelt (10 – 180 min). Phospho-TrkA wurde anschließend durch die Western Blot Methode detektiert. Eine Steigerung der TrkA-Phosphorylierung wurde innerhalb von 10 min bis 180 min nach Exposition mit Orthovanadat gemessen.

3.1.2.4 Einfluss von Okadainsäure auf die TrkA-Aktivierung

Okadainsäure ist ein Inhibitor der Serin/Threonin-Phosphatasen, ausgenommen der PP2C (Biolojan und Takai, 1988; Cohen et al., 1990; Pahan et al., 1998). Um nachzuweisen, dass nur Hemmstoffe der Protein-Tyrosin-Phosphatasen zu einer Steigerung der TrkA-Phosphorylierung führen und keine Hemmstoffe der Serin/Threonin-Phosphatasen, wurden hippocampale Neurone mit Okadainsäure (1 μ M) behandelt. Trotz unterschiedlich langer Inkubationszeiten mit dem Inhibitor (10 min – 3 h), konnte immunzytochemisch keine Verstärkung der TrkA-Phosphorylierung gemessen werden (Abb. 3.7).

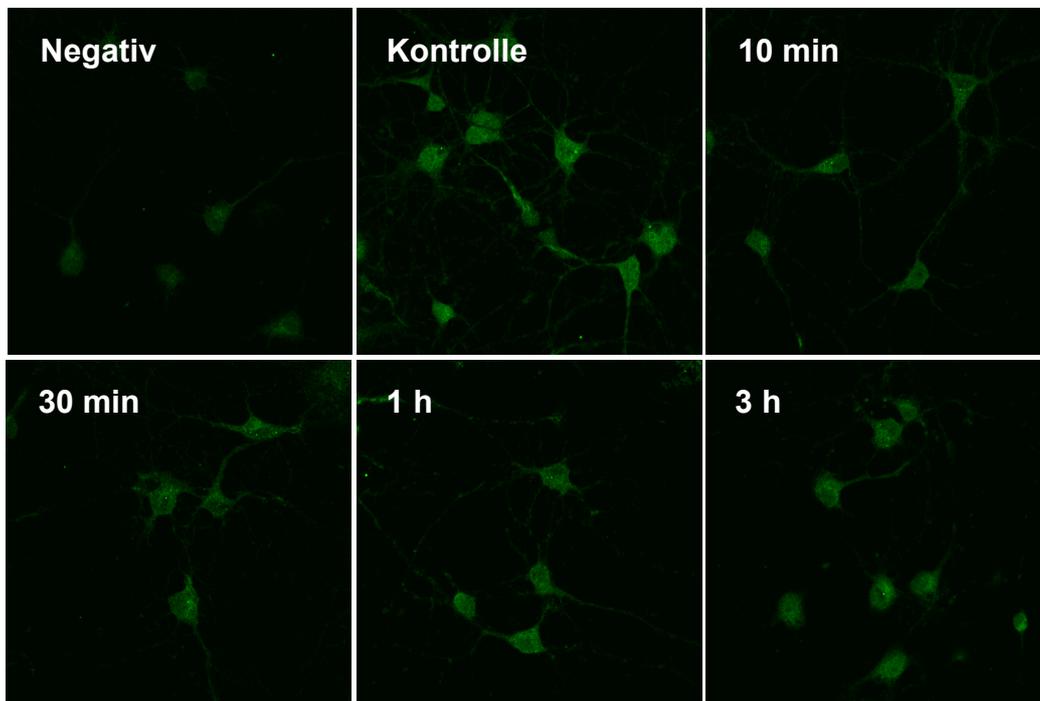


Abb. 3.7: Keine Veränderung der TrkA-Phosphorylierung nach Okadainsäurebehandlung

Hippokampale Neurone wurden mit Okadainsäure (1 μ M, 10 min – 3 h) inkubiert. Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop zeigen keine Veränderung des TrkA-Phosphorylierungsgrades. Als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, bei denen während der Immunzytochemie der Primärantikörper weggelassen wurde. Kontrollen sind mit Vehikel (DMSO) behandelt worden.

3.1.3 Natriumorthovanadat-vermittelte Neuroprotektion

3.1.3.1 Natriumorthovanadat schützt konzentrationsabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Orthovanadat neurotoxisch ist und zur Apoptose führt (Huang et al., 2000; Ivancsits et al., 2002). Andererseits sind einige wenige Literaturstellen zu finden, wo gezeigt wird, dass Orthovanadat Apoptose verhindert (Chin et al., 1998) oder Insulin-ähnliche Effekte induziert (Fantus et al., 1995; Goldfine et al., 1995). Ob und inwiefern Orthovanadat auch neuroprotektive Effekte besitzt, war bei Beginn der Anfertigung der vorliegenden Arbeit nicht bekannt.

Aufgrund der zuvor gezeigten Induktion der TrkA-Phosphorylierung sollte der Einfluss der PTP-Hemmung hinsichtlich der neuroprotektiven Effekte untersucht werden. Dazu wurden hippocampale Rattenzellen mit Orthovanadat in Konzentrationen von 0,1 bis 100 μM inkubiert. Sechs Stunden später erfolgte die Behandlung mit Staurosporin (200 nM, 24 h) und anschließender Hoechstfärbung. Staurosporin führte zu einem Anstieg an apoptotischen Zellkernen von 17 % in der Kontrolle auf 46 % (Abb. 3.8). Die Anzahl an apoptotischen Kernen nach Behandlung mit Orthovanadat (0,1 – 10 μM) blieb unter Kontrollbedingungen unverändert, während konzentrationsabhängige, antiapoptotische und somit neuroprotektive Effekte bei der gleichzeitigen Exposition mit Staurosporin zu sehen waren. Wie schon in der Literatur beschrieben (Huang et al., 2000) war Orthovanadat in Konzentrationen von 100 μM neurotoxisch (26 % apoptotische Kerne im Vergleich zu 17 % bei der Kontrolle) und zeigte in Kombination mit Staurosporin keine signifikant neuroprotektiven Eigenschaften.

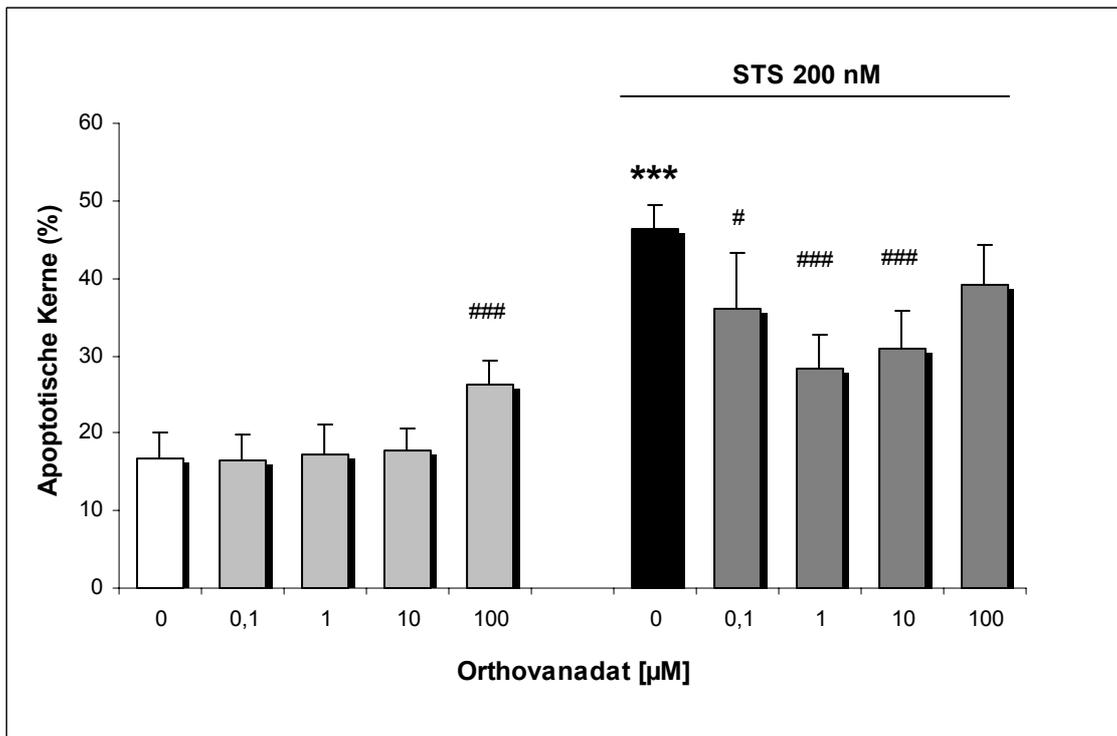


Abb. 3.8: Orthovanadat schützt konzentrationsabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose

Hippokampale Neurone wurden 6 h vor der Staurosporin-Behandlung (STS, 200 nM) mit Orthovanadat (0,1 – 100 μ M) inkubiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Kerne in Prozent \pm S.D. aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle ohne Orthovanadatbehandlung; # $p < 0,05$ und ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Die gleichen neuroprotektiven Eigenschaften von Orthovanadat waren bei Staurosporin-induzierter Apoptose in Neurobasalmedium ohne B27-Supplement zu sehen (Abb. 3.9). Hierzu wurden die Zellen vor Behandlung einmal mit Neurobasalmedium ohne B27-Supplement gewaschen, 6 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Orthovanadat in Neurobasalmedium ohne B27-Supplement inkubiert und anschließend 24 h mit Staurosporin (200 nM) behandelt. Orthovanadat (0,1 – 10 μM) reduzierte die Zahl an apoptotischen Kernen gegenüber der Staurosporinkontrolle schon bei Konzentrationen von 0,1 μM signifikant ($p < 0,001$). Im Vergleich zu der Kontrolle von Neurobasal mit B27-Supplement war die Grundschädigung ohne B27-Supplement signifikant höher ($p < 0,001$).

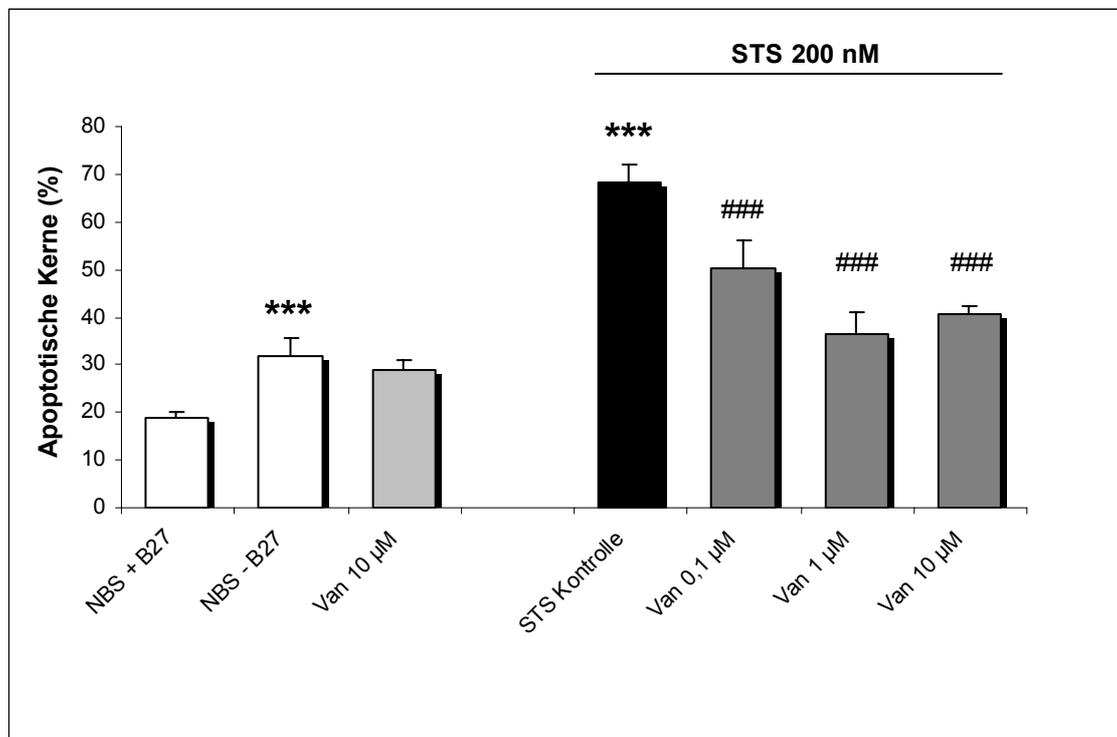


Abb. 3.9: Orthovanadat schützt konzentrationsabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose in B27-Supplement-freiem Neurobasalmedium

Hippocampale Neurone wurden 6 h vor der Behandlung mit Staurosporin (STS, 200 nM) mit Orthovanadat (Van, 0,1 – 100 μM in B27-Supplement-freiem Neurobasalmedium) inkubiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 gefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte der apoptotischen Kerne in Prozent \pm S.D. aus 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle ohne Orthovanadatbehandlung; ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Nachdem neuroprotektive Eigenschaften von Orthovanadat gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose in Neurobasalmedium festgestellt werden konnten, wurden in weiteren Untersuchungen die antiapoptotischen Eigenschaften des PTP-Inhibitors in glukosehaltiger Salzlösung (Locke's-Lösung) geprüft (Abb. 3.10). Auch unter den Bedingungen des Entzuges von Vitaminen, Wachstumsfaktoren und Aminosäuren zeigte Orthovanadat konzentrationsabhängige, neuroprotektive Effekte gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose. Im Vergleich zu der Kontrolle im Neurobasalmedium war die Grundschädigung in Locke's Lösung signifikant höher ($p < 0,001$).

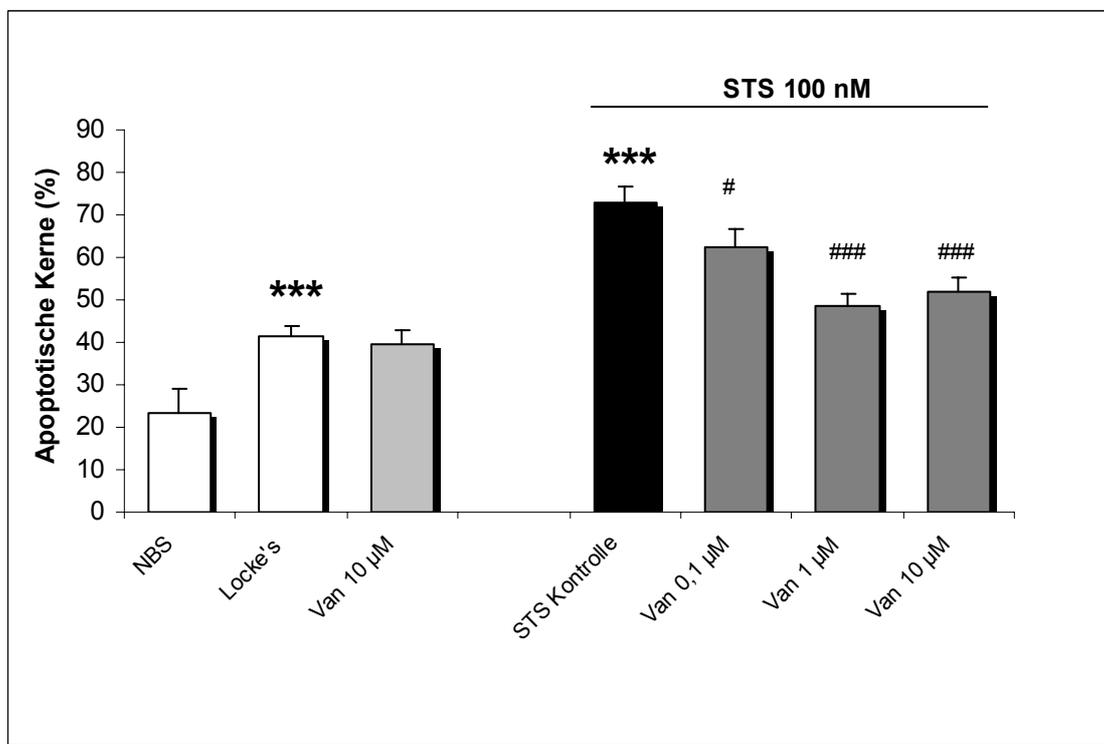


Abb. 3.10: Orthovanadat schützt konzentrationsabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose in Locke's Lösung

Hippocampale Neurone wurden 6 h vor der Staurosporin (STS, 100 nM)-Behandlung mit Orthovanadat (Van, 0,1 – 100 µM in Locke's Lösung) inkubiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 gefärbt. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen ist als Mittelwert \pm S.D. aus 4-5 Kulturen pro Gruppe dargestellt. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle ohne Orthovanadatbehandlung; # $p < 0,05$ und ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.1.3.2 Natriumorthovanadat schützt zeitabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose

In der nächsten Studie wurde untersucht, ob die neuroprotektiven Effekte von Orthovanadat zeitabhängig sind. Hierzu wurden Neurone mit der in den vorherigen Experimenten wirksamsten Konzentration von 1 μM Orthovanadat in Neurobasalmedium 0 bis 24 h vor der Staurosporin-Behandlung vorinkubiert. Abbildung 3.11 zeigt, dass der protektive Effekt vor Staurosporin-induzierter Apoptose bei einer Vorbehandlungszeit von 6 bis 12 h ($p < 0,001$) am stärksten war. Zudem konnte eine Zeitabhängigkeit der neuroprotektiven Wirkung von Orthovanadat festgestellt werden.

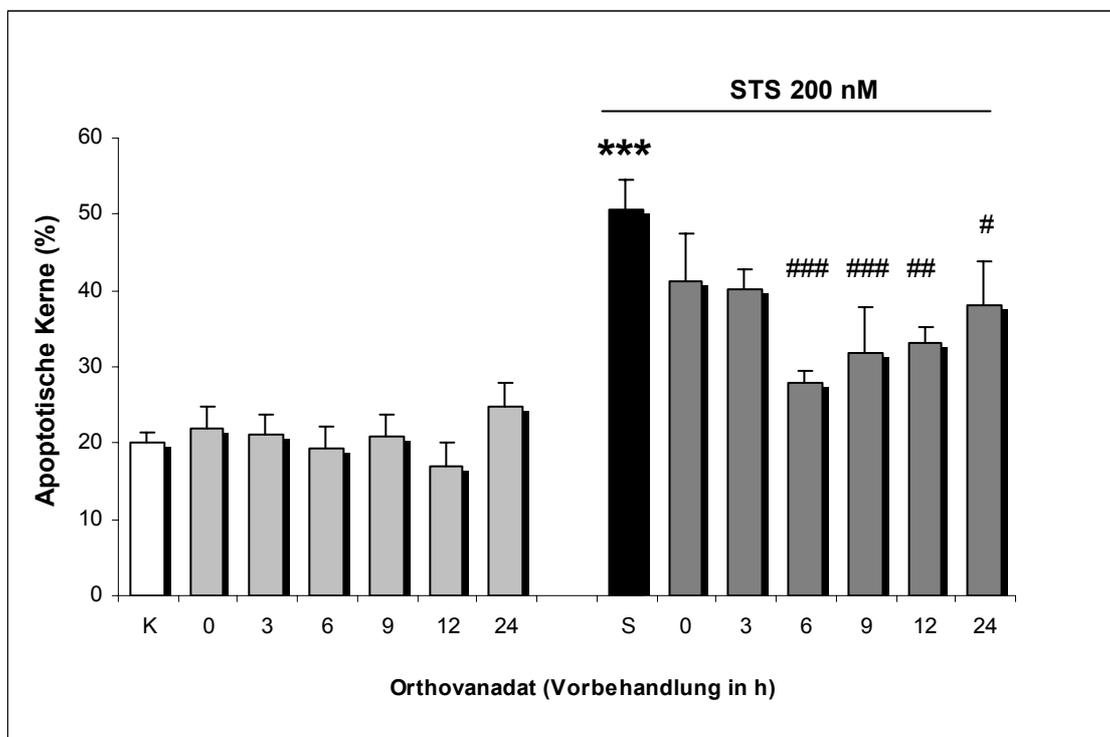


Abb. 3.11: Orthovanadat schützt zeitabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose

Null bis vierundzwanzig Stunden vor der Behandlung mit Staurosporin (STS) wurden Neurone mit Orthovanadat (1 μM) vorbehandelt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Kerne in Prozent \pm S.D. aus 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle (K) ohne Orthovanadatbehandlung; # $p < 0,05$ und ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle (S) (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.1.4 Neuroprotektion und TrkA-Aktivierung durch Orthovanadat sind unabhängig von der NGF-Bindung an den TrkA-Rezeptor

Nachdem in vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass Orthovanadat als PTP-Inhibitor zu einer erhöhten TrkA-Phosphorylierung und zur Neuroprotektion führt, wurde im Folgenden der Frage nachgegangen, ob NGF in diesen Prozessen involviert ist. Zunächst musste getestet werden, welche Konzentration des NGF-Antikörpers ausreicht, um NGF-vermittelte, antiapoptotische Effekte durch Neutralisation des Wachstumsfaktors aufzuheben. In Abbildung 3.12 ist zu sehen, dass 200 ng/ml des NGF-Antikörpers die neuroprotektiven Eigenschaften von 2.5S NGF (20 ng/ml) gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose aufhoben.

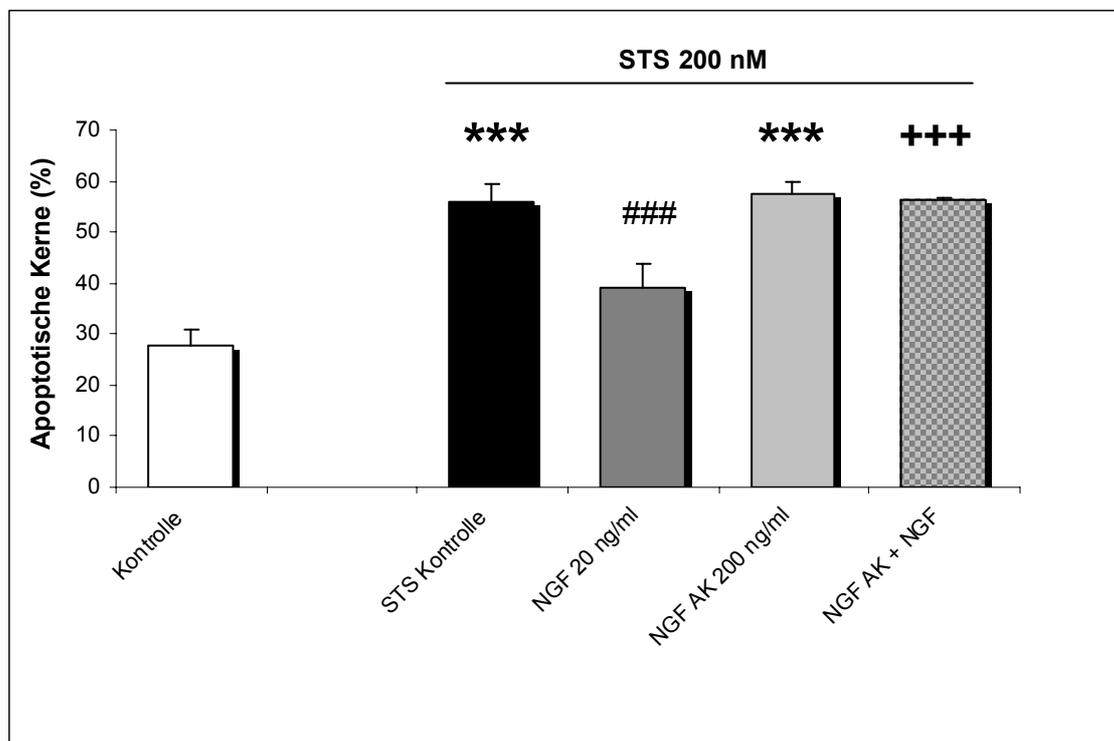


Abb. 3.12: Aufheben der NGF-induzierten Neuroprotektion durch NGF-Antikörper

Hippokampale Rattenneuronen wurden 1 h mit NGF-Antikörper (NGF AK, 200 ng/ml) inkubiert und anschließend 6 h mit 2.5S NGF (20 ng/ml) behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation mit Staurosporin (STS, 200 nM) wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt. Angegeben ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen als Mittelwert \pm S.D. aus 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; +++ $p < 0,001$ im Vergleich zu den mit NGF und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Auf der Grundlage dieses Versuches wurde in den folgenden Experimenten getestet, ob die neuroprotektive Wirkung von Orthovanadat gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose auch in Abwesenheit von NGF stattfindet. Hierzu wurden hippocampale Neurone 1 h mit dem neutralisierenden NGF-Antikörper (200 ng/ml) vorinkubiert, 6 h mit Orthovanadat (1 μ M) und anschließend 24 h mit Staurosporin (200 nM) behandelt. Wie in Abbildung 3.13 zu sehen, wurde die neuroprotektive Wirkung des PTP-Inhibitors durch die Behandlung mit dem NGF-Antikörper nicht aufgehoben. Es bestand kein signifikanter Unterschied darin, ob die Neurone vor der Staurosporin-Inkubation mit Orthovanadat alleine (37 % apoptotische Kerne) oder zusätzlich mit dem NGF-Antikörper (39 % apoptotische Kerne) behandelt wurden.

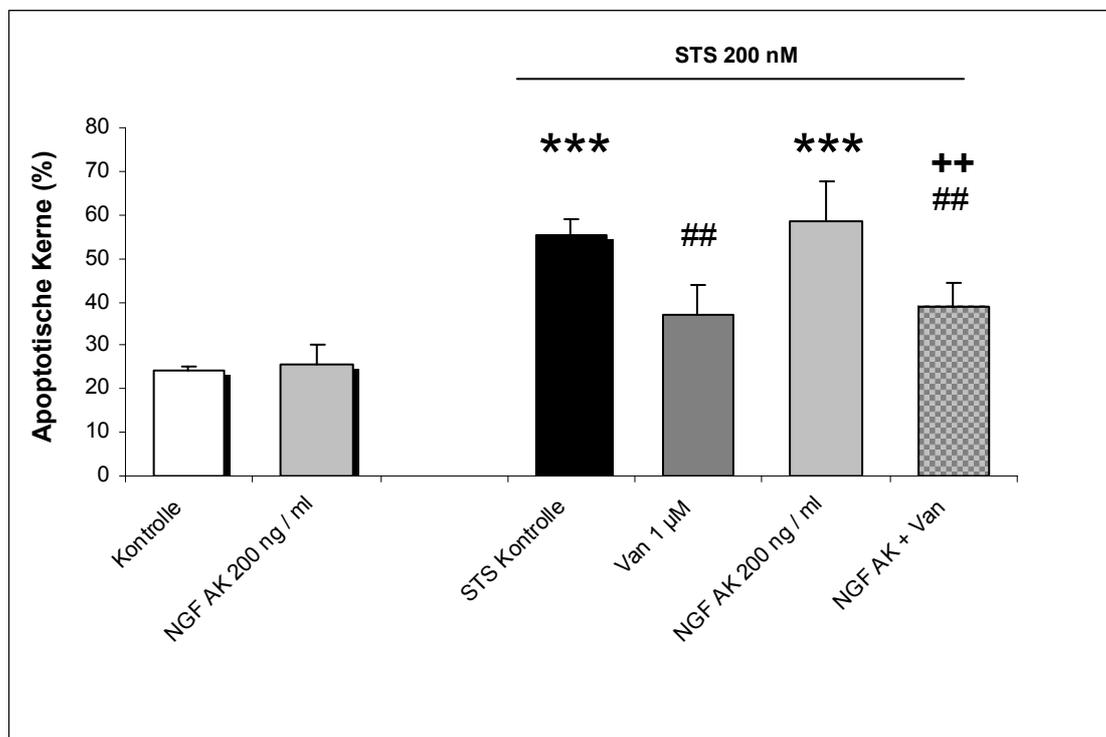


Abb. 3.13: Orthovanadat-induzierte Neuroprotektion in Abwesenheit von NGF

Hippokampale Neuronenkulturen wurden 1 h mit NGF-Antikörper (NGF AK, 200 ng/ml) inkubiert, 6 h mit Orthovanadat (Van, 1 μ M) und anschließend mit Staurosporin (STS, 200 nM) behandelt. Nach 24 h wurden die Rattenzellen fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Die prozentualen Anteile der apoptotischen Kerne sind als Mittelwerte \pm S.D. aus 4-5 Kulturen pro Gruppe dargestellt. *** p <0,001 im Vergleich zur Kontrolle; ## p <0,01 im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; ++ p <0,01 im Vergleich zu den mit NGF AK und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Des Weiteren konnte durch immunzytochemische Untersuchungen gezeigt werden, dass die Erhöhung der TrkA-Phosphorylierung nach 10 bis 30-minütiger Orthovanadatbehandlung (1 μ M) durch eine 1-stündige Vorbehandlung mit dem NGF-Antikörper (200 ng/ml) nicht aufgehoben wurde, wohingegen die Konzentration des NGF-Antikörpers ausreichend war, um die NGF-induzierte (10 ng/ml) TrkA-Phosphorylierung zu blockieren (Abb. 3.14). Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass sowohl die neuroprotektiven Eigenschaften von Orthovanadat, als auch die verstärkte TrkA-Phosphorylierung unabhängig von NGF waren.

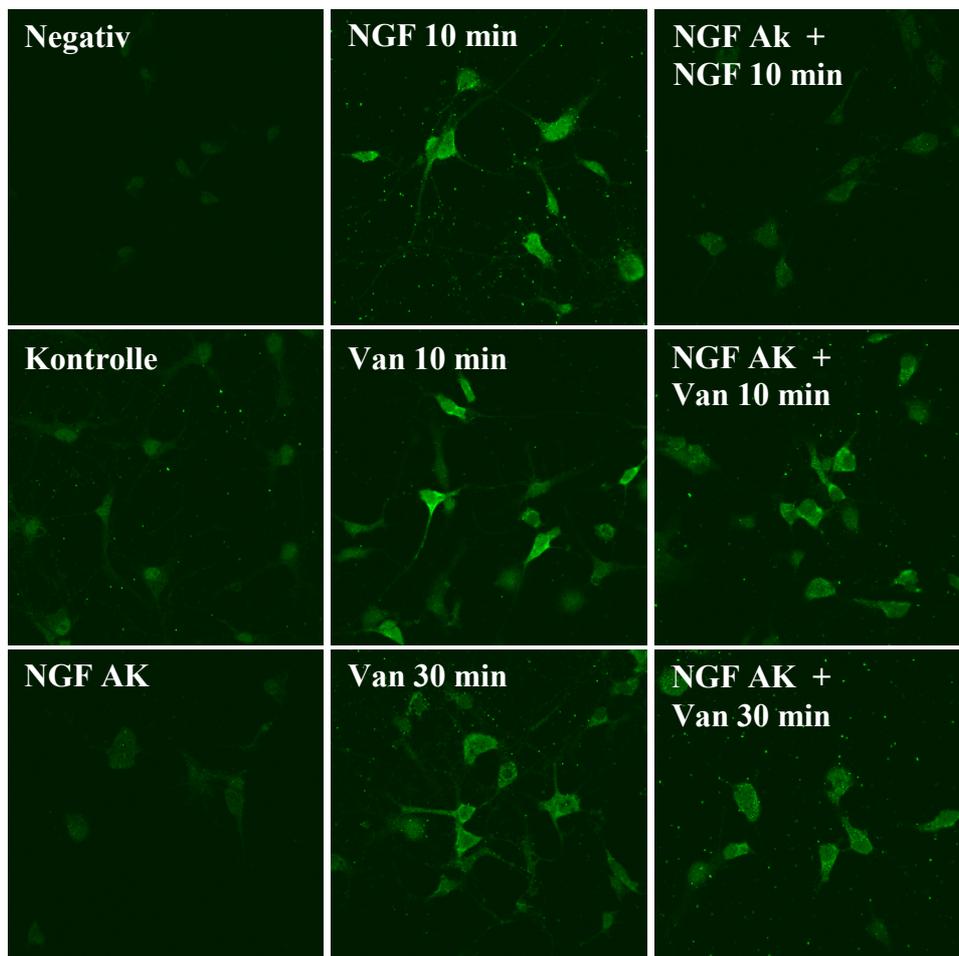


Abb. 3.14: Orthovanadat-induzierte TrkA-Phosphorylierung in Abwesenheit von NGF

Hippokampale Neurone wurden 10 min mit 2.5S NGF (10 ng/ml) behandelt. Mittels Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie wurde nach der Exposition eine erhöhte Phosphorylierung von TrkA nachgewiesen, die nach 1-stündiger Vorbehandlung mit NGF-Antikörper (NGF AK, 200 ng/ml) nicht detektierbar war. Die verstärkte TrkA-Phosphorylierung durch Inkubation mit Orthovanadat (1 μ M) für 10 bis 30 min konnte durch die Vorbehandlung mit dem NGF-Antikörper nicht aufgehoben werden. Kontrollen wurden mit Vehikel (H_2O) behandelt und als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, die unter Weglassen des Primärantikörpers vermessen wurden.

Ein weiteres Experiment sollte bestätigen, dass die Orthovanadat-induzierte Neuroprotektion in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren stattfindet. Hierzu wurden Rattenneurone unmittelbar vor der Behandlung mit glukosehaltiger Salzlösung (Locke's-Lösung) gewaschen und während des Experiments in Locke's-Lösung gehalten, um einen Wachstumsfaktorentzug zu simulieren. Die Neurone wurden 1 h mit dem neutralisierenden NGF-Antikörper (200 ng/ml) vorinkubiert, sechs Stunden mit Orthovanadat (1 μ M) behandelt und anschließend mit Staurosporin (200 nM, 24 h) geschädigt. In Abbildung 3.15 ist zu sehen, dass eine Vorbehandlung mit dem NGF-Antikörper die antiapoptotischen Eigenschaften von Orthovanadat nicht aufheben konnte (51 % geschädigte Neurone im Vergleich zu 50 %).

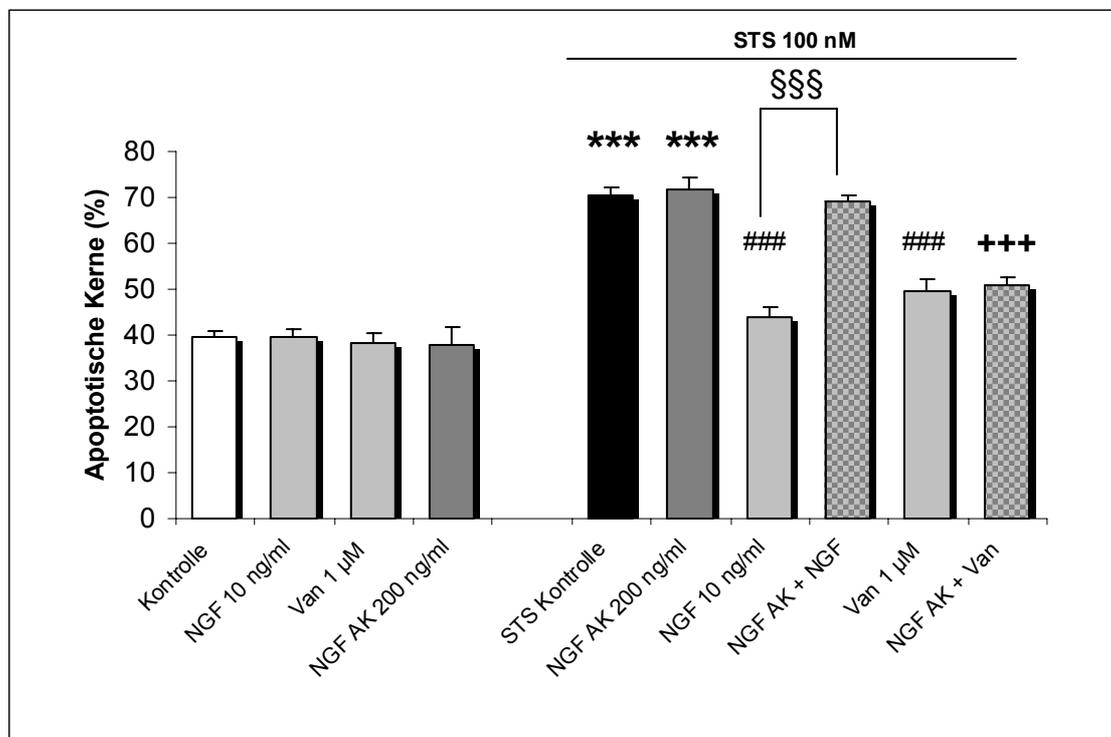


Abb. 3.15: Orthovanadat-induzierte Neuroprotektion in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren

Hippokampale Rattenneuronen wurden 1 h mit NGF-Antikörper (NGF AK, 200 ng/ml) vorinkubiert und anschließend 6 h mit Orthovanadat (1 μ M) oder 2.5S NGF (10 ng/ml) behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation mit Staurosporin (STS, 200 nM) wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen als Mittelwert \pm S.D. aus 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** p <0,001 im Vergleich zur Kontrolle; ### p <0,001 im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; +++ p <0,001 im Vergleich zu den mit NGF, NGF AK und Staurosporin behandelten Zellen; §§§ p <0,001 im Vergleich zu den mit NGF und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Während K-252a in der Literatur häufig als Inhibitor der Trk-Phosphorylierung beschrieben wird (Lazarovici et al., 1997a) und aufgrund dieser Hemmung in Konzentrationen größer 100 nM Neurotrophin-induzierte Effekte blockiert (Koizumi and Guroff, 1988; Berg et al., 1992), belegen einige Literaturzitate eine Neuroprotektion in Konzentrationen kleiner als 20 nM (Cheng et al., 1994; Goodman und Mattson, 1994). Um den Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors auf die durch Orthovanadat-induzierte Neuroprotektion zu überprüfen, wurde K-252a (20 und 500 nM) 1 h vor der Behandlung mit Orthovanadat (1 μ M) auf hippocampale Neurone gegeben. Die Zellen unterlagen anschließend einer 24-stündigen Exposition mit Staurosporin (200 nM). Die Auswertung der Versuche ergab, dass für K-252a in niedrigen Konzentrationen von 20 nM, wie auch schon in der Literatur beschrieben, neuroprotektive Effekte festzustellen waren (46 % apoptotische Kerne gegenüber 54 % in der Staurosporinkontrolle, $p < 0,01$) und eine Hemmung der Orthovanadat-induzierten Neuroprotektion nicht erreicht werden konnte (34 % bei den mit K-252a und Staurosporin behandelten Zellen gegenüber 33 % in den mit Orthovanadat und Staurosporin behandelten Kulturen; Abb. 3.16a).

Höhere Konzentrationen des Tyrosinkinase-Inhibitors (500 nM) verringerten den neuroprotektiven Effekt von Orthovanadat signifikant (42 % apoptotische Kerne bei den mit K-252a und Staurosporin behandelten Zellen im Vergleich zu 33 % bei den mit Orthovanadat und Staurosporin behandelten Neuronen, $p < 0,05$, Abb. 3.16b). K-252a allein in der Konzentration von 500 nM bewirkte weder neuroprotektive noch neurotoxische Effekte.

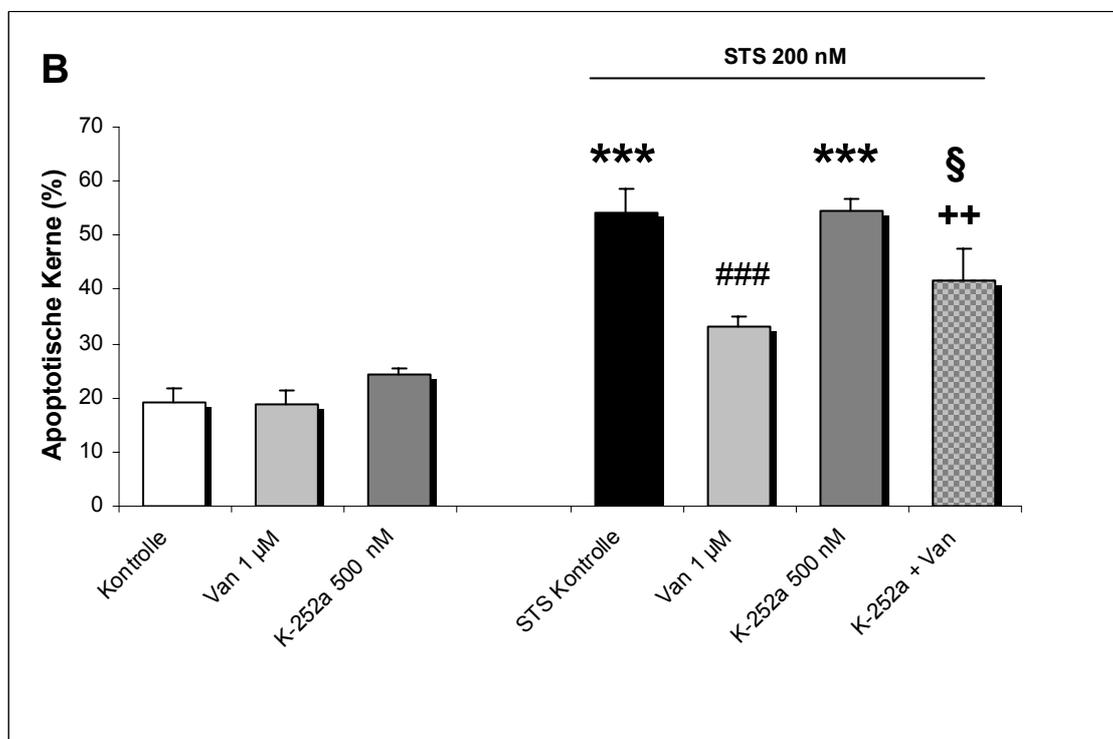
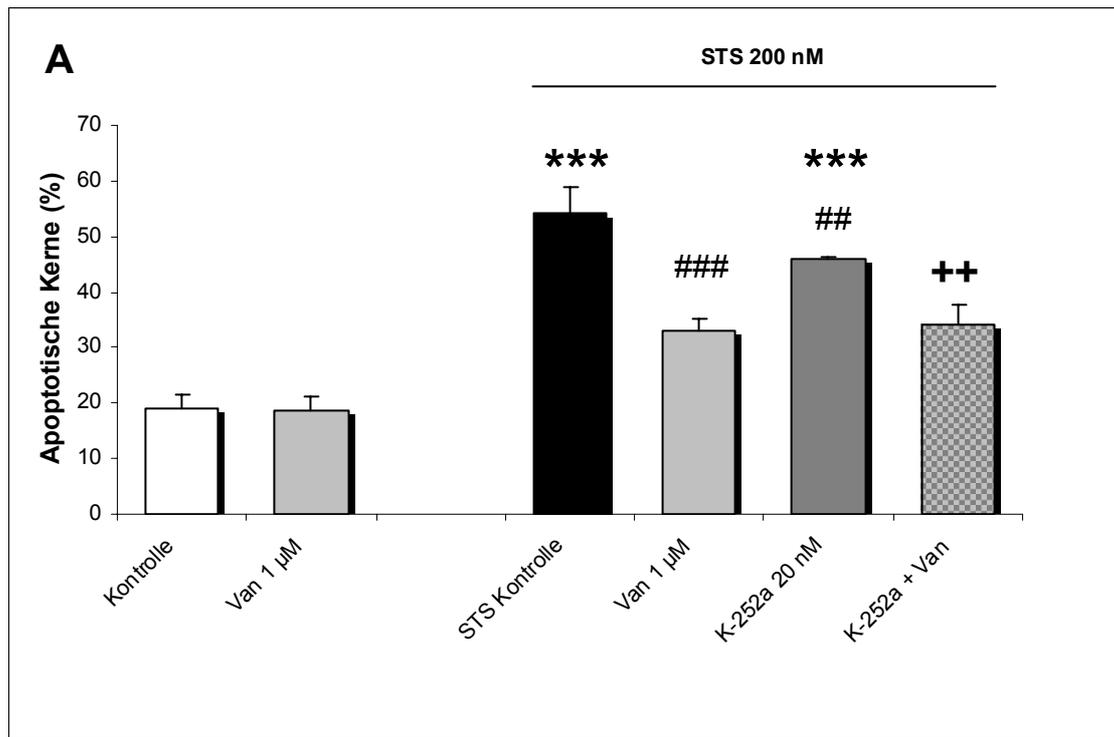


Abb. 3.16: Der Tyrosinkinase-Inhibitor K-252a hebt Orthovanadat-induzierte Neuroprotektion nicht auf

Eine Stunde vor Behandlung mit Orthovanadat (Van, 1 μ M, 6 h) wurden hippocampale Neurone mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor K-252a (20 nM (A)/500 nM (B)) inkubiert. Nach 24-stündiger Exposition mit Staurosporin (STS, 200 nM) wurden die Zellen fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Kerne als Mittelwert \pm S.D. aus 4-5 Schalen pro Gruppe **A**. Eine Vorbehandlung mit 20 nM K-252a verringert den neuroprotektiven Effekt von Orthovanadat nicht, zeigte allerdings einen neuroprotektiven Effekt gegen die Staurosporinschädigung. **B**. Für eine Konzentration von 500 nM konnte keine Neuroprotektion mehr nachgewiesen werden, wohingegen die Protektion der Neurone durch Orthovanadat signifikant verringert werden konnte. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ## $p < 0,01$ und #### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; ++ $p < 0,01$ im Vergleich zu den mit K-252a und Staurosporin behandelten Zellen; § $p < 0,05$ im Vergleich zu den mit Orthovanadat und Staurosporin behandelten Neuronen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.1.5 Die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt- und des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges vermittelt die neuroprotektive Wirkung von Orthovanadat

In Neuronen werden mittels Phosphorylierung und nachfolgender Aktivierung von TrkA durch NGF verschiedene Signaltransduktionswege beschrieben, die an den neuroprotektiven Eigenschaften des Wachstumsfaktors beteiligt sind. Der PI3-K/Akt-Signalweg und der MAPK-Signalweg sind die Hauptsignalwege, die nach Aktivierung des hochaffinen NGF-Rezeptors in der Literatur beschrieben werden (Sofroniew et al., 2001). Da vorherige Experimente belegten, dass Orthovanadat neuroprotektiv ist und zu einer Erhöhung der TrkA-Phosphorylierung führte (Gerling et al., 2001, 2003a,b), wurde im Folgenden der Frage nachgegangen, ob der PTP-Inhibitor bei der Imitierung der NGF-vermittelten neuroprotektiven Signaltransduktionswege involviert ist.

3.1.5.1 Orthovanadat-vermittelte Akt-Phosphorylierung in embryonalen, hippocampalen Neuronen

Wie der folgende immunzytochemische Versuch belegte, zeigte sich eine Erhöhung der Akt-Phosphorylierung in Rattenneuronen bereits 10 min nach der Exposition mit Orthovanadat (1 μM). Der Anstieg der Akt-Phosphorylierung verlief transient, denn nach 9-stündiger Vorbehandlung mit Orthovanadat wurde wieder das Kontrollniveau erreicht. Abbildung 3.17 zeigt die transiente Akt-Phosphorylierung in den Neuronen nach Orthovanadatbehandlung.

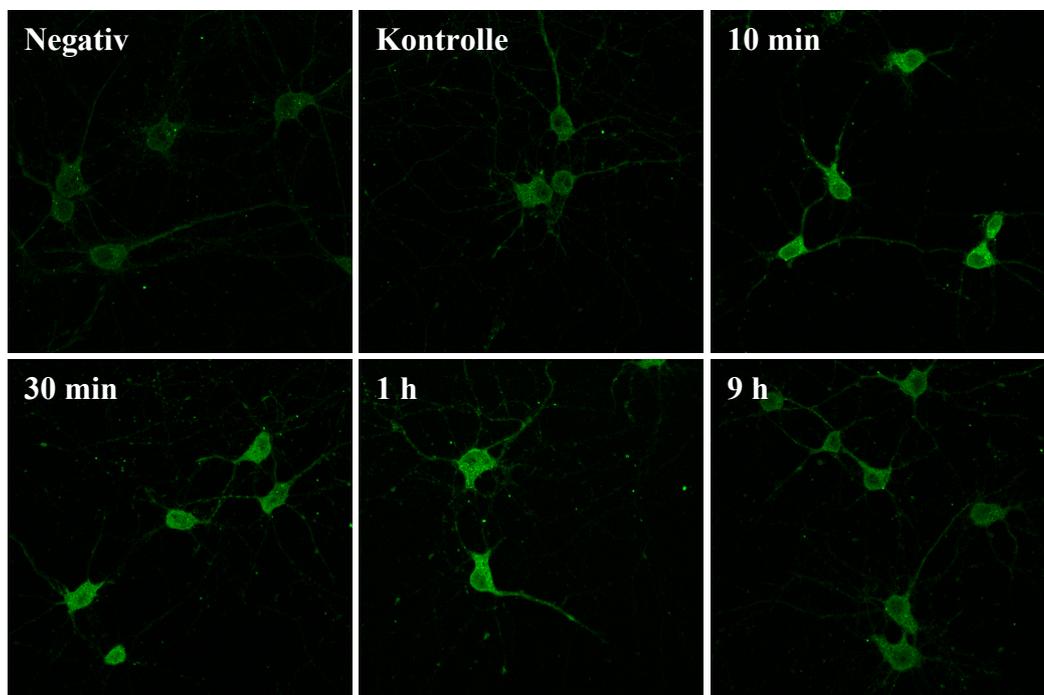


Abb. 3.17: Transiente Akt-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Orthovanadat

Immunzytochemische Analysen zeigen die transiente Phosphorylierung von Akt in hippocampalen Neuronen durch Orthovanadat (1 μM). Ein Anstieg der Phosphorylierung konnte innerhalb von 10 min bis 1 h nach Inkubation mit dem PTP-Inhibitor mittels Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie nachgewiesen werden, während nach 9 h wieder das Kontrollniveau erreicht wurde. Negativkontrollen wurden unter Weglassen des Primärantikörpers vermessen. Kontrollen wurden mit Vehikel (H_2O) anstatt Orthovanadat behandelt.

3.1.5.2 Beteiligung der PI3-Kinase an Orthovanadat-vermittelten neuroprotektiven Effekten

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Orthovanadat zu einer Erhöhung der Akt-Phosphorylierung führte (Abb. 3.17), sollte des weiteren untersucht werden, ob die PI3-K, die durch Aktivierung unmittelbar zu einer Phosphorylierung von Akt führt (Datta et al., 1999), an der neuroprotektiven Wirkung von Orthovanadat beteiligt ist.

Durch Immunoblotanalyse von Proteinextrakten aus hippocampalen Neuronen konnte die Beteiligung der PI3-K an der Phosphorylierung von Akt und den somit vermittelten neuroprotektiven Effekten nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Bereits 15 min nach Exposition mit Orthovanadat (1 μ M) konnte eine Erhöhung der Akt-Phosphorylierung gemessen werden, die auch nach 60-minütiger Behandlung noch detektierbar war. Dagegen war eine durch Orthovanadat-verstärkte Phosphorylierung von Akt nach Vorbehandlung (1 h) mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin (20 nM) nur noch abgeschwächt nachweisbar. Die Detektion von α -Tubulin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

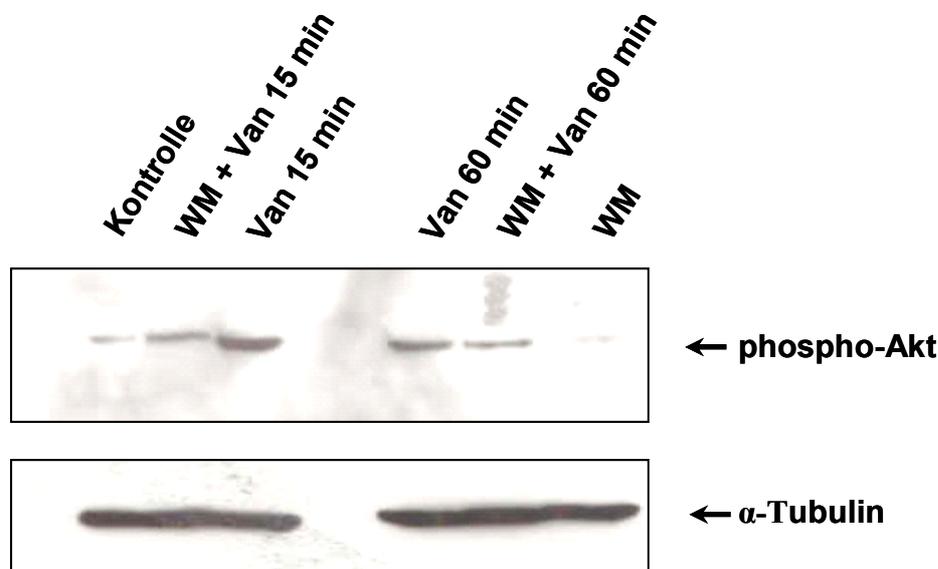


Abb. 3.18: Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin hemmt die Orthovanadat-induzierte Akt-Phosphorylierung

Eine erhöhte Akt-Phosphorylierung konnte mit der Immunoblotanalyse aus Proteinextrakten von embryonalen, hippocampalen Neuronen 15 bis 60 min nach der Inkubation mit Orthovanadat (1 μ M) nachgewiesen werden. Der Effekt wurde nach Vorbehandlung mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin (WM, 20 nM, 1 h) aufgehoben, so dass gezeigt werden konnte, dass die Erhöhung der Akt-Phosphorylierung durch Orthovanadat über die PI3-Kinase läuft.

Zur Überprüfung der Bedeutung einer verstärkten Akt-Phosphorylierung für den neuroprotektiven Effekt von Orthovanadat wurden hippocampale Rattenneurone 1 h mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin (20 nM) behandelt. Nach anschließender 6-stündiger Inkubation mit Orthovanadat (1 μ M) und Behandlung für 24 h mit Staurosporin (200 nM) wurden die Zellen mit Hoechst 33258 gefärbt. Die Auswertung (Abb. 3.19) bestätigte eine Orthovanadat-vermittelte Neuroprotektion (32 % apoptotische Kerne) gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose (48 %). Die Hemmung der PI3-Kinaseaktivität durch Wortmannin blockierte den neuroprotektiven Effekt des PTP-Inhibitors gegen Staurosporin-induzierte Apoptose signifikant (45 % apoptotische Kerne, $p < 0,01$). Wortmannin führte dagegen zu keiner signifikanten Schädigung der Neurone (20 % apoptotische Kerne gegenüber 18 % in der Kontrolle).

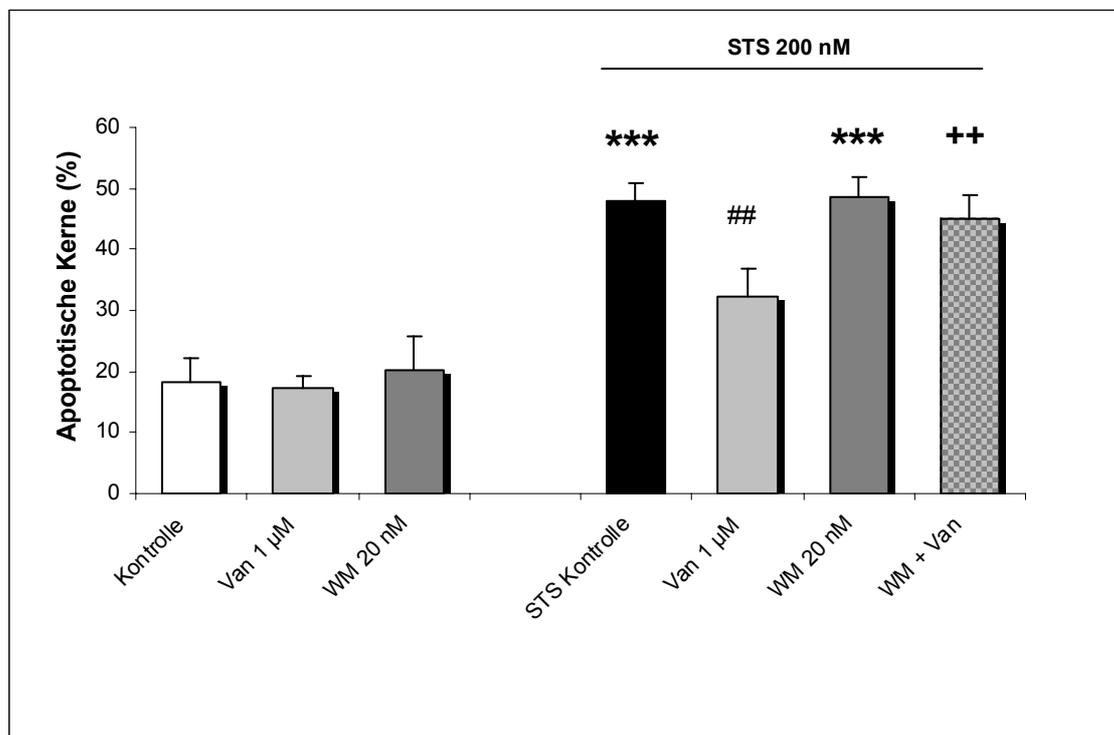


Abb. 3.19: Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin hemmt die neuroprotektive Wirkung von Orthovanadat

Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin (WM, 20 nM) wurde 1 h vor der Behandlung der hippocampalen Neurone mit Orthovanadat (Van, 1 μ M) zugegeben. Nach 6 h wurden die Zellen 24 h mit Staurosporin (STS, 200 nM) inkubiert, anschließend fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen wurde bestimmt und als Mittelwert \pm S.D. aus jeweils 4-5 Kulturen angegeben. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ## $p < 0,01$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; ++ $p < 0,01$ im Vergleich zu den mit Orthovanadat und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.1.5.3 Orthovanadat-vermittelte Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 in hippocampalen Neuronen

Vorherige Versuche zeigten, dass der PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweg eine wesentliche Rolle bei der Neuroprotektion durch Orthovanadat einnimmt. Nun sollte in weiteren Experimenten der Frage nachgegangen werden, ob die MAPK Erk1 und Erk2 bei der Neuroprotektion durch den PTP1B-Inhibitor involviert sind.

Zunächst wurde mittels immunzytochemischer Analyse die Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 nach Behandlung mit Orthovanadat ($1 \mu\text{M}$) untersucht. Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop zeigen eine transiente Phosphorylierung von Erk1/2 nach Inkubation mit Orthovanadat (Abb. 3.20). Bereits nach 10-minütiger Behandlung erfolgte eine erhöhte Phosphorylierung, die bis 1 h nach Exposition anhielt. Nach länger andauernder Inkubation mit Orthovanadat (6 h) war keine verstärkte Erk1/2-Phosphorylierung mehr vorhanden.

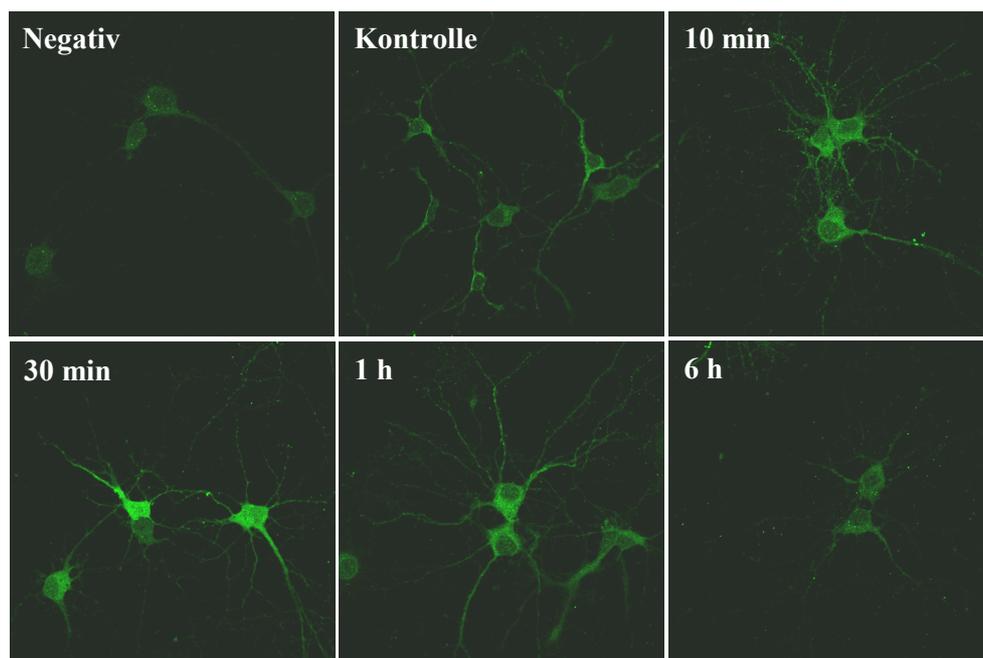


Abb. 3.20: Transiente Phosphorylierung von Erk1/2 in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Orthovanadat

Transiente Phosphorylierung von Erk1/2 wurde mittels Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Orthovanadat ($1 \mu\text{M}$) gemessen. Eine Steigerung der Phosphorylierung konnte innerhalb von 10 min nach Inkubation mit dem PTP-Inhibitor nachgewiesen werden. Nach 6 h nahm der phospho-Erk1/2 Gehalt wieder bis auf das Kontrollniveau ab. Negativkontrollen wurden unter Weglassen des Primärantikörpers vermessen. Kontrollen wurden mit Vehikel (H_2O) anstatt Orthovanadat behandelt.

3.1.5.4 Beteiligung der MEK an Orthovanadat-vermittelten neuroprotektiven Effekten

Der PTP-Inhibitor induzierte eine Erhöhung der Erk1/2-Phosphorylierung (Abb 3.20). Es stellte sich daraufhin die Frage, ob die MEK – die ihrerseits nach Phosphorylierung und daraus folgender Aktivierung für eine Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 verantwortlich ist – in den Prozess der durch Orthovanadat-induzierten Neuroprotektion beteiligt ist.

Immunoblotanalysen aus Proteinextrakten von hippocampalen Rattenneuronen bestätigten die Beteiligung der MEK an der Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 und der hierdurch vermittelten Neuroprotektion durch Orthovanadat. Die Orthovanadat-induzierte Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 war sowohl 15 min, als auch 60 min nach Exposition mit dem PTP1B-Inhibitor (Van, 1 μ M) detektierbar (Abb. 3.21). Vorbehandlung der Neurone mit dem MEK-Inhibitor UO126 (20 μ M, 1 h) blockierte bzw. verminderte dagegen die durch Orthovanadat-induzierte Phosphorylierung von Erk1 und Erk2. Erk1 und Erk2 wurden nicht reguliert. Die Detektion von α -Tubulin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

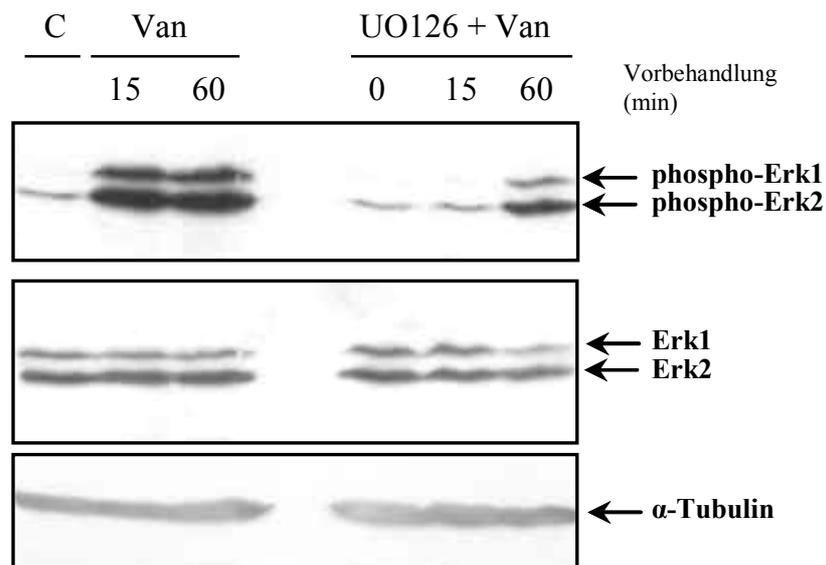


Abb. 3.21: Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die Orthovanadat-induzierte Erk1- und Erk2-Phosphorylierung

Eine erhöhte Erk1- und Erk2-Phosphorylierung konnte mit der Immunoblotanalyse aus Proteinextrakten von hippocampalen Neuronen 15 bis 60 min nach der Inkubation mit Orthovanadat (Van, 1 μ M) nachgewiesen werden. Der Effekt wurde nach Vorbehandlung mit dem MEK-Inhibitor UO126 (20 μ M, 1 h) aufgehoben – bei 15-minütiger Inkubation mit Orthovanadat, bzw. vermindert – bei 60-minütiger Inkubation mit Orthovanadat. Eine Regulation von Erk1 und Erk2 wurde hingegen nicht nachgewiesen. Identische α -Tubulin-Signale bestätigten gleichmäßige Proteinbeladung.

Des Weiteren wurden hippocampale Rattenneurone 1 h mit dem MEK-Inhibitor UO126 (20 μM) behandelt und anschließend 6 h mit Orthovanadat (10 μM) inkubiert. Nach 24-stündiger Exposition mit Staurosporin (200 nM) wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt. Die Auswertung (Abb. 3.22) zeigte – wie schon in vorherigen Versuchen – eine Orthovanadat-vermittelte Neuroprotektion (32 % geschädigte Neurone) gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose (53 % geschädigte Neurone). Die Hemmung der MEK-Aktivität durch UO126 verminderte den neuroprotektiven Effekt des PTP-Inhibitors vor Staurosporin-induzierter Apoptose signifikant (47 % apoptotische Kerne, $p < 0,01$). UO126 bewirkte dagegen selbst keine signifikante Schädigung der Neurone (20 % apoptotische Kerne gegenüber 21 % in der Kontrolle).

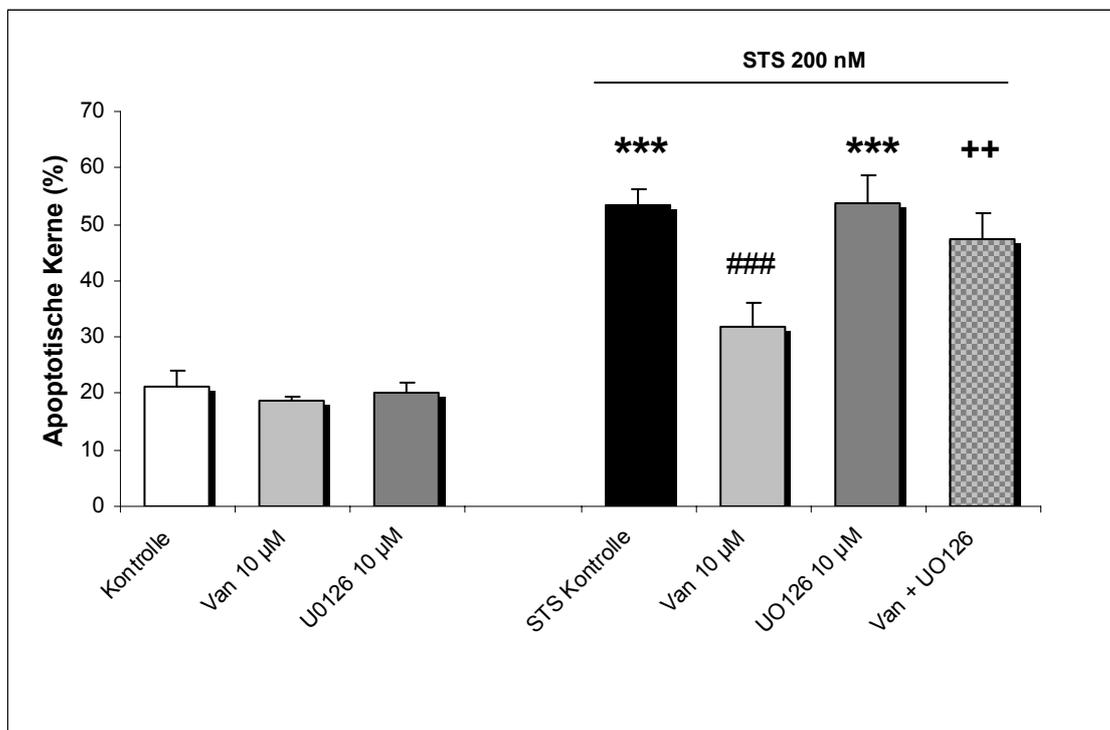


Abb. 3.22: Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die neuroprotektive Wirkung von Orthovanadat

Der MEK-Inhibitor UO126 (20 μM) wurde 1 h vor der Behandlung der hippocampalen Neurone mit Orthovanadat (Van, 10 μM) zugegeben. Nach 6 h wurden die Zellen 24 h mit Staurosporin (STS, 200 nM) inkubiert, anschließend fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen als Mittelwert \pm S.D. aus jeweils 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; ++ $p < 0,01$ im Vergleich zu den mit Orthovanadat und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.2 Die Rolle der Protein-Tyrosin-Phosphatase-1B bei der TrkA-vermittelten Neuroprotektion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch den Inhibitor Natriumorthovanadat zu einer Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA führt und infolge dessen neuroprotektive Effekte erzielt werden konnten. Daraufhin stellte sich die Frage, welche Phosphatase(n) für die Dephosphorylierung und Inaktivierung des TrkA-Rezeptors verantwortlich sind. Bislang liegen jedoch keinerlei Befunde darüber vor, welche PTP(s) bei der Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors involviert ist (sind). Literaturberichten zu Folge interagiert die PTP-1B mit verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren und inhibiert diese (Flint et al., 1997; Kenner, 1996; Haj et al., 2003). Aus diesem Grunde testeten wir einige Hemmstoffe der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B.

Hierzu zählten folgende Inhibitoren:

Gruppe Zhang: Compound 2

Gruppe Umezawa: Ethyl-3,4-dephostatin
 Methoxim-3,4-dephostatin
 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin

Die Ergebnisse der Dephostatin-Derivate sind in Abschnitt 3.3 dargestellt.

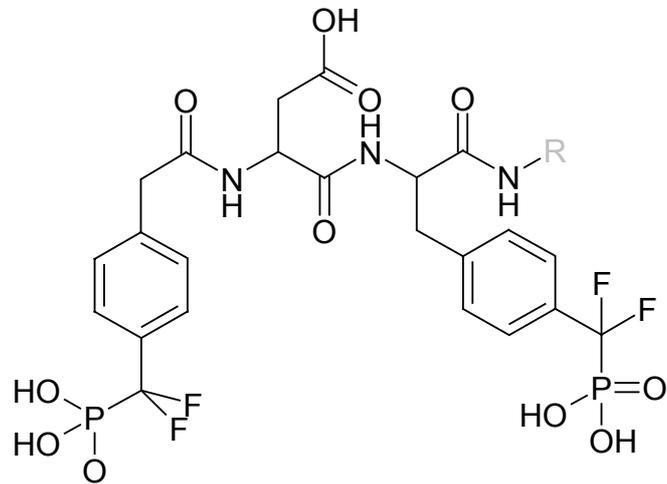
3.2.1 Einfluss von Compound 2 auf NGF-induzierte TrkA-Phosphorylierung

Im Folgenden wurde überprüft, ob mit dem spezifischeren und stärker wirksamen PTP-1B-Inhibitor Compound 2 Effekte auf die Hemmung der TrkA-Dephosphorylierung zu verzeichnen sind. In Tabelle 3.1 sind die IC_{50} - und K_i -Werte von Compound 1 gegenüber diversen Phosphatasen zu sehen (Shen et al., 2001), anhand derer die hohe Spezifität und Selektivität zu erkennen ist. Compound 2 unterscheidet sich von Compound 1 durch eine Seitengruppe (Sun et al., 2003), die eine Zellpermeabilität ermöglicht (Abb. 3.23).

PTPase	K_i [nM]; IC_{50} [μ M]	
	Compound 1	Compound 2
PTP-1B	$K_i = 2,4$	$K_i = 1,8$
TCPTP	$K_i = 26$	-
<i>Yersinia</i> PTP	$IC_{50} = 1,6$	-
SHP-1	$IC_{50} = 11$	-
SHP-2	$IC_{50} = 10$	-
LAR	$IC_{50} = 72$	-

Für HePTP, PTP α , CD45, VHR, MKP3, Cdc25A, Stp1, PP2C α → keine Inhibition durch Compound 1 bei 10 μ M

Tab. 3.1: Hemmung verschiedener Phosphatasen durch Compound 1 und 2 (nach Shen et al., 2001; Sun et al., 2003)



Compound 1: R = H

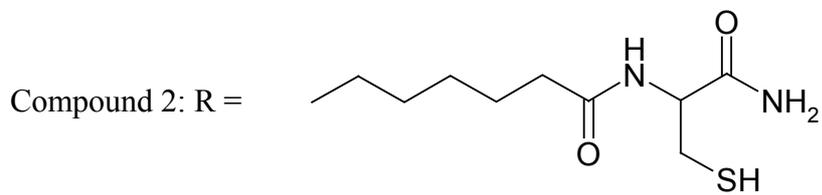


Abb. 3.23: Strukturformeln von Compound 1 und Compound 2

Um den Einfluss von Compound 2 auf die TrkA-Phosphorylierung zu messen, wurden embryonale hippocampale Neurone mit dem PTP-1B-Inhibitor (100 nM) 1 h behandelt. In Abbildung 3.24 ist zu sehen, dass es durch die Behandlung mit dem PTP-1B-Inhibitor zu einer Erhöhung der TrkA-Phosphorylierung kommt. Wie schon von Culmsee et al., 2002 beschrieben, führt 2.5S NGF (10 ng/ml) innerhalb von 10 min ebenfalls zu einer gesteigerten TrkA-Phosphorylierung, die aber nach 60 min wieder abnimmt. Dieses Absinken der TrkA-Phosphorylierung nach 60 min auf Kontrollniveau konnte durch 1-stündige Vorbehandlung mit dem PTP-1B-Inhibitor Compound 2 verhindert werden.

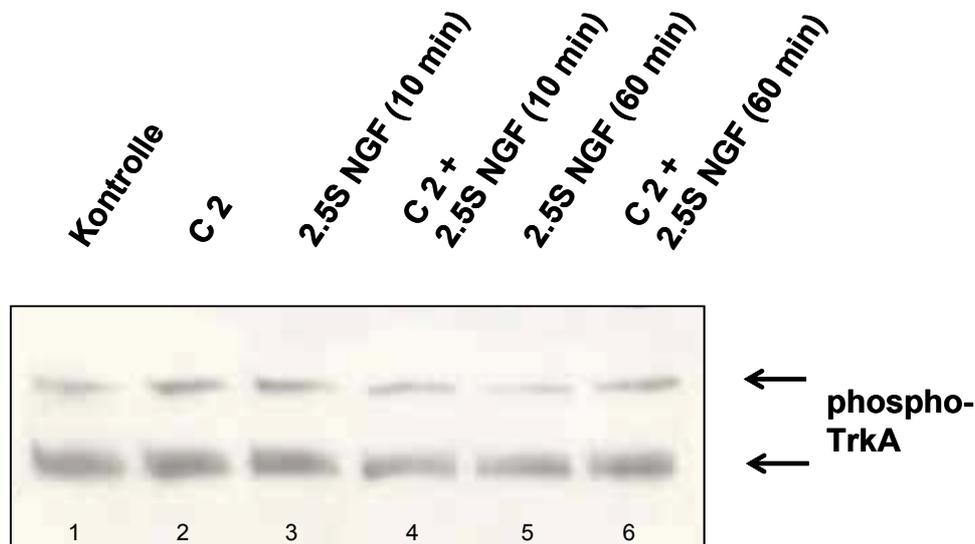


Abb. 3.24: Compound 2 beeinflusst die TrkA-Dephosphorylierung

Hippokampale Neurone wurden 1 h mit Compound 2 (C 2, 100 nM, Bahn 2) vorinkubiert und anschließend mit 2.5S NGF (10 ng/ml, 10 + 60 min, Bahn 4 und 6) behandelt. Zur Kontrolle des Einflusses des PTP-1B-Inhibitors auf die TrkA-Phosphorylierung wurden die Kulturen zunächst 1h mit DMSO anstatt Compound 2 und dann mit 2.5S NGF (10 + 60 min, Bahn 3 und 5) behandelt. Phospho-TrkA wurde anschließend durch Immunoblotanalyse detektiert.

3.2.2 Einfluss der rekombinanten PTP-1B auf NGF-induzierte TrkA-Phosphorylierung

Um den Einfluss der PTP-1B auf die Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA genauer zu analysieren, wurden PC12-Zellen 10 min mit 2.5S NGF (10 ng/ml) behandelt, um eine maximale TrkA-Phosphorylierung zu erhalten. Anschließend wurden die Proteinextrakte der PC12-Zellen mit der PTP-1B gemäß Punkt 2.6.4 behandelt und eine Immunoblotanalyse durchgeführt.

3.2.2.1 Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die TrkA-Phosphorylierung

Die mit 2.5S NGF behandelten PC12-Zelle extrakte wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Magnesiumchlorid (20 – 100 mM) und mit unterschiedlichen Konzentrationen der PTP-1B (1-5 mU/ μ l Reaktionsansatz) 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend eine Immunoblotanalyse durchgeführt. Abbildung 3.25 zeigt die Magnesium-Abhängigkeit der TrkA-Dephosphorylierung: Im Vergleich zur Kontrolle (Bahn 1) führte eine Behandlung mit 60 mM Magnesium zu einer teilweisen Dephosphorylierung (Bahn 3) und nach Inkubation mit 100 mM Magnesium zeigte sich eine vollständige Dephosphorylierung (Bahn 5) des TrkA-Rezeptors. Behandlung der PC12-Zelle extrakte mit 3 mU PTP-1B/ μ l Reaktionsansatz bei einer Magnesium-Konzentration von 60 mM (Bahn 4) führte im Vergleich zur Kontrolle (Bahn 3) zu einer verstärkten Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA. Hingegen reichten geringere Mengen der PTP-1B (1 mU/ μ l Reaktionsansatz) nicht aus, um den Rezeptor bei einer Magnesiumkonzentration von 20 mM zu dephosphorylieren. Mittels der Detektion von α -Tubulin konnte eine gleichmäßige Proteinbeladung nachgewiesen werden.

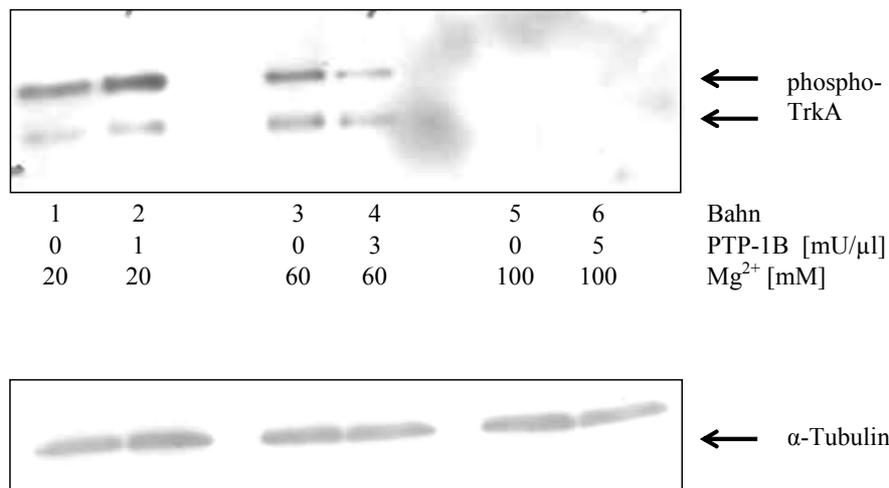


Abb. 3.25: Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration

PC12-Zellhomogenisat wurde 15 min bei 37°C mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentration (20 – 100 mM) und unterschiedlichen Konzentrationen der PTP-1B (1, 3 und 5 mU/ μ l Reaktionsansatz) inkubiert. Anschließend wurde die TrkA-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration und PTP-1B Menge mittels Immunoblotanalyse detektiert. Die Detektion von α -Tubulin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

3.2.2.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die TrkA-Phosphorylierung

Die Auswertung des folgenden Experimentes zeigte die Abhängigkeit der TrkA-Dephosphorylierung durch die PTP-1B von der Inkubationszeit. PC12-Zellhomogenisat wurde mit 3 mU PTP-1B/ μ l Reaktionsansatz bei einer Magnesiumkonzentration von 60 mM 5 und 30 min bei 37°C inkubiert. Wie in Abbildung 3.26 zu sehen, führte eine 30-minütige Inkubation mit der PTP-1B zu einer vollständigen Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors (Bahn 6). Eine Inkubationszeit von 5 min reichte hingegen nicht aus, um den TrkA-Rezeptor zu dephosphorylieren. Die Detektion von α -Tubulin zeigt gleichmäßige Proteinbeladung.

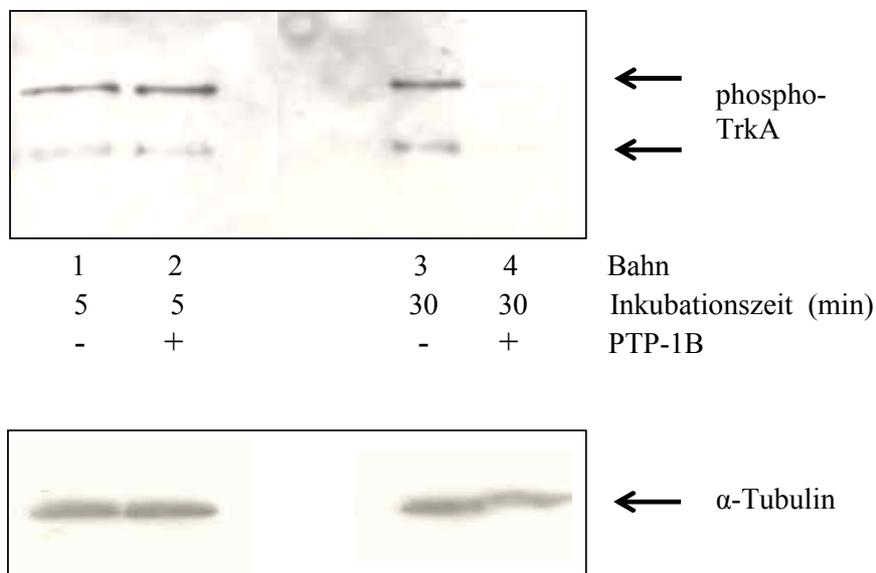


Abb. 3.26: Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

PC12-Zellhomogenisat wurde 5 und 30 min bei 37°C mit 60 mM Magnesium und 3 mU PTP-1B/ μ l Reaktionsansatz inkubiert. Anschließend wurde die TrkA-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mittels Immunoblotanalyse detektiert. Die Detektion von α -Tubulin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

3.2.2.3 Einfluss der PTP-1B Proteinkonzentration auf die TrkA-Phosphorylierung

Als nächstes sollte der Einfluss der PTP-1B Menge auf die Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors untersucht werden. Hierzu wurde das PC12-Zellhomogenisat mit unterschiedlichen PTP-1B Konzentrationen 15 beziehungsweise 30 min bei 37°C und einer Magnesiumkonzentration von 50 mM inkubiert. Die Auswertung der Immunoblotanalyse zeigt eine Dephosphorylierung von TrkA in Abhängigkeit von der eingesetzten PTP-1B Menge bei einer Inkubationszeit von 30 min (Abb. 3.27, Bahn 5 – 6). Fünf mU PTP-1B/ μ l Reaktionsansatz führen zu einer fast vollständigen Dephosphorylierung von TrkA (Bahn 7) im Vergleich zur Kontrolle (Bahn 5), wohingegen niedrigere Proteinkonzentrationen von 1 mU/ μ l Reaktionsansatz (Bahn 6) oder kürzere Inkubationszeiten von 15 min (Bahn 1 – 4) keinen Einfluss auf den phospho-TrkA Gehalt hatten. Mittels der Detektion von α -Tubulin konnte eine gleichmäßige Proteinbeladung nachgewiesen werden.

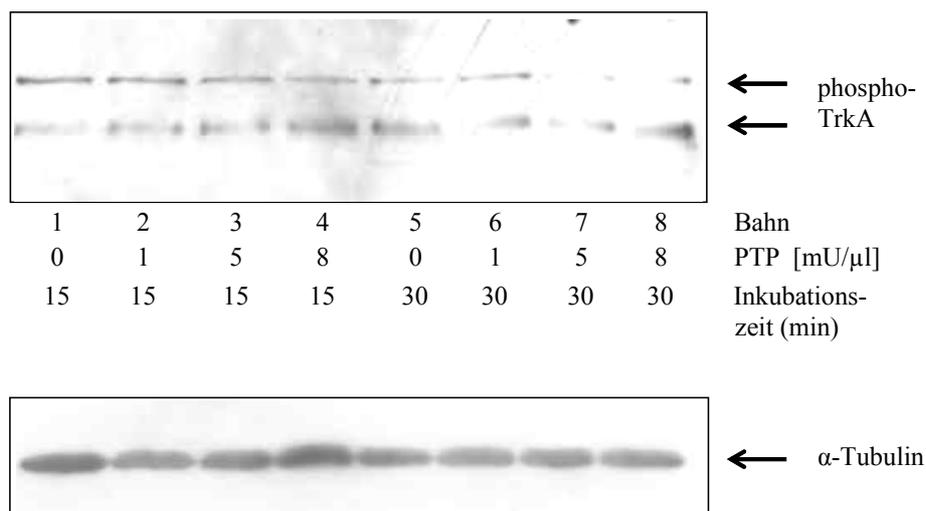


Abb. 3.27: Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors in Abhängigkeit von der PTP-1B Proteinkonzentration

PC12-Zellhomogenisat wurde 15 beziehungsweise 30 min bei 37°C mit 50 mM Magnesium und unterschiedlichen Konzentrationen der PTP-1B (1-8 mU/ μ l Reaktionsansatz) inkubiert. Anschließend wurde die TrkA-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der eingesetzten PTP-1B Konzentration mittels Immunoblotanalyse detektiert. Die Detektion von α -Tubulin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

3.3 Neuroprotektive Effekte durch Dephostatin-Derivate und die beteiligten Signaltransduktionswege

3.3.1 Neuroprotektive Effekte durch Dephostatin-Derivate gegen Staurosporin-induzierte Apoptose in hippocampalen Neuronen

Dephostatin war die erste organische Substanz, die zur Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen eingesetzt wurde. Sie wurde aus *Streptomyces sp.* MJ742-NF5 isoliert (Imoto et al., 1993; Kakeya et al., 1993) und wirkt spezifisch gegen PTPen und nicht gegen Serin/Threonin-Phosphatasen (Watanabe et al., 1995). Im Laufe der letzten Jahre wurden stabilere Substanzen synthetisiert, die neben anderen Protein-Tyrosin-Phosphatasen auch die PTP-1B hemmt und somit über eine indirekte Aktivierung des Insulinrezeptors antidiabetische Eigenschaften vorweisen kann (Watanabe et al., 2000; Suzuki et al., 2001). Da zu Beginn unserer Untersuchungen der Einfluss der PTP-1B bei der Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA nicht näher bekannt war, sollte der Einfluss der Dephostatin-Derivate auf die Neuroprotektion, die TrkA-Dephosphorylierung und die nachfolgend beteiligten Signaltransduktionswege untersucht werden.

3.3.1.1 Neuroprotektion durch Ethyl-3,4-dephostatin gegen Staurosporin-induzierte Apoptose

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob Ethyl-3,4-dephostatin neuroprotektiv gegen Staurosporin-induzierte Apoptose wirkt. Für diesen Nachweis wurden hippocampale Neurone aus der Ratte mit dem Dephostatin-Derivat in Konzentrationen von 0,01 bis 10 μM inkubiert. Sechs Stunden später erfolgte die 24-stündige Behandlung mit Staurosporin (200 nM). Nach Fixierung der Zellen und anschließender Färbung mit Hoechst 33258 zeigte sich nach der Exposition mit Staurosporin ein prozentualer Anstieg an apoptotischen Kernen von 22 % in der Kontrolle auf 53 % (Abb. 3.28). Die Anzahl an apoptotischen Kernen nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin blieb unter Kontrollbedingungen unverändert, während konzentrationsabhängige antiapoptotische und somit neuroprotektive Effekte bei der gleichzeitigen Exposition mit Staurosporin zu sehen waren.

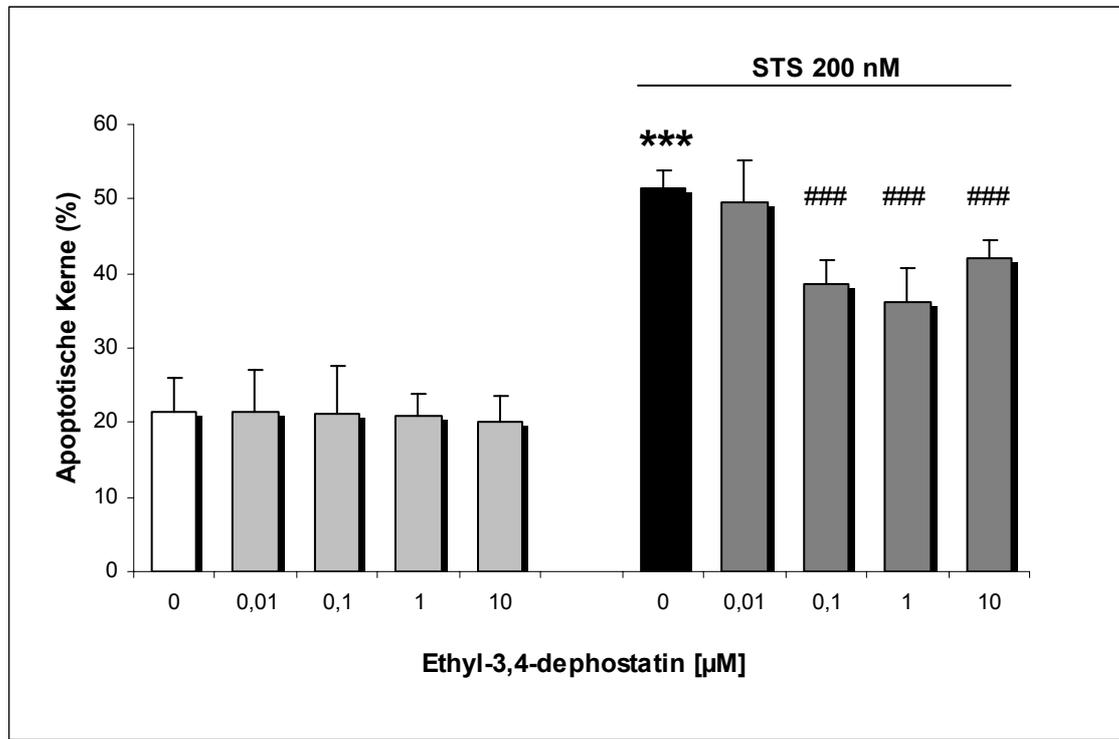


Abb. 3.28: Ethyl-3,4-dephostatin schützt konzentrationsabhängig vor Staurosporin-induzierter Apoptose

Hippokampale Neurone wurden 6 h vor der Behandlung mit Staurosporin (STS, 200 nM) mit Ethyl-3,4-dephostatin in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 - 10 μM) behandelt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen mit Hoechst 33258 gefärbt. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen ist als Mittelwert ± S.D. aus jeweils 4-5 Kulturen pro Gruppe dargestellt. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Die gleichen neuroprotektiven Eigenschaften von Ethyl-3,4-dephostatin waren bei NMDA-induzierter Apoptose in glukosehaltiger Locke's-Lösung zu sehen (Abb. 3.29). Hierzu wurden die hippocampalen Neurone vor der Behandlung einmal mit Locke's-Lösung gewaschen und mit Ethyl-3,4-dephostatin (0,1 – 10 μM) in Locke's-Lösung behandelt. Anschließend wurden die Kulturen 24 h mit NMDA (10 μM) geschädigt. Die Auswertung zeigte eine signifikante Reduktion des Anteils der apoptotischen Kerne im Vergleich zur NMDA-Kontrolle.

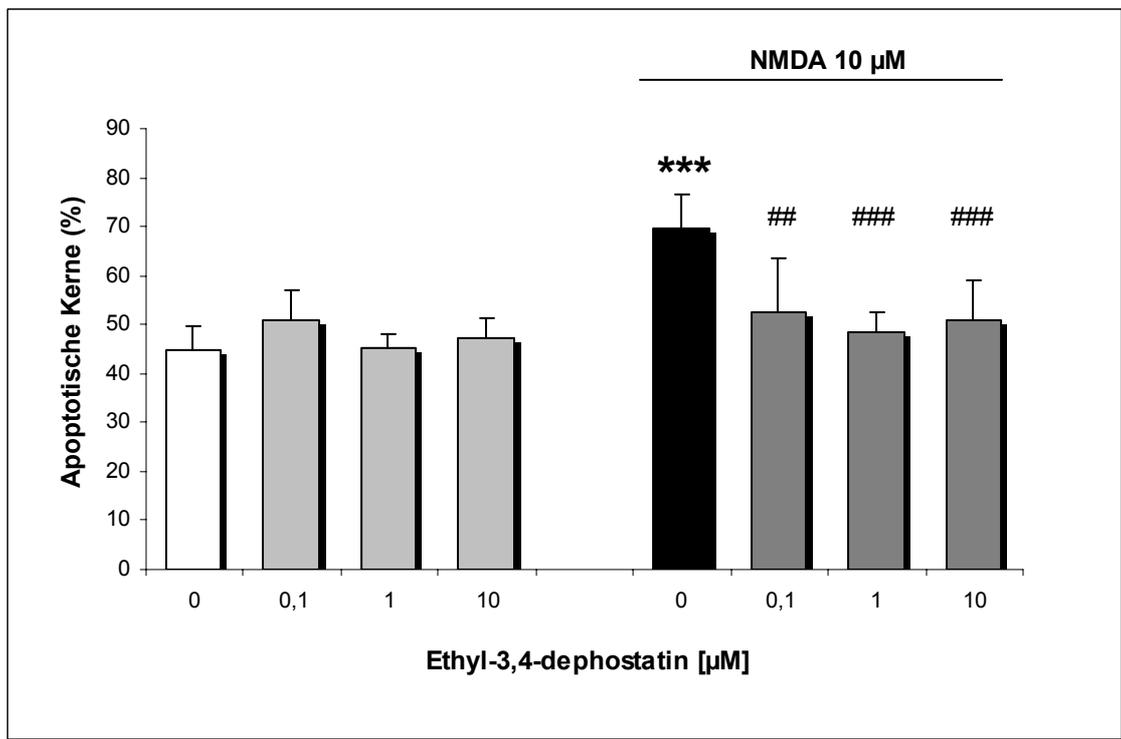


Abb. 3.29: Ethyl-3,4-dephostatin schützt hippocampale Neurone vor NMDA-induzierter Apoptose in Locke's-Lösung

Sechs Stunden vor der Behandlung mit NMDA (10 μM) wurden hippocampale Neurone mit Ethyl-3,4-dephostatin (0,1 – 10 μM) inkubiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte der apoptotischen Kerne in Prozent \pm S.D. aus 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ## $p < 0,01$ und ### $p < 0,001$ im Vergleich zur NMDA-Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.1.2 Neuroprotektion durch 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin gegen Staurosporin-induzierte Apoptose

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Ethyl-3,4-dephostatin vor Staurosporin- und NMDA-induzierter Apoptose schützt, wurde untersucht, ob auch 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin neuroprotektiv wirkt. Dieses Dephostatin-Derivat hemmt ebenfalls die PTP-1B, wenngleich es 33-fach höhere IC_{50} -Werte hinsichtlich der PTP-1B besitzt als Ethyl-3,4-dephostatin (Suzuki et al., 2001). Die Behandlung hippocampaler Neurone mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin ergab, dass 1 und 10 μM die am stärksten neuroprotektiv wirksamen Konzentrationen waren ($p < 0,001$). Abbildung 3.30 zeigt die konzentrationsabhängige antiapoptotische Wirkung dieses Dephostatin-Derivates gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose.

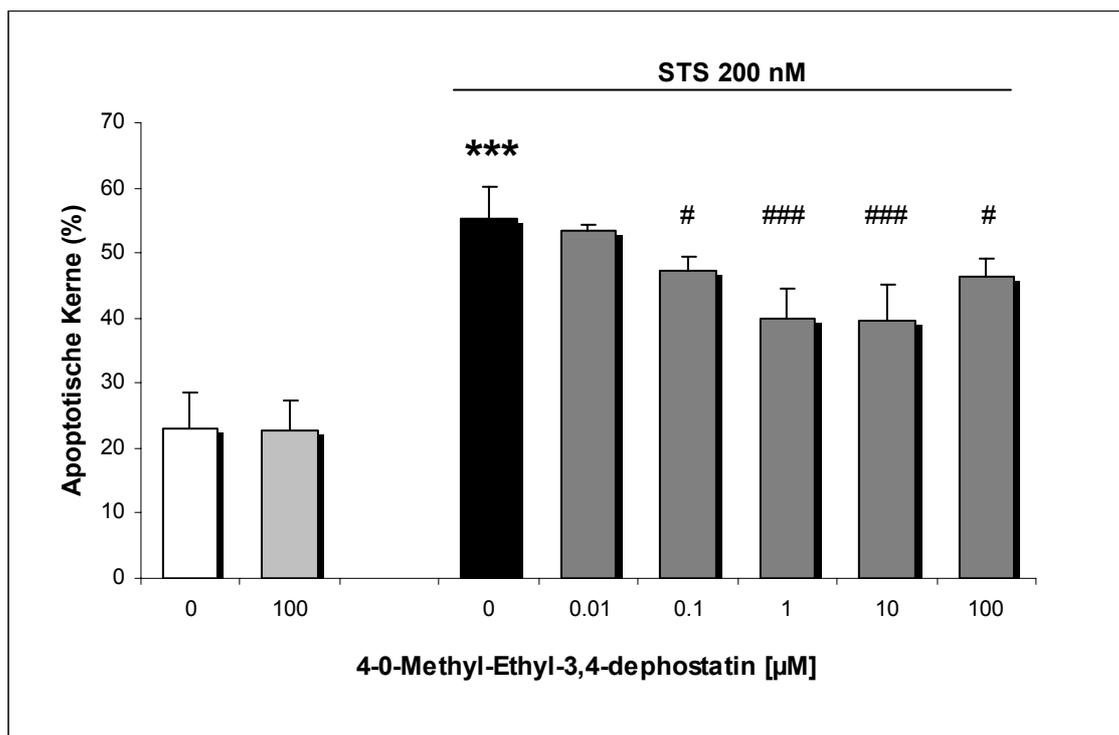


Abb. 3.30: 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin schützt konzentrationsabhängig vor Staurosporin-induzierter Apoptose

Hippocampale Rattenneurone wurden 6 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 – 100 μM) 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin vorinkubiert und anschließend mit Staurosporin (STS, 200 nM) behandelt. Nach Fixierung und Anfärbung mit Hoechst 33258 wurde der prozentuale Anteil der Mittelwerte \pm S.D. aus 4-5 Kulturen pro Gruppe dargestellt. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; # $p < 0,05$ und ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.1.3 Methoxim-3,4-dephostatin schützt nicht vor Staurosporin-induzierter Apoptose

Methoxim-3,4-dephostatin ist ein nitrosaminfreies Dephostatin-Derivat, welches ebenfalls durch eine Hemmung der PTP-1B antidiabetische Eigenschaften besitzt. Es hat 5-fach höhere IC_{50} -Werte hinsichtlich der PTP-1B als Ethyl-3,4-dephostatin (Hiroki et al., 2002). Hippokampale Kulturen wurden mit dem Dephostatin-Derivat 6 h vorinkubiert und anschließend 24 h mit Staurosporin (200 nM) geschädigt. Wie in Abbildung 3.31 dargestellt, zeigte Methoxim-3,4-dephostatin (0,01 – 100 μ M) keine antiapoptotischen Eigenschaften, vielmehr konnten bei einer Konzentration von 100 μ M geringe neurotoxische Effekte festgestellt werden ($p < 0,05$). Ethyl-3,4-dephostatin (1 μ M), hier als Positivkontrolle eingesetzt, schützte dagegen vor Staurosporin-induzierter Apoptose (42 % apoptotische Kerne im Vergleich zu 59 % bei der Staurosporinkontrolle).

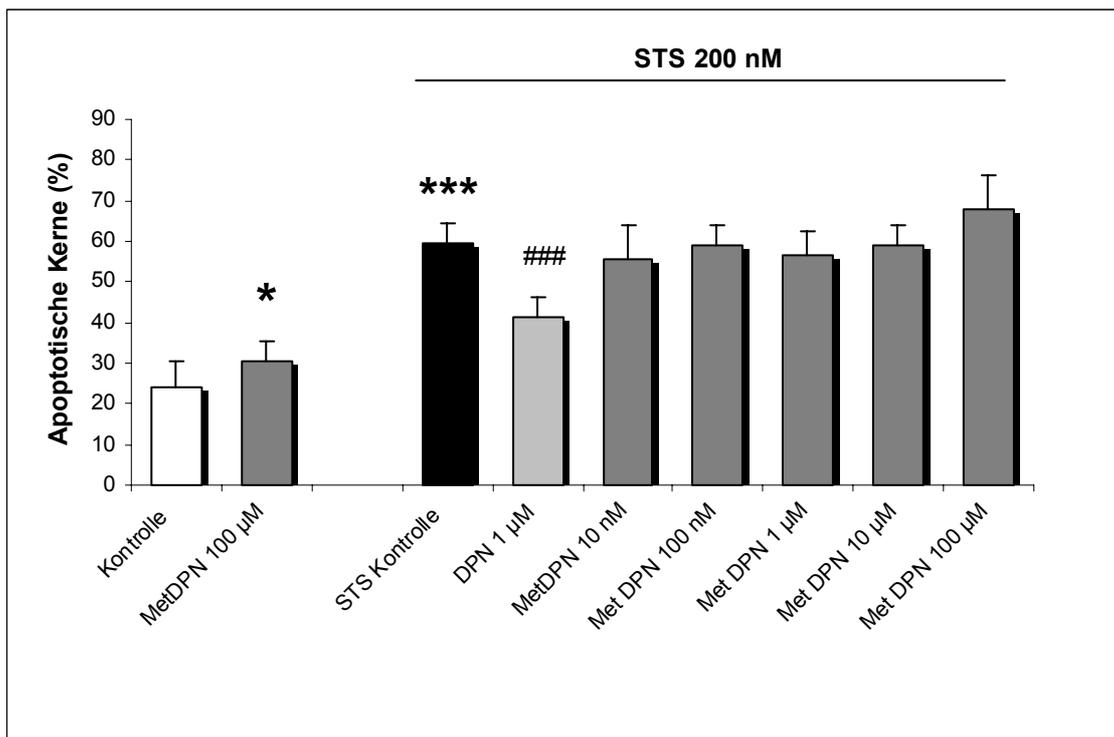


Abb. 3.31: Methoxim-3,4-dephostatin schützt nicht vor Staurosporin-induzierter Apoptose

Hippokampale Neurone wurden 6 h mit Methoxim-3,4-dephostatin (MetDPN, 0,01 – 100 μ M) oder Ethyl-3,4-dephostatin (DPN, 1 μ M) behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation mit Staurosporin (STS, 200 nM) wurden die Zellen mit Hoechst 33258 angefärbt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Mittelwerte \pm S.D. aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Wie der folgende Versuch belegte, wurden auch gegenüber NMDA-induzierter Apoptose in Locke's Lösung keine neuroprotektiven Effekte für Methoxim-3,4-dephostatin gemessen. Für Konzentrationen von 0,01 bis 100 μM waren keine antiapoptotischen Eigenschaften feststellbar, im Gegenteil, der PTP-1B-Inhibitor zeigte bei einer Konzentration von 100 μM neurotoxische Effekte, so dass nahezu 100 % der Neurone abstarben (Abb. 3.32). Ethyl-3,4-dephostatin (1 μM), hier als Positivkontrolle eingesetzt, schützte vor NMDA-induzierter Apoptose (29 % apoptotische Kerne im Vergleich zu 49 % bei der Staurosporinkontrolle).

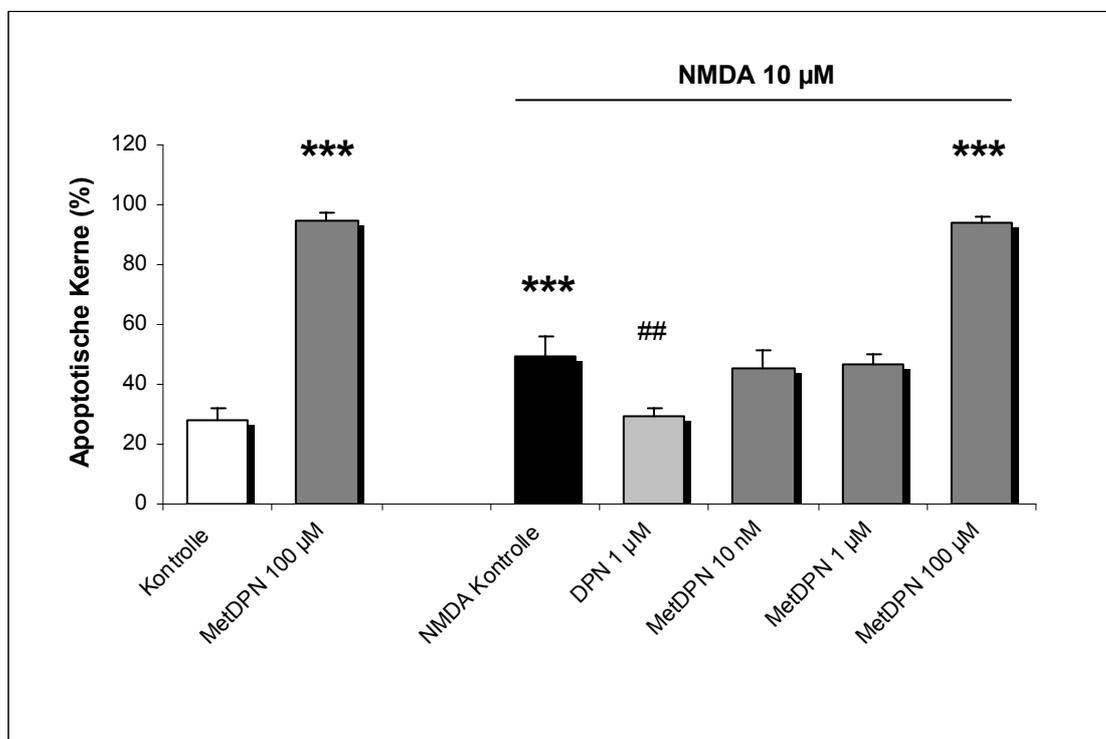


Abb. 3.32: Methoxim-3,4-dephostatin schützt nicht vor NMDA-induzierter Apoptose

Hippokampale Neurone wurden 6 h mit Methoxim-3,4-dephostatin (MetDPN, 0,01 – 100 μM) oder Ethyl-3,4-dephostatin (DPN, 1 μM) in Locke's Lösung behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation mit NMDA (10 μM) wurden die Zellen mit Hoechst 33258 angefärbt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Mittelwerte \pm S.D. aus jeweils 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ## $p < 0,01$ im Vergleich zur NMDA Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.2 Dephostatin-Derivate als NO-Donatoren

Die vorausgehenden Versuche zeigten, dass erstens 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin als PTP-1B-Inhibitor mit vergleichsweise hohem IC_{50} -Wert von 101 μ M ebenso neuroprotektiv wirkt wie Ethyl-3,4-dephostatin mit einem IC_{50} -Wert von 3,15 μ M, und dass zweitens das nitrosaminfreie Methoxim-3,4-dephostatin als Inhibitor der PTP-1B keine neuroprotektiven Eigenschaften besaß. Es ist daher unwahrscheinlich, dass der neuroprotektive Effekt der Dephostatin-Derivate allein auf eine Hemmung der PTP-1B zurückzuführen ist. Es galt vielmehr nach weiteren möglichen Mechanismen der Neuroprotektion durch die Dephostatin-Derivate zu suchen. Die molekulare Struktur der Dephostatin-Derivate legt die Vermutung nahe, dass Ethyl-3,4-Dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin in vivo NO freisetzen und dadurch die antiapoptotischen, neuroprotektiven Eigenschaften vermittelt werden. Methoxim-3,4-dephostatin, das keine neuroprotektiven Eigenschaften gegenüber NMDA- und Staurosporin-induzierter Apoptose besitzt, scheint aufgrund der nitrosaminfreien Struktur hingegen keine NO-Donatoreigenschaften zu besitzen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde zunächst die NO-Freisetzung der Dephostatin-Derivate am Institut für Pharmazeutische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg durch Frau Bianca Rickerts unter Leitung von Prof. Dr. H.-J. Duchstein gemessen.

3.3.2.1 Ethyl-3,4-dephostatin als NO-Donator

Im folgenden Experiment wurde auf der Basis einer Chemilumineszenzreaktion zwischen Ozon und Stickstoffmonoxid mit Hilfe eines NOA (Nitric oxide analyzer) untersucht, ob und wieviel Stickstoffmonoxid aus Ethyl-3,4-dephostatin (Abb. 3.33) freigesetzt werden konnte. Hierzu wurde Ethyl-3,4-dephostatin 20 h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen in PBS gerührt und anschließend 1 ml der sich über der Reaktionslösung befindlichen Gasphase mittels einer Glasspritze in den NO-Analysator (NOA 280) übertragen.

Abbildung 3.34 zeigt den prozentualen Anteil des freigesetzten Stickstoffmonoxids bezogen auf die Gesamt-Stickstoffmonoxidmenge des eingesetzten Ethyl-3,4-dephostatin. Insgesamt wurden 15,1 % NO aus dem Dephostatin-Derivat freigesetzt. Wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich ein Sauerstoffdonator (Iodosobenzen) hinzugefügt, stieg der Anteil des freigesetzten Stickstoffmonoxids auf 55 %.

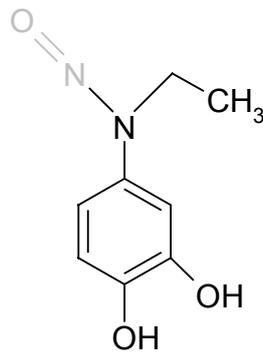


Abbildung 3.33: Strukturformel von Ethyl-3,4-dephostatin

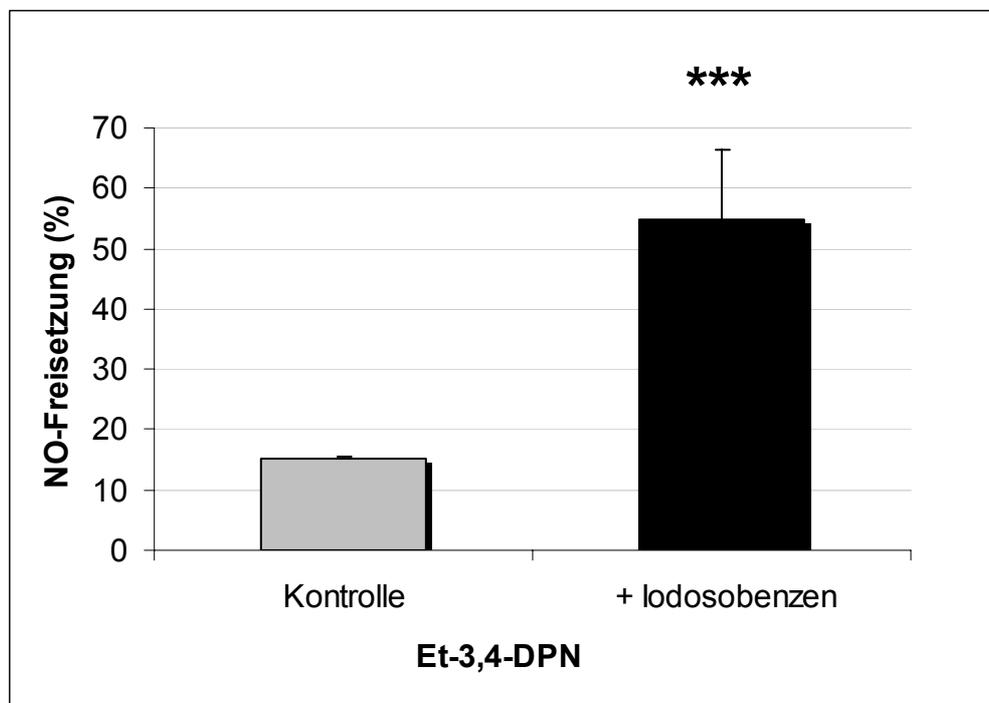


Abb. 3.34: NO-Freisetzung durch Ethyl-3,4-dephostatin

Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid wurde unter anaeroben Bedingungen bei 37°C erzeugt. Nach Übertragung von 1 ml der über der Reaktionslösung befindlichen Gasphase in den NOA 280 wurde das freigesetzte NO gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil des freigesetzten Stickstoffmonoxids bezogen auf die Ausgangsmenge des eingesetzten Ethyl-3,4-dephostatins (Et-3,4-DPN) als Mittelwert \pm S.D. aus mindestens 3-4 Messungen. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur freigesetzten Stickstoffmonoxidmenge ohne Zusatz des Sauerstoffdonators Iodosobenzen (Kontrolle; Student's *t*-Test).

3.3.2.2 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin als NO-Donator

Ebenso konnte für 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin (Abb. 3.35) eine Stickstoffmonoxid-freisetzung mittels chemiluminometrischer Messung nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil des freigesetzten Stickstoffmonoxids bezogen auf die Gesamt-Stickstoffmonoxidmenge des eingesetzten Dephostatin-Derivates betrug 5 %. Abbildung 3.36 zeigt, dass – wie auch schon bei Ethyl-3,4-dephostatin – der prozentuale Anteil des freigesetzten Stickstoffmonoxids nach Zugabe des Sauerstoffdonators Iodosobenzol auf 20,8 % steigt. Dem gegenüber waren für Methoxim-3,4-dephostatin nachweisbar.

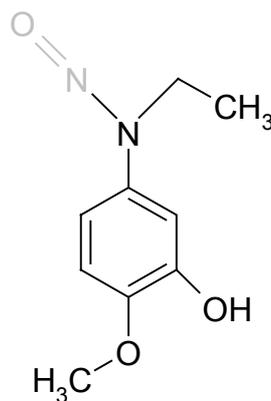


Abb. 3.35: Strukturformel von 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin

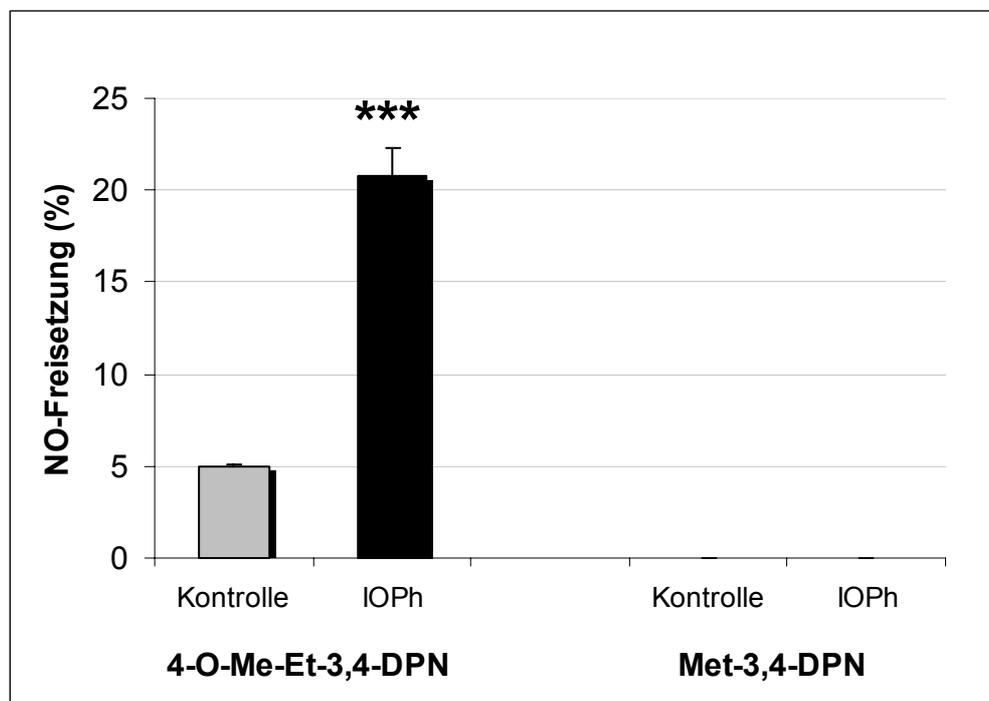


Abb. 3.36: NO-Freisetzung durch 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin und Methoxim-3,4-dephostatin

Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid wurde unter anaeroben Bedingungen bei 37°C erzeugt. Nach Übertragung von 1 ml der über der Reaktionslösung befindlichen Gasphase in den NOA 280 wurde das freigesetzte NO aus 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin (4-O-Me-Et-3,4-DPN) und Methoxim-3,4-dephostatin (Met-3,4-DPN) gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil des freigesetzten Stickstoffmonoxids bezogen auf die Ausgangsmenge des eingesetzten 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatins als Mittelwert \pm S.D. aus mindestens 3-4 Messungen. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur freigesetzten Stickstoffmonoxidmenge ohne Zusatz des Sauerstoffdonators Iodosobenzol (IOPh) (Student's *t*-Test).

3.3.2.3 Methoxim-3,4-dephostatin setzt kein NO frei

Nachdem in vorhergehenden Versuchen eine Stickstoffmonoxidfreisetzung aus Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin mit dem NOA 280 gemessen werden konnte (Abb. 3.34, 3.36), ergab die chemiluminometrische Messung für Methoxim-3,4-dephostatin (Abb. 3.37) keine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Abb. 3.36). Auch nach Zugabe des Sauerstoffdonators Iodosobenzol konnte für dieses Dephostatin-Derivat nur geringste Mengen ($< 0,002$ %) freies NO gemessen werden.

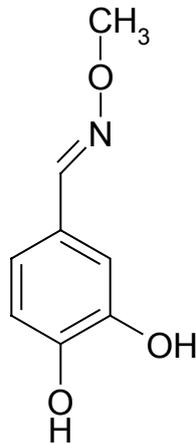


Abb. 3.37: Strukturformel von Methoxim-3,4-dephostatin

3.3.3 Erhöhung des Phosphorylierungsgrades des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA nach Behandlung mit Dephostatin-Derivaten

Wie schon in der Einleitung beschrieben, kann Stickstoffmonoxid über Aktivierung und Inhibierung verschiedener Signaltransduktionswege neuroprotektiv wirken. Ein Mechanismus der diskutiert wird, ist die NO-vermittelte Inhibierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (Caselli et al., 1994; Callsen et al., 1999). Im folgenden wurde untersucht, welche Rolle die PTP-Inhibitoren und NO-Donatoren Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin hinsichtlich der verstärkten Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA spielen, und ob diese Effekte über eine Freisetzung von NO zu erklären sind.

3.3.3.1 Ethyl-3,4-dephostatin erhöht den Phosphorylierungsgrad von Tyrosinresten

Nach Behandlung von hippocampalen Neuronen der Ratte mit Ethyl-3,4-dephostatin (1 μ M) zeigte sich eine transiente, also vorübergehende Steigerung des Phosphorylierungsgrades an Tyrosinresten. Hierzu wurden die Kulturen unterschiedlich lange mit dem PTP-Inhibitor und NO-Donator vorinkubiert und anschließend mittels Immunzytochemie am konfokalen Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop vermessen. In Abbildung 3.38 ist zu sehen, dass eine Steigerung der Tyrosinphosphorylierung nach 30 min zu verzeichnen ist und nach 1 h wieder abnimmt. Nach einer Vorbehandlungszeit von 3 h war keine verstärkte Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle mehr zu sehen.

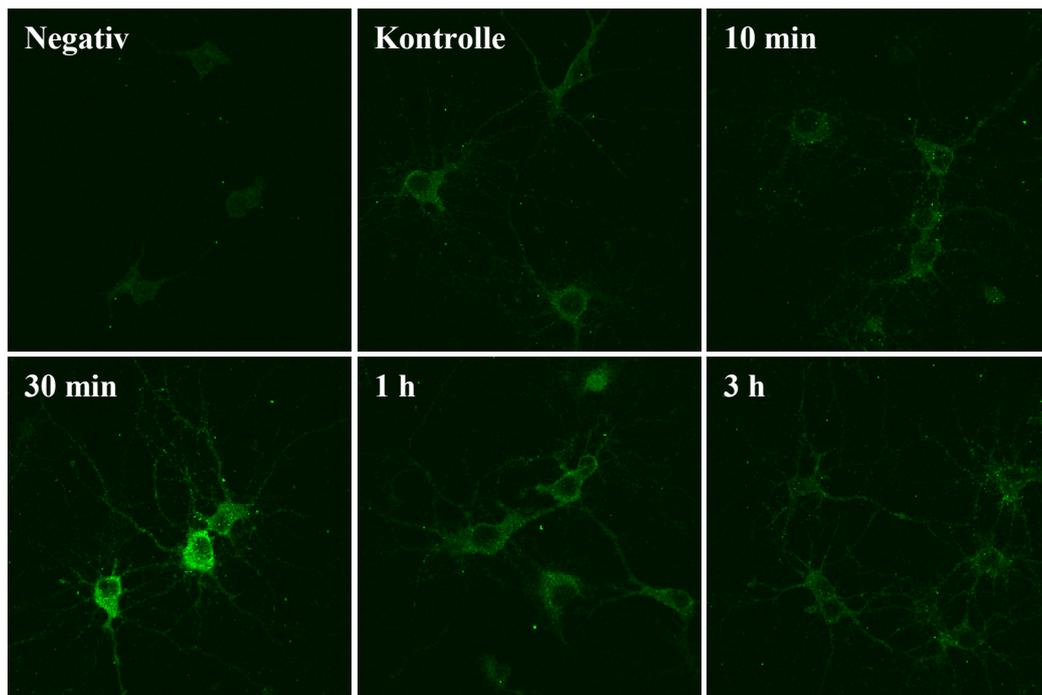


Abb. 3.38: Transiente Phosphorylierung von Tyrosinresten nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin

Messungen mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop zeigen eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin ($1 \mu\text{M}$) für unterschiedliche Behandlungszeiten (10 min – 3 h). Als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, bei denen während der Immunzytochemie der Primärantikörper weggelassen wurde. Kontrollen sind mit Vehikel (H_2O) anstatt Orthovanadat behandelt worden.

3.3.3.2 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin erhöht den Phosphorylierungsgrad von Tyrosinresten

Gleiche Effekte ließen sich nach Behandlung hippocampaler Neurone mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin messen. Nach Behandlung mit dem PTP-Inhibitor und gleichzeitigem NO-Donator konnte immunzytochemisch eine transiente Steigerung der Tyrosinphosphorylierung festgestellt werden (Abb. 3.39).

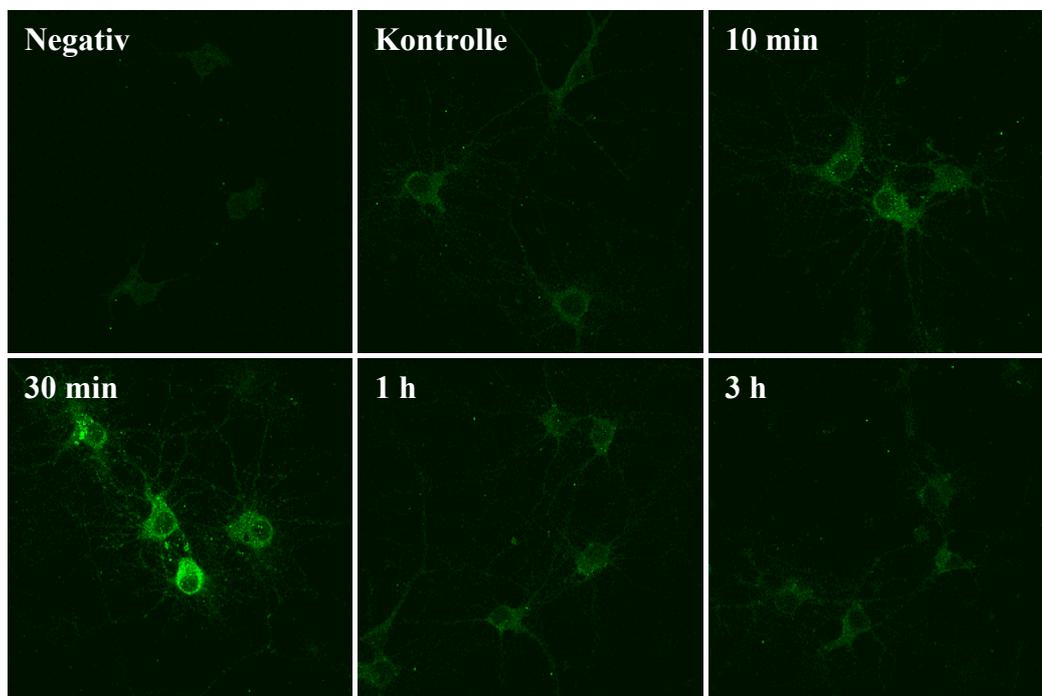


Abb. 3.39: Transiente Phosphorylierung von Tyrosinresten nach Behandlung mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin

Immunzytochemische Analysen zeigen die transiente Phosphorylierung von Tyrosinresten in hippocampalen Neuronen durch 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin ($1 \mu\text{M}$). Eine Steigerung der Phosphorylierung konnte 10 bis 30 min nach Inkubation mit dem NO-Donator mittels Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie nachgewiesen werden, während nach 1 h wieder das Kontrollniveau erreicht wurde. Als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, bei denen während der Immunzytochemie der Primärantikörper weggelassen wurde. Kontrollen sind mit Vehikel (DMSO) anstatt mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-Dephostatin behandelt worden.

3.3.3.3 Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen

Nachdem ein Anstieg der Tyrosinphosphorylierung nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin gemessen werden konnte, sollte als nächstes der Einfluss auf die TrkA-Phosphorylierung getestet werden. Hierzu wurden hippocampale Rattenkulturen mit dem Dephostatin-Derivat (1 μM) inkubiert und anschließend der Zeitverlauf mittels der Immunoblotanalyse detektiert. Bereits 5 min nach Inkubation konnte eine Erhöhung der TrkA-Phosphorylierung gemessen werden, die nach 60 min wieder abnahm und 180 min nach Behandlung wieder das Kontrollniveau erreichte (Abb. 3.40).

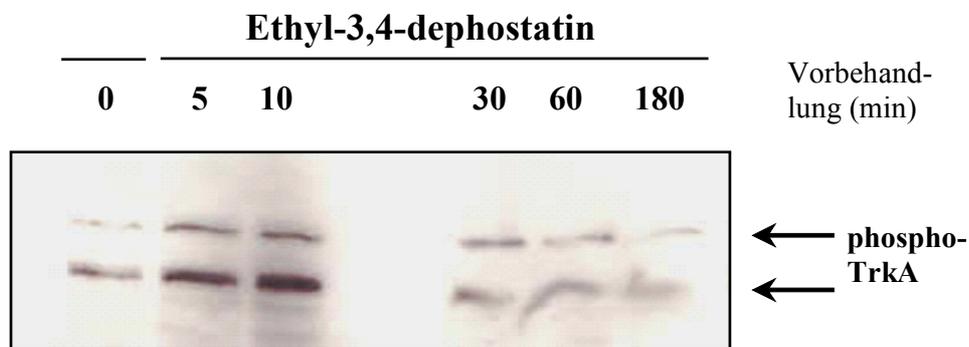


Abb. 3.40: Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA nach Ethyl-3,4-dephostatin-Behandlung

Eine erhöhte TrkA-Phosphorylierung konnte mit der Immunoblotanalyse aus Proteinextrakten von hippocampalen Rattenneuronen 5 bis 60 min nach der Inkubation mit Ethyl-3,4-dephostatin (DPN, 1 μM) festgestellt werden.

Aufnahmen mit dem konfokalen Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop bestätigen das Ergebnis des Western Blots (Abb. 3.40). Hippokampale Neurone wurden mit Ethyl-3,4-Dephostatin ($1 \mu\text{M}$) vorbehandelt, so dass anschließend der Zeitverlauf der TrkA-Phosphorylierung immunzytochemisch nachgewiesen werden konnte. Abbildung 3.41 zeigt die transiente Phosphorylierung von TrkA nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin.

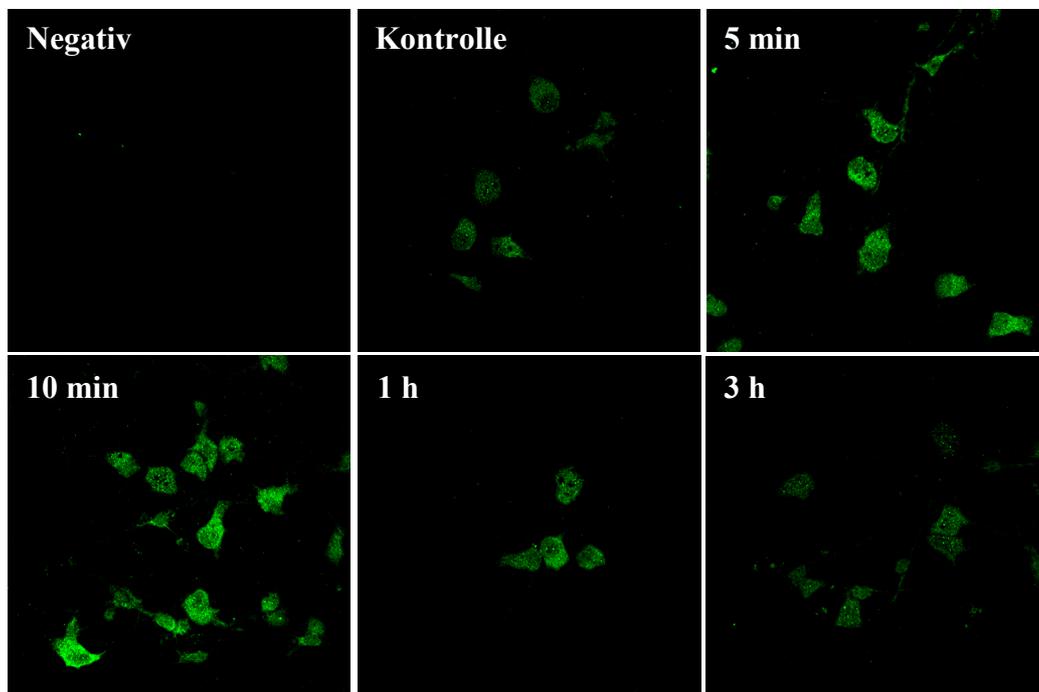


Abb. 3.41: Transiente TrkA-Phosphorylierung in hippocampalen Rattenzellen nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin

Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop zeigen eine verstärkte TrkA-Phosphorylierung nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin ($1 \mu\text{M}$) für unterschiedliche Behandlungszeiten (5 min – 3 h). Als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, bei denen während der Immunzytochemie der Primärantikörper weggelassen wurde. Kontrollen sind mit Vehikel (DMSO) anstatt Ethyl-3,4-dephostatin behandelt worden.

3.3.3.4 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss auf die TrkA-Phosphorylierung nach Behandlung mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin ($1 \mu\text{M}$) untersucht. Immunoblotanalysen aus Proteinextrakten von hippocampalen Neuronen zeigen eine transiente Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors nach Behandlung mit dem NO-Donator bzw. PTP-Inhibitor (Abb. 3.42).

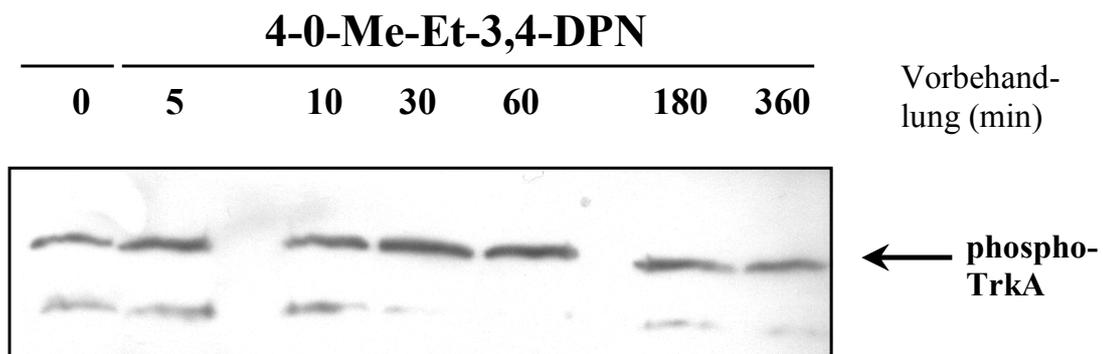


Abb. 3.42: Transiente TrkA-Phosphorylierung in hippocampalen Rattenzellen nach Behandlung mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin

Rattenneurone wurden mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin ($1 \mu\text{M}$) behandelt (5 – 360 min). Phospho-TrkA wurde anschließend durch die Western Blot Methode detektiert. Eine Steigerung der TrkA-Phosphorylierung wurde innerhalb von 5 min bis 60 min nach der Exposition mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin gemessen.

3.3.4 Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges vermittelt die neuroprotektive Wirkung von Ethyl-3,4-dephostatin

Wie gezeigt werden konnte, führt eine Behandlung mit den Dephostatin-Derivaten Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin zu einer Aktivierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA. In folgenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob durch die Ethyl-3,4-dephostatin-induzierte TrkA-Phosphorylierung der PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweg aktiviert wird und an den neuroprotektiven Effekten von Ethyl-3,4-dephostatin beteiligt ist.

3.3.4.1 Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte Akt-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen

Zunächst wurde mittels immunzytochemischer Analyse die Phosphorylierung von Akt nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin (10 μ M) untersucht. Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop zeigen eine transiente Phosphorylierung von Akt nach Inkubation mit Ethyl-3,4-dephostatin (Abb. 3.43). Bereits nach 10-minütiger Behandlung erfolgte eine erhöhte Phosphorylierung, die bis 1 h nach Exposition anhielt. Nach länger andauernder Inkubation (6 h) war keine verstärkte Akt-Phosphorylierung mehr vorhanden.

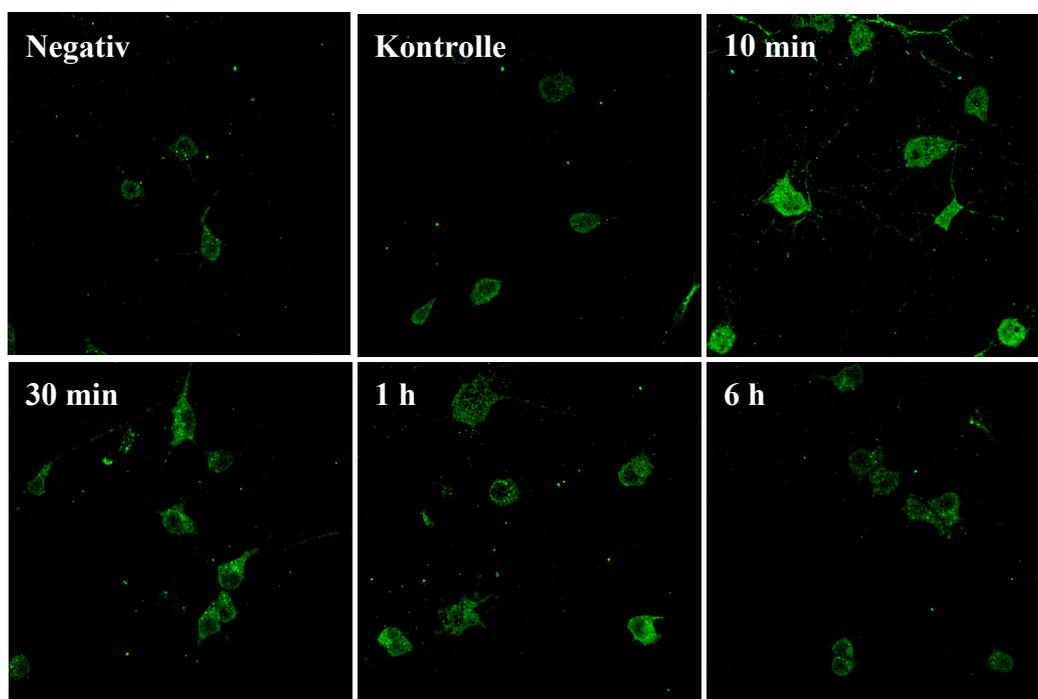


Abb. 3.43: Transiente Phosphorylierung von Akt in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin

Transiente Phosphorylierung von Akt wurde mittels Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin (10 μ M) gemessen. Eine Steigerung der Phosphorylierung konnte innerhalb von 10 min nach Inkubation mit dem PTP-Inhibitor bzw. NO-Donator nachgewiesen werden. Nach 6 h nahm der phospho-Akt Gehalt wieder bis auf das Kontrollniveau ab. Negativkontrollen wurden unter Weglassen des Primärantikörpers vermessen. Kontrollen wurden mit Vehikel (DMSO) anstatt Ethyl-3,4-dephostatin behandelt.

3.3.4.2 Beteiligung der PI3-Kinase an Ethyl-3,4-dephostatin-induzierten neuroprotektiven Effekten

Mit Hilfe der Western Blot Methode wurde untersucht, ob die PI3-Kinase für die Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte Aktivierung von Akt verantwortlich ist. Hippokampale Neurone wurden vor der Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin (1 μ M, 5 – 60 min) mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin (20 nM, 1 h) vorbehandelt. Immunoblotanalysen (Abb. 3.44) von den behandelten Proteinextrakten zeigen eine Erhöhung der Akt-Phosphorylierung nach Inkubation mit Ethyl-3,4-dephostatin, die durch Vorbehandlung mit Wortmannin blockiert wurde.

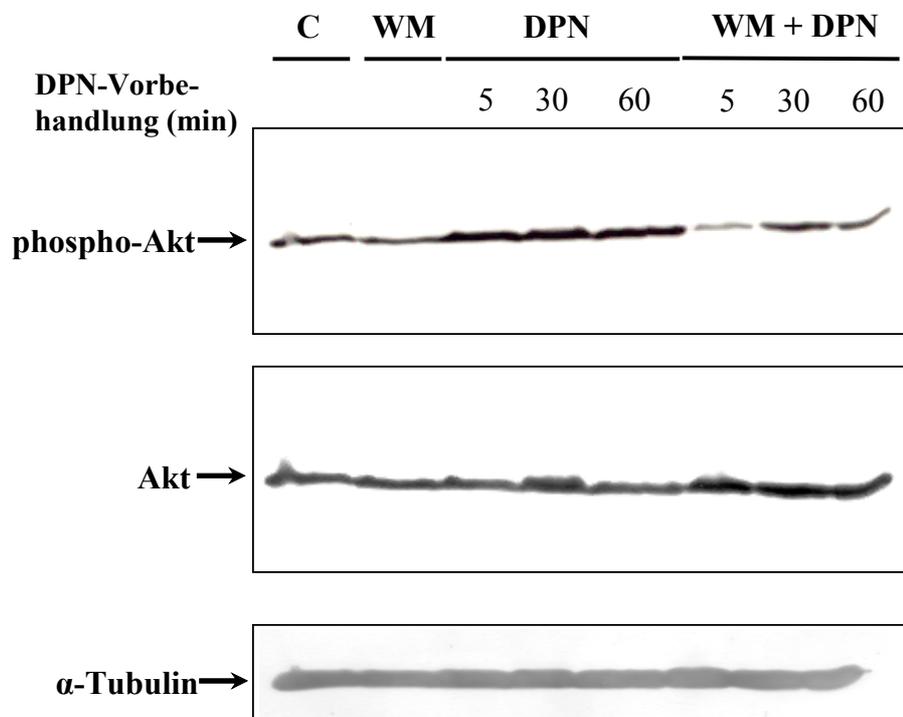


Abb. 3.44: Der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin hemmt die Ethyl-3,4-dephostatin-induzierte Akt-Phosphorylierung

Mittels der Immunoblotanalyse aus hippocampalen Proteinextrakten konnte eine erhöhte Akt-Phosphorylierung von hippocampalen Neuronen 15 bis 60 min nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin (DPN, 1 μ M) nachgewiesen werden. Der Effekt wurde nach Vorbehandlung mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin (WM, 20 nM, 1 h) aufgehoben. Mit Hilfe der anti-Akt- und - α -Tubulin-Antikörper wurde die gleichmäßige Beladung des Gels nachgewiesen.

Wie der folgende Versuch belegte, konnte eine Beteiligung der PI3-Kinase an Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelter Neuroprotektion gemessen werden. Hippokampale Neurone wurden hierzu mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin (20 nM) vorbehandelt, mit dem NO-Donator bzw. PTP-1B-Inhibitor inkubiert (1 μ M) und anschließend einer Exposition mit Staurosporin (200 nM) ausgesetzt. Wie schon in vorhergehenden Versuchen gezeigt, blockierte Ethyl-3,4-dephostatin die Staurosporin-induzierte Apoptose (38 % apoptotische Kerne im Vergleich zu 50 % in der Staurosporinkontrolle, Abb. 3.45). Die Hemmung der PI3-Kinaseaktivität durch Wortmannin hob die neuroprotektive Wirkung von Ethyl-3,4-dephostatin auf (53 % apoptotische Kerne, $p < 0,001$). Wortmannin dagegen führte zu keiner signifikanten Schädigung der Neurone (24 % apoptotische Kerne im Vergleich zu 23 % in der Kontrolle).

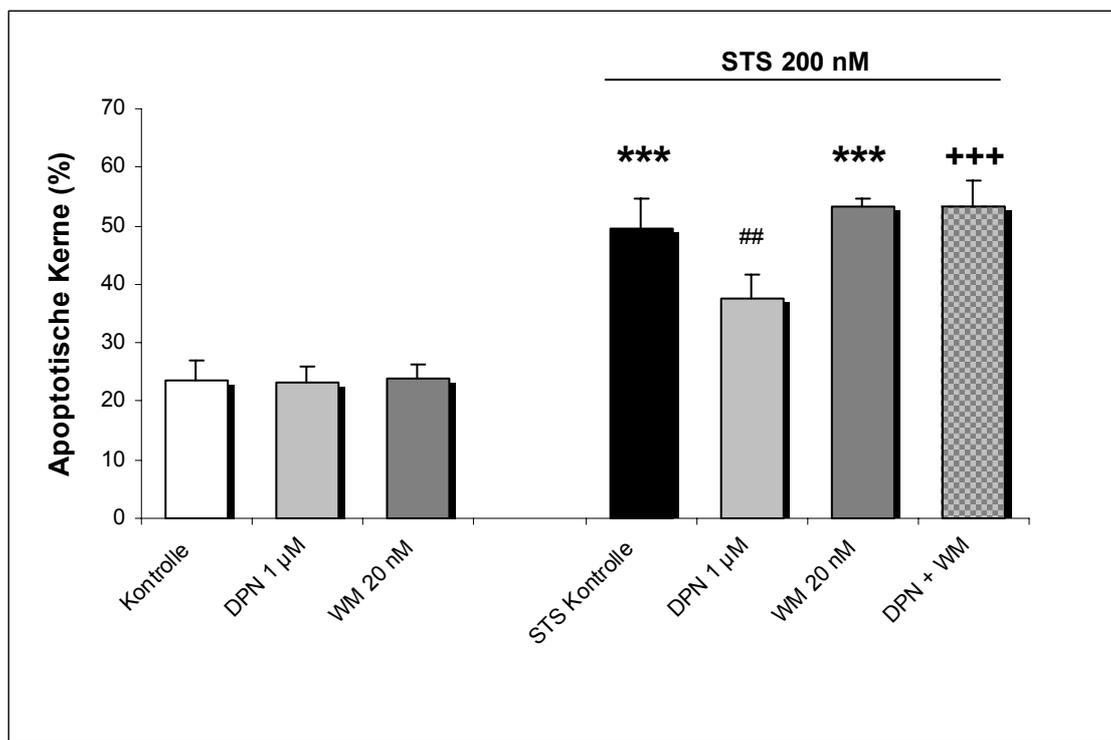


Abb. 3.45: Der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin hemmt die neuroprotektiven Effekte von Ethyl-3,4-dephostatin

Hippokampale Neurone wurden 1 h mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (20 nM) vorbehandelt, sechs Stunden mit Ethyl-3,4-dephostatin (DPN, 1 μ M) und anschließend mit Staurosporin (STS, 200 nM) inkubiert. Nach Färbung mit Hoechst 33258 wurde der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen als Mittelwert \pm S.D. aus 4-5 Kulturen je Gruppe angegeben. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; # $p < 0,01$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; +++ $p < 0,01$ im Vergleich zu den mit Ethyl-3,4-dephostatin und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.5 Aktivierung des MEK/Erk1/2-Signaltransduktionsweges vermittelt die neuroprotektive Wirkung von Ethyl-3,4-dephostatin

In früheren Experimenten konnte eine Beteiligung des PI3-K/Akt Signaltransduktionsweges an Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelter Neuroprotektion nachgewiesen werden. Bislang liegen aber noch keine Studien über den Einfluss des Dephostatin-Derivats auf die MEK oder die MAPK Erk1 und Erk2 vor. Um die Beteiligung der MEK/MAPK an der durch Ethyl-3,4-dephostatin-induzierten Neuroprotektion zu untersuchen, wurden nachfolgende Experimente durchgeführt.

3.3.5.1 Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte Erk1- und Erk2-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen

Um obige These zu untersuchen, wurden hippocampale Rattenneurone immunzytochemisch nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin (1 μM) untersucht. Hierzu wurden die Kulturen mit dem NO-Donator inkubiert und die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers vermessen. Die Auswertung mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop ergab eine transiente Phosphorylierung von Akt. Der Anstieg der Phosphorylierung war bereits nach 10 min detektierbar, und das Kontrollniveau wurde wieder nach 6 h erreicht. Abbildung 3.46 zeigt die transiente Erk1/2-Phosphorylierung.

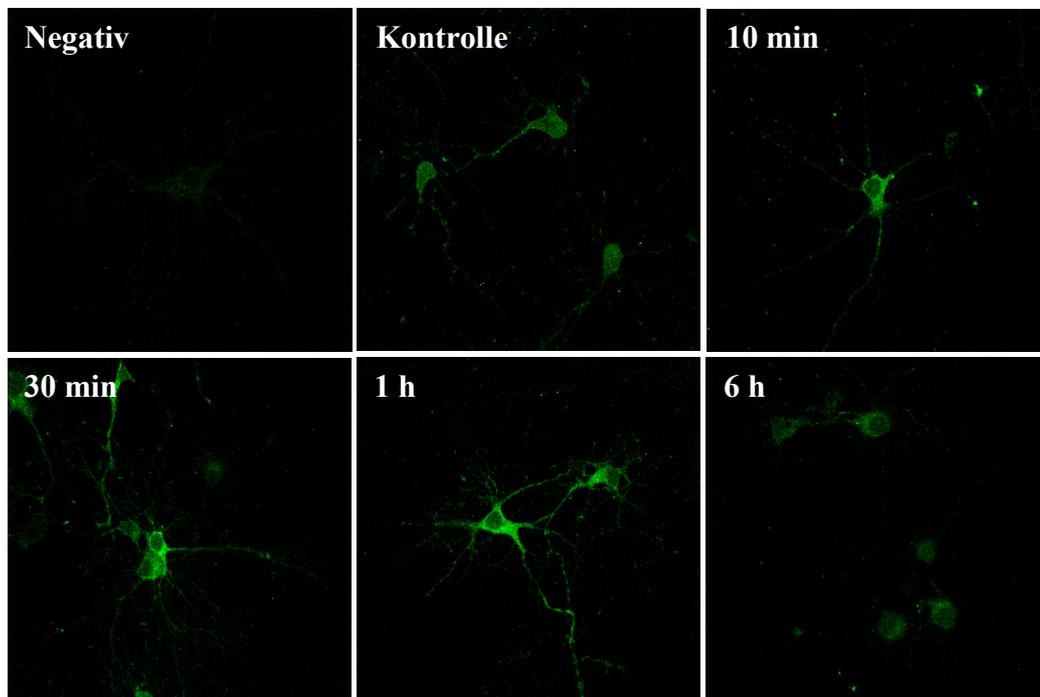


Abb. 3.46: Transiente Erk1/2-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin

Immunzytochemische Analysen zeigen die transiente Phosphorylierung von Erk1/2 in hippocampalen Neuronen durch Ethyl-3,4-dephostatin ($1 \mu\text{M}$). Ein Anstieg der Phosphorylierung konnte 30 min nach Inkubation mit dem NO-Donator mittels Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie nachgewiesen werden, während nach 6 h wieder das Kontrollniveau erreicht wurde. Als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, bei denen während der Immunzytochemie der Primärantikörper weggelassen wurde. Kontrollen sind mit Vehikel (DMSO) anstatt Ethyl-3,4-dephostatin behandelt worden.

3.3.5.2 Beteiligung der MEK an Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelten neuroprotektiven Effekten

Erk1/2 wurde durch die Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin transient erhöht. Zur Überprüfung der Bedeutung einer verstärkten Erk1/2-Phosphorylierung für den neuroprotektiven Effekt von Ethyl-3,4-dephostatin wurden hippocampale Rattenneurone 1 h mit dem MEK-Inhibitor UO126 (20 μ M) behandelt. Nach anschließender 6-stündiger Inkubation mit Ethyl-3,4-dephostatin (1 μ M) und Behandlung mit STS (200 nM) wurden die Zellen mit Hoechst angefärbt. In Abbildung 3.47 ist zu sehen, dass UO126 die neuroprotektive Wirkung von Ethyl-3,4-dephostatin gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose signifikant aufhebt ($p < 0,001$).

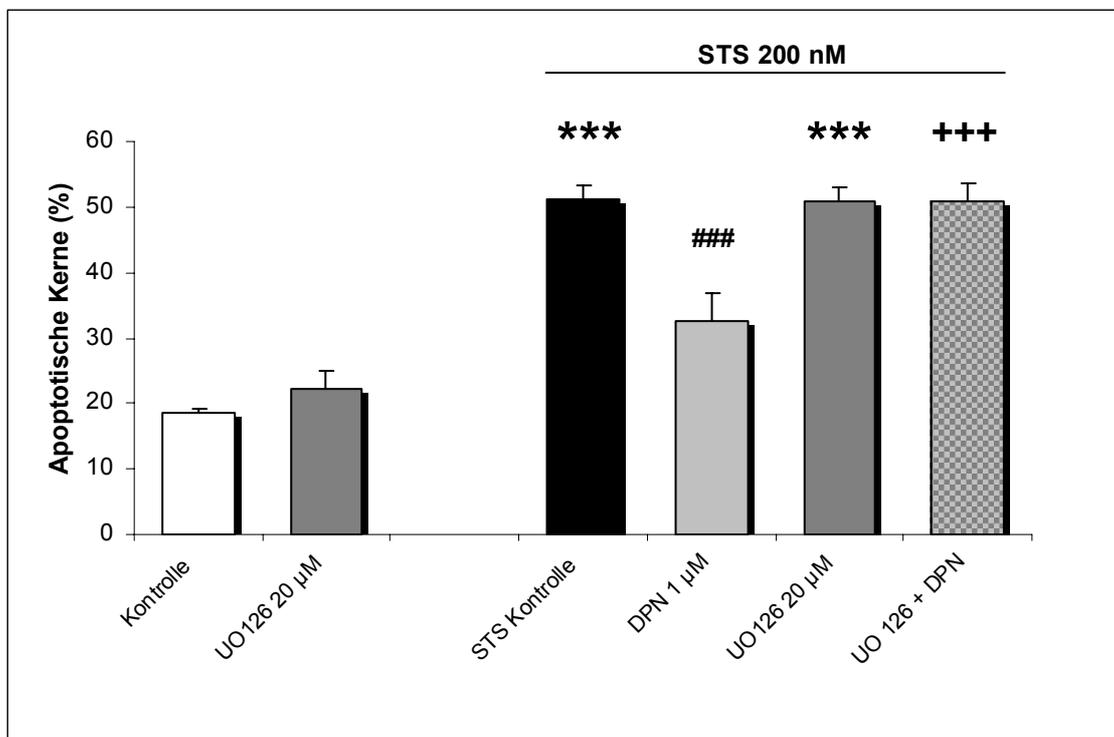


Abb. 3.47: Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die neuroprotektiven Effekte von Ethyl-3,4-dephostatin

Der Inhibitor UO126 (20 μ M) wurde 1 h vor der Behandlung der hippocampalen Neurone mit Ethyl-3,4-dephostatin (DPN, 1 μ M) zugegeben. Nach 6 h wurden die Zellen 24 h mit Staurosporin (STS, 200 nM) inkubiert, anschließend fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen als Mittelwert \pm S.D. aus 2 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; +++ $p < 0,001$ im Vergleich zu den mit Ethyl-3,4-dephostatin und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.6 Beteiligung der löslichen Guanylatcyclyase an Ethyl-3,4-dephostatin- und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelter Neuroprotektion

Barsacchi et al. (2002) beschreiben in ihren Experimenten eine Freisetzung von cGMP durch Stickstoffmonoxid mit nachfolgenden antiapoptotischen Eigenschaften durch Hemmung der Sphingomyelinase. Dies ist nur ein Beispiel für die neuroprotektive Wirkung von NO. Stickstoffmonoxid führt zu einer Freisetzung von cGMP nach Aktivierung der löslichen Guanylatcyclyase (Fiscus, 2002). Durch die Freisetzung von cGMP kommt es schließlich zu einer Aktivierung der Proteinkinase G, die ihrerseits über eine Aktivierung verschiedener Proteine wie z.B. Bcl-2 (Tejedo et al., 2001) oder CREB (Ciani et al., 2002), Inaktivierung von z.B. Caspasen (Kim et al. 1999) oder Hemmung der Cytochrom C-Freisetzung (Kim et al., 1999) zu neuroprotektiven Effekten führt. Schon in niedrigen Konzentrationen vermag Stickstoffmonoxid diese Signaltransduktionswege zu aktivieren (Davis et al., 2001).

3.3.6.1 Hemmung der Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelten Neuroprotektion durch ODQ

Um den Einfluss dieser Kaskade auf die Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte Neuroprotektion in hippokampalen Neuronen zu untersuchen, wurden die Kulturen 1 h mit dem Inhibitor der sGC – 1-*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-on (ODQ; 20 μ M) – vorbehandelt. Nach Inkubation mit Ethyl-3,4-dephostatin (1 μ M) und anschließender Exposition mit Staurosporin (200 nM) zeigte die Auswertung (Abb. 3.48), dass der sGC-Inhibitor die antiapoptotische Wirkung von Ethyl-3,4-dephostatin aufzuheben vermochte und selbst zu keiner Schädigung der Neurone führte. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem synthetischen cGMP-Analogen 8-Br-cGMP (100 pM) behandelt, das einerseits membrangängig ist (Sugawa et al., 1993; Ward et al., 1992) und andererseits schlechter durch die cGMP-abhängige-Phosphodiesterase abgebaut werden kann (Butt et al., 1992). Die Versuche wurden durchgeführt, um die cGMP-vermittelte Neuroprotektion zu bestätigen. 8-Br-cGMP verminderte dabei den Anteil an apoptotischen Kernen signifikant ($p < 0,001$) von 67 % in der Staurosporinkontrolle auf 43 %.

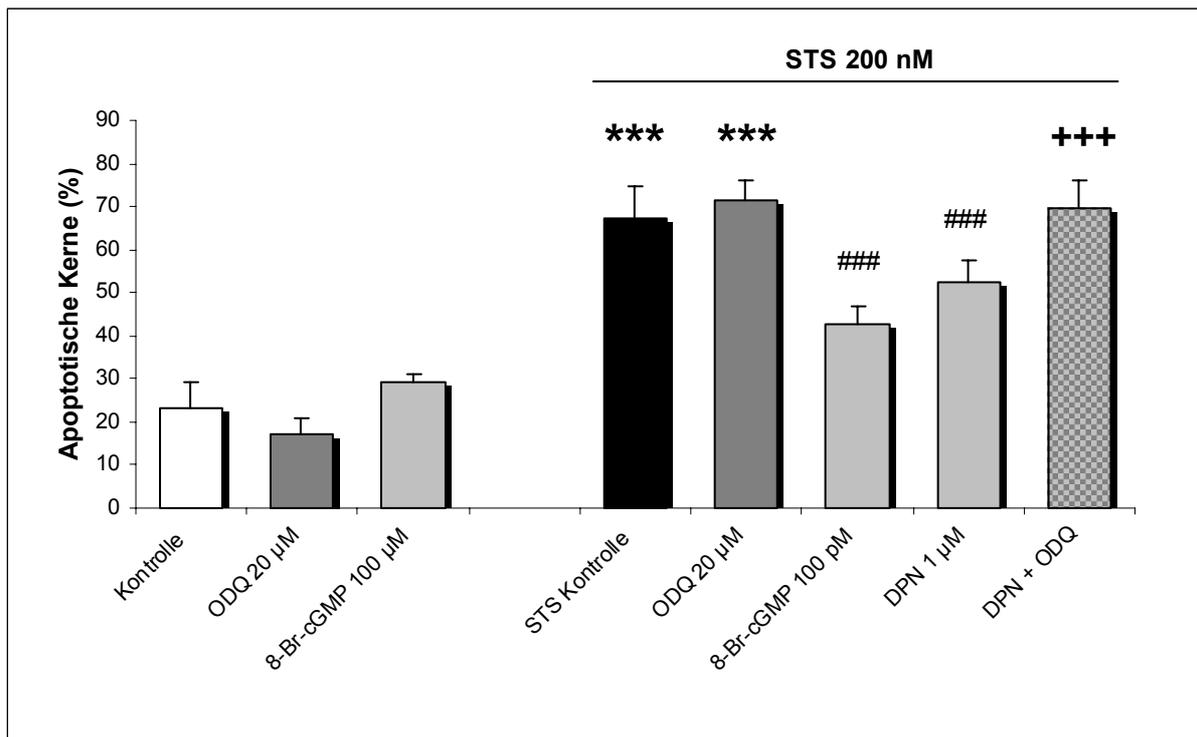


Abb. 3.48: Beteiligung der sGC an Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelter Neuroprotektion

Der sGC-Inhibitor ODQ (20 μ M) wurde 1 h vor der Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin (DPN, 1 μ M) zu hippocampalen Neuronen gegeben. Nach 6-stündiger Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin und 24-stündiger Exposition mit Staurosporin (STS, 200 nM) wurden die Zellen mit Hoechst 33258 gefärbt. Die Auswertung zeigt den prozentualen Anteil an apoptotischen Kernen \pm S.D. aus jeweils 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; +++ $p < 0,001$ im Vergleich zu den mit Ethyl-3,4-dephostatin und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.6.2 Hemmung der 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelten Neuroprotektion durch ODQ

Nachdem im vorherigen Versuch die Beteiligung von cGMP an der durch Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelten Neuroprotektion festgestellt werden konnte, sollte im folgenden Experiment der Einfluss von cGMP auf 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelte Neuroprotektion untersucht werden.

Hierzu wurden hippokampale Neurone mit ODQ (20 μ M) vorbehandelt und anschließend mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin (1 und 10 μ M) inkubiert. Wie Abbildung 3.49 zeigt, wurden die antiapoptotischen und somit neuroprotektiven Eigenschaften des NO-Donators bzw. PTP-1B-Inhibitors gegen Staurosporin-induzierte Apoptose signifikant ($p < 0,001$) aufgehoben.

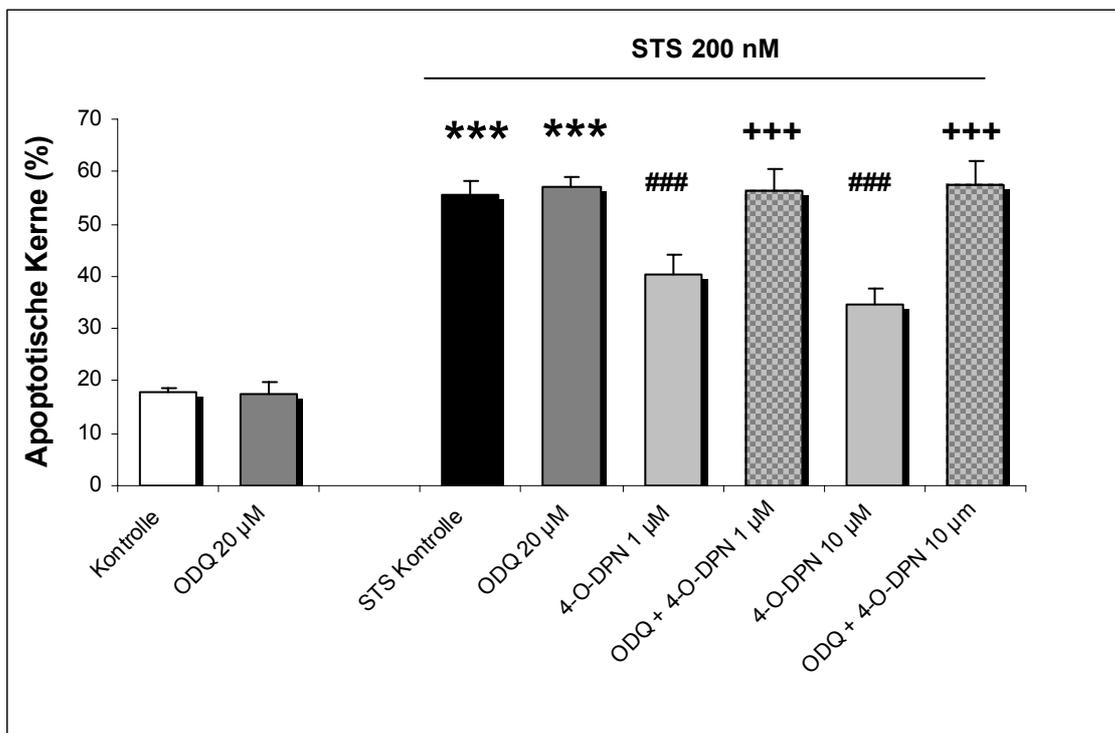


Abb. 3.49: Beteiligung der sGC an 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelter Neuroprotektion
 Hippokampale, embryonale Neuronenkulturen wurden 1 h mit dem sGC-Inhibitor ODQ (20 μ M) behandelt und anschließend 6 h mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin (4-O-DPN, 1 und 10 μ M) inkubiert. Nach 24-stündiger Schädigung mit Staurosporin (STS, 200 nM) wurden die Zellen mit Hoechst 33258 angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen als Mittelwert \pm S.D. aus jeweils 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; +++ $p < 0,001$ im Vergleich zu den mit Ethyl-3,4-dephostatin und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.4 Mechanismen der NO-vermittelten Neuroprotektion in hippocampalen Neuronen

Literaturberichten zu Folge kann Stickstoffmonoxid sowohl neuronalen Zelltod induzieren als auch neuroprotektive Effekte vermitteln. Die hierfür diskutierten Mechanismen sind sehr vielfältig. Neurotoxizität wird z. B. über p53-vermittelter DNA-Fragmentierung (Messmer und Bruene, 1996), wohingegen die neuroprotektiven Eigenschaften über eine Caspasehemmung (Kim et al., 1997, 1999) oder Aktivierung der Proteinkinase G (Fiscus, 2002) induziert werden.

3.4.1 SNAP-vermittelte neuroprotektive Effekte

S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) ist ein Stickstoffmonoxid-donator und besitzt im Vergleich zu anderen NO-Donatoren wie Spermin NONOate, SNP oder SIN-1 eine sehr hohe Halbwertszeit von ca. 37 h und kann somit ideal auch über längere Zeiträume in Zellkultursystemen eingesetzt werden (Ferrero et al., 1999).

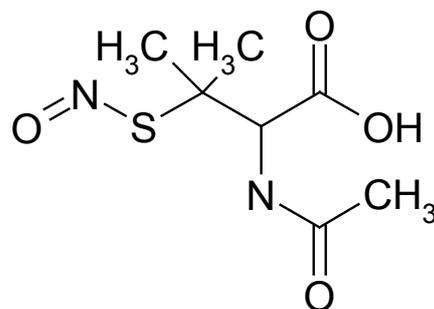


Abbildung 3.50: Strukturformel von S-Nitroso-N-acetylpenicillamin

Zur Bestätigung der NO-vermittelten Neuroprotektion mittels der Dephostatin-Derivate wurden hippocampale Rattenkulturen 6 h mit SNAP in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 – 100 μM) inkubiert und anschließend 24 h mit Staurosporin (200 nM) geschädigt. Staurosporin führte zu einem Anstieg an apoptotischen Zellkernen von 23 % in der Kontrolle auf 61 % nach Schädigung (Abb. 3.51). Der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen nach Behandlung mit SNAP blieb für den Konzentrationsbereich von 0,01 – 10 μM unverändert, wohingegen bei einer Konzentration von 100 μM signifikante, neurotoxische Effekte auftraten. Bei der gleichzeitigen Exposition mit Staurosporin konnten für SNAP konzentrationsabhängige, antiapoptotische und somit neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden. Konzentrationen von 1 und 10 μM blockierten am effektivsten ($p < 0,001$) die Staurosporin-induzierte Apoptose.

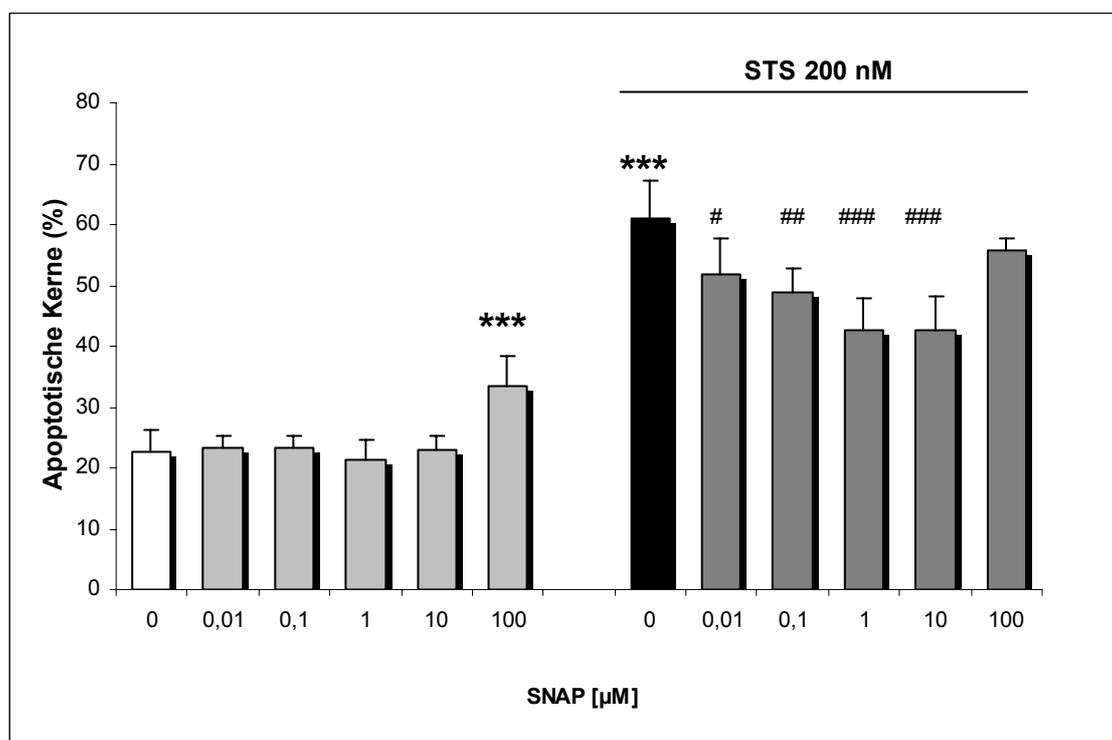


Abb. 3.51: Konzentrationsabhängige Hemmung der Staurosporin-induzierten Apoptose durch den NO-Donator SNAP

Um die neuroprotektiven Eigenschaften von SNAP zu untersuchen, wurden embryonale, hippocampale Neurone 6 h mit dem NO-Donator inkubiert und anschließend mit Staurosporin (STS, 200 nM) behandelt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Kerne in Prozent \pm S.D. aus jeweils 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ und ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.4.2 Erhöhung des Phosphorylierungsgrades des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA durch SNAP

Mit Hilfe des NO-Donators SNAP sollte immunzytochemisch der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss Stickstoffmonoxid auf den Phosphorylierungsgrad des NGF-Rezeptors TrkA besitzt. Hierzu wurden hippocampale Neurone mit SNAP (1 μ M) inkubiert, nach unterschiedlichen Behandlungszeiten fixiert und anschließend immunzytochemisch untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass NO zu einem transienten Anstieg der TrkA-Phosphorylierung führt: Bereits nach 10 min war eine verstärkte Phosphorylierung detektierbar, die nach einer 3-stündigen Behandlungsdauer wieder auf Kontrollniveau absank (Abb. 3.52).

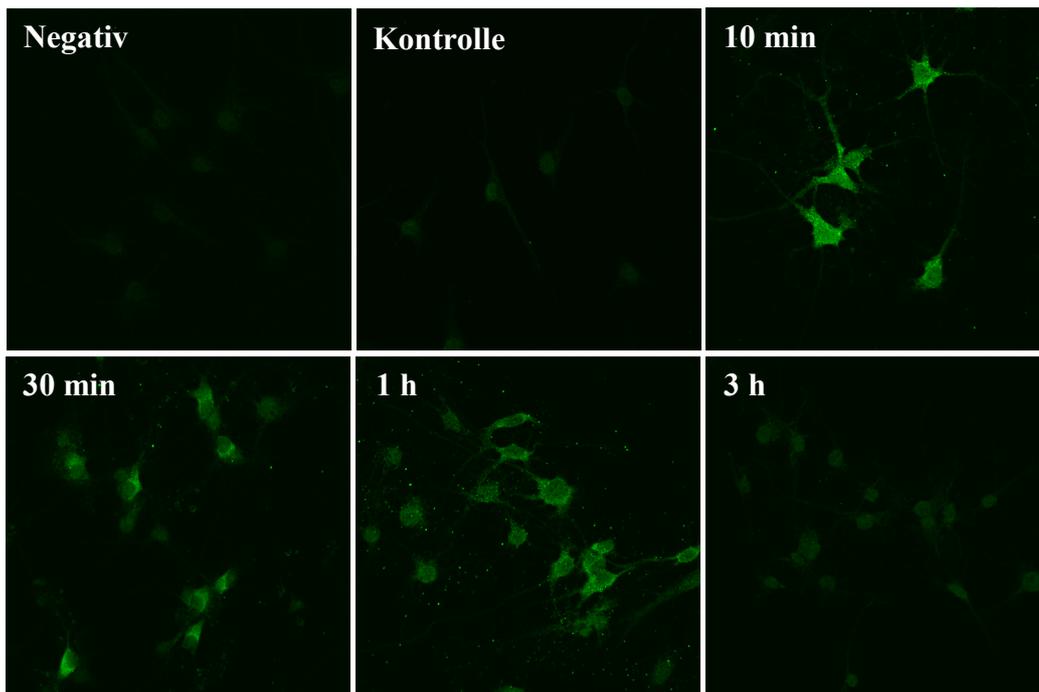


Abb. 3.52: Transiente TrkA-Phosphorylierung durch SNAP

Messungen mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop zeigen eine verstärkte TrkA-Phosphorylierung nach Vorbehandlung mit dem NO-Donator SNAP (1 μ M) für unterschiedliche Behandlungszeiten (10 min – 3 h). Als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, bei denen während der Immunzytochemie der Primärantikörper weggelassen wurde. Kontrollen sind mit Vehikel (DMSO) behandelt worden.

Bestätigt wurde dieses durch Immunoblotanalyse von Proteinextrakten aus hippocampalen Neuronen. Abbildung 3.53 zeigt den Anstieg der TrkA-Phosphorylierung nach 15-minütiger Behandlung mit SNAP (1 μ M), der auch noch nach einer Behandlungsdauer von 60 min zu detektieren war. Die Detektion von α -Tubulin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

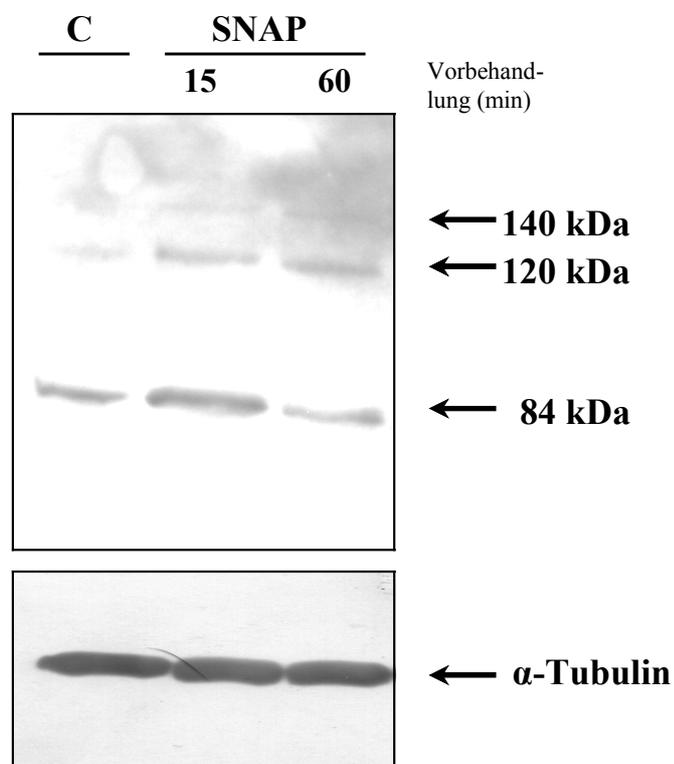


Abb. 3.53: Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA durch SNAP

Hippokampale Rattenneurone wurden mit SNAP (1 μ M) behandelt (15 und 60 min). Phospho-TrkA wurde anschließend mittels Western-Blot-Methode detektiert. Eine Steigerung der TrkA-Phosphorylierung wurde innerhalb von 10 bis 60 min nach Exposition mit SNAP detektiert.

3.4.3 Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges vermittelt die neuroprotektive Wirkung von SNAP

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob aufgrund der SNAP-induzierten Phosphorylierung und nachfolgenden Aktivierung des TrkA-Rezeptors auch der PI3-Kinase/Akt-Signalweg aktiviert wird, und ob durch diese Aktivierung die SNAP-vermittelten neuroprotektiven Effekte vermittelt werden.

3.4.3.1 SNAP-vermittelte Akt-Phosphorylierung in hippokampalen Neuronen

Um obige These zu untersuchen, wurde eine Immunoblotanalyse von Proteinextrakten aus hippokampalen Neuronen nach Behandlung mit dem NO-Donator SNAP (1 μ M) durchgeführt. Abbildung 3.54 zeigt den Anstieg der Akt-Phosphorylierung nach 30-minütiger Behandlung. Nach einer Inkubationszeit von 3 h nahm die Phosphorylierung wieder ab und bei Behandlungszeiten von 6 h war keine verstärkte Akt-Phosphorylierung mehr zu sehen.

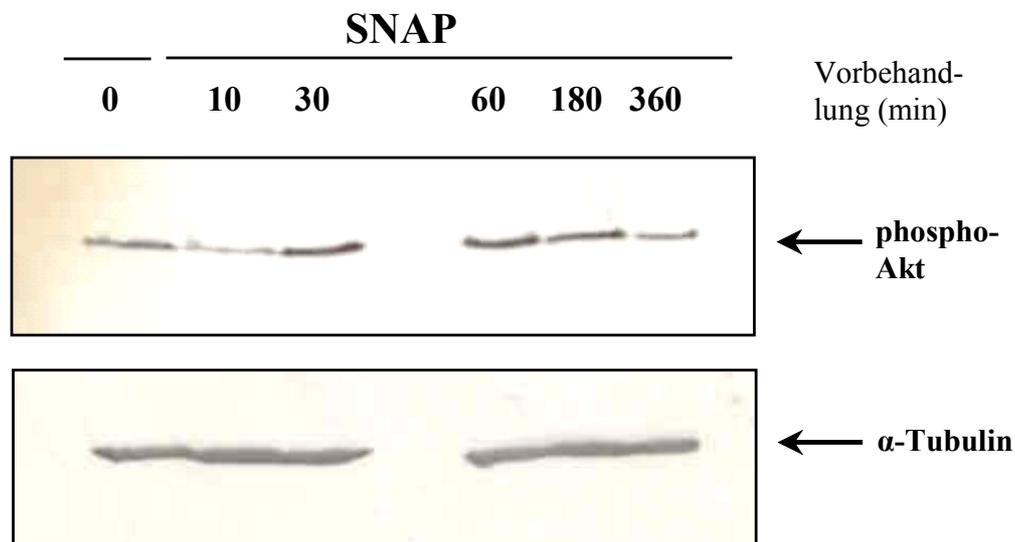


Abb. 3. 54: Transiente Akt-Phosphorylierung durch SNAP

Hippokampale Neurone wurden mit SNAP (1 μ M) behandelt (10 min – 6 h). Transiente Akt-Phosphorylierung konnte anschließend durch die Immunoblotanalyse detektiert werden. Eine Steigerung der Phosphorylierung wurde innerhalb von 30 min bis 180 min nach Exposition mit dem NO-Donator gemessen. Die Detektion von α -Tubulin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

Ein Anstieg der Akt-Phosphorylierung nach SNAP-Behandlung konnte immunzytochemisch bestätigt werden. Hierzu wurden die Kulturen mit dem NO-Donator ($1 \mu\text{M}$) behandelt und die Akt-Phosphorylierung nach den angegebenen Behandlungszeiten im Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop vermessen. Die Auswertung ergab eine transiente Phosphorylierung von Akt. Der Anstieg der Phosphorylierung war bereits nach 10 min detektierbar. Nach 1 h war eine Abnahme zu verzeichnen, das Kontrollniveau wurde jedoch erst nach 3 h erreicht. Abbildung 3.55 zeigt die transiente Erk1/2-Phosphorylierung.

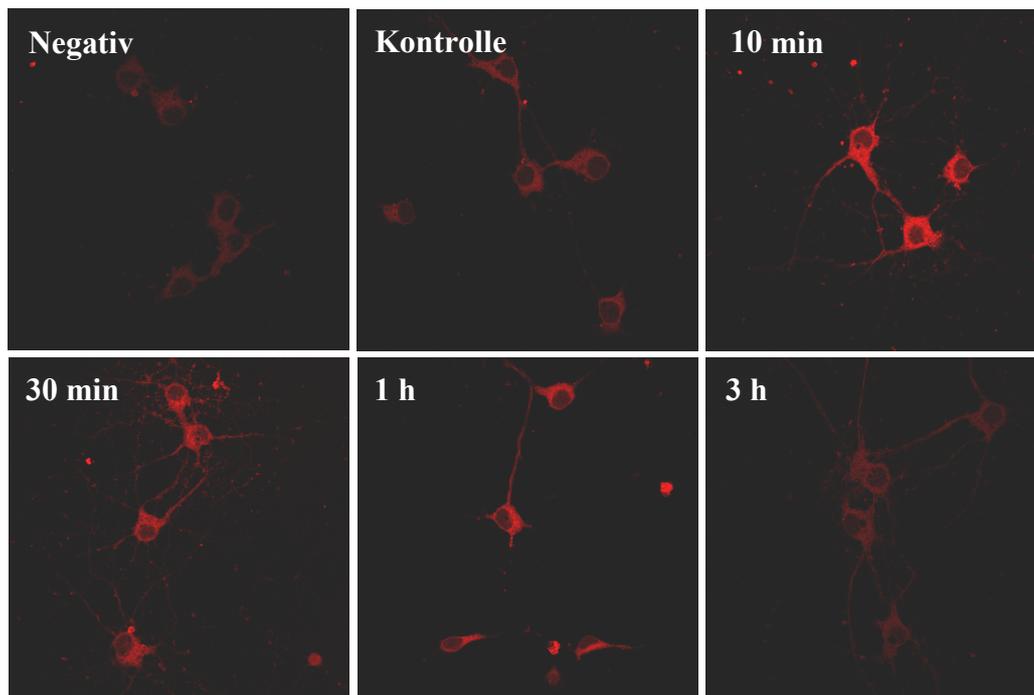


Abbildung 3.55: Transiente Akt-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen nach SNAP-Behandlung

Transiente Phosphorylierung von Akt wurde mittels Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit SNAP ($1 \mu\text{M}$) gemessen. Ein Anstieg der Phosphorylierung konnte innerhalb von 10 min nach Inkubation mit dem NO-Donator nachgewiesen werden. Nach 1 h nahm der phospho-Akt-Gehalt ab und nach 3 h wurde wieder das Kontrollniveau erreicht. Negativkontrollen wurden unter Weglassen des Primärantikörpers vermessen. Kontrollen wurden mit Vehikel (DMSO) anstatt SNAP behandelt.

3.4.3.2 Beteiligung der PI3-Kinase an SNAP-vermittelten neuroprotektiven Effekten

Nachdem eine transiente Phosphorylierung von Akt durch SNAP festgestellt werden konnte, sollte in einem weiteren Experiment die Beteiligung der PI3-K, die nach Aktivierung durch TrkA unmittelbar Akt phosphoryliert, an der SNAP-vermittelten Neuroprotektion überprüft werden.

Hippokampale Neuronenkulturen wurden 1 h mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin (20 nM) behandelt. Nach 6-stündiger Inkubation mit SNAP (10 μ M) und einer 24-stündigen Exposition mit Staurosporin (200 nM) wurden die Zellen mit Hoechst angefärbt. Die Auswertung zeigte eine SNAP-vermittelte Neuroprotektion (41 % apoptotische Kerne im Vergleich zu 55 % in der Staurosporinkontrolle, Abb. 3.56), die durch die Vorbehandlung mit Wortmannin signifikant ($p < 0,01$) aufgehoben wurde. Wortmannin führte dagegen zu keiner Schädigung der Neurone (21 % apoptotische Neurone im Vergleich zu 20 % in der Kontrollgruppe).

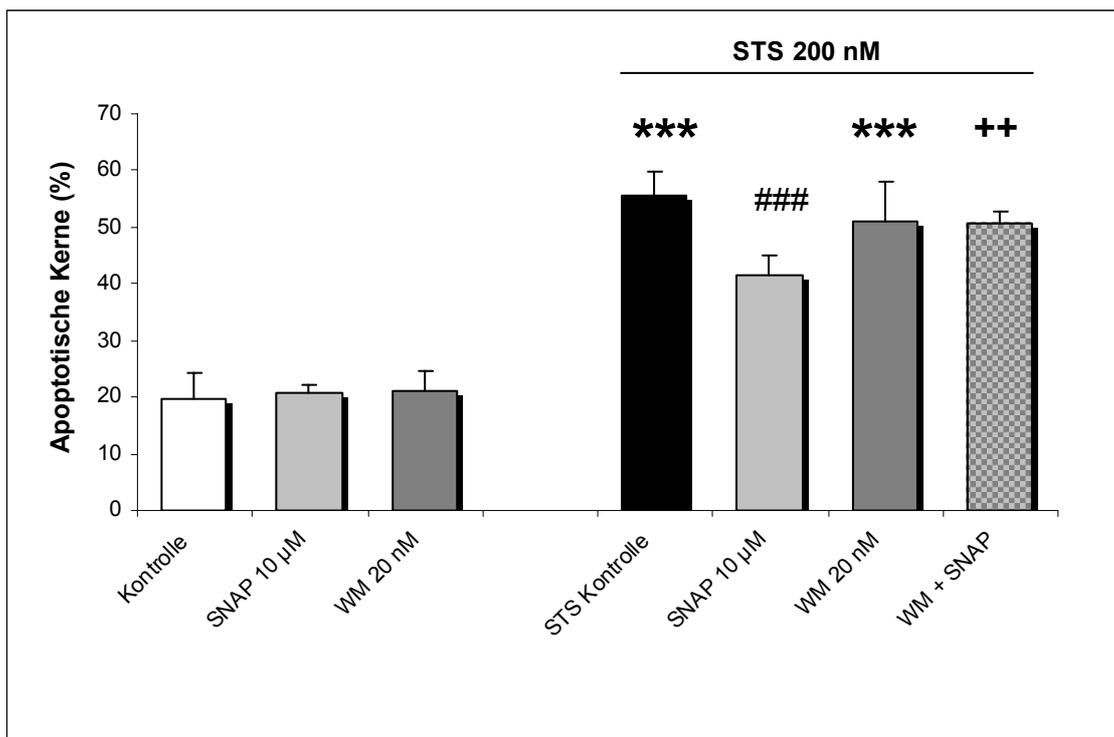


Abb.3.56: Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin hemmt die neuroprotektive Wirkung von SNAP

Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin (WM, 20 nM) wurde 1 h vor der Behandlung der hippokampalen Neurone mit SNAP (1 μ M) zugegeben. Nach 6 h wurden die Zellen 24 h mit Staurosporin (STS, 200 nM) inkubiert, anschließend fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen wurde bestimmt und als Mittelwert \pm S.D. aus 2 voneinander unabhängigen

durchgeführten Versuchen angegeben. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; #### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; ++ $p < 0,01$ im Vergleich zu den mit SNAP und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.4.4 Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 vermittelt die neuroprotektive Wirkung von SNAP

Um die Rolle der MAPK Erk1 und Erk2 an der SNAP-vermittelten Neuroprotektion zu untersuchen, wurden nachfolgende Experimente durchgeführt.

3.4.4.1 SNAP-vermittelte Erk1/2-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen

Mit Hilfe immunzytochemischer Analysen wurde die Phosphorylierung von Erk1/2 nach Behandlung mit SNAP untersucht. Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop zeigen eine Erhöhung der Phosphorylierung von Erk1/2 nach Inkubation mit dem NO-Donator (1 μM) nach 10 min bis 1 h Behandlungsdauer (Abb. 3.57). Nach länger andauernden Inkubationszeiten mit SNAP (6 h) war keine verstärkte Erk1/2-Phosphorylierung mehr detektierbar.

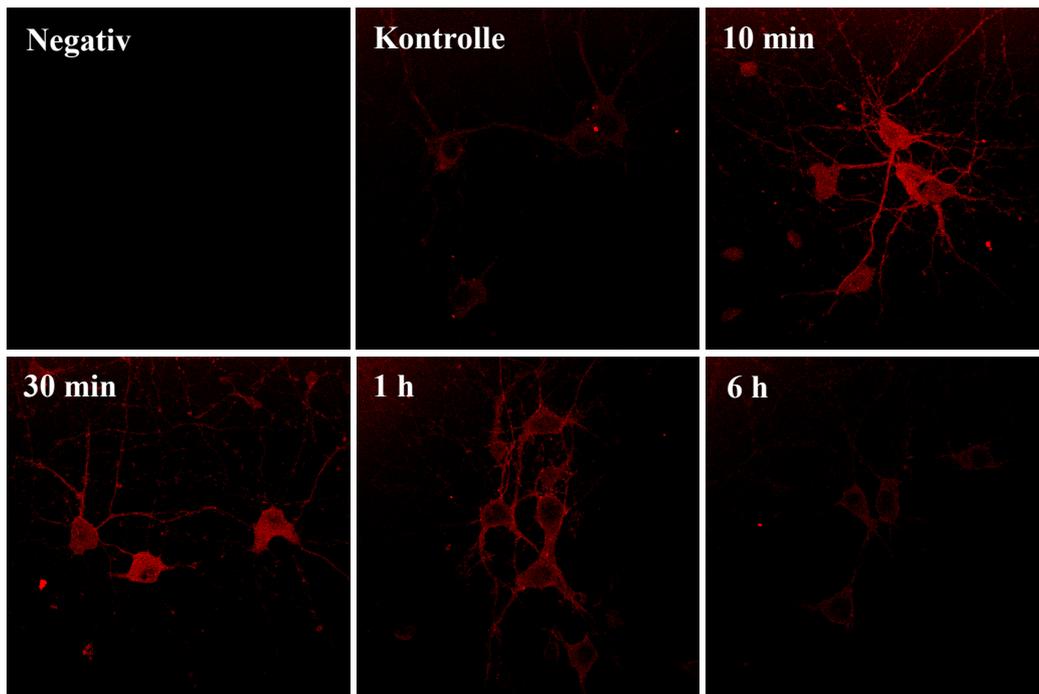


Abb. 3.57: Transiente Erk1/2-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen nach SNAP-Behandlung

Immunzytochemische Analysen zeigen die transiente Phosphorylierung von Erk1/2 in hippocampalen Neuronen durch SNAP ($1 \mu\text{M}$). Eine Steigerung der Phosphorylierung konnte 10 min bis 1 h nach Inkubation mit dem NO-Donator mittels Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie nachgewiesen werden, während nach 6 h wieder das Kontrollniveau erreicht wurde. Als Negativ sind die Aufnahmen bezeichnet, bei denen während der Immunzytochemie der Primärantikörper weggelassen wurde. Kontrollen sind mit Vehikel (DMSO) anstatt SNAP behandelt worden.

3.4.4.2 Beteiligung der MEK an SNAP-vermittelten neuroprotektiven Effekten

Der Stickstoffmonoxid-donator erhöhte transient die Phosphorylierung von Erk1/2. Es stellte sich daraufhin die Frage, ob die MEK – die ihrerseits nach Phosphorylierung und daraus folgender Aktivierung für eine Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 verantwortlich ist – in den Prozess der durch SNAP-induzierten Neuroprotektion beteiligt ist.

Immunoblotanalysen von Proteinextrakten aus hippocampalen Rattenneuronen bestätigen die Beteiligung der MEK an der Phosphorylierung der MAPK Erk1 und Erk2 und der hierdurch vermittelten Neuroprotektion durch Orthovanadat. Hierzu wurden die Kulturen 15 beziehungsweise 60 min mit SNAP (1 μ M) behandelt. Vorbehandlung der Neurone mit dem MEK-Inhibitor UO126 (20 μ M, 1 h) blockierte bzw. verminderte dagegen die durch SNAP-induzierte Phosphorylierung von Erk1 und Erk2. Erk1 und Erk2 wurden nicht reguliert (Abb. 3.58). Die Detektion von α -Tubulin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

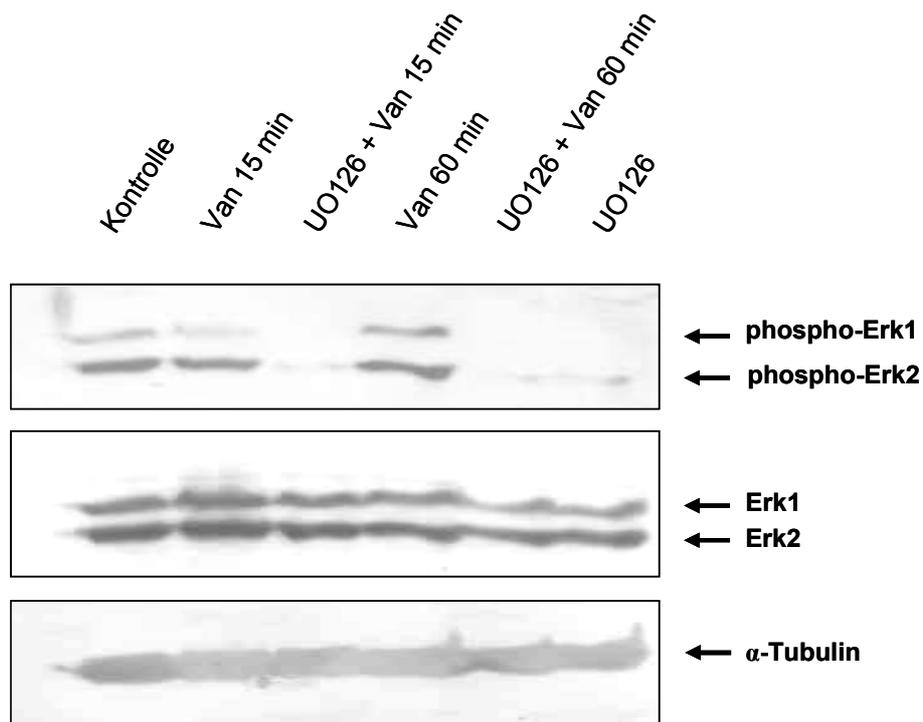


Abb.3.58: Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die SNAP-induzierte Phosphorylierung von Erk1 und Erk2

Mittels der Immunoblotanalyse von Proteinextrakten aus hippocampalen Rattenneuronen konnte eine verstärkte Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 nach Behandlung mit SNAP (1 μ M) nachgewiesen werden. Präinkubation mit dem MEK-Inhibitor UO126 (20 μ M, 1 h) blockierte die Phosphorylierung der MAPK. Eine Regulation von Erk1 und Erk2 wurde hingegen nicht nachgewiesen. Identische α -Tubulin-Signale bestätigten gleichmäßige Proteinbeladung.

Um die Beteiligung der MEK an der SNAP-vermittelten Neuroprotektion zu untersuchen, wurden hippocampale Neurone 1 h mit dem MEK-Inhibitor UO126 (20 μM) vorbehandelt und anschließend 6 h mit SNAP inkubiert. Nach 24-stündiger Exposition mit Staurosporin (200 nM) konnte eine Verminderung des prozentualen Anteils an apoptotischen Kernen von 55 % in der Staurosporinkontrolle auf 41 % nach Vorinkubation mit SNAP festgestellt werden (Abb. 3.59). Durch eine Vorbehandlung mit UO126 verringerten sich die durch SNAP-induzierten neuroprotektiven Effekte signifikant ($p < 0,001$). UO126 bewirkte dagegen selbst keine signifikante Schädigung der Neurone.

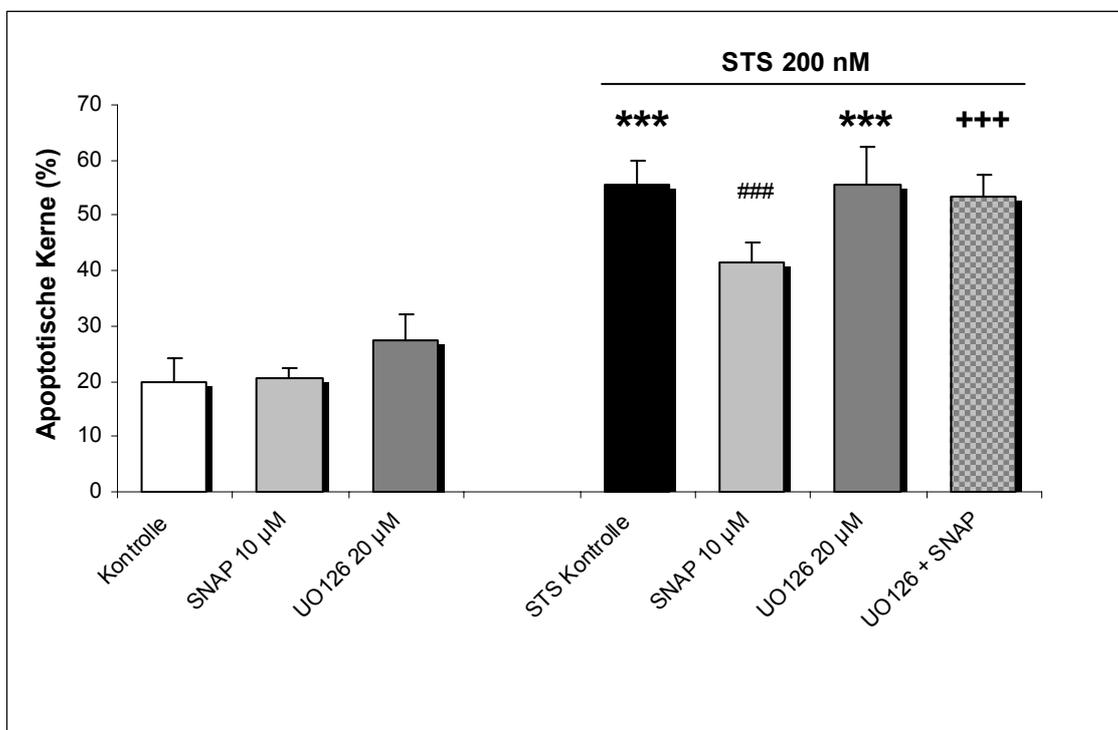


Abb. 3.59: Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die neuroprotektive Wirkung von SNAP

Hippokampale Neurone wurden 1 h mit dem MEK-Inhibitor UO126 (20 μM) vorbehandelt und anschließend 6 h mit dem NO-Donator SNAP inkubiert. Nach 24-stündiger Behandlung mit Staurosporin (STS, 200 nM) erfolgte die Anfärbung der Neurone mit Hoechst 33258. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Kernen als Mittelwert \pm S.D. aus jeweils 4-5 Kulturen pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporinkontrolle; +++ $p < 0,001$ im Vergleich zu den mit SNAP und Staurosporin behandelten Zellen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.4.5 Beteiligung der Guanylatcyclase an SNAP-vermittelter Neuroprotektion

Um den Einfluss des unter Kapitel 3.3.6 beschriebenen NO/sGC/cGMP-Signalweges auf die SNAP-vermittelte Neuroprotektion in hippocampalen Neuronen zu untersuchen, wurden die Kulturen 1 h mit einem Inhibitor der sGC, ODQ (20 μM), inkubiert. ODQ oxidiert die sGC irreversibel und unterdrückt somit die cGMP-Produktion (Bellamy und Garthwaite, 2002). Anschließend wurden die Kulturen 6 h mit SNAP (1 und 10 μM) inkubiert und 24 h (200 nM) mit Staurosporin geschädigt. Abbildung 3.60 zeigt, dass der sGC-Inhibitor ODQ die SNAP-vermittelte Neuroprotektion aufhob und selbst zu keiner Schädigung der Neurone führte (21% apoptotische Neurone gegenüber 20 % in der Kontrolle).

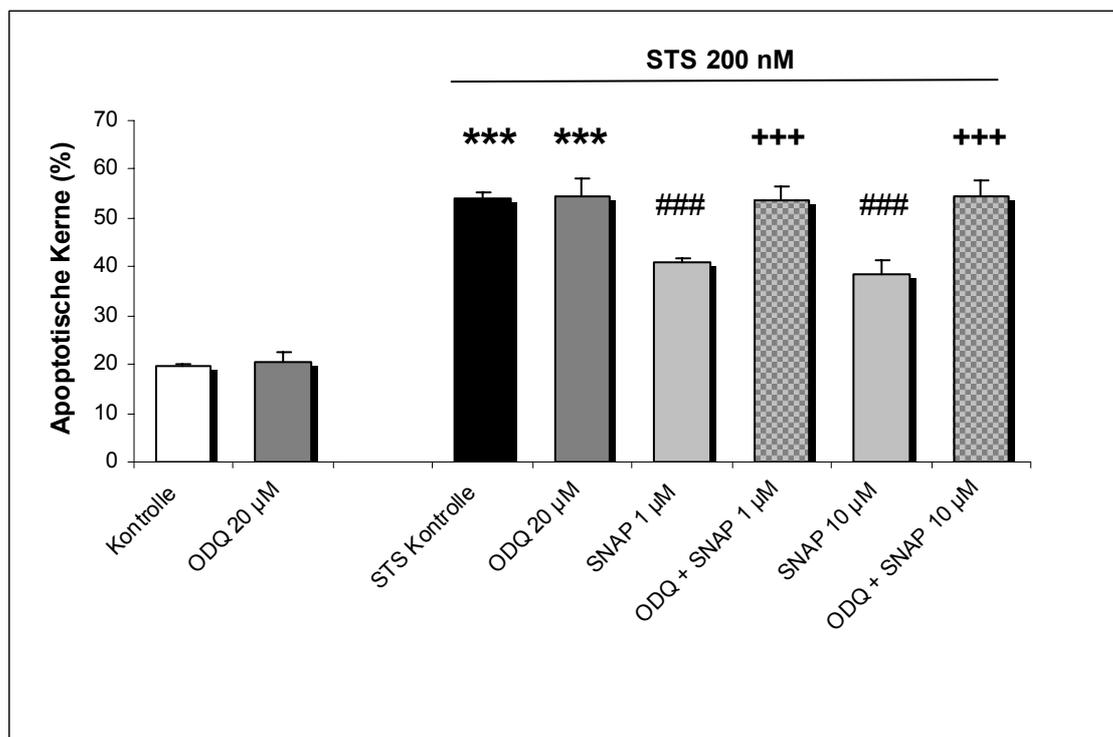


Abb. 3.60: Beteiligung der sGC an SNAP-vermittelter Neuroprotektion

Der sGC-Inhibitor ODQ (20 μM) wurde 1 h vor der Behandlung von hippocampalen Neuronen mit SNAP (1 und 10 μM) zugegeben. Nach 6 h wurden die Zellen 24 h mit Staurosporin (STS, 200 nM) inkubiert, anschließend fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Kerne ist als Mittelwert \pm S.D. aus jeweils 4-5 Kulturen pro Gruppe angegeben. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle; ### $p < 0,001$ im Vergleich zur Staurosporin-kontrolle; +++ $p < 0,001$ im Vergleich zu den mit SNAP und Staurosporin behandelten Neuronen (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der verwendeten neuronalen Zellkultur und des Schädigungsmodelles

Zur Anlage der Neuronenkulturen wurden die Hippokampi von embryonalen Sprague-Dawley-Ratten, Embryonaltag 18 herangezogen. Die in Neurobasalmedium kultivierten Neurone wurden am 7. bzw. 8. Kulturtag für die Behandlungen verwendet. Diese Kulturen enthielten zu diesem Zeitpunkt weniger als 5 % nichtneuronale Zellen, die meisten davon Astrozyten, wie nach Anfärbung mit Antikörpern gegen das Astrozyten-spezifische, saure gliale fibrilläre Protein (GFAP) in unserem Arbeitskreis immunzytochemisch nachgewiesen wurde. Zur Schädigung der Neurone wurde hauptsächlich Staurosporin verwendet, in einigen Experimenten auch NMDA.

Staurosporin wurde aus dem Bakterium *Streptomyces staurospores* isoliert und hemmt neben den Serin/Threonin-Kinasen auch Protein-Tyrosin-Kinasen (Lazarovici et al., 1997a). Dies führt schon in nanomolaren Konzentrationen zu einer Inhibition der Differenzierung (Campbell und Neet, 1995; Hashimoto und Hagino, 1989) und der NGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung von TrkA-Rezeptoren in PC12-Zellen (Berg et al., 1992; Ohmichi et al., 1992; Tapley et al., 1992). Der unspezifische Kinaseinhibitor wurde in vielen Studien zur Induktion der neuronalen Apoptose angewandt (Buisson et al., 2003; Prehn et al., 1997; Zhu et al., 2002). Für die Induktion der Staurosporin-induzierten Apoptose wird vor allem die Hemmung der Proteinkinase C (Lazarovici et al., 1997a) und der Phospholipase C (Bunn und Saunders, 1995) verantwortlich gemacht. Andere Mechanismen sind aufgrund der unspezifischen Hemmwirkung aber nicht auszuschließen (Deshmukh und Johnson, 2000). Andererseits wurden auch Staurosporin-vermittelte neuroprotektive Effekte z. B. durch Hemmung des Amyloid- β -induzierten Ca^{2+} -Anstiegs (Cheng et al., 1994; Goodman und Mattson, 1994) oder Potenzierung EGF-vermittelter MAPK-Phosphorylierung in PC12-Zellen (Raffioni und Bradshaw, 1995) für geringe Konzentrationen gemessen. In unseren Experimenten diente Staurosporin in Konzentrationen von 100 und 200 nM zur Induktion der neuronalen Apoptose.

Eine Stimulation des NMDA-Rezeptors durch NMDA führt zu einer Öffnung von Calciumkanälen, was zu einem vermehrten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle mit nachfolgendem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Diese gestörte

Calciumhomöostase löst dann den neuronalen Zelltod über verschiedene Mechanismen wie Störungen des Energiestoffwechsels, der Membranstabilität oder der Transmitterfunktion aus (Krieglstein, 1990).

Die Auswertung der neuronalen Schädigung bzw. des Anteils an apoptotischen Zellkernen wurde mit Hilfe der so genannten Höchstfärbung charakterisiert (Ahlemeyer und Krieglstein, 1998; Latt et al., 1974; Latt und Wohlleb, 1975; Ravati et al., 1999). Der DNA-Fluorochromfarbstoff Bisbenzimid – auch Hoechst 33258 genannt – ist membranpermeabel und bindet an AT-Regionen der DNA (Araki et al., 1985; Labarca und Paigen, 1980; Latt und Stetten, 1976; Latt und Wohlleb, 1975). Durch die Kondensation und Fragmentierung des Chromatins und des Zellkerns und durch die starke Fluoreszenzintensität während der Apoptose (Kerr und Harmon, 1991; Majno und Joris, 1995) konnte die Detektion der apoptotischen Kerne nach Anfärbung mit dem DNA-Fluorochrom mit dem Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

4.2 Diskussion der Natriumorthovanadat-vermittelten neuroprotektiven Effekte und der beteiligten Signaltransduktionswege

4.2.1 Natriumorthovanadat-vermittelte TrkA-Phosphorylierung in Abwesenheit von NGF

Natriumorthovanadat ist in vielen Studien als unspezifischer Protein-Tyrosin-Phosphatase Inhibitor beschrieben worden (Jin et al., 1998; Kreysa et al., 1997; Rijkssen et al., 1993), der durch reversible Bindung an einem Cysteinrest im katalytischen Zentrum bindet und auf diese Weise das Enzym inaktiviert (Denu et al., 1993; Huyer et al., 1997). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Inhibition der PTP durch Orthovanadat. Die rekombinante PTP aus *Yersinia enterocolitica* wurde dabei konzentrationsabhängig gehemmt und die Phosphataseaktivität schon in nanomolaren Konzentrationen (100 nM) um die Hälfte reduziert. Bei höheren Vanadatkonzentrationen als 100 µM waren nur noch sehr geringe Phosphataseaktivitäten messbar.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob mittels Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmung TrkA-vermittelte neuroprotektive Effekte erzielt werden können. Wie der Literatur zu entnehmen ist, nimmt die NGF-induzierte Phosphorylierung und Aktivierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA bereits nach 5 bis 10 min ab (Culmsee et al., 2002; Hempstead et al., 1992). Hemmung der PTP und der TrkA-Dephosphorylierung durch den PTP-Inhibitor Orthovanadat wäre eine mögliche Variante, die NGF-vermittelte TrkA-Phosphorylierung und Neuroprotektion aufrechtzuerhalten. Durch mehrere in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse konnte erstmals belegt werden, dass der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat den Phosphorylierungsgrad von Tyrosinresten, insbesondere aber des Tyr-490 Restes des TrkA-Rezeptors transient erhöht. Die Autophosphorylierungsstelle Tyr-490 liegt außerhalb der katalytischen Domäne und ist für die NGF-vermittelte Neuroprotektion und Differenzierung einer der wichtigsten Phosphorylierungsstellen (Kaplan und Stephens, 1994). Nach Bindung von NGF an den TrkA-Rezeptor und Phosphorylierung an Tyr-490 kommt es zur Aktivierung von Shc und des Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweges (Baxter et al., 1995; Van der Geer et al., 1995). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunzytochemischen Aufnahmen in PC12-Zellen und in embryonalen hippocampalen Rattenneuronen, als auch die Immunoblotanalysen aus Proteinextrakten von Orthovanadat-behandelten hippocampalen Neuronen belegen, dass bereits nach 10-minütiger Behandlung mit dem PTP-Inhibitor eine erhöhte Tyrosin- und TrkA-Phosphorylierung erfolgte. Im Gegensatz zur NGF-induzierten TrkA-Phosphorylierung, wo bereits nach 30 min wieder das Kontrollniveau aufgrund der Rezeptordepshosphorylierung erreicht wurde (Culmsee et al., 2002; Hempstead et al., 1992), nahm der Phosphorylierungsgrad des hochaffinen NGF-Rezeptors durch Orthovanadatbehandlung erst nach 3 h geringfügig ab. Erst 6 h nach Beginn der Orthovanadatbehandlung wurde der TrkA-Phosphorylierungsgrad des Kontrollniveaus wieder erreicht. Im Gegensatz dazu zeigen immunzytochemische Analysen mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin, dass der Phosphorylierungsgrad an Tyrosinresten das Kontrollniveau schon wieder 3 h nach einer Orthovanadatbehandlung erreicht. Die Diskrepanz in der unterschiedlichen Dauer der gemessenen Phosphorylierung an TrkA und Tyrosinresten kann damit erklärt werden, dass der Anteil des phosphorylierten TrkA im Vergleich zu allen Tyrosinresten im Zytosol relativ gering ist. Daher ist 3 h nach Orthovanadatbehandlung die Steigerung der TrkA-Phosphorylierung mit den unspezifischen anti-phospho-Tyrosin-Antikörpern nicht mehr detektierbar.

Interessant ist, welche Rolle der Wachstumsfaktor NGF bei der Orthovanadat-vermittelten TrkA-Phosphorylierung spielt. NGF ist das am längsten bekannte Mitglied der Neurotrophinfamilie (Levi-Montalcini und Angeletti, 1964; Levi-Montalcini, 1965) und aktiviert zwei verschiedene Rezeptoren, den hochaffinen NGF-Rezeptor TrkA (Klein et al., 1991a; Lee et al., 2001; Miller und Kaplan, 2001) der Trk-Rezeptorfamilie (Martin-Zanca et al., 1986) und den niedrigaffinen NGF-Rezeptor $p75^{\text{NTR}}$, ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie (Chao und Hempstead, 1995; Kaplan und Miller, 1997, Klesse und Parada, 1999). Zwar zeigen frühere Arbeiten, dass NGF seine Wirkungen nur über den TrkA-Rezeptor (Perez-Polo et al., 1990), und nicht über den $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor vermittelt (Meakin und Shooter, 1992) respektive die induzierten Effekte nicht durch Bindung von NGF an den $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor resultieren (Ibanez et al., 1992; Weskamp und Reichardt, 1991). Neuere Studien hingegen belegen die Beteiligung des niedrigaffinen NGF-Rezeptors für NGF-vermittelte Effekte. Der $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor wird als Co-Rezeptor nicht nur für die TrkA-Aktivierung benötigt (Barker und Shooter, 1994; Hantzopoulos et al., 1994), sondern auch für die NGF-induzierte Differenzierung (Hempstead et al., 1991; Verdi et al., 1994) und die NGF-vermittelte Neuroprotektion in hippokampalen und kortikalen Kulturen sowie in PC12-Zellen (Bui et al., 2002; Culmsee et al., 2002; Greene und Kaplan, 1995). Darüber hinaus konnte in einigen Experimenten gezeigt werden, dass NGF unabhängig vom TrkA-Rezeptor über den $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor neuronalen Zelltod induziert (Brann et al., 2002; Carter und Lewin, 1997; Dobrowsky et al., 1994; Troy et al., 2002). Demgegenüber steht die neuroprotektive Wirkung des $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor nach NGF-Bindung durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Carter et al., 1996; Foehr et al., 2000; Rabizadeh et al., 1993). Nach Phosphorylierung und Aktivierung durch NGF (Kaplan et al., 1991a,b) induziert der TrkA-Rezeptor Differenzierung (Klesse et al., 1999), vermittelt Neuroprotektion in vitro und in vivo (Culmsee et al., 1999a,b, 2002; Semkova et al., 1996 a, b) und schützt Neurone gegen Apoptose in verschiedenen Zellkultursystemen (Ahlemeyer et al., 2000; Zhang et al., 1993). Nachdem die Befunde eine Orthovanadat-induzierte Hemmung der TrkA-Dephosphorylierung belegten, sollte geklärt werden, ob die durch den PTP-Inhibitor-vermittelte TrkA-Phosphorylierung nur in Anwesenheit von NGF auftritt oder aber NGF-unabhängig abläuft. Interessanterweise konnten die vorliegenden Experimente zeigen, dass die Orthovanadat-induzierte TrkA-Phosphorylierung unabhängig von NGF ist. NGF wird im Hippokampus und im Neocortex des adulten Rattengehirns exprimiert, unter anderem in den Zielregionen cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns (Schwab et al., 1979; Seiler und Schwab, 1983; Whittemore et al., 1988). Aber auch in hippokampalen Neuronen während der

neuronalen Entwicklung findet NGF-Synthese statt (Ayer-LeLievre et al., 1988; Friedman et al., 1991; Maisonpierre et al., 1990; Roback et al., 1990). So konnte die Arbeitsgruppe um Prochiantz zeigen, dass der NGF-Gehalt im Medium von kultivierten hippocampalen Neuronen, die am Embryonaltag 19 angelegt worden sind, signifikant höher lagen als im Medium von kultivierten Neuronen des Embryonaltages 17 (Houlgatte et al., 1989). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass auch in unseren hippocampalen Neuronenkulturen NGF sezerniert wird. Präinkubation mit den neutralisierenden NGF-Antikörpern blockierten zwar die NGF-induzierte TrkA-Phosphorylierung – wie immunzytochemische Aufnahme belegen – aber nicht die Orthovanadat-induzierte Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors. Diese Experimente belegen, dass nicht nur die Orthovanadat-induzierte Neuroprotektion, sondern auch die vermittelte TrkA-Phosphorylierung unabhängig von der Anwesenheit des Neurotrophins NGF ist. Inwiefern Orthovanadat diese Effekte vermittelt ist unklar. Zum einen besteht die Möglichkeit der direkten Aktivierung des TrkA-Rezeptors durch den PTP-Inhibitor. Bis dato liegen aber keine Studien vor, die belegen, dass eine direkte Phosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren und infolge dessen eine Aktivierung durch Orthovanadat induziert wird. Auf der anderen Seite gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass es durch Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen indirekt zu einer Aktivierung der Wachstumsfaktorrezeptoren kommt, wie zuvor diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Ullrich konnte ferner eine Basisaktivität für die Kinase Rezeptoren nachweisen, die zu einer Grundaktivität der Wachstumsfaktorrezeptoren führt (Honegger et al., 1988a,b; Kris et al., 1985). Eine weitere Möglichkeit der Orthovanadat-vermittelten Rezeptorphosphorylierung in Abwesenheit von NGF besteht darin, dass NT-3 zu einer Aktivierung und Phosphorylierung von TrkA führt (Barbacid, 1994; Barker und Murphy, 1992) und dieser Zustand durch Behandlung mit dem PTP-Inhibitor über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten bleibt.

4.2.2 Natriumorthovanadat-vermittelte Neuroprotektion

Die therapeutische Anwendung von NGF bei neurodegenerativen Erkrankungen ist trotz der neuroprotektiven Wirkung problematisch, da es sich um ein hochmolekulares Protein handelt, das nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Von daher muss nach neuen Strategien gesucht werden, um dennoch den neuroprotektiven Effekt des Wachstumsfaktors zu nutzen. Nachdem in vorherigen Versuchen eine gesteigerte Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA gezeigt wurde, sollte die Möglichkeit der Orthovanadat-

vermittelten Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen als neue Strategie der TrkA-vermittelten Neuroprotektion untersucht werden.

Die Behandlung mit dem PTP-Inhibitor Orthovanadat führte in hippokampalen Neuronen zu antiapoptotischen Effekten gegenüber Staurosporin- und NMDA-induzierter Apoptose. Die Protektion der Neurone durch Orthovanadat war dabei konzentrationsabhängig und auch unter den Bedingungen des Entzuges von Wachstumsfaktoren messbar. Gleichzeitig durchgeführte Untersuchungen zweier Arbeitsgruppen bestätigen die hier in der vorliegenden Arbeit festgestellten neuroprotektiven Eigenschaften von Orthovanadat. Die Arbeitsgruppe um Ushio konnte in vivo einen verminderten Anteil an apoptotischen Zellen in hippokampalen CA1 Neuronen nach präischämischer (Kawano et al., 2001) und postischämischer Behandlung (Hasegawa et al., 2003) mit Orthovanadat gegenüber den Kontrollen gemessen haben. Ferner konnten Lu et al. (2002) neuroprotektive Effekte für Pervanadat durch Stimulation BDNF-vermittelter Wachstumsfaktoreffekte nachweisen. Demgegenüber zeigten höhere Konzentrationen von Orthovanadat (100 μM) keine neuroprotektiven Eigenschaften, vielmehr waren bei diesen Konzentrationen signifikante ($p < 0,001$) neurotoxische Effekte zu messen. Frühere Studien belegen die neurotoxische Wirkung von Orthovanadat bei höheren Konzentrationen: Figiel und Kaczmarek (1997) konnten Orthovanadat-induzierte Apoptose in Kulturen von Zellen des Gyrus dentatus für eine Konzentration von 100 μM messen und Huang et al. (2000) eine zeit- und konzentrationsabhängige p53-Aktivierung mit nachfolgendem apoptotischen Zelltod.

Darüber hinaus sind nicht nur konzentrationsabhängige neuroprotektive Effekte für Orthovanadat nachweisbar, sondern auch zeitabhängige antiapoptotische Eigenschaften. So konnte durch die vorliegenden Befunde gezeigt werden, dass bei Vorbehandlungszeiten von 6 bis 9 h der protektive Effekt von Orthovanadat gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose maximal ausgeprägt war. Man kann davon ausgehen, dass es diese Zeit bedarf, bis Natriumorthovanadat in die Zelle aufgenommen wird und die neuroprotektiven, Signaltransduktionswege aktiviert werden, um die neuronale Apoptose zu verhindern.

Es konnte somit gezeigt werden, dass eine konzentrations- und zeitabhängige unspezifische Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch den PTP-Inhibitor Orthovanadat zu neuroprotektiven Effekten führt. Es stellte sich jedoch die Frage, inwiefern der Wachstumsfaktor NGF bei der Orthovanadat-vermittelten Neuroprotektion beteiligt ist, nachdem in vorherigen Befunden die NGF-unabhängige TrkA-Phosphorylierung durch den

PTP-Inhibitor nachgewiesen wurde. So konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass eine Präinkubation mit neutralisierenden NGF-Antikörpern die neuroprotektive Wirkung von Orthovanadat gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose auch unter den Bedingungen des Entzuges von Wachstumsfaktoren (Locke's Lösung) nicht aufhob. Damit ist ferner nachgewiesen, dass die Orthovanadat-induzierten antiapoptotischen Effekte auch in Abwesenheit des Wachstumsfaktors NGF stattfinden. Eine Beteiligung anderer Wachstumsfaktorrezeptoren z. B. für BDNF, EGF, oder TGF kann bei der zellschützenden Wirkung von Orthovanadat nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen, insbesondere auch zu den übrigen Neurotrophin-Rezeptoren, TrkB und TrkC, wären für die antiapoptotische und somit auch für die neuroprotektiven Effekte von Orthovanadat vom großen Interesse.

Eine Vorbehandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor K-252a verringerte in einer Konzentration von 500 nM die antiapoptotische Wirkung des PTP-Inhibitors Orthovanadat signifikant ($p < 0,05$). Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass K-252a die TrkA-vermittelten Effekte vermindert, und somit die vorliegenden Befunde bestätigt. Tapley et al. (1992) konnten eine Hemmung der NGF-induzierten Differenzierung von PC12-Zellen zeigen, Berg et al. (1992) und Muroya et al. (1992) eine Aufhebung der TrkA-Phosphorylierung bzw. TrkA-Aktivierung und Hashimoto (1988) eine Blockade des NGF-vermittelten Neuritenwachstums. Die Hemmung der protektiven Wirkung von Orthovanadat durch K-252a weist auf eine wesentliche Bedeutung der gemessenen TrkA-Phosphorylierung im Mechanismus der Neuroprotektion hin.

Eine vollständige Aufhebung der Orthovanadat-vermittelten Neuroprotektion oder der antiapoptotischen Effekte für K-252a konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. Dies ist durch die Unspezifität der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmung durch Orthovanadat zu erklären. Es ist anzunehmen, dass Orthovanadat nicht nur die Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors hemmt, sondern auch andere neuroprotektiven Proteine mit Tyrosin-Phosphorylierungsstellen wie z. B. die MAPK (Cohen, 2000; Ostrowski et al., 2000). So kann Orthovanadat trotz der Blockade von TrkA durch K-252a zellschützende Effekte vermitteln. Auch eine direkte Aktivierung von Akt und Erk1 und Erk2 ist wahrscheinlich, nachdem Conus und Kollegen (2002) entdeckten, dass Tyr-474 eine für die Aktivität von Akt essentielle Phosphorylierungsstelle ist und Chen et al. (2001) die Regulation der Akt-Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung nachweisen konnte. Andere Arbeitsgruppen konnten die Aktivierung von Erk1 und Erk2 durch PTP zeigen (Pulido et al., 1998; Tarrega et

al., 2002). Dies könnte die Erklärung dafür sein, weshalb der Tyrosinkinase-Inhibitor K-252a die Orthovanadat-vermittelte Neuroprotektion nicht vollständig aufzuheben vermochte.

Es wurden verschiedene Effekte für die Behandlung von Rattenneuronen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor K-252a gemessen. Neben der inhibitorischen Wirkung auf die Tyrosinkinaserzeptoren konnten neuroprotektive Effekte für eine Konzentration von 20 nM gemessen. Auch in den hier dargestellten Versuchen konnte K-252a in der gleichen Konzentration neuroprotektive Effekte vermitteln und die durch Orthovanadat-induzierten antiapoptischen Eigenschaften nicht blockieren. Vergleichbare Befunde bestätigen die zellschützenden Eigenschaften des Tyrosinkinase-Inhibitors. So wurde eine Stabilisierung der Calciumhomöostase durch K-252a gezeigt (Cheng et al., 1994), die offenbar auch zum Schutz hippokampaler Neurone gegen A β -induziertem Zelltod beiträgt (Goodman und Mattson, 1994). Andererseits konnte die Arbeitsgruppe um Barker zeigen, dass K-252a in kortikalen Mausneuronen und in PC12nr5-Zellen Neuroprotektion gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose vermittelt (Roux et al., 2002). Sie wiesen gleichzeitig eine Phosphorylierung und Aktivierung von Akt und Erk nach, die durch Inhibitoren der PI3-K und der MEK aufgehoben wurde. Die Autoren konnten somit zeigen, dass die neuroprotektiven Eigenschaften von K-252a sowohl durch den PI3-K/Akt Signaltransduktionsweg als auch durch den MEK/MAPK Signaltransduktionsweg vermittelt werden. Weiterhin belegt diese Studie eine K-252a-induzierte Phosphorylierung an Tyr-418 und nachfolgende Aktivierung von Src. Frühere Studien konnten zeigen, dass Src die Akt- und MAPK-Signalwege sowohl abhängig (Jones et al., 2000) als auch unabhängig (Wong et al., 1999) von der Focal Adhesion Kinase (FAK) aktiviert und K-252a wiederum FAK phosphoryliert und stimuliert (Maroney et al., 1995). Folglich induziert K-252a die Neuroprotektion über eine Src-Phosphorylierung mit nachfolgender Aktivierung von FAK und der nachgeschalteten Signaltransduktionswege.

Mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat durch Verhinderung der Rezeptor-dephosphorylierung nicht nur zu einer verstärkten Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors führt, sondern aufgrund dessen auch NGF-vermittelte Neuroprotektion imitieren kann. Aufgrund dieser Tatsache besteht große Hoffnung, mittels Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmung die neuroprotektive Wirkung des Neurotrophins NGF auch in dessen Abwesenheit zu nutzen.

4.2.3 Beteiligung des PI3-K/Akt- und des MAPK-Signaltransduktionsweges an Natriumorthovanadat-vermittelter Neuroprotektion

Die NGF-vermittelte Neuroprotektion in hippocampalen Neuronen wird nach Phosphorylierung und Aktivierung des TrkA-Rezeptors im Wesentlichen mittels Aktivierung zweier Signaltransduktionswege vermittelt. Hierzu gehören der PI3-K/Akt-Signalweg und der Ras/MEK/MAPK-Signalweg. Aufgrund der festgestellten NGF-imitierenden Effekte hinsichtlich der gesteigerten TrkA-Phosphorylierung und der Neuroprotektion nach Behandlung der Neurone mit dem PTP-Inhibitor Orthovanadat lag die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung der neuroprotektiven Signaltransduktionswege vorliegt.

Diese Hypothese der PI3-K-vermittelten Protektion konnte in vorliegenden Studien bestätigt werden. Vorbehandlung mit dem spezifischen Inhibitor der PI3-K Wortmannin (Davies et al., 2000) führte sowohl zur Hemmung der Orthovanadat-induzierten Akt-Phosphorylierung als auch zu einer Aufhebung der durch Orthovanadat-vermittelten Neuroprotektion. Vergleichbare Ergebnisse aus einer anderen Studie zeigen, dass Orthovanadat über eine Aktivierung von Akt die Glukoseaufnahme steigert (Donthi et al., 2000). Darüber hinaus weisen die hier dargelegten Untersuchungen darauf hin, dass infolge der beschriebenen Aktivierung der PI3-K auch die Proteinkinase B/Akt phosphoryliert und aktiviert wird. Immunzytochemische Aufnahmen nach Behandlung mit Orthovanadat und Immunoblotanalysen von Proteinextrakten aus hippocampalen Rattenneuronen bestätigen die transiente Akt-Phosphorylierung an Ser-473. Eine vergleichbare Orthovanadat-vermittelte Neuroprotektion mittels Aktivierung von Akt konnte gleichzeitig in einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden (Hasegawa et al., 2003; Kawano et al., 2001). Die dort dargelegten Befunde belegen eindeutig, dass Orthovanadat eine Aktivierung von Akt induziert und dieses sowohl gegenüber transientser Vorderhirnischämie als auch vor Ischämie induziert durch transiente Okklusion der Arteria cerebri media (MCA) schützt.

Der PI3-K-Signalweg ist eine wichtige Kaskade, die in verschiedenen Zellkulturen Neuroprotektion vermittelt (Crowder und Freeman, 1998; Philpott et al., 1997; Yao und Cooper, 1995) und durch Wachstumsfaktoren wie BDNF (Cheng und Mattson, 1994; Dolcet et al., 1999) oder durch Zytokine wie TNF- α (Barger et al., 1995; Sandra et al., 2002) aktiviert wird. Frühere Experimente unseres Labors konnten zeigen, dass NGF hippocampale Neurone vor Schädigungen mit Glutamat oder oxidativem Stress durch eine Aktivierung des PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweges schützt (Culmsee et al., 2002). Bindung der 85 kDa-Untereinheit an die durch NGF-vermittelte TrkA-

Autophosphorylierungsstelle Tyr-751 (Obermeier et al., 1993b; Soltoff et al., 1992) führt zur Aktivierung der PI3-K und der Proteinkinase B/Akt, was nachfolgend eine wesentliche Rolle in NGF-vermittelter Neuroprotektion durch verschiedene Mechanismen wie z. B. NF- κ B-Aktivierung spielt (Dudek et al., 1997; Marte und Downward, 1997). Frühere Studien haben zeigen können, dass Akt den proapoptotischen Faktor Bad bevorzugt an Ser-136 phosphoryliert. Dies führt zu einer Freisetzung des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 aus dem Bcl-2/Bad-Komplex (Datta et al., 1997; Del Peso et al., 1997; Khwaja, 1999) und einer Bindung an 14-3-3-Proteinen, was zur Inaktivierung des Bad-Proteins führt (Datta et al., 2000; Khwaja, 1999). In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren bindet Bad an Bcl-2 und Bcl-x_L und blockiert so deren antiapoptotischen Eigenschaften (Datta et al., 1997). Auch eine Aktivierung des antiapoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Phosphorylierung der I κ B führt zur Akt-vermittelten Neuroprotektion in verschiedenen Kulturen (Mattson et al., 2000; Ozes et al., 1999; Romashkova und Makarov, 1999). NF- κ B induziert die Synthese von Proteinen mit neuroprotektivem Potential wie z. B. viele antiapoptotische Faktoren, darunter die „Inhibitors of Apoptosis“ (IAP) sowie Bcl-2 und Bcl-x_L (Mattson et al., 2000; Tamatani et al., 1999). Diese antiapoptotischen Mitglieder verhindern Apoptose über den Schutz von Mitochondrien (Kluck et al., 1997; Kroemer, 1997; Yang et al., 1997) und sind wahrscheinlich auch wesentlich an der TrkA-vermittelten neuroprotektiven Wirkung von NGF beteiligt (Bui et al., 2002; Zhu et al., 1999). Daneben wird eine Akt-induzierte Hemmung der proapoptotischen und die Alzheimer-Erkrankung auslösenden Gsk-3 β durch Ser-9 Phosphorylierung beschrieben (Grimes und Jope, 2001). Unter anderem aktiviert Gsk-3 β den proapoptotischen Transkriptionsfaktor p53, wie neue Studien belegen (Watcharasit et al., 2002, 2003). Durch mehrere Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass Akt-Aktivität hippocampale Neurone durch Blockade der p53-vermittelten Todeskaskaden schützt (Yamaguchi et al., 2001). Die zentrale Rolle von p53 im neuronalen Zelltod ist unter anderem in der eigenen Arbeitsgruppe belegt worden (Culmsee et al., 2001, 2003). Weitere Studien auf diesem Gebiet vermuten eine Akt-abhängige Phosphorylierung von Murine Double Minute-2 (MDM2) an Ser-166 (Gottlieb et al., 2002) und Ser-186 (Zhou et al., 2002), was zu einer Steigerung der MDM-2-vermittelten Degradation und Ubiquitinierung von p53 führt (Ogawara et al., 2002; Zhou et al., 2002).

Diese Beispiele zeigen, dass die Aktivierung der PI3-K durch verschiedene Rezeptorliganden in den Zellen zu einer Aktivierung von Akt führen, welches das Überleben der Zellen sichert, indem die Schlüsselfaktoren zu Regulation des Zelltods ausgeschaltet und Überlebenssignale induziert werden. Welche Akt-vermittelten Signalwege bei der Orthovanadat-induzierten

Neuroprotektion involviert sind, müssen nähere Untersuchungen an den zuvor beschriebenen Proteinen zeigen. Jedoch ist auch eine direkte Akt-Aktivierung durch Orthovanadat nicht auszuschließen, nachdem Befunde zweier Arbeitsgruppen auf eine Beteiligung der Tyrosinphosphorylierung bei der Aktivierung von Akt hinweisen (Chen et al., 2001; Conus et al., 2002).

Ein anderer Signaltransduktionsweg, der bei der NGF-vermittelten Neuroprotektion eine wesentliche Rolle spielt ist die Ras/Raf/MEK/MAPK-Kaskade (Xia et al., 1995). Auch in den Studien der vorliegenden Arbeit wird die Beteiligung der MEK nachgewiesen. So induziert der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat nicht nur eine Phosphorylierung von Erk1/2, sondern auch bei den induzierten antiapoptotischen Eigenschaften gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose ist diese Signaltransduktionskaskade wesentlich involviert. Präinkubation der hippocampalen Neurone mit dem Inhibitor der MEK-UO126 (Davies et al., 2000; English JM und Cobb, 2002) verminderte die neuroprotektiven Eigenschaften und blockierte die Orthovanadat-induzierte Aktivierung und Phosphorylierung von Erk1 und Erk 2, wie vorliegende immunzytochemische Aufnahmen und Zellkulturexperimente belegen. Vergleichbare Effekte in neuronalen Zellen konnten von der Arbeitsgruppe um Ushio erzielt werden, die MAPK-vermittelte, neuroprotektive Eigenschaften von Orthovanadat gegenüber transientser Vorderhirnischämie und gegenüber Ischämie, induziert durch transiente Okklusion der Arteria cerebri media (MCA), zeigen konnten (Hasegawa et al., 2003; Kawano et al., 2001).

Dieser Signaltransduktionsweg ist nicht nur bei der Differenzierung, sondern auch bei der Proliferation und Protektion verschiedenster Zellarten involviert (Gomez und Cohen, 1991; Xia et al., 1995). Einige Studien zeigen, dass die neuroprotektiven Eigenschaften von NGF insbesondere über den PI3-K-Signalweg vermittelt sind, während der MEK/MAPK-Signalweg für die neuronale Differenzierung steht (Culmsee et al., 2002; Klesse et al., 1999). Andere Studien zeigen aber ebenso eine entscheidende Rolle der Ras/Raf/MEK/MAPK-Kaskade bei neuroprotektiven Effekten von NGF (Han und Holtzman, 2000; Nicole et al., 2001). Bindung von Shc an die TrkA-Autophosphorylierungsstelle Tyr-490 nach Aktivierung des Rezeptors durch NGF induziert die Ras/Raf/MAPK-Kaskade (Obermeier et al., 1993b, 1994; Stephens et al., 1994; Van der Geer, 1995). Die Mechanismen, die bei der Erk-vermittelten Neuroprotektion eine Rolle spielen, sind vielfältig. Geregelt wird die MAPK-induzierte Protektion von Zellen mittels Aktivierung und Inaktivierung verschiedener Proteine und Signalwege. Beispielsweise aktivieren die MAPK den schon zuvor

beschriebenen antiapoptotischen Faktor Bcl-2 und die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und CREB (Hindley und Kolch, 2002; Sweatt, 2001), die wiederum die Expression antiapoptotischer Faktoren wie MnSOD, die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bcl-2 und Bcl-x_L oder Calbindin steigern (Mattson et al., 2000). Außerdem inaktivieren die MAPK Erk1 und Erk2 die proapoptotischen Faktoren p53 und Bad durch Phosphorylierungsreaktionen (Jin et al., 2002; Mazzoni et al., 1999; Zhu et al., 2002). Viele der genannten Faktoren spielen eine große Rolle bei der Neuroprotektion und sind sicherlich mögliche Faktoren zur Verhinderung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und des Schlaganfalls (Mattson et al., 2001). Dies unterstreicht die zentrale Bedeutung der Ras/Raf/MEK/MAPK-Kaskade für das neuronale Überleben oder den Schutz von Neuronen.

Insgesamt konnte durch die vorliegenden Experimente erstmals belegt werden, dass Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmung durch Orthovanadat in Neuronen ähnliche neuroprotektive Mechanismen aktiviert, wie das Neurotrophin NGF. Neben einer Aktivierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA konnte die Beteiligung des PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweges und des Ras/Raf/MEK/MAPK-Signaltransduktionsweges an der durch Orthovanadat-vermittelten Neuroprotektion nachgewiesen werden. Somit könnte die Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen eine neue, vielversprechende Strategie zur Induktion NGF-ähnlicher neuroprotektiver Wirkungen sein.

4.3 Diskussion des Einflusses der PTP-1B hinsichtlich der TrkA-Dephosphorylierung

4.3.1 Die Rolle der Compound 2 und der rekombinanten PTP-1B

Durch Befunde der vorliegenden Arbeit konnten neuroprotektive Effekte infolge Hemmung der TrkA-Dephosphorylierung durch den PTP-Inhibitor Orthovanadat nachgewiesen werden. Aufgrund des vielfältigen Einflusses der PTP-1B auf verschiedene zelluläre Prozesse v. a. bei der Regulation der Wachstumsfaktoren (Flint et al., 1997; Kenner, 1996) sollte untersucht werden, ob die PTP-1B an der Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA beteiligt ist.

Kinetische Studien von Protein-Tyrosin-Phosphatasen lassen darauf schließen, dass für die Aktivität der PTP-1B nicht nur die katalytische Domäne für die hochaffine Bindung an ein Substrat verantwortlich ist. Für die Substraterkennung werden weitere sogenannte „Subtaschen“, die in der Nähe des katalytischen Zentrums liegen, benötigt (Zhang, 1997). Die Arbeitsgruppe um Zhang konnte die Notwendigkeit dieser „Subtaschen“ bei der Suche nach spezifischen Inhibitoren ebenfalls für die PTP-1B nachweisen (Vetter et al., 2000) und aufgrund dieser Befunde PTP-1B-Inhibitoren mit hoher Spezifität synthetisieren (Tab. 3.1; Shen et al., 2001; Sun et al., 2003). Sie werden von Sun et al. (2003) namentlich als Compound 1 und Compound 2 benannt – Bezeichnungen, die auch in der vorliegenden Arbeit für die PTP-1B-Inhibitoren verwendet werden.

Die in der vorliegenden Studie erbrachten Belege für die Hypothese der Beteiligung der PTP-1B an der Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA konnten durch die Immunoblotanalyse bestätigt werden. Zum einen hemmt der PTP-1B-Inhibitor Compound 2, der im Gegensatz zu Compound 1 die Zellmembran passieren kann (Sun et al., 2003), die Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors, was sich durch die erhöhte Phosphorylierung 60 min nach Behandlung mit 2.5S NGF beweisen lässt. Zum anderen induziert Compound 2 eine TrkA-Phosphorylierung ohne zusätzliche NGF-Behandlung. Dies kann einerseits durch einen direkten Effekt, das heißt durch eine direkte Compound 2-vermittelte Phosphorylierung erzielt werden. Andererseits deuten Literaturberichte darauf hin, dass eine Basissekretion von NGF vorliegt (Ayer-LeLievre et al., 1988; Da Penha et al., 1993; Houlgatte et al., 1989), so dass Compound 2 die dadurch induzierte TrkA-Phosphorylierung über einen längeren Zeitraum durch Hemmung der PTP-1B aufrechterhalten kann.

Die PTP-1B gehört zu der Gruppe der nicht-Rezeptor gebundenen Protein-Tyrosin-Phosphatasen und besteht aus 435 Aminosäuren (Liu, 2003). Sie wurde zuerst im Jahre 1988 von der Arbeitsgruppe um Tonks (1988a,b) aus humanem Plazentagewebe gereinigt und isoliert und schließlich im Jahre 1994 kristallisiert (Barford et al., 1994). Mehrere Studien belegen die vielfältige Rolle der PTP-1B. Beispielsweise werden die Signalwege für c-Src (Bjorge et al., 2000), Erythropoietin (Cohen et al., 2003), Cadherin (Balsamo et al., 1998) und Integrin (Arregui et al., 1998; Cheng et al., 2001) reguliert. Außerdem gibt es Hinweise auf eine wichtige Funktion der PTP-1B in pathophysiologischen Mechanismen bei der Entstehung von Diabetes mellitus. Es wurde gezeigt, dass die PTP-1B den Insulinrezeptor dephosphoryliert und so die Insulin-vermittelten Effekte blockiert (Dadke et al., 2000; Goldstein et al., 1998). Versuche mit PTP-1B Antisenseoligonukleotiden konnten zeigen, dass

die Aktivität des IRS und nachfolgend der PKB gesteigert werden konnte (Gum et al., 2003). Andere Studien belegen den Einfluss der PTP-1B hinsichtlich der Dephosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren. Haj et al. (2003) konnten die Beteiligung an der EGF- und der PDGF-Rezeptordephosphorylierung nachweisen. So zeigten Fibroblasten von PTP-1B^{-/-}-Mäusen eine gesteigerte Phosphorylierung an diesen Rezeptoren. Ferner ist der Literatur zu entnehmen, dass durch Aminosäureaustausch inaktivierte PTP-1B nicht mehr in der Lage war, den Rezeptor für EGF zu dephosphorylieren (Flint et al., 1997).

Zur Bestätigung vorangehender Experimente wurde der Einfluss der rekombinanten PTP-1B auf PC12-Zellen untersucht, die zuvor mit 2.5S NGF stimuliert wurden. PC12-Zellen wurden in vielen Studien zur Untersuchung des TrkA-Rezeptors verwendet und gelten als Standardzelllinie bei der Untersuchung des hochaffinen NGF-Rezeptors (Hempstead et al., 1991; Kaplan et al., 1991a,b; Klein et al., 1991a). In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine konzentrations- und zeitabhängige Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors nach Behandlung NGF-stimulierter PC12-Zellen mit der rekombinanten PTP-1B stattfindet. Ferner wurde der hochaffine NGF-Rezeptor in Abhängigkeit von der eingesetzten Magnesiumkonzentration dephosphoryliert. Inkubation der PC12-Zellen mit einer Magnesiumkonzentration von 60 mM und 3 mU PTP-1B/μl Reaktionsansatz führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer stärkeren Dephosphorylierung von TrkA. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Experimente in anderen Zelltypen. Zipser und Kosower (1996) konnten die Magnesiumabhängigkeit für die PTP-1B der humanen Erythrozytenmembran nachweisen. Interessanterweise reicht eine Magnesiumkonzentration von 100 mM aus, um ohne Zugabe von rekombinanter PTP-1B den TrkA-Rezeptor zu dephosphorylieren, wie vorliegende Befunde belegen. Eine Ursache für diesen Befund könnte die sehr hohe Magnesiumkonzentration sein, die dazu führt, dass der Antikörper nicht mehr in der Lage ist, das Protein zu detektieren. Zum anderen kann eine Anwesenheit der PTP-1B im PC12-Zellextrakt nicht ausgeschlossen werden. Diese wird dann durch die Magnesiumionen aktiviert, so dass auch ohne Zugabe von rekombinanter PTP-1B eine Dephosphorylierung nachzuweisen ist.

Die Befunde mit der rekombinanten PTP-1B weisen auf eine Beteiligung der PTP-1B an der Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA hin und bestätigen die Befunde mit dem PTP-1B-Inhibitor Compound 2. Allerdings sind die Ergebnisse mittels immunzytochemischer Analysen oder Untersuchungen zur Neuroprotektion mit der rekombinanten PTP-1B zu verifizieren. Weiterhin sind Studien mit PTP-1B

Antisenseoligonukleotiden, Röntgenstrukturanalysen des TrkA-Rezeptors nach potentieller PTP-1B-Bindung und/oder Experimente mit der RNA-interference-Methode notwendig, um die Beteiligung der PTP-1B an der Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors eindeutig nachzuweisen.

4.3.2 Die Rolle der Dephostatin-Derivate

Für die Dephostatin-Derivate sind inhibitorische Eigenschaften gegenüber der PTP-1B beschrieben worden (Hiroki et al., 2002; Suzuki et al., 2001; Watanabe et al., 2000; Tab. 4.1). Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte der Einfluss der PTP-1B-Hemmung auf die Neuroprotektion hippokampaler Neurone untersucht werden.

Die in Kapitel 3.3.1 dargestellten Befunde zeigen die neuroprotektive Wirkung der Dephostatin-Derivate Ethyl-3,4-dephostatin, 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin. Dabei waren die antiapoptotischen und somit neuroprotektiven Effekte konzentrationsabhängig und darüber hinaus auch unter den Bedingungen des Entzuges von essentiellen Nährstoffen nachweisbar. Demgegenüber stehen die Befunde für das nitrosaminfreie Dephostatin-Derivat Methoxim-3,4-dephostatin. Sowohl gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose in Neurobasalmedium als auch gegenüber NMDA-induzierter Apoptose in Locke's Lösung konnte keine Neuroprotektion nachgewiesen werden. Im Gegenteil mit Konzentrationen von 100 μM wurde eine nahezu 100 %ige Schädigung der Neurone festgestellt. In Neurobasalmedium war dieser Effekt nicht messbar. Erklärung für diese Schädigung könnte die höhere Grundschädigung in Locke's Lösung aufgrund des Fehlens essentieller Nährstoffe und Neuroprotektiva wie z. B. Antioxidantien sein. Zudem scheint es so zu sein, dass die Neurone in Locke's Lösung leichter zu schädigen sind als in Neurobasalmedium, da im Gegensatz zu dem in dem Neurobasalmedium enthaltenen B27-Supplement in der Locke's Lösung keine zellschützenden Zusatzstoffe wie z. B. Antioxidantien enthalten sind.

Wodurch letztendlich aber die Schädigung der Neurone nach Methoxim-3,4-dephostatin Behandlung ausgelöst wird, ist unklar. Zwar besitzt dieses Dephostatin-Derivat inhibitorische Eigenschaften gegenüber der PTP-1B, die ähnlich denen des Ethyl-3,4-dephostatin sind (Tab. 4.1), doch bei Behandlung mit anderen PTP-1B-Inhibitoren konnte auch in hohen Konzentrationen keine Schädigung neuronaler Kulturen festgestellt werden. Obwohl in einer Studie gezeigt werden konnte, dass Hemmung der PTP-1B zu einer verminderten NF- κ B-Aktivierung führt (Singh et al., 1996), sind bislang keine Studien veröffentlicht, in denen eine

Hemmung der PTP-1B (neuronalen) Zelltod vermittelt. Folglich ist die PTP-1B-Hemmung wahrscheinlich nicht verantwortlich für die induzierte Schädigung. Weitere inhibitorische Eigenschaften von Methoxim-3,4-dephostatin gegenüber anderen Phosphatasen sind bis dato nicht bekannt. Es kann durchaus sein, dass die Induktion von neuronalem Zelltod durch eine Aktivierung proapoptotischer Proteine oder durch Inaktivierung antiapoptotischer Proteine mittels Methoxim-3,4-dephostatin-vermittelter Dephosphorylierung an Tyrosinresten eingeleitet wird. Um dieses aber zu klären, müssten zunächst die inhibitorischen Fähigkeiten von Methoxim-3,4-dephostatin hinsichtlich anderer PTP getestet werden.

PTPase	IC ₅₀ [μM]		
	Ethyl-3,4-dephostatin	4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin	Methoxim-3,4-dephostatin
PTP-1B	3,15	101	17,2
SHP-1	5,2	70,7	?
CD45	154	>500	?
LAR	>500	>500	?

Tab. 4.1: Hemmung verschiedener Phosphatasen durch Dephostatin-Derivate (nach Hiroki et al., 2002; Suzuki et al., 2001)

Die aus der vorliegenden Studie erbrachten Ergebnisse zum Einfluss der Dephostatin-Derivate gegenüber Staurosporin- und NMDA-induzierter Apoptose zeigen, dass keine Korrelation zwischen neuroprotektiven Effekten und inhibitorischer Potenz gegenüber der PTP-1B seitens der Dephostatin-Derivate vorliegt. So konnte sowohl für den Ethyl-3,4-dephostatin als starken Inhibitor der PTP-1B als auch für 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin als schwachen Inhibitor Neuroprotektion nachgewiesen werden. Dagegen wurden keine antiapoptotischen Eigenschaften für Methoxim-3,4-dephostatin, welches ähnliche IC₅₀-Werte für die PTP-1B wie Ethyl-3,4-dephostatin besitzt (Hiroki et al., 2002; Suzuki et al., 2001; Watanabe et al., 2000; Tab. 4.1), nachgewiesen. Ferner muss hinzugefügt werden, dass die Spezifität der PTP-1B-Hemmung durch die Dephostatin-Derivate nicht gegeben ist, so dass

genaue Aussagen hinsichtlich des Einflusses der PTP-1B auf die neuroprotektiven Eigenschaften nicht gemacht werden können.

Aufgrund der Tatsache, dass der PTP-1B-Inhibitor Methoxim-3,4-dephostatin keine Neuroprotektion zeigt, ist davon auszugehen, dass eine Hemmung der PTP-1B nicht ausreichend ist, um hippokampale Rattenneurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose zu schützen. Vielmehr lassen die dargestellten Befunde zusätzliche Mechanismen für die durch Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-induzierte Neuroprotektion vermuten, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

4.4 Diskussion der Stickstoffmonoxid-vermittelten Neuroprotektion und der beteiligten Signaltransduktionswege

4.4.1 Dephostatin-Derivate als NO-Donatoren

Aufgrund der inhibitorischen Wirkung auf die PTP-1B sollten die Dephostatin-Derivate Aufschluss über die Beteiligung der PTP-1B an der Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors geben. Es stellte sich jedoch während der Durchführung der Studien heraus, dass einige Derivate Stickstoffmonoxid freisetzen, so dass die Gründe für die TrkA-vermittelten Effekte sowohl die Hemmung der PTP-1B, als auch die Stickstoffmonoxid-Freisetzung sein können, die für die Dephostatin-Derivate erstmalig in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. In den folgenden Kapiteln soll dieser Zusammenhang genauer erläutert werden.

Eine Betrachtung der Dephostatin-Derivate lässt eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid vermuten (Abb. 4.1).

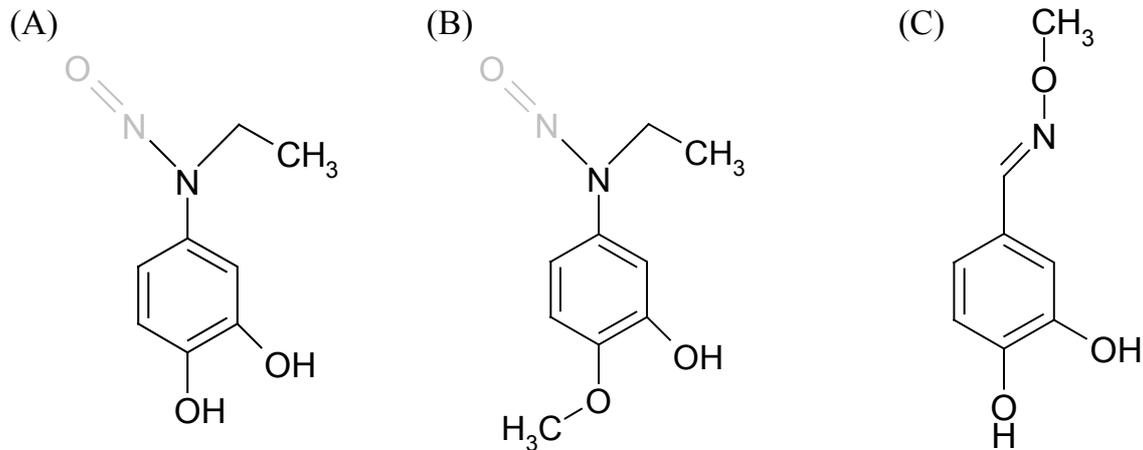


Abb. 4.1: Die chemischen Strukturen der Dephostatin-Derivate

(A) Ethyl-3,4-dephostatin, (B) 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin und (C) Methoxim-3,4-dephostatin.

Um die Hypothese zu bestätigen, wurde die NO-Freisetzung von Ethyl-3,4-dephostatin, 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin und Methoxim-3,4-dephostatin auf der Basis einer Chemilumineszenzreaktion mit Hilfe des NOA untersucht.

Mit den dargestellten Experimenten konnte erstmals die NO-Freisetzung von Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin belegt werden. Bezogen auf die eingesetzte Gesamtmenge NO der Dephostatin-Derivate wurden spontan 15 % beziehungsweise 5 % Stickstoffmonoxid freigesetzt. Für Methoxim-3,4-dephostatin konnte erwartungsgemäß kein freies NO gemessen werden. Nach Zugabe des Sauerstoffdonators Iodosobenzen kann die Freisetzung von NO aus den Dephostatin-Derivaten um das 3,6-fache (Ethyl-3,4-dephostatin) bzw. um das 4,2-fache (4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin) gesteigert werden. Diese Steigerung ist deswegen interessant, da die Dephostatin-Derivate während der Behandlung der hippokampalen Neuronenkultur ebenfalls einer Sauerstoffzufuhr aus der Umgebungsluft unterliegen. Aufgrund des ausgeprägteren negativ induzierenden Effektes (-I-Effekt) der beiden Hydroxylgruppen des Ethyl-3,4-dephostatin – im Vergleich zu der Hydroxyl- und der Methoxygruppe des 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin, werden sowohl ohne als auch unter Zugabe des Sauerstoffdonators Iodosobenzen für Ethyl-3,4-dephostatin 3-fach höhere Freisetzungswerte als für 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin erreicht.

4.4.2 SNAP-vermittelte Neuroprotektion

Um den Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die neuronale Zellkultur zu untersuchen und die durch die Dephostatin-Derivate-induzierte Neuroprotektion zu bestätigen, wurden hippocampale Neurone mit dem NO-Donator SNAP inkubiert. Präinkubation der Kulturen mit SNAP führte zu einer Verminderung des prozentualen Anteils der geschädigten Neurone. Der antiapoptotische und somit neuroprotektive Effekt von SNAP gegen die Staurosporin-induzierte Apoptose war dabei konzentrationsabhängig mit maximalen Effekten bei 1 und 10 μM .

Der in den vorliegenden Experimenten eingesetzte NO-Donator SNAP wird in zahlreichen Studien zur Induktion von NO-vermittelten Effekten verwendet (Ha et al., 2003; Nara et al., 1999; Rauhala et al., 2002; Vidwans et al., 1999). Im Gegensatz zu anderen NO-Donatoren wie „DEA NONOat“ und „Spermin NONOat“, die das monomere Gas spontan oder über einen kurzen Zeitraum in Lösung freisetzen, besitzt SNAP eine vergleichsweise lange Halbwertszeit von 37 ± 4 h (Ferrero et al., 1999) und setzt somit NO konstant über einen langen Zeitraum frei.

Die Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Regulation der neuronalen Apoptose ist komplex und wird kontrovers zitiert. Literaturberichten zu Folge kann NO in neuronalen Kulturen Apoptose (Dawson et al., 1993; Heneka et al. 1998; Lipton et al., 1993) z. B. durch hohe Konzentrationen eines NO-Donators oder durch Aktivierung der iNOS (Heneka et al., 1998; Lu et al., 1996) induzieren. Ferner kann es zur Bildung von Peroxynitritradikale kommen, welche zur Schädigung von Mitochondrien führen (Bolanos et al., 1997; Stewart und Heales, 2003), oder Caspase-vermittelten neuronalen Zelltod induzieren (Moriya et al., 2000). Für diese NO-vermittelten neurodegenerativen Effekte waren insbesondere sehr hohe Konzentrationen des Gases notwendig. Diese Beobachtungen korrelieren mit den vorliegenden Ergebnissen, bei denen ebenfalls signifikante neurotoxische Effekte nach Behandlung mit 100 μM SNAP induziert wurden.

Andererseits vermittelt NO aber auch neuroprotektive Eigenschaften (Estevez et al., 1998a,b; Farinelli et al., 1996), die durch die Untersuchungen mit den Dephostatin-Derivaten als NO-Donatoren belegt werden konnten. Die hier festgestellten neuroprotektiven Eigenschaften stimmen mit den Berichten aus der Literatur durch Untersuchungen in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen überein (Farinelli et al., 1996). So führt NO in niedrigen Konzentrationen

zur Neuroprotektion über Caspasehemmung durch S-Nitrosylierung (Li et al., 1997) oder durch Nitrosierung am für die katalytische Aktivität essentiellen Cystein (Dimmeler et al., 1997; Li et al., 1997; Kim et al., 1998; Rossig et al., 1999), zu einer Aktivierung von neuroprotektiven Proteinen wie Erk1 und Erk2 (Monteiro et al., 2000; Monteiro, 2002) oder zur Hemmung der Cytochrom C-Freisetzung durch Hemmung der Cytochrom C Oxidase und Hemmung der Bcl-2 Fragmentierung (Brookers et al., 2002; Kim et al., 1998). Auch Experimente zur Bcl-2 Induktion (Genaro et al., 1995) und NF- κ B-Aktivierung (Simpson und Morris, 1999) sowie Schutz vor oxidativem Stress (Monastyrskaja et al., 2002) durch Bindung mitochondrialer Radikale mit nachfolgender Hemmung der Bcl-x_L-Runterregulation konnten gezeigt werden (Wenzel et al., 2003).

4.4.3 Der Einfluss der NO-Donatoren auf die TrkA-Phosphorylierung

Einige wenige Befunde erläutern die NO-vermittelte Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmung (Li und Whorton, 2003; Takakura et al., 1999). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse sollte der Einfluss der NO-Donatoren auf die Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors untersucht werden.

Immunzytochemische Aufnahmen und Immunoblotanalysen von Proteinextrakten aus hippokampalen Neuronen zeigen eine transiente Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA nach Inkubation mit den NO-Donatoren Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin. Vergleichbare Befunde aus dem Labor von Umezawa bestätigen diese Ethyl-3,4-dephostatin-induzierte Phosphorylierung. Sie konnten nach Behandlung von 3T3-L1 Mausadipozyten ebenfalls eine transiente Phosphorylierung von Tyrosinkinase Rezeptoren feststellen (Suzuki et al., 2001; Umezawa et al., 2003). Die hier beschriebene Phosphorylierung des Insulinrezeptors fand zudem unabhängig von der zusätzlichen Behandlung mit dem Insulinrezeptorsubstrat statt. Die induzierte Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors und die dadurch vermittelte Neuroprotektion durch die beiden Substanzen können dabei einerseits durch eine direkte Hemmung der PTP-1B resultieren. Andererseits zeigen frühere Befunde eine NO-vermittelte Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (Caselli et al., 1994), was zur gesteigerten Phosphorylierung von Wachstumsfaktoren führt (Callsen et al., 1999; Monteiro et al., 2000). Beispielsweise berichten Li und Whorton (2003) von einer NO-vermittelten EGF-Rezeptorphosphorylierung

durch Hemmung der PTP-1B. Ebenso ist sicherlich eine Hemmung der PTP durch die Dephostatin-vermittelte NO-Freisetzung denkbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung neuronaler Kulturen mit den nitrosaminhaltigen Dephostatin-Derivaten Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin zu einer verstärkten Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA führt. Diese Befunde können, wie bereits erwähnt, durch die NO-vermittelte Protein-Tyrosin-Phosphatase-Hemmung induziert werden. Um die Rolle des monomeren Gases Stickstoffmonoxid näher zu untersuchen, wurden Studien mit dem NO-Donator SNAP durchgeführt. Anhand von immunzytochemischen Analysen und der Immunoblotanalyse aus Proteinextrakten von SNAP-behandelten hippokampalen Rattenneuronen konnte gezeigt werden, dass der NO-Donator zu einer transienten Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors führt. Bereits eine 10-minütige Behandlung induzierte die TrkA-Phosphorylierung und erst nach 3-stündiger Behandlungszeit nahm die Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors wieder ab, so dass das Kontrollniveau erreicht wurde. Demgegenüber zeigen frühere Studien, dass die NGF-induzierte TrkA-Phosphorylierung nur sehr kurz anhält und nach 30 min wieder Signale gleich dem Kontrollniveau erreicht werden (Culmsee et al., 2002; Hempstead et al., 1992). Folglich konnte durch Behandlung mit dem NO-Donator eine verlängerte TrkA-Phosphorylierung erzielt werden.

Diese Befunde deuten eindeutig auf eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid an der Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors hin. Die Arbeitsgruppe um Monteiro konnte zeigen, dass eine Behandlung von Endothelzellen mit den NO-Donatoren SNP (Natrium nitroprusside) und SNAP zu einer Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors führt (Oliveira et al., 2003). Die Phosphorylierung ist dabei cGMP vermittelt. Vielmehr noch wird eine Aktivierung des Ras/Raf/MEK/MAPK-Signaltransduktionsweges für die NO/cGMP-vermittelte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors benötigt, da die Hemmung von Erk1 und Erk2 die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors blockierte (Oliveira et al., 2003). Der aktivierte EGF-Rezeptor stimuliert seinerseits die Ras/Raf/MEK/MAPK-Kaskade, so dass also ein positiver Rückkopplungsmechanismus vorliegt (Oliveira et al., 2003).

Ein Mechanismus, der für die NO-vermittelte Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors in Frage kommt, ist die Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Zwar belegen einige Befunde die Aktivierung der PTP-1B durch Stickstoffmonoxid (Hassid et al., 1999; Sreejayan et al., 2002), jedoch weist die überwiegende Anzahl an Literaturberichten eine Hemmung der PTP-1B und anderer PTP nach (Caselli et al., 1994; Li und Whorton, 2003; Takakura et al., 1999).

Die Hemmung der PTP führt dann, wie bereits erläutert, zu einer verstärkten Phosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren sowohl bei Anwesenheit als auch bei Abwesenheit des Wachstumsfaktors (Callsen et al., 1999; Peranovich et al., 1995).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die NO-Donatoren Ethyl-3,4-dephostatin, 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin und SNAP eine Stickstoffmonoxidfreisetzung und eine Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA mit nachfolgender Neuroprotektion induzieren. Zwar kann eine NO-induzierte Hemmung der für die TrkA-Dephosphorylierung verantwortlichen Protein-Tyrosin-Phosphatase(n) sicherlich nicht ausgeschlossen werden, die Beteiligung einer NO-vermittelten Tyrosin-Phosphatasehemmung bei der hier nachgewiesenen TrkA-Phosphorylierung kann aber bislang ohne weiteres nicht nachgewiesen werden. Um diese Beteiligung zu untersuchen, müsste zunächst die für die TrkA-Dephosphorylierung verantwortliche PTP identifiziert werden, um dann den Einfluss von Stickstoffmonoxid auf diese Phosphatase messen zu können. Allerdings weisen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu der PTP-1B und die Tatsache, dass eine NO-induzierte Hemmung dieser Phosphatase bereits belegt wurde, auf einen Zusammenhang hin. Für den Nachweis der Kausalität sind jedoch weitere Studien notwendig.

4.4.4 Aktivierung des PI3-K/Akt- und des MEK/MAPK-Signaltransduktionsweges durch NO-Donatoren

Wie bereits erwähnt, wird die NGF-vermittelte Neuroprotektion in hippocampalen Neuronen im Wesentlichen über den PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweg und über den Ras/Raf/MEK/MAPK-Signaltransduktionsweg vermittelt (Sofroniew et al., 2001). Nachdem in vorherigen Ergebnissen der Arbeit gezeigt werden konnte, dass die NO-Donatoren Ethyl-3,4-dephostatin und SNAP hinsichtlich der TrkA-Phosphorylierung und der Neuroprotektion NGF-ähnliche Effekte besitzt (Gerling et al., 2002a,b, 2003b), konnte durch die im Folgenden diskutierten Experimente eine Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalweges nach Behandlung mit dem NO-Donator und gleichzeitigem PTP-Inhibitor Ethyl-3,4-dephostatin nachgewiesen werden.

Vorbehandlung embryonaler, hippocampaler Neurone mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin führte sowohl zu einer Aufhebung der Ethyl-3-4-dephostatin-induzierten Akt-Phosphorylierung als auch zu einer Blockade der antiapoptotischen und somit

neuroprotektiven Eigenschaften. Darüber hinaus weisen die hier dargelegten Untersuchungen daraufhin, dass infolge der Aktivierung der PI3-K auch Akt phosphoryliert und aktiviert wird. Immunzytochemische Aufnahmen und Immunoblotanalysen aus Proteinextrakten von hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin belegen die transiente Phosphorylierung von Akt. Bestätigt werden die hier gezeigten Befunde durch Ergebnisse aus dem Labor von Prof. Umezawa, die ebenfalls eine Beteiligung der PI3-K und der Proteinkinase B/Akt bei den durch Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelten antidiabetischen Effekten zeigen konnten (Suzuki et al., 2001). Die gleichen Effekte hinsichtlich der Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalweges konnten mit dem NO-Donator SNAP gezeigt werden. Diese Befunde bestätigen, dass die nitrosaminhaltigen Dephostatin-Derivate Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin ihre antiapoptotischen Eigenschaften über eine NO-Freisetzung mit nachfolgender Aktivierung der PI3-K/Akt-Signaltransduktionskaskade vermitteln.

Ähnliche Effekte konnten nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin für den MEK/MAPK-Signaltransduktionsweg erzielt werden. Es wurde nicht nur eine Phosphorylierung von Erk1/2 induziert, sondern ferner auch eine Beteiligung der MEK an den vermittelten antiapoptotischen Eigenschaften nachgewiesen. Präinkubation hippocampaler Neurone mit dem MEK-Inhibitor UO126 verminderte die neuroprotektive Wirkung von Ethyl-3,4-dephostatin gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose. Zwar fehlen bislang weitere Befunde zum Einfluss von Ethyl-3,4-dephostatin auf die MEK/MAPK-Kaskade, so konnte jedoch mit Methyl-3,4-dephostatin eine verlängerte Erk1 und Erk2-Phosphorylierung nach Behandlung mit NGF demonstriert werden (Fujiwara et al., 1997; Umezawa, 1997). Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung der MEK/MAPK-Kaskade an der SNAP-vermittelten Neuroprotektion nachgewiesen werden. Bestätigt werden obige Befunde durch Literaturberichte, die eine Aktivierung des Ras/MEK/MAPK-Signaltransduktionsweges durch Stickstoffmonoxid zeigen (Monteiro et al., 2000; Oliveira et al., 2003).

Die hier durchgeführten Untersuchungen belegen eindeutig die Beteiligung der antiapoptotischen Signaltransduktionswege, der PI3-K/Akt-Kaskade und der MEK/MAPK-Kaskade, an NO-induzierter Neuroprotektion. Die Mechanismen der hier induzierten protektiven Wirkungen können vielfältig sein. Zum einen kann eine direkte Aktivierung antiapoptotischer Proteine zur Neuroprotektion führen. Literaturberichten zufolge wurde beispielsweise eine Beteiligung der Tyrosinphosphorylierung bei der Aktivierung von Akt

nachgewiesen (Chen et al., 2001; Conus et al., 2002). Andere Arbeitsgruppen konnten eine Interaktion von Protein-Tyrosin-Phosphatasen mit Erk1 und Erk2 nachweisen (Pulido et al., 1998; Tarrega et al., 2002). Ob und in welchem Maße Ethyl-3,4-dephostatin in der Lage ist, Akt und die MAPK Erk1 und Erk2 über eine Hemmung der Dephosphorylierung an Tyrosinresten direkt zu aktivieren, müssen weitere Studien klären.

Auf der anderen Seite gibt es einige Hinweise in der Literatur dafür (Fujiwara et al., 1997; Suzuki et al., 2001), dass die Dephostatin-Derivate Tyrosinkinase-Rezeptoren aktivieren. Es konnte ferner durch die hier durchgeführten Experimente eine Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin gezeigt werden. Aufgrund dieser Aktivierung können die induzierten PI3-K/Akt- und MEK/MAPK-Signaltransduktionskaskaden die neuroprotektive Wirkung des PTP-Inhibitors über eine Aktivierung und Neusynthese neuroprotektiver Proteine oder mittels Inaktivierung apoptotischer Mediatoren vermitteln. Übersichtsarbeiten erläutern diese Zusammenhänge (Kaplan und Miller, 1997; Patapoutian und Reichardt, 2001; Sofroniew et al., 2001), die schon näher bei der Orthovanadat-vermittelten Neuroprotektion im Kapitel 4.2 beschrieben wurden. Jedoch sollen an dieser Stelle die Interaktionen zwischen den beiden vor Neurodegeneration schützenden Signalwegen erläutert werden.

Literaturberichten zufolge werden sowohl inhibitorische, aber auch aktivierende Interaktionen zwischen dem PI3-K/Akt-Weg und dem Ras/Raf/MEK/MAPK-Weg beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Zimmermann konnte eine Phosphorylierung von Raf an Ser-259 mit nachfolgender Inaktivierung des Proteins in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums der Zellen nachweisen (Zimmermann und Moelling, 1999; Rommel et al., 1999). Diese inhibitorische Interaktion ist dabei von der Stärke der Akt-Aktivierung abhängig (Moelling et al., 2002) und führt letztendlich zu einer Hemmung der Ras/Raf/MEK/MAPK-Kaskade und den dadurch vermittelten Effekten (Reusch et al., 2001). Auf der anderen Seite sprechen aber viele Befunde für eine stimulierende Interaktion. Rodriguez-Viciana et al. (1994, 1997) konnten das Protein p21-Ras als Substrat der PI3-K nachweisen. Andere Studien demonstrieren die PI3-K-induzierte Aktivierung des Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweges mittels Ras-Interaktion (Crossthwaite et al., 2002; York et al., 2000) und nachfolgender Aktivierung antiapoptotischer Proteine wie z. B. NF- κ B (Gingery et al., 2003) oder CREB (Perkinton et al., 2002). Dieses führt dann zu einer Hemmung der neuronalen Apoptose (Von Gise et al., 2001; York et al., 2000). Weitere Experimente konnten die Interaktion der PI3-K mit Gab1 (Growth Factor Receptor-bound Protein 2-associated binder 1) belegen, die ebenso

zu der Aktivierung von Ras bzw. zur Aktivierung des Ras/Raf/MEK/MAPK-Signaltransduktionsweges führt (Bisotto und Fixman, 2001; Yart et al., 2001). Zudem ist eine positiv modulatorische Interaktion durch Aktivierung der PI3-K/Akt-Kaskade durch Ras (Jimenez C, 2002; Rodriguez-Viciana et al., 1996) und Gab1 (Holgado-Madruga et al., 1997) beschrieben worden. Diese Literaturberichte zeigen, dass die Interaktionen zwischen dem PI3-K/Akt-Weg und dem Ras/Raf/MEK/MAPK-Weg sehr komplex sind und es weitere Untersuchungen bedarf, die genauen Zusammenhänge aufzuklären.

Auch in Abwesenheit der Tyrosinkinaserzeptoren konnte eine NO-vermittelte direkte Aktivierung der MEK/MAPK-Kaskade nachgewiesen werden. So konnte beispielsweise die Arbeitsgruppe um Dawson von einer Ras- und Erk1/2-Aktivierung durch endogen produziertes Stickstoffmonoxid nach ischämischer Präkonditionierung mittels Sauerstoff-Glucose-Entzug in kortikalen Neuronen berichten (Dawson et al., 1998; Gonzalez-Zulueta et al., 2000). Diese cGMP-unabhängige Aktivierung des Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweges vermittelte daraufhin neuroprotektive Eigenschaften (Gonzalez-Zulueta et al., 2000) und wurde durch Aktivierung der NMDA-Rezeptoren eingeleitet (Yun et al., 1998). Neben der Aktivierung von Erk1 und Erk2 durch NO/Ras (Monteiro, 2002) konnte außerdem eine Ras-abhängige NF- κ B-Aktivierung gezeigt werden (Lander et al., 1995a,b; Simpson und Morris, 1999). Die oben zitierten Befunde finden unabhängig von cGMP statt. Die cGMP-abhängige Phosphorylierung der PI3-K- und der MAPK-Kaskade und die dadurch induzierten neuroprotektiven Effekte von Stickstoffmonoxid werden im nächsten Kapitel näher erläutert.

4.4.5 Die Rolle der löslichen Guanylatcyclase bei der NO-vermittelten Neuroprotektion

Aufgrund der vorliegenden Messungen, in denen eine NO-Freisetzung aus Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin gezeigt werden konnte, kann eine Beteiligung des Botenstoffes cGMP an Dephostatin-induzierter Neuroprotektion nicht ausgeschlossen werden.

ODQ ist ein Inhibitor der löslichen Guanylatcyclasen. Mittels Bindung am Eisen der Hämgruppe und nachfolgender Oxidation zu Fe³⁺ wird die Bindung von NO an das Eisen der Hämgruppe und die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase unterbunden (Bellamy und Garthwaite, 2002; Stone et al., 1996). Mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte

eine Guanylatcyclase- bzw. cGMP-vermittelte Neuroprotektion durch Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin nachgewiesen werden. Mit dem Guanylatcyclaseinhibitor ODQ konnten die antiapoptotischen Effekte der NO-Donatoren und PTP-Inhibitoren blockiert werden. Mit Hilfe von 8-Br-cGMP konnte zudem gezeigt werden, dass cGMP neuroprotektiv wirkt.

Vergleichbare Effekte konnte in der vorliegenden Arbeit durch SNAP gezeigt werden. Präinkubation mit dem Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase blockierte die durch SNAP-induzierte Neuroprotektion gegenüber Staurosporin-induzierte Apoptose in hippokampalen Neuronenkulturen.

Verschiedene Studien belegen die neuroprotektiven Eigenschaften der löslichen Guanylatcyclase. Die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch Stickstoffmonoxid und die damit verbundene Synthese von cGMP induziert dabei verschiedene neuroprotektive Signaltransduktionswege (Fiscus, 2002; Shen et al., 2001; Thippeswamy und Morris, 1997). Im Vergleich zu anderen NO-vermittelten Effekten reichen bereits geringe, nanomolare Konzentrationen aus, um das Enzym zu aktivieren (Davis et al., 2001). Die Aktivierung und damit verbundene Bildung von cGMP führt über verschiedene Mechanismen zur NO-vermittelten Neuroprotektion (Fiscus, 2002).

Beispielsweise berichten verschiedene Arbeitsgruppen von einer Aktivierung der Proteinkinase B/Akt durch Stickstoffmonoxid (Ha et al., 2003; Kook et al., 2003). Ferner konnten Barsacchi und Kollegen (2002) eine NO-induzierte cGMP-Freisetzung mit Hemmung der Ceramid-vermittelten Apoptose messen. Inaktivierung verschiedener Caspasen direkt durch NO oder indirekt über eine Induktion von cGMP wurde von den Arbeitsgruppen um Kim/Billiar und Zeiher/Dimmeler nachgewiesen (Dimmeler et al., 1997; Kim et al., 1997, 1999). Durch die Freisetzung von cGMP kommt es ferner zur Aktivierung der PKG. Literaturzitate zu Folge wird hierdurch Neuroprotektion über die Aktivierung verschiedener neuroprotektiver Proteine induziert. Hierzu zählen, um nur einige wenige zu nennen, u. a. Bcl-2 (Andoh et al., 2002), NF- κ B (Barger und Mattson, 1996; He und Weber, 2003) und CREB (Gudi et al., 2000; Lu et al., 1999).

Bereits 1995 konnten über 40 Substrate identifiziert werden, die cGMP-abhängig durch die Proteinkinase G phosphoryliert werden (Wang und Robinson, 1995). Die PKG spielt dabei eine wichtige Rolle bei der durch Stickstoffmonoxid-vermittelten Neuroprotektion. Beispielsweise hemmt sie die Caspase-3, was nachfolgend zu antiapoptotischen Effekten

durch Blockade der Cytochrom C-Freisetzung führt (Kim et al., 1999). Aber auch eine Induktion der Src Kinase mit daraus resultierender Hemmung der Bcl-2 Degradierung (Tejedo et al., 2001) und die Induktion der MnSOD konnte gezeigt werden (Andoh et al., 2002; Rauhala et al., 2002). Neben der NO-induzierten Caspasehemmung, aktiviert Stickstoffmonoxid über den NO/sGC/cGMP/PKG-Signalweg die neuroprotektiv wirkenden Proteine Erk1 und Erk2 (Ciani et al., 2002; Ho et al., 1999; Komalavilas et al., 1999) und Akt (Gélinas et al., 2002; Kawasaki et al., 2003; Kook et al., 2003). Ha et al. (2003) konnten zeigen, dass die SNAP-induzierte Akt-Aktivierung, vermittelt durch den NO/sGC/cGMP/PKG-Signaltransduktionsweg, zu einer Hemmung der Apoptose mittels Bad-Phosphorylierung, Inhibierung der Cytochrom C-Freisetzung und S-Nitrosylierung an Caspase-3 und Caspase-9 führt und somit neuroprotektive Effekte vermittelt.

Anhand der durchgeführten Studien ist eindeutig die Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA und die Beteiligung der neuroprotektiven PI3-K/Akt- und MEK/MAPK-Signaltransduktionskaskaden an der NO-vermittelten Neuroprotektion nachgewiesen worden. Inwiefern hierfür die Hemmung der für die TrkA-Dephosphorylierung verantwortlichen Protein-Tyrosin-Phosphatase verantwortlich ist, lässt sich an dieser Stelle nicht eindeutig klären. Sie ist jedoch aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wahrscheinlich. Ferner konnte gezeigt werden, dass der sGC/cGMP/PKG-Signaltransduktionsweg die Neuroprotektion der NO-Donatoren SNAP, Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin vermittelt. Somit könnte die Induktion neuroprotektiver Signaltransduktionswege durch NO-Donatoren eine neue, vielversprechende Strategie zur Verhinderung des neuronalen Zelltods während neurodegenerativer Erkrankungen sein.

5 Zusammenfassung

Trotz des enormen Fortschrittes der Medizin und neuen Erkenntnissen über die pathologischen Mechanismen des neuronalen Zelltodes steht bislang keine wirkungsvolle, kausale Therapie zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen zur Verfügung. Die Forschung an den pathophysiologischen Mechanismen des neuronalen Zelltodes ist daher unabdingbar, um neue Strategien zur Behandlung der neurodegenerativen Erkrankungen zu entwickeln und so die Prognose bei den altersbedingten Hirnleistungsstörungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson zu verbessern.

Obwohl unterschiedliche Ursachen für den neuronalen Zelluntergang verantwortlich sein können, gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass die neuronale Apoptose im Rahmen von degenerativen Erkrankungen am Zelltod beteiligt ist. Auch bei den neurodegenerativen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems und nach zerebraler Ischämie ist eine Beteiligung apoptotischer Prozesse nachgewiesen worden. Hierin liegt die Grundlage zur Entwicklung dringend benötigter neuer Therapiestrategien. Eine Möglichkeit, die neuronale Apoptose nach einem schädigenden Ereignis oder im Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen zu blockieren, stellt dabei die Behandlung mit neurotrophen Wachstumsfaktoren dar.

Für die neurotrophen Wachstumsfaktoren sind antiapoptotische Eigenschaften und neuroprotektive Wirkungen beschrieben worden. Durch Aktivierung verschiedenster Rezeptoren und Signaltransduktionskaskaden werden Schlüsselproteine aktiviert, die für die Hemmung der neuronalen Apoptose und somit für das neuronale Überleben notwendig sind. Aufgrund der molekularen Struktur der Wachstumsfaktoren ergeben sich aber insbesondere bei der Applikation Probleme, da diese Proteine die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können und somit ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften vorliegen. Eine mögliche Lösung dieses Problems besteht darin, die Wachstumsfaktor-induzierte, neuroprotektive Wirkung mittels Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen zu imitieren.

Anhand von quantitativen Untersuchungen konnten neuroprotektive Effekte für den PTP-Inhibitor Orthovanadat festgestellt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser neuroprotektiven Wirkung scheint eine Induktion der Phosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren zu sein. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit eine Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA nach Behandlung embryonaler,

hippokampaler Neurone mit dem PTP-Inhibitor nachgewiesen werden. Dieser Befund erklärt die neuroprotektiven Eigenschaften von Orthovanadat gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose, die durch Hemmung der TrkA-Phosphorylierung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor K-252a vermindert werden konnten. Frühere Studien, in denen die Phosphorylierung und Aktivierung des TrkA-Rezeptors durch NGF neuroprotektive Effekte vermittelt, bestätigen die gemachten Befunde.

Darüber hinaus wurde erstmals die Phosphorylierung und Aktivierung des NGF-Rezeptors TrkA in Abwesenheit von NGF dargestellt. Präinkubation mit neutralisierenden NGF-Antikörpern vermochte zwar die NGF-induzierte Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors und die dadurch vermittelte Neuroprotektion aufheben, die Orthovanadat-induzierten Effekte konnten jedoch nicht blockiert werden. Dies begründet sich wahrscheinlich durch die Basisaktivität der Wachstumsfaktorrezeptoren und/oder durch die Anwesenheit von NT-3.

Nachdem durch Behandlung mit dem Inhibitor der Protein-Tyrosin-Phosphatasen Orthovanadat TrkA-vermittelte neuroprotektive Effekte belegt werden konnten, stellte sich die Frage, welche Mechanismen für die antiapoptotischen Wirkung verantwortlich waren. Die NGF-vermittelte Neuroprotektion wird nach Aktivierung und Phosphorylierung des TrkA-Rezeptors überwiegend mittels Aktivierung zweier Signaltransduktionswege vermittelt. Hierzu gehören der PI3-K/Akt-Signalweg und der Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg. Für Orthovanadat waren die Mechanismen der induzierten Protektion neuronaler Zellen bis dato nahezu unbekannt. Mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer und biochemischer Methoden konnte an dieser Stelle infolge der TrkA-Aktivierung eine Beteiligung dieser Signaltransduktionskaskaden an der Orthovanadat-vermittelten Neuroprotektion nachgewiesen werden. Immunoblotanalysen aus Proteinextrakten embryonaler, hippocampaler Rattenneurone und immunzytochemische Aufnahmen konnten die gesteigerte Phosphorylierung von Akt und Erk1 und Erk2 nach Behandlung mit Orthovanadat nachweisen. Quantitative Untersuchungen zeigten weiterhin, dass eine Blockade der PI3-K durch Wortmannin und eine Hemmung der MEK durch UO126 die neuroprotektiven Eigenschaften von Orthovanadat aufheben und somit zweifelsfrei die Beteiligung des PI3-K/Akt-Signalweges und der MEK/MAPK-Kaskade belegen.

Aus den durchgeführten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit geht somit eindeutig hervor, dass eine Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch Orthovanadat die

Phosphorylierung und Aktivierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA auch in Abwesenheit von NGF induziert und dieses zu neuroprotektiven Effekten mittels Aktivierung der PI3-K/Akt-Signaltransduktionskaskade und der Aktivierung der Ras/Raf/MEK-MAPK-Kaskade führt. Die Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen könnte somit eine neue, vielversprechende Strategie sein, die neuroprotektive Wirkung der Wachstumsfaktoren zu imitieren, um so im Verlauf chronisch degenerativer Hirnerkrankungen vor neuronalem Zelltod zu schützen.

Die für die Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors verantwortliche Protein-Tyrosin-Phosphatase ist bis dato unbekannt. Zwar belegen viele Studien die Beteiligung der PTP-1B an der Dephosphorylierung verschiedener Wachstumsfaktoren aus der RTK-Familie, jedoch gab es bislang keinen klaren Hinweis zur Interaktion zwischen dem hochaffinen NGF-Rezeptor und der PTP-1B. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl eine Verlängerung der NGF-induzierten TrkA-Phosphorylierung in PC12-Zellen durch den spezifischen PTP-1B-Inhibitor Compound 2 nachgewiesen werden, als auch eine konzentrations- und zeitabhängige Dephosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors in embryonalen, hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit rekombinanter PTP-1B. Anhand der hier durchgeführten Experimente besteht Anlass zur Hoffnung, dass die PTP-1B die für die TrkA-Dephosphorylierung verantwortliche Phosphatase ist. Somit könnte die Hemmung der PTP-1B ein probater Mechanismus zur Induktion der TrkA-Phosphorylierung und der dadurch vermittelten Neuroprotektion sein.

Studien früherer Arbeiten zeigen das ambivalente Verhalten von Stickstoffmonoxid hinsichtlich der neuronalen Degeneration. So konnte nachgewiesen werden, dass hohe Konzentrationen des monomeren Gases toxische Effekte durch Aktivierung verschiedener Mechanismen induzieren, hingegen aber niedrigere Konzentrationen antiapoptotische Effekte vermitteln. Die hierfür verantwortlichen Mechanismen sind gerade auf neuronaler Ebene nahezu unbekannt und konnten durch die durchgeführten Experimente weiter aufgedeckt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine NO-Freisetzung für die Dephostatin-Derivate Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin gemessen. Dieser Befund ist

insbesondere im Hinblick auf die festgestellten neuroprotektiven Eigenschaften dieser Substanzklasse interessant. So konnten anhand quantitativer Untersuchungen in hippokampalen Rattenneuronen antiapoptotische Effekte gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose für diese NO-Donatoren nachgewiesen werden, wohingegen das Nitrosaminfreie Derivat Methoxim-3,4-dephostatin weder Stickstoffmonoxid freisetzte noch Neuroprotektion vermittelte. Aufgrund dieser Feststellungen schien eine Korrelation zwischen der Stickstoffmonoxidfreisetzung und der Neuroprotektion zu bestehen. Die hierfür verantwortlichen Mechanismen ließen daraufhin eine Beteiligung der löslichen Guanylatcyclyase vermuten, welche nicht nur für die neuroprotektiven Effekte des NO-Donators SNAP demonstriert wurde, sondern auch für Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin gezeigt werden konnte.

Für einige NO-Donatoren sind hemmende Eigenschaften hinsichtlich diverser Protein-Tyrosin-Phosphatasen beschrieben worden. Dennoch sind diese Prozesse und die dadurch vermittelten Effekte noch nicht aufgeklärt worden. Es war daher von großem Interesse, diese Zusammenhänge zu charakterisieren und hinsichtlich des Einflusses auf den Tyrosinkinase-Rezeptor TrkA zu untersuchen. Die Ergebnisse immunzytochemischer Messungen und die Immunoblotanalysen von hippokampalen Proteinextrakten konnten nicht nur eine SNAP-induzierte TrkA-Phosphorylierung belegen, sondern auch zeigen, dass die Dephostatin-Derivate Ethyl-3,4-dephostatin und 4-O-Methyl-3,4-dephostatin neben der Neuroprotektion eine transiente Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors induzieren. Dieses begründet sich höchstwahrscheinlich aus der NO-vermittelten Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen, wengleich kompetitive Hemmmechanismen für die Dephostatin-Derivate hinsichtlich einiger PTP beschrieben wurden.

Auf der Grundlage obiger Feststellungen stellte sich die Frage, ob durch die induzierte TrkA-Phosphorylierung die dem hochaffinen NGF-Rezeptor nachgeschalteten Signaltransduktionswege bei der NO-vermittelten Neuroprotektion beteiligt waren. Diesbezüglich konnte durch vorliegende immunzytochemische Aufnahmen und Immunoblotanalysen nicht nur eine gesteigerte Phosphorylierung von Akt nach der Behandlung mit den NO-Donatoren Ethyl-3,4-dephostatin und SNAP nachgewiesen werden, sondern auch eine transiente Phosphorylierung der MAPK Erk1 und Erk2. Vielmehr noch bestätigten die durchgeführten Studien mit den Inhibitoren der PI3-K und der MEK die Beteiligung des PI3-K/Akt- und des Ras/Raf/MEK/MAPK-Signaltransduktionsweges an der

NO-induzierten Neuroprotektion. Somit erlauben die Befunde der vorliegenden Arbeit die Schlussfolgerung, dass ein positiver Zusammenhang zwischen NO-induzierter Neuroprotektion und Aktivierung der neuroprotektiven PI3-K/Akt- und der MEK/MAPK-Signalwege besteht.

Anhand der durchgeführten Studien konnte zweifelsfrei die NO-vermittelte Induktion der TrkA-Phosphorylierung demonstriert werden. Neben der Beteiligung der neuroprotektiven PI3-K/Akt- und der MEK/MAPK-Transduktionskaskaden konnte die Beteiligung der löslichen Guanylatcyclase an den antiapoptotischen Effekten der NO-Donatoren SNAP und Ethyl-3,4-dephostatin belegt werden. Inwiefern Interaktionen zwischen diesen Kaskaden bestehen und welche Rolle der Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch die Dephostatin-Derivate zukommt, müssen nähere Untersuchungen zeigen. Die Induktion von neuroprotektiven Neurotrophin-Signalkaskaden durch die NO-Donatoren könnte aufgrund der Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen eine neue, vielversprechende Strategie sein, um in die pathophysiologischen Mechanismen des neuronalen Zelltods einzugreifen und so neue Arzneistoffe zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlemeyer B, Krieglstein J (1998) Retinoic acid reduces staurosporine-induced apoptotic damage in chick embryonic neurons by suppressing reactive oxygen species production. *Neurosci. Lett.* 246, 93-96.
- Ahlemeyer B, Huehne R, Krieglstein J (2000) Retinoic acid potentiated the protective effect of NGF against STS-induced apoptosis in cultured chick neurons by increasing the TrkA protein expression. *J. Neurosci. Res.* 60, 767-778.
- Ahmad F, Li PM, Meyerovitch J, Goldstein BJ (1995) Osmotic loading of neutralizing antibodies demonstrates a role for protein-tyrosine phosphatase 1B in negative regulation of the insulin action pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 20503-20508.
- Albrecht EWJA, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H (2003) Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J. Pathol.* 199, 8-17.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615.
- Alzheimer A (1906) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Psychiatrien* 30, 177-179.
- American Heart Association (2001) 2002 Heart and stroke statistical update. Dallas, Texas: American Heart Association.
- Andoh T, Chock PB, Chiueh CC (2002) Preconditioning-mediated neuroprotection: role of nitric oxide, cGMP, and new protein expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962, 1-7.
- Antuono P, Beyer J (1999) The burden of dementia. A medical and research perspective. *Theor. Med. Bioeth.* 20, 3-13.
- Aoki Y, Huang Z, Thomas SS, Bhide PG, Huang I, Moskowitz MA, Reeves SA (2000) Increased susceptibility to ischemia-induced brain damage in transgenic mice overexpressing a dominant negative form of SHP2. *FASEB J.* 14, 1965-1973.
- Araki T, Thono Y, Takakuso A, Yamada MO (1985) Polarization fluorometry of nucleosome DNA structure with Hoechst 33258 fluorochrome. *Cell. Mol. Biol.* 31, 407-412.
- Archer S (1993) Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 7, 349-360.
- Arends M, Morris R, Wyllie A (1990) Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *PNAS* 74, 3203-3207.

- Arregui CO, Balsamo J, Lilien J (1998) Impaired integrin-mediated adhesion and signaling in fibroblasts expressing a dominant-negative mutant PTP1B. *J. Cell. Biol.* 143, 861-873.
- Arregui CO, Balsamo J, Lilien J (2000) Regulation of signaling by protein-tyrosine phosphatases: potential roles in nervous system. *Neurochem. Res.* 25, 95-105.
- Ashe PC, Berry MD (2003) Apoptotic signaling cascades. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psych.* 27, 199-214.
- Atochin DA, Clark J, Demchenko IT, Moskowitz MA, Huang PL (2003) Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases. *Stroke* 34, 1299-1303.
- Ayer-LeLievre C, Olson L, Ebendal T, Seiger A, Persson H (1988) Expression of the beta-nerve growth factor gene in hippocampal neurons. *Science* 240, 1339-1341.
- Balsamo J, Arregui C, Leung T, Lilien J (1998) The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage. *J. Cell. Biol.* 143, 523-532.
- Barbacid M (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25, 1386-1403.
- Barford D, Flint AJ, Tonks NK (1994) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* 263, 1397-1404.
- Barford D (1995) Protein phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 728-734.
- Barford D, Jia Z, Tonks NK (1995) Protein tyrosine phosphatases take off. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1043-1053.
- Barger SW, Hoerster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP (1995) Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation. *PNAS* 92, 9328-9332.
- Barger SW, Mattson MP (1996) Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 40, 116-126.
- Barker PA, Murphy RA (1992) The nerve growth factor receptor: a multicomponent system that mediates the actions of the neurotrophin family of proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 10, 1-15.
- Barker P, Shooter EM (1994) Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduced NGF-binding to trkA on PC12 cells. *Neuron* 13, 203-215.

- Barrett WC, de Gnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* 274, 34543-34546.
- Barrett GL (2000) The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 61, 205-229.
- Barsacchi R, Perrotta C, Sestili P, Cantoni O, Moncada S, Clementi E (2002) Cyclic GMP-dependent inhibition of acid sphingomyelinase by nitric oxide: an early step in protection against apoptosis. *Cell Death Differ.* 9, 1248-1255.
- Bax B, Blundell TL, Murray-Rust J, McDonald MQ (1997) Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure* 5, 1275-1285.
- Baxter RM, Cohen P, Obermeier A, Ullrich A, Downes CP, Doza YN (1995) Phosphotyrosine residues in the nerve-growth-factor receptor (Trk-A). Their role in the activation of inositolphospholipid metabolism and protein kinase cascades in pheochromocytoma (PC12) cells. *Eur. J. Biochem.* 234, 84-91.
- Bellamy TC, Garthwaite J (2002) Pharmacology of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in cerebellar cells. *Brit. J. Pharmacol.* 136, 95-103.
- Benedetti M, Levi A, Chao MV (1993) Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *PNAS* 90, 7859-7863.
- Berg MM, Strenberg DW, Parada LF, Chao MV (1992) K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *J. Biol. Chem.* 267, 13-16.
- Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14, 2919-2937.
- Billiar TR (1995) Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann. Surg.* 221, 339-349.
- Biolojan C, Takai A (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* 256, 283-290.
- Bisotto S, Fixman ED (2001) Src-family tyrosine kinases, phosphoinositide 3-kinase and Gab1 regulate extracellular signal-regulated kinase 1 activation induced by the type A endothelin-1 G-protein-coupled receptor. *Biochem. J.* 360, 77-85.
- Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ (2000) Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 275, 41439-41446.

- Boehmer FD, Boehmer SA, Heldin CH (1993) The dephosphorylation characteristics of the receptors for epidermal growth factor and platelet-derived growth factor in Swiss 3T3 cell membranes suggest differential regulation of receptor signalling by endogenous protein-tyrosine phosphatases. *FEBS Lett.* 331, 276-280.
- Bolanos JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB (1995) Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* 64, 1965-1972.
- Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 68, 2227-2240.
- Boyd CS, Cadenas E (2002) Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol. Chem.* 383, 411-423.
- Brann AB, Tcherpakov M, Williams IM, Futerman AH, Fainzilber M (2002) Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 277, 9812-9818.
- Brautigan DL, Bornstein P, Gallis B (1981) Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *J. Biol. Chem.* 256, 6519-6522.
- Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *PNAS* 87, 682-685.
- Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 175-195.
- Brookers PS, Levonen AL, Shiva S, Darley-Usmar VM (2002) Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 755-764.
- Brunet A, Datta AR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 297-305.
- Bui NT, Koenig HG, Culmsee C, Bauerbach E, Pope M, Kriegstein J, Prehn JHM (2002) p75 neurotrophin receptor is required for constitutive and NGF-induced survival signaling in PC12 cells and rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 81, 594-605.
- Buisson A, Lesne S, Docagne F, Ali C, Nicole O, MacKenzie ET, Vivine D (2003) Transforming growth factor-beta and ischemic brain injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 23, 539-550.

- Bunn SJ, Saunders HJ (1995) Staurosporine inhibits inositol phosphate formation in bovine adrenal medullary cells. *Eur. J. Pharmacol.* 290, 227-236.
- Butt E, Nolte C, Schulz S, Beltman J, Beavo JA, Jastorff B, Walter U (1992) Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem. Pharmacol.* 43, 2591-2600.
- Callsen D, Sandau KB, Bruene B (1999) Nitric oxide and superoxide inhibit platelet-derived growth factor receptor phosphotyrosine phosphatases. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1544-1553.
- Campbell XZ, Neet KE (1995) Hierarchical analysis of the nerve growth factor-dependent and nerve growth factor-independent differentiation signaling pathways in PC12 cells with protein kinase inhibitors. *J. Neurosci. Res.* 42, 207-219.
- Canals S, Casarejos MJ, Rodríguez-Martín E, de Bernardo S, Mena MA (2001) Neurotrophic and neurotoxic effects of nitric oxide on fetal midbrain cultures. *J. Neurochem.* 76, 56-68.
- Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhaeuser N, Boehm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA (1996) Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272, 542-545.
- Carter BD, Lewin GR (1997) Neurotrophins live or let die: does p75NTR decide? *Neuron* 18, 187-190.
- Casaccia-Bonofil P, Gu C, Chao MV (1999) Neurotrophins in cell survival/death decisions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468, 275-282.
- Caselli A, Camici G, Manao G, Moneti G, Pazzagli L, Cappugi G, Ramponi G (1994) Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 269, 24878-24882.
- Caselli A, Chiarugi P, Camici G, Manao G, Ramponi G (1995) In vivo inactivation of phosphotyrosine protein phosphatases by nitric oxide. *FEBS Lett.* 374, 249-252.
- Cellerino A (1993) Expression of messenger RNA coding for the nerve growth factor receptor trkA in the hippocampus of the adult rat. *Neuroscience* 70, 613-616.
- Chan SL, Mattson MP (1999) Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res.* 58, 167-190.
- Chao MV, Hempstead BL (1995) p75 and Trk: a two receptor system. *TINS* 7, 321-326.
- Chen B, Barger SW, Mattson MP (1994) Staurosporine, K-252a, and K-252b stabilize calcium homeostasis and promote survival of CNS neurons in the absence of glucose. *J. Neurochem.* 62, 1319-1329.

- Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y (2001) Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 31858-31862.
- Cheng A, Bal GS, Kennedy BP, Tremblay ML (2001) Attenuation of adhesion-dependent signaling and cell spreading in transformed fibroblasts lacking protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Biol. Chem.* 276, 25848-25855.
- Cheng B, Barger SW, Mattson MP (1994) Staurosporine, K-252a, and K-252b stabilize calcium homeostasis and promote survival of CNS neurons in the absence of glucose. *J. Neurochem.* 62, 1319-1329.
- Cheng B, Mattson MP (1994) NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res.* 640, 56-67.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lidsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell.* 8, 705-711.
- Chernoff J, Schievella AR, Jost CA, Erikson RL, Neel BG (1990) Cloning of a cDNA for a major human protein tyrosine phosphatase. *PNAS* 87, 2735-2739.
- Cheung PY, Salas E, Etches PC, Phillipos E, Schulz R, Radomski MW (1998) Inhaled nitric oxide and inhibition of platelet aggregation in critically ill neonates. *Lancet* 351, 1181-1182.
- Chin L. S., Murray S. F., Harter D. H., Doherty PF, Singh SK (1998) Sodium vanadate inhibits apoptosis in malignant glioma cells: a role for Akt/PKB. *J. Biomed. Sci.* 6, 213-218.
- Chiueh (1999) Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann. NY Acad. Sci.* 890, 301-311.
- Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261-1276.
- Choi JJ, Kim WK (1998) Potentiated glucose deprivation-induced death of astrocytes after induction of iNOS. *J. Neurosci. Res.* 54, 870-875.
- Ciani E, Guidi S, Della Valle G, Perini G, Bartesaghi R, Contestabile A (2002) Nitric oxide protects neuroblastoma cells from apoptosis induced by serum deprivation through cAMP-response element-binding protein (CREB) activation. *J. Biol. Chem.* 277, 49896-49902.
- Clary DO, Reichardt LF (1994) An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *PNAS* 91, 11133-11137.
- Cohen P, Holmes CF, Tsukitani V (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* 9, 685-689.

- Cohen P (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* 25, 596-601.
- Cohen J, Oren-Young L, Klingmuller R, Neumann D (2004) Protein tyrosine phosphatase 1B participates in down-regulation of erythropoietin receptor signaling. *Biochem. J.* 377, 517-524.
- Conus NM, Hannan KM, Cristiano BE, Hemmings B, Pearson RB (2002) Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the akt protein kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 38021-38028.
- Corbit KC, Foster DA, Rosner MR (1999) Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4209-4218.
- Cordon-Cardo C, Tapley P, Jing S, Nanduri V, O'Rourke E, Lamballe F, Kovary K, Klein R, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M (1991) The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 173-183.
- Crossthwaite A, Hasan S, Williams RJ (2002) Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca(2+) and PI3-kinase. *J. Neurochem.* 80, 24-35.
- Crowder RJ, Freeman RS (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18, 2933-2943.
- Culmsee C, Semkova I, Krieglstein J (1999a) NGF mediates the neuroprotective effect of the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol in vitro and in vivo: evidence from an NGF-antisense study. *Neurochem. Int.* 35, 47-57.
- Culmsee C, Stumm RK, Schaefer MK, Weihe E, Krieglstein J (1999b) Clenbuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes, and protects rat brain tissue against ischemic damage. *Eur. J. Pharmacol.* 379, 33-45.
- Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, Greig NH, Mattson MP (2001) A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* 77, 220-228.
- Culmsee C, Gerling N, Lehmann M, Nikolova-Karakashian M, Prehn JHM, Mattson MP, Krieglstein J (2002) Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor p75. *Neuroscience* 115, 1089-1108.

- Culmsee C, Siewe J, Junker V, Retiounskaia M, Schwarz S, Camadola S, El-Metainy S, Behnke H, Mattson MP, Krieglstein J (2003) Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor-kappaB transcriptional activities determines cell survival or death in neurons. *J. Neurosci.* 23, 8586-8595.
- Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR, Greene LA (1997) Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 10957-10967.
- Cutler NR, Sramek JJ (2001) Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: challenges for drug development. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 25, 27-57.
- Dadke S, Kusari J, Chernoff (2000) Down-regulation of insulin signaling by protein-tyrosine phosphatase 1B is mediated by an N-terminal binding region. *J. Biol. Chem.* 275, 23642-23647.
- Da Penha BM, Berzaghi M, Cooper J, Castren E, Zafra F, Sofroniew M, Thoenen H, Lindholm D (1993) Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *J. Neurosci.* 13, 3818-3826.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905-2927.
- Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell.* 6, 41-51.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351, 95-105.
- Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F (2001) Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 203-236.
- Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* 13, 2651-2661.
- Dawson TM, Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL (1998) Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog. Brain Res.* 118, 3-11.

- Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Denu JM, Lohse DL, Vijayalakshmi J, Saper MA, Dixon JE (1993) Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *PNAS* 93, 2493-2498.
- Denu JM, Stuckey JA, Saper MA, Dixon JE (1996) Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* 87, 361-364.
- DeRubertis FR, Craven PA (1976) Calcium-independent modulation of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation by nitrosamines. *Science* 193, 897-899.
- Desai DM, Sap J, Schlessinger J, Weiss A (1993) Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell* 73, 541-554.
- Descamps S, Toillon R, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, Le Bourhis X, Boilly B, Peyrat JP, Hondermarck H (2001) Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 17864-17780.
- Deshmukh M, Johnson EM jr. (2000) Staurosporine-induced neuronal death: multiple mechanisms and methodological implications. *Cell Death Differ.* 7, 250-261.
- Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM (1997) Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.* 185, 601-607.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
- Dimmeler S, Zeiher AM (1999) Nitric oxide - an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ.* 6, 964-968.
- Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA (1994) Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265, 1596-1599.
- Dolcet X, Egea J, Soler RM, Martin-Zanca D, Comella JX (1999) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *J. Neurochem.* 73, 521-531.
- Donthi RV, Huisamen B, Lochner A (2000) Effect of vanadate and insulin on glucose transport in isolated adult rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 14, 463-470.

- Dudek H, Datta RS, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997) Intrazellulär ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57, 1835-1840.
- Eisenstein TK (2001) Implications of Salmonella-induced nitric oxide (NO) for host defense and vaccines: NO, an antimicrobial, antitumor, immunosuppressive and immunoregulatory molecule. *Microbes. Infect.* 3, 1223-1231.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay M, Kennedy BP (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544-1548.
- Eliasson MJL, Huang Z, Ferrantre Z, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, Moskowitz MA (1999) Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J. Neurosci.* 19, 5910-5918.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Hunag P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *PNAS* 95, 8880-8885.
- English JM, Cobb MH (2002) Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 40-45.
- Eriksdotter Jonhagen M, Nordberg A, Amberla K, Backman L, Ebendal T, Meyerson B, Olson L, Seiger A, Shigeta M, Theodorsson E, Viitanen M, Winblad B, Wahlund LO (1998) Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9, 246-257.
- Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Barbeito L, Radi S, Beckman JS (1998a) Role of endogenous nitric oxide and peroxynitrite formation in the survival and death of motor neurons in culture. *Prog. Brain Res.* 118, 269-280.
- Estevez AG, Spear N, Thompson JA, Cornwell TL, Radi R, Barbeito L, Beckman JS (1998b) Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 18, 3708-3714.
- Etcheverry SB, Cortizo AM (1998) Bioactivity of vanadium compounds on cell in culture. In: O. Nriagu (ed.). *Vanadium in the environment*. John Wiley & Son, New York, 1998, pp 359-394.

- Fantus IG, Deragon G, Lai R, Tang S (1995) Modulation of insulin action by vanadate: evidence of a role for phosphotyrosine phosphatase activity to alter cellular signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 153, 103-112.
- Farinelli SE, Park DS, Greene LA (1996) Nitric oxide delays the death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons by a cGMP-mediated mechanism. *J. Neurosci.* 16, 2325-2334.
- Faure R, Baquiran G, Bergeron JJ, Posner BI (1992) The dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors. Role of endosome-associated phosphotyrosine phosphatase(s). *J. Biol. Chem.* 267, 11215-11221.
- Ferrero R, Rodriguez-Pascual F, Miras-Portugal MT, Torres M (1999) Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: correlation with nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.* 127, 779-787.
- Figiel I, Kaczmarek L (1997) Orthovanadate induces cell death in rat dentate gyrus primary culture. *Neuroreport* 8, 2465-2470.
- Fischer W, Wictorin K, Bjorklund A, Williams AR, Varon S, Gage FH (1987) Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* 329, 65-68.
- Fiscus RR (2002) Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in the regulation of apoptosis and survival in neural cells. *Neurosignals* 11, 175-190.
- Flint AJ, Tiganis T, Barford D, Tonks NK (1997) Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *PNAS* 94, 1680-1685.
- Foehr ED, Lin X, O'Mahony A, Geleziunas R, Bradshaw RA, Greene WC (2000) NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J. Neurosci.* 20, 7556-7563.
- Forstermann U, Closs EI, Pollack JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23, 1121-1131.
- Friedman WJ, Ernfors P, Persson H (1991) Temporal and spatial expression of NGF receptor mRNA during postnatal rat brain development analyzed by in situ hybridization. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 63, 43-51.
- Friedman WJ (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J. Neurosci.* 20, 6340-6346.

- Fujiwara S, Watanabe T, Nagatsu T, Gohda J, Imoto M, Umezawa K (1997) Enhancement or induction of neurite formation by a protein tyrosine phosphates inhibitor, 3,4-dephostatin, in growth factor treated PC12h cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 213-217.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos, Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC (1992) Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 258, 302- 304.
- Gélinas DS, Bernatchez PN, Rollin S, Bazan NG, Sirois M (2002) Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br. J. Pharmacol.* 137, 1021-1030.
- Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L (1995) Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J. Clin. Invest.* 95, 1884-1890.
- Gerling N, Culmsee C, Selke D, Klumpp S, Krieglstein J (2001) Inhibitors of tyrosine-phosphatase mimic NGF-induced neuroprotective signaling downstream TrkA-activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 364 (Suppl.): R28.
- Gerling N, Culmsee C, Umezawa K, Klumpp S, Krieglstein J (2002a) The inhibitor of protein tyrosine phosphatases Et-3,4-dephostatin mimics NGF-induced neuroprotective signaling. 3rd Forum of European Neuroscience, Paris, 13-17 July, 2002.
- Gerling N, Culmsee C, Rupenthal I, Wallbaum T, Klumpp S, Krieglstein J (2002b) Neuroprotection by NO-donors in embryonic hippocampal neurons involves enhanced tyrosine phosphorylation of TrkA. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 335 (Suppl 1):P:P8.
- Gerling N, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J (2003a) The tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate mimics NGF-induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. *Neurochem. Int.* (in press).
- Gerling N, Culmsee C, Umezawa K, Klumpp S, Krieglstein J (2003b) Inhibition of protein tyrosine phosphatases mimics NGF-induced neuroprotective signaling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* Vol. 23 (Suppl. 1) No. 467.
- Gingery A, Bradley E, Shaw A, Oursler MJ (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase coordinately activates the MEK/ERK and AKT/NFkappaB pathways to maintain osteoclast survival. *J. Cell. Biochem.* 89, 165-179.

- Goldfine AB, Simonson DC, Folli F, Patti ME, Kahn CR (1995) Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 3311-3320.
- Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR (1998) Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biochem.* 182, 91-99.
- Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M (2000) Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.* 275, 4283-4289.
- Gomez N, Cohen P (1991) Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* 353, 170-173.
- Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, Kalb RG, Dillman JF, Parada LF, Dawson VL (2000) Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *PNAS* 97, 436-441.
- Goodman Y, Mattson MP (1994) Staurosporine and K-252 compounds protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide toxicity and oxidative injury. *Brain Res.* 650, 170-174.
- Gordon JA (1991) Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Meth. Enzymol.* 201, 477-481.
- Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M (2002) Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21, 1299-1303.
- Gotz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharf M, Thoenen H (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372, 266-269.
- Graham SH, Chen J (2001) Programmed cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 99-109.
- Greene LA, Kaplan DR (1995) Early events in neurotrophin signaling via Trk and p75 receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 579-587.
- Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* 65, 391-426.
- Gross S, Knebel A, Tenev T, Neininger A, Gaestel M, Herrlich P, Boehmer FD (1999) Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274, 26378-26386.

- Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro LJ (1979) Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine. *J. Cyclic. Nucleotide Protein Phosphor. Res.* 5, 211-224.
- Gu M, Lynch J, Brecher P (2000) Nitric oxide increases p21(Waf1/Cip1) expression by a cGMP-dependent pathway that includes activation of extracellular signal-regulated kinase and p70(S6k). *J. Biol. Chem.* 275, 11389-11396.
- Gudi T, Casteel DE, Vinson C, Boss GR, Pilz RB (2000) NO activation of fos promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation. *Oncogene* 19, 6324-6333.
- Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, Heindel M, Clampit JE, Zinker BA, Trevillyan JM, Ulroch RG, Jirousek MR, Rondinone CM (2003) Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. *Diabetes* 52, 21-28.
- Ha KS, Kim KM, Kwon YG, Bai SK, Nam WD, Yoo YM, Kim PKM, Chung HT, Billiar TR, Kim YM (2003) Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation. *FASEB J.* 17, 1036-1047.
- Hagg T, Varon S (1993) Ciliary neurotrophic factor prevnts degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons. *PNAS* 90, 6315-6319.
- Haj FG, Markova B, Klaman LD, Bohmer FD, Neel BG (2003) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Biol. Chem.* 278, 739-744.
- Han BH, Holtzman DM (2000) BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J. Neurosci.* 20, 5775-5781.
- Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD (1994) The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* 13, 187-201.
- Hasegawa Y, Hamada JI, Morioka M, Yano S, Kawano T, Kai Y, Fukunaga K, Ushio Y (2003) Neuroprotective effect of postischemic administration of sodium orthovanadate in rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 1040-1051.
- Hashimoto (1988) K-252a, a potent protein kinase inhibitor, blocks nerve growth factor-induced neurite outgrowth and changes in the phosphorylation of proteins in PC12h cells. *J. Cell. Biol.* 107, 1531-1539.
- Hashimoto S, Hagino A (1989) Blockage of nerve growth factor action in PC12h cells by staurosporine, a potent protein kinase inhibitor. *J. Neurochem.* 53, 1675-1685.

- Hassid A, Yao J, Huang S (1999) NO alters cell shape and motility in aortic smooth muscle cells via protein tyrosine phosphatase 1B activation. *Am. J. Physiol.* 277, 1014-1026.
- He B, Weber GF (2003) Phosphorylation of NF-kappaB proteins by cyclic GMP-dependent kinase. A noncanonical pathway to NF-kappaB activation. *Eur. J. Biochem.* 270, 2174-2185.
- Hefti F, Weiner WJ (1986) Nerve growth factor and Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 20, 275-281.
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350, 678-683.
- Hempstead BL, Rabin SJ, Kaplan L, Reid S, Parada LF, Kaplan DR (1992) Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. *Neuron* 9, 883-896.
- Hempstead BL (2002) The many faces of p75 (NTR). *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 260-267.
- Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wullner U, Klockgether T (1998) Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J. Neurochem.* 71, 88-94.
- Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW (1994) Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 13, 487-494.
- Hindley A, Kolch W (2002) Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J. Cell. Sci.* 115, 1575-1581.
- Hiroki A, Hatakeyama H, Kawakami M, Watanabe T, Takei I, Umezawa K (2002) Antidiabetic effect of a nitrosamine-free dephostatin analogue, methoxime-3,4-dephostatin, in db/db mice. *Biomed Pharmacother* 56, 179-185.
- Ho AK, Hashimoto K, Chik CL (1999) 3',5'-cyclic guanosine monophosphate activates mitogen-activated protein kinase in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* 73, 598-604.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emllet DR, Dieterich R, Wong AJ (1997) Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *PNAS* 94, 12419-12424.
- Honegger A, Dull TJ, Bellot F, Van Obberghen E, Szapary D, Schmidt A, Ullrich A, Schlessinger J (1988a) Biological activities of EGF-receptor mutants with individually altered autophosphorylation sites. *EMBO J.* 7, 3045-3052.

- Honegger A, Dull TJ, Szapary D, Komoriya A, Kris R, Ullrich A, Schlessinger J (1988b) Kinetic parameters of the protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor mutants with individually altered autophosphorylation sites. *EMBO J.* 7, 3053-3060.
- Hood J, Granger HJ (1998) Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 23504-23508.
- Houlgatte R, Mallat M, Brachet P, Prochiantz A (1989) Secretion of nerve growth factor in cultures of glial cells and neurons derived from different regions of the mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 24, 143-152.
- Huang C, Zhang Z, Ding M, Li X, Ye SS, Shen HM, Butterworth L, Lu Y, Costa M, Rojanasakul Y, Castranova V, Vallyathan V, Shi X (2000) Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 32516-32522.
- Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-236.
- Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsaprailis G, Gresser MJ, Ramachandran C (1997) Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* 272, 843-851.
- Ibanez CF, Ebendal T, Barbany G, Murray-Rust J, Blundell TL, Persson H (1992) Disruption of the low affinity receptor-binding site in NGF allows neuronal survival and differentiation by binding to the trk gene product. *Cell* 69, 329-341.
- Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS (1982a) Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim. Biophys. Acta* 718, 49-59.
- Ignarro LJ, Wood K, Wolin MS (1982b) Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *PNAS* 79, 2870-2873.
- Ignarro (1996) Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int. Suppl.* 55, 2-5.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1997) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *PNAS* 84, 9265-9269.
- Imoto M, Kakeya H, Sawa T, Hayashi C, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa K (1993) A novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces*. *J. Antibiot.* 46, 1342-1346.

- Ip NY, Li Y, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1993) Cultured hippocampal neurons show responses to BDNF, NT-3, and NT-4, but not NGF. *J. Neurosci.* 13, 3394-3405.
- Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rudiger HW (2002) Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutat Res.* 519, 25-35.
- Jellinger KA, Stadelmann C (2001) Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 3, 31-40.
- Jia Z, Barford D, Flint AJ, Tonks NK (1995) Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* 268, 1754-1758.
- Jiang G, den Hertog J, Su J, Noel J, Sap J, Hunter T (1999) Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase- α . *Nature* 401, 606-610.
- Jimenez C, Hernandez C, Pimentel B, Carrera A (2002) The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J. Biol. Chem.* 277, 41556-41562.
- Jin YJ, Friedman J, Burakoff SJ (1998) Regulation of tyrosine phosphorylation in isolated T cell membrane by inhibition of protein tyrosine phosphatases. *J. Immunol.* 161, 1743-1750.
- Jin K, Mao XO, Zhu Y, Greenberg DA (2002) MEK and ERK protect hypoxic cortical neurons via phosphorylation of Bad. *J. Neurochem.* 80, 119-125.
- Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992) Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9, 1067-1079.
- Johnson EM, Greenlund LJS, Akins PT, Hsu CY (1995) Neuronal apoptosis: Current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury. *J. Neurotrauma* 12, 843-852.
- Jones RJ, Brunton VG, Brame MC (2000) Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur. J. Cancer* 36, 1595-1606.
- Jongstra-Bilen J, Coblenz L, Shooter EM (1989) The in vitro processing of the NGF precursors by the gamma-subunit of the 7S NGF complex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 5, 159-169.
- Takeya H, Imoto M, Takahashi Y, Naganawa H, Takeuchi T, Umezawa K (1993) Dephostatins, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces*. II. Structure determination. *J. Antibiot.* 46, 1716-1719.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF (1991a) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252, 554-558.

- Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF (1991b) Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350, 158-160.
- Kaplan DR, Stephens RM (1994) Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J. Neurobiol.* 25, 1404-1417.
- Kaplan DR, Miller FD (1997) Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 213-221.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 381-391.
- Kawano T, Fukunaga K, Takeuchi Y, Morioka M, Yano S, Hamada JI, Ushio Y, Miyamoto E (2001) Neuroprotective effect of sodium orthovanadate on delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1268-1280.
- Kawasaki K, Smith RS, Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK (2003) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5726-5737.
- Kenner KA (1996) Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. *J. Biol. Chem.* 271, 19810-19816.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kerr JFR, Harmon BV (1991) Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In: *Apoptosis: The molecular basis of cell death* (Tomei LD and Cope FO, eds.) Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 5-29.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV (1994) Morphological criteria for identifying apoptosis. In: *Cell Biology* (Celis JE, ed.), Academic Press, NY, pp 319-329.
- Kerr JFR, Gobé GC, Winterford CM, Harmon BV (1995) Anatomical methods in cell death. In: *Cell death* (Schwaetz LM and Osborne BA, eds.) NY, Academic Press, pp 1-27.
- Khwaja A (1999) Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 401, 33-34.
- Kim YM, Talanian RV, Billiar TR (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272, 31138-31148.
- Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR (1998) Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 273, 31437-31441.

- Kim YM, Chung HT, Kim SS, Han JA, Yoo YM, Kim KM, Lee GH, Yun HY, Green A, Li J, Simmons RL, Billiar TR (1999) Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling. *J. Neurosci.* 19, 6740-6747.
- Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M (1991a) The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189-197.
- Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M (1991b) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395-403.
- Klesse LJ, Meyers KA, Marshall CJ, Parada LF (1999) Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene* 18, 2055-2068.
- Klesse LJ, Parada LF (1999) Trks: signal transduction and intracellular pathways. *Microsc. Res. Tech.* 45, 210-216.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *PNAS* 86, 5159-5162.
- Koizumi S, Guroff G (1998) K-252a: a specific inhibitor of the action of NGF on PC12 cells. *J. Neurosci.* 8, 715-721.
- Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252.
- Komalavilas P, Shah PK, Jo H, Lincoln TM (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274, 34301-34309.
- Kook H, Itoh H, Choi BS, Sawada N, Doi K, Hwang TJ, Kim KK, Arai H, Baik YH, Nakao K (2003) Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284, 1388-1397.
- Krejsa CM, Nadler SG, Esselstyn JM, Kavanagh TJ, Ledbetter JA, Schieven GL (1997) Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 272, 11541-11549.

- Krieglstein J (1990) In: Hirnleistungstörungen. (Krieglstein J, ed) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, pp. 32, 55-59.
- Krieglstein J, Culmsee C, Zhu Y, Semkova I (1999) Stimulation of β_2 -adrenoceptors induces nerve growth factor and inhibits apoptosis in rat brain after ischemia. In: Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia III. (Ito U et al., eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 77-86.
- Kris RM, Lax I, Gullick W, Waterfield MD, Ullrich A, Fridkin M, Schlessinger J (1985) Antibodies against a synthetic peptide as a probe for the kinase activity of the avian EGF receptor and v-erbB protein. *Cell* 40, 619-625.
- Kroemer (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* 3, 614-620.
- Kuhn W, Mueller T (1995) Exogenous stimulation of NGF synthesis by catecholamines and their analogues. *J. Neural. Transm. Suppl.* 46, 189-192.
- Labarca C, Paigen K (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102, 344-352.
- Lachyankar MB, Condon PJ, Daou MC, De AK, Levine JB, Obermeier A, Ross AH (2003) Novel functional interactions between Trk kinase and p75 neurotrophin receptor in neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 71, 157-172.
- Lad S, Neet KE (2003) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway through p75^{NTR}: a common mechanism for the neurotrophin family. *J. Neurosci. Res.* 73, 614-626.
- Lad S, Peterson DA, Bradshaw RA, Neet KE (2003) Individual and combined effects of TrkA and p75^{NTR} nerve growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 24808-24817.
- Lammers R, Bossenmaier B, Cool DE, Tonks NK, Schlessinger J, Fischer EH, Ullrich A (1993) Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J. Biol. Chem.* 268, 22456-22462.
- Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A (1995a) Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J. Biol. Chem.* 270, 7017-7020.
- Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A (1995b) p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J. Biol. Chem.* 270, 21195-21198.
- Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM (1996) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J. Biol. Chem.* 271, 19705-19709.
- Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA (1997) A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J. Biol. Chem.* 272, 4323-4326.

- Latt SA, Davidson RL, Lin MS, Gerald PS (1974) Lateral asymmetry in the fluorescence of human Y chromosomes stained with 33 258 Hoechst. *Exp. Cell. Res.* 87, 425-429.
- Latt SA, Wohlleb JC (1975) Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 52, 297-316.
- Latt SA, Stetten G (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* 24, 24-33.
- Laufs U, Endres M, Stagliano N, Amin-Hanjani S, Chui DS, Yang SX, Simoncini T, Yamada M, Rabkin E, Allen PG, Huang PL, Bohm M, Schoen FJ, Moskowitz MA, Liao JK (2000a) Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J. Clin. Invest.* 106, 15-24.
- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2000b) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31, 2442-2449.
- Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M (2002) Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res.* 942, 23-30.
- Lazarovici P, Matsuda Y, Kaplan D, Guroff G (1997a) The protein kinase inhibitors K-252a and staurosporine as modifiers of neurotrophin receptor signal transduction. In: *Cellular and Molecular Mechanisms of Toxin Action* (Gutman Y and Lazarovici P, eds.) Harwood Academic Publishers GmbH, Amsterdam, pp 69-93.
- Lazarovici P, Oshima M, Shavit D, Shibutani M, Jiang H, Monshipouri M, Fink D, Movsesyan V, Guroff G (1997b) Down-regulation of epidermal growth factor receptors by nerve growth factor in PC12 cells is p140(trk)-, Ras-, and Src-dependent. *J. Biol. Chem.* 272, 11026-11034.
- Lee KV, Davies AM, Jaenisch R (1994) p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development* 120, 1027-1033.
- Lee TH, Kato H, Chen ST, Kogure K, Itovama Y (1998a) Expression of the nerve growth factor and trka after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29, 1687-1696.
- Lee TH, Kato H, Pan LH, Ryu JH, Kogure K, Itoyama Y (1998b) Localization of nerve growth factor, trkA and P75 immunoreactivity in the hippocampal formation and basal forebrain of adult rats. *Neuroscience* 83, 335-349.

- Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV (2001) The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr. Opin Neurobiol.* 11, 281-286.
- Lee SB, Rhee SG (1995) Significance of PIP₂ hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 183-189.
- Leis JF, Kaplan NO (1982) An acid phosphatase in the plasma membranes of human astrocytoma showing marked specificity toward phosphotyrosine protein. *PNAS* 79, 6507-6511.
- Leist M, Single B, Castoldi F, Kühnle S, Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185, 1481-1486.
- Leoni C, Valtorta F (2002) Constitutive TrkA activity in receptor-overexpressing PC12 clones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 972-978.
- Lewin GR, Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 289-317.
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1964) Hormonal control of the NGF content in the submaxillary glands of mice. *Int. Ser. Monogr. Oral Biol.* 21, 129-141.
- Levi-Montalcini (1965) Growth regulation of sympathetic nerve cells. *Arch. Ital. Biol.* 103, 832-846.
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1968) Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 48, 534-569.
- Levi-Montalcini (1987) Nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1161.
- Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM (1997) Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 240, 419-424.
- Li L, Dixon JE (2000) Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Sem. Immunol.* 12, 75-84.
- Li S, Whorton AR (2003) Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B in intact cells by S-nitrosothiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 410, 269-279.
- Lindholm D, Castren E, Hengerer B, Zafra F, Berninger B, Thoenen H (1992) Differential Regulation of Nerve Growth Factor (NGF) Synthesis in Neurons and Astrocytes by Glucocorticoid Hormones. *Eur. J. Neurosci.* 4, 404-410.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632.

- Liu G (2003) Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition: opportunities and challenges. *Curr. Med. Chem.* 10, 1241-1253.
- Liu F, Chernoff J (1997) Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* 327, 139-145.
- Loeb DM, Greene LA (1993) Transfection with trk restores "slow" NGF binding, efficient NGF uptake, and multiple NGF responses to NGF-nonresponsive PC12 cell mutants. *J. Neurosci.* 13, 2919-2929.
- Lu L, Bonham CA, Chambers FG, Watkins SC, Hoffman RA, Simmons RL, Thomson AW (1996) Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J. Immunol.* 157, 3577-3586.
- Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD (1999) Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J. Neurosci.* 19, 10250-10261.
- Lu X, Maysinger D, Hagg T (2002) Tyrosine phosphatase inhibition enhances neurotrophin potency and rescues nigrostriatal neurons in adult rats. *Exp. Neurol.* 178, 259-267.
- Lucas HJ, Kennedy ER, Formo MW (1995) Iodosobenzene. *Org. Synth. Coll. Vol.* 3, 483-485.
- Maggirwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, Freeman RS (1998) Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18, 10356-10365.
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL (1994) High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 6884-6891.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth Me, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5, 501-509.
- Majeti R, Bilwes AM, Noel JP, Hunter T, Weiss A (1998) Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science* 279, 88-91.
- Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3-15.

- Malamas MS, Sredy J, Moxham C, Katz A, Xu W, McDevitt R, Adebayo FO, Sawicki DR, Seesteller L, Sullivan D, Taylor JR (2000) Novel benzofuran and benzothiophene biphenyls as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B with antihyperglycemic properties. *J. Med. Chem.* 43, 1293-1310.
- Mamidipudi V, Li X, Wooten MV (2002) Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* 277, 28010-28018.
- Marais R, Light Y, Mason C, Paterson H, Olson MF, Marshall CJ (1998) Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* 280, 109-112.
- Maroney AC, Lipfert L, Forbes ME, Glicksman MA, Neff NT, Siman R, Dionne CA (1995) K-252a induces tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase and neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 64, 540-549.
- Marte BM, Downward J (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide-3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 22, 355-358.
- Martin LJ (2001) Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury. *Int. J. Mol. Med.* 7, 455-478.
- Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M (1986) A human oncogene formed by fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319, 743-748.
- Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M (1989) Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 24-33.
- Martinou JC (1994) Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13, 1017-1030.
- Masters JN, Finch CE, Sapolsky RM (1989) Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons does not involve deoxyribonucleic acid cleavage. *Endocrinology* 124, 3083-3088.
- Mattson MP, Zhang Y, Bose S (1993) Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. *Exp. Neurol.* 121, 1-13.
- Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 65, 1740-1751.
- Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S (2000) Roles of nuclear factor kappa B in neuronal survival and plasticity. *J. Neurochem.* 74, 443-456.

- Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 120-129.
- Mattson MP, Duan W, Pedersen WA, Culmsee C (2001) Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis* 6, 69-81.
- Mazzoni IE, Said FA, Aloyz R, Miller FD, Kaplan D (1999) Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J. Neurosci.* 19, 9716-9727.
- Mauro LJ, Dixon JE (1994) 'Zip codes' direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular 'address'. *Trends Biochem. Sci.* 19, 151-155.
- Meakin SO, Shooter EM (1992) The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* 15, 323-331.
- Meakin SO, Suter U, Drinkwater CC, Welcher AA, Shooter EM (1992) The rat trk protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor. *PNAS* 89, 2374-2378.
- Messmer UK, Bruene B (1996) Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signaling pathways. *Biochem. J.* 319, 299-305.
- Miller FD, Kaplan DR (2001) Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1045-1053.
- Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schwenker M (2002) Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J. Biol. Chem.* 277, 31099-31106.
- Moller NP, Iversen LF, Andersen HS, McCormack JG (2000) Protein tyrosine phosphatases as drug targets: inhibitors of PTP-1B for the treatment of diabetes. *Curr. Opin. Drug Discovery* 3, 527-540.
- Monastyrskaja E, Folarin N, Malyshev I, Green C, Andreeva L (2002) Application of the nitric oxide donor SNAP to cardiomyocytes in culture provides protection against oxidative stress. *Nitric Oxide* 7, 127-131.
- Monteiro HP, Gruija-Gray J, Peranovich TM, de Oliveira LC, Stern A (2000) Nitric oxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, Src kinase, and mitogen-activated protein kinases in murine fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 174-182.
- Monteiro HP (2002) Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 765-773.

- Morishita T, Tsutsui M, Shimokawa H, Horiuchi M, Tanimoto A, Suda O, Tasaki H, Huang PL, Sasaguri Y, Yanagihara N, Nakashima Y (2002) Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase. *FASEB J.* 16, 1994-1996.
- Moriya R, Uehara T, Nomura Y (2000) Mechanism of nitric oxide-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett.* 484, 253-260.
- Muroya K, Hashimoto Y, Hattori S, Nakamura S (1992) Specific inhibition of NGF receptor tyrosine kinase activity by K-252a. *Biochim. Biophys. Acta.* 1135, 353-356.
- Mustelin T, Feng GS, Bottini N, Alonso A, Kholod N, Birle D, Merlo J, Huynh H (2002) Protein tyrosine phosphatases. *Front. Biosci.* 7, 85-142.
- Nara K, Konno D, Uchida J, Kiuchi Y, Oguchi K (1999) Protective effect of nitric oxide against iron-induced neuronal damage. *J. Neural. Transm.* 106, 835-848.
- Nathan C, Shiloh MU (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *PNAS* 97, 8841-8848.
- Neel BG, Tonks NK, (1997) Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 193-204.
- Nicole O, Ali C, Docagne F, Plawinski L, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* 21, 3024-3033.
- Nicotera P, Leist M, Manzo L (1999) Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 46-51.
- Nilsson AS, Fainzilber M, Falck P, Ibanez CF (1998) Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.* 424, 285-290.
- Nobes CD, Reppas JB, Markus A, Tolkovsky AM (1996) Active p21Ras is sufficient for rescue of NGF-dependent rat sympathetic neurons. *Neuroscience* 70, 1067-1079.
- Nolan B, Collette H, Baker S, Duffy A, De M, Miller C, Bankey P (2000) Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NFkappabeta dependent. *J. Trauma* 48, 599-604.
- Nussbaum RL, Ellis CE (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *New Engl. J. Med.* 348, 1356-1364.
- Obermeier A, Halfter H, Wiesmueller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993a) Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J.* 12, 933-941.

- Obermeier A, Lammers R, Wiesmueller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993b) Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J. Biol. Chem.* 268, 22963-22966.
- Obermeier A, Bradshaw RA, Seedorf K, Choidas A, Schlessinger J, Ullrich A (1994) Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J.* 13, 1585-1590.
- Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki Z, Tanaka K, Masuyama N, Gotoh Y (2002) Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J. Biol. Chem.* 277, 21843-21850.
- Ohmichi M, Decker SJ, Pang L, Saltiel AR (1991) Nerve growth factor binds to the 140 kd trk proto-oncogene product and stimulates its association with the src homology domain of phospholipase C gamma 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 217-223.
- Ohmichi M, Decker SJ, Pang L, Saltiel AR (1992) Inhibition of the cellular actions of nerve growth factor by staurosporine and K252A results from the attenuation of the activity of the trk tyrosine kinase. *Biochemistry* 31, 4034-4039.
- Oliveira CJ, Schindler F, Ventura AM, Morais MS, Arai RJ, Debbas V, Stern A, Monteiro HP (2003) Nitric oxide and cGMP activate the RAS-MAP kinase pathway –stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* 35, 381-396.
- Ostman A, Boehmer FD (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol.* 11, 258-266.
- Ostrowski J, Woszczyński M, Kowalczyk P, Trzeciak L, Hennig E, Bomsztyk K (2000) Treatment of mice with EGF and orthovanadate activates cytoplasmic and nuclear MAPK, p70S6k, and p90rsk in the liver. *J. Hepatol.* 32, 965-974.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB (1999) NF-kappa B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-85.
- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I (1998) Inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A differentially regulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat astrocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* 273, 12219-12226.
- Palacios M, Knowles RG, Palmer RM, Moncada S (1989) Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 802-809.

- Palmer AM (2002) Pharmacotherapy for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 426-433.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
- Palmer RM, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666.
- Palmer RM, Moncada S (1989) A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 348-352.
- Pannifer AD, Flint AJ, Tonks NK, Barford D (1998) Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* 273, 10454-10462.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 272-280.
- Peles E, Schlessinger J, Grumet M (1998) Multi-ligand interactions with receptor-like protein tyrosine phosphatase beta: implications for intercellular signaling. *Trends Biochem. Sci.* 23, 121-124.
- Peranovich TM, da Silva AM, Fries DM, Stern A, Monteiro HP (1995) Nitric oxide stimulates tyrosine phosphorylation in murine fibroblasts in the absence and presence of epidermal growth factor. *Biochem. J.* 305, 613-619.
- Perez-Polo JR, de Jong WW, Straus D, Shooter EM (1972) The physical and biological properties of 7S and beta-NGF from the mouse submaxillary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 32, 91-97.
- Perez-Polo JR, Foreman PJ, Jackson GR, Sham D, Tagliatela G, Thorpe LW, Werrbach-Perez K (1990) Nerve growth factor and neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* 4, 57-91.
- Perkinton MS, Ip JK, Wood GL, Crossthwaite AJ, Williams RJ (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurons. *J. Neurochem.* 80, 239-254.
- Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Chaudry V, Flexner C, Wachsman M, Sinicropi, Burton LE, Peroutka SJ (1994) The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann. Neurol.* 36, 244-246.
- Philpott KL, McCarthy MJ, Klippel A, Rubin LL (1997) Activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase promote survival of superior cervical neurons. *J. Cell. Biol.* 139, 809-815.

- Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qui J, Chiarugi A, Thomas SS, Kohane DS, Korsmeyer SJ, Moskowitz MA (2002) BID mediates neuronal cell death after oxygen/glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *PNAS* 98, 15318-15323.
- Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *PNAS* 88, 10480-10484.
- Prast H, Philippu A (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64, 51-68.
- Prehn JH, Jordon J, Ghadge GD, Preis E, Galindo MF, Roos RP, Kriegstein J, Miller RJ (1997) Ca²⁺ and reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* 68, 1679-1685.
- Pulido R, Zuniga A, Ullrich A (1998) PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J.* 17, 7337-7350.
- Putchu GV, Deshmukh M, Johnson EM (1999) Bax translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, Bcl-2, and caspases. *J. Neurosci.* 19, 7476-7485.
- Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Butler CM, Butcher LL, Bredesen DE (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261, 345-348.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *PNAS* 87, 5193-5197.
- Raffioni S, Bradshaw RA (1995) Staurosporine causes epidermal growth factor to induce differentiation in PC12 cells via receptor up-regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 7568-7572.
- Raoul C, Pettmann B, Henderson CE (2000) Active killing of neurons during development and following stress: a role for p75(NTR) and Fas? *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 111-117.
- Rauhala P, Andoh , Yeh K, Chiueh CC (2002) Contradictory effects of sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpenicillamine on oxidative stress in brain dopamine neurons in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962, 60-72.
- Ravati A., Junker V, Kouklei M, Ahlemeyer B, Culmsee C, Kieglstein J (1999) Enalapril and moexipril protect from free radical-induced neuronal damage in vitro and reduce ischemic brain injury in mice and rats. *Eur. J. Pharmacol.* 373, 21-33.
- Reed JC (2002) Apoptosis-based therapies. *Nature Rev. Drug Discov.* 1, 111-121.

- Reusch HP, Zimmermann S, Schaefer M, Paul M, Moelling K (2001) Regulation of Raf by Akt controls growth and differentiation in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276, 33630-33637.
- Rijksen G, Voller MC, Van Zoelen EJ (1993) Orthovanadate both mimics and antagonizes the transforming growth factor beta action on normal rat kidney cells. *J. Cell. Physiol.* 154, 393-401.
- Roback JD, Large TH, Otten U, Wainer BH (1990) Nerve growth factor expression in the developing hippocampus isolated in vitro. *Dev. Biol.* 137, 451-455.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Downward J, (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 508-509.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.* 15, 2442-2451.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89, 457-467.
- Rogers MV, Buensuceso C, Montague F, Mahadevan L (1994) Vanadate stimulate differentiation and neurite outgrowth in rat phaeochromocytoma PC12 cells and neurite extension in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci.* 60, 479-494.
- Romashkova JA, Makarov SS (1999) NF-kappa B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* 401, 86-90.
- Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossmann R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286, 1738-1741.
- Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A, Dimmeler S (1999) Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 6823-6826.
- Roth KA (2001) Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. *J Neuropath. Exp. Neurol.* 60, 829-838.
- Roux PP, Bhakar AL, Kennedy TE, Barker PA (2001) The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 23097-23104.

- Roux PP, Dorval G, Boudreau M, Angers-Loustau A, Morris SJ, Makkerh J, Barker PA (2002) K252a and CEP1347 are neuroprotective compounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK. *J. Biol. Chem.* 277, 49473-49480.
- Ruano MJ, Hernandez-Hernando S, Jimenez A, Estrada C, Villalobo A (2003) Nitric oxide-induced epidermal growth factor-dependent phosphorylations in A431 tumour cells. *Eur. J. Biochem.* 270, 1828-1837.
- Saeki M, Maeda S, Kamisaki Y (2002) Vanadate protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against peroxynitrite-induced cell death. *J. Cell. Biochem.* 85, 721-727.
- Salice VC, Cortizo AM, Gomez Dumm CL, Etcheverry SB (1999) Tyrosine phosphorylation and morphological induced by four vanadium compounds on MC3T3E1 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 198, 119-128.
- Salvemini D, de Nucci G, Gryglewski RJ, Vane JR (1989) Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *PNAS* 86, 6328-6332.
- Sanders KM, Ward SM (1992) Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am. J. Physiol.* 262, 379-392.
- Sandra F, Matsuki NA, Takeuchi H, Ikebe T, Kanematsu T, Ohishi M, Hirata M (2002) TNF inhibited the apoptosis by activation of Akt serine/threonine kinase in the human head and neck squamous cell carcinoma. *Cell. Signal.* 14, 771-778.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Freisen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-1687.
- Schaeffer HJ, Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2435-2444.
- Schlessinger (1988) Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* 13, 443-447.
- Schlessinger J, Ullrich A (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212.
- Schulz JB, Matthews RT, Beal MF (1995) Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 8, 480-486.
- Schwab ME, Otten U, Agid Y, Thoenen H (1979) Nerve growth factor (NGF) in the rat CNS: absence of specific retrograde axonal transport and tyrosine hydroxylase induction in locus coeruleus and substantia nigra. *Brain Res.* 168, 473-483.

- Seely L, Staubs PA, Reichart DR, Berhanu P, Milarski KL, Saltiel AR, Kusari J, Olefsky JM (1996) Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes* 45, 1379-1385.
- Segal RA, Bhattacharyya A, Rua LA, Alberta JA, Stephens RM, Kaplan DR, Stiles CD (1996) Differential utilization of Trk autophosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 271, 20175-20181.
- Seiger A, Nordberg A, von Holst A, Backman L, Ebendal T, Alafuzoff I, Amberla K, Hartvig P, Herlitz A, Lilja A (1993) Intracranial infusion of purified nerve growth factor to an Alzheimer patient: the first attempt of a possible future treatment strategy. *Behav. Brain Res.* 57, 255-261.
- Seiler M, Schwab ME (1983) Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. *Brain Res.* 300, 33-39.
- Semkova I, Schilling M, Henrich-Noack P, Rami A, Krieglstein J (1996a) Clenbuterol protects mouse cerebral cortex and rat hippocampus from ischemic damage and attenuates glutamate neurotoxicity in cultured hippocampal neurons by induction of NGF. *Brain Res.* 717, 44-54.
- Semkova I, Wolz P, Schilling M, Krieglstein J (1996b) Selegiline enhances NGF synthesis and protects central nervous system neurons from excitotoxic and ischemic damage. *Eur. J. Pharmacol.* 315, 19-30.
- Semkova I, Haberlein C, Krieglstein J (1999) Ciliary neurotrophic factor protects hippocampal neurons from excitotoxic damage. *Neurochem. Int.* 35, 1-10.
- Semkova I, Krieglstein J (1999a) Ciliary neurotrophic factor enhances the expression of NGF and p75 low-affinity NGF receptor in astrocytes. *Brain Res.* 838, 184-192.
- Semkova I, Krieglstein J (1999b) Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30, 176-188.
- Shechter Y (1990) Insulin-mimetic effect of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes. *Diabetes* 39, 1-5.
- Shen K, Keng YF, Wu L, Guo XL, Lawrence DS, Zhang ZY (2001) Acquisition of a specific and potent PTP1B inhibitor from a novel combinatorial library and screening procedure. *J. Biol. Chem.* 276, 47311-47319.
- Shi YF, Szalay MG, Paskar L, Sahai BM, Boyer M, Singh B, Green DR (1990) Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J. Immunol.* 144, 3326-3333.

- Shifrin VI, Davis RJ, Neel BG (1997) Phosphorylation of protein-tyrosine phosphatase PTP-1B on identical sites suggests activation of a common signaling pathway during mitosis and stress response in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272, 2957-2962.
- Simpson CS, Morris BJ (1999) Activation of nuclear factor kappaB by nitric oxide in rat striatal neurones: differential inhibition of the p50 and p65 subunits by dexamethasone. *J. Neurochem.* 73, 353-361.
- Singh S, Darnay BG, Aggarwal BB (1996) Site-specific tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha negatively regulates its inducible phosphorylation and degradation. *J. Biol. Chem.* 271, 31049-31054.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1217-1281.
- Soltoff SP, Rabin SL, Cantley LC, Kaplan DR (1992) Nerve growth factor promotes the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and its association with the trk tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 17472-17477.
- Sreejayan N, Lin Y, Hassid A (2002) NO attenuates insulin signaling and motility in aortic smooth muscle cells via protein tyrosine phosphatase 1B-mediated mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1086-1092.
- Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR (1994) Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 12, 691-705.
- Stern A, Yin X, Tsang SS, Davison A, Moon T (1993) Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochem. Cell. Biol.* 71, 103-112.
- Stewart VC, Heales JR (2003) Nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Rad. Biol. Med.* 34, 287-303.
- Stone RL, Dixon JE (1994) Protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 268, 31323-31326.
- Stone JR, Sands RH, Dunham WR, Marletta MA (1996) Spectral and ligand-binding properties of an unusual hemoprotein, the ferric form of soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 35, 3258-3262.
- Sugawa M, Tamura K, Koide T, Naitoh S (1993) Functional roles of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate analogue in cerebral vasodilation. *Gen. Pharmacol.* 24, 577-584.
- Sugimoto K, Iadecola C (2002) Effects of aminoguanidine on cerebral ischemia in mice: comparison between mice with and without inducible nitric oxide synthase gene. *Neurosci. Lett.* 331, 25-28.

- Sun JP, Fedorov AA, Lee SY, Guo XL, Shen K, Lawrence DS, Almo SC, Zhang ZY (2003) Crystal structure of PTP 1B complexed with a potent and selective bidentate inhibitor. *J. Biol. Chem.* 278, 12406-12414.
- Suzuki T, Hiroki A, Watanabe T, Yamashita T, Takei I, Umezawa K (2001) Potentiation of insulin-related signal transduction by a novel protein-tyrosine-phosphatase inhibitor, Et-3,4 dephostatin, on cultured 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 27511-27518.
- Swarup G, Cohen S, Garbers DL (1992) Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1104-1109.
- Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76, 1-10.
- Takakura K, Beckman JS, MacMillan-Crow LA, Crow JP (1999) Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 197-207.
- Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T, Tohyama M (1999) Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 274, 8531-8538.
- Tapley P, Lamballe F, Barbacid M (1992) K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7, 371-381.
- Tarrega C, Blanco-Aparicio C, Munoz JJ, Pulido R (2002) Two clusters of residues at the docking groove of mitogen-activated protein kinases differentially mediate their functional interaction with the tyrosine phosphatases PTP-SL and STEP. *J. Biol. Chem.* 277, 2629-2636.
- Tejedo RJ, Ramirez R, Cahuana GM, Rincón P, Sobrino F, Bedoya FJ (2001) Evidence for involvement of c-Src in the anti-apoptotic action of nitric oxide in serum-deprived RINm5F cells. *Cell. Signal.* 13, 809-817.
- Thippeswamy T, Morris R (1997) Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated neuroprotection by nitric oxide in dissociated cultures of rat dorsal root ganglion neurones. *Brain Res.* 774, 116-122.
- Thippeswamy T, McLay JS, Morris R (2001) Bax and caspases are inhibited by endogenous nitric oxide in dorsal root ganglion neurons in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1229-1236.
- Thoenen H, Sendtner M (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nature Neurosci.* 5, 1046-1050.

- Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH (1988a) Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* 263, 6722-6730.
- Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH (1988b) Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* 263, 6731-6737.
- Tonks NK, Neel BG (2001) Combinatorial control the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 182-195.
- Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ (2002) Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J. Biol. Chem.* 277, 34295-34302.
- Uchida T (1994) Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J. Biol. Chem.* 269, 12220-12228.
- Uchiyama T, Otani H, Okada T, Ninomiya H, Kido M, Imamura H, Nogi S, Kobayashi (2002) Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1049-1061.
- Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212.
- Umezawa (1997) Induction of cellular differentiation and apoptosis by signal transduction inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 37, 393-401.
- Umezawa K, Kawakami M, Watanabe T (2003) Molecular design and biological activities of protein-tyrosine phosphatase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 99, 15-24.
- Van der Geer P, Wiley S, Lai VK, Olivier JP, Gish GD, Stephens R, Kaplan D, Shoelson S, Pawson T (1995) Identification of residues that control specific binding of the Shc phosphotyrosine-binding domain to phosphotyrosine sites. *PNAS* 93, 963-968.
- Van Vector D (1998) Protein tyrosine phosphatases in the developing system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 174-181.
- Van Vector D, O'Reilly AM, Neel BG (1998) Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 8, 112-126.
- Verdi JM, Birren SJ, Ibanez CF, Persson H, Kaplan DR, Benedetti M, Chao MV, Anderson DJ (1994) p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* 12, 733-745.
- Vetter ML, Martin-Zanca D, Parada LF, Bishop JM, Kaplan DR (1991) Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *PNAS* 88, 5650-5654.

- Vetter SW, Keng YF, Lawrence DS, Zhang ZY (2000) Assessment of protein-tyrosine phosphatase 1B substrate specificity using "inverse alanine scanning". *J. Biol. Chem.* 275, 2265-2268.
- Vidwans AS, Kim S, Coffin DO, Wink DA, Hewett SJ (1999) Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murine mixed cortical cell culture. *J. Neurochem.* 72, 1843-1852.
- Virchow R (1853) Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaktion der Glukose. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 6, 135-138.
- Von Gise A, Lorenz P, Wellbrock C, Hemmings B, Berberich-Siebelt F, Rapp UR, Troppmair J (2001) Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signals. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2324-2336.
- Wall ME, Francis SH, Corbin JD, Grimes K, Richie-Jannetta R, Kotera J, MacDonald BA, Gibson RR, Trewhella J (2003) Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase. *PNAS* 100, 2380-2385.
- Wang JY, Shum AY, Ho YJ, Wang JY (2003) Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons: synergistic effects of H₂O₂ and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *J. Neurosci. Res.* 72, 508-519.
- Wang X, Robinson PJ (1995) Cyclic GMP-dependent protein kinase substrates in rat brain. *J. Neurochem.* 65, 595-604.
- Wang X, Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J. Neurochem.* 68, 443-456.
- Ward SM, Dalziel HH, Bradley ME, Buxton IL, Keef K, Westfall DP, Sanders KM (1992) Involvement of cyclic GMP in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in dog proximal colon. *Br. J. Pharmacol.* 107, 1075-1082.
- Watanabe T, Takeuchi T, Otsuka M, Umezawa K (1994) Total synthesis of dephostatin, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994, 437-438.
- Watanabe T, Takeuchi T, Otsuka M, Tanaka S, Umezawa K (1995) Synthesis and protein tyrosine phosphatase inhibitory activity of dephostatin analogs. *J. Antibiot.* 48, 1460-1466.
- Watanabe T, Suzuki T, Umezawa Y, Takeuchi T, Otsuka M, Umezawa K (2000) Structure-activity relationship and rational design of 3,4-dephostatin derivatives as protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Tetrahedron* 56, 741-752.

- Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS (2002) Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 β and p53 after DNA damage. *PNAS* 99, 7951-7955.
- Watcharasit P, Bijur GN, Song L, Zhu J, Chen X, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3 β (Gsk3 β) binds to, and promotes the activation. *J. Biol. Chem.* 278, 48872-48879.
- Watson FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, Stiles CD, Segal RA (1999) TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J. Neurobiol.* 39, 323-336.
- Wenzel U, Kuntz S, De Sousa UJ, Daniel H (2003) Nitric oxide suppresses apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Int. J. Cancer* 106, 666-675.
- Weskamp G, Reichardt LF (1991) Evidence that biological activity of NGF is mediated through a novel subclass of high affinity receptors. *Neuron* 6, 649-663.
- White FA, Keller-Peck CR, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Snider WD (1998) Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice. *J. Neurosci.* 18, 1428-1439.
- Whittemore SR, Friedman PL, Larhammer D, Persson H, Gonzalez-Carvajal M, Holets VR (1988) Rat beta-nerve growth factor sequence and site of synthesis in the adult hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 20, 403-410.
- Wiesmann C, de Vos AM (2001) Nerve growth factor: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 748-759.
- Wilmot MR, Bath PMW (2003) The potential of nitric oxide therapeutics in stroke. *Expert Opin. Investig. Drugs* 12, 455-470.
- Wolin MS, Wood K, Ignarro LJ (1982) Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme. *J. Biol. Chem.* 257, 13312-13320.
- Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaya M, Hanafusa H, Choi Y (1999) TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol. Cell* 4, 1041-1049.
- Wong JM, Billiar TR (1995) Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv. Pharmacol.* 34, 155-170.
- Wrobel J, Sredy J, Moxham C, Dietrich A, Li Z, Sawicki DR, Seestaller L, Wu L, Katz A, Sullivan D, Tio C, Zhang ZY (1999) PTP1B inhibition and antihyperglycemic activity in the ob/ob mouse model of novel 11-arylbenzo[*b*]naphtho[2,3-*d*]furans and 11-arylbenzo[*b*]naphtho[2,3-*d*]thiophens. *J. Med. Chem.* 42, 3199-3202.

- Wu YY, Bradshaw RA (1993) Effect of nerve growth factor and fibroblast growth factor on PC12 cells: inhibition by orthovanadate. *J. Cell Biol* 121, 409-422.
- Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL (1998) The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *PNAS* 95, 15587-15591.
- Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Wyllie AH, Kerr JFK, Currie AR (1980) Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rec. Cytol.* 68, 251-306.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
- Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M (2001) Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J. Biol. Chem.* 276, 5256-5264.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
- Yao R, Cooper GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267, 2003-2006.
- Yart A, Laffargue M, Mayeux P, Chretien S, Peres C, Tonks N, Roche S, Payrastre B, Chap H, Raynal P (2001) A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 276, 8856-8864.
- York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ (2000) Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8069-8083.
- Yu L, McGill A, Ramirez J, Wang PG, Zhang ZY (1995) Synthesis and bioassay of a protein tyrosine phosphatase inhibitor, dephostatin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 1003-1006.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-809.
- Yun H, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL, Dawson TM (1998) Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate receptor-induced activation of p21ras. *PNAS* 95, 5773-5778.
- Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ (1997) BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* 272, 24101-24104.

- Zhang ZY (1997) Structure, mechanisms, and specificity of protein-tyrosine phosphatases. *Curr. Top. Cell Regul.* 35, 21-68.
- Zhang YZ, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (2000) Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalised receptors regulate NGF-induced differentiation. *J. Neurosci.* 20, 5671-5678.
- Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP (1993) Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 378-388.
- Zheng XM, Wang Y, Pallen CJ (1992) Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 359, 336-339.
- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC (2002) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 3, 973-982.
- Zhu Y, Culmsee C, Semkova I, Krieglstein J (1998) Stimulation of beta2-adrenoceptors inhibits apoptosis in rat brain after transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 1032-1039.
- Zhu Y, Krieglstein J (1999) β_2 -Adrenoceptor agonist clenbuterol causes NGF expression and neuroprotection. *CNS Drug Rev.* 5, 347-364.
- Zhu Y, Prehn JH, Culmsee C, Krieglstein J (1999) The beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol modulates Bcl-2, Bcl-xl and Bax protein expression following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* 90, 1255-1263.
- Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J (2002) Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J. Neurosci.* 22, 3898-3909.
- Zhu Y, Krieglstein J (2003) Neuroprotection by drug-induced growth factors. *Int. Congr. Ser.* 1252, 235-246.
- Zimmermann S, Moelling K (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286, 1741-1744.
- Zipser Y, Kosower NS (1996) Phosphotyrosine phosphatase associated with band 3 protein in the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.* 314, 881-887.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549-11556.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

- 1.1 Interaktionen der Neurotrophine mit ihren Rezeptoren
- 1.2 Mechanismen der TrkA-vermittelten Neuroprotektion in hippocampalen Neuronen

- 2.1 Strukturformel von Staurosporin
- 2.2 Strukturformel von NMDA
- 2.3 Strukturformel des Kernfarbstoffs Hoechst 33258
- 2.4 Kerne lebender und apoptotischer Zellen nach Hoechstfärbung

- 3.1 Konzentrationsabhängige Hemmung der PTP-Aktivität durch Natriumorthovanadat
- 3.2 Transiente Phosphorylierung von Tyrosinresten nach Orthovanadatbehandlung
- 3.3 Transiente TrkA-Phosphorylierung in PC12-Zellen nach Orthovanadatbehandlung
- 3.4 Überprüfung der Spezifität des monoklonalen phospho-TrkA-Antikörpers
- 3.5 Transiente TrkA-Phosphorylierung in hippocampalen Rattenzellen nach Orthovanadatbehandlung
- 3.6 Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA durch Orthovanadat
- 3.7 Keine Veränderung der TrkA-Phosphorylierung nach Okadainsäurebehandlung
- 3.8 Orthovanadat schützt konzentrationsabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose
- 3.9 Orthovanadat schützt konzentrationsabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose in B27-Supplement freiem Neurobasalmedium
- 3.10 Orthovanadat schützt konzentrationsabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose in Locke's Lösung
- 3.11 Orthovanadat schützt zeitabhängig hippocampale Neurone vor Staurosporin-induzierter Apoptose
- 3.12 Aufheben der NGF-induzierten Neuroprotektion durch NGF-Antikörper
- 3.13 Orthovanadat-induzierte Neuroprotektion in Abwesenheit von NGF
- 3.14 Orthovanadat-induzierte TrkA-Phosphorylierung in Abwesenheit von NGF
- 3.15 Orthovanadat-induzierte Neuroprotektion in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren

- 3.16 Der Tyrosinkinase-Inhibitor K-252a hebt Orthovanadat-induzierte Neuroprotektion nicht auf
- 3.17 Transiente Akt-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Orthovanadat
- 3.18 Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin hemmt die Orthovanadat-induzierte Akt-Phosphorylierung
- 3.19 Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin hemmt die neuroprotektive Wirkung von Orthovanadat
- 3.20 Transiente Phosphorylierung von Erk1/2 in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Orthovanadat
- 3.21 Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die Orthovanadat-induzierte Erk1- und Erk2-Phosphorylierung
- 3.22 Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die neuroprotektive Wirkung von Orthovanadat
- 3.23 Strukturformeln von Compound 1 und Compound 2
- 3.24 Compound 2 beeinflusst die TrkA-Dephosphorylierung
- 3.25 Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration
- 3.26 Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors in Abhängigkeit von der Inkubationszeit
- 3.27 Dephosphorylierung des TrkA-Rezeptors in Abhängigkeit von der PTP-1B Proteinkonzentration
- 3.28 Ethyl-3,4-dephostatin schützt konzentrationsabhängig vor Staurosporin-induzierter Apoptose
- 3.29 Ethyl-3,4-dephostatin schützt hippocampale Neurone vor NMDA-induzierter Apoptose in Locke's-Lösung
- 3.30 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin schützt konzentrationsabhängig vor Staurosporin-induzierter Apoptose
- 3.31 Methoxim-3,4-dephostatin schützt nicht vor Staurosporin-induzierter Apoptose
- 3.32 Methoxim-3,4-dephostatin schützt nicht vor NMDA-induzierter Apoptose
- 3.33 Strukturformel von Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.34 NO-Freisetzung durch Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.35 Strukturformel von 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.36 NO-Freisetzung durch 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin und Methoxim-3,4-dephostatin
- 3.37 Strukturformel von Methoxim-3,4-dephostatin

- 3.38 Transiente Phosphorylierung von Tyrosinresten nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.39 Transiente Phosphorylierung von Tyrosinresten nach Behandlung mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.40 Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA nach Ethyl-3,4-dephostatin-Behandlung
- 3.41 Transiente TrkA-Phosphorylierung in hippocampalen Rattenzellen nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.42 Transiente TrkA-Phosphorylierung in hippocampalen Rattenzellen nach Behandlung mit 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.43 Transiente Phosphorylierung von Akt in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.44 Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin hemmt die Orthovanadat-induzierte Akt-Phosphorylierung
- 3.45 Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin hemmt die neuroprotektiven Effekte von Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.46 Transiente Erk1/2-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.47 Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die neuroprotektiven Effekte von Ethyl-3,4-dephostatin
- 3.48 Beteiligung der sGC an Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelter Neuroprotektion
- 3.49 Beteiligung der sGC an 4-O-Methyl-Ethyl-3,4-dephostatin-vermittelter Neuroprotektion
- 3.50 Strukturformel von S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
- 3.51 Konzentrationsabhängige Hemmung der Staurosporin-induzierten Apoptose durch den NO-Donator SNAP
- 3.52 Transiente TrkA-Phosphorylierung durch SNAP
- 3.53 Phosphorylierung des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA durch SNAP
- 3.54 Transiente Akt-Phosphorylierung durch SNAP
- 3.55 Transiente Akt-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen nach SNAP-Behandlung
- 3.56 Der PI3-K-Inhibitor Wortmannin hemmt die neuroprotektive Wirkung von SNAP
- 3.57 Transiente Erk1/2-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen nach SNAP-Behandlung

- 3.58 Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die SNAP-induzierte Phosphorylierung von Erk1 und Erk2
 - 3.59 Der MEK-Inhibitor UO126 hemmt die neuroprotektive Wirkung von SNAP
 - 3.60 Beteiligung der sGC an SNAP-vermittelter Neuroprotektion
-
- 4.1 Die chemischen Strukturen der Dephostatin-Derivate

7.2 Tabellenverzeichnis

- 2.1 Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien MEM, NeurobasalTM und RPMI 1640
- 3.1 Hemmung verschiedener Phosphatasen durch Compound 1 und 2
- 4.1 Hemmung verschiedener Phosphatasen durch Dephostatin-Derivate

7.3 Publikationen

A: Abstract
O: Originalarbeit
P: Poster
V: Vortrag

2001

A/P Gerling N, Culmsee C, Selke D, Klumpp S, Krieglstein J (2001) Inhibitors of tyrosine-phosphatase mimic NGF-induced neuroprotective signaling downstream TrkA- activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 364 (Suppl.), R28.

2002

P Gerling N, Culmsee C, Umezawa K, Klumpp S, Krieglstein J (2002) The inhibitor of protein tyrosine phosphatases Et-3,4-dephostatin mimics NGF-induced neuroprotective signaling. 3rd Forum of European Neuroscience, Paris, 13-17 July, 2002.

P Gerling N, Culmsee C, Umezawa K, Klumpp S, Krieglstein J (2002) Inhibitors of protein tyrosine phosphatases mimic NGF-induced neuroprotective signaling. 9th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg, 21-24 July, 2002.

A/P Gerling N, Culmsee C, Rupenthal I, Wallbaum T, Klumpp S, Krieglstein J (2002) Neuroprotection by NO-donors in embryonic hippocampal neurons involves enhanced tyrosine phosphorylation of TrkA. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 335 (Suppl 1):P:P8.

O Culmsee C, Gerling N, Lehmann M, Nikolova-Karakashian M, Prehn JHM, Mattson MP, Krieglstein J (2002) Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor p75. *Neuroscience*, 115:1089-1108.

- A/P** Culmsee C, Junker V, **Gerling N**, Lehmann M, Prehn JHM, Mattson MP, Krieglstein J (2002) NGF survival signaling via TrkA and p75 in hippocampal neurons. International Conference 'Cellular Signaling in Neuroprotection and Plasticity', Magdeburg, 26-28 September, 2002. RNNEEL 20: 68.
- P** Culmsee C, Junker V, **Gerling N**, Lehmann M, Prehn JHM, Mattson MP, Krieglstein J (2002) The p75NTR is essential for TrkA-mediated survival signaling in hippocampal and cortical neurons. 3rd Forum of European Neuroscience, Paris, 13-17 July, 2002.
- P** Culmsee C, Junker V, **Gerling N**, Lehmann M, Prehn JHM, Mattson MP, Krieglstein J (2002) NGF survival signaling in hippocampal neurons is mediated via TrkA and requires the low affinity neurotrophin receptor p75. 9th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg, 21-24 July, 2002.

2003

- O** **Gerling N**, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J (2003) The tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate mimics NGF-induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. *Neurochemistry International*, in press.
- A/P** **Gerling N**, Culmsee C, Umezawa K, Klumpp S, Krieglstein J (2003) Inhibition of protein tyrosine phosphatases mimics NGF-induced neuroprotective signaling. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* Vol. 23 (Suppl. 1) No. 467.
- V** Culmsee C, **Gerling N**, Umezawa K, Klumpp S, Krieglstein J (2003) Activation of neurotrophin-like signaling by protein tyrosine phosphatase inhibitors in hippocampal neurons. Annual International Conference, GBM-Study Group Neurochemistry, Dresden, 19-20 September 2003.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Norbert Gerling
Anschrift: Am Engelsberg 27
35041 Marburg

Geburtsdatum: 19.05.1975
Geburtsort: Damme
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Heinrich Gerling
Maria Gerling, geb. Landwehr

Schulbildung

1981 - 1987 Grundschole und Orientierungsstufe Holdorf
1987 - 1994 Gymnasium Damme
07/1994 Abitur

Wehrdienst

10/1994 - 09/1995 Grundwehrdienst in Leer und Varel als Sanitäter

Hochschulstudium

10/1995 - 12/1999 Studium der Pharmazie an der Philipps –
Universität in Marburg

09/1997 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
12/1999 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Praktische Tätigkeiten

09/1998 – 12/1998	Anstellung als studentische Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Chemie, Abteilung Biochemie der Philipps-Universität Marburg; » <i>Reinigung und Charakterisierung rekombinanter Aldolasemutanten</i> «
12/1999 – 06/2000	Praktikum in der Neuen Universitätsapotheke zum Schwan in Marburg
06/2000 – 12/2000	Praktikum bei Vetter Pharma Fertigung GmbH & Co. KG in Ravensburg; » <i>Implementierung eines neuen Prozessablaufs hinsichtlich der Qualitätsstandards in der Optischen Kontrolle</i> «

Approbation

01/2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
03/2001	Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeiten

02/01 – 01/04	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, Anfertigung einer Promotionsarbeit: » <i>Neuroprotektion und Aktivierung von Neurotrophin-Signaltransduktionswegen durch Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen und durch NO-Donatoren</i> «
---------------	---