

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Volker Seifert

**Molekulare Mechanismen der S100B-vermittelten
Neuroprotektion**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Seyed Mohammad Amin Hashemi
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2013

Dekan: Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Donat Kögel

Korreferent: Prof. Dr. Georg Auburger

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2013

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1.1. Das Protein S100B.....	1
1.2. Neuroblastome und hippokampale Neurone.....	4
1.3. Apoptose.....	5
1.4. Exzitotoxizität durch NMDA-Schädigung und Hypoxie.....	9
1.5. DNA-Schädigungsmodelle und Proteasomaler Stress durch UV-Bestrahlung, Etoposid und Epoxomicin.....	12
1.6. p53 und seine weitreichenden Wirkungsmechanismen.....	14
1.6.1. p53 und S100B.....	17
1.7. NFκB.....	18
1.7.1. Rolle von NFκB in Neuronen.....	21
1.8. Fragestellung und Zielsetzung.....	22
II. Material und Methoden	24
2.1. Material.....	24
2.1.1. Zelllinien.....	24
2.1.2. Geräte.....	24
2.1.3. Chemikalien.....	25
2.1.4. Kulturmedien, Seren und Zusätze.....	26
2.1.5. Antikörper.....	27
2.1.5.1. Primärantikörper.....	27
2.1.5.2. Sekundärantikörper.....	27
2.1.6. Oligonukleotide.....	28
2.1.7. Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.8. Verwendete Kits.....	29
2.1.9. Verwendete Software.....	29
2.2. Methoden.....	30
2.2.1. Zellkulturmethoden.....	30
2.2.1.1. Kultivierung von Zelllinien.....	30
2.2.1.2. Mediumwechsel und Passagieren von Zellen.....	30
2.2.1.3. Zellzahlbestimmung und Aussähen der Zellen.....	31
2.2.1.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	31
2.2.1.5. Vitalitätsbestimmung.....	32
2.2.1.6. Präparation hippokampaler Neurone.....	32
2.2.1.7. Kultivierung hippokampaler Neurone.....	33

2.2.1.8. Beschichtung von Kulturgefäßen.....	34
2.2.1.9. Fixierung von hippokampalen Neuronen.....	34
2.2.2. In-vitro Schädigungsmodelle.....	35
2.2.2.1. NMDA-Schädigungsmodell.....	35
2.2.2.2. Hypoxie/Anoxiemodell	36
2.2.2.3. DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung und Etoposid.....	36
2.2.2.4. Proteasomaler Stress und p53 Aktivierung durch Epoxomicin.....	37
2.2.3. Proteinchemische Methoden.....	38
2.2.3.1. Caspase 3 Aktivitäts-Assay.....	38
2.2.3.2. Western-Blot Immundetektion.....	40
2.2.4. Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion.....	45
2.2.5. Gelretardations- und Supershift-Analysen (EMSA).....	46
2.2.6. Immunzytochemie und Immunfluoreszenzanalysen.....	49

III. Ergebnisse.....51

3.1. Die Rolle von S100B beim exzitotoxischen Zelltod.....	51
3.1.1. S100B schützt primäre hippokampale Neurone vor NMDA-induzierten exzitotoxischen Zelltod.....	51
3.1.2. S100B aktiviert den Zellrezeptor RAGE.....	53
3.1.3. Die Rolle des MEK/ERK-Signalweges für die S100B-vermittelte Neuroprotektion im Rahmen des exzitotoxischen Zelltodes.....	58
3.1.4. Die Rolle des PI3/Akt-Signalweges für den neuroprotektiven Effekt von S100B.....	58
3.2. Die Rolle von S100B im Rahmen des Hypoxie-induzierten Zelltodes in Neuronen.....	59
3.2.1. S100B schützt SHSY5Y-Zellen vor dem Hypoxie-induzierten Zelltod.....	59
3.2.2. Primäre hippokampale Neurone zeigen mit S100B einen signifikanten Schutz gegenüber Hypoxie-induzierter Zellschädigung.....	61
3.2.3. VEGF-Aktivierung durch S100B nach Hypoxie in SHSY5Y-Zellen..	62
3.2.4. Aktivierung der p50/p65 Untereinheit von NF-κB während hypoxieinduzierter Apoptose in SHSY5Y-Zellen.....	64
3.3. DNA-Schädigung, S100B und die Rolle von p53.....	66
3.3.1. S100B bei der Apoptose in SHSY5Y Zellen induziert durch den Proteasomeninhibitor Epoxomicin.....	66
3.3.2. S100B-Effekt in SHSY5Y-Zellen auf die durch den Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid ausgelösten Apoptose.....	68

3.3.3. S100B-Effekt auf DNA-Schädigung in primären hippocampalen Neuronen der Ratte.....	71
3.3.4 S100B schützt primäre hippocampale Neurone der Ratte vor einem Zelltod hervorgerufen durch einen Epoxomicin induziertem proteasomalen Stress	71
3.3.5. DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung.....	73
3.3.6. Hippokampale Neurone der Ratte zeigen in Anwesenheit von S100B einen signifikanten Schutz gegenüber UV-induziertem Zelltod	73
3.3.7. Die p53-abhängige Rolle von S100B im Apoptoseverhalten von Neuroblastomzellen nach DNA-Schädigung.....	75
3.3.8. Verminderte p53-Expression nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung in Anwesenheit von S100B.....	75
3.3.9. Effekt von S100B auf p53-Aktivierung während DNA-Schädigung durch Etoposid in SHSY5Y Zellen.....	77
3.4. S100B Effekt auf die Expression von p53-abhängigen Zielgenen.....	79

IV. Diskussion.....81

4.1. S100B und seine Rolle im zentralen Nervensystem.....	81
4.2. Untersuchung in zwei verschiedenen neuronalen Zellmodellen	83
4.2.1. Humane Neuroblastomzellen SHSY5Y.....	83
4.2.2. Hippokampale Neurone der Ratte.....	84
4.3. Hypoxie und NMDA-induzierte Exzitotoxizität : zwei in vitro Zelltodmodelle zur Untersuchung der zerebralen Ischämie.....	84
4.3.1. S100B schützt primäre hippocampale Neurone der Ratte und humane Neuroblastomzellen vor exzitotoxischer Zellschädigung	85
4.3.2. S100B schützt primäre hippocampale Neurone der Ratte und humane Neuroblastomzellen vor Hypoxie-induziertem Zelltod.....	86
4.4. S100B aktiviert RAGE (receptor for advanced glycation endproducts).....	87
4.5. Neuronale Überlebens-Signalwege.....	87
4.5.1. Der PI3K/Akt-Signalweg.....	88
4.5.2. Der PI3K/Akt-Signalweg spielt für die neuroprotektive Wirkung von S100B bei NMDA-induziertem Zelltod keine signifikante Rolle ..	90
4.5.3. Der MEK/ERK-Signalweg.....	90
4.5.4. Der MEK/ERK-Signalweg kann teilweise die neuroprotektive Wirkung von S100B beim exzitotoxischen Zelltod erklären.....	91
4.6. NFκB und seine Rolle in der Vermittlung der neuroprotektiven Eigenschaft von S100B.....	92
4.6.1. S100B führt in SHSY5Y-Zellen zu einer NFκB-Aktivierung mit möglichem neuroprotektivem Wirkmechanismus beim exzitotoxischem Zelltod..	93

4.7. VEGF - ein (vaskulärer) Überlebensfaktor mit zahlreichen Funktionen.....	95
4.7.1. Auf transkriptioneller Ebene gibt es Hinweise einer Hochregulierung von VEGF durch S100B.....	96
4.8. S100B schützt primäre hippokampale Neurone der Ratte und menschlichen Neuroblastomzellen vor Apoptose induzierender DNA-Schädigung.....	98
4.8.1. p53 : eines der Haupteffektorproteine bei der Induktion von Apoptose nach DNA-Schädigung.....	99
4.8.2. Nach DNA-Schädigung zeigt sich in Anwesenheit von S100B ein verminderter p53-Proteinlevel und eine verminderte Apoptose.....	100
4.8.3. Keine Hinweise für eine signifikante Veränderung der p53 regulierten Zielgene Bax, PUMA, NOXA und WAF1.....	102
4.9. S100B im klinischen Einsatz : Ein Ausblick.....	105

V. Zusammenfassung.....107

VI. Literaturverzeichnis.....111

VII. Anhang.....121

1. Einleitung

1.1. Das Protein S100B

S100B ist ein Protein mit 92 Aminosäuren, codiert von einem Gen auf Chromosom 21q22 mit einem Molekulargewicht von 10.713 Da. Es gehört zur Gruppe der S100-Familie, welche zwei Kalziumbindungsstellen in einer Helix-Loop-Helix (EF-Hand) Formation besitzt (Marenholz et al., 2006; Tsoporis et al., 2010). Der Name dieser Proteinfamilie leitet sich von der Eigenschaft ab, zu 100% in Ammonium-Sulfat mit einem neutralen pH-Wert löslich zu sein (Moore et al., 1965). Bis heute sind 25 Mitglieder dieser Familie bekannt, die ausschließlich bei Wirbeltieren vorkommen (Sedaghat et al., 2008).

Aufgrund ihrer kalziumbindenden Fähigkeit können die Mitglieder der S100-Familie durch Kalzium als second messenger aktiviert werden und mit weiteren Proteinen interagierend deren Funktion beeinflussen. Eine Ausnahme bildet S100A10, welches unabhängig von Kalzium seine Regulatorfunktion ausübt und S100G, der als Kalziumpuffer im Zytosol agiert (Donato et al., 2009; siehe Abb. 1). Abgesehen von S100G liegen alle Mitglieder dieser Familie meist als Homo- und seltener als Heterodimere in der Zelle vor. Vereinzelt wurden auch Oligomere beobachtet (Donato et al., 2009).

S100B, das erste entdeckte Mitglied der S100-Familie, wird unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Zellarten wie z. B. in Astrozyten und Oligodendrozyten, Schwannzellen, Adipozyten, bestimmten neuronalen Populationen, Chondrozyten, Melanozyten und Dendritischen Zellen exprimiert und kommt im Nukleus und/oder Zytoplasma vor (Yang et al., 1999; Donato and Heizmann, 2010). Es existiert dabei meist als S100 $\beta\beta$ homodimer und seltener als Heterodimer mit einer β - und einer S100 α 1-Untereinheit (Isobe et al., 1983).

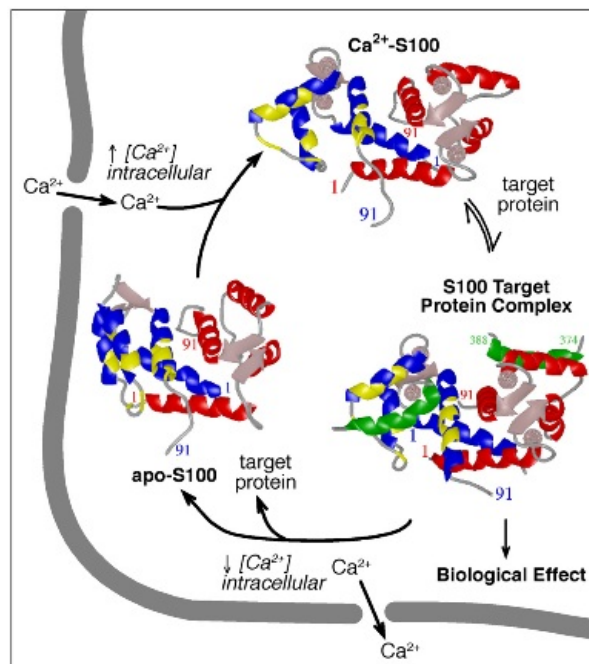


Abb. 1: Konformationsänderung von S100B:

S100B kann nach einer Kalziumbindung und anschließenden Konformationsänderung an seine Zielproteine binden und somit Zellvorgänge beeinflussen (nach Weber).

Im Allgemeinen beeinflusst S100B intrazelluläre Signaltransduktionswege meist in einem kalziumabhängigen Mechanismus durch Interaktion mit zahlreichen Targetproteinen. Hierbei führt es unter anderem zu einer Regulierung von Proteinphosphorylierungen, Enzymaktivität und der Transkription (siehe Abb 2). Dabei kommt es unter anderem zu einer Interaktion mit Regulatorproteinen wie der Proteinkinase C (PKC) dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 und dem Tumorsuppressorprotein p53 (Landar et al., 1996).

S100B kann auch extrazelluläre Vorgänge als Signalmolekül regulieren und spielt unter anderem bei der Modulation neuronaler Netzwerke im Gehirn eine wichtige Rolle (Sakatani et al., 2008).

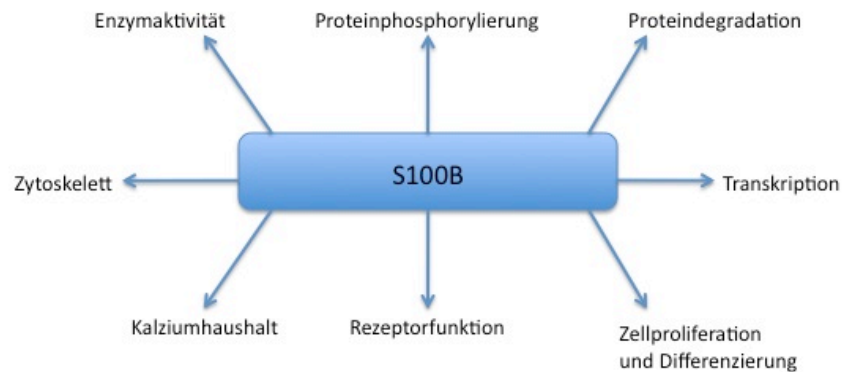


Abb.2: Intrazelluläre Wirkungen von S100B (modifiziert nach Donato und Heizmann, 2010)

Autokrine und parakrine Effekte von S100B auf Neuronen und Gliazellen werden immer weitreichender (Zimmer et al., 1995; Donato, 2001, 2003; Rothermundt et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass nach zahlreichen verschiedenen neuronalen Schädigungen z. B. dem ischämischen Schlaganfall, ZNS-Trauma, neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, aber auch bei neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie das Protein im Serum hochreguliert wird (Rothermundt et al., 2001, 2003). Aber auch nach starker körperlicher Belastung wie bei Langstreckenläufern wurde eine Serumproteinerhöhung verzeichnet (Otto et al., 2000).

Schon vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die Rolle, die das Protein in zahlreichen Zellvorgängen einnimmt, konzentrationsabhängig ist. Demnach zeigt sich, dass S100B abhängig von seiner Konzentration sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Effekte haben kann (Huttunen et al., 2000). In einem ersten Schritt zum Verständnis des Wirkmechanismus konnte unter anderem in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass S100B in sehr geringen Konzentrationen einen Nuklear-Faktor κ B (NF- κ B) abhängigen neuroprotektiven Effekt gegen den NMDA-induzierten exzitotoxischen Zelltod zeigt (Kögel et al., 2005).

1.2. Neuroblastome und hippokampale Neurone

Neuroblastome im Allgemeinen sind verantwortlich für 10% aller Tumore im Kindesalter und sind, trotz zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen noch immer die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Kindern (Pearson et al., 2000). Der neuroektodermale Tumor geht aus Neuroblasten hervor, die von der primitiven Neuralleiste (z. B. paravertebrale Ganglien im Grenzstrang des Sympathikus) abstammen. Häufig sind diese Tumore in der Initialtherapie noch sensibel gegenüber einer Chemo- oder Radiotherapie, zeigen als Rezidive jedoch meist eine Resistenz gegen solche Therapieformen (Twedle et al., 2001). Eventuell kann dies durch eine nachfolgend näher beschriebene, im Verlauf der Therapie auftretende p53 Mutation erklärt werden.

Die in dieser Arbeit benutzte Neuroblastomzelllinie SHSY5Y hat zahlreiche Ähnlichkeiten mit Neuronen. Unter anderem konnten in diesen Zellen verschiedene Enzymaktivitäten (z. B. Tyrosin und Dopamin- β -Hydroxylase), eine spezifische Aufnahme von Norepinephrin (NA), Expression von Neurofilamentproteinen sowie die Expression von opioiden und muscarinergen Rezeptoren nachgewiesen werden, welche als neuronale Marker dienen (Ciccarone et al., 1989).

Der Hippokampus, benannt nach dem lateinischen Wort für Seepferdchen, ist ein zentraler Baustein des limbischen Systems im Temporallappen des Großhirns. Abgesehen von seinen zahlreichen Funktionen beim Lernen, Gedächtnis und Empfinden hat er aufgrund seiner hohen Dichte an glutamatergen Zellen und NMDA-Rezeptoren einen hohen Stellenwert für die Erforschung von Krankheiten, die auf einer Fehlfunktion dieser Zellen beruhen.

Um die Rolle von S100B bei dem Schutz vor Apoptose in primären hippokampalen Neuronen und menschlichen Neuroblastomzellen besser zu verstehen, wurde bei dieser Arbeit auf verschiedene, zelltodinduzierende Behandlungen zurückgegriffen.

1.3. Apoptose

Apoptose (griechisch *apo*: „weg“ und *ptosis*: „Fall“), eine Analogie an das Fallen der Blätter im Herbst, ist ein vielbeschriebener, essentieller Zelltodmechanismus der Zelle in physiologischen und pathologischen Zuständen. Pro Jahr werden ca. 13000 Publikationen über dieses Thema veröffentlicht (Lawen, 2003). Bereits 1951 gab es erste Beschreibungen, dass der apoptotische Zelltod eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung, insbesondere der Embryogenese mehrzelliger Organismen einnimmt (Glueksmann, 1951). Bereits kurze Zeit später wurde dann zum ersten Mal der Begriff vom programmierten Zelltod (PCD) verwendet, was einen nicht zufälligen, koordinierten Ablauf der Zelle zur Selbstzerstörung impliziert (Lockshin et al., 1964). Der Begriff *Apoptose* selbst wurde als erstes in einer Publikation von Kerr 1972 verwendet (Kerr et al., 1972).

Apoptose spielt nicht nur in der Embryogenese, wie z. B. bei der Differenzierung der Finger und Gliedmaßen oder der Entwicklung des Gehirns, bei dem etwa die Hälfte der gebildeten Neurone durch den programmierten Zelltod verstirbt, eine wichtige Rolle, sondern nimmt auch eine herausragende Stellung im Erwachsenenalter bei der Differenzierung, Proliferation, Entfernung potentiell schädlicher Zellen wie Tumorzellen, Regulation des Immunsystems und der Hämostase ein (Zuzarte-Luis et al., 2002; Hutchins et al., 1999; Fadeel et al., 1999).

Auch durch die folgende beeindruckende Zahl wird die physiologische Bedeutung der Apoptose verdeutlicht: Im menschlichen Körper werden etwa 100.000 Zellen durch Mitose pro sec. gebildet und es sterben in der gleichen Zeit etwa die gleiche Anzahl durch Apoptose (Vaux et al., 1999). Es ist somit schnell verständlich wie fatal eine Schädigung dieses Gleichgewichts durch zu viel Apoptose, wie z. B. bei der Parkinson- oder Alzheimer-Krankheit, oder zu wenig Apoptose, wie bei zahlreichen Tumorerkrankungen, sein kann.

Apoptotische Zellen sind durch eine Reihe stereotypischer Veränderung gekennzeichnet: Zunächst kommt es zu einer Chromatinkondensation im Zellkern, einer Zellschrumpfung und einem Kontaktverlust zu den angrenzenden Nachbarzellen. Die Plasmamembran fängt an zu „brodeln“, es bilden sich Bläschen an der Oberfläche und schließlich wird die Zelle in membranumschlossene Vesikeln sog. „apoptotic bodies“ zerteilt. Diese enthalten neben dem kondensierten Chromatin, auch das Zytosol und die Organellen. Diese Fragmente werden dann durch Makrophagen phagozytiert und es kommt anders als bei der Nekrose zu keiner Entzündungsreaktion und keiner Schädigung der Nachbarzellen (siehe Abb. 3; Van Cruchten et al., 2002)

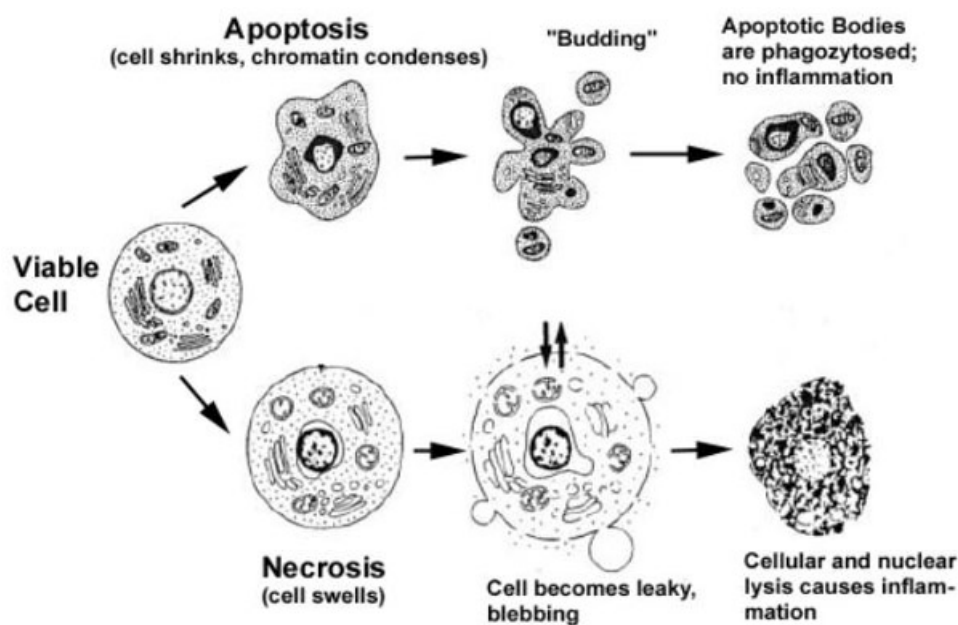


Abb. 3: Apoptose vs. Nekrose

Während es bei der Apoptose nach einer Zellschrumpfung und Chromatin-Kondensierung zu einer Bildung von „Apoptose-Körperchen“ kommt, die die Organellen sowie Zytosol und Zellkernfragmente beinhalten und anschließend phagozytiert werden, kommt es bei nekrotischen Zellen zu einer zunehmenden Schwellung, Zelldurchlässigkeit und Zelluntergang mit Freisetzung der intrazellulären Bestandteile in das umgebende Gewebe mit resultierender Inflammation (nach Van Cruchten, 2002).

Für die Initiierung der Apoptose werden im Allgemeinen zwei Signalwege unterschieden: Zum einen gibt es den extrinsischen rezeptorvermittelten Weg, zum anderen den intrinsischen mitochondrialen Weg.

Für den extrinsischen Weg sind einige in der Plasmamembran liegende Todesrezeptoren wie TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) und p75NTR (Fas und NGF-Rezeptor) hauptverantwortlich. Diese werden durch extrazelluläre Liganden aktiviert. Zu den wichtigsten zählen Fas (auch Apo-1 oder CD95), TNF α (tumor necrosis factor alpha) und NGF (nerve growth factor) (Ashkenazi, 2002; Lavrik et al., 2005).

Der intrinsische Signalweg wird durch zahlreiche intra- und/oder extrazelluläre Stresssignale wie DNA-Schädigung oder oxidativen Stress aktiviert (Wang et al., 2001). Diese Signale führen durch eine Veränderung der mitochondrialen Membran zu einem Cytochrom-c Ausstrom aus dem Mitochondrium in das Zytosol (Bernardi et al., 1999).

Beide Signalkaskaden haben einen gemeinsamen Ablauf ab dem Level der sog. (Effektor)Caspasen (cysteine aspartic acid proteases), den Schlüsselenzymen für die Apoptoseausführung. Diese haben einen Cysteinbaustein im aktiven Zentrum und besitzen die Eigenschaft nach einem Aspartat zu spalten. Es sind aktuell 12 Caspasen in Säugetieren bekannt, die in den letzten Jahren zunehmend auch in nicht-apoptotischen Vorgängen wie Synapsen-Plastizität, Dendriten-Entwicklung, Lernen und Gedächtnisprozessen eine wichtige Rolle einnehmen (Li et Sheng, 2012). Sie werden als Pro-Enzyme gebildet und durch andere Caspasen oder autokatalytisch aktiviert, was in einer Caspasen-Kaskade resultiert (Earnshaw et al., 1999).

Man unterscheidet bei der Apoptose-Einleitung zwei Arten von Caspasen (Li et Yuan, 2008):

- die Initiatorcaspasen (upstream caspases): 2,8,9,10
- die Effektorcaspasen (downstream caspases): 3, 6, 7
- (die übrigen Caspasen spielen eher eine Rolle für die Zytokinreifung oder Autoimmunprozessen als bei der Apoptose).

Beim extrinsischen Signalweg kommt es nach Anlagerung extrazellulärer Liganden an einen Todesrezeptor zunächst zu einer intrazellulären DISC (death-inducing signaling complex)-Bildung mit anschließender Aktivierung der Initiatorcaspase 8 (und 10). Beim intrinsischen Weg wird nach verschiedenen Stresstimuli durch Porenbildung an der Mitochondrienmembran Cytochrom-c freigesetzt, welches nach Bindung an APAF-1 (Apoptosis protease-activating factor 1) in einem ATP-abhängigen Mechanismus zu einem Apoptosom oligomerisiert und dann seinerseits Caspase 9 aktiviert.

Diese Initiatorcaspasen haben dann die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 gemeinsam (Abb.3; Sartorius et al., 2001; Denault et al., 2002, Earnshaw et al., 1999).

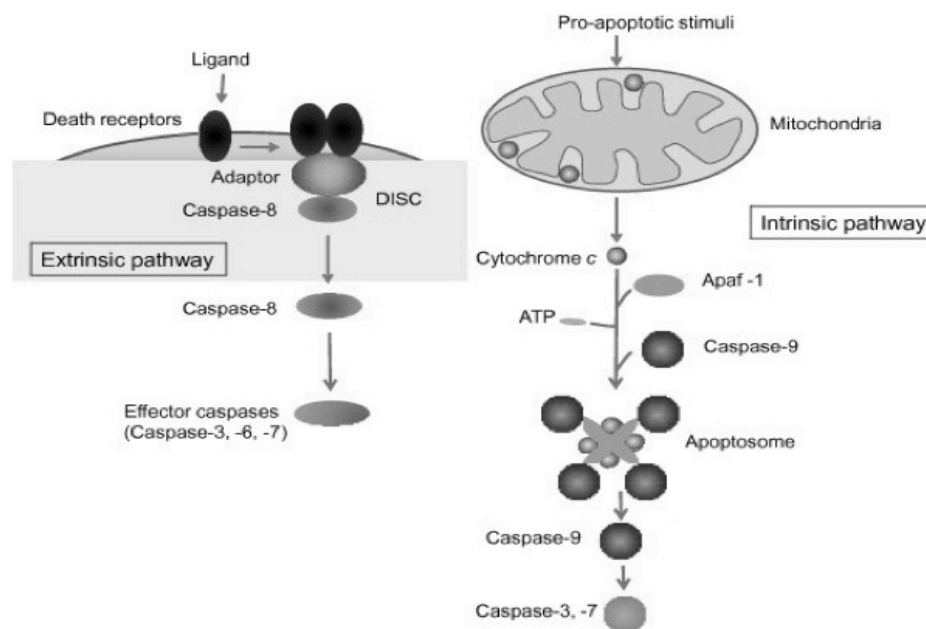


Abb. 3: Caspasen-Aktivierung beim intrinsischen und extrinsischen Signalweg (modifiziert nach Li und Sheng, 2012).

Auch eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Signalwege wurde beschrieben. Ist z. B. ein vorhandener externer Reiz nicht stark genug für eine Apoptoseinduktion, kann durch Caspase 8 proteolytisch Bid, ein Bcl-2 Familienmitglied (siehe unten) aktiviert werden, welches seinerseits den Ausstrom von Cytochrom-c erleichtert (Luo et al., 1998).

1.4. Exzitotoxizität durch NMDA-Schädigung und Hypoxie:

Der Begriff *Exzitotoxizität*, zusammengesetzt aus den Worten *excitare* (lateinisch) = treiben und *toxicon* (griechisch) = Gift, beschreibt einen durch „Übererregung“ von Neuronen und Gliazellen herbeigeführten Neuronenuntergang. Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat, der vielleicht wichtigste und mit einer Konzentration von 5-10 mmol/kg Gewebe (Butcher et al., 1987) am häufigsten vorkommende Transmitter im zentralen Nervensystem, wird hauptsächlich mit dieser Art der Zellschädigung in Verbindung gebracht. Glutamat hat im Gehirn zahlreiche Schlüsselfunktionen - von der neuronalen Entwicklung (Komuro et al., 1993) bis hin zur neuronalen Signaltransduktion, der synaptischen Plastizität, dem Lernmechanismus, dem Gedächtnis und der sensorischen Wahrnehmung (Cavalheiro et al., 2001). So ist es auch wenig verwunderlich, dass eine mit Glutamat vergesellschaftete Neurotoxizität, erstmals beschrieben 1957 (Lucas et al., 1957), bei zahlreichen Erkrankungen im zentralen Nervensystem im Mittelpunkt steht. Geprägt wurde der Begriff der Glutamat-Exzitotoxizität von Olney, der durch subkutane Glutamatinjektionen in Mäusen, Läsionen im Gehirn beschrieb (Olney, 1969). Eine glutamatabhängige Exzitotoxizität ist sowohl in akuten Läsionen wie Ischämien (Sisjo et al., 1995) und Neurotraumata (Zhang et al., 1996) als auch bei chronischen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson (Price, 1999) und Multipler Sklerose (Smith et al., 2000) mehrfach beschrieben. Auch bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), Chorea major (Huntington) und epileptischen Anfällen spielt Glutamat eine wichtige pathophysiologische Rolle. Obwohl weiterhin zahlreiche Forschungsarbeiten über neuronale Exzitotoxizität durchgeführt werden, gibt es bis heute keine signifikanten klinischen Therapien für einen neuronalen Schutz gegenüber exzitatorischer Zellschädigung z. B. nach Ischämien oder Traumata.

Aus Synapsen freigesetztes Glutamat aktiviert mehrere Rezeptortypen, die in zwei Hauptgruppen - die ionotropen (ligandengesteuerten Ionenkanäle) und metabotropen (G-Protein gekoppelten) Glutamatrezeptoren - eingeteilt

werden. Sie unterscheiden sich unter anderem aufgrund ihrer Liganden und Signaltransduktionswege. Die ionotropen Rezeptoren werden wiederum aufgrund ihrer Affinität zu exogenen Agonisten unterteilt in NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat), AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazole Propionsäure) und KA- (Kainat) Rezeptoren (Simon et al., 1994). Entscheidend für die kalziumabhängige Exzitotoxizität ist der ionotrope NMDA-Rezeptor (Choi, 1988).

Kommt es z. B. durch einen ischämischen Schlaganfall zu einer Minderversorgung der Zelle mit Sauerstoff und Glukose und damit einem Energieverlust, ist die Natrium-Kalium-Pumpe der Zellmembran nicht mehr (voll) funktionsfähig. Unweigerlich kommt es zu einer Depolarisation der Membran, einer Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle und damit zur präsynaptischen Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern, vor allem von Glutamat. Es kommt hinzu, dass die energieabhängigen Glutamat-Transporter, die normalerweise eine Wiederaufnahme in die Zelle ermöglichen und die Glutamatkonzentration im intersynaptischen Spalt konstant halten (Huang et al., 2004), ebenfalls ihre Funktion verlieren und damit zusätzlich einen Anstieg des Transmitters im Extrazellularraum zur Folge haben.

In der Folge zeigt sich eine Aktivierung der NMDA-Rezeptoren, die einen Einstrom von Kationen, hauptsächlich Kalzium, zur Folge hat. Dieser NMDA-abhängige, erhöhte Kalziumeinstrom, aufgrund eines verlängerten und verstärkten Glutamatreizes, kann Zelltodmechanismen auslösen oder erleichtern (Sattler et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass der Kalziumeinstrom essentiell für die Glutamat-abhängige Neurotoxizität ist (Choi, 1985). Zusätzliche Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern führt zudem zu einer zusätzlichen Glutamatreisetzung, einem Circulus vitiosus. Normalerweise wird ein Kalziumeinstrom, notwendig für physiologische Prozesse wie Lernen und Erinnern, durch das Endoplasmatische Retikulum und dem Mitochondrium abgepuffert. Ist der Einstrom jedoch zu groß, kommt es in der Mitochondrienmembran zu einer Depolarisation mit Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom-c und damit einer Apoptoseinitiierung.

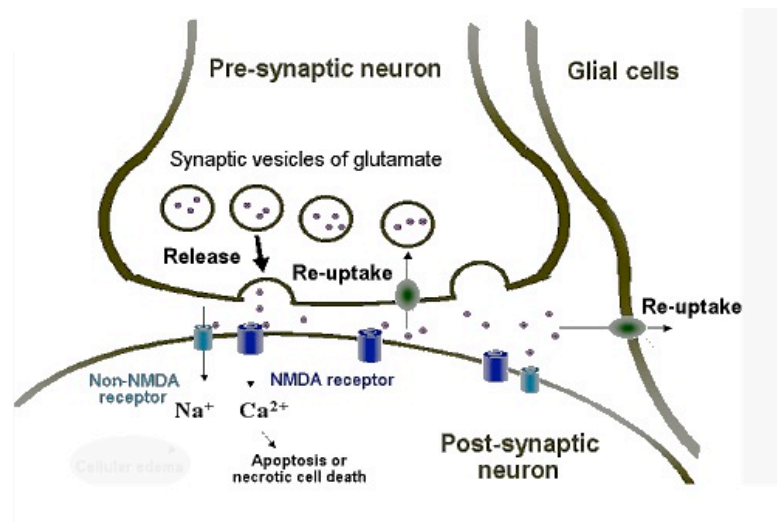


Abb. 4: Grundlage der neuronalen Exzitotoxizität

Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat wird nach einer Depolarisation im präsynaptischen Neuron in den intersynaptischen Spalt freigesetzt. Dort bindet es unter anderem an NMDA-Rezeptoren des postsynaptischen Neurons und führt zu einem vermehrten Kalziumeinstrom in die Zelle und schlussendlich zu einem Zelltod (modifiziert nach Moritani et al., 2002).

Außerdem kann intrazelluläres Kalzium direkt zahlreiche katabole Enzymsysteme wie Nukleasen, Phospholipasen und Proteasen aktivieren, die wiederum durch Proteolyse, DNA-Fragmentierung und Proteinphosphorylierung einen Zelltod triggern (Orrenius et al., 1994).

Die Aktivierung von Caspasen im Rahmen des exzitotoxischen Zelltodes wurde ebenfalls beschrieben. Es konnte dabei durch die Applikation zahlreicher Caspaseinhibitoren eine Neuroprotektion gegenüber NMDA-induzierten Zelltod erreicht werden (Du et al., 1997; Tenneti et al., 1998).

Ein dritter Zelltodmechanismus nach Kalziumeinstrom ist die Bildung freier Radikale wie Stickstoffmonoxyd (NO) (Dawson et al., 1991). Die NO-Toxizität ist unter anderem durch DNA-Strangbrüche einer der wichtigsten Mediatoren für den anschließend endgültigen neuronalen Zelltod (Haider et al., 2011; Aquilano et al., 2011).

1.5. DNA-Schädigungsmodelle und proteasomaler Stress durch UV-Bestrahlung, Etoposid und Epoxomicin

In gesunden menschlichen Zellen setzt eine DNA-Schädigung eine Reihe von Signalkaskaden in Kraft, die das Ziel haben einen Zellzyklusarrest und die Reparatur der geschädigten DNA zu koordinieren. Diese Antwort hat eine genomische Stabilität zur Folge und verhindert die Akkumulation genetischer Mutationen und die Entstehung von Tumoren, oder im zentralen Nervensystem auch einer neurodegenerativen Entwicklung. Gleichwohl spielen diese Maßnahmen auch eine entscheidende Rolle bei physiologischen Vorgängen wie Wachstum, Differenzierung und Entwicklung der Zelle und des Organismus.

Menschliche Neuronen haben neben ihrer post-mitotischen, enddifferenzierten und unersetzbaren Eigenschaften einen sehr hohen metabolischen Umsatz mit einhergehender hoher Transkriptions- und Translationsaktivität. So werden vermehrt Sauerstoffradikale angehäuft. Dementsprechend höher und schwerwiegender ist die Gefahr von DNA-Schädigungen (Barzilai et al., 2008).

Normalerweise kommt es nach einer DNA-Schädigung in einer Zelle zur schnellen Detektion durch sog. Sensorproteine. Diese setzen dann eine hierarchische Kaskade in Kraft, bei der es mit Hilfe von Effektorproteinen zu einem Zellzyklusarrest und anschließender DNA-Reparatur kommt. Ist dies, aus welchen Gründen auch immer, nicht (mehr) möglich, wird eine Apoptose eingeleitet (Su et al., 2006).

Zur DNA-Reparatur werden im Allgemeinen zwei Mechanismen unterschieden: die Basenexzisionsreparatur bei Fehler in der Basenpaarung und die Nukleotidexzisionsreparatur, bei der wiederum zwischen einer Reparatur in transkriptionsinaktiven (GGR: Global Genome Repair) und transkriptionsaktiven (TCR: Transcription Coupled Repair) Bereichen unterschieden wird.

Beim letzteren spielt die RNA-Polymerase II eine entscheidende Rolle. Diese ist normalerweise für die Transkription der für Proteine kodierenden Gene in eine mRNA verantwortlich. Kommt es an einer Stelle zu einer DNA-Schädigung, so wird die RNA-Polymerase dort in ihrer Transkriptionsaktivität blockiert und initiiert wichtige Reparaturmechanismen. Dieser RNA-Polymerase II-Arrest kann dann unter anderem durch eine Aktivierung des Tumorsuppressors p53 eine Apoptose in Gang setzen (Derheimer et al., 2007).

Es sind zahlreiche Mechanismen beschrieben worden, die zu einer DNA-Schädigung führen. Durch UV-Strahlung kommt es zur direkten DNA-Schädigung, hauptsächlich verursacht durch die Formation von Pyrimidin-Dimeren (Schreiber et al., 1995). Nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung in zahlreichen Zellarten spielt p53 bei der anschließenden Apoptoseinduktion eine herausragende Rolle (Sanchez and Elledge, 1995).

Die Topoisomerase II ist ein Schlüsselenzym in der DNA-Replikation. Sie existiert in Säugetieren in den zwei verschiedenen Isoformen α und β (Wang, 2002). Etoposid bindet an die aktivere und für Replikation essentiellere Isoform II α und bildet einen nicht-kovalenten und reversiblen Komplex (Elsa et al., 1993). Etoposid führt dementsprechend konzentrationsabhängig zu einer Stabilisierung des Bindungskomplexes und durch den Funktionsverlust der Topoisomerase II zu einer fehlerhaften DNA-Reparatur oder Replikation und schlussendlich zu einem genotoxischen und apoptosesteigerndem Ergebnis (Li et al., 2001). Die Topoisomerase II ist wegen ihrer essentiellen nukleären Funktion auch der primäre Wirkungsort zahlreicher Chemotherapeutika. Für einige Zeit wurde auch Etoposid regelmäßig in der Tumorthherapie, z. B. in humanen Neuroblastomzellen, eingesetzt (Striborova et al., 2010).

Das 26S-Proteasom ist ein makromolekularer intrazellulärer Proteasekomplex, welches für den Abbau von ubiquitinierten Proteinen verantwortlich ist. Es kontrolliert unter anderem den Abbau defekter oder kurzlebiger Proteine, welche wichtige Regulatorfunktionen bei der Zellteilung, Transkription, Zelldifferenzierung und Apoptose einnehmen.

Eine Fehlfunktion des Proteasoms hat meist verheerende Folgen für den Zellzyklus, DNA-Reparaturmechanismen und das Überleben der Zelle (King et al., 1996, Ciechanover et al., 2000). Epoxomicin ist ein sehr spezifischer, potenter und irreversibler Proteasominhibitor (Meng et al., 1999). Eine kovalente Bindung des Peptids mit dem Proteasom führt meist zu einer p53-Steigerung und über eine Caspaseaktivierung zur Apoptoseeinleitung (Kloetzel, 2001).

1.6. p53 und seine weitreichenden Wirkungsmechanismen

p53 ist ein vor 30 Jahren zunächst in Tumorzellen entdecktes, nukleäres Phosphoprotein (Lane et al., 1979; Linzer et al., 1979). Als eines der ersten Funktionen des Proteins wurde die Sequenz-abhängige Bindung an die DNA und die Transkriptionsaktivierung zahlreicher Gene entdeckt (Fields et al., 1990; Kern et al., 1991). p53 ist für die Aktivierung zahlreicher Proteine wie z.B. p21WAF1, MDM2 (HDM2 in Menschen), den proapoptotischen Bcl-2 Proteinen wie Bax, PUMA und Noxa sowie der Herunterregulierung anderer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-XI verantwortlich (Miyashita et al., 1995; Nakano et al., 2001; Oda et al., 2000; Haldar et al., 1994).

p53 kann aufgrund seiner Eigenschaft sowohl beide oben näher beschriebenen Caspase-abhängigen Apoptosesignalwege aktivieren als auch Caspase-unabhängig zu einem Zelltod führen. Der extrinsische Weg kann durch transkriptionelle Induktion sog. Todesliganden wie FAS und DR5 aktiviert werden (Owen-Schaub et al., 1995, Wu et al., 1997). Und auch die genannte Familie der proapoptotischen Bcl-2 Proteine, die hauptsächlich den intrinsischen Signalweg mit dem Ausstrom von Cytochrom-c kontrolliert, kann durch p53 aktiviert werden.

Trotz einer normalerweise geringen Zellkonzentration, aufgrund einer kleinen Halbwertszeit von 20 min., übernimmt p53 eine überragende Rolle in der Kontrolle zahlreiche Zellvorgänge.

Zellmobilität, Zelladhäsion, DNA-Reparatur, zelluläre Alterung, Autophagie, Membranfunktionen, Zelldifferenzierung und Induktion pluripotenter Stammzellen sind nur einige der wichtigsten Funktionen (Vousden et al., 2009; Hong et al., 2009).

Zusätzlich existieren intrazellulär latente, nicht transkriptionsaktive Mengen von p53. Bei zellulären Stresssituationen, wie DNA-Schädigung durch UV-Strahlung, akkumuliert p53 in der Zelle. Denn normalerweise kann MDM2, selbst hochreguliert durch p53, in einem autoregulatorischem Loop, Ubiquitin-abhängig an p53 binden und dieses inaktivieren (Degradation). Ist jedoch, wie in zahlreichen Tumorzellen, p53 mutiert, kann das Protein MDM2 (mouse double minute 2) nicht mehr an p53 binden und dessen Funktion als Transkriptionsfaktor blockieren. Es resultiert eine Akkumulation von p53 und einer Reihe nicht funktionsfähiger Proteine in der Zelle. p53 kann auf zellulären Stress mit Zellzyklusarrest oder Apoptoseinduktion antworten. Letzteres kann abhängig vom Zelltyp transkriptionsabhängig oder unabhängig geschehen. In vielen Zellreihen wird dafür durch p53 die Transkription von BAX induziert. BAX ist ein proapoptotisches Gen, welches mitochondriale Poren formt und dadurch zu einem Ausstrom von Cytochrom-c aus Zytosolen führt, welche wiederum ihrerseits die beschriebene Caspasenaktivierung und damit die Apoptose der Zelle zur Folge hat. Es kann jedoch auch, abhängig von bestimmten Faktoren, zunächst ein WAF1-induzierter Zellzyklusarrest eintreten. Dabei werden durch WAF1, selbst hochreguliert durch p53, Cyclin-abhängige G1-Kinasen inhibiert und der Zellzyklusprogress von G1 zur S-Phase geblockt. So bekommt die Zelle zunächst die Chance, notwendige Reparaturen durchzuführen. Erst wenn diese auch nicht erfolgreich sein sollten, wird erneut der Apoptosemechanismus aktiviert (Abb. 5) (Levine, 1997; Kirsch et al., 1998).

Außer den beschriebenen transkriptionsabhängigen Apoptoseinduktionswegen kann p53 auch durch direkte Translokation zum Mitochondrium und Bindung an anti- und proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und damit Apoptose auslösen (Moll et al., 2005).

Ob nun eine Zelle einen p53-abhängigen Zell-Zyklusarrest oder den Apoptoseweg einschlägt, ist abhängig von zahlreichen Faktoren, unter anderem: DNA-Schädigungslevel, Zelltyp, Zellzyklusphase und das Vorhandensein externer Wachstums- und Überlebensfaktoren.

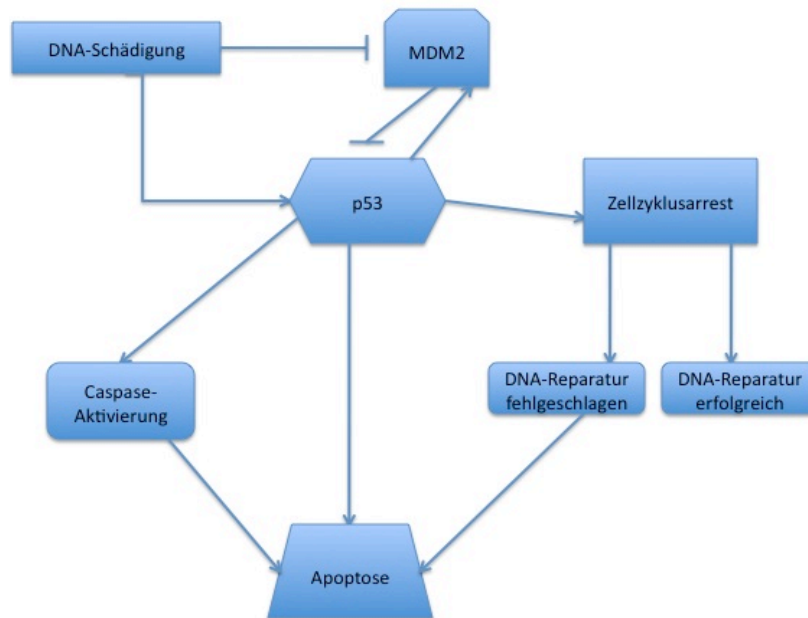


Abb. 5.: Vereinfachte Darstellung des p53-Wirkmechanismus nach einer DNA Schädigung.

Nach einer DNA-Schädigung, wie UV-Bestrahlung, kommt es durch eine p53-Phosphorylierung zu einer Akkumulation des Proteins. Zusätzlich wird MDM2 ebenfalls durch eine Phosphorylierung in seiner Funktion als p53-Blocker gehemmt, welches ebenfalls zu einer p53-Hochregulierung führt. p53 kann dann seinerseits entweder eine Apoptose induzieren (Caspase-abhängig oder-unabhängig) oder einen Zellzyklusarrest herbeiführen, damit der Zelle Zeit für eine DNA-Reparatur gegeben wird. Kann dies jedoch nicht (mehr) erfolgreich durchgeführt werden, wird die Apoptose in Gang gesetzt.

Neueste Daten zeigen zudem, dass das mutierte p53-Gen nicht nur durch Verlust bestimmter regulatorischer Funktionen, sondern auch durch neu erworbene „mutierte“ Fähigkeiten eine wesentliche Rolle in Tumorzellen spielt (Goldstein et al., 2010).

Wichtige Ziele aktueller Forschungsarbeiten sind unter anderem p53-abhängige Therapiekonzepte bei Tumoren, Ischämien, oder sonstiger Zellschädigungsmechanismen, bei denen p53 eine Rolle spielt.

1.6.1. p53 und S100B

Das S100B-Protein ist hochreguliert in zahlreichen Tumoren und wird zur Klassifizierung von einigen Tumorarten verwendet (Pedrocchi et al., 1994). Besonders in Astrozytomen konnten erhöhte Konzentrationen nachgewiesen werden (Castets et al., 1997).

Die Rolle von S100B in menschlichen Tumorzellen ist immer noch nicht vollständig entschlüsselt und bildet den Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen. S100B bindet am C-terminalen Ende sowie der Oligomerisierungsdomäne von p53 und verhindert so dessen Tetramerisierung (tetramerer Formation) und Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (Baudier et al., 1992; Delphin et al., 1999). Beide Vorgänge sind essentiell für die p53-Aktivierung und damit dessen intrazelluläre Funktion (Giaccia et al., 1998).

Die Interaktion dieser beiden Proteine ist umso interessanter, weil beide den Zellzyklus beeinflussen, eine Überexprimierung in Tumorzellen zeigen und als Tumormarker auf eine Tumorprogression hindeuten können (Schafer et al., 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass Überexprimierung von S100B die transkriptionale Aktivität und DNA Bindungskapazität von p53 signifikant senkt und die Expressierung von Effektorgenen inhibiert (Jing et al., 2001).

Trotz dieser sehr interessanten und evtl. weitreichenden Befunde ist eine mögliche Bedeutung der S100B-p53-Interaktion in Neuronen noch weitestgehend unerforscht. Dementsprechend war es für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung eine evtl. Involvierung von p53 bei der neuroprotektiven oder neurotoxischen Wirkungsweise von S100B aufzuzeigen.

1.7.NFκB:

Der Transkriptionsfaktor NFκB, erstmals entdeckt 1986 als ein notwendiger nukleärer Faktor für die Transkription der Immunglobulin-κ-Leichtketten in B-Zellen, ist ein evolutionär angelegtes Regulatorprotein zur schnellen zellulären Antwort auf zahlreiche Reize wie Entzündungen, Verletzungen oder Stress (Sen et al., 1986; Kopp et al., 1995). NFκB spielt auch bei zahlreichen Zellvorgängen wie Regulierung der Immunantwort, der Entzündungsreaktion, der Zellproliferation, der Differenzierung, der Apoptose und der Überlebensmechanismen eine wichtige Rolle (Gutierrez and Davies, 2011). Nach einem entsprechenden Signalreiz im Körper werden bestimmte Messenger-Proteine gebildet (meistens Zytokine durch Immunzellen) die zunächst zu einer Aktivierung von NFκB führen. Der zytoplasmatische Transkriptionsfaktor NFκB seinerseits wandert nach seiner Aktivierung direkt in den Zellkern und bindet dort an seine Zielgene. Die Tatsache, dass NFκB bereits in inaktiver Form im Zytoplasma existiert und keine neue Proteinsynthese benötigt, verleiht dem Signalweg dabei seinen einzigartig schnellen Charakter.

Zahlreiche weitere Stimuli, wie virale und bakterielle Produkte sowie intra- und extrazellulärer Stress, können zu einer Aktivierung von NFκB führen. Zu den zahlreichen Proteinen die dann durch NFκB-Zielgene reguliert werden gehören: Zytokine (z. B.: IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNFα etc.), Chemokine (z. B.: IL-8), Adhäsionsmoleküle (z.B.: ICAM, VCAM etc.) und Akut-Phase-Proteine (Ghosh et al., 2002).

NFκB kommt bei jeder Zellart vor und besteht in Säugetieren aus einer Gruppe von Homo- und Heterodimeren. Diese sind zusammengesetzt aus fünf Proteinen, deren Gemeinsamkeit eine Domäne von etwa 300 Aminosäuren ist - die N-terminale Rel-Homologie-Domäne. Die fünf Protein-Mitglieder sind: Rel (c-Rel), RelA(p65), RelB, NFκB1 (p50 und sein Precursor p105) und NFκB2 (p52 und sein Precursor p100) (Ghosh et al., 1998).

Am häufigsten wird die NFκB Funktion hierbei durch zwei große Komplexe vermittelt:

1. p50/p65: welches als Transkriptionsaktivator fungiert
2. p50/50: mit einer transkriptionshemmenden Eigenschaft

Normalerweise existiert NFκB zunächst in einer inaktiven Form im Zytoplasma, da er an Inhibitoren der κB-Einheit (IκB) gebunden ist. Die IκB-Familie besteht ihrerseits ebenfalls aus fünf Mitgliedern: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBY, Bcl-3 und die Precursor Rel-Proteine p100 und p105 (Ghosh et al., 1998). Nach einem entsprechenden Reiz kommt es zu einer Phosphorylierung von IκB durch die IκB-Kinase (IKK) und zu einer anschließenden Ubiquitinierung und Abbau durch den 26S Proteasom (Li et al., 1999). Der freigesetzte NFκB p50/p65 Komplex kann nun zu seinen Zielgenen im Nukleus translozieren und diese aktivieren (Abb. 6).

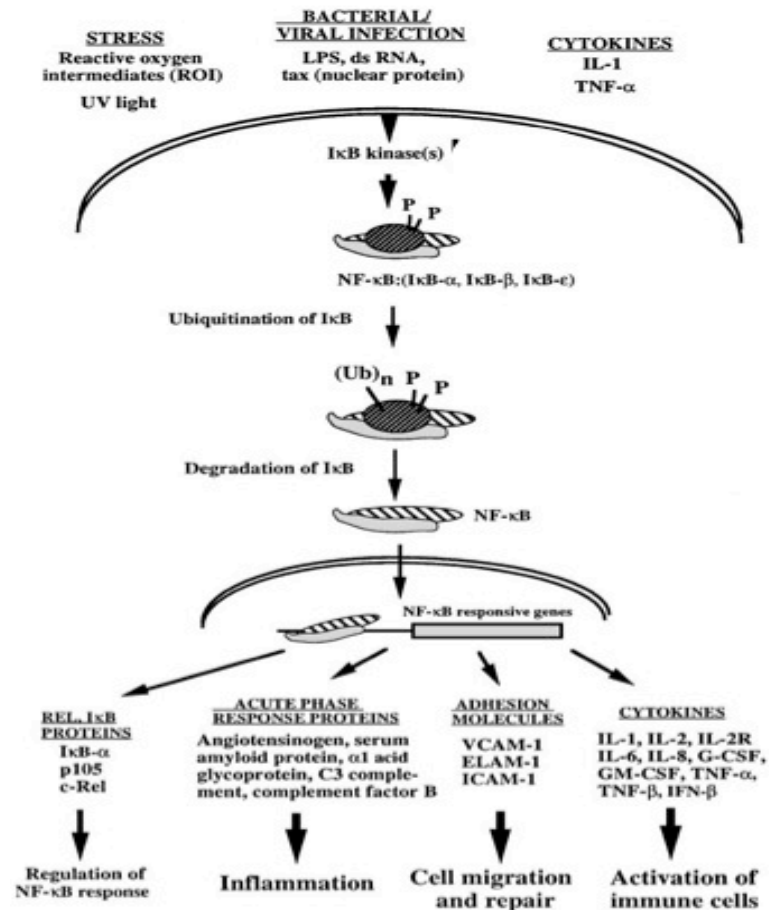


Abb.6: Mechanismus der NFκB-Aktivierung

NFκB Homo- und Heterodimere sind im Zytosol der Zelle transkriptionsinaktiv gebunden an ihre Inhibitoren IκBα, IκBβ und IκBε. Nach einem extrazellulären Stress- oder Infektionssignal kommt es zu einer Aktivierung von IκB-Kinasen mit Phosphorylierung des IκB-Proteins. Dies führt zu einer anschließenden Ubiquitinierung und Degradation des Inhibitors. Der nun „freie“ NFκB-Komplex kann in den Nucleus translozieren und die Expression seiner Zielgene regulieren, welche unter anderem in der Immun- und Entzündungsreaktion eine Rolle spielen (modifiziert nach Gosh et al., 1998).

Leider wird der sehr effektive NFκB-Signalweg auch von Tumorzellen benutzt, und erzeugt so z. B. eine Resistenz gegenüber einer Radio- oder Chemotherapie. Hier liegt aber auch gleichzeitig durch eine evtl. Inhibierung von NFκB eine Chance für zukünftig erfolgreichere Tumorthérapien (Luo et al., 2005).

1.7.1. Rolle von NFκB in Neuronen

Auch im zentralen Nervensystem obliegt NFκB die Regulierung der Expression zahlreicher wichtiger Zielgene, die unter anderem in der neuronalen Entwicklung und Funktion, sowie der Zellrezeptorbildung von Bedeutung sind (Mitra et al., 2010). Außerdem gibt es aktuelle Beschreibungen, dass NFκB bei der Neurogenese (Koo et al., 2010), periphere Nervenmyelinisierung (Limpert and Carter, 2010) sowie bei zahlreichen Aspekten des Lernens und des Gedächtnisses (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009) wesentlich mit involviert ist.

Die Rolle von NFκB in Bezug auf neuronaler Apoptose wird z. T. immernoch kontrovers diskutiert und verschieden beschrieben. Zum einen wird, unter anderem auch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dem Transkriptionsfaktor NFκB eine Neuroprotektive Rolle zugeschrieben. So nimmt NFκB bei einer durch Glutamat, oxidativen Stress oder Amyloid β-Peptid induzierten neuronalen Apoptose eine zellschützende, überlebensfördernde Funktion ein (Kögel et al., 2005; Qin et al., 2007). Gleichzeitig wird von einigen Autoren eine neurodegenerative, apoptosefördernde Wirkung von NFκB besonders unter ischämischen oder inflammatorischen Bedingungen in den Vordergrund gestellt (Malek et al., 2007).

Diverse Erklärungen versuchen die unterschiedlich beobachteten Wirkmechanismen von NFκB zu deuten. So wird unter anderem ungleiche Wirkungen von NFκB in verschiedenen Zelltypen wie Neuronen (Neuroprotektion) und Gliazellen (Induktion von Inflammation, Autoimmunreaktionen und ischämischen Prozessen) als mögliche Erklärung angesehen (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009). Außerdem wird die Aktivierung verschiedener Untereinheiten und der Zeitpunkt der NFκB-Aktivierung als mögliche Ursachen der z. T. konträren Effekte bzgl. der Neuroprotektion angebracht (Teng and Tang, 2010; Sarnico et al., 2009).

1.8. Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des Proteins S100B im Rahmen von neuronalen Zelltodmechanismen zu untersuchen. Hierfür sollte die neuroprotektive oder neurotoxische Rolle von S100B in humanen Neuroblastomzellen und primären hippokampalen Neurone der Ratte beim exzitotoxischen Zelltod sowie während der Induktion einer DNA-Schädigung erforscht werden.

Um möglichst aussagekräftige, reliable Ergebnisse zur S100B-Rolle bei der neuronalen Zellschädigung zu gewinnen, wurden die Experimente, zusätzlich zur Untersuchung in zwei verschiedenen neuronalen Zellmodellen, mit z. T. sehr unterschiedlich wirkenden, zelltod- und apoptosefördernde Mechanismen und Chemikalien (NMDA, Hypoxie, UV, Epoxomicin, Etoposid) geplant und wiederholt.

Neben der Beantwortung der Frage nach einer neuroprotektiven oder neurotoxischen Eigenschaft von S100B in den verschiedenen Zelltodmodellen galt es die möglichen zugrunde liegenden Signaltransduktionswege mit Veränderungen im Proteinlevel und bei der Genexpression näher zu erforschen und zu beschreiben.

Ein mögliches Regulatorprotein im Kontext von neuronalem Stress ist NFκB (siehe 1.4.1). Ein neuroprotektiver Effekt von S100B nach NMDA-Schädigung in Neuronen, der durch NFκB vermittelt wird, ist in einer vorherigen Arbeit unserer Arbeitsgruppe postuliert worden (Kögel et al., 2005). Zu Beginn dieser Arbeit gab es sonst nur vereinzelt Hinweise auf eine mögliche Interaktion von S100B und NFκB bei neuronaler Apoptose (Lam et al., 2001). Bis heute werden die Hinweise für die Vermittlung der neuroprotektiven Eigenschaft von S100B durch NFκB in der Literatur zwar immer häufiger, sind jedoch weitestgehend in ihren jeweiligen Mechanismen noch unvollständig verstanden (Villareal et al., 2011; Bianchi et al., 2008).

So gab es im Rahmen dieser Arbeit unter anderem die Zielsetzung, die durch S100B aktivierten Signaltransduktionswege im Rahmen einer exzitotoxischen Zellschädigung, die zu einer evtl. Aktivierung von NFκB führen können, zu erforschen. Zwei der allgemein wichtigsten Überlebenssignalwege in der Zelle, die auch in Neuronen vorhanden und in anderen Zusammenhängen schon mehrfach untersucht worden sind, sind zum einen der MEK/ERK- und zum anderen der PI3k/Akt-Signalweg (siehe Kap. 4.4). Beide Wege können in Neuronen nach einem Stressreiz besonders schnell durch eine Aktivierung überlebenswichtiger Kaskaden, unter anderem durch eine Hochregulierung von NFκB, antworten und sollten dementsprechend auch in unserem Modell untersucht werden (Yokota et al., 2011; Kim et al., 2009).

Außerdem sollte in diesem Rahmen auch der Frage nachgegangen werden, ob das von Zellen exprimierte S100B seine Wirkung auf die Neurone durch Interaktion mit best. Zelloberflächenrezeptoren ausübt oder (zusätzlich) nach einer Aufnahme in die Zelle direkte Wechselwirkungen mit bestimmten Zielproteinen zeigt.

Eines dieser möglichen Proteine, welches unter physiologischen Bedingungen als Transkriptionsfaktor zahlreiche Regulatorfunktionen einnimmt, ist p53 (siehe Kap. 1.3). Nach einer DNA-Schädigung und dementsprechend auch in zahlreichen Tumorarten wird es hochreguliert und kann einen Zellzyklusarrest und/oder eine Apoptose initiieren. Trotz Hinweisen auf eine direkte Wechselwirkung von S100B und p53 (Fernandez-Fernandez et al., 2008) wurde dies im Rahmen einer DNA-Schädigung in Neuronen noch nicht untersucht und sollte ebenfalls durch die vorliegende Arbeit ebenfalls erforscht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

- **SHSY5Y**: humane Neuroblastom-Zelllinie, Subklon der SK-N-SH Linie
- **primäre Rattenneurone**: Hippokampale Neurone der Neugeborenen Ratte

2.1.2. Geräte

Gerät (Bezeichnung)	Hersteller
Analytik Waage BP61	Sartorius, Göttingen
Blotkammer	Biometra, Göttingen
Cleanbench (Herasave)	Haereus, Hanau
Cleanbench (Technoflow)	Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Elektrophoresekammer PAGE	Biorad, München
ELISA-Reader (HTS 7000)	Perkin Elmer, Langen
Fluoreszenzmikroskop (TE2000S)	Nikon, Düsseldorf
Gel-Dokumentationssystem	MWG Biotech
Gelstand für SDS-Page	Biorad, München
Geltrockner	Biorad, München
Inversmikroskop (TE300)	Nikon, Düsseldorf
pH-Messgerät (pH 530)	Knick, Berlin
Reinstwasseranlage (Seralpur Delta)	Seral, Ransbach-Baumbach
Spannungsgeber (EPS 300)	Pharmacia, Freiburg
Spannungsgeber (PowerPac 200/300)	Biorad, München
SPOT2 Kamera	Diagnostic Instruments / Visitron, Puchheim
Thermocycler (Mastercycler)	Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge (Biofuge 13)	Haereus, Hanau
UV Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Freiburg
Vakuumpumpe (MZ2)	Vacuubrand, Wertheim
Wärmeschrank	WTB Binder, Tuttlingen
Zellkulturschrank (HeraCell)	Heareus, Hanau

2.1.3. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acylamid 39 % (w/v) und N,N'-Methylenbisacrylamid 1 % (w/v)	Serva Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	Delta Pharma Boehringer
Caspase-3 Inhibitor (zDEVD-fmk)	Alexis, Grünberg
Caspase-Inhibitor I (zVAD-fmk)	Alexis, Grünberg
CHAPS	AppliChem
Cytosin- β -D-Arabinofuranosid (CAF)	Sigma (St.Louis, Mo, USA)
D-(+)-Glucose-Solution	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (St.Louis, Mo, USA)
100 bp DNA-Leiter	Promega, Mannheim
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Etoposid	Alexis
Epoxomicin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hepes Buffered Saline Solution (HBSS)	Cambrex
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Glycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Leupeptin	Bachem, Heidelberg
LY294002 (gelöst in DMSO)	Sigma, St. Louis, Mo, USA
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PD98059	Alexis, Grünberg

Papain	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS Puffer	AppliChem
Phosphatase-Inhibitor Cocktail I u. II	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rotiphorese [®] Acrylamid 30 % (m/v), N,N'-Methylenbisacrylamid 0,8 % (m/v)	Roth, Karlsruhe
S100B	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sea Blue Plus 2 [®] Prestained Protein Standards	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
Saccharose (Sucrose)	AppliChem
Staurosporine (STS)	Alexis, Grünberg
Taq-Polimerase	Amersham Biosciences, Freiburg
TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TNF- α	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-HCL	Promega, Mannheim
Triton [®] X-100 (p-t-Octylphenylpolyoxyethylene)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Bio Whittaker, Taufkirchen
Trypsin	Sigma, St.Louis, Mo, USA
Trypsin-Inhibitor Typ II-O Hühnereiweiß	Sigma, St.Louis, Mo, USA
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm

2.1.4. Kulturmedien, Seren und Zusätze

Substanzen	Hersteller
B27 [®] Serum Supplement	Life Technologies, Karlsruhe
BSA (Bovines Serum Albumin)	PAA, Cölbe/Life Technologies, Karlsruhe
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)	Life Technologies, Karlsruhe

Fungizone (Amphotericin B)	Life Technologies, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe/Life Technologies
L-Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
Glutamax [®]	Life Technologies, Karlsruhe
MEM II 10x	Life Technologies, Karlsruhe
NU [®] Serum	Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin (10.000 I.E.) / Streptomycin (10 mg/ ml)	Life Technologies, Karlsruhe
RPMI 1640	Life Technologies, Karlsruhe

2.1.5. Antikörper

2.1.5.1. Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller
Anti-p53, Kaninchen IgG, polyklonal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti- β -Tubulin (Maus, monoklonal)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-ERK1	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-ERK2	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-JNK1	BD Biosciences, Hamburg
Anti- c-Rel	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti- p65	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti- p50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
I κ B α	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.1.5.2. Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti-rabbit IgG (HRP-konjugiert)	Promega, Heidelberg
Anti-Maus IgG (HRP-konjugiert)	Promega, Heidelberg
Oregon Green 488 Konjugat	Molecular Probes
Streptavidin, Alexa Fluor [®] 556 Konjugat	Alexis

2.1.6. Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
Bax	5` - AGC TCT GAG CAG ATC ATG AAG AC -3`(sense) 5` - CCA TCT TCT TCC AGA TCG TGA G -3`(antisense)
VEGF	5` - AAG CCA TCC TGT GTG CCC CTGATG -3`(sense) 5` - GCT CCT TCC TCC TGC CCG GCT CAC-3`(antisense)
WAF 1	5` - GGT AGA AAT CTG TCA TGC TGG TC -3 (sense) 5` - ATG GAA CTT CGA CTT TCT CAC -3`(antisense)
GAPDH	5` - CTC GTG GTT CAC ACC CAT -3`(sense) 5` - GGC TGC CTT CTC TTG TGA -3`(antisense)
NOXA	5` - AGT CGA GTG TGC TAC TCA ACT CA-3`(sense) 5` - TGA TGT ATT CCA TCT TCC GTT TC- 3`(antisense)
PUMA (bbc3)	5` - TCA GCC CTC GCT CTC G -3`(sense) 5` - CAC CTA ATT GGG CTC CAT CTC -3`(antisense)
Receptor of advanced glycation products (RAGE)	5` - GGT CAA GTC CAA CTA CCG AGT C-3`(sense) 5` - TGC AGG AAT AGG TAG GAG TGG T-3`(antisense)

2.1.7. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
3 MM [®] Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
8-well Chamber Slides	Falcon, Wiesbaden
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulose Membranen (0,25µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Pipettenspitzen	Starlab
PCR-Tubes 0,2 ml	Eppendorf
Röntgenfilme, Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Saran Folie [®]	Saran, SC Johnson Wax, Haan
Stripetten 2, 5, 10, 25 ml	Coring
Zellkulturflaschen/-platten/-schalen	Greiner, Solingen

2.1.8. Verwendete Kits

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay Kit®	Uptima / KMF, Köln
Qiafilter endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Super Signal Chemiluminiszenzreagenz Pico und Femto	Pierce/Perbio Science, Bonn

2.1.9. Verwendete Software

Adobe Photoshop 7.0

SPOT Version 2.2.1

SPSS Version 11.0

MS Office 2010

Citavi Literaturverwaltung

Primer3 Primeranalysen :

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

PubMed Nucleotidsequenzanalysen :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturmethoden

2.2.1.1. Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellen (SHSY5Y und primäre hippokampale Zellen) wurden in einem Inkubator bei 37 °C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Zu den verschiedenen Kulturmedien (RPMI 1640, DMEM) wurden 10 % Kälberserum, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penicillin addiert. Das Serum wurde jedesmal vor Verwendung zur Inaktivierung des Komplements in einem Wasserbad mit 56 °C für 30-60 min inkubiert. Das so fertiggestellte Medium wurde bei 4 °C gelagert und innerhalb eines Monats aufgebraucht.

2.2.1.2. Mediumwechsel und Passagieren von Zellen

Um eine ausreichende Nährstoffzufuhr zu garantieren wurde bei den SHSY5Y Zellen alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierfür wurde das bestehende Medium zunächst abpipettiert und die Zellen mit PBS (ohne Ca⁺ oder Mg⁺ Zusatz) vorsichtig gewaschen. Dabei wurden bereits abgestorbene oder abgelöste Zellen und Reste des vorherigen Mediums entfernt. Nach PBS-Entfernung wurde erneut eine ausreichende Menge an Medium hinzugegeben und die Zellen im Brutschrank weiter kultiviert.

Je nach Zelldichte und Grösse der Kulturflasche wurde in regelmäßigen Zeitabständen ein Passagieren der Zellen in neue Flaschen notwendig. Zu diesem Zweck werden die Zellen zunächst wie oben beschrieben mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5-2ml - abhängig vom Monolayer) für ca. 2-3 min im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen von ihrer Unterlage wurde mit dem Lichtmikroskop kontrolliert und neues serumhaltiges Medium hinzugegeben, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Zellen mit Medium wurden in einem 15 ml Röhrchen aufgefangen und bei 1000 rpm für 3 min pelletiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer geringen Menge frischen Mediums resuspendiert. Die Zellen wurde in einer Neubauer Zählkammer (siehe unten) ausgezählt, so dass alle Subkulturen eine definierte Menge an Zellen beinhalten. Diese wurden in ausreichend viele Kulturgefäße mit Medium überführt und im Brutschrank erneut kultiviert.

2.2.1.3. Zellzahlbestimmung und Aussähen der Zellen

Für die Durchführung von Experimenten war es meist notwendig, Zellen in Gewebekulturplatten (6-, 12- oder 24-Loch) zu transferieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst, wie beim Passagieren der Zellen oben beschrieben, ein Pellet gewonnen und in Medium resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in einem Neubauer-Hämozytometer gegeben und die Zellzahl bezogen auf 1 ml folgendermaßen bestimmt:

Die Zellen in einem Großquadranten wurden unter dem Mikroskop gezählt. Der Mittelwert von mind. 4 Großquadranten multipliziert mit dem Faktor 10^4 und dem Verdünnungsfaktor ergab die Zellzahl pro ml.

Für die Übertragung auf die Vertiefungen der Kulturplatten wurde eine Zellzahl von etwas 3×10^4 Zellen pro ml berechnet.

2.2.1.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen werden diese nach Protokoll des Passagierens zunächst vom Untergrund der Kulturflasche abgelöst, um dann bei RT für 10 min mit 13.000 Upm abzentrifugiert zu werden. Der Überstand wird abgehoben und das Pellet in 500µl (entsprechend der Menge des Pellets) Kulturmedium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. In gleicher Volumenmenge wird Frostalösung zugegeben und mit einer Mikropipette mit der Zellsuspension homogenisiert. Anschließend werden immer 1 ml an Zelllösung in Kryoröhrchen gegeben, diese gut verschlossen und in einer Isopropanolappartur bei - 80 °C für 1-2 Tage eingefroren. Danach werden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff überführt und bei -196 °C gelagert.

Zum Auftauen werden die zuvor im Stickstoffcontainer gelagerten Kryoröhrchen möglichst schnell im Wasserbad aufgetaut, 5 ml frisches, 37 °C warmes Kulturmedium werden vorsichtig hinzugegeben. Nach Durchmischung wird das DMSO, in dem die Zellen unter anderem eingefroren waren, durch Zentrifugation bei 1000 Upm und 3 min mit dem Überstand entfernt. Das Pellet wird wiederum mit 1ml Kulturmedium resuspendiert und entsprechend der benötigten Menge in sterile Kulturflaschen überführt und in Kultur genommen.

2.2.1.5. Vitalitätsbestimmung

Eine wichtige und relativ schnelle Methode zur Vitalitätsbestimmung ist der Trypanblau-Ausschlusstest. Hierfür wurde aus einer suspendierten Zellkultur ein Aliquot entnommen und mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Unter dem Lichtmikroskop zeigten sich dann lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran farblos, tote Zellen jedoch tiefblau, da der Farbstoff aufgrund der defekten Zellmembran ungehindert eindringen kann. Für die Auswertung wurden die Zellen in einer Neubauer-Hämozytometer wie in 3.1.7 beschrieben ausgezählt.

2.2.1.6. Präparation hippokampaler Neurone

Zur Isolierung und Verarbeitung der Hippokampi wurde ein etabliertes Protokoll (Krohn et al., 1998) benutzt. Hierzu wurden Neonatale (P0-P1) Fischer 344- oder Wistar Unilever-Ratten unter sterilen Bedingungen dekapitiert, die Hippokampi sorgfältig herauspräpariert und in Lösung 1 gelagert. Nachdem dieser Schritt bei allen Ratten durchgeführt wurde, wurden die Hippokampi von Gefäßresten und umgebendes Restgewebe befreit und zum Verdau in Lösung 2 gegeben. Nach 20 min. Inkubation im Wasserbad bei 37 °C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Gewebe in 2 ml Kultivierungsmedium (MEM II ohne B27) resuspendiert. Nach einer kurzen Sedimentationszeit bei der undissoziierte Gewebereste sich absetzen wurde der Überstand in Lösung 3 überführt.

Dieser Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (10 min. bei 600U/min) und der Überstand erneut abpipettiert. Die so gewonnenen hippokampalen Neurone wurden in ausreichender Menge Kulturmedium (MEM II) resuspendiert und verteilt.

Lösung 1: 0,02% BSA in DMEM

Lösung 2: Lösung 1 + Papain (1:1)

Lösung 3: 1% BSA

1% Trypsin-Inhibitor (Typ II-O Hühnereiweiß)

MEM II ohne B27

MEM II : MEM Medium (10 x konz.)

10% NU® - Serum

2 mM L-Glutamin

20 mM D-Glucose

26,2 mM Natriumhydrogencarbonat

100 IE/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin

2% B-27 Serum-Supplement (50 x konzentriert)

2.2.1.7. Kultivierung hippokampaler Neurone

Nach der Präparation wurden die Zellen in hierfür speziell beschichtete 6- oder 24-Loch-Platten (siehe unter 2.2.1.8.) pipettiert. In MEM II Medium wurden die Zellen dann im Brutschrank mit 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die erste von zwei Behandlungen mit 1 µM des Zytostatikum Cytosin-β-D-arabinofuranosid (CAF). Mit CAF soll das Wachstum eventuell mitpräparierter Gliazellen verhindert werden. Auf die mitotisch nicht mehr aktiven hippokampalen Neurone hat es jedoch keinen Einfluss. Nach 24 h wurde der Mediumwechsel mit frischem MEM II und neuem CAF wiederholt und bis zu den experimentellen Behandlungen am 12-14 Tag so belassen.

2.2.1.8. Beschichtung von Kulturgefäßen

Um eine bessere Anheftung und damit auch Kultivierung der primären hippokampalen Neurone zu gewährleisten, wurden die benutzten 6- oder 24-Loch-Platten zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet. Diese polymerisierte Aminosäure baut durch eine negativ geladene Oberfläche eine elektrostatische Wechselwirkung mit der Zellmembran auf und fördert damit die Adhäsion. Hierfür wird Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) in einer 1:1 Mischung von 1,25 % Borsäure und 1,91 % Borax (Natriumtetraborat) gelöst und sterilfiltriert. Die Lösung wird steril in die Vertiefungen der Platte gegeben und für 24 h dort belassen. Danach wird sie wieder entfernt, die Platte mit Aqua dest. vier mal gewaschen und anschließend unter Raumtemperatur getrocknet. Innerhalb einer Woche mussten die so behandelten Gewebekulturplatten benutzt werden.

2.2.1.9. Fixierung von hippokampalen Neuronen

Um hippokampale Neurone für längere Zeit aufzubewahren und für spätere Färbungen und immunhistochemische Untersuchungen geeignet zu erhalten, wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Hierbei werden lösliche Zellbestandteile in unlösliche überführt. Freie Aminogruppen benachbarter Proteine werden durch das hinzugegebene Aldehyd unter Erhaltung der Zellarchitektur miteinander vernetzt. Ein positiver Nebeneffekt ist die dabei häufig auftretende Denaturierung der Proteine was bei der Immunzytochemie die Anbindung des Antikörpers an das Antigen deutlich erleichtert.

Für die Herstellung der Fixierlösung wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 60 ml Aqua dest. auf 60 °C erwärmen
- + 4 g Paraformaldehyd
- + 2 Tropfen NaOH
- + 10 ml 10fach konzentriertes PBS
- + 4 g Sucrose
- Auffüllen mit Aqua dest. auf 100 ml
- pH-Wert Einstellung auf 7,4 nach Abkühlung auf Raumtemperatur

Für den Fixierungsprozess wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit der 37°C warmen Fixierlösung bedeckt und 20 min. im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Lösung wieder abpipettiert und die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend konnten die Zellen, bedeckt mit PBS und mit Parafilm luftdicht verschlossen, im Kühlschrank gelagert werden.

2.2.2. In-vitro Schädigungsmodelle:

Wie oben beschrieben wurden hippocampale Neurone der Ratte und humane SHSY5Y-Neuroblastomzellen kultiviert, ausgesät und für folgende Zellschädigungen und Behandlungen vorbereitet:

2.2.2.1. NMDA-Schädigungsmodell:

NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) ist ein synthetischer Ligand, der in-vitro die Toxizität des exzitotoxischen Neurotransmitters Glutamat nachahmt. Es wird deshalb in Schädigungsmodelle zur Erforschung von neuronalen Krankheitsbildern mit einer Übererregung von Glutamatrezeptoren eingesetzt (Lankiewicz et al., 2000).

Für die Experimente wurden den primärenhippokampalen Rattenneurone zwischen dem 12. und 14. Tag das Medium abpipettiert und die Zellen mit Mg^{2+} -haltigem HBS zweimal gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen 5 min lang mit 300 μ M NMDA-haltigem HBS mit 0,1 μ M Glycin (als Kofaktor an NMDA-Rezeptoren) und 0,5 μ M Tetrodotoxin (Verhinderung spontaner neuronaler Aktivität) inkubiert, erneut gewaschen und wieder dem ursprünglichen Medium zugeführt. Zuvor wurde die Hälfte der Zellen für die jeweils angegebene Zeitdauer mit 20 ng/ml S100B präinkubiert und Kontrollen ohne Schädigung mit und ohne S100B angelegt. 24 Stunden nach NMDA Behandlung wurden die Zellen aus dem Brutschrank entnommen und den weiteren Untersuchungsmethoden zugeführt.

2.2.2.2. Hypoxie/Anoxiemodell

Um den Effekt von S100B nach einer Hypoxieschädigung zu untersuchen und dabei den klinischen Zustand z. B. nach einem Schlaganfall besser zu simulieren, wurden SHSY5Y Zellen und primäre Hippokampale Zellkulturen zunächst gleichmäßig ausgesät. Nach 24h wurden SHSY5Y-Zellen und nach 12-14 Tage die primären hippokampalen Neurone mit einer dann vergleichbaren optischen Konfluenz in einer Anoxiekammer (GasPak 150 Anaerobic System, BD Biosciences, Heidelberg) unter anoxischen Bedingungen mit ca. 5 %-iger O₂-Konzentration bei 37 °C für die jeweils geplante Dauer kultiviert. Nach Abschluss der Behandlung wurden die jeweiligen Nachweismethoden angewandt.

2.2.2.3. DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung und Etoposid

Eine hier modellhaft eingesetzte Methode zur DNA-Schädigung ist die UV-Bestrahlung. Durch UV-Strahlung kommt es zur direkten DNA Schädigung, hauptsächlich verursacht durch die Formation von Pyrimidin-Dimeren (Schreiber et al., 1995). Hierbei kommt es zu einer p53-Aktivierung und Einleitung der Apoptose (Sanchez and Elledge, 1995).

Für dieses Modell wurden die Zellen in vorher bestimmte Platten ausgesät und SHSY5Y Zellen für 24h, primäre hippokampale Neurone zwischen 12 und 14 Tage kultiviert. Anschließend wurde den Zellen das Medium entzogen, die Zellen in einer UV-Kammer einer Bestrahlungsintensität von 100 J/m² ausgesetzt und das abpipettierte Medium wieder zurück gegeben. Die Zellen werden dann wieder erneut im Brutschrank für eine bestimmte Zeit kultiviert und anschließend den weiteren Untersuchungsmethoden zugeführt.

Ein weiteres Modell zur DNA-Schädigung, p53-Aktivierung und Apoptoseeinleitung ist die Behandlung mit Etoposid. Dieses Zytostatikum führt als Topoisomerase II Inhibitor (ein wichtiges Enzym in der DNA-Replikation) zu einem Funktionsverlust der Topoisomerase II. Dementsprechend kommt es zu einer fehlerhaften DNA-Reparatur, Replikation, Transkription, Rekombination und schlussendlich zur p53 Aktivierung und Apoptoseeinleitung (Li et al., 2001).

Für dieses Modell wurden erneut wie oben beschrieben die hippokampalen Neurone und SHSY5Y-Zellen ausgesät und vorbereitet. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ M Etoposid (in DMSO) für die jeweils angegebenen Zeiten im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Vorher wurde die Hälfte der Zellen für bestimmte Zeiten mit S100B (200 ng/ml) präinkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen den entsprechenden Untersuchungsmethoden zur weiteren Evaluation zugeführt.

2.2.2.4. Proteasomaler Stress und p53 Aktivierung durch Epoxomicin

Ein weiteres in dieser Arbeit eingesetztes Apoptosemodell ist eine proteasomale Inhibition mit p53-Steigerung und Caspase-Aktivierung durch den spezifischen und potenten Inhibitor Epoxomicin (Kloetzel, 2001). Das 26S-Proteasom ist für den Abbau von ubiquitinierten Proteinen verantwortlich und kontrolliert unter anderem den Abbau defekter oder kurzlebiger Proteine, welche wichtige Regulatorfunktionen bei der Zellteilung, Transkription, Zelldifferenzierung, Apoptose und Signalprozessierung einnehmen. Eine Fehlfunktion hat meist verheerende Folgen für den Zellzyklus, DNA-Reparaturmechanismen und das Überleben der Zelle (King et al., 1996, Ciechanover et al., 2000). In den hier durchgeführten Experimenten wurden primäre hippokampale Neurone der Ratte und humane SHSY5Y Zellen nach den unter Kap. 2.2.1. beschriebenen Methode vorbereitet, zur Hälfte mit 200 ng/ml S100B für 4h präinkubiert und anschließend einer Behandlung von 50 nM Epoxomicin (in DMSO) unterzogen. Die bereits mit S100B präinkubierten Zellen wurden zusätzlich weiterhin mit 200 ng/ml S100B behandelt. Die Kontrollen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO mit und ohne S100B behandelt. Der Effekt auf die induzierte Apoptose wurde mittels eines Caspase-Assays untersucht.

2.2.3. Proteinchemische Methoden

2.2.3.1. Caspase 3 Aktivitäts-Assay

Caspasen sind die Schlüsselenzyme der Apoptoseeinleitung nach einem intrinsischen und/oder extrinsischen Stress-Stimulus (siehe Einleitung). Durch beide Signalwege werden verschiedene Initiatorcaspasen aktiviert, die alle einen gemeinsamen Ablauf ab dem Level der sog. Effektor-Caspasen (3, 6 und 7) haben. Zur Apoptoseuntersuchung kann man nun die Aktivität von Caspasen, die zu einer Spaltung eines fluoreszierenden Acetyl-DEVD-aminomethylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) führen, messen. Hierbei wird dieses Substrat hauptsächlich durch die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 gespalten.

Probengewinnung

Nachdem die Behandlung an ausgesäten Zellen beendet war, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Es wurde dann pro Platte (bei 24-Loch-Platten 200 μ l) Lysepuffer mit DTT und Proteinaseinhibitoren (siehe unten) hinzugegeben. Die Zellen wurden mit diesem Puffer für 20 min unter ständigen schütteln lysiert. Nach diesem Schritt gab es die Möglichkeit entweder mit dem Assay fortzufahren oder die Zellen zunächst bei -21 °C einzufrieren.

Lysepuffer :

10 mM HEPES pH 7,4	
0,5% CHAPS	+ frisch hinzugegen:
42 mM KCL	1 mM DTT
5 mM MgCl ₂	5 μ g/ml Aprotinin
0,1 mM EDTA	1 μ g/ml Leupeptin
0,1 mM EGTA	1 μ g/ml Pepstatin A
	1 mM PMSF

Fluoreszenzmessung

Um die Caspase Aktivität zu bestimmen wurde dem oben hergestellten Lysat (30 - 50 μ l) in einer schwarzen 96-Loch-Plate (Nunc) 150 μ l Reaktionspuffer (siehe unten) mit frisch hinzugefügtem DTT (Dithioereitol) und Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-AMC) hinzugegeben. Als Nullwert diente eine Reihe mit reinem Lyse- und Reaktionspuffer. Das durch die Caspasespaltung freigesetzte Aminomethylcoumarin kann durch eine Fluoreszenzmessung bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm mit einem ELISA Reader bestimmt werden. Die Messungen werden zu den Zeitpunkten 0 min, 60 min und 120 min durchgeführt. Während dieser Zeit blieben die Zellen im Brutschrank bei 37 °C. Die Auswertung erfolgte mit Excel und SPSS, wobei nach der Proteinbestimmung (siehe unten) ein Fluoreszenzwert pro Zeit und Mikrogramm Protein festgestellt werden kann.

Reaktionspuffer:

25 mM HEPES pH 7,5	+ frisch hinzugegeben:
1 mM EDTA	3 mM DTT
10 % Sucrose	10 μ M N-Acetyl-Asp-Glu-Val-
0,1 % CHAPS	Aminomethylcoumarin

Proteinbestimmung

Um ein genaues Verhältnis von Caspaseaktivität und Proteinmenge zu erhalten, wurde für jedes Probenlysat eine Proteinbestimmung durchgeführt. Hierfür wurde in einer transparenten 96-Loch-Platte 25 μ l Lysat mit 25 μ l an 0,9 % NaCl vorgelegt. Auch hier wurde für den Nullwert eine Reihe nur Lysepuffer und NaCl aufgetragen. Mit Hilfe von BSA (Bovines Serumalbumin) und dem Lysepuffer wurde außerdem eine Standardkonzentrationsreihe mit bekannter Proteinkonzentration hergestellt. Anschließend wurde auf jede Probe 200 μ l Roti-Quant (bestehend aus 2 Teilen Roti-Quant und 5,5 Teilen H₂O) pipetiert. Die Platte wurde so für 5 min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert und die Absorption dann in einem ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Die Absorption ist für weite Bereiche der Proteinkonzentration proportional. Mit Hilfe des Absorptionswertes bezogen auf die erstellte BSA-Eichkurve wurde für jede Probe die Proteinmenge errechnet.

2.2.2.3. Western-Blot Immundetektion

Das bei dieser Arbeit verwendete Western-Blot Verfahren diente Zur Proteinanalyse nach bestimmten Behandlungen. Hierfür wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose Membran aufgetragen und anschließend durch Antikörper und Immunfärbung sichtbar gemacht und analysiert.

Gesamtzellextraktion

Um Proteine aus der Zelle zu gewinnen, mussten diese zuvor lysiert werden. Hierzu wurden die Zellen zuvor in 6-Loch Platten mit einer Dichte von mind. $2,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Nach Behandlung wurden die Zellen dann mit 100µl eines SDS-Lysepuffers mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren bei 95°C (siehe unten) resuspendiert und für 15 min. in diesem Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 15 min. bei 15.000 x g abzentrifugiert. Das Lysat konnte zu diesem Zeitpunkt bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren werden.

SDS-Lysepuffer mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren:

1 % SDS	Proteinaseinhibitor Cocktail (Sigma)
10 mM Tris-HCL (pH 7,5)	Phosphataseinhibitor Cocktails I und II (Sigma)
2 mM EDTA (pH 8,0)	

Konzentrationsbestimmung der Proteine

Für die Proteinkonzentration wurde ein BCA Protein Assay Kit (Pierce) verwendet. Hierfür wird die Proteinprobe mit BCA-Reagenz (Bicinchonsäure) inkubiert. Dafür wird in einem alkalischen Milieu Cu^{2+} in Anwesenheit von Proteinen zu Cu^{1+} reduziert. Cu^{1+} führt seinerseits mit 2 Molekülen BCA zu einer Komplexbildung.

Dieses violett gefärbte Reaktionsprodukt kann nach Erstellen einer zusätzlichen Standardkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen (BSA) photometrisch bei einer Wellenlänge von 560nm bestimmt werden und ist proportional zur Proteinmenge.

SDS-Elektrophorese mit SDS-Polyacrylamid-Gelen

Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe in einem Acrylamidgel wurde eine Methode nach Laemmli angewandt. Dabei werden Proteine durch eine unspezifische Natriumdodecylsulfat (SDS)-Anlagerung negativ geladen und es kommt zu einer Dissoziation ihrer Untereinheiten. Außerdem werden dabei Protein-Proteininteraktion unterbunden. In einem elektrischen Feld können die so gebildeten negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe mit vergleichbaren hydrodynamischen Eigenschaften entsprechend ihrer Gesamtladung, die proportional zu ihrer Größe ist, wandern.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden zwei Gele mit unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen und pH-Wert hergestellt und übereinander aufgetragen (Sammel- und Trenngel). Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels hängt von der Größe des zu detektierenden Proteins ab und ist umso höher je kleiner das Protein ist.

Sammelgel (5 %) und Trenngel (10 - 15 %) wurden nach Sambrock et al. hergestellt (siehe unten). Die Polymerisierung erfolgte ausgehend vom Acrylamid (Monomer) und Bisacrylamid (bifunktional). Sie wurde induziert durch die Zugabe von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin), indem es die Bildung freier Radikale aus APS (Ammoniumpersulfat) katalysierte.

Nach einer Polymerisationsdauer von 30-60 min beim Trenngel wurde das Sammelgel hergestellt und damit das Trenngel überschichtet. Zur Bildung von Geltaschen, in denen später die Proben aufgetragen wurden, musste ein Kamm vorsichtig in das Sammelgel eingeführt werden.

Die Gelbox wurde dann in die Elektrophoresekammer (Biorad) eingespannt und mit 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer bedeckt. Anschliessend wurden die Proben mit jeweils gleicher Proteinmenge (ca.30-50µg) in Laemmli-Laufpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Die so aufbereiteten Proben wurden dann in die entsprechend vorbereiteten Taschen pipetiert.

Als Größenmarker wurde See Blue® Prestained Standards (Invitrogen) in eine der Taschen pipetiert. Nach ca. 30 min. bei konstanter Stromstärke von 15mA im Sammelgel entstand eine scharfe Protein-Bande an der Grenze von Sammel- und Trenngel. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Elektrophorese und die Auftrennung im Trenngel mit erhöhter Spannung (120-140V) und 20-25 mA für ca. 90 min fortgeführt.

	12 % Trenngel (10ml)	5 % Sammelgel (10 ml)
40 % Acrylamid	3 ml	1,5 ml
1 M Tris-HCL (pH 8,8)	3,75 ml	-
1 M Tris-HCL (pH 6,8)	-	3,75 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
dest. H ₂ O	3,05 ml	4,55 ml
10 % APS	100 µl	100 µl
0,05 % TEMED	5 µl	5 µl

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer:

30,2 g Tris-Base

144 g Glycin

100 ml 10 % SDS

auf 1 Liter mit H₂O auffüllen (pH : 8,3)

4 x Lämmli-Puffer:

250 mM Tris-HCL (pH 6,8)

8 % SDS

20 % Glycerol

0,01 % Bromphenolblau

20 % β-Mercaptoethanol

Proteintransfer (Blotten)

Der Proteintransfer nach dem Auftrennen auf eine geeignete Membran (hier Nitrocellulose) wird als Western Blot bezeichnet. Die verwendete Membran bindet Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Der Transfer fand in einem sog. Blotter, einer Apparatur mit zwei Graphitelektroden (Anode und Kathode), statt. Für dieses elektrophoretische Verfahren wurde zunächst die Anode mit Transfer-Puffer befeuchtet. Darauf wurden 2 Lagen Whatman-Papier und die Nitrocellulosemembran (jew. vorher für 10 min. in Transfer-Puffer getränkt) gelegt.

Das SDS-Gel wurde auf die Membran überführt und erneut mit drei Lagen feuchtem Whatman-Papier und der Kathode bedeckt. Der Transfer selbst fand bei Raumtemperatur und einer konstanten Spannung von 20 V für 60 min. statt, wobei die Dauer von der Größe des zu detektierenden Proteins abhing. Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers und zur Fixierung der Proteine wurde die Membran mit Ponceaurot S-Lösung und die Gele mit Coomassie-Lösung (siehe unten) gefärbt.

Ponceaurot-Lösung:

0,1 % Ponceaurot-S in 5 % Essigsäure

Transfer-Puffer:

50 ml 10 SDS-Laufpuffer

200 ml Methanol

ad. 1 l dest. H₂O

Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie-Blue-Stain in einer sog. Färbelösung unter leichtem Schütteln über Nacht. Danach wurden die Gele erst mit einer Entfärbelösung und anschließend Aufbewahrungslösung gewaschen und von überschüssigem Farbstoff befreit. Die Aufbewahrung der eingeschweißten Gele in der Aufbewahrungslösung erfolgte bei 4°C.

Färbelösung:

50 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 39,9 % bidest. Wasser,

0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärbelösung:

5 % Ethanol, 12,5 % Essigsäure, 82,5 % Wasser

Aufbewahrungslösung:

7 % Essigsäure, 93 % bidest. Wasser

Geltrocknung

Die Gele wurden anschließend auf einem mit Wasser befeuchtetem Whatman-Papier gelegt und mit einer handelsüblichen Cellophanfolie bedeckt. Zusammen legt man alles auf einem Geltrockner (Biorad), der bei 80°C für 120 min. die Gele unter Vakuum trocknet.

Western-Blot Immundetektion

Um zunächst unspezifische Bindungsstellen der geblotteten Proteine abzusättigen, wurden die mit Ponceaurot gefärbten Membranen, nachdem sie abfotografiert wurden, in einer Blockpuffer für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht unter Schütteln mit dem in Blockpuffer verdünntem Primärantikörper (Verdünnung 1:500) inkubiert. Die Membran wird daraufhin 3 x mit 3 % Blockpuffer gewaschen und schließlich mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2500) für 2-3 h inkubiert. Dieser mit Meerrettichperoxidase gekoppelter Zweitantikörper kann den Primärantikörper binden und muss entsprechend der Tierspezies, die zur Herstellung des Primärantikörpers immunisiert worden war, gewählt werden. Überschüssiger Sekundärantikörper wird durch dreimaliges Waschen mit TBS-T_{0,05%} für jeweils 10 min entfernt. Es kann die Detektion der Peroxidaseaktivität nach dem ECL/Supersignal Chemilumineszenzreagenz (West Femto/Pico) Protokoll erfolgen.

Blockpuffer (Blockproteine in TBS-T_{0,05%}):

Milchpulver (5% zum Blocken, 3% zur Antikörperverdünnung)

50 mM Tris (pH 7,5)

150 mM NaCl

0,1 % Tween 20® (Applichem, Darmstadt)

Signaldetektion (ECL)

Nach dem letzten Waschgang wurde der Blot aus der Waschlösung entnommen, auf Papier kurz abgetropft und anschließend mit der Detektionslösungen (West-Pico oder West-Femto) unkubiert.

Hierbei wird durch die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) die Oxidation von Luminol katalysiert und eine Chemilumineszenz ausgelöst.

Dieses Licht wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms in einer Filmmappe mit unterschiedlichen Belichtungszeiten detektiert. Nach Entwicklung des Röntgenfilms werden die unterschiedlichen Proteinbanden sichtbar.

2.2.4. Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Nach jeweiliger Schädigung wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert. Hierfür wurde ein RNeasy Mini Kit[®] der Firma Qiagen verwendet und die Proben nach Herstellerangaben mit den dazugehörigen Puffern und Lösungen behandelt. Die entstandene RNA-Probe wurde bzgl. ihrer Konzentration und Reinheit (A_{260}/A_{280} Ratio) UV-photometrisch analysiert.

Die reverse Transkription der gewonnenen RNA in cDNA erfolgte für 50 min bei 42°C unter Verwendung von 200 Units der Reversen Transkriptase M-MLV (Molones Murine Leukemia Virus) und unter Zugabe von 200 µM dNTP, 0,45 µM random hexamers und 1 µg Gesamt-RNA. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen wurde eine nicht revers-transkribierte RNA-Präparation den weiteren PCR-Schritten unterworfen.

1 µl der erstellten cDNA wurde folgendem Ansatz hinzugefügt:

-1µl Primer (sense/antisense) -10 µl 2 x Reaktionspuffer (enthält dNTPs)
-0,8 µl Taq Polymerase (1U(µl)) -ad 20 µl H₂O

Für die PCR-Reaktion wurde der Ansatz zunächst bei 95 °C für 1 min zur Inaktivierung der reversen Transkriptase und Denaturierung des Ausgangsmaterials inkubiert. Es folgten 25-40 Zyklen mit 95 °C für 30 sec (Denaturierung), 55 °C für 60 sec (Annealing) und 72 °C für 60 sec (Elongation). Nach Beendigung der Zyklen erfolgte eine abschließende Elongation bei 72 °C für 3 min.

Das Design der Primer erfolgte mit Hilfe des Primer3 Programmes. Die Zyklenzahl wurde an verschiedene Primer angepasst und wird jeweils bei den Ergebnissen angegeben.

Anschließend wurden 15 µl des PCR-Produkts mit einem 6x DNA-Ladepuffer (Promega) versetzt und zusammen mit einem Größenmarker in einem 2%-igen Agarosegel mit einem Gehalt von 0,1 % Ethidiumbromid bei 80 V und 100 mA für ca. 45 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die jeweiligen Banden wurden im UV-Licht sichtbar und konnten digital aufgenommen werden.

2.2.5. Gelretardations- und Supershift-Analysen (EMSA)

Gelretardationsstudien (EMSA - electrophoretic mobility shift assay) werden verwendet um z.B. DNA-bindende Proteine wie NFκB mit radioaktiven Sonden zu markieren und mittels nicht-denaturierender Elektrophorese zu analysieren. Durch die Bindung des Proteins an die spezifische Sonde (ein Oligonukleotid mit jeweiliger Erkennungssequenz für das Protein) besitzt dieser Komplex im Gegensatz zu ungebundener DNA eine deutlich verminderte Migrationsgeschwindigkeit im Gel und wird als Bande mittels Autoradiographie sichtbar.

Probenaufbereitung, Markierung der NFκB-Sonde mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und Herstellung eines Bindungsmix

Die Probenaufbereitung nach durchgeführter Zellschädigung erfolgte wie unter Gesamtzellextraktion (Western Blot) beschrieben. Statt dem SDS-Lysepuffer wurde TOTEX-Puffer mit folgender Zusammensetzung verwendet:

20 mM HEPES (pH7,9)	350 mM NaCl
1mM MgCl ₂	1 % (m/V) NP-40 [®]
0,5 mM EDTA	20 % (m/V) Glycerol
0,1 mM EGTA	1 mM DTT

Vor Inkubation des Proteinlysats mit der Sonde musste diese mit ihrer NFκB Konsensus-Oligonukleotidsequenz zunächst endständig radioaktiv markiert werden. Hierfür wurde ein Enzym (T4-Polynukleotidkinase) benutzt, welches den Transfer des γ-ständigen radioaktiv-markierten Phosphatrestes des $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP auf die 5'-OH-Gruppe eines Oligonukleotids katalysiert.

Es wurde folgender Markierungsansatz bei 37 °C für 30 min inkubiert:

10 x T4-PNK Reaktionspuffer	3 μl
T4-PNK (10 U/ml)	2 μl
NFκB - Sonde	1,5 μl
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (50 μCi , 10 pmol)	5 μl
H ₂ O	18,5 μl

Die nicht umgesetzten radioaktiven Nukleotide wurden danach in einer MicoSpin G-25[®] (Sepharose G-25, Amersham) Säule abgetrennt. Zum Ansatz wurden 60 μl STE-Puffer (0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tri-HCL (pH 8,0)) dazugegeben und die gesamten 90 μl auf die Säule pipetiert. Nach 3 min. Zentrifugation bei 3.000 rpm wurden die freien ATP-Moleküle dadurch zurückgehalten, während die markierten Oligonukleotide sich im Durchlauf befanden.

2 μl dieser markierten DNA-Sonde wurde mit 10 μg Proteinlysat und den folgenden Zusätzen zu einem Bindungsmix für 15 min bei RT inkubiert:

5 x Bindungspuffer	4 μl
Poly [dl-dC]-Lösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	2 μl (Abfangen anderer DNA-Bindungsproteine)
BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl

Für zusätzliche Supershiftanalysen wurden zuvor jeweils 2 μl der entsprechenden Antikörper zu den Gesamtproteinextraktionen hinzugegeben.

Herstellung eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels, Elektrophorese und Autoradiographie

Zur Herstellung eines 4%-igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgels für die Elektrophorese wurde folgender Ansatz benutzt:

Rotiphorese 30	10,5 ml
H ₂ O	56,5 ml
TEMED	75 µl
10 % APS	0,5 ml

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt und zum polymerisieren über Nacht im Kühlschrank (5 °C) gelagert.

Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer mit folgender Zusammensetzung benutzt:

TBE-Puffer (5 x)	
Tris	54 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml
Borsäure	27,5 g
H ₂ O	ad 1 l

Der zuvor hergestellte Bindungsmix wurde in eine Tasche des Gels gegeben und die Elektrophorese mit einer Spannung von 200 V für 2 h begonnen. Nach Beendigung des Vorgangs wurde das Gel mit einem Stück Whatmann-Papier von der Glasplatte abgenommen und auf einem Geltrockner (Biorad) mit 72 °C für 2 h getrocknet. Anschließend wurden die Gele in einer Photokassette mit Verstärkerfolie und Röntgenfilm im Dunkelraum für 1-5 Tage bei -80 °C gelagert werden. Nach stattgehabter Autoradiographie konnten die Filme entwickelt und die Banden analysiert werden.

2.2.6. Immunzytochemie und Immuzfluoreszenzanalysen

Eine weitere bei dieser Arbeit benutzte Methode zur direkten Visualisierung von p53 innerhalb der Zelle war die Immunzytochemie. Hierbei konnte man nach einer durchgeführten Schädigung bei mikroskopischer Vergrößerung die p53-Proteinaktivität untersuchen.

Fixierung und Permeabilisierung:

Zunächst müssen die behandelten SHSY5Y Zellen auf den hierfür benutzten 24-Well-Platten immobilisiert und die physiologischen Vorgänge gestoppt werden. Zu diesem Zwecke wurden die Zellen zunächst vorsichtig 1x mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehydlösung bei 37°C für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung mit eiskaltem 0,1%-igem Triton® X-100 in PBS für höchstens 3 min behandelt, um eine Antikörperpenetration in die Zelle zu erleichtern. Die anschließenden Schritte erfolgten auf Eis.

4% Paraformaldehydlösung:

- 4 g Paraformaldehyd in PBS auf 60 °C erhitzen

- + 2-3 Tropfen 1 N-NaOH-Lösung

- + 4 g Sucrose

unter Rühren auf RT bringen, mit PBS auf 100 ml auffüllen und den pH auf 7,4 einstellen

Antikörperbehandlung

Die Platten wurden dann erneut dreimal mit PBS gewaschen. Ähnlich wie beim Western-Blotting wurden die Zellen mit einer Blocking-Lösung (siehe unten) für mind. 1 h behandelt um auch hier unspezifische Bindungsstellen der Antikörper abzusättigen.

Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln mit dem Primärantikörper anti p53 in einer Konzentration von 1:500 in Blocking-Lösung inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper z. B. anti-Maus, anti-Kaninchen oder anti-Ziegen IgG für 1 h in einer Verdünnung von 1:500 inkubiert. Erneut wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und danach mit einem an Biotin bindenden Streptavidin-Oregon green Konjugat (1 µg/µl; Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:1000 für 30 min inkubiert. Zum Schluss wurde nochmals dreimalig mit PBS gewaschen. Als Negativkontrolle wurden Zellen nur nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper (ohne vorherigen Primärantikörper) gefärbt.

Schließlich wurden noch die Zellkerne mit Hoechst 33258 (1µg/µl in PBS) für 15 min gefärbt.

Blocking-Lösung:

- PBS (pH 7,4)
- + 5% Pferdeserum
- + 0,3% Triton® X-100

Detektion und Aufnahmen:

Die Fluoreszenz konnte dann mit einem inversen Mikroskop mit folgender Einstellung betrachtet werden:

Exzitation: 465-495 nm, Strahlteiler: 505 nm; Emission: 515-555 nm.

Die Zellen wurden unter RT mit der SPOT-2 Kamera bei 20facher Vergrößerung aufgenommen. Die digitalen Bilder wurden unter gleichen Belichtungszeiten, mit mind. 3 Bilder proWell jeweils bei Durchlicht, Höchst und Antikörperfärbung angefertigt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Rolle von S100B beim exzitotoxischen Zelltod

3.1.1 S100B schützt primäre hippocampale Neurone vor NMDA-induzierten exzitotoxischen Zelltod

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, spielt die glutamatabhängige Exzitotoxizität eine zentrale Rolle bei zahlreichen neuronalen Erkrankungen und Schädigungen. Hierbei entfaltet der Neurotransmitter Glutamat seine Wirkung über zwei Rezeptortypen. Wesentlich für die glutamaterge Exzitotoxizität ist der ionotrope NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptor. Den Namen hat der Rezeptor aufgrund seiner Affinität zu dem exogenen Agonisten NMDA.

Die Rolle die S100B im Rahmen der neuronalen Zellschädigungen und Apoptose einnimmt ist zu einem großen Teil noch unerforscht und zum Teil auch kontrovers. Meist wird ein konzentrationsabhängiger Effekt mit neuroprotektiven Eigenschaften in niedrigen und neurotoxischen Eigenschaften in höheren Konzentrationen unterschieden (siehe Einleitung). Um den Effekt von S100B bei der glutamatergen, exzitotoxischen Zellschädigung so natürlich wie möglich nachzuahmen, haben wir hierfür die Experimente in primären, hippocampalen Neuronen von neugeborenen Ratten durchgeführt. Da diese hippocampalen Neuronen zum einen im Gehirn mit die meisten Glutamat-Rezeptoren aufweisen, mit einer maximalen Expression am 7.-14. postnatalen Tag, und zum anderen Hirnregionen mit besonders hoher Glutamat-Rezeptordichte eine höhere Vulnerabilität gegenüber Hypoxie und exzitotoxischen Zelltod aufweisen, sind diese fetalen Rattenneuronen ideale Zellen für die Untersuchung der Rolle von S100B (Chaudieu et al., 1991).

Für die Experimente wurde ein etabliertes Modell eines NMDA-induzierten Zelltodes benutzt. Dazu wurden die primäre hippocampale Rattenneurone

zwischen dem 12. und 14. Tag nach Präparation fünf min lang mit 300 μ M NMDA inkubiert, gewaschen und wieder dem ursprünglichen Medium zugeführt (Lankiewicz et al., 2000). 4 h zuvor wurde die Hälfte der Zellen mit 20 ng/ml S100B präinkubiert und Kontrollen ohne Schädigung mit und ohne S100B angelegt. 24 Stunden nach NMDA-Behandlung wurden die Zellen aus dem Brutschrank entnommen und mit Trypanblau gefärbt, um den Prozentsatz der Zellen mit Membranschädigung, einem Endpunkt im neuronalen Zelltod, herauszufinden. Es erfolgte eine Zellzählung und eine statistische Auswertung. Diese ergab bei den mit S100B präinkubierten Zellen eine potente, statistisch signifikante Abnahme des NMDA-induzierten Zelltodes gegenüber der Kontrolle. Dieser Schutz war so ausgeprägt, dass Zellen mit NMDA-Behandlung und S100B-Inkubation statistisch gesehen keinen signifikant höheren Zelltod gegenüber den nicht behandelten Kontrollen aufwiesen (Abbildung 7).

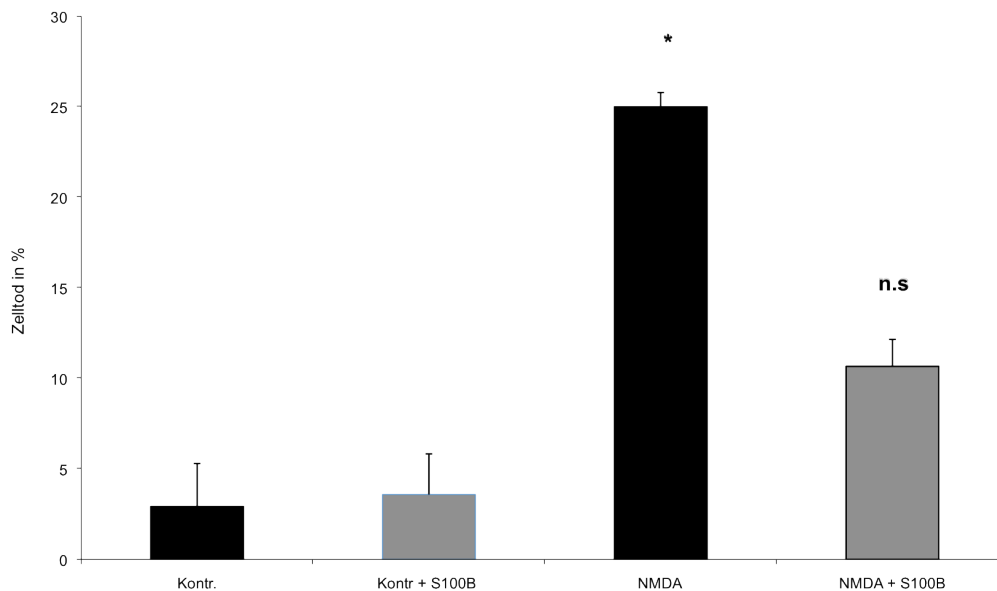


Abb. 7: S100B schützt primäre hippocampale Neurone vor dem NMDA-induzierten exzitotoxischen Zelltod

Primäre hippocampale Neurone der Ratte wurden für 5 min entweder einer NMDA-Behandlung mit 300 μ M ausgesetzt oder mit dem Lösungsmittel (Kontr.) behandelt. Die zusätzlich mit „+S100B“ markierten Behandlungen wurden bereits 4h vor und nach der Schädigung mit 20 ng/ml S100B (prä)inkubiert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Höhe des Zelltodes mit Hilfe von Trypanblau-Färbung ermittelt.

Daten sind Mittelwerte \pm SD aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils n = 8 Kulturen pro Behandlung (* p <0.05 verglichen mit Kontrolle; n.s.: keine signifikante Erhöhung verglichen mit Kontrollen).

3.1.2 S100B aktiviert den Zellrezeptor RAGE

RAGE, ein Zelloberflächenrezeptor der Immunglobulinsuperfamilie, wurde zunächst als Rezeptor für „advanced glycation endproducts“ beschrieben (Schmidt et al., 1992). Der Rezeptor ist bekannt für die strukturelle Inhomogenität seiner multiplen Liganden. Außer den AGEs können proinflammatorische Zytokine RAGE aktivieren, während beide interessanterweise bei der zellulären Stressantwort und Inflammation eine wichtige Rolle spielen (Stern et al., 2002). Außer bei inflammatorischen Prozessen konnte ein wesentlicher Einfluss von RAGE auf neurotrophe und neurotoxische Prozesse und beim Tumorwachstum gezeigt werden (Schmidt et al., 2001).

Wie das extrazellulär freigesetzte Protein S100B seinen Effekt in der Zelle ausbreitet wird ebenfalls noch unterschiedlich diskutiert. Ob das Protein in die Zelle aufgenommen und durch direkte Bindungen an bestimmte Zielproteine seine Effekte ausübt oder über bestimmte Zelloberflächenrezeptoren seine Wirkung vermittelt ist noch nicht endgültig geklärt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass S100B seine Wirkung unter anderem durch eine Bindung an den RAGE-Rezeptor entfaltet (Huttunen et al., 2000). Zur Klärung der Frage, ob RAGE zur Vermittlung der neuroprotektiven Funktion von S100B eine Rolle spielt, sollte die Expressionsrate des RAGE-Rezeptors in Neuronen nach Behandlung mit S100B und NMDA-induzierter Exzitotoxizität untersucht werden. Es wurden hierfür primäre hippokampale Neurone der Ratte nach Behandlung mit S100B und NMDA lysiert und einer RT-PCR-Reaktion unterworfen (Abbildung 8). Obwohl in nicht behandelten Zellen selbst nach 40 Zyklen der PCR keine signifikant erhöhte Transkriptionsrate der RAGE-mRNA zu verzeichnen ist, führt die Behandlung mit 20ng/ml S100B zu einem signifikant höheren RAGE-mRNA Level. Da es zahlreiche Hinweise gibt, dass RAGE-Liganden zu einer Transkriptionsaktivierung des RAGE-Gens führen (Schmidt et al., 2000) liegt die Vermutung nahe, dass S100B seine intrazelluläre Wirkung als direkter RAGE-Ligand ausübt.

Da in diesen Experiment auch eine NMDA-Behandlung allein zu einer erhöhten Transkriptionsrate führt, muss es zusätzliche, S100B-unabhängige Wege zur Induktion der RAGE-Expression nach exzitotoxischen Stress geben.

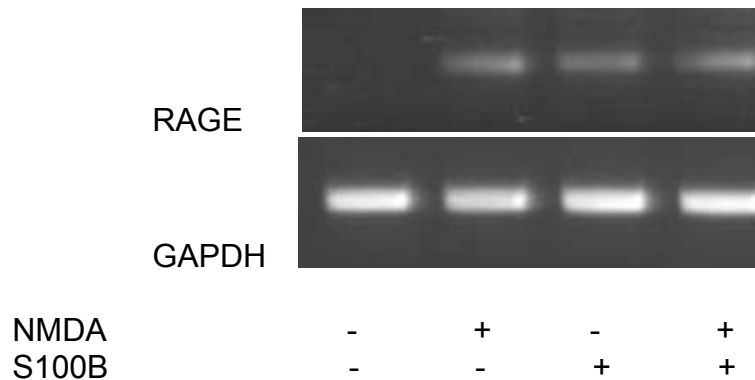


Abb. 8: S100B und NMDA induzieren die RAGE-Expression in primären Rattenneuronen. Primäre hippocampale Neurone wurden, wie gekennzeichnet, 4 h mit S100B (20ng/ml) präinkubiert und anschließend für 5 min. mit NMDA (300 μ M) oder zur Kontrolle mit Mg^{2+} freies HBS (Sham) behandelt und anschließend in ihr konditioniertes Medium zurückgegeben. Nach weiteren 20 h wurde die Gesamt-RNA isoliert und in einer quantitativen RT-PCR die Transkriptmenge von RAGE (40 Zyklen) und GAPDH (20 Zyklen) zur Ladekontrolle bestimmt.

3.1.3 Die Rolle des MEK/ERK-Signalweges für die S100B-vermittelte Neuroprotektion im Rahmen des exzitotoxischen Zelltodes

Der MEK/ERK-Signalweg, genauer gesagt der Raf/MEK/ERK-Signalweg kann unter anderem durch den Oberflächenrezeptor RAGE aktiviert werden (Ghavami et al., 2008) und ist einer der wichtigsten zellulären Antwortmechanismen auf extrazelluläre Reize mit dem Ziel der Regulierung der Expression zahlreicher Proteine. Diese spielen vor allem bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose eine wesentliche Rolle (Peyssonnaud et al., 2001). Dieser Signalmechanismus wird aktiviert, wenn extrazelluläre Liganden wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone an sog. Rezeptortyrosinkinasen binden und diese als Antwort an ihrem zytoplasmatischen Anteil phosphoryliert werden. Nach einigen weiteren Schritten wird Ras nach einer GTP Bindung aktiviert. Dadurch wird die Raf-Kinase rekrutiert und an der Plasmamembran phosphoryliert und aktiviert (Rushworth et al., 2006). Dies führt weiterhin zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von MEK, welche ihrerseits die Kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase) phosphoryliert und gleichzeitig aktiviert. Aktiviertes ERK löst sich vom Ras/Raf/MEK/ERK-Komplex und phosphoryliert bzw. aktiviert eine Reihe von Proteinen, Kinasen, Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1, ETS-1, c-Jun und c-Myc (Chong et al., 2003; Palona et al., 2006). Diese führen durch Veränderung der Genexpression zu einer Anpassung der Proliferation, Differenzierung, Angiogenese und des Überlebens der Zelle (Mercer et al., 2003).

Es wurde bereits vereinzelt eine RAGE-vermittelte Aktivierung des Ras-MEK-ERK1/2-NF- κ B Signalwegs durch S100B in Neuroblastomen postuliert (Huttunen et al., 2000).

Um herauszufinden, ob der MEK/ERK-Signalweg in Neuronen von S100B beeinflusst wird und ob sich dies während des exzitotoxischen Zelltodes verändert, wurden primäre hippocampale Neurone der Ratte mit und ohne S100B-Zusatz einer NMDA-induzierten Apoptose ausgesetzt und die Zellkulturen in einem Western-Blot-Analyse untersucht.

S100B behandelte, Sham-vorbehandelte Neuronen weisen eine Erhöhung in phosphoryliertem ERK1 und ERK2 nach 30 min und 3 h auf (Abb.9). NMDA führt ebenfalls zu einer vermehrten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 und die zusätzliche Stimulation mit S100B ändert das entstehende Signal nicht wesentlich (Daten nicht gezeigt).

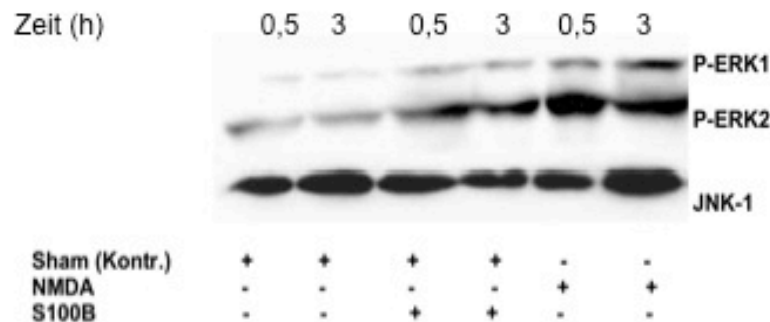


Abb. 9: S100B Behandlung und NMDA-induzierte Exzitotoxizität führen zu einer gesteigerten Konzentration von phosphorylierten ERK1/ERK2 in Neuronen. Nach 5 min Sham- oder NMDA(300µM)-Behandlung wurden die Neurone für weitere 30 oder 180 min mit und ohne S100B (20 ng/ml) weiter inkubiert. Anschließend wurde der p-ERK1 und p-ERK2 Proteinlevel in Gesamtzell-extrakte mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. JNK-1 diente als Ladekontrolle.

Nachdem feststand, dass der MEK/ERK Signalweg sowohl von S100B allein als auch beim NMDA-induzierten exzitotoxischen Zelltod beeinflusst wird, galt es als nächsten Schritt herauszufinden, ob auch für den S100B vermittelten neuroprotektiven Effekt der MEK/ERK-Signalweg benötigt wird. Hierzu wurde in einem nächsten Schritt zusätzlich der MEK-Inhibitor PD98059 eingesetzt. Obwohl S100B selbst in Anwesenheit von PD98059 eine signifikante Senkung des NMDA-induzierten Zelltodes bewirkte, war dieser Schutz bei Blockade des MEK/ERK-Signalwegs nur partiell, da der Zelltod in diesen Zellen ebenfalls ein signifikantes Level, verglichen mit den Sham-behandelten Kontrollen, erreichte (Abbildung 10).

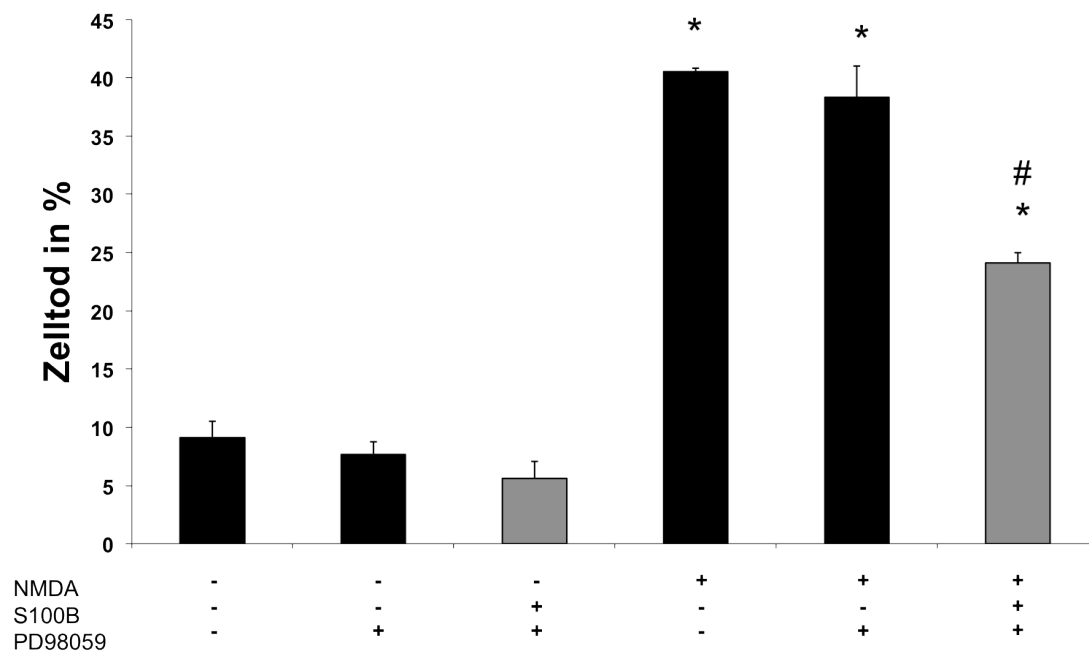


Abb. 10: Der MEK Inhibitor PD98059 reduziert teilweise den neuroprotektiven Effekt von S100B gegen die NMDA-Toxizität.

Neurone wurden für 4 h mit S100B (20 ng/ml) vorbehandelt. PD98059 (30 μ M) wurde 30 min vor der Behandlung mit S100B zu den Kulturen hinzugegeben. Zelltod wurde mittels Trypan-Blau-Färbung 24 h nach NMDA (300 μ M; 5min) Behandlung quantifiziert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD von n = 8 Kulturen pro Behandlung; (*p <0,05 verglichen mit Sham-behandelten Kontrollen; #p <0,05 verglichen mit NMDA-behandelten Kulturen ohne S100B).

Diese Daten legen nahe, dass der neuroprotektive S100B-Effekt zumindest teilweise durch den MEK/ERK Signalweg vermittelt wird.

3.1.4 Die Rolle des PI3/Akt-Signalweges für den neuroprotektiven Effekt von S100B

Der PI3K/Akt-Signalweg ist ein weiterer essentieller Signalweg für das Zellüberleben, der ebenfalls durch den Oberflächenrezeptor RAGE aktiviert werden kann (Ghavami et al., 2008). Um eine mögliche Rolle des PI3K/Akt-Signalwegs beim neuroprotektiven Effekt von S100B auf NMDA-induzierten Zelltod zu untersuchen, wurden primäre hippocampale Neurone mit dem PI-3 Kinase-Inhibitor LY294003 vorbehandelt. Wie im vorherigen Versuch wurden die Zellen dann erneut einer NMDA-induzierten Zellschädigung mit und ohne Anwesenheit von S100B unterworfen. Nach Trypan-Blau-Färbung, Auszählung der apoptotischen Zellen und statistischer Auswertung zeigte sich keine signifikante Inhibition des protektiven Effekts von S100B gegenüber dem exzitatorischen Zelltod durch den Inhibitor LY294003. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die Aktivierung des PI3/Akt Signalweges für die durch S100B vermittelte Neuroprotektion keine wesentliche Rolle spielt.

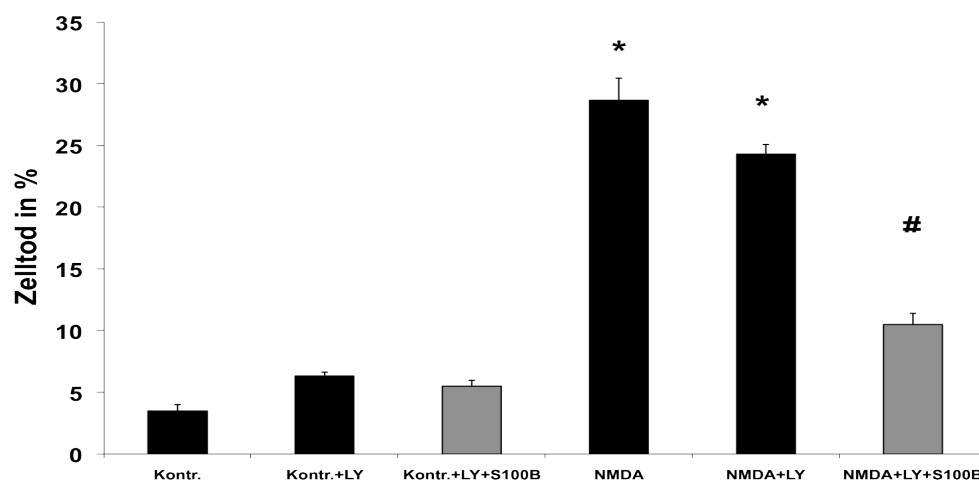


Abb. 11: Der PI-3 Kinase-Inhibitor LY294002 verhindert nicht den neuroprotektiven Effekt von S100B gegen die NMDA-Toxizität.

Die Neurone sind für 4 h mit S100B (20 ng/ml) vorbehandelt worden. LY294002 (10 μ M) ist eine halbe Stunde vor Behandlung mit S100B dem Medium hinzugegeben worden. Zelltod wurde mittels Trypan-Blau-Färbung 24 h nach NMDA Behandlung (300 μ M; 5min) quantifiziert.

Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus 4 verschiedene Experimente mit jeweils n = 4 Kulturen pro Behandlung (*P<0,05 verglichen mit Sham behandelten Kontrollen und #p <0,05 verglichen der gleich behandelten Kultur ohne S100B Zugabe).

3.2. Die Rolle von S100B im Rahmen des Hypoxie-induzierten Zelltodes in Neuronen

3.2.1. S100B schützt SHSY5Y Zellen vor dem Hypoxie-induzierten Zelltod.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kommt es bei einem hypoxischen Prozess zu einem zellulären Energieverlust und einem zumindest partiellen Ausfall der Natrium-Kalium-Pumpe an der Zellmembran. Dies führt zu einer Aktivierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle und zu einer Glutamat-abhängigen Exzitotoxizität.

Nachdem nun der neuroprotektive Effekt von S100B an NMDA-induzierter Apoptose gezeigt werden konnte, haben wir im nächsten Schritt, orientierend an der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls, die Wirkung von S100B direkt an einem etablierten Hypoxie/Reoxygenierungsmodell untersucht. Hierfür wurden in einer Hypoxiekammer durch Applikation von CO₂ ein hyp/anoxisches Milieu mit einer verbleibenden O₂-Konzentration von ca. 5 % aufgebaut. Zunächst wurden humane SHSY5Y-Zellen für 3h in dieser Kammer einer Hypoxie ausgesetzt. Einige Zellen wurden daraufhin für die weitere Untersuchung mittels Caspase Assay sofort lysiert. Die weiteren Zellen wurden erst nach einer Reoxygenierungszeit von: 12 h, 16 h oder 20 h für den Assay vorbereitet. Die Apoptoseaktivität wurde durch die Messung der Caspaseaktivität ermittelt. Die Ergebnisse zeigen zwar bereits nach 8 und 12 h eine geringere Caspaseaktivität der Zellen mit S100B und damit eine neuroprotektive Tendenz, statistisch signifikant wird dies jedoch erst nach 20 h (Abbildung 12).

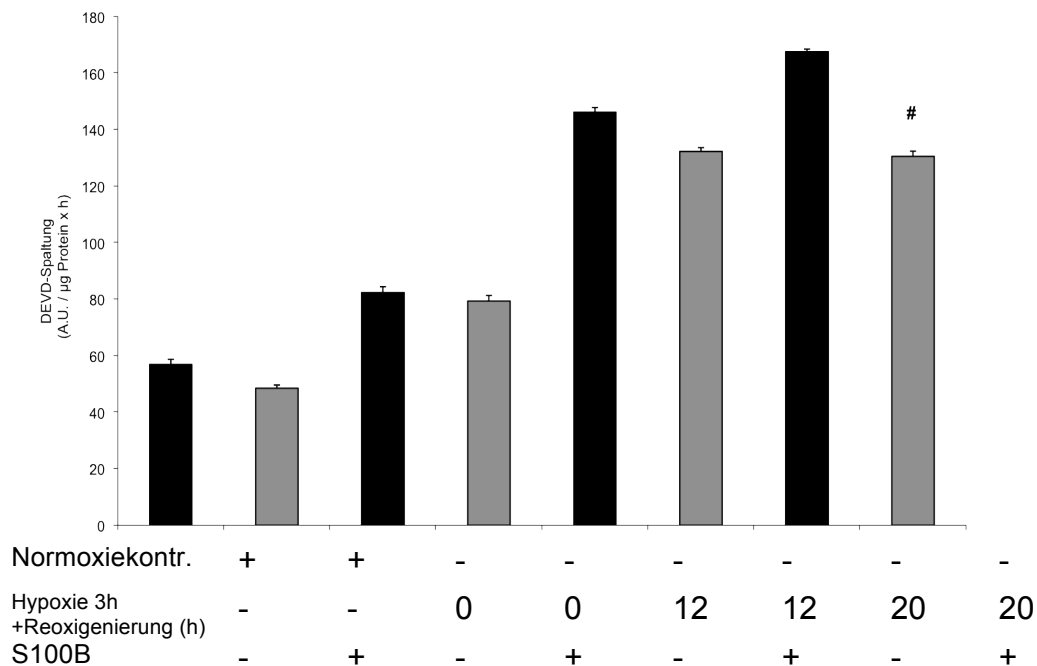


Abb. 12: SHSY5Y Zellen wurden für 3 h in einer Kammer (2 mmHg O₂) einer Hypoxie ausgesetzt. Anschließend wurden einige Zellen einer Reoxigenierung für 12 h, 16 h und 20 h ausgesetzt. Die Hälfte der Zellen wurde jeweils mit 20 ng/ml S100B behandelt und vor der Hypoxie für 3 h präinkubiert. Es zeigt sich zunächst ein signifikanter Anstieg der Caspaseaktivität aller behandelten Zellen gegenüber den Kontrollen +/- S100B. Zusätzlich zeigt sich nach 20 h Reoxigenierungszeit ein signifikanter Schutz der Zellen mit S100B gegenüber den nicht mit S100B behandelten Zellen mit gleicher Reoxigenierungszeit.

Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SD von n = 8 Kulturen pro Behandlung (#p <0,05 verglichen mit den gleich behandelten Kulturen ohne S100B Zusatz). Eine Wiederholung erbrachte vergleichbare Ergebnisse.

3.2.2. Primäre hippocampale Neurone zeigen mit S100B einen signifikanten Schutz gegenüber Hypoxie-induzierter Zellschädigung

Nach den bestätigten Ergebnissen in humanen Neuroblastomzellen wurden auch primäre hippocampale Neurone einer Hypoxie für 3h ausgesetzt und das Ergebnis in einer Trypan-Blau-Färbung und Auszählung der apoptotischen Zellen untersucht. Interessanterweise zeigte sich ähnlich wie bei den SHSY5Y-Zellen zwar bereits nach 12 h Reoxigenierung ein tendenziell geringerer Zelltod mit S100B, der jedoch statistisch signifikant erst nach 24 h wurde (Abbildung 14).

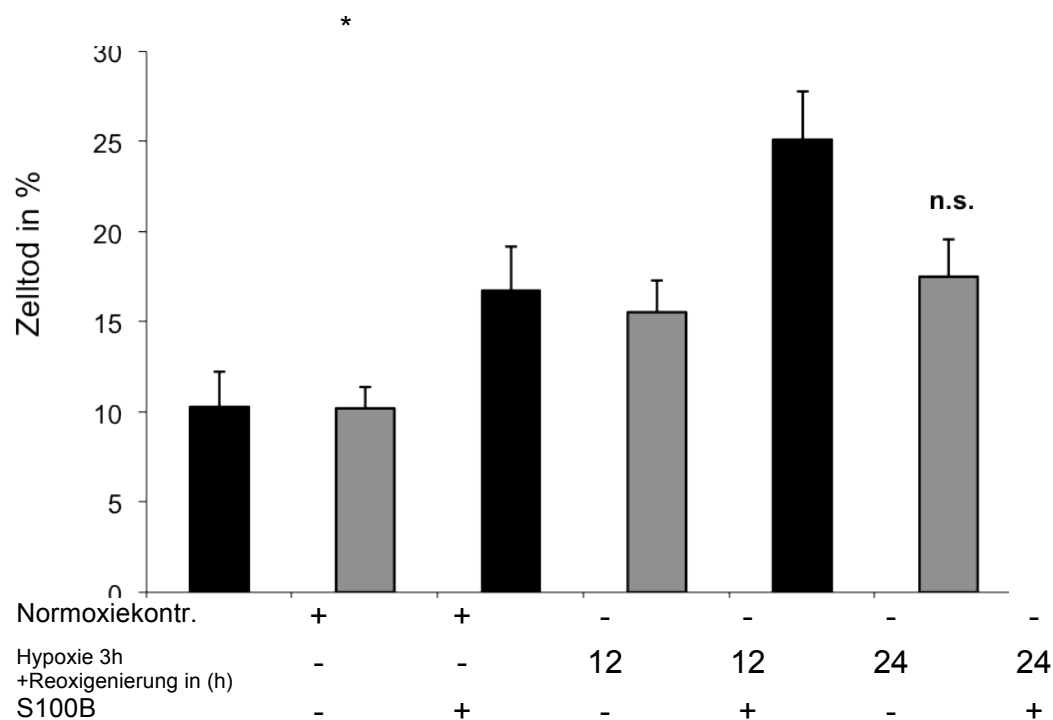


Abb. 14: Primäre hippocampale Neurone wurden zur Hälfte mit 20 ng/ml S100B für 4 h präinkubiert. Anschließend wurden alle Zellen, außer den Kontrollen, für 3 h einer Hypoxie mit 2 mmHg O₂ ausgesetzt. Es erfolgte eine Reoxigenierungszeit von 12 h bzw. 24 h. Es zeigt sich nach 24 h bei den ohne S100B behandelten Zellen ein signifikanter Anstieg der toten Zellen gegenüber den Kontrollen, während sich die übrigen Behandlungen insbesondere die Zellen mit S100B und 24 h Reoxigenierungszeit nicht signifikant von den Kontrollen unterscheiden. Die Daten sind Mittelwerte +/- SD von n = 6 Kulturen pro Behandlung (*p < 0,05 verglichen mit den Normoxiekontrollen; n.s.: kein signifikanter Unterschied zu den Normoxiekontrollen).

3.2.3. VEGF-Aktivierung durch S100B nach Hypoxie in SHSY5Y-Zellen

Die VEGF-(Vascular endothelial growth factor)Familie besteht aus fünf strukturell ähnlichen Liganden, die sich in ihrer Bindungseigenschaft an den drei Tyrosinrezeptorkinasen (VEGFR1, 2 und 3) und den Neuropilinrezeptoren (NP-)1 und 2 unterscheiden. Darunter wohl am besten untersucht ist VEGF-A mit einem hohen angiogenen Effekt (Hicklin et al., 2005). Es konnte auch durch zahlreiche Arbeiten eine positive Rolle von VEGF auf neuronales Wachstum, Differenzierung und Überleben gezeigt werden (Sondell et al., 1999). Besonders interessant für diese Arbeit ist der neuroprotektive Effekt bei Glutamat- und hypoxieinduzierter Apoptose (Matsuzaki et al., 2001.; Jin et al., 2000; Nishijima et al., 2007). Auch in zahlreichen anderen Zellen, wie z. B. Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass VEGF einen signifikanten Schutz gegenüber Hypoxie induzierter Apoptose zeigt (Robin et al., 2001).

Interessanterweise ist ein MEK/ERK-abhängiger Pathway für einige der intrazellulären Effekte von VEGF wie z. B. der Neovaskularisation beschrieben worden (Yang et al., 2009). Für den Effekt von VEGF auf Glutamat-induzierten Zelltod und folgender Caspase-Aktivierung wurden sowohl der PI3K-Akt als auch der MEK-ERK-Weg als relevante Signaltransduktionswege zur Vermittlung des neuroprotektiven Effekts von VEGF postuliert (Matsuzaki et al., 2001). Beide Signalwege sind vorher schon unabhängig voneinander für zahlreiche VEGF spezifische Zellantworten beschrieben worden.

Außerdem wurde zusätzlich eine gesteigerte VEGF-Expression in Plazentazellen oder nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinomzellen nach Aktivierung des Ras-MEK-ERK-Signalwegs beschrieben (Sobczak et al., 2008; Yu et al., 2010).

Es zeigt sich sowohl eine signifikante Aktivierung durch Hypoxie und zusätzlich durch S100B (Abbildung 14). Es lässt darauf schließen, dass S100B seinen neuroprotektiven Effekt unter anderem durch VEGF entfaltet.

Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass S100B durch RAGE eine Ras-raf-MEK-ERK-Signalweg aktiviert und dieses zu einer gesteigerten VEGF-Expression führt. VEGF seinerseits kann wiederum zu einer zusätzlichen Aktivierung von MEK-ERK führen und die Expression zahlreicher anderer neuroprotektiver Faktoren aktivieren.

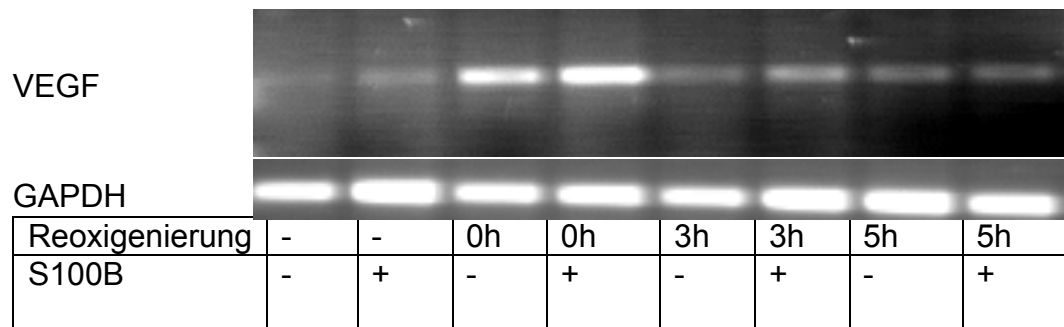


Abb. 14: S100B-Behandlung führt zu einem Anstieg der VEGF-Expression in Neuronen nach einer Hypoxiebehandlung.

Humane SH-SY5Y Neuroblastomzellen wurden für 3 h einer Hypoxie ausgesetzt. Anschließend erfuhren einige Zellen für 3 h bzw. 5 h in einer physiologischen Umgebung eine Reoxigenierung. Die während der Hypoxie zusätzlich mit 20 ng/ml S100B behandelten Zellen waren zuvor für 3 h mit S100B präinkubiert worden. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert, die Gesamt-RNA isoliert und in einer quantitativen RT-PCR die VEGF- und GAPDH (zur Ladekontrolle) mRNA-Expression nach jeweils 25 Zyklen bestimmt.

3.2.4. Aktivierung der p50/p65 Untereinheit von NF- κ B während hypoxieinduzierter Apoptose in SHSY5Y-Zellen

Das Protein NF κ B nimmt in menschlichen Zellen als schneller Transkriptionsfaktor bei vielen zellulären Signalwegen eine zentrale Rolle ein und zeigt unter anderem in Neuronen eine konstitutiv hohe basale Aktivität (O'Neill et al., 1997; Kaltschmidt et al., 1994).

Da es durch zahlreiche Faktoren aktiviert und ebenso zahlreiche Zielgene beeinflussen kann, ist die Wirkung von NF κ B sehr facettenreich und viele Einzelheiten noch unerklärt (siehe Einleitung, Kap. 1.4). Unter anderem wird seit Jahren seine neuroprotektive vs. neurotoxische Eigenschaft kontrovers diskutiert. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir bereits eine neuroprotektive S100B abhängige Aktivierung von NF κ B in primären hippocampalen Neuronen der Ratte nach einer NMDA-induzierten Exzitotoxizität nachweisen (Kögel et al., 2004). In einem weiterführenden Schritt galt es zunächst, mögliche Veränderungen der NF κ B-Aktivität, insbesondere der verschiedenen Untereinheiten, während einer hypoxie-induzierten Apoptose zu erforschen.

Hierzu wurden humane Neuroblastomzellen (SHSY5Y) für 3 h einer Hypoxie ausgesetzt und haben dann z. T. eine Reoxigenierung für 1 h erfahren. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Gelretardationsstudien durchgeführt (Abbildung 15.). Es zeigt sich nach der Hypoxie (3 h) im Vergleich zu der Normoxiekontrolle ein Anstieg der NF κ B-Aktivität, welcher nach der Reoxigenierungszeit (1 h) erneut abfällt.

Da durch zahlreichen Studien belegt ist, dass verschiedene Untereinheiten von NF κ B verschiedene Zielgene mit verschiedenen Signalwegen aktivieren, sollte in einem sog. „Supershifting“-Modell die Aktivität der jeweiligen Untereinheiten untersucht werden. Dafür wurden im selben Experiment einige der Proteinextrakte mit Antikörpern gegen die unterschiedlichen Untereinheiten versetzt und in der gleichen Gelretardationsstudie analysiert. Es kam hierbei nach der Hypoxieschädigung (3 h) vor allem zu einer Aktivierung der p50/p65-Untereinheit, welche nach der Reoxigenierungszeit erneut abfällt (Abbildung 15).

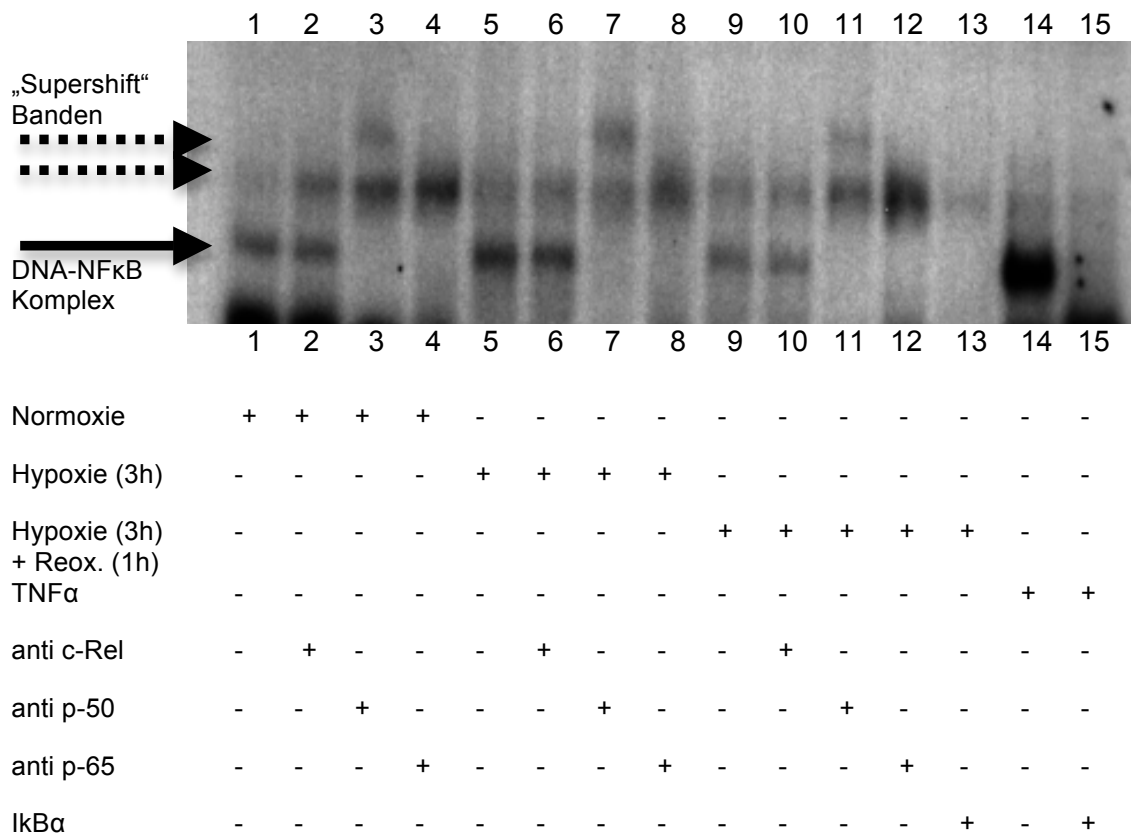


Abb. 15: NF κ B Aktivität in humanen Neuroblastomzellen nach einer Hypoxieschädigung im Gelshift-Experiment und Supershift-Analysen

SHSY5Y Zellen wurden für 3 h einer Hypoxie ausgesetzt. Wo beschriftet wurde bei den Zellen danach auch eine Reoxigenierung für 1 h durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend lysiert, eine κ B-DNA-sequenzhaltige Sonde wurde mit γ^{32} P-ATP markiert und mit den Proteinlysaten inkubiert. Es erfolgte eine Auftrennung mittels nicht-denaturierender Elektrophorese. Nach der Gel Trocknung kam es zu einer Exposition mit einem Röntgenfilm zur Autoradiographie bei -80°C für 2 Tage. Als Kontrolle für die spezifische NF κ B Bande (siehe Pfeil) diente als Positivkontrolle TNF α (14). TNF α induziert die I κ B-Phosphorylierung durch eine Aktivierung von IKK, welches schlussendlich in eine schnelle Degradierung von I κ B und einer Aktivierung von NF κ B mündet. Als weitere Kontrolle diente der I κ B α -Zusatz, der als Inhibitor an NF κ B bindet und dessen Aktivierung hemmt (13+15).

Es zeigt sich im Vergleich zu der Normoxiekontrolle (1) nach Hypoxieschädigung zunächst eine NF κ B-Aktivierung (6) die nach einer Reoxigenierungszeit von 1 h erneut abfällt (9).

Für die Analyse der durch Hypoxie induzierten NF κ B-Untereinheiten wurden Gelretardationsstudien (Supershifting)-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden vor Inkubation mit der γ^{32} P-ATP markierten Sonde die jeweiligen Proteinextrakte mit Antikörper gegen die Untereinheiten p-50, p-65 und c-Rel versetzt (2-4; 6-8; 10-12).

Nach Hypoxie kommt es zu vor allem zu einer Aktivierung des p50/p65 Heterodimers, welches nach Behandlung mit den jeweiligen Antikörpern eine „Supergeshift“ Bande im Gel aufzeigt (gepunktete Pfeile) (7+8).

3.3. DNA-Schädigung, S100B und die Rolle von p53

In den letzten Jahren gab es vermehrt Hinweise, dass S100B zusätzlich zur Bindung an den Zelloberflächenrezeptor RAGE auch durch direkte Bindungen an intrazelluläre Proteine seine Wirkungen entfalten kann. Eines dieser, besonders für die Apoptoseeinleitung wichtigen Proteine ist p53. Der Tumorsuppressor p53 ist unter anderem als Transkriptionsfaktor in zahlreiche Zellprozesse und Signaltransduktionswege wesentlich mit involviert und spielt unter anderem bei der Initiierung der Apoptose oder des Zellzyklusarrests nach DNA-Schädigung eine wichtige Rolle (siehe Einleitung). Da neuronale, entdifferenzierte Zellen ihre Teilungsfähigkeit weitestgehend verloren haben, sind sie besonders anfällig für DNA-schädigende Prozesse. Die Fähigkeit dieser Zellen, trotz ihrer vermeintlichen Schwäche sehr lange zu überleben und ihre Funktion dabei adäquat auszuüben, ist verständlicherweise überlebenswichtig und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

Mit dieser Arbeit sollte deshalb die Rolle von S100B auch bei der durch DNA-Schädigung induzierten Apoptose untersucht werden. Dies wurde zur besseren Vergleichbarkeit der eventuellen Signalwege erneut an der humanen Neuroblastomzelllinie SHSY5Y und primären hippocampalen Neuronen der Ratte untersucht. Als direkte DNA-schädigende Reagenzien welche zur p53-Aktivierung führen, wurden Etoposid und UV-Bestrahlung eingesetzt während Epoxomicin als Proteasominhibitor zu einer p53-Stabilisierung führt.

3.3.1. S100B bei der Apoptose in SHSY5Y Zellen induziert durch den Proteasomeninhibitor Epoxomicin

Epoxomicin, eines der am spezifischsten wirkenden Proteasomeninhibitoren, bindet irreversibel an der Chymotrypsin-ähnlichen Seite des Proteasoms (Sin et al., 1999). Proteasomeninhibitoren verhindern unter anderem den Reparaturmechanismus einer geschädigten DNA.

Es konnte ebenfalls in SHSY5Y-Zellen gezeigt werden, dass Epoxomicin zu einer Konzentrationssteigerung der poly-ubiquinierten Proteine und p53 in der Zelle führt und zusätzlich eine Ausschüttung von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium und eine Caspaseaktivierung fördert (Concannon et al., 2007).

Zur Untersuchung der Frage nach dem Effekt von S100B auf die Apoptoseinduktion durch einen proteasomalen Stress und einer p53-Aktivierung, hervorgerufen durch Epoxomicin, wurden humane SHSY5Y-Zellen zur Hälfte mit 200 ng/ml S100B für 4 h präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen einer Behandlung von 50nM Epoxomicin unterzogen. Die bereits mit S100B präinkubierten Zellen wurden zusätzlich weiterhin mit 200 ng/ml S100B behandelt. Die Kontrollen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Der Effekt auf die induzierte Apoptose wurde mittels eines Caspase-Assays untersucht (Abbildung 16).

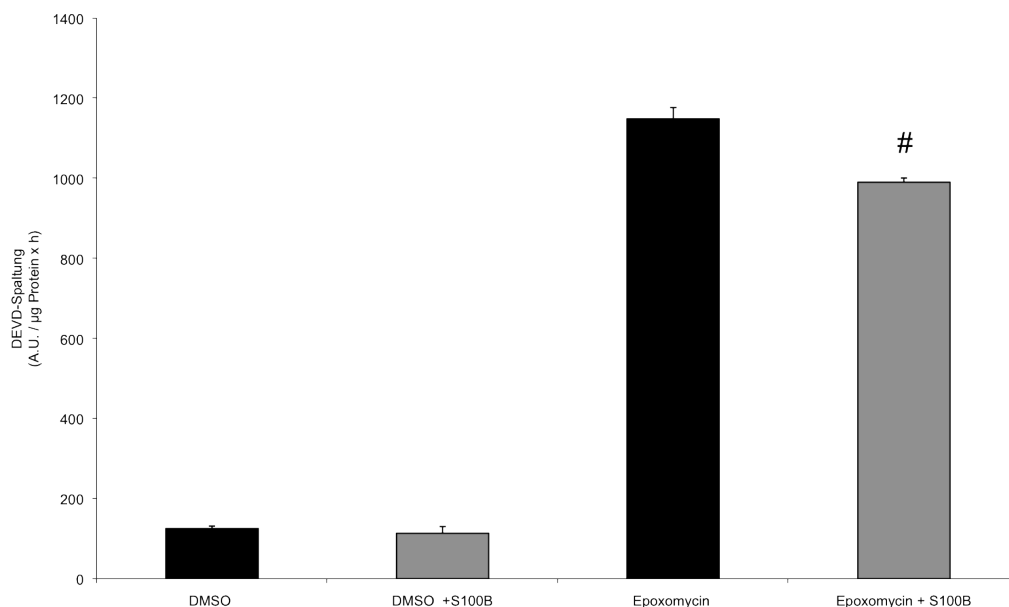


Abb. 16: SHSY5Y-Zellen wurden für 24h mit 50 nM Epoxomicin behandelt. Zellen mit zusätzlich 200 ng/ml S100B (Präinkubation 4 h) zeigen eine signifikante Reduktion der Caspaseaktivität und damit Apoptose. Kontrollen wurden mittels DMSO mit und ohne 200 ng/ml S100B untersucht.

Die Daten zeigen Mittelwerte +/- SD von n = 8 Kulturen pro Behandlung. (#p <0,05 verglichen mit den ebenfalls durch Epoxomicin behandelten Kulturen ohne S100B). Die Versuche wurden zwei Mal wiederholt mit vergleichbaren Ergebnissen.

3.3.2. S100B-Effekt in SHSY5Y-Zellen auf die durch den Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid ausgelösten Apoptose

Etoposid agiert in der Zelle als Topoisomerase II-Inhibitor, und ist ein wichtiges Enzym in der DNA-Replikation. Etoposid führt konzentrationsabhängig zu einem Funktionsverlust der Topoisomerase II und dementsprechend zu einer fehlerhaften DNA-Reparatur, Replikation, Transkription, Rekombination und schlussendlich nach irreparablen Doppelstrangbrüchen zur p53-Aktivierung und Apoptoseeinleitung (vgl. Einleitung; Li et al., 2001).

In einem ersten Experiment konnte mit einer Etoposid-Konz. von 200µM zwar eine deutliche zeitabhängige Caspase-Aktivität und damit Apoptose nachgewiesen werden, welche nach bereits 8 h signifikant war; der neuroprotektive Trend mit 200 ng/ml S100B und 4 h Präinkubation war jedoch nicht signifikant. Die Versuche wurden mit verschiedenen Behandlungszeiten wiederholt. Erst nach 16 h und 24 h konnten wir einen eindeutig signifikanten neuroprotektiven Effekt von S100B nachweisen, der nach 36 h in seiner Wirkung nachließ (Abbildung 17 und 18).

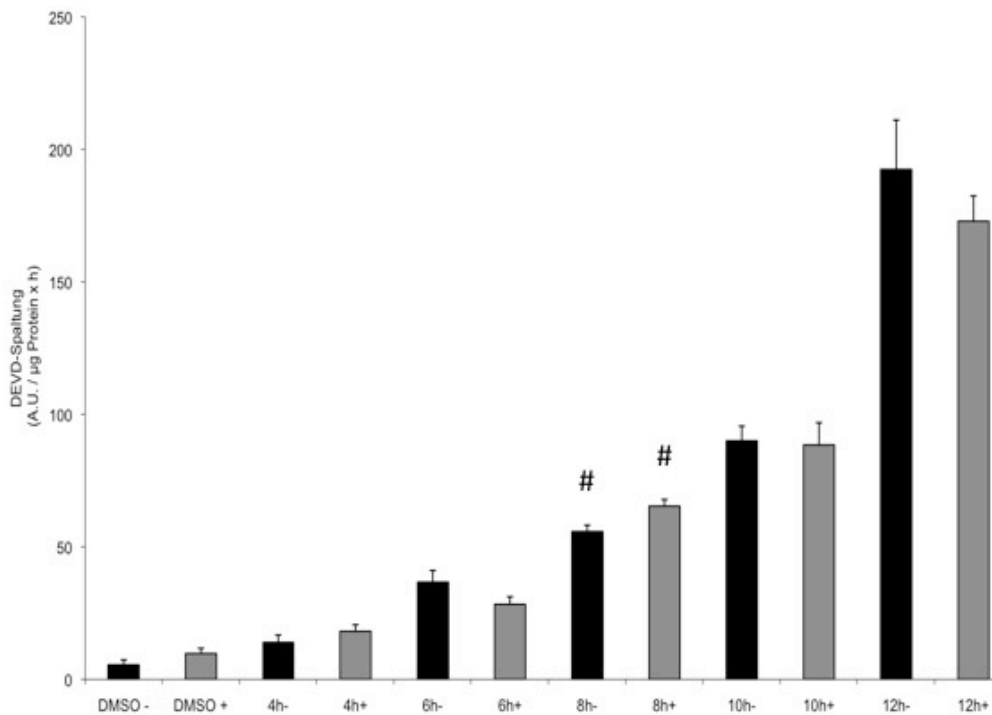


Abb. 17: Deutlicher zeitabhängiger Anstieg der Caspaseaktivität bei Behandlung von SHSY5Y-Zellen mit 200 µM Etoposid.

Die zusätzlich mit S100B behandelten Zellen wurden 4h mit 200 ng/ml S100B präinkubiert und anschließend wurde für die angegebene Zeit 200 µM Etoposid addiert. Während durch Etoposid nach 8 h signifikant die Apoptose induziert ist, zeigt die Anwesenheit von S100B lediglich einen neuroprotektiven jedoch noch nicht signifikanten Trend. (Ab Behandlungsstart wurde 3% FCS benutzt). (#p < 0,05 verglichen mit den mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Kulturen). Daten sind Mittelwerte +/- SD von n = 8 Kulturen pro Behandlung.

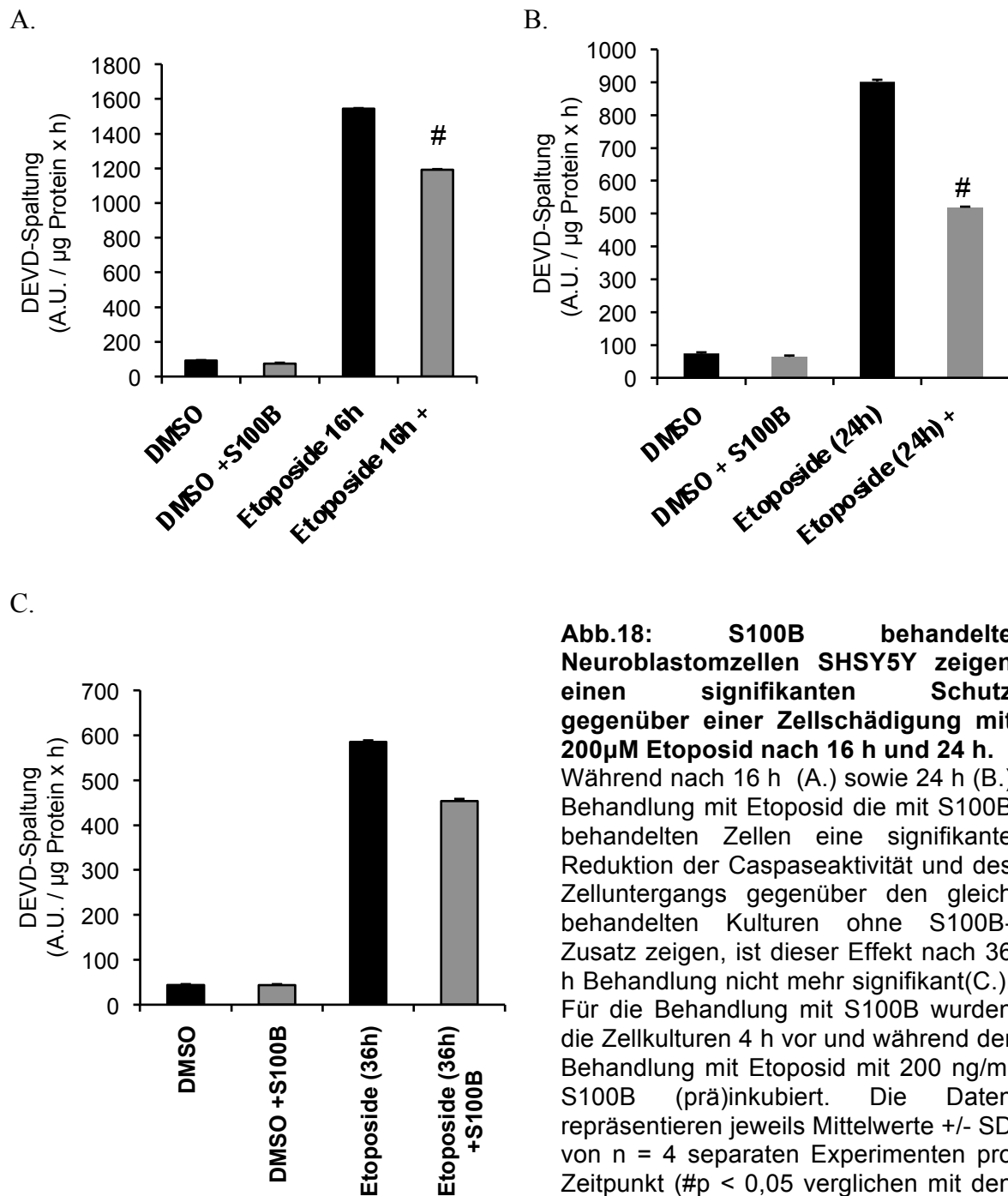


Abb.18: S100B behandelte Neuroblastomzellen SHSY5Y zeigen einen signifikanten Schutz gegenüber einer Zellschädigung mit 200µM Etoposid nach 16 h und 24 h. Während nach 16 h (A.) sowie 24 h (B.) Behandlung mit Etoposid die mit S100B behandelten Zellen eine signifikante Reduktion der Caspaseaktivität und des Zelluntergangs gegenüber den gleich behandelten Kulturen ohne S100B-Zusatz zeigen, ist dieser Effekt nach 36 h Behandlung nicht mehr signifikant (C.). Für die Behandlung mit S100B wurden die Zellkulturen 4 h vor und während der Behandlung mit Etoposid mit 200 ng/ml S100B (prä)inkubiert. Die Daten repräsentieren jeweils Mittelwerte \pm SD von $n = 4$ separaten Experimenten pro Zeitpunkt (# $p < 0,05$ verglichen mit den Etoposid-behandelten Kulturen ohne S100B).

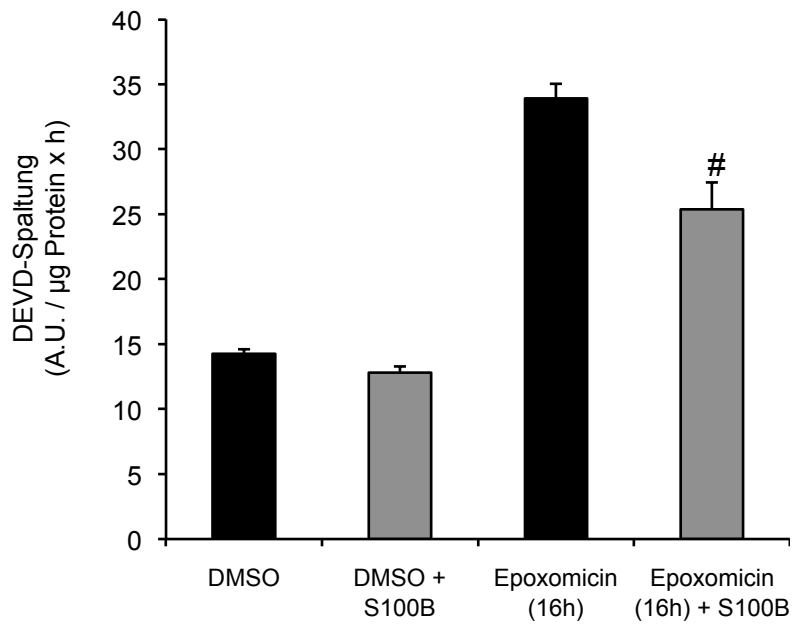
3.3.3. S100B-Effekt auf DNA Schädigung bei primären hippocampalen Neuronen der Ratte

Um festzustellen ob S100B unterschiedliche Effekte in teilungsfähige und replizierbare Neuroblastomzellen und primäre, enddifferenzierte hippocampale Neurone zeigt, wurden die Schädigungsmodelle mit Epoxomicin und UV-Bestrahlung erneut mit und ohne S100B untersucht.

3.3.4. S100B schützt primäre hippocampale Neurone der Ratte vor einem Zelltod hervorgerufen durch einen Epoxomicin induziertem proteasomalen Stress

Um festzustellen ob S100B auch auf Neuronen aus Primärkulturen einen schützenden Effekt gegenüber einer Apoptoseinduktion durch einen Proteasomalen Stress und p53-Aktivierung durch Epoxomicin besitzt, wurden primäre hippocampale Neurone der Ratte zur Hälfte mit 200 ng/ml S100B für 24 h präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen einer Behandlung von 50nM Epoxomicin unterzogen. Die bereits mit S100B präinkubierten Zellen wurden zusätzlich weiterhin mit 200 ng/ml S100B behandelt. Die Kontrollen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Der Effekt auf die induzierte Apoptose wurde mittels eines Caspase-Assays untersucht (Abbildung 19). Es zeigt sich nach 16 h eine signifikante Reduzierung der Caspase-Aktivität in Anwesenheit von S100B. Der neuroprotektive Schutz war nach 20 h tendenziell weiterhin vorhanden, war jedoch nicht mehr signifikant.

A.



B.

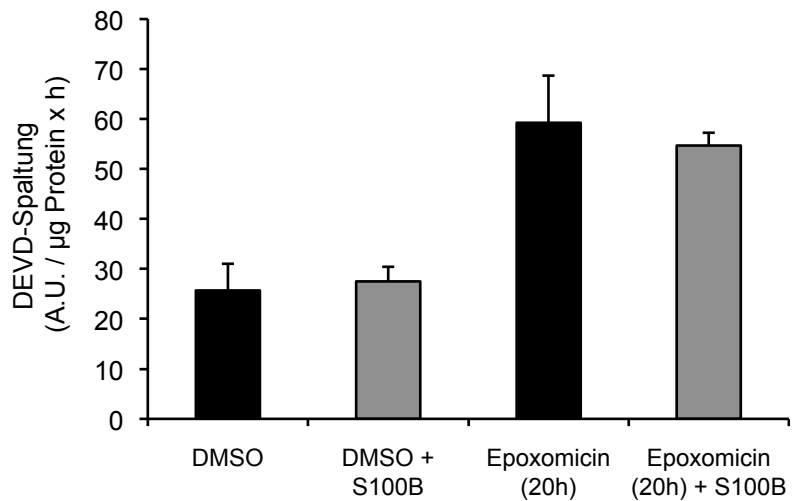


Abb. 19: Primäre Hippokampale Neurone der Ratte zeigen unter Behandlung mit S100B einen signifikanten Schutz gegenüber Epoxomicin-induziertem Zelltod

Hippokampale Neurone wurden nach einer 24 h Präinkubation mit 200 ng/ml S100B einer zusätzlichen Epoxomicin-Behandlung (50 nM) für 16 h (A.) bzw. 20 h unterworfen (B.). Nach 16 h zeigen die mit S100B behandelten Neurone eine signifikant reduzierte Caspase-Aktivität und damit einen signifikanten protektiven Effekt von S100B (A.). Dieser Effekt ist tendenziell nach 20 h zwar immer noch vorhanden ist jedoch nicht mehr signifikant nachweisbar.

Die Daten repräsentieren jeweils Mittelwerte \pm SD von $n = 4$ separaten Experimenten pro Zeitpunkt ($\#p < 0,05$ verglichen mit den Epoxomicin behandelten Zellen ohne S100B-Zusatz).

3.3.5. DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung

DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung spielt auf der Erde mit einer zunehmenden Ozonschichtveränderung eine zunehmende Rolle. Bei einer Reihe von Krankheiten scheint die UV-Strahlung eine wesentliche Rolle zu spielen unter anderem bei Tumoren wie dem malignen Melanom. UV-Strahlen können direkte und indirekte DNA-Schädigungen auslösen. Zu den indirekten Mechanismen zählen: Induktion von (Sauerstoff-)freien Radikalen und ROS (reactive oxygen species), welche zu Modifizierung der Basen und schlussendlich zu oxydativem Stress führen können.

Zu den direkten Mechanismen zählen: Störung der Genomintegrität, fehlerhafte Inkorporation der Basen bei der Replikation, hydrolytische Schäden mit Deaminierung (Verlust von Aminogruppen), Depurinierung und Depyrimidinierung mit der Gefahr eines einfachen oder sogar doppelten DNA-Strangbruchs (Rastogi et al., 2010).

DNA-Schädigung selbst induziert durch eine p53-Aktivierung einen Reparaturmechanismus oder eine Apoptose (Smith et al., 2010). Dieser Effekt nach UV-Bestrahlung wurde hier modellhaft zur p53-Aktivierung und Apoptoseinitiierung eingesetzt.

3.3.6 Hippokampale Neurone der Ratte zeigen in Anwesenheit von S100B einen signifikanten Schutz gegenüber UV-induziertem Zelltod

In einem nächsten Experiment wurden hippokampale Neurone der Ratte modellhaft einer UV-Bestrahlung zur DNA-Schädigung und p53-Aktivierung ausgesetzt. Hierfür wurden die Zellen erneut zur Hälfte für 4 h mit 200 ng/ml S100B präinkubiert und anschließend einer UV-Bestrahlung von 100 J/m² ausgesetzt. Die Zellen wurden daraufhin für 12 bzw. in einem zweiten Experiment für 20 h weiter im Brutschrank mit ihrem ursprünglichen Medium behandelt. Zum Schluss wurde die Apoptoserate mithilfe eines Caspase-Assays analysiert.

Es zeigte sich auch hierbei nach 12 h eine signifikante Caspase- und Apoptosereduktion mit S100B. Dieser Effekt war nach 20h nicht mehr signifikant (Abbildung 20).

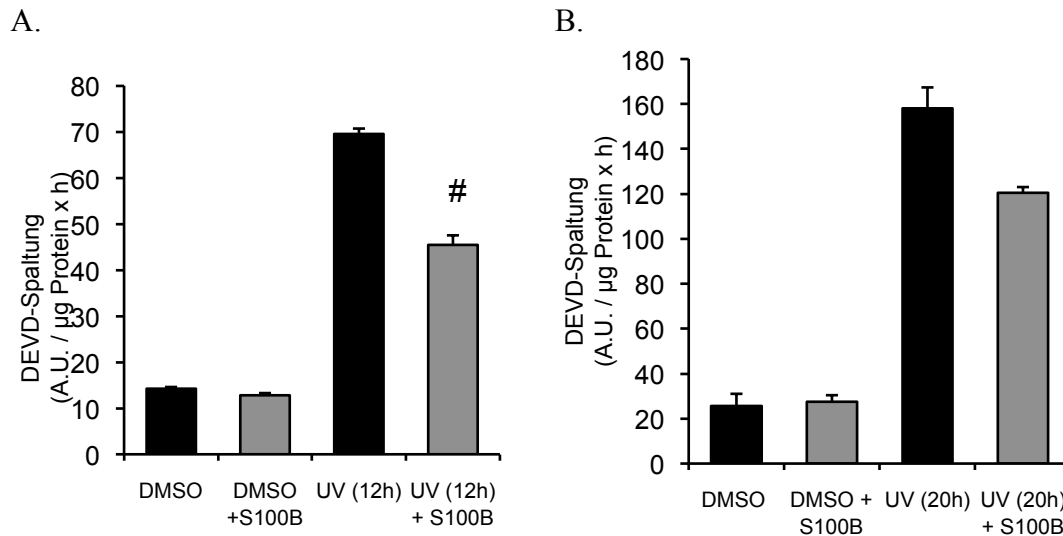


Abb. 20: Primäre Hippokampale Neurone der Ratte zeigen unter Behandlung mit S100B einen signifikanten Schutz gegenüber UV-Schädigung

Hippokampale Neurone wurden zur Hälfte 4 h mit 200 ng/ml S100B präinkubiert. Anschließend wurden alle Zellen außer den Kontrollen einer UV-Bestrahlung von 100 J/m^2 ausgesetzt und erneut im Brutschrank für 12 h (A.) bzw 20 h (B.) inkubiert. Die nach 12 h durchgeführte Zelltod-Analyse mittels Caspase-Assay zeigt einen signifikanten Schutz der S100B-behandelten Neurone gegenüber einer UV-Bestrahlung. Die erst nach 20 h untersuchten Zellen konnten zwar weiterhin eine schützende Tendenz für S100B aufzeigen, dieser war jedoch nicht mehr signifikant. Die Daten repräsentieren jeweils Mittelwerte \pm SD von $n = 4$ separaten Experimenten pro Zeitpunkt ($\#p < 0,05$ verglichen mit den vergleichbaren UV-behandelten Zellen ohne S100B Zusatz). Die Versuche wurden einmal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

3.3.7. Die p53-abhängige Rolle von S100B im Apoptoseverhalten von Neuroblastomzellen nach DNA-Schädigung

p53 spielt bei der Apoptoseeinleitung nach DNA-Schädigung eine wesentliche Rolle. Außerdem ist eine direkte Interaktion der Proteine S100B und p53, bei der es zu einer verminderten Transkriptionsaktivität von p53 kommt, durch zahlreiche Arbeiten beschrieben (siehe Einleitung). Nachdem es unter anderem auch in unserer Arbeitsgruppe (Rachid El Idrissi, Daten noch nicht publiziert) Hinweise für eine intrazelluläre Aufnahme von S100B gab (Lin et al., 2010) wurde in der vorliegenden Arbeit nach DNA-Schädigungen mit UV-Bestrahlung und Etoposid untersucht, ob die neuroprotektive Rolle von S100B evtl. durch eine Interaktion und Wechselwirkung mit p53 zu erklären ist.

3.3.8. Verminderte p53-Expression nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung in Anwesenheit von S100B:

Wie oben beschrieben ist p53 einer der Hauptfaktoren in der Initiierung der Apoptose nach einer DNA-Schädigung. Nachdem wir in den Experimenten zuvor einen signifikanten Schutz von Neuronen gegenüber UV-induzierter Apoptose durch S100B beobachtet haben, galt es, einen möglichen Effekt von S100B auf p53 näher zu untersuchen. Dafür wurden SHSY5Y-Zellen erneut zur Hälfte mit 200 ng/ml S100B für 4 h präinkubiert. Anschließend wurden alle Zellen, außer den Kontrollen, einer UV-Bestrahlung von 100 J/m² ausgesetzt und dann erneut mit ihrem konditioniertem Medium für 8 h, 12 h, oder 16 h im Brutschrank inkubiert. Es erfolgte mit Hilfe eines Western-Blottings die Analyse der p53-Expression nach UV-Bestrahlung mit und ohne S100B (Abbildung 21).

Hier zeigt sich zunächst eine deutlich erhöhte p53-Konzentration nach 8 h, welche in den nächsten Zeitabschnitten erneut abfällt. Dieser Anstieg ist unter zusätzlicher Behandlung mit S100B deutlich geringer und langsamer.

Während nämlich nach 8 h in den mit S100B behandelten Zellen noch kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen zu verzeichnen ist, ist in der Behandlung ohne S100B bereits das Maximum der p53-Aktivierung erreicht. Ein erhöhter Anstieg der p53-Expression ist mit S100B-Inkubation jedoch erst nach 12 h zu beobachten und ist auch hier immernoch geringer als bei den vergleichbaren Zellen ohne S100B. Nach 16 h sind die p53-Proteinlevel wieder ähnlich. S100B kann somit evtl. durch eine verminderte p53-Expression seinen zuvor beschriebenen neuroprotektiven Effekt bei UV-Bestrahlung ausüben.

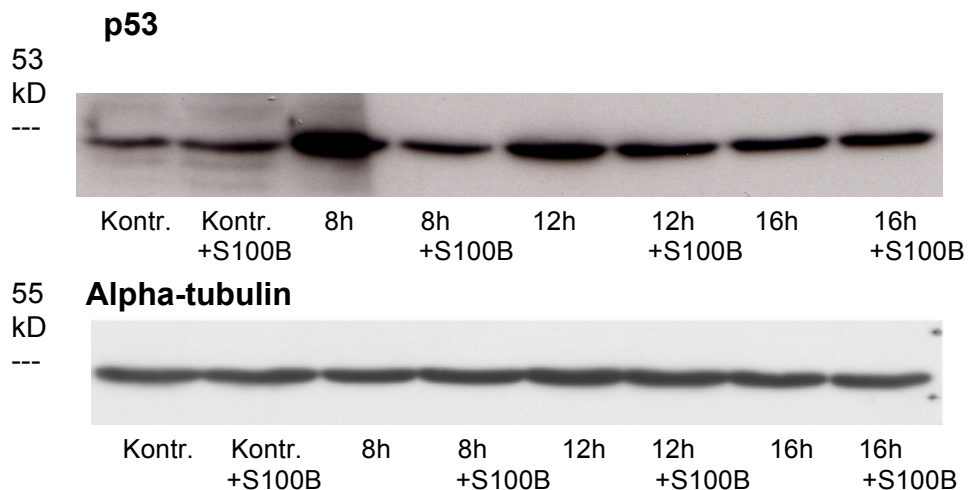


Abb. 21 : Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des S100B-Effekts auf die p53-Expression in humanen Neuroblastomzellen nach UV-Bestrahlung

Humane Neuroblastomzellen wurden, wo gekennzeichnet, 4 h vor Beginn der Schädigung und für den gesamten Zeitpunkt danach mit 200 ng/ml S100B inkubiert. Außer die mit dem Lösungsmittel (DMSO) behandelten Neurone wurden die Zellen einer UV-Bestrahlung von 100 J/m² ausgesetzt und anschließend für 8 h, 12 h und 16 h im Brutschrank weiter inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Proteine nach Gehaltsbestimmung und Gelelektrophorese mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert. Nach Inkubation mit dem p53-Antikörper wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper zur Detektion mittels Chemiluminiszenzreaktion verwendet. Nach Stripping der Antikörper von der Membran wurde der Vorgang mit α -Tubulin-Antikörper als Ladekontrolle wiederholt.

3.3.9. Effekt von S100B auf p53-Aktivierung während DNA-Schädigung durch Etoposid in SHSY5Y-Neuronen

Nachdem im vorherigen Versuch gezeigt werden konnte, dass S100B in Western-Blot-Analysen zu einer verminderten p53-Expression nach UV-Bestrahlung führt, und dies durch eine evtl. direkte Interaktion von S100B und p53 zu erklären ist, sollte in einem weiteren DNA-Schädigungsmodell dieser Effekt weiter untersucht und ggf. bestätigt werden. Da p53 sowohl durch Translokation zum Zellkern und Transkriptionsaktivierung bestimmter Zellgene als auch durch transkriptionsunabhängige Bindung und Beeinflussung von pro- und antiapoptotischen Proteinen eine Apoptose initiieren kann (siehe Einleitung) galt es zusätzlich, die Frage der zellulären Verteilung von p53 während einer Schädigung zu klären und einen evtl. S100B Einfluss hierauf aufzuzeigen.

Dazu wurden humane SHSY5Y-Neuroblastomzellen, wie im Versuch 3.3.2 einer Behandlung mit 200µM Etoposid mit und ohne Anwesenheit von S100B unterworfen. Daraufhin wurde die p53-Expression und -Verteilung in einer Immunfluoreszenz-Analyse untersucht und zur Kontrolle die Zellkerne mittels Höchstfärbung dargestellt (Abbildung 22). Es zeigt sich eine Aktivierung von p53 nach Etoposid Behandlung bereits nach 4 h und eine vermehrte Translokation in den Zellkern. Diese Effekte sind jedoch unter den zusätzlich S100B (200 ng/ml) behandelten Neuronen deutlich schwächer ausgeprägt. S100B führt also zu einer verminderten zellulären Proteinkonzentration von p53 und einer verminderten Akkumulation im Zellkern. Auch diese Beobachtungen können durch eine direkte Bindung von S100B an p53 zu erklären sein.

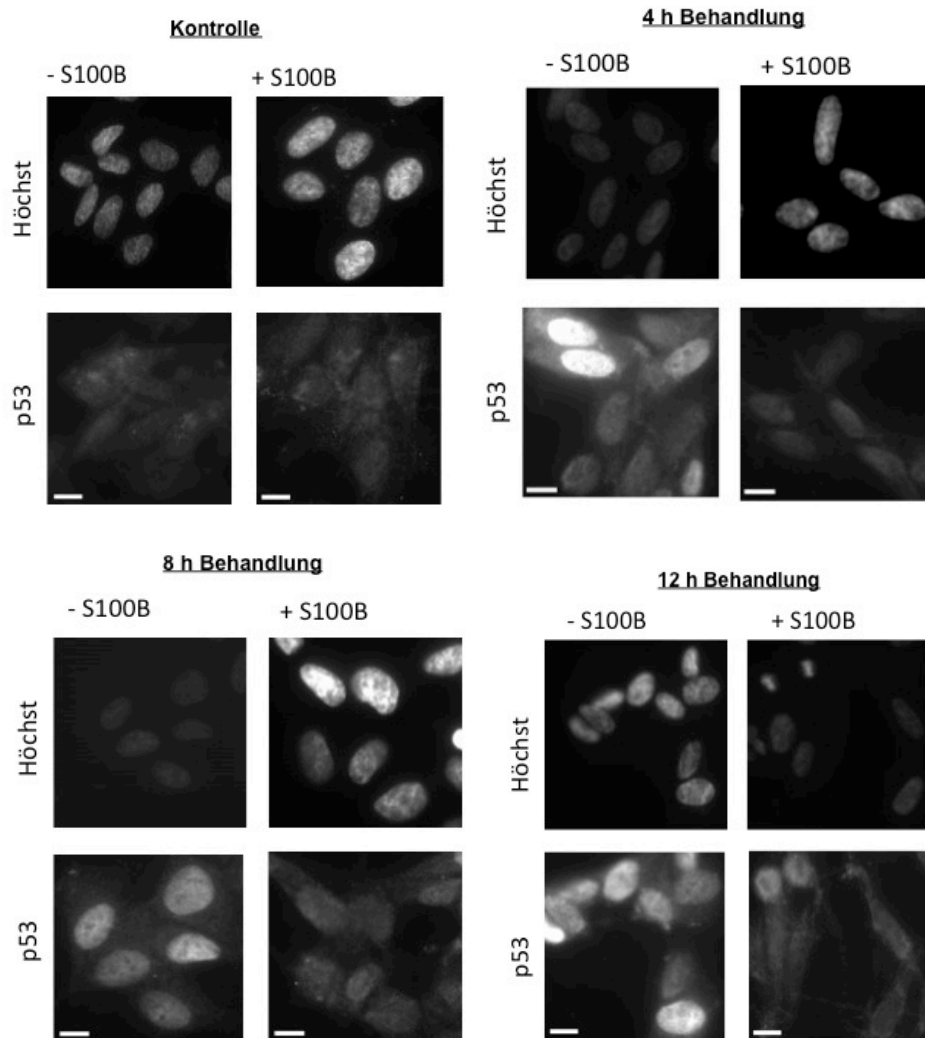


Abb. 22: Immunfluoreszenz-Analyse der Expression von p53 in Etoposid-behandelten SHSY5Y-Zellen in Abhängigkeit von S100B.

S100B behandelte SHSY5Y Zellen wurden, wo beschriftet, zunächst für 24h mit 200 ng/ml S100B präinkubiert. Anschließend wurden alle Zellen für die angegebenen Zeiten (4 h, 8 h, 12 h) mit 200 μ M Etoposid behandelt. Die Kontrollen wurden mit dem Lösemittel DMSO behandelt. In der anschließenden Immunfluoreszenz-Analyse mittels polyklonalen p53-Antikörper (1:2500 rabbit) wurde die Expression und die Verteilung von p53 untersucht. Die zusätzliche nukleäre Höchstfärbung diente zur Kontrolle der Kernposition. Anschließend wurden die Zellen digital fotografiert. Es zeigt sich in den verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zu den Etoposid behandelten Zellen ohne S100B unter der Behandlung mit S100B eine verminderte intrazelluläre p53 Konzentration und eine Blockierung der Translokation von p53 in den Zellkern. Der Maßstab beträgt 25 μ m.

3.4. S100B-Effekt auf die Expression von p53-abhängigen Zielgenen

Nachdem gezeigt wurde, dass der neuroprotektive Effekt von S100B bei der DNA-Schädigung evtl. p53-abhängig ist, stellte sich die Frage ob dieser Effekt durch einen der von p53 aktivierten Gene erklärt und vermittelt ist.

Hierfür wurden die in den Vorversuchen 3.3.2 und 3.3.7 beschriebenen DNA-Schädigungen an humanen Neuroblastomzellen SHSY5Y mittels UV-Bestrahlung und Etoposid-Behandlung erneut durchgeführt. Anschließend wurde die mRNA der häufigsten p53-abhängigen Zielgene im Rahmen einer initiierten Apoptose einer quantitativen RT-PCR Untersuchung unterzogen.

Eines der pro-apoptotischen Proteine der Bcl2-Familie, welches durch p53 aktiviert werden kann ist Noxa. Eine RT-PCR Analyse nach UV-Bestrahlung ergab zwar eine erhöhte Aktivität von Noxa bereits nach 4h aber keinen signifikanten Unterschied in Anwesenheit von S100B (Abbildung 23).

Es zeigt sich nach UV-Bestrahlung zwar insgesamt ein Anstieg der Genaktivierung aber keine signifikante Veränderung durch S100B.

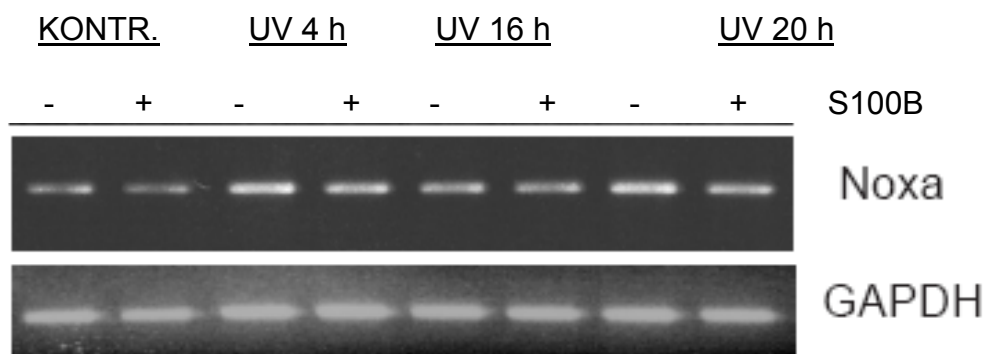


Abb. 23: S100B Effekt auf die Expression von Noxa nach UV-Bestrahlung
SHSY5Y-Zellen wurden jeweils zur Hälfte mit (200 ng/ml) S100B für 24 h präinkubiert. Anschließend wurden alle Zellen außer den Kontrollen einer UV-Bestrahlung mit 100 J/m^2 ausgesetzt und für 4 h, 16 h oder 20 h weiter im Brutschrank inkubiert. Die anschließende Untersuchung der Noxa-mRNA mittels quantitativer RT-PCR-Analyse ergab, dass die Aktivierung von Noxa durch UV-Bestrahlung in Anwesenheit von S100B keine signifikante Veränderung zeigt. Als Kontrolle diente 20 Zyklen GAPDH.

Zwei weitere Zielgene, die im Rahmen der Apoptoseinitiierung durch p53 häufig eine wichtige Rolle spielen, sind PUMA und WAF1.

Sowohl PUMA, ein Mitglied der Bcl2-Genfamilie, als auch der Cyklin-abhängige Kinase-Inhibitor WAF1 zeigen weder eine Aktivierung durch Etoposid oder UV-Bestrahlung, noch einen S100B-abhängigen Effekt (Abbildung 24).

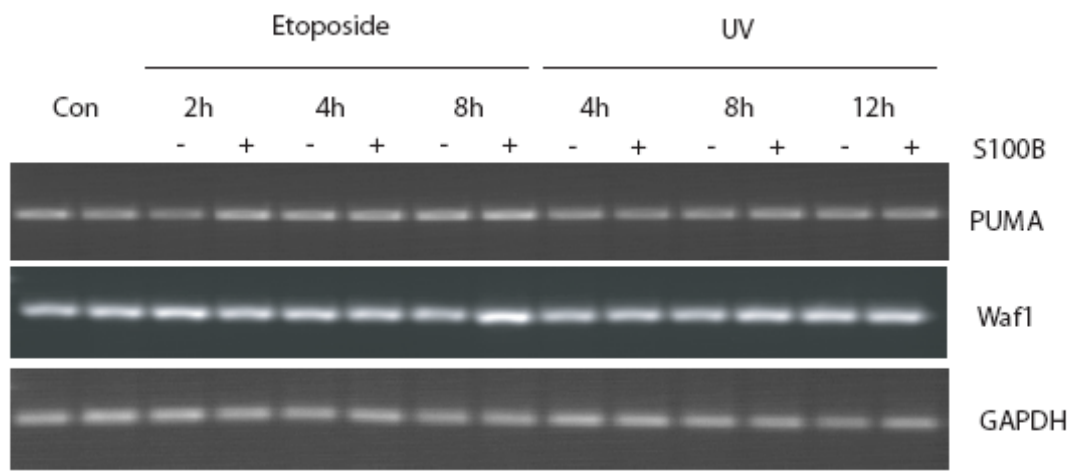


Abb. 24: S100B Effekt auf die Expression von PUMA und WAF1 nach UV-Bestrahlung und Etoposid-Behandlung

Humane SHSY5Y-Neuroblastomzellen wurden wo mit (+) gekennzeichnet mit (200 ng/ml) S100B für 24h präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die jeweils angegebene Zeit mit 200µM Etoposid-behandelt. Für die UV-Schädigung wurden die Zellen mit 100 J/m² bestrahlt und anschließend für die angegebenen Zeitpunkte weiter im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen lysiert, die Gesamt-RNA isoliert und in einer quantitativen RT-PCR die PUMA, WAF1 und GAPDH (zur Ladekontrolle) mRNA-Expression nach jeweils 25 Zyklen bestimmt. Es zeigt sich weder eine Aktivierung durch Etoposie oder UV-Bestrahlung noch eine Veränderung durch S100B.

4. Diskussion:

4.1. S100B und seine Rolle im zentralen Nervensystem

Die bisherigen Forschungsergebnisse aus unserer und anderen Arbeitsgruppen zeigen ein weit gefächertes Wirkungsspektrum von S100B in verschiedenen Zelltypen. S100B hat auf zahlreiche Zellarten wie Astrozyten, Neuronen, Adipozyten und Myoblasten unter anderem einen Effekt auf den Kalziumhaushalt, die Enzym- und Transkriptionsaktivität, Zellproliferation und Differenzierung, Proteinphosphorylierung, Zellwachstum- und Überleben (vgl. Einleitung; Donato et al., 2009).

Die Rolle von S100B bei verschiedenen Zellschädigungsmechanismen- bzw. beim Zelluntergang durch Apoptose-induzierende Stimuli ist Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsarbeiten und zu einem großen Teil noch unerforscht (Michetti et al., 2012; Lange et al., 2012). In Neuronen wird dabei ein konzentrationsabhängiger Effekt unterschieden. In geringen Konzentrationen hat S100B einen neurotrophen Effekt und hemmt unter anderem die inflammatorischen Reaktionen (Huttunen et al., 2000; Reali et al., 2005). Es schützt Neurone vor Apoptose-induzierenden Stresssituationen, fördert das neuronale Wachstum und stimuliert die Astrozytenproliferation (van Eldik et al., 2003).

Nach experimentellen Schädel-Hirn-Traumata bei Ratten konnte eine S100B-Freisetzung beobachtet werden, welche zu einer Reduzierung der späten neuronalen Schädigungen führt (Ellis et al., 2007). Zum anderen konnte durch aktive intraventrikuläre Infusion geringer Mengen von S100B sogar die Neurogenese im Bereich des Hippokampus induziert und die kognitiven Funktionen gebessert werden (Kleindienst et al., 2005). Als Ursache der Neuroprotektion durch S100B wird unter anderem eine Stimulierung der Glutamataufnahme durch Astrozyten (Tramontina et al., 2006) sowie ein erhöhter neuronaler, RAGE abhängiger Schutz gegenüber β -Amyloid-Toxizität diskutiert (Businaro et al., 2006).

In höheren Konzentrationen wirkt S100B als DAMP- (damage associated molecular pattern) Faktor und kann die Neuroinflammation direkt oder indirekt über die Aktivierung des RAGE-Rezeptors aktivieren. Hierbei kommt es zu einer Mikrogliaaktivierung mit Hochregulierung der COX-2, Stimulierung der NO- und TNF α -Freisetzung in Astrozyten und Mikroglia und einer Apoptoseeinleitung in Neuronen (Bianchi et al., 2010; Adami et al., 2004; Kögel et al., 2004).

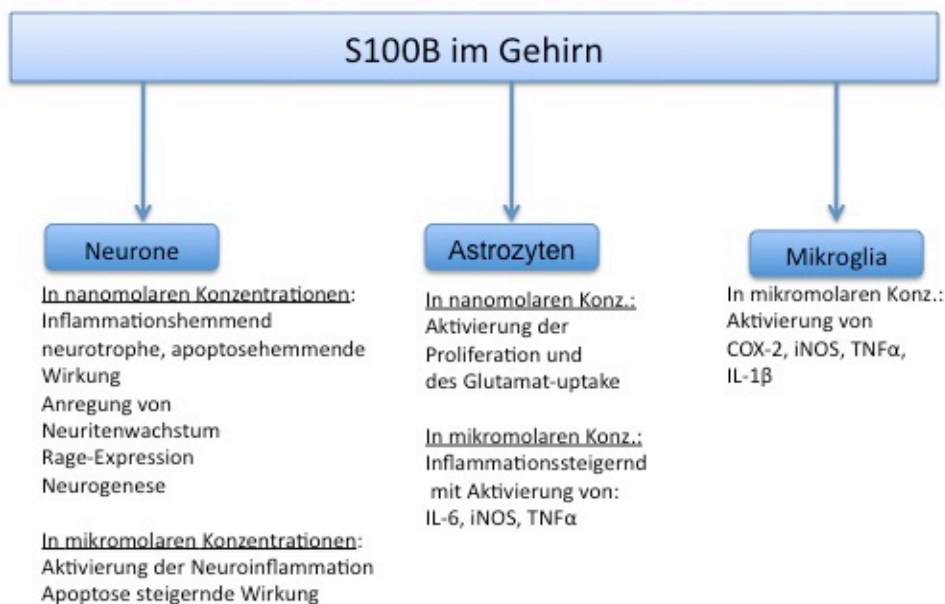


Abb. 25: Wirkung von S100B im Gehirn (modifiziert nach Donato und Heizmann, 2010)

Aus diesem Grund wird S100B im Serum und Liquor cerebrospinalis oft als Analyse-, Screening- und Verlaufsparemeter zahlreicher neuronaler Zellschädigungen, analog der Rolle des C-reactiven Proteins (CRP) als Marker für die systemische Inflammation zunehmend diskutiert und z. T. bereits klinisch eingesetzt (Sen et Belli, 2007; siehe Kap. 4.8.)

Abgesehen davon, dass S100B nach einer Zellschädigung durch Apoptose oder Nekrose passiv von allen S100B exprimierenden Zellen freigesetzt wird, kann es auch z. T. aktiv z. B. von Astrozyten und Adipozyten sezerniert werden (Gerlach et al., 2006).

Außerhalb der Zelle übt S100B seine bereits erforschten autokrinen und parakrinen Effekte hauptsächlich über den Rezeptor RAGE aus (Donat, 2007). In neueren Untersuchungen wurden auch andere Rezeptoren wie der FGFR1-Rezeptor für die S100B-Wirkung diskutiert (Sorci et al., 2010). Diese und weitere intrazelluläre Regulatorfunktionen und extrazelluläre Signalwirkungen werden immer weiter ergänzt und untersucht.

In dieser Arbeit sollte ein möglicher Effekt von S100B auf das Zellüberleben nach unterschiedlichen Apoptoseinduktionsmechanismen in zwei verschiedenen neuronalen Zellmodellen untersucht werden. Anschließend sollten die an diesem Effekt beteiligten intrazellulären Veränderungen auf Protein- und DNA-Ebene mit möglichen zugrunde liegenden Signalkaskaden erforscht werden. Die Ergebnisse können zu einem besseren Verständnis über klinische Krankheitsbilder beitragen und evtl. Therapieansätze für zukünftige Forschungsarbeiten bieten.

4.2 Untersuchung in zwei verschiedenen neuronalen Zellmodellen

4.2.1 Humane Neuroblastomzellen SHSY5Y

Die für diese Arbeit benutzte Neuroblastozelllinie SHSY5Y ist der dritte Subklon der SK-N-SH-Zelllinie (SH-SY, SH-SY5, SHSY5Y), welche ursprünglich 1970 durch eine Knochenmarksbiopsie eines metastasierten Neuroblastoms in einem 4-jährigen Mädchen gewonnen wurde (Biedler et al., 1978). SHSY5Y-Zellen haben die Fähigkeit, nach Kontakt mit bestimmten Agenzien z. B. RA (retinoic acid), BDNF (brain derived neurotrophic factor) oder Staurosporin, zu differenzieren und ein neuronales Phänotyp mit Neuritenausbreitung zu entwickeln (Singh et al., 2007; Cernaianu et al., 2008; Mollereau et al., 2007). Da diese Zelllinie außerdem zahlreiche biochemische und funktionelle Ähnlichkeiten mit Neuronen besitzt und eine sehr lange, kontaminationsfreie Proliferationseigenschaft hat, ist es als In-vitro-Zellmodell für neuronale Differenzierung und Metabolismus sowie Neurodegeneration, Neurotoxizität und Neuroprotektion weit verbreitet (Xie et al., 2010; vgl. Einleitung).

4.2.2 Hippokampale Neurone der Ratte

Um herausgearbeitete Erkenntnisse in der Neuroblastomzelllinie, die immerhin ursprünglich aus einem wenig differenzierten, teilungsaktiven Tumor stammt, zu bestätigen und gleichzeitig eine hohe Übereinstimmung mit den In-vivo-Verhältnissen zu gewinnen, wurden zusätzlich hippokampale Primärneurone der neonatalen Ratte für die Experimente herangezogen.

Dabei ist abgesehen vom Nutzen einer direkt aus dem Gehirn gewonnenen Primärkultur die Übereinstimmung mit den menschlichen Zellen ein großer Vorteil. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass zwischen einer untersuchten Untereinheit des für den exzitotoxischen Zelltod entscheidenden Rezeptors NMDA eine 99 %ige Übereinstimmung von Mensch, Ratte und Maus zu finden ist (Nakanishi et al., 1992). Hippokampale Neurone sind außerdem gegenüber einer Hypoxie sehr empfindlich und werden daher sehr oft für experimentelle, neuronenspezifische Fragestellungen zu diesem Thema herangezogen.

4.3. Hypoxie und NMDA-induzierte Exzitotoxizität : zwei In-vitro-Zelltodmodelle zur Untersuchung der zerebralen Ischämie

Der Schlaganfall (zu 85 % ischämisch und zu 15 % hämorrhagisch bedingt) ist die dritthäufigste Todesursache in den Industrieländern und die häufigste Ursache für eine permanente Behinderung bei Erwachsenen weltweit (Luo, 2010; Sims et Muyderman 2010). Trotz der ausgedehnten Forschungszweige ist bis heute eine adäquate klinische Therapie nach Ereigniseintritt ausgeblieben.

Durch eine verminderte oder ausbleibende Blutzufuhr kommt es in den Zellen des betroffenen Hirnareals (Neurone, Oligodendrozyten, Astrozyten und epithelialen Zellen) zu einer Schädigung (Dirnagl et al., 1999).

Unter anderem zeigt sich hierbei nach einem verminderten Sauerstoff- und Glukoseangebot, ein Abfall der ATP-Konzentration, ein Energieverlust der Natrium-Kalium-Pumpe der Zellmembran und damit eine Depolarisation der Zelle. Es folgt eine Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern, vor allem Glutamat, dem häufigsten und wichtigsten Neurotransmitter im Gehirn (Butcher et al., 1987). Eine Exzitotoxizität wird initiiert, bei der es aufgrund einer exzessiven und oder prolongierten Glutamataktivität unter anderem zu einer massiven Überaktivierung des NMDA-Rezeptors mit Steigerung des intrazellulären Kalziumeinstroms kommt (Doble, 1995; Werner et al., 2000). Ein erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel führt dann entweder auf direktem Weg, z. B. durch Aktivierung zahlreicher Enzymsysteme wie Nukleasen, Proteasen, Phospholipasen oder Caspasen sowie der Bildung freier Radikale wie die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) oder auf indirektem Weg durch Depolarisation der Mitochondrienmembran und anschließender Freisetzung von Cytochrom-C, zu einer Apoptoseinitiierung und Aktivierung multipler Zelltodmechanismen (vgl. Einleitung; Wang et Qin, 2010).

Bei dieser Arbeit wurde eine NMDA-induzierter Zelltod sowie ein Hypoxiemodell durch Sauerstoffentzug in einer Kammer als In-vitro-Modelle für zerebrale Ischämie und exzitotoxischem Zelltod untersucht.

4.3.1. S100B schützt primäre hippokampale Neurone der Ratte und humane Neuroblastomzellen vor exzitotoxischer Zellschädigung

Nachdem es erste Hinweise auf eine konzentrationsabhängige, neuroprotektive Wirkung von S100B gab (Huttunen et al., 2000; Reali et al., 2005), wurde bei dieser Arbeit zunächst in einem etablierten Modell ein NMDA-induzierter Zelltod in primären hippokampalen Neuronen der Ratte untersucht (Lankiewitz et al., 2000; Rothermundt et al., 2003). Bei diesem Modell kommt es infolge von einer Überaktivierung des NMDA-Rezeptors, welcher in vivo nach einer Schädigung durch Glutamat aktiviert wird, zu einer Apoptoseeinleitung (siehe Einleitung).

Hierbei konnte eine signifikante Zelltodreduktion in einer Live/Dead-Färbung der primären Neurone in Anwesenheit von S100B gezeigt werden, welche durch mehrfache Wiederholung auch in den SHSY5Y-Zellen bestätigt werden konnte.

Durch eine Präinkubation mit S100B zeigte sich somit ein signifikanter Schutz der primären hippocampalen Neurone und humanen Neuroblastomzellen nach NMDA-induzierter Zellschädigung.

4.3.2. S100B schützt humane Neuroblastomzellen und primäre hippocampale Neurone der Ratte vor Hypoxie-induziertem Zelltod

Nach den Ergebnissen aus den experimentellen NMDA-Versuchen sollte als nächster Schritt die Rolle von S100B in einem Hypoxie-induziertem Zelltodmodell untersucht werden, dessen Pathomechanismus ebenfalls hauptsächlich auf eine Exzitotoxizität beruht. Hier konnte nach einer Hypoxiephase in einer Hypoxiekammer ebenfalls ein signifikanter neuroprotektiver Effekt von S100B auf primäre hippocampale Neurone und SHSY5Y-Zellen gezeigt werden. Diese Daten bestätigen zum einen die bei der NMDA-Exzitotoxizität gewonnenen Ergebnisse zum anderen verdeutlichen sie durch eine genauere Simulation der pathophysiologischen Grundlagen ischämisch bedingter Neurotoxizität, deren klinische Relevanz. Eine intrazelluläre Regulation der S100B-Konzentration könnte damit eine neuronale Exzitotoxizität verhindern und evtl. einen möglichen Therapieansatz darstellen.

Nach diesen Initialversuchen war die Grundlage geschaffen, mögliche Signaltransduktionswege zu untersuchen, mit denen die herausgearbeitete neuroprotektive Wirkung von S100B erklärt und verstanden werden kann.

4.4. S100B aktiviert RAGE (receptor for advanced glycation endproducts)

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war sehr wenig bekannt über mögliche Aufnahmemechanismen und Signalweiterleitungen durch S100B. Um die Arbeitsgruppe von Donato gab es vereinzelt Hinweise auf die Involvierung von RAGE (receptor for advanced glycation endproducts). Dabei konnte vor allem eine Aktivierung von NF κ B mit resultierender Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl2 durch den Raf-MEK-ERK-Signalweg nach Bindung von S100B an RAGE gezeigt werden (Huttunen et al., 2000). Durch die gleiche Arbeitsgruppe konnte aber auch nach hohen S100B-Konzentrationen bei neuronalen Zellen eine exzessive Stimulation des RAGE-Rezeptors mit resultierender ROS (reactive oxygen species) Bildung gezeigt werden, welche im Gegensatz zur antiapoptotischen Wirkung von S100B in geringen Konzentrationen, dort zu einer erhöhten Apoptoserate führte.

In dieser Arbeit konnte eine signifikante Stimulierung der Expressionsraten von RAGE in primären hippocampalen Neuronen nach S100B Behandlung gezeigt werden. Zu einer ähnlich starken Aktivierung kam es nach einer NMDA-Schädigung dieser Neurone, welche nach zusätzlicher Addition von S100B keinen messbaren Unterschied zeigte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass RAGE durch S100B und NMDA-Schädigung hochreguliert wird, und dass S100B seine neuroprotektive Wirkung evtl. über eine RAGE-Aktivierung entfaltet.

4.5. Neuronale Überlebens-Signalwege

Neuronale Zellen können als Antwort auf einen Stressfaktor wie Exzitotoxizität, durch Expression neuroprotektiver Zytokine und der Aktivierung bestimmter überlebenswichtiger Signalwege antworten. Oft sind diese Signalwege unter physiologischen Bedingungen ständig aktiv.

Unter anderem um zahlreiche Zellaufgaben zu koordinieren und permanent eine Apoptose zu unterdrücken. Zusätzlich können sie dann in bestimmten Situationen in ihrer Aktivität reguliert werden. Zwei der dabei wichtigsten Signalkaskaden sind der MEK/MAPK-ERK und der PI3/Akt-Signalweg, die beide durch den Oberflächenrezeptor RAGE aktiviert werden können (Clerk et al., 1998; Kamada et al., 2007; Ghavami et al., 2008).

4.5.1. Der PI3K/Akt-Signalweg

Die Phosphoinositid (PI) 3-Kinase wurde zum ersten Mal 1984 entdeckt und 1998 konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym die Fähigkeit besitzt, die dritte Hydroxyl-Gruppe des Inositolringes von Phosphatidylinositol zu phosphorylieren (Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat). Dieses Lipid ist dementsprechend nach PI3K Aktivierung intrazellulär akut gesteigert detektierbar (Brogiolo et al., 2001). Die PI 3-Kinase-Aktivität wurde in allen untersuchten eukaryontischen Zelltypen gefunden und spielt eine große Rolle bei zahlreichen Zellantworten auf extrazelluläre Signale wie z. B. beim Wachstum, Bewegung, Differenzierung, Überleben und Proliferation (Katso et al., 2001).

Eine Reihe von Membranrezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität kann PI3K an die Zellmembran rekrutieren und dort aktivieren (Ding et al., 2010). Nach Lokalisierung und Aktivierung an der Membran führt PI3K zu der oben beschriebenen Phosphorylierung von Phosphatidylinositol. Dieses Lipid hat dann seinerseits die Fähigkeit, Proteine mit einer Pleckstrin-Homology-Domäne, wie die Serin-Threonin-Kinase-Akt und die Phosphoinositid-Dependent-Kinase 1 (PDK1) an die Membran zu rekrutieren. Hier wird Akt dann von PDK phosphoryliert und kann dann selbst Phosphorylierung und Regulierung zahlreicher Kinasen und Transkriptionsfaktoren übernehmen. Die von Akt aktivierten Substrate spielen in zahlreichen essentiellen Zellfunktionen wie Überleben, Glukosemetabolismus und Proteintranslation eine wichtige Rolle (Fruman et al., 1998; Katso et al., 2001).

Der PI3k/Akt Signalweg antagonisiert die pro-apoptotische Signaltransduktion auf mehreren Ebenen und zeigt hierbei unter anderem durch eine Regulierung des NFκB-Proteinkomplexes sowie der Proteine BAD und Caspase9 einen durchweg neuroprotektiven Charakter. So führt die Phosphorylierung des Proteins Bad durch Akt dazu, dass es an der Mitochondrienmembran die antiapoptotischen Eigenschaften von Bcl-2 und BclXL nicht mehr blocken kann. Caspase 9 ist ein Protein, welches direkt in der Apoptoseinitiierung eine wichtige Stellung einnimmt und durch Akt phosphoryliert und inhibiert wird. Schlussendlich führt Akt durch eine Aktivierung der IκB-Kinasen (IKKs) zu einer Degradierung von IκB, dem Inhibitor vom NFκB, und kann damit zu einer Transkriptionsaktivierung zahlreicher, anti-apoptotischer, NFκB-abhängiger Zielgene wie Bcl-xL, Bcl-2 oder XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) führen (Miyawaki et al., 2008; Collett et Campbell, 2006; Kane et al., 1999; Cardone et al., 1998).

Außerdem wird der PI3k/Akt-Signalweg durch zahlreiche neurotrophe Faktoren wie IGF-1 (insulin-like growth factor 1), NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) etc. aktiviert (Wang et al., 2012; Jeon et al., 2010; Numakawa et al., 2012).

Durch einige Autoren wurde bereits eine Involvierung des PI3K/Akt Signalweges für den Effekt von S100B auf Proliferation und Differenzierung der Zelle vorgeschlagen (Brozzi et al., 2009).

In anderen Versuchen konnte sogar eine PI-3 Kinase vermittelte neuroprotektive Funktion von S100B beschrieben werden. So aktiviert beispielsweise S100B in PC12 Neuronen, die selbst normalerweise kein S100B exprimieren, ein PI3K/Akt/p21^{WAF1}/cyclin-D1/cdk4/Rb/E2F-Signalweg mit dem Effekt einer höheren Proliferation und erniedrigten Apoptoserate (Sorci et al., 2010).

4.5.2. Der PI3k/Akt-Signalweg spielt für die neuroprotektive Wirkung von S100B bei NMDA-induziertem Zelltod keine signifikante Rolle

Für die Untersuchung ob der PI3k/Akt Signalweg für die neuroprotektive Wirkung von S100B beim exzitotoxischen Zelltod in primären hippocampalen Neuronen eine Rolle spielt, wurde das vorangegangene NMDA-Schädigungsmodell mit dem PI-3-Kinase-Inhibitor LY294002 erweitert. Der synthetisch hergestellte Inhibitor LY294002 wurde bereits 1994 als spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase vorgestellt (Vlahos et al., 1994). Trotz seiner evtl. Limitierungen wie z. B. einer insgesamt schwachen Inhibierung (nur micromolare Potenz) oder möglicher Off-target-Effekte auf andere Kinasen, ist LY294002 aktuell einer der nützlichsten und am meisten benutzten Inhibitoren der PI-3-Kinasen (Workman et al., 2010). Obwohl durch einige Autoren anders beschrieben, konnten wir für den neuroprotektiven Effekt von S100B auf den exzitotoxischen Zelltod nach Zugabe des Inhibitors keine Veränderung feststellen. Der neuronale Schutz mit S100B war weiterhin hoch signifikant und der PI-3-Kinase-abhängiger Signalweg scheint damit bei der neuroprotektiven Wirkung von S100B in unseren Modellen keine signifikante Rolle zu spielen

4.5.3. Der MEK/ERK-Signalweg

MAPKs bestehen aus einer Familie von Serin/Threonin-Kinasen zu denen die durch extrazelluläre Signale regulierte ERK-Kinase sowie die stress-aktivierten Proteinkinasen JNK/SAPK1 und p38/SAPK2 gehören. Die MAPKs können durch eine veränderte Genexpression oder posttranslationale Proteinmodifikation zahlreiche Zellvorgänge in Antwort auf einen extrazellulären Reiz verändern (Martindale und Holbrook, 2002). Während für JNK und p38 im Allgemeinen ein proapoptotischer Signalweg postuliert wird, zeichnet sich für den ERK-Signalweg eine doppelte Rolle ab.

Abhängig von Trigger, Dauer und Dynamik seiner Aktivierung kann ERK eine zytoprotektive oder zytotoxische Zellantwort auslösen (Ho et al., 2007).

ERK 1/2 ist eine der nachgeschalteten Komponenten des Raf/MEK/ERK Signalwegs (Chong et al., 2003; Kolch, 2000), welcher durch MEK phosphoryliert und damit aktiviert werden kann. Aktiviertes pERK besitzt als Schlüsselkomponente in dieser Kaskade dann die Fähigkeit, in den Zellkern zu translozieren, dort zahlreiche Transkriptionsfaktoren zu regulieren und damit die Genexpression zahlreicher Proteine zu beeinflussen. Außerdem kann es durch Aktivierung von I κ B-Kinasen (IKKs) zu einer Aktivierung von NF- κ B führen, welches seinerseits wichtige Transkriptionsfunktionen einnimmt (Chuderland and Seger, 2005; siehe Abbildung 26).

In einigen Zellen wie z. B. Neuronen und Myoblasten konnte bereits eine Aktivierung des MEK/ERK Signalwegs und eine anschließende Apoptosereduzierung durch S100B nachgewiesen werden (Huttunen et al., 2000; Riuzzi et al., 2006). Zusätzlich führt in Neuronen eine ERK-abhängige Aktivierung von NF κ B zu einer Neuroprotektion nach Ischämie (Yokota et al., 2011).

4.5.4. Der MEK/ERK-Signalweg kann teilweise die neuroprotektive Wirkung von S100B beim exzitotoxischen Zelltod erklären

Es wurden in dieser Arbeit auf Proteinebene zunächst basale Level von pERK, sowie nach Inkubation mit S100B und NMDA-Schädigung untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Aktivierung von ERK 1/2 allein nach S100B-Inkubation sowie noch stärker nach NMDA-Schädigung. Eine gleichzeitige Inkubation mit S100B und NMDA-Schädigung zeigte keinen signifikanten Unterschied zur alleinigen NMDA-Behandlung. Nachdem klar war, dass dieser Signalweg sowohl bei der NMDA-induzierten Exzitotoxizität als auch von S100B aktiviert wird, stellte sich die Frage, ob auch der neuroprotektive Effekt von S100B durch diesen Mechanismus erklärt werden kann.

Zur Klärung dieser Frage wurde das oben beschriebene NMDA-Schädigungsmodell mit und ohne S100B mit dem MEK-Inhibitor PD98059 erweitert. PD98059 ist ein gut etablierter, stromaufwärts von ERK 1/2 agierender, spezifischer Inhibitor von MEK. In Anwesenheit des Inhibitors konnte nach der Live/Dead-Färbung zwar weiterhin ein neuroprotektiver Effekt von S100B beobachtet werden, dieser war jedoch nur partiell, da gleichzeitig ein signifikanter Zelltod im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten war. Aus diesen Versuchen lässt sich schließen, dass der MEK/ERK Signalweg zumindest teilweise für die neuroprotektive Rolle von S100B verantwortlich zu sein scheint.

4.6 NFκB und seine Rolle in der Vermittlung der neuroprotektiven Eigenschaft von S100B

Der aus fünf Mitglieder bestehende Transkriptionsfaktor NFκB ist ein im Zytoplasma praktisch jeder eukaryotischen Zelle vorkommendes Regulatorprotein, welches in der Kontrolle von zahlreichen Zellprozessen wie Wachstum, Differenzierung, Proliferation, Überleben und Apoptose sowie in der Immun- und Entzündungsreaktion eine zentrale Stellung einnimmt. Die hierbei am häufigsten vorkommende aktive Form besteht aus einem p65/p50-Heterodimer (Sun and Andersson, 2002). Normalerweise liegt NFκB, gebunden an seinem Inhibitor (IκB), in einer inaktiven Dimer-Form im Zytoplasma vor. Nach einem entsprechenden Reiz werden diese Inhibitoren phosphoryliert und abgebaut und der dann freie NFκB-Komplex kann aktiviert in den Nukleus translozieren und dort die Expression seiner zahlreichen Zielgene regulieren (vgl. Einleitung; Ghosh et al., 2002).

Die Rolle von NFκB in verschiedenen physiologischen und pathologischen Vorgängen ist sehr weitreichend und bedarf, um der Sache gerecht zu werden, mehrerer ausführlicher Kapitel. Hier soll zunächst nur die Rolle von NFκB in der Neuroprotektion im Allgemeinen (siehe unter 4.5.1.) sowie in der Vermittlung der neuroprotektiven Effekte von S100B im Speziellen diskutiert werden.

4.6.1. S100B führt in SHSY5Y-Zellen zu einer NFκB-Aktivierung mit möglichem neuroprotektivem Wirkmechanismus beim exzitotoxischem Zelltod

Im zentralen Nervensystem konnte eine wichtige Rolle von NFκB in der Transkriptionsregulierung zahlreicher Gene sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen nachgewiesen werden (O'Neill et al., 1997). Während in Neuronen eine konstitutiv hohe basale NFκB-Aktivität zu verzeichnen ist, wird die Rolle von NFκB in Bezug auf Neuroprotektion z. T. noch kontrovers diskutiert (Kaltschmidt et al., 1994; Pizzi et al., 2002). Auf der einen Seite wird von zahlreichen Autoren die neuroprotektive Funktion in Neuronen unter anderem durch Hochregulierung antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL in den Vordergrund gestellt und eine Hochregulierung von NFκB als erhöhter Schutz vor Stress-Stimuli beobachtet (König et al., 2005; Zhu et al., 2004; Manuvakhova et al., 2011). So konnte auch in beiden für diese Arbeit benutzten Zellarten - den primären hippocampalen Neurone der Ratte und den humanen Neuroblastomzellen SHSY5Y - bereits zuvor eine NFκB-abhängige, neuroprotektive Aktivierung von Bcl-xL gezeigt werden, welche unter anderem zu einem Apoptoseschutz gegenüber Beta-amyloid Neurotoxizität führt (Luetjens et al., 2001; Bui et al., 2001). Auf der anderen Seite wird eine Hochregulierung von NFκB in Stresssituationen, wie z. B. nach einem Infarkt, als Ursache der anschließenden Inflammation und Apoptose in Neuronen beschrieben (Herrmann et al., 2005). Als Ursache der unterschiedlichen, zum Teil sogar gegensätzlichen Effekte von NFκB wird unter anderem eine Zeit- und Stimulus-abhängige Aktivierung verschiedene Untereinheiten diskutiert, die dann wiederum verschiedene Zielgene regulieren können (Hoffmann et al., 2003; Sacconi et al., 2003). Zusätzlich wurde eine NFκB-Aktivierung durch S100B mit anschließender iNOS-Expression in kortikalen Astrozyten der Ratte beschrieben (Lam et al., 2001).

Basierend auf diese Daten wurde die NFκB-Rolle in der neuroprotektiven Wirkung von S100B auch durch unsere Arbeitsgruppe untersucht.

Tatsächlich konnte in unserer Arbeitsgruppe sowohl in humanen Neuroblastomzellen als auch in primären hippokampalen Neuronen der Ratte nach Inkubation mit S100B eine NFκB-Aktivierung durch EMSA-Untersuchungen nachgewiesen werden. Es wurde ebenfalls eine NFκB Aktivierung nach NMDA-Schädigung gezeigt, welche durch eine zusätzliche S100B-Behandlung weiter verstärkt wurde. Interessanterweise wurde dabei ein zusätzlich zeitabhängiger Shift der aktivierten NFκB-Untereinheit zu einem p65/c-Rel-Komplex beobachtet (Kögel et al., 2004).

Um herauszufinden ob diese NFκB Aktivierung auch für den neuroprotektiven Charakter von S100B beim exzitotoxischen Zelltod verantwortlich ist, wurden die Versuche weiter ergänzt. Normalerweise wird der NFκB-Inhibitor IκBα durch das Proteasom mit einer Proteindegradierung abgebaut, sodass NFκB aktiviert in den Nukleus translozieren kann. Lactacystin, ein Proteasominhibitor, blockt durch eine Verhinderung des IκBα-Abbaus die Aktivierung von NFκB. Eine Vorbehandlung der hippokampalen Neurone mit Lactacystin stoppte den neuroprotektiven Effekt von S100B beim exzitotoxischen Zelltod durch NMDA. Die Daten belegen damit einen möglichen NFκB-abhängigen Mechanismus der Neuroprotektion von S100B (Kögel et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als nächster Schritt die Rolle von NFκB während hypoxieinduzierter Apoptose in SHSY5Y-Neuronen untersucht. Es konnte nach Hypoxieschädigung und anschließender Reoxigenierung vor allem eine Aktivierung des p50/p65 Dimers von NFκB in den humanen Neuroblastomzellen gezeigt werden. Ein eventueller Effekt von S100B auf diese aktivierte Untereinheit bleibt zu untersuchen.

4.7 VEGF - ein (vaskulärer) Überlebensfaktor mit zahlreichen Funktionen

Die VEGF (Vascular endothelial growth factor) Familie spielt eine wichtige Rolle bei Formen des vaskulären Wachstums, insbesondere bei der Stimulation der Angiogenese, Arteriogenese und Lymphangiogenese (Yla-Herttuala et al., 2003).

Das erste entdeckte und 1989 erfolgreich geklonte Mitglied der VEGF-Familie war VEGF-A (Leung et al., 1989). Zahlreiche Faktoren wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren oder Zytokine wie TNF- α konnten eine Expression von VEGF-A induzieren (Ferrara N., 2004; Rissanen et al., 2002). VEGF, zunächst hauptsächlich als Angiogenesefaktor untersucht und beschrieben, zeigt zusätzlich direkte Effekte auf neuronale (Stamm-)Zellen. Eine abnormale Expressionsrate wird als Ursache in zahlreichen neurodegenerativen Krankheitsbildern diskutiert und hier ansetzende Therapiemöglichkeiten werden aktuell erforscht (Storkebaum and Carmeliet, 2004).

In vorhergegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass VEGF in primären hippocampalen Neurone der Ratte einen Caspase-unabhängigen Schutz gegenüber einem exzitotoxischen Hypoxie-induziertem Zelltod zeigt (Svensson et al., 2002).

Aktuell ist VEGF weiterhin Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Es ist in vielen Krankheiten des zentralen Nervensystems, unter anderem beim ischämischen Schlaganfall, mit involviert und gewinnt durch seine positiven Effekte auf Angiogenese, Neuroprotektion und Neurogenese eine immer größere Rolle (Ma et al., 2011; Zheng et al., 2012; Lee et al., 2011). Nach zahlreichen experimentellen und prä-klinischen Untersuchungen werden in den letzten Jahren immer häufiger bereits auch Studien an Patienten, insbesondere zur Therapie der Ischämie und der Induktion einer Angiogenese im Rahmen der koronaren Herzkrankheit, durchgeführt (Timothy D. Henry et al., 2003). Leider konnten diese jedoch bis jetzt die hochgesteckten Erwartungen nach den zum Teil außerordentlich erfolversprechenden experimentellen Labordaten nicht erfüllen.

Durch Blockierung der pathologischen VEGF-induzierten Tumorangiogenese durch Wirkstoffe wie Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF-A, zeigen sich jedoch bereits hoffnungsvolle Therapieansätze in der Tumorthherapie (Takahashi, 2011).

4.7.1 Auf transkriptioneller Ebene gibt es Hinweise einer Hochregulierung von VEGF durch S100B

Wie bereits beschrieben, induziert NFκB nach seiner Aktivierung die Expression zahlreicher Zielgene. Unter anderem konnte z. B. durch S100B eine NFκB-vermittelte Induktion von Bcl-xL, einem neuroprotektiven Gen, nachgewiesen werden (Bui et al., 2001). In kardialen Myozyten der neonatalen Ratte konnte durch S100B eine RAGE und NFκB-abhängige Hochregulierung der VEGF mRNA, VEGF-Proteinkonzentration und Sekretion beobachtet werden (Tsoporis et al., 2012). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Ligand S100B RAGE-abhängig zu einer Hochregulierung von VEGF in ARPE-19 Zellen (humane, retinale Pigmentepithelzelllinie) führt (Ma et al. 2007).

In primären kortikalen Neuronen wurde zusätzlich eine Involvierung des MEK/ERK-Signalwegs bei der neuroprotektiven Funktion von VEGF in Trauma-induzierter Apoptose beschrieben (Ma et al., 2011).

Zur Untersuchung möglicher aktivierter Zielgene bei der neuroprotektiven Funktion von S100B wurden humane Neuroblastoma-Zellen SHSY5Y nach Hypoxie-induzierter Apoptose mit und ohne S100B-Inkubation untersucht. Durch die vorliegende Arbeit wurde sowohl eine leichte Erhöhung der basalen VEGF-Expression durch S100B als auch eine erhöhte Aktivität nach Hypoxie in Anwesenheit von S100B in humanen Neuroblastomzelllinien gezeigt.

Auf Grundlage der erhobenen Daten liegt die Vermutung nahe, dass die RAGE-Raf-MEK-Erk-NFκB-VEGF-Signalachse für die neuroprotektive Rolle von S100B eine zentrale Rolle spielen (siehe Abbildung 26).

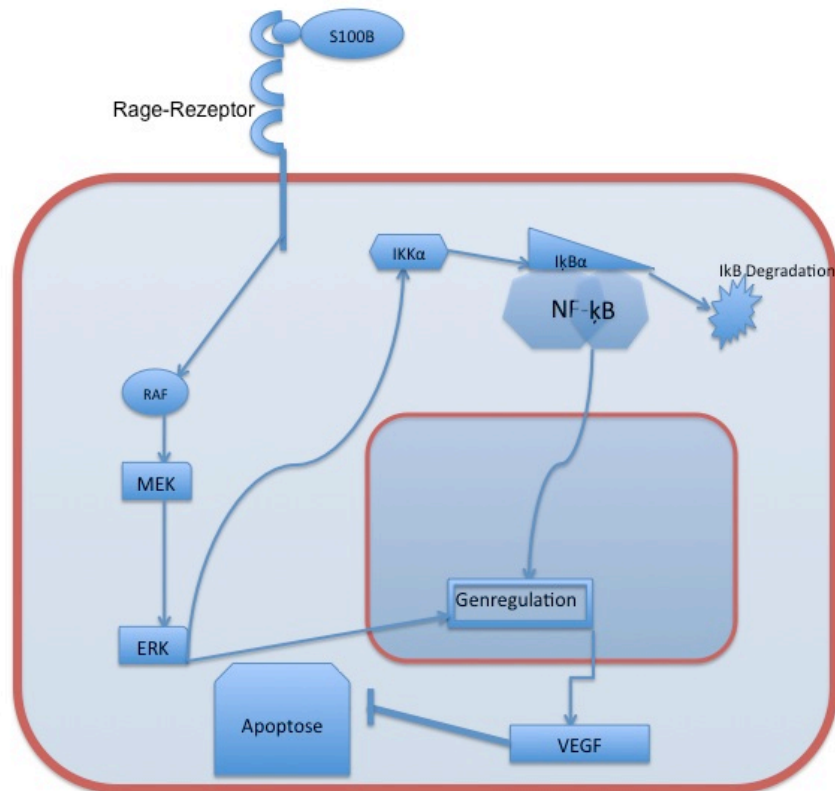


Abbildung 26: Hypothese eines möglichen Signalwegs für den neuroprotektiven Effekt von S100B beim exzitotoxischen Zelltod

S100B kann nach einer Bindung an den RAGE-Rezeptor über eine Signalkaskade zu einer intrazellulären Aktivierung von ERK führen. Dieser kann entweder selbst direkt im Zellkern die Genexpression bestimmter Gene beeinflussen oder durch Aktivierung der IκB Kinase (IKK) zu einer IκBα Degradierung führen. Damit aktiviertes NF-κB hat dann seinerseits die Möglichkeit in den Zellkern zu translozieren und bestimmte Zielgene wie VEGF zu aktivieren. VEGF selbst hat eine neuroprotektive, antiapoptotische Eigenschaft.

4.8. S100B schützt primäre hippocampale Neurone der Ratte und menschliche Neuroblastomzellen vor Apoptose induzierender DNA-Schädigung

Es gibt verschiedene Apoptose-induzierende Stimuli wie Hypoxie, Entzug von Wachstumsfaktoren, Aktivierung spezifischer Rezeptoren wie dem TNF-Rezeptor, sowie verschiedener DNA-Schädigungsstimuli wie UV- oder γ -Strahlung.

Neurone sind enddifferenzierte Zellen mit, im Vergleich zu anderen Zellen, sehr hohem metabolischen Umsatz und damit einhergehender Transkriptions- und Translationsaktivität. Dementsprechend ist eine DNA-Schädigung in diesen Zellen deutlich fataler und effektive Reparaturmechanismen ungemein wichtiger (vgl. Einleitung; Barzilai et al., 2008). Obwohl eine durch DNA-Schädigung induzierte Neurotoxizität in zahlreichen Pathologien des Nervensystems beschrieben worden ist, sind die einzelnen Mechanismen noch nicht endgültig geklärt. Hierbei kann man zwischen einer akuten Neurotoxizität mit anschließendem Zelltod und einer chronischen, langsam progressiven Neurodegeneration aufgrund der DNA-Schädigung unterscheiden (Katyal et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein signifikanter neuroprotektiver Effekt von S100B nach einer DNA-Schädigung in primären hippocampalen Neuronen der Ratte und menschlichen Neuroblastomzelllinien gezeigt werden. Hierzu wurden Etoposid und UV-Bestrahlung als etablierte DNA-Schädigende Agenzien und Epoxomicin, als ein Proteasom-Inhibitor und p53-Aktivator eingesetzt.

Es wurde in allen drei Fällen nach mehrfach wiederholten Caspase-Assay-Analysen eine signifikante Reduktion des Zelltodes in Anwesenheit von S100B beobachtet. Demnach spielt S100B neben dem exzitotoxischen Zelltod auch bei der durch DNA-Schädigung induzierten Zellschädigung als neuroprotektives Protein evtl. eine sehr wichtige Rolle.

4.8.1. p53 : eines der Haupteffektorproteine bei der Induktion von Apoptose nach DNA-Schädigung

Im Rahmen einer DNA-Schädigung werden verschiedene Mechanismen, wie die Aktivierung von Reparaturmechanismen oder die Einleitung einer Apoptose, in Kraft gesetzt.

Zu den wichtigsten Mechanismen gehört die Aktivierung des Tumorsuppressors p53, unter anderem herbeigeführt durch einen Arrest der Polymerase II, die normalerweise die Transkriptionsfunktion einnimmt (Derheimer et al., 2007). Das Protein p53 hat insgesamt weitreichende intrazelluläre Funktionen und reguliert zahlreiche Signalwege und Gene, die in vielen wichtigen Zellprozessen wie die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest eine zentrale Rolle spielen. (vgl., Einleitung; Levine, 1997; Mihara et al., 2003).

p53 hat bei der Einleitung der Apoptose interessanterweise die Fähigkeit, abhängig von verschiedenen Faktoren wie Zelltyp, Stress-Stimulus, DNA-Schädigungslevel und Vorhandensein externer Wachstumsfaktoren, verschiedene Signalwege zu aktivieren (Benchimol, 2001). So kann p53 als Transkriptionsfaktor zahlreiche pro-apoptotische Gene wie BAX, Bak, PUMA, Noxa, PIDD, Fas/APO-1 etc. hoch und entgegenwirkend dazu anti-apoptotische Gene wie Bcl-2 und Bcl-XL herunter regulieren (vgl. Einleitung; Hoffman et al., 2002). Zusätzlich kann p53 nach einer DNA-Schädigung auch ohne Transkriptionsaktivität durch Translokation zum Mitochondrium, Bindung an anti-apoptotische Proteine wie Bcl-XL und daraus resultierender Aktivierung pro-apoptotischer Proteine wie BAX eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und damit eine Apoptose in Gang setzen (Chipuk et al., 2004). Desweiteren kann p53 den Transport sog. Todesrezeptoren wie Fas/APO-1 und Killer/DR5 von zytoplasmatischen Speicher auf die Zelloberfläche erleichtern und damit eine Apoptose initiieren (Bennett et al., 1998; siehe Abbildung 27).

p53 agiert also mit der Einleitung der Apoptose in DNA-geschädigten, nicht mehr reparablen Zellen, als Tumorsuppressor und nimmt dabei eine Schutzfunktion für den Gesamtorganismus ein. Nach einer evtl. Mutation im p53-Gen selbst kann es jedoch seine Funktion oft nicht mehr (voll) wahrnehmen und so gewinnt es in den letzten Jahren zusätzlich als einer der Ursachen der Tumorentstehung immer mehr an Bedeutung (Goldstein et al., 2010).

4.8.2 Nach DNA-Schädigung zeigt sich in Anwesenheit von S100B ein verminderter p53-Proteinlevel und eine verminderte Apoptose

p53 wird durch verschiedene inhibierende und aktivierende Faktoren reguliert. Einer der wichtigsten und am besten erforschten Schlüsselkomponenten der Regulierung von p53 ist das Protein MDM2 (beim Menschen hdm2), welches an p53 bindend seine Degradation und den Verlust der Transkriptionsaktivität bewirkt (Petroni et al., 2012; siehe Einleitung). Durch zahlreiche Arbeiten unter anderem von Fersht und Mitarbeitern konnte zusätzlich eine Bindung verschiedener Mitglieder der S100-Familie, unter anderem S100B, an p53 gezeigt werden (Fernandez-Fernandez et al., 2008). Der resultierende Effekt wird noch kontrovers diskutiert. Während einige Autoren eine Aktivierung von p53 durch die S100-Protein-Familie beschreiben, steht für andere Arbeitsgruppen eine Inhibierung der Transkriptionsaktivität von p53 nach der Bindung im Vordergrund (Mueller et al., 2005; Lin et al., 2001). Als Erklärung kommen evtl. die unterschiedlichen Bindungseigenschaften und Bindungsorte der verschiedenen S100-Mitglieder an p53 in Frage. Dem Protein S100B wird hierbei eine weitestgehend inhibierende Wirkung der Transkriptionsaktivität von p53 zugeschrieben (van Dieck et al., 2009).

Für S100B konnte eine Bindung am c-terminalen Ende von p53 sowie der Oligomerisierungsdomäne gezeigt werden, welche dessen Tetramerisierung

(tetramerer Formation) und Phosphorylierung durch die Proteinkinase C verhindert (Baudier et al., 1992; Delphin et al., 1999; Fernandez-Fernandez et al., 2005). Beide Vorgänge sind essentiell für die p53-Aktivierung und damit dessen intrazellulärer Funktion (Giaccia et al., 1998). Es konnte bestätigt werden, dass eine Überexprimierung von S100B die transkriptionale Aktivität und DNA Bindungskapazität von p53 signifikant senkt und die Expressierung von down-stream Effektorgene inhibiert (Jing et al., 2001).

Außerdem führt unter anderem beim malignen Melanom, dem aggressivsten Hauttumor, die Bindung von S100B an p53, zu einer Reduktion des p53-Proteinlevels und darauf folgend zu einem Funktionsverlust bei der Apoptoseinduktion (Lin et al., 2010; Lin et al., 2004). Bei diesem Tumor zeigte sich trotz Vorhandenseins von „normalem“ p53-Gen eine mehrfach erhöhte Konzentration von S100B, was zu einer Herunterregulierung des p53-Proteinlevels führt. Eine mögliche Erklärung für den reduzierten Proteinlevel von p53 ist die bereits beschriebene Auflösung der p53-Tetramere (Baudier et al., 1992) sowie die Konformationsänderung am C-terminalen Ende und der Oligomerisierungsdomäne nach Bindung von S100B (Rustandi et al., 1999). Diese Formationsänderungen könnten synergistisch dem Wirken von hdm2, eine Calcium-vermittelte, Ubiquitin-abhängige Proteindegradation von p53 in Gang setzen (Lin et al., 2004).

Die Daten in Melanomzellen bestätigend, konnten wir durch vorangegangenen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe zusätzlich zu einer S100B-Bindung an den RAGE-Rezeptor auch eine Internalisierung von S100B in die Zelle nachweisen (Rachid El Idrissi, Daten noch nicht publiziert). Somit kann sich die neuroprotektive Wirkung von S100B nicht nur durch die Bindung an den RAGE-Rezeptor, sondern evtl. auch durch direkte intrazelluläre Wechselwirkungen mit dem Protein p53 entfalten. Zur Untersuchung eines Effektes auf den p53-Proteinlevel wurde bei dieser Arbeit nach einer UV-Schädigung und einer Etoposid-Behandlung die p53-Expression im Western-Blotting und durch eine Immunfluoreszenzbehandlung dargestellt. Hierbei zeigte sich in Anwesenheit von S100B sowohl eine signifikante Herunterregulierung des intrazellulären p53-Proteinlevels nach DNA-

Schädigung als auch eine verminderte Translokation des aktivierten p53 zum Zellkern. Die Daten legen nahe, dass S100B seine neuroprotektive, anti-apoptotische Wirkung nach einer DNA-Schädigung in humanen Neuroblastomzellen unter anderem durch eine aktive Bindung an p53 und Reduktion von dessen Proteinlevel entfaltet (siehe Abbildung 27).

4.8.3. Keine Hinweise für eine signifikante Veränderung der p53 regulierten Zielgene Bax, PUMA, NOXA und WAF1

p53 kann als Transkriptionsfaktor seine proapoptotische Wirkung unter anderem durch Einflussnahme auf bestimmte Zielgene ausüben. Um einen Effekt von S100B auf die Transkriptionsaktivität von p53 zu untersuchen, wurden einige bereits etablierte Zielgene von p53 ausgewählt und analysiert.

Die große Bcl-2-Familie besteht aus einer Reihe strukturell verwandter Proteine, die mindestens eines der vier charakteristischen Bcl-2-Homology-Domänen besitzen. Sie besitzen entweder pro- oder anti-apoptotische Eigenschaften. Sie sind in zahlreichen Zellaktivitäten involviert und haben unter anderem die Fähigkeit, die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zu regulieren. In bestimmten Situationen führt dies zu einer Cytochrom-c-Ausschüttung ins Zytosol, welches seinerseits durch Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 9 eine Apoptose initiieren kann. Bcl-2-assoziertes X-Protein, kurz "Bax" ist eines der proapoptotischen Proteine welche zur Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, den sog. MACs (mitochondrial apoptosis-induced channels) führt (Dejean et al., 2006). In humanen Neuroblastomzellen SHSY5Y konnte bereits eine p53-abhängige Aktivierung von Bax und eine Einleitung der Apoptose gezeigt werden (Lee et al., 2011). Während Bax im Normalzustand hauptsächlich im Zytosol zu finden ist, kommt es nach einer Apoptoseinduktion zu einer Konformationsänderung und einer höheren Ansiedlung in der äußeren Mitochondrienmembran (Wolter et al., 1997). Normalerweise kommt es durch eine Interaktion anti-apoptotischer Bcl-2-Mitglieder wie z. B. Bcl-xL oder Bcl-2

mit Bax zu einer Hemmung von dessen apoptotischer Wirkung. In unseren Untersuchungen konnte nach DNA-Schädigung keine Veränderung der Expressionsrate von Bax in Anwesenheit von S100B beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

PUMA (p53-upregulated mediator of apoptosis), ebenfalls Mitglied der Bcl-2-Protein-Familie, wird durch den Tumorsuppressor p53 z. B. nach DNA-Schädigung hochreguliert und bindet an die anti-apoptotischen Mitglieder wie Bcl-xL oder Bcl-2. Durch diese Bindung wird deren Interaktion mit Bax reduziert und es resultiert eine oben erwähnte mitochondriale Dysfunktion mit Caspase-Aktivierung und neuronalen Zelltod (Tsuchiya et al., 2011).

Ein weiteres Mitglied der BH3 (Bcl-2 homology 3)-only-Subgruppe der Bcl-2 Proteinfamilie, welches ebenfalls durch extra- und intrazelluläre „Todessignale“ reguliert wird, ist NOXA. Auch bei diesem Protein konnte eine p53-abhängige Erhöhung der Expressionsrate nach DNA-Schädigung beschrieben werden (Akhtar et al., 2006).

Das vierte untersuchte p53-abhängige Protein, welches bei der Stressantwort der Zelle eine wichtige Rolle spielt, ist p21 / WAF1 oder CKI (Cyklin-dependent kinase inhibitor). Das Protein wird streng reguliert durch p53 und höher exprimiert nach Stressstimuli wie Bestrahlung. Es führt zu einem Zellzyklusarrest, bei dem der Zelle zunächst Zeit geboten werden soll, mögliche Reparaturmechanismen durchzuführen. Bei nicht mehr möglicher Rettung wird dann die endgültige Apoptose eingeleitet (vgl. Einleitung; Kirsch et al., 1998).

In mehrfach wiederholter konventioneller semiquantitativer RT-PCR-Technik konnte kein Hinweis für eine Veränderung der Genaktivität dieser Proteine gefunden werden. Evtl. ist dies auch der Methode zu schulden. Neuere PCR-Methoden wie die quantitative Real-Time-PCR, die zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch nicht zur Standardmethode gehörten, sind schneller, reproduzierbarer und erlauben die genauere Quantifizierung von geringeren Expressionsunterschieden noch während der Amplifizierung.

Außerdem sind post-PCR-Schritte nicht mehr notwendig, die die Gefahr einer Kontamination erhöhen. Der Mechanismus der p53 abhängigen Apoptoseinhibierung durch S100B nach DNA Schädigung muss daher weiter untersucht werden.

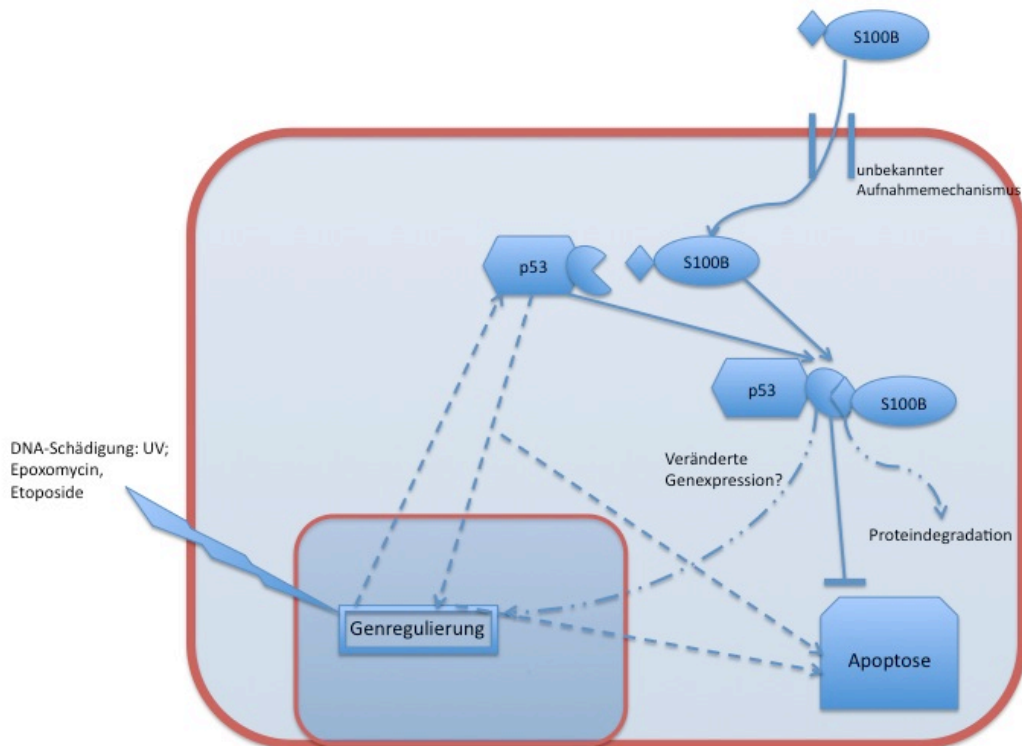


Abb. 27: Möglicher Signalmechanismus für den neuroprotektiven Effekt von S100B bei Apoptose-induzierender DNA-Schädigung

Normalerweise kann p53 nach einer DNA-Schädigung durch Veränderung seiner Transkriptionseigenschaften oder über direkte Aktivierung pro-apoptotischer Proteine und Todesrezeptoren eine Apoptose induzieren. S100B wird über einen noch unbekanntem Mechanismus in die Zelle aufgenommen und bindet an das Protein p53. Nach der Bindung an S100B kommt es jedoch durch eine Proteindegradation zu einer verminderten Apoptosefähigkeit. Evtl. ist dies zusätzlich durch eine aktuell noch nicht bekannte, veränderte Expressionseigenschaft von p53 zu erklären.

4.9. S100B im klinischen Einsatz- ein Ausblick

Die Tatsache, dass S100B nach verschiedenen intrazerebralen Zellschädigungen wie Ischämie, Trauma, Alzheimer, Parkinson etc. vermehrt im Serum und Liquor zu finden ist, führt unweigerlich zu der Fragestellung, ob S100B als Biomarker für den Verlauf oder der Ausdehnung einer Krankheit dienen kann, und ob bestimmte Therapieansätze daraus resultieren.

Ein großes Untersuchungsfeld ist der Einsatz von S100B als Biomarker. Beispielhaft sind kraniale Schädel-Hirn-Traumata, insbesondere milde Schädel-Hirn-Traumata bei Kindern, da bei diesem Kollektiv oft eine adäquate neurologische Untersuchung sehr schwierig und evtl. nicht ausreichend ist. Ein Literaturüberblick von Aristotelis und Mitarbeitern im Jahre 2010 beschreibt, dass trotz zahlreicher Studien S100B als verlässlicher Biomarker zumindest in diesem Zusammenhang noch kontrovers diskutiert wird.

Auf der einen Seite postulieren z. B. einige Autoren die Ausschließbarkeit von intrakraniellen Verletzungen bei normalen S100B-Serum-Level und beschreiben S100B als sehr hilfreichen Beurteilungs-, Verlaufs- und Prognoseparameter bei intrakraniellen, neuronalen Verletzungen. (Savola et al., 2004; Ingebrigtsen et al., 2003; Vos et al., 2003). Bei Kindern konnte z. B. eine signifikante Korrelation zwischen einem pathologischen CT-Befund und einer S100B-Steigerung nachgewiesen werden (Castellani et al., 2009). Im Gegensatz dazu gehen einige Autoren bzgl. der Ursache der S100B-Level Steigerung im Serum eher von einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke aus, als einer endgültigen neuronalen Schädigung, da S100B normalerweise diese Schranke nicht überqueren kann (Dash et al., 2010). Da abgesehen von geschädigten Astrozyten zahlreiche weitere, z. T. extrakranielle Zellarten Einfluss auf den S100B-Serum-Level haben, ist eine eindeutige Interpretation der Daten oft sehr schwierig. So wird auch nach Traumata ohne kraniale Mitbeteiligung ein Anstieg des S100B-Levels im Serum gemessen (Anderson et al., 2001).

Außerdem zeigt das basale S100B-Level im Serum physiologischerweise besonders bei Kindern altersabhängige Schwankungen, was eine eindeutige Interpretation weiter erschwert (Gazzolo et al., 2003).

Eine weitere Schwierigkeit bezüglich der Benutzung des Proteins als Biomarker ist die Frage nach dem richtigen Zeitpunkt für die Serum-Kontrolle, da S100B eine Serum-Halbwertszeit von 60-120 min hat, bevor es renal ausgeschieden wird (Kövesdi et al., 2010).

Da S100B sowohl passiv nach pathologischer Zellschädigung austreten kann, als auch nach einer aktiven Sezernierung, z. B. als Antwort auf einen Stresstimulus (Gerlach et al., 2006), zu erhöhten Serum und Liquorkonzentrationen führt, ist eine zusätzliche Bestimmung weiterer glialer und neuronaler Proteine sehr hilfreich. So weist eine gleichzeitig unveränderte Konzentration der nicht-sekretorischen Proteine: GFAP (glial fibrillary acidic protein), MBP (myelin basic protein) und NSE (neuron-specific-enolase) eher auf eine aktive sekretorische Erhöhung des S100B hin.

Durch weitere Untersuchungen von S100B und die evtl. Kombination mit weiteren neuronalen Proteinen könnte die Sensivität und Spezifität von S100B als Biomarker weiter erhöht werden.

Ein wünschenswerter klinischer Ausblick wäre z. B. eine Blockierung der erhöhten S100B Konzentrationen und ggf. der aktive Einsatz von niedrigen Konzentrationen dieses sehr breit wirkenden Proteins wie es z. T. bei Ratten schon beschrieben worden ist (Kleindienst et al., 2005). So könnte S100B als Therapie oder Vorbeugemaßnahme durch Inhibierung der Apoptoseinduktion in chronischen und akuten Krankheitsbilder zahlreichen Patienten dienen. Außerdem könnte die aktive Blockade des Proteins in Tumorzellen wie dem malignen Melanom zu einer „Normalisierung“ des p53-Proteinlevels und einer therapeutischen Tumorsuppression führen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des Proteins S100B in humanen Neuroblastomzellen und primären hippocampalen Neurone der Ratte beim apoptotischen Zelltod untersucht. Hierfür wurden verschiedene zelltodinduzierende Agentien und Stresskonditionen verwendet. Für den exzitotoxischen, glutamatabhängigen Zelltod wurde eine NMDA-induzierte Zellschädigung sowie eine Hypoxieinduktion in einer Hypoxiekammer benutzt. Hier konnte für beide Apoptosemodelle und in beiden Zellarten eine signifikante Neuroprotektion in Anwesenheit von S100B gezeigt werden. Besonders in Hinblick auf bereits gezeigte aktive Sezernierung von S100B nach metabolischem Stress in Astrozyten sollten die weiteren Signalwege und Effekte dieses Proteins erforscht werden. Im Zuge der Untersuchung eines möglichen Wirkungsmechanismus von S100B zeigte sich zunächst eine signifikante Aktivierung des Zellrezeptors RAGE. Weiterhin zeigte sich in primären hippocampalen Neuronen eine Aktivierung des RAF/MEK/MAPK-ERK-Signalwegs zumindest partiell verantwortlich für die Vermittlung der neuroprotektiven Wirkung von S100B bei NMDA-induzierter Apoptose. Durch Experimente unserer Arbeitsgruppe wurde bereits zuvor eine S100B abhängige Aktivierung von NFκB beobachtet. In dieser Arbeit konnte mit VEGF ein evtl. NFκB-abhängig aktiviertes Zielgen für die neuroprotektive Wirkung von S100B bei hypoxieinduzierter Apoptose gefunden werden. Demnach erklärt sich ein möglicher neuroprotektiver Wirkmechanismus von S100B beim exzitotoxischen Zelltod durch Aktivierung des Rezeptors RAGE an der Zelloberfläche, mit anschließender Aktivierung des MEK-Erk Signalwegs. Dieses kann seinerseits zu einer Aktivierung von NFκB in der Zelle mit Hochregulierung des VEGF-Gens führen.

Ein weiteres untersuchtes Apoptosemodell für die Rolle von S100B war die direkte DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung und Etoposid sowie die Schädigung durch den Proteasom-Inhibitor und p53 Aktivator Epoxomicin in humanen SHSY5Y Neuroblastoma-Zellen und primären hippocampalen Neuronen der Ratte. Auch hier zeigte sich in allen drei Modellen eine signifikante Neuroprotektion in Anwesenheit von S100B.

Da es einige Hinweise (unter anderem noch nicht publizierte Daten unserer eigenen Arbeitsgruppe) für eine Aufnahme von S100B in die Zelle gibt, wurde eine evtl. Wechselwirkung von S100B mit dem, nach DNA-Schädigung hochreguliertem, apoptoseinduzierenden Protein p53 untersucht. Hier zeigte sich, dass S100B sowohl nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung, als auch nach Etoposid-Behandlung die Hochregulierung von p53 auf Proteinebene signifikant reduziert und eine Translokation zum Zellkern verhindert. In Zusammenschau dieser Daten und den aktuellen Literaturdaten über direkte Wechselwirkungen von S100B und p53 kann man davon ausgehen, dass S100B seine Wirkung nicht nur über den Zelloberflächenrezeptor RAGE ausübt, sondern nach einem noch nicht vollständig erforschten Aufnahmemechanismus in die Zelle durch direkte Proteininteraktionen, z. B. wie hier mit dem Protein p53, in den Zellprozess insbesondere im Apoptoseprozess eingreift. Abgesehen von der in dieser Arbeit beschriebenen Herunterregulierung des p53-Proteinlevels in Anwesenheit von S100B, welche die Folge einer proteasomalen Degradation nach Formationsänderung sein kann, sollten die weiteren p53-abhängigen Apoptoseinduktionswege wie eine Veränderung von dessen Transkriptionsaktivität, Hemmung proapoptotischer Proteine und ein evtl. Einfluss auf die Translokation von sog. Todesrezeptoren an die Zellmembran in Anwesenheit von S100B als evtl. Ursachen des neuroprotektiven Effekts von S100B weiter erforscht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführte Untersuchungen auf Veränderungen der Expressionsrate von möglichen p53-Zielgenen haben noch keine endgültigen Ergebnisse geliefert. Zum einen ist evtl. die Auswahl der ausgewählten Zielgene nicht ausreichend gewesen und zum anderen besteht eine evtl. Limitation der semiquantitativen RT-PCR Methode gegenüber neueren Methoden wie die quantitative Real-Time-PCR in der Detektion auch kleinerer Expressionsunterschiede (siehe oben). Der Mechanismus der Neuroprotektion kann in diesem Modell abschließend noch nicht vollständig geklärt werden. Weiterführende Untersuchungen sollten den genauen Aufnahmemechanismus von S100B in die Zelle untersuchen, und die neuroprotektiven Schritte nach einer Blockierung/Herunterregulierung von p53 weiter klären.

Summary:

This dissertation examines the role of the protein S100B in human neuroblastoma cells and primary rat hippocampal neurons during apoptotic cell death. Various cell death inducing agents and stress conditions were used for this purpose. An excitotoxic, glutamate-dependent cell death was examined by a NMDA-induced cell damage and an induction of hypoxia in a hypoxic chamber. A significant neuroprotection is observed for both apoptosis models and in both cell types in the presence of S100B. Furthermore signaling pathways and effects of this protein are explored particularly in terms of already shown active secretion of S100B from astrocytes after metabolic stress. During the investigations for possible S100B targets a significant activation of the cellular receptor RAGE was found. In addition, an activation of the RAF/MEK/MAPK-ERK signaling pathway turns out to be at least partially responsible for mediating the neuroprotective effects of S100B during NMDA-induced apoptosis.

A S100B dependent activation of NF κ B was previously described by our group. In this study VEGF could be found as a possibly activated target gene by NF κ B in hypoxia-induced apoptosis. As a consequence, a possible neuroprotective mechanism of S100B in excitotoxic cell death can be explained by an activation of the RAGE receptor on the cell surface with subsequent activation of the mek-erk signaling pathway. This may, in turn, lead to an activation of NF κ B in the cell with upregulation of the VEGF gene.

Another used model for studying the neuroprotective effects of S100B in human neuroblastoma cells SHSY5Y and primary rat hippocampal neurons was direct DNA damage through UV radiation and Etoposide, as well as the cell damage caused by the proteasome inhibitor and p53 activator epoxomicin. In all three models a significant neuroprotection was found in the presence of S100B. Since there is some evidence (not yet published data from our own group) for S100B uptake into the cell, a possible interaction of S100B with the apoptosis-inducing protein p53, which itself is upregulated after DNA damage, was additionally examined.

Hereby S100B significantly reduces the upregulation of p53 protein level and prevents a translocation to the nucleus after DNA damage caused by UV radiation as well as as Etoposide treatment. Taking these data and the current literature about S100B and p53 interactions into consideration, one can assume that S100B exerts its effects not only through the cell surface receptor RAGE, but also through direct protein interactions after a not yet fully explored uptake mechanism into the cell. Beside from the described downregulation of p53 protein levels in the presence of S100B, which may be the consequence of a proteasomal degradation after conformation change, the influence of other p53-dependent pathways for apoptosis induction such as a change of its transcriptional activity, inhibition of proapoptotic proteins and a possible influence on the translocation of the so-called death receptors on the cell membrane should be further explored.

The conducted investigations in this work on possible changes in the expression rate of p53 target genes provides no conclusive results. A possible reason could be an insufficient number of the selected target genes. On the other hand, there are possible limitations of the semi-quantitative RT-PCR method, compared to newer methods such as quantitative real-time PCR (see above). The mechanism of neuroprotection is not yet fully understood. Further studies should investigate the uptake mechanism of S100B in the cell and the steps after blocking / down-regulation of p53.

6. Literaturverzeichnis

1. Adami C, Bianchi R, Pula G, Donato R. S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004;1742(1-3):169-177. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.008.
2. Akhtar RS, Geng Y, Klocke BJ, et al. BH3-only proapoptotic Bcl-2 family members Noxa and Puma mediate neural precursor cell death. *J. Neurosci.* 2006;26(27):7257-7264. doi:10.1523/JNEUROSCI.0196-06.2006.
3. Anderson RE, Hansson LO, Nilsson O, Dijlai-Merzoug R, Settergren G. High serum S100B levels for trauma patients without head injuries. *Neurosurgery.* 2001;48(6):1255-8; discussion 1258-60.
4. Aquilano K, Baldelli S, Cardaci S, Rotilio G, Ciriolo MR. Nitric oxide is the primary mediator of cytotoxicity induced by GSH depletion in neuronal cells. *J. Cell. Sci.* 2011;124(Pt 7):1043-1054. doi:10.1242/jcs.077149.
5. Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R, Donato R. Annexin V, annexin VI, S100A1 and S100B in developing and adult avian skeletal muscles. *Neuroscience.* 2002;109(2):371-388.
6. Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R, Donato R. Subcellular localization of S100A11 (S100C, calgizzarin) in developing and adult avian skeletal muscles. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002;1600(1-2):84-94.
7. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2(6):420-430. doi:10.1038/nrc821.
8. Bachelder RE, Crago A, Chung J, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2001;61(15):5736-5740.
9. Barzilai A, Biton S, Shiloh Y. The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance. *DNA Repair (Amst.).* 2008;7(7):1010-1027. doi:10.1016/j.dnarep.2008.03.005.
10. Baudier J, Delphin C, Grunwald D, Khochbin S, Lawrence JJ. Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(23):11627-11631.
11. Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science.* 1998;282(5387):290-293.
12. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.* 1999;264(3):687-701.
13. Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol. Aging.* 2010;31(4):665-677. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.017.
14. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 1978;38(11 Pt 1):3751-3757.
15. Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. An evolutionarily conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 2001;11(4):213-221.
16. Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *J. Biol. Chem.* 2009;284(13):8797-8811. doi:10.1074/jbc.M805897200.
17. Bui NT, Livolsi A, Peyron JF, Prehn JH. Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkkappaBalpha. *J. Cell Biol.* 2001;152(4):753-764.
18. Burch LR, Scott M, Pohler E, Meek D, Hupp T. Phage-peptide display identifies the interferon-responsive, death-activated protein kinase family as a novel modifier of MDM2 and p21WAF1. *J. Mol. Biol.* 2004;337(1):115-128. doi:10.1016/j.jmb.2003.10.081.
19. Businaro R, Leone S, Fabrizi C, et al. S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses. *J. Neurosci. Res.* 2006;83(5):897-906. doi:10.1002/jnr.20785.

20. Butcher SP, Hagberg H, Sandberg M, Hamberger A. Extracellular purine catabolite and amino acid levels in the rat striatum during severe hypoglycemia: Effects of 2-amino-5-phosphonovalerate. *Neurochem. Int.* 1987;11(1):95-99.
21. Butcher SP, Hamberger A. In vivo studies on the extracellular, and veratrine-releasable, pools of endogenous amino acids in the rat striatum: effects of corticostriatal deafferentation and kainic acid lesion. *J. Neurochem.* 1987;48(3):713-721.
22. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998;282(5392):1318-1321.
23. Castellani C, Bimbashi P, Rutenstock E, Sacherer P, Stojakovic T, Weinberg A. Neuroprotein s-100B -- a useful parameter in paediatric patients with mild traumatic brain injury? *Acta Paediatr.* 2009;98(10):1607-1612. doi:10.1111/j.1651-2227.2009.01423.x.
24. Castets F, Griffin WS, Marks A, van Eldik LJ. Transcriptional regulation of the human S100 beta gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997;46(1-2):208-216.
25. Cavalheiro EA, Olney JW. Glutamate antagonists: deadly liaisons with cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98(11):5947-5948. doi:10.1073/pnas.121179198.
26. Cernaianu G, Brandmaier P, Scholz G, et al. All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *J. Pediatr. Surg.* 2008;43(7):1284-1294. doi:10.1016/j.jpedsurg.2008.01.007.
27. Chaudieu I, Alonso R, Mount H, Quirion R, Boksa P. Effects of L- and N-type Ca²⁺ channel antagonists on excitatory amino acid-evoked dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.* 1992;220(2-3):203-209.
28. Chaudieu I, Mount H, Quirion R, Boksa P. Transient postnatal increases in excitatory amino acid binding sites in rat ventral mesencephalon. *Neurosci. Lett.* 1991;133(2):267-270.
29. Chaudieu I, Mount H, Quirion R, Boksa P. Transient postnatal increases in excitatory amino acid binding sites in rat ventral mesencephalon. *Neurosci. Lett.* 1991;133(2):267-270.
30. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004;303(5660):1010-1014. doi:10.1126/science.1092734.
31. Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* 1985;58(3):293-297.
32. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 1988;11(10):465-469.
33. Chong H, Vikis HG, Guan K. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell. Signal.* 2003;15(5):463-469.
34. Chuderland D, Seger R. Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol. Biotechnol.* 2005;29(1):57-74. doi:10.1385/MB:29:1:57.
35. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* 1989;49(1):219-225.
36. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays.* 2000;22(5):442-451. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<442:AID-BIES6>3.0.CO;2-Q.
37. Collett GP, Campbell FC. Overexpression of p65/RelA potentiates curcumin-induced apoptosis in HCT116 human colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2006;27(6):1285-1291. doi:10.1093/carcin/bgi368.
38. Concannon CG, Koehler BF, Reimertz C, et al. Apoptosis induced by proteasome inhibition in cancer cells: predominant role of the p53/PUMA pathway. *Oncogene.* 2007;26(12):1681-1692. doi:10.1038/sj.onc.1209974.
39. Crawford LV, Lane DP. An immune complex assay for SV40 T antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977;74(1):323-329.
40. Crawford LV, Lane DP, Denhardt DT, et al. Characterization of the complex between SV40 large T antigen and the 53K host protein in transformed mouse cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1980;44 Pt 1,:179-187.
41. Crawford LV, Pim DC, Lane DP. An immunochemical investigation of SV40 T-antigens. 2. Quantitation of antigens and antibody activities. *Virology.* 1980;100(2):314-325.
42. Dash PK, Zhao J, Hergenroeder G, Moore AN. Biomarkers for the diagnosis, prognosis, and evaluation of treatment efficacy for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics.* 2010;7(1):100-114. doi:10.1016/j.nurt.2009.10.019.

43. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991;88(14):6368-6371.
44. Delphin C, Ronjat M, Deloulme JC, et al. Calcium-dependent interaction of S100B with the C-terminal domain of the tumor suppressor p53. *J. Biol. Chem.* 1999;274(15):10539-10544.
45. Denault J, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.* 2002;102(12):4489-4500.
46. Derheimer FA, O'Hagan HM, Krueger HM, Hanasoge S, Paulsen MT, Ljungman M. RPA and ATR link transcriptional stress to p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(31):12778-12783. doi:10.1073/pnas.0705317104.
47. Ding Z, Liang J, Li J, et al. Physical association of PDK1 with AKT1 is sufficient for pathway activation independent of membrane localization and phosphatidylinositol 3 kinase. *PLoS ONE.* 2010;5(3):e9910. doi:10.1371/journal.pone.0009910.
48. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001;33(7):637-668.
49. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 2003;60(6):540-551. doi:10.1002/jemt.10296.
50. Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* 2007;7(8):711-724.
51. Donato R, Heizmann CW. S100B Protein in the Nervous System and Cardiovascular Apparatus in Normal and Pathological Conditions. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010:929712. doi:10.1155/2010/929712.
52. Du Y, Bales KR, Dodel RC, et al. Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(21):11657-11662.
53. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:383-424. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.383.
54. Ellis EF, Willoughby KA, Sparks SA, Chen T. S100B protein is released from rat neonatal neurons, astrocytes, and microglia by in vitro trauma and anti-S100 increases trauma-induced delayed neuronal injury and negates the protective effect of exogenous S100B on neurons. *J. Neurochem.* 2007;101(6):1463-1470. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04515.x.
55. Elsea SH, McGuirk PR, Gootz TD, Moynihan M, Osheroff N. Drug features that contribute to the activity of quinolones against mammalian topoisomerase II and cultured cells: correlation between enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage in vitro and cytotoxic potential. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37(10):2179-2186.
56. Fadeel B, Gleiss B, Högstrand K, et al. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;266(2):504-511. doi:10.1006/bbrc.1999.1820.
57. Fields S, Jang SK. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science.* 1990;249(4972):1046-1049.
58. Filippidis AS, Papadopoulos DC, Kapsalaki EZ, Fountas KN. Role of the S100B serum biomarker in the treatment of children suffering from mild traumatic brain injury. *Neurosurg Focus.* 2010;29(5):E2. doi:10.3171/2010.8.FOCUS10185.
59. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 1998;67:481-507. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.481.
60. Gazzolo D, Michetti F, Bruschetti M, et al. Pediatric concentrations of S100B protein in blood: age- and sex-related changes. *Clin. Chem.* 2003;49(6 Pt 1):967-970.
61. Gerlach R, Demel G, König H, et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience.* 2006;141(4):1697-1701. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.008.
62. Ghavami S, Rashedi I, Dattilo BM, et al. S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *J. Leukoc. Biol.* 2008;83(6):1484-1492. doi:10.1189/jlb.0607397.
63. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 1998;12(19):2973-2983.

64. Goldstein I, Marcel V, Olivier M, Oren M, Rotter V, Hainaut P. Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Ther.* 2011;18(1):2-11. doi:10.1038/cgt.2010.63.
65. Gutierrez H, Davies AM. Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF- κ B. *Trends Neurosci.* 2011;34(6):316-325. doi:10.1016/j.tins.2011.03.001.
66. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain.* 2011;134(Pt 7):1914-1924. doi:10.1093/brain/awr128.
67. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 1994;54(8):2095-2097.
68. Herrmann O, Baumann B, Lorenzi R de, et al. IKK mediates ischemia-induced neuronal death. *Nat. Med.* 2005;11(12):1322-1329. doi:10.1038/nm1323.
69. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(5):1011-1027. doi:10.1200/JCO.2005.06.081.
70. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.* 2002;277(5):3247-3257. doi:10.1074/jbc.M106643200.
71. Hoffmann A, Leung TH, Baltimore D. Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J.* 2003;22(20):5530-5539. doi:10.1093/emboj/cdg534.
72. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature.* 2009;460(7259):1132-1135. doi:10.1038/nature08235.
73. Huang YH, Bergles DE. Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2004;14(3):346-352. doi:10.1016/j.conb.2004.05.007.
74. Hutchins JB, Barger SW. Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat. Rec.* 1998;253(3):79-90.
75. Ingebrigtsen T, Romner B. Biochemical serum markers for brain damage: a short review with emphasis on clinical utility in mild head injury. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2003;21(3-4):171-176.
76. Jeon S, Park J, Bae C, Park J. NGF-induced moesin phosphorylation is mediated by the PI3K, Rac1 and Akt and required for neurite formation in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 2010;56(6-7):810-818. doi:10.1016/j.neuint.2010.03.005.
77. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(18):10242-10247.
78. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(3):a001271. doi:10.1101/cshperspect.a001271.
79. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14(6):3981-3992.
80. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* 1999;9(11):601-604.
81. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001;17:615-675. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.615.
82. Kataly S, McKinnon PJ. DNA strand breaks, neurodegeneration and aging in the brain. *Mech. Ageing Dev.* 2008;129(7-8):483-491. doi:10.1016/j.mad.2008.03.008.
83. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science.* 1991;252(5013):1708-1711.
84. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972;26(4):239-257.
85. Kim HG, Hwang YP, Han EH, et al. Metallothionein-III provides neuronal protection through activation of nuclear factor-kappaB via the TrkA/phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling pathway. *Toxicol. Sci.* 2009;112(2):435-449. doi:10.1093/toxsci/kfp230.
86. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science.* 1996;274(5293):1652-1659.
87. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J. Clin. Oncol.* 1998;16(9):3158-3168.
88. Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, Colello RJ, Hamm RJ, Bullock MR. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2005;22(6):645-655. doi:10.1089/neu.2005.22.645.

89. Kögel D, Peters M, König H, et al. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience*. 2004;127(4):913-920. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.013.
90. Kögel D, Plöttner O, Landsberg G, Christian S, Scheidtmann KH. Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene*. 1998;17(20):2645-2654. doi:10.1038/sj.onc.1202204.
91. Kögel D, Prehn JH, Scheidtmann KH. The DAP kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game. *Bioessays*. 2001;23(4):352-358. doi:10.1002/bies.1050.
92. Komuro H, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*. 1993;260(5104):95-97.
93. König H, Kögel D, Rami A, Prehn JHM. TGF- β 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- κ B signaling. *J. Cell Biol.* 2005;168(7):1077-1086. doi:10.1083/jcb.200407027.
94. Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(6):2669-2674. doi:10.1073/pnas.0910658107.
95. Kövesdi E, Lückl J, Bukovics P, et al. Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. *Acta Neurochir (Wien)*. 2010;152(1):1-17. doi:10.1007/s00701-009-0463-6.
96. Krohn AJ, Preis E, Prehn JH. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J. Neurosci.* 1998;18(20):8186-8197.
97. Lam AG, Koppal T, Akama KT, et al. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NF κ B. *Neurobiol. Aging*. 2001;22(5):765-772.
98. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278(5701):261-263.
99. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278(5701):261-263.
100. Lane DP, Crawford LV. The complex between simian virus 40 T antigen and a specific host protein. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 1980;210(1180):451-463.
101. Lange RT, Iverson GL, Brubacher JR. Clinical utility of the protein S100B to evaluate traumatic brain injury in the presence of acute alcohol intoxication. *J Head Trauma Rehabil.* 2012;27(2):123-134. doi:10.1097/HTR.0b013e31820e6840.
102. Lankiewicz S, Marc Luetjens C, Truc Bui N, et al. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J. Biol. Chem.* 2000;275(22):17064-17071.
103. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J. Cell. Sci.* 2005;118(Pt 2):265-267. doi:10.1242/jcs.01610.
104. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays*. 2003;25(9):888-896. doi:10.1002/bies.10329.
105. Lee B, Clarke D, Al Ahmad A, et al. Perlecan domain V is neuroprotective and proangiogenic following ischemic stroke in rodents. *J. Clin. Invest.* 2011;121(8):3005-3023. doi:10.1172/JCI46358.
106. Lee JE, Kang JS, Shin IC, et al. Fluazepam-induced apoptosis of SH-SY5Y cells is mediated by p53 and Bcl-2 family proteins. *Neurotoxicology*. 2011;32(6):702-710. doi:10.1016/j.neuro.2011.08.004.
107. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323-331.
108. Li TK, Liu LF. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001;41:53-77. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.53.
109. Li Z, Sheng M. Caspases in synaptic plasticity. *Mol Brain*. 2012;5:15. doi:10.1186/1756-6606-5-15.
110. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27(48):6194-6206. doi:10.1038/onc.2008.297.
111. Limpert AS, Carter BD. Axonal neuregulin 1 type III activates NF- κ B in Schwann cells during myelin formation. *J. Biol. Chem.* 2010;285(22):16614-16622. doi:10.1074/jbc.M109.098780.

112. Lin J, Blake M, Tang C, et al. Inhibition of p53 transcriptional activity by the S100B calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.* 2001;276(37):35037-35041. doi:10.1074/jbc.M104379200.
113. Lin J, Yang Q, Yan Z, et al. Inhibiting S100B restores p53 levels in primary malignant melanoma cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279(32):34071-34077. doi:10.1074/jbc.M405419200.
114. Lin J, Yang Q, Wilder PT, Carrier F, Weber DJ. The calcium-binding protein S100B down-regulates p53 and apoptosis in malignant melanoma. *J. Biol. Chem.* 2010;285(35):27487-27498. doi:10.1074/jbc.M110.155382.
115. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 1979;17(1):43-52.
116. LUCAS DR, NEWHOUSE JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol.* 1957;58(2):193-201.
117. Luetjens CM, Lankiewicz S, Bui NT, Krohn AJ, Poppe M, Prehn JH. Up-regulation of Bcl-xL in response to subtoxic beta-amyloid: role in neuronal resistance against apoptotic and oxidative injury. *Neuroscience.* 2001;102(1):139-150.
118. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94(4):481-490.
119. Ma Y, Liu W, Wang Y, et al. VEGF protects rat cortical neurons from mechanical trauma injury induced apoptosis via the MEK/ERK pathway. *Brain Res. Bull.* 2011;86(5-6):441-446. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.07.007.
120. Ma Y, Qu Y, Fei Z. Vascular endothelial growth factor in cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2011;89(7):969-978. doi:10.1002/jnr.22628.
121. Malek R, Borowicz KK, Jargiełło M, Czuczwar SJ. Role of nuclear factor kappaB in the central nervous system. *Pharmacol Rep.* 2007;59(1):25-33.
122. Manuvakhova MS, Johnson GG, White MC, et al. Identification of novel small molecule activators of nuclear factor-kB with neuroprotective action via high-throughput screening. *J. Neurosci. Res.* 2011;89(1):58-72. doi:10.1002/jnr.22526.
123. Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J.* 2001;15(7):1218-1220.
124. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000;1(2):120-129. doi:10.1038/35040009.
125. Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96(18):10403-10408.
126. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003;1653(1):25-40.
127. Michetti F, Corvino V, Geloso MC, et al. The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *J. Neurochem.* 2012;120(5):644-659. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07612.x.
128. Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell.* 2003;11(3):577-590.
129. Mitra AK, Gao L, Zucker IH. Angiotensin II-induced upregulation of AT(1) receptor expression: sequential activation of NF-kappaB and Elk-1 in neurons. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2010;299(3):C561-9. doi:10.1152/ajpcell.00127.2010.
130. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293-299.
131. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005;17(6):631-636. doi:10.1016/j.ceb.2005.09.007.
132. Mollereau C, Zajac J, Roumy M. Staurosporine differentiation of NPFF2 receptor-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells induces selectivity of NPFF activity towards opioid receptors. *Peptides.* 2007;28(5):1125-1128. doi:10.1016/j.peptides.2007.03.001.
133. Mueller A, Schäfer BW, Ferrari S, et al. The calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 2005;280(32):29186-29193. doi:10.1074/jbc.M505000200.
134. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 1992;258(5082):597-603.

135. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell.* 2001;7(3):683-694.
136. Nishijima K, Ng Y, Zhong L, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am. J. Pathol.* 2007;171(1):53-67. doi:10.2353/ajpath.2007.061237.
137. Numakawa T, Adachi N, Richards M, Chiba S, Kunugi H. Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: Reciprocal influence on the central nervous system. *Neuroscience.* 2012. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.09.073.
138. Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000;288(5468):1053-1058.
139. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 1969;164(3880):719-721.
140. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 1997;20(6):252-258.
141. Orrenius S, Nicotera P. The calcium ion and cell death. *J. Neural Transm. Suppl.* 1994;43:1-11.
142. Otto M, Holthusen S, Bahn E, et al. Boxing and running lead to a rise in serum levels of S-100B protein. *Int J Sports Med.* 2000;21(8):551-555. doi:10.1055/s-2000-8480.
143. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(6):3032-3040.
144. Palona I, Namba H, Mitsutake N, et al. BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. *Endocrinology.* 2006;147(12):5699-5707. doi:10.1210/en.2006-0400.
145. Pedrocchi M, Schäfer BW, Mueller H, Eppenberger U, Heizmann CW. Expression of Ca(2+)-binding proteins of the S100 family in malignant human breast-cancer cell lines and biopsy samples. *Int. J. Cancer.* 1994;57(5):684-690.
146. Petroni M, Veschi V, Gulino A, Giannini G. Molecular mechanisms of MYCN-dependent apoptosis and the MDM2-p53 pathway: an Achilles' heel to be exploited for the therapy of MYCN-amplified neuroblastoma. *Front Oncol.* 2012;2:141. doi:10.3389/fonc.2012.00141.
147. Peyssonnaud C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell.* 2001;93(1-2):53-62.
148. Pizzi M, Goffi F, Boroni F, et al. Opposing roles for NF-kappa B/Rel factors p65 and c-Rel in the modulation of neuron survival elicited by glutamate and interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* 2002;277(23):20717-20723. doi:10.1074/jbc.M201014200.
149. Price DL. New order from neurological disorders. *Nature.* 1999;399(6738 Suppl):A3-5.
150. Qin Z, Tao L, Chen X. Dual roles of NF-kappaB in cell survival and implications of NF-kappaB inhibitors in neuroprotective therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* 2007;28(12):1859-1872. doi:10.1111/j.1745-7254.2007.00741.x.
151. Reali C, Scintu F, Pillai R, Donato R, Michetti F, Sogos V. S100b counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia. *J. Neurosci. Res.* 2005;81(5):677-686. doi:10.1002/jnr.20584.
152. Rothermundt M, Arolt V, Wiesmann M, et al. S-100B is increased in melancholic but not in non-melancholic major depression. *J Affect Disord.* 2001;66(1):89-93.
153. Rothermundt M, Peters M, Prehn JHM, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 2003;60(6):614-632. doi:10.1002/jemt.10303.
154. Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(6):2262-2272. doi:10.1128/MCB.26.6.2262-2272.2006.
155. Rustandi RR, Baldisseri DM, Drohat AC, Weber DJ. Structural changes in the C-terminus of Ca2+-bound rat S100B (beta beta) upon binding to a peptide derived from the C-terminal regulatory domain of p53. *Protein Sci.* 1999;8(9):1743-1751. doi:10.1110/ps.8.9.1743.
156. Sacconi S, Pantano S, Natoli G. Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol. Cell.* 2003;11(6):1563-1574.
157. Sakatani S, Seto-Ohshima A, Shinohara Y, et al. Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. *J. Neurosci.* 2008;28(43):10928-10936. doi:10.1523/JNEUROSCI.3693-08.2008.
158. Sanchez Y, Elledge SJ. Stopped for repairs. *Bioessays.* 1995;17(6):545-548. doi:10.1002/bies.950170611.

159. Sarnico I, Lanzillotta A, Benarese M, et al. NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival. *Int. Rev. Neurobiol.* 2009;85:351-362. doi:10.1016/S0074-7742(09)85024-1.
160. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *ChemBiochem.* 2001;2(1):20-29.
161. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* 2001;24(1-3):107-129. doi:10.1385/MN:24:1-3:107.
162. Savola O, Pyhtinen J, Leino TK, Siitonen S, Niemelä O, Hillbom M. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma.* 2004;56(6):1229-34; discussion 1234.
163. Schäfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 1996;21(4):134-140.
164. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* 1992;267(21):14987-14997.
165. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 2001;108(7):949-955. doi:10.1172/JCI14002.
166. Schreiber M, Baumann B, Cotten M, Angel P, Wagner EF. Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.* 1995;14(21):5338-5349.
167. Sen J, Belli A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J. Neurosci. Res.* 2007;85(7):1373-1380. doi:10.1002/jnr.21211.
168. Siesjö BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjö P, Katsura K, Folbergrová J. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann. Thorac. Surg.* 1995;59(5):1316-1320.
169. Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science.* 1984;226(4676):850-852.
170. Sin N, Kim KB, Elofsson M, et al. Total synthesis of the potent proteasome inhibitor epoxomicin: a useful tool for understanding proteasome biology. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999;9(15):2283-2288.
171. Singh J, Kaur G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Res.* 2007;1154:8-21. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.015.
172. Smith T, Groom A, Zhu B, Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat. Med.* 2000;6(1):62-66. doi:10.1038/71548.
173. Sobczak I, Galabova-Kovacs G, Sadzak I, Kren A, Christofori G, Baccarini M. B-Raf is required for ERK activation and tumor progression in a mouse model of pancreatic beta-cell carcinogenesis. *Oncogene.* 2008;27(35):4779-4787. doi:10.1038/onc.2008.128.
174. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 1999;19(14):5731-5740.
175. Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, et al. The many faces of S100B protein: when an extracellular factor inactivates its own receptor and activates another one. *Ital J Anat Embryol.* 2010;115(1-2):147-151.
176. Stern D, Du Yan S, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002;54(12):1615-1625.
177. Stiborová M, Poljaková J, Eckschlager T, Kizek R, Frei E. DNA and histone deacetylases as targets for neuroblastoma treatment. *Interdiscip Toxicol.* 2010;3(2):47-52. doi:10.2478/v10102-010-0010-6.
178. Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 2004;113(1):14-18. doi:10.1172/JCI20682.
179. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:217-245. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.217.
180. Su TT. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu. Rev. Genet.* 2006;40:187-208. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090428.
181. Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock.* 2002;18(2):99-106.

182. Svensson B, Peters M, König H, et al. Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002;22(10):1170-1175. doi:10.1097/00004647-200210000-00003.
183. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol. Pharm. Bull.* 2011;34(12):1785-1788.
184. Teng FYH, Tang BL. NF-kappaB signaling in neurite growth and neuronal survival. *Rev Neurosci.* 2010;21(4):299-313.
185. Tenneti L, D'Emilia DM, Troy CM, Lipton SA. Role of caspases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.* 1998;71(3):946-959.
186. Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, et al. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2006;26(1):81-86. doi:10.1007/s10571-006-9099-8.
187. Tsoporis JN, Izhar S, Proteau G, Slaughter G, Parker TG. S100B-RAGE dependent VEGF secretion by cardiac myocytes induces myofibroblast proliferation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012;52(2):464-473. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.015.
188. Tsoporis JN, Mohammadzadeh F, Parker TG. Intracellular and Extracellular Effects of S100B in the Cardiovascular Response to Disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010:206073. doi:10.1155/2010/206073.
189. Tsuchiya T, Bonner HP, Engel T, et al. Bcl-2 homology domain 3-only proteins Puma and Bim mediate the vulnerability of CA1 hippocampal neurons to proteasome inhibition in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 2011;33(3):401-408. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07538.x.
190. Tweddle DA, Pinkerton CR, Lewis IJ, Ellershaw C, Cole M, Pearson AD. OPEC/OJEC for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age. *Med. Pediatr. Oncol.* 2001;36(1):239-242. doi:10.1002/1096-911X(20010101)36:1<239:AID-MPO1058>3.0.CO;2-G.
191. van Cruchten S, van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 2002;31(4):214-223.
192. van Dieck J, Fernandez-Fernandez MR, Veprintsev DB, Fersht AR. Modulation of the oligomerization state of p53 by differential binding of proteins of the S100 family to p53 monomers and tetramers. *J. Biol. Chem.* 2009;284(20):13804-13811. doi:10.1074/jbc.M901351200.
193. van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2003;21(3-4):97-108.
194. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell.* 1999;96(2):245-254.
195. Villarreal A, Aviles Reyes RX, Angelo MF, Reines AG, Ramos AJ. S100B alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF-kB signaling. *J. Neurochem.* 2011;117(2):321-332. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07207.x.
196. Vos PE, Lamers KJB, Hendriks JCM, et al. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology.* 2004;62(8):1303-1310.
197. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 2009;137(3):413-431. doi:10.1016/j.cell.2009.04.037.
198. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001;15(22):2922-2933.
199. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002;3(6):430-440. doi:10.1038/nrm831.
200. Wang H, Zhang Q, Zhang L, et al. Insulin-like growth factor-1 induces the phosphorylation of PRAS40 via the PI3K/Akt signaling pathway in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 2012;516(1):105-109. doi:10.1016/j.neulet.2012.03.068.
201. Wu GS, Burns TF, McDonald ER, et al. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* 1997;17(2):141-143. doi:10.1038/ng1097-141.
202. Xie H, Hu L, Li G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J.* 2010;123(8):1086-1092.
203. Yang Q, O'Hanlon D, Heizmann CW, Marks A. Demonstration of heterodimer formation between S100B and S100A6 in the yeast two-hybrid system and human melanoma. *Exp. Cell Res.* 1999;246(2):501-509. doi:10.1006/excr.1998.4314.
204. Yang X, Wang Y, Zhang J, et al. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1alpha and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009;50(4):1873-1879. doi:10.1167/iovs.08-2591.

205. Yokota H, Narayanan SP, Zhang W, et al. Neuroprotection from retinal ischemia/reperfusion injury by NOX2 NADPH oxidase deletion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52(11):8123-8131. doi:10.1167/iovs.11-8318.
206. Yu W, Chen L, Yang Y, et al. Cytochrome P450 ω -hydroxylase promotes angiogenesis and metastasis by upregulation of VEGF and MMP-9 in non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011;68(3):619-629. doi:10.1007/s00280-010-1521-8.
207. Zhang L, Rzigalinski BA, Ellis EF, Satin LS. Reduction of voltage-dependent Mg²⁺ blockade of NMDA current in mechanically injured neurons. *Science.* 1996;274(5294):1921-1923.
208. Zheng X, Zhang S, Yin F, et al. Neuroprotection of VEGF-expression neural stem cells in neonatal cerebral palsy rats. *Behav. Brain Res.* 2012;230(1):108-115. doi:10.1016/j.bbr.2012.01.026.
209. Zhu Y, Culmsee C, Klumpp S, Kriegelstein J. Neuroprotection by transforming growth factor-beta1 involves activation of nuclear factor-kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1,2 signaling pathways. *Neuroscience.* 2004;123(4):897-906.
210. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res. Bull.* 1995;37(4):417-429.
211. Zuzarte-Luís V, Hurlé JM. Programmed cell death in the developing limb. *Int. J. Dev. Biol.* 2002;46(7):871-876.

Danksagung

Oh Gott, ich beginne meine Danksagung damit, dir zu danken. Du warst mir, mit all deiner Großzügigkeit und Gefälligkeit, ein Freund und Wegweiser in allen Zeiten. Ich danke dir für alles; besonders für deine 14 Lichter in dieser Welt.

Ich danke meinem Dr.Vater Herrn Privat. Doz. Dr. rer. nat Donat Kögel, für die Überlassung des Dissertationsthemas, die ausgezeichnete Betreuung, die sehr hilfreichen Anregungen und die immer freundliche und geduldige Diskussionsbereitschaft.

Ein großer Dank geht an alle Mitglieder unseres Labors, für die immer angenehme und kollegiale Atmosphäre. Besonders danken möchte ich hierbei Hildegard Schweers, Claus Reimertz und Hans-Georg König, die mich in die „Welt“ der Molekularbiologie eingeführt haben und mich anschließend systematisch mit der Durchführung apoptotischer Nachweisverfahren vertraut machten.

Ich danke meiner Familie, allen voran meinen Eltern, für die unendlichen Hilfen und Gebete. Durch euch bin ich all das, was ich jetzt bin und jemals sein werde.

Nicht zuletzt möchte ich meiner wunderbaren Frau herzlich danken, die mich jetzt seit über 3 Jahren in meinem gesamten Werdegang, insbesondere bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und motiviert. Durch sie ist das Leben erst lebenswert geworden.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

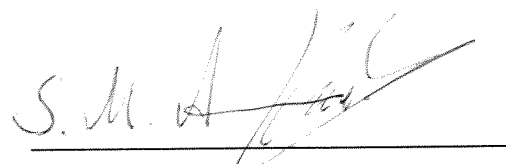
„Molekulare Mechanismen der S100B-vermittelten Neuroprotektion“

im Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, unter Betreuung und Anleitung von Priv. Doz. Dr. rer. nat. Doant Kögel, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Teile der vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Kögel D, Peters M, König H, Hashemi SMA, Bui NT, Arolt V, Rothermund M, Prehn JHM. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience*. 2004; 127(4):913-920. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.013.



Heidelberg, den 16.01.2013

Seyed Mohammad Amin Hashemi