

**Die Rolle von p53 und der
Proteinphosphatase 2C
in der neuronalen Apoptose**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Stephanie Schwarz

aus Merzalben

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 03. September 2004 angenommen:

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein

Zweitgutachter: Prof. Dr. S. Klumpp

Tag der mündlichen Prüfung: 03. September 2004

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Dr. Josef Krieglstein.

Ihm danke ich für die hervorragende Betreuung und Anleitung während der vergangenen drei Jahre, für seine stete Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen sowie für die wertvolle Förderung und Unterstützung, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Mein Dank gebührt außerdem Frau Professor Dr. Susanne Klumpp vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für ihre Unterstützung bezüglich der PP2C, die vielen wertvollen Anregungen sowie ihre ständige Gesprächsbereitschaft. Vielen Dank auch den Kollegen aus ihrem Arbeitskreis für die gute Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Sara Lavi und ihrer Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme und die Unterstützung während meines Aufenthalts in ihrem Labor an der George S. Wise Faculty of Life Sciences der Universität Tel Aviv bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Yuan Zhu und PD Dr. Carsten Culmsee für ihre Beratung bei der Durchführung der Experimente sowie für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Allen Freunden und Kollegen am Institut danke ich für die persönliche und wissenschaftliche Unterstützung und das ausgezeichnete Arbeitsklima; ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Apoptose – Merkmale, Grundlagen und Bedeutung	1
1.2	Die Proteinphosphatase 2C und der neuronale Zelltod	9
1.2.1	Phosphatasen und die reversible Phosphorylierung.....	9
1.2.2	Einteilung der Phosphatasen.....	10
1.2.3	Die Proteinphosphatase 2C.....	11
1.2.4	Die Proteinphosphatase 2C, Bad und der neuronale Zelltod.....	14
1.2.5	Funktionelle Analyse der PP2C.....	17
1.3	Fragestellungen.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Tiere und Tierhaltung.....	21
2.1.2	Chemikalien.....	22
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.4	Antikörper.....	26
2.1.5	Geräte	26
2.1.6	Software.....	27
2.2	Transiente Vorderhirnischämie der Ratte.....	28
2.2.1	Durchführung der transienten Vorderhirnischämie der Ratte	28
2.2.2	Arzneistoffgabe.....	30
2.2.3	Perfusion der Ratten.....	30
2.2.4	Entnahme der Gehirne.....	31
2.2.5	Aufarbeitung formalinfixierter Rattengehirne	31
2.2.6	Histologische Färbung der Gehirnschnitte	31
2.2.7	Bestimmung des ischämischen Schadens.....	32
2.3	Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur	33
2.4	Präparation und Kultivierung von embryonalen kortikalen Rattenneuronen.....	33
2.4.1	Vorbereitung der Kulturschalen.....	33
2.4.2	Präparation embryonaler kortikaler Rattenneurone	34

2.5	Kultivierung humaner Neuroblastomzellen (SH-SY5Y).....	36
2.5.1	Charakterisierung der SH-SY5Y-Zellen	36
2.5.2	Kultivieren von humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y).....	36
2.5.3	Differenzieren der SH-SY5Y-Zellen	38
2.5.4	Beschichtung mit Poly-L-lysin	38
2.6	Apoptoseinduktion und Detektion	39
2.6.1	Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen und kortikalen Neuronen	39
2.6.2	Behandlung mit weiteren Fettsäuren und Fettsäureestern	40
2.6.3	Staurosporinbehandlung von SH-SY5Y-Zellen	40
2.6.4	Bestimmung der Apoptose mit Hoechst 33258	41
2.6.5	Nilblaufärbung zur Detektion von Lipiden in der Zelle.....	42
2.7	Aufschluss von Zellen für das Western Blotting.....	43
2.7.1	Proteinextraktion aus Zellen	43
2.7.2	Bestimmung der Proteinmenge.....	44
2.8	Immunpräzipitation.....	45
2.8.1	Prinzip der Immunpräzipitation	45
2.8.2	Vorbereitung der Protein A-Sepharose	45
2.8.3	Immunpräzipitation	46
2.9	SDS-PAGE und Western Blotting.....	47
2.9.1	Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele.....	47
2.9.2	SDS-PAGE	48
2.9.3	Western Blotting	48
2.10	Immunzytochemie.....	51
2.10.1	Immunzytochemische Detektion mit mit Texas-Red®.....	51
2.10.2	Immunzytochemische Detektion mit Fluoroisothiocyanat (FITC)...	52
2.10.3	Immunzytochemische Doppelfärbung PP2C β und Bad.....	52
2.11	RNA-Interferenz (RNAi)	54
2.11.1	Grundlagen der RNA- Interferenz	54
2.11.2	Das Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi).....	55
2.11.3	Auswahl der Oligonukleotidsequenzen für die RNAi	57
2.11.4	Prinzip der Lipofektion	61
2.11.5	Transfektion von SH-SY5Y-Zellen in der Kulturschale.....	61
2.11.6	Transfektion von SH-SY5Y-Zellen in Suspension.....	62
2.12	Untersuchung der Messenger-RNA	63
2.12.1	Extraktion der Gesamt-RNA	63
2.12.2	Gehaltsbestimmung der Gesamt-RNA.....	63
2.12.3	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	64
2.12.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Auswertung der RT-PCR	66
2.13	Statistik.....	67

3	ERGEBNISSE	68
3.1	Neuroprotektion durch Pifithrin-α im Modell der transienten Vorderhirnischämie der Ratte.....	68
3.1.1	Einfluss von Pifithrin- α auf die neuronale Schädigung	68
3.1.2	Einfluss von Pifithrin- α auf die physiologischen Parameter.....	69
3.2	Expression von PP2Cα, PP2Cβ und Bad in SH-SY5Y-Zellen und in embryonalen kortikalen Neuronen der Ratte	72
3.2.1	Expression von PP2C α und PP2C β	72
3.2.2	Expression von Bad	74
3.2.3	Immunzytochemische Detektion von PP2C α , PP2C β und Bad.....	74
3.2.4	Staurosporindifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen hat keinen Einfluss auf die Expression von PP2C α , PP2C β und Bad.....	76
3.3	Etablierung eines Modells zur Ölsäureschädigung von SH-SY5Y-Zellen	79
3.3.1	Effekte der Ölsäure in Gegenwart von Serum.....	79
3.3.2	Effekte der Ölsäure bei reduziertem Serumgehalt	80
3.3.3	Morphologie der SH-SY5Y-Zellen nach Ölsäurebehandlung.....	82
3.3.4	Nilblaufärbung von SH-SY5Y-Zellen nach Ölsäurebehandlung	83
3.3.5	Zeitabhängigkeit der Ölsäurewirkung auf SH-SY5Y-Zellen	84
3.3.6	Konzentrationsabhängigkeit der Ölsäurewirkung auf SH-SY5Y-Zellen.....	85
3.3.7	Vergleich der Ölsäureeffekte auf SH-SY5Y-Zellen und embryonale kortikale Rattenneuronen	86
3.3.8	Untersuchung der Caspase 3-Aktivierung nach Ölsäurebehandlung.....	87
3.3.9	Detektion von PP2C α , PP2C β und Bad nach Ölsäurebehandlung....	88
3.3.10	Untersuchung der Bad-Phosphorylierung nach Ölsäurebehandlung	90
3.4	Untersuchungen zur fettsäureinduzierten Apoptose in SH-SY5Y-Zellen und in embryonalen kortikalen Neuronen.....	93
3.4.1	Stearinsäure: der Einfluss der Doppelbindung	94
3.4.2	Elaidinsäure: cis- gegenüber trans-Konfiguration	95
3.4.3	Ölsäuremethylester: der Einfluss der Säurefunktion	97
3.4.4	Linolsäure: die Positivkontrolle.....	101
3.5	Etablierung eines Systems zum simultanen <i>Knockdown</i> von PP2Cα und PP2Cβ in SH-SY5Y-Zellen.....	103
3.5.1	Auswahl eines geeigneten Lipofektionsreagenzes.....	104
3.5.2	Test der siRNA-Oligonukleotide für die PP2C α -RNAi	106
3.5.3	Einfluss der Zelldichte auf den Transfektionserfolg.....	108
3.5.4	Einfluss der siRNA-Menge auf den Transfektionserfolg.....	109
3.5.5	Test der Sequenz 1 für die PP2C β -RNAi.....	110
3.5.6	Kombinierte Transfektion von SH-SY5Y-Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden zum <i>Knockdown</i> von PP2C α und PP2C β	111
3.5.7	<i>Knockdown</i> von PP2C α und PP2C β vermindert die ölsäureinduzierte Schädigung von SH-SY5Y-Zellen.....	116

4	DISKUSSION	118
4.1	Neuroprotektion durch Pifithrin-α am Modell der transienten Vorderhirnischämie der Ratte.....	118
4.1.1	Die transiente Vorderhirnischämie der Ratte	118
4.1.2	Neuroprotektion durch Pifithrin- α nach globaler Ischämie	120
4.2	Korrelation von PP2C-Aktivierung und fettsäureinduzierter Apoptose in SH-SY5Y-Zellen und kortikalen Neuronen	123
4.3	Einfluss der Ölsäurebehandlung auf PP2Cα, PP2Cβ und Bad	129
4.4	Etablierung eines RNAi-Modells zum simultanen <i>Knockdown</i> der PP2Cα und PP2Cβ in SH-SY5Y-Zellen	133
4.4.1	Expressionsregulation durch RNA-Interferenz	133
4.4.2	<i>Knockdown</i> von PP2C α und PP2C β durch RNAi	139
4.5	Beteiligung der PP2C am ölsäureinduzierten Zelltod in SH-SY5Y-Zellen	140
5	ZUSAMMENFASSUNG	143
6	LITERATURVERZEICHNIS	145

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i> ; apoptoseinduzierender Faktor
Akt (= PKB)	<i>V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1/</i> Proteinkinase B
Apaf-1	Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor-1
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
Bad	<i>Bcl-xL/Bcl-2 associated death promotor</i> ; Bcl-assoziierter Todespromotor
Bak	<i>Bcl-2 antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated x protein</i> ; Bcl-assoziertes X-Protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
Bcl-xL	<i>Bcl-x long</i>
BH	<i>Bcl-2 homology domain</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2 interacting killer</i>
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
Bok	<i>Bcl-2 related ovarian killer</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CA	<i>cornu ammonis</i>
CaMKPase	Calmodulinkinase-Phosphatase
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	doppelsträngige RNA
E18	Embryonaltag 18
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoroisothiocyanat
GAP-43	<i>growth-associated protein 43</i> ; wachstumsassoz. Protein 43
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
IκB	Inhibitor von NF-κB
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
mdm-2	<i>Murine Double Minute-2</i>

MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
MKK	Mitogenaktivierte Kinase-Kinase
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NB	Neurobasal
NF- κ B	<i>nuclear factor of immunoglobulin κ locus in B cells</i>
Nix	<i>Nip3-like protein x</i>
nt	Nukleotide
p	Signifikanzniveau
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pBad	phospho-Bad
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> ; phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PFT α	Pifithrin- α
PI3-K	Phosphoinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PKR	dsRNA-aktivierte Proteinkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Proteinphosphatase
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPM	Proteinphosphatase, magnesiumabhängig
PPP	Phosphoproteinphosphatase
Puma	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	<i>rotations per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RR	Blutdruck
RT	reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> ; Natriumlaurylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i> ; Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,2-propandiol
U	<i>unit</i> ; Einheit
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i> ; spannungsgesteuerter Anionenkanal

1 Einleitung

1.1 Die Apoptose – Merkmale, Grundlagen und Bedeutung

In jeder Sekunde entstehen im Körper eines Erwachsenen rund 100.000 neue Zellen (Vaux und Korsmeyer, 1999), Zeichen eines ständigen Auf- und Umbauprozesses. Überflüssige oder defekte Zellen müssen im Gegenzug verschwinden. Dafür sorgt die Apoptose, ein genetisch festgelegtes Selbstmordprogramm, bei dem die Zelle innerhalb kurzer Zeit komplexe morphologische Veränderungen erfährt und schließlich komplett eliminiert wird.

Dieser aktive Prozess wurde 1972 durch Kerr und Mitarbeiter benannt und detailliert beschrieben; der Begriff „Apoptose“ ist griechischen Ursprungs („apo“= ab, weg, los; „ptosis“= Senken, Fallen) und soll an das Fallen der Blätter im Herbst erinnern – als Hinweis darauf, dass diesem Vorgang im Kreislauf des Lebens eine wichtige Rolle zukommt. Immerhin ist die Apoptose nicht nur für die Regulation der Zellzahl und den Erhalt der Gewebshomöostase im fertigen Organismus wesentlich: Schon während der Entwicklung gehen viele nicht oder nicht mehr benötigte Strukturen apoptotisch zugrunde (Meier et al., 2000); betroffen ist hier auch das Gehirn, wenn während der Ausbildung des neuronalen Netzwerks viele der ursprünglich angelegten Neurone wieder eliminiert werden – über apoptotische Prozesse, ausgelöst durch einen Mangel an entsprechenden Wachstumsfaktoren (Hutchins und Barger, 1998).

Zu Beginn der Apoptose schrumpft die Zelle, das Zytoplasma kondensiert. Dabei bleibt die Struktur der Mitochondrien erhalten, und der Stoffwechsel bricht nicht zusammen. Die Plasmamembran bleibt ebenfalls intakt, und da der Zellinhalt nicht austritt, bleiben Entzündungsreaktionen aus (Kerr und Harmon, 1991). Später kann es zur Ausstülpung der Membran und Bildung von Bläschen kommen, dem „*membrane blebbing*“, doch auch dabei verliert die Zytoplasmamembran nicht an Integrität (Majno und Joris, 1995).

Nicht nur die Zelle selbst, auch ihr Kern schrumpft; das Chromatin verdichtet sich und verbleibt entweder als glatte runde Masse im Nukleus oder lagert sich an die Kernmembran an (Majno und Joris, 1995). In einem weiter fortgeschrittenen Stadium schneiden $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonukleasen die DNA spezifisch zwischen den Nukleosomen; die Bruchstücke sind jeweils 180 Basenpaare bzw. ein Vielfaches davon lang (Arends et al., 1990; Wyllie, 1980) und zeigen nach elektrophoretischer Auftrennung ein typisches Muster, die DNA-Leiter (Masters et al., 1989; Shi et al., 1990).

Schließlich zerbricht der Kern, und die Zelle zerfällt in „*apoptotic bodies*“; kleine membranumschlossene Körperchen, die Fragmente des kondensierten Chromatins, Mitochondrien und Stücke endoplasmatischen Retikulums enthalten (Kerr et al., 1995). Spezifische Veränderungen der Membran, etwa die Translokation von Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Zytoplasmamembran, schaffen schließlich die Voraussetzungen für den letzten Schritt der Apoptose: die Aufnahme der Zellüberreste durch Phagozyten und benachbarte Zellen. Nach der Resorption werden die apoptotischen Körperchen enzymatisch aufgeschlossen und so am Ende vollständig wiederverwertet (Majno und Joris, 1995; Savill und Fadok, 2000).

Neben dem Konzept des zellulären Selbstmordes existiert auch das des Mordes, also des durch äußere Einflüsse bedingten Untergangs. Diese sogenannte Nekrose unterscheidet sich von der typischen Apoptose; sie läuft passiv ab, ist energieunabhängig und erscheint insgesamt weniger geordnet (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997). Beispielsweise klumpt das Chromatin unregelmäßig zusammen, und statt regelmäßiger DNA-Bruchstücke erhält man nach elektrophoretischer Auftrennung einen bloßen DNA-Schmier. Weil die Plasmamembran geschädigt wird, strömen Wasser und Ionen in die Zelle, es kommt zum typischen Anschwellen der Organellen wie auch der Zelle selbst. Schließlich werden die Strukturen komplett zerstört, der Zellinhalt tritt aus und verursacht eine lokale Entzündungsreaktion mit Gewebeschädigung; anders als bei der Apoptose werden hier auch gesunde Zellen in Mitleidenschaft gezogen (Majno und Joris, 1995).

Betrachtete man früher Apoptose und Nekrose als zwei komplett voneinander verschiedene Formen des Zelltods, so setzt sich heute die Erkenntnis durch, dass eine strikte Unterscheidung der beiden Vorgänge nicht immer möglich ist. Vielmehr stellen Apoptose und Nekrose nur die Extrempunkte eines Kontinuums dar; die Übergänge sind fließend (Martin, 2001; Kanduc et al., 2002), und in vielen Fällen liegen in Abhängigkeit von Bedingungen wie dem ATP-Gehalt der Zelle oder der mitochondrialen Funktion Mischformen vor aus aktiver Apoptose und durch metabolischen Kollaps ausgelöster passiver Nekrose (Leist et al., 1997; Nicotera et al., 1999).

Die Apoptose folgt komplexen Signalwegen

Die morphologischen Veränderungen der Zelle im Verlauf der Apoptose sind die Folge höchst komplexer Vorgänge in ihrem Innern. In Abhängigkeit vom Stimulus werden unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert, die alle letztlich im Untergang der Zelle münden (vgl. Abb. 1.1-1).

In Säugerzellen unterscheidet man im wesentlichen den extrinsischen, rezeptorvermittelten vom intrinsischen, mitochondrienvermittelten Signalweg. Im ersten Fall ist die Apoptose Resultat der Interaktion von Liganden wie FasLigand (FasL) oder Tumornekrosefaktor (TNF) mit ihren Rezeptoren in der Zellmembran. Beim intrinsischen Weg spielt das Mitochondrium die zentrale Rolle; Stimuli vor allem aus dem Zellinneren fördern die Freisetzung apoptotischer Substanzen wie Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma (Kroemer und Reed, 2000). Daneben kann auch Stress zur Apoptose führen, indem er die Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum fördert (Nakagawa et al., 2000) oder durch freie Radikale die Schädigung von Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren verursacht (Mattson, 2000).

An den ablaufenden Signalkaskaden sind viele Faktoren beteiligt; einige begünstigen den Untergang der Zelle, andere fördern das Überleben, und ihr Zusammenwirken entscheidet schließlich über das Schicksal der Zelle.

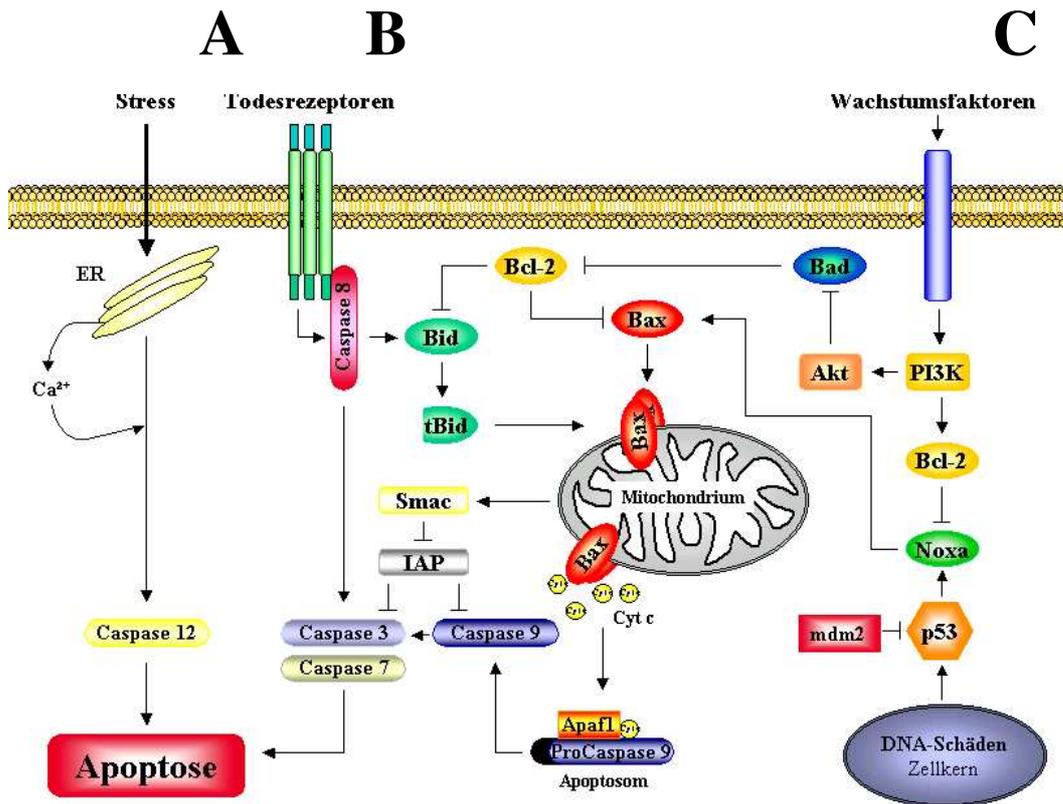


Abb. 1.1-1: Schematische Darstellung verschiedener Apoptose-Signalwege

Stress setzt Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) frei, die nachfolgende Aktivierung von Caspase 12 führt zur Apoptose (A). Die ligandengesteuerte Aktivierung von Todesrezeptoren in der Zellmembran löst über Caspase 8-Aktivierung ebenfalls Apoptose aus, entweder direkt über Caspase 3-Aktivierung oder indirekt über Bid, das Mitochondrium und Aktivierung von Caspase 9 (B).

Wachstumsfaktoren binden an entsprechende Rezeptoren in der Membran und senden damit Überlebenssignale (C); fehlen sie, geht die Zelle zugrunde. Auch hier läuft der Vorgang letztlich über das Mitochondrium, aus dem unter Beteiligung proapoptotischer porenbildender Proteine wie Bax u.a. Cytochrom c freigesetzt wird, das mit Apaf1 und der Procaspase 9 das Apoptosom bildet. Die so aktivierte Caspase 9 aktiviert ihrerseits Caspase 3, die Zelle stirbt.

p53: der Wächter des Genoms

Der Tumorsuppressor p53 schützt die Zelle vor Entartung; als „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992) kontrolliert er ihre genomische Stabilität. In dieser Funktion sorgt er nach DNA-Schädigung oder Aktivierung von Onkogenen dafür, dass die Defekte nicht an nachfolgende Zellgenerationen weitergegeben werden. Menge und Aktivität von p53 in der Zelle werden streng kontrolliert, unter anderen durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen ihm und

seinem Antagonisten mdm2, der an p53 bindet und sowohl dessen Aktivierung hemmt (Momand et al, 1992) als auch seinen Abbau fördert (Haupt et al., 1997); andererseits führt aktives p53 zur gesteigerten Expression von mdm2 und schließt damit die Feedbackschleife (Barak et al., 1993).

Nach Schädigung der DNA wird p53 durch Phosphorylierung aktiviert (Woo et al., 1998) und ist dann Transkriptionsfaktor für eine Reihe von Genen, die im Zellzyklus oder bei der Apoptose eine Rolle spielen. Auf diesem Weg unterbricht p53 den Zellzyklus, damit vorhandene Schäden repariert werden können und nicht vererbt werden; sind die Schäden allerdings irreparabel, wird die Apoptose eingeleitet und die Zelle eliminiert (Vogelstein et al., 2000; Vousden und Lu, 2002). Kann p53 diese wichtige Aufgabe nicht mehr erfüllen, so begünstigt das die Entstehung von Tumoren - und tatsächlich ist p53 in mehr als 50% aller humanen Tumore mutiert und damit nicht mehr funktionsfähig (Crawford et al., 1981; Lane, 1992; Vogelstein et al., 2000).

Die Bcl-2-Familie: Regulatoren der Apoptose

Die Mitglieder der hoch konservierten Bcl-2-Familie gehören zu den Schlüsselregulatoren der Apoptose. Namensgeber ist das Onkogen Bcl-2, das an der Entstehung des B-Zell-Lymphoms (*B-cell lymphoma*) beteiligt ist (Vaux et al., 1988). Die Bcl-2-Familie hat sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirkende Mitglieder; ihr Verhältnis bestimmt die Empfindlichkeit der Zelle apoptotischen Signalen gegenüber (Oltvai et al., 1993).

Alle Familienmitglieder besitzen mindestens eine von insgesamt vier Bcl-2-homologen (BH-) Domänen. Einige verfügen außerdem über eine Transmembrandomäne, mit der sie an Membranen binden können und die somit über die Lokalisation entscheidet (Krajewski et al., 1993). Die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Unterfamilie besitzen die BH-Domänen 1-4 (vgl. Abb. 1.1-2). Den Mitgliedern der proapoptotischen Bax-Unterfamilie fehlt BH4. Proteine der dritten, ebenfalls proapoptotischen Unterfamilie verfügen nur noch über eine BH3-Domäne, wobei die für die apoptosefördernde Aktivität sowohl notwendig als auch hinreichend ist (Cory und Adams, 2002): Die Domänen BH1-3 der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine bilden eine hydrophobe Tasche, in welche die

amphipathische, helikale BH3-Domäne ihrer proapoptotischen Verwandten inserieren kann: Es entstehen Heterodimere (Sattler et al., 1997; Kelekar und Thompson, 1998; Huang and Strasser, 2000). Das wiederum bedeutet beispielsweise für Bax, das Bcl-2-assoziierte X-Protein, dass es nicht mehr homooligomerisieren kann und damit auch nicht mehr in der Lage ist, durch Bildung von Poren oder Modulation anderer Ionenkanäle wie etwa dem spannungsgesteuerten Anionenkanal VDAC (*voltage-gated anion channel*) in der äußeren Mitochondrienmembran die Freisetzung proapoptotischer Stoffe zu fördern (Shimizu et al., 1999; Tsujimoto und Shimizu, 2000; Antonsson, 2001; Wei et al., 2001) – die Zelle überlebt.

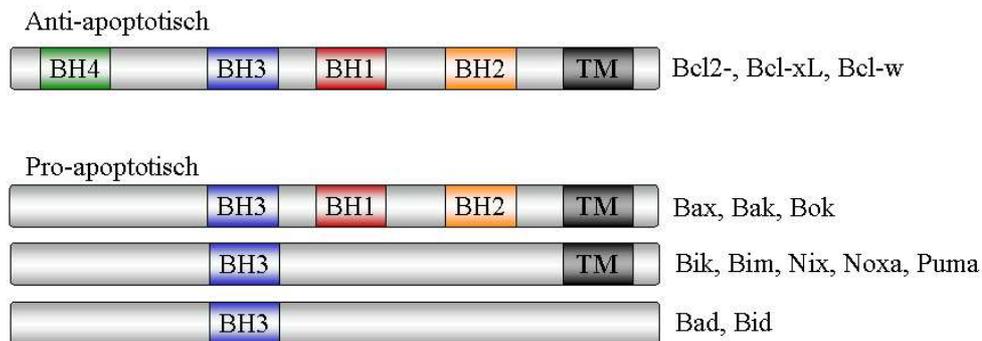


Abb. 1.1-2: Einteilung der Bcl-2-Proteine (modifiziert nach Antonsson, 2001)

Caspasen: zentrale Mediatoren der Apoptose

Eine zentrale Rolle in Initiation und Ausführung der Apoptosesignalwege spielen die Caspasen: intrazelluläre aspartatspezifische Cysteinproteasen, die in der Zelle als inaktive Zymogene, die Procaspasen, vorliegen und bei Bedarf durch Schneiden aktiviert werden (Cohen, 1997).

Im Säuger sind 14 Mitglieder der Caspasefamilie bekannt (Alnemri, 1997). Die Initiator-Caspasen 2, 8, 9 und 10 stehen am Anfang der Kaskade und sind teils für die Signalweiterleitung nach Aktivierung von Todesrezeptoren zuständig, teils für die Übermittlung apoptotischer Signale nach mitochondrialer Schädigung. Ihre Substrate sind in erster Linie die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7,

die sie prozessieren und aktivieren, damit die ihrerseits das Apoptosesignal weiterleiten und verstärken und so zu den typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen der apoptotischen Zelle beitragen (Earnshaw et al., 1999).

Dem Auftrag entsprechend sind die Substrate der Caspasen vielfältig: Dazu zählen neben Apoptoseregulatoren wie Bad (Condorelli et al., 2001) oder Bax (Wood and Newcomb, 1999) auch Proteine des Zellzyklus wie mdm2 (Chen et al., 1997), Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder sein Bindeprotein I κ B (Barkett et al., 1997), Serin/Threonin-Kinasen wie Akt (Widmann et al., 1998) und Phosphatasen wie Calmodulin (Mukerjee et al., 2000) und die Proteinphosphatase 2A (Santoro et al., 1998; Übersicht bei Fischer et al., 2003).

Störungen der Apoptose sind die Ursache vieler Erkrankungen

Ein Ungleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod ist die Ursache vieler Erkrankungen (Miller und Marx, 1998). Eine verringerte Apoptoserate, z.B. bei Defekten von Tumorsuppressorgenen wie p53, führt zu Krebs, weil zufällig mutierte Zellen nicht entfernt werden. Auch bei Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses ist der aktive Zelltod reduziert (Thompson, 1995), ebenso bei einer Reihe von viralen Infektionen. Papilloma- und Adenoviren blockieren die Apoptose ihrer Wirtszellen mit Hilfe eines p53-Inhibitors (Young et al., 1997; Schuchmann et al., 2002). HIV kann zusätzlich in nicht infizierten Zellen Apoptose auslösen (Teodoro und Branton, 1997).

Eine Steigerung der Apoptoserate im Gehirn ist für eine Reihe pathologischer Zustände verantwortlich: Der Untergang bestimmter Populationen von Neuronen führt zu neurodegenerativen Krankheitsbildern (Yuan und Yankner, 2000). Die motorischen Störungen bei Morbus Parkinson sind bedingt durch den Untergang dopaminergener Neurone in der Substantia nigra (Mattson et al., 2001; Vila und Przedborski, 2003). Bei Morbus Alzheimer degenerieren kortikale und hippokampale Neurone (Mattson et al., 2001): Amyloid β kumuliert im Gehirn des Patienten und bildet Ablagerungen, die zusammen mit den aus hyperphosphoryliertem Tau gebildeten neurofibrillären Bündeln die

histopathologischen Charakteristika von Morbus Alzheimer darstellen (Loo et al., 1993; Stadelmann et al., 1999; Cutler und Sramek, 2001). Die Folge ist eine fortschreitende Demenz mit Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses, Desorientierung und Veränderungen der Persönlichkeit.

Die Degeneration striataler Neurone führt bei der Erbkrankheit Chorea Huntington zu unkontrollierbaren Körperbewegungen und einer Reihe von psychiatrischen Symptomen (Portera-Cailliau et al., 1995; Vila und Przedborski, 2003). Die Amyotrophe Lateralsklerose wird durch den Verlust motorischer Neurone u.a. im zerebralen Kortex verursacht, es kommt zu fortschreitender Paralyse mit Sprach- und Schluckstörungen (Guegan et al., 2001; Vila und Przedborski, 2003).

Auch bei einigen akuten Krankheitsbildern ist die Apoptoserate erhöht; in erster Linie handelt es sich um ischämische Erkrankungen, namentlich um Herzinfarkt (Kolodgie et al., 2000) und Schlaganfall. Hier ist besonders die grenzwertig durchblutete Randzone des Hirninfarkts, die so genannte Penumbra, betroffen: Dort sind die Zellen nicht sofort tot, gehen aber verzögert durch apoptotische Prozesse zugrunde (Dirnagl et al., 1999). Rechtzeitige Intervention könnte daher das Ausmaß der Schädigung geringer halten. Wie wichtig es ist, diese Chance zu ergreifen und entsprechende Therapien zu entwickeln, wird besonders deutlich, wenn man die hohe Zahl der Betroffenen bedenkt. So ist der Schlaganfall in den Industrieländern nach kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs die dritthäufigste Todesursache (American Heart Association, 2001) - und auch überlebende Patienten sind meist nicht völlig wiederhergestellt, sondern benötigen lebenslange Pflege und Unterstützung (Bronner et al., 1995).

Angesichts der steigenden Lebenserwartung in den Industrienationen, die weiter steigende Fallzahlen erwarten lässt, wird deutlich, wie wichtig es ist, die Pathophysiologie der genannten Krankheitsbilder weiter aufzuklären und die zugrundeliegenden apoptotischen Mechanismen zu erforschen, um auf dieser Basis effektive Therapien zu entwickeln und dadurch sowohl die Prognose als auch die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern.

1.2 Die Proteinphosphatase 2C und der neuronale Zelltod

1.2.1 Phosphatasen und die reversible Phosphorylierung

Über reversible Phosphorylierung werden fast alle biologischen Funktionen der Zelle reguliert; nicht umsonst enthalten rund 30% aller humanen Proteine kovalent gebundenes Phosphat (Cohen, 2000). Bei der Untersuchung von Phosphorylierung und Dephosphorylierung richtete sich das Augenmerk zunächst auf die Kinasen, welche Phosphat und Protein miteinander verknüpfen, während die Phosphatasen, die die Bindung wieder lösen, weniger beachtet wurden. Die Entdeckung, dass im menschlichen Genom etwa 600 Kinasen, aber nur knapp 200 Phosphatasen codiert sind (Cohen, 2001), stützte diese Betrachtungsweise, schienen die Kinasen doch wesentlich spezifischer zu sein als ihre Gegenspieler. Schließlich zeigte sich jedoch, dass auch die Proteinphosphatasen wichtige und differenziert agierende Regulatoren sind (Dombradi et al., 2002), und berücksichtigt man die Anzahl der durch unterschiedliche Kombination von Untereinheiten gebildeten Holoenzyme, so gleicht sich die Zahl der Phosphatasen der der Kinasen an (Bollen und Beullens, 2002).

Die Bindung von Phosphat an ein Protein verursacht eine Konformationsänderung und beeinflusst so seine Fähigkeit, mit Liganden und Substraten zu interagieren. Dies wirkt sich auf die enzymatische Aktivität und den Substratumsatz des Proteins aus, kann aber beispielsweise auch über die Zusammensetzung aus bestimmten Untereinheiten oder die Lokalisation

in der Zelle entscheiden (Bollen und Beullens, 2002). Letztlich ist das Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen (Abb. 1.2-1) für den Phosphorylierungsgrad eines Proteins und damit für seine Funktion in der Zelle

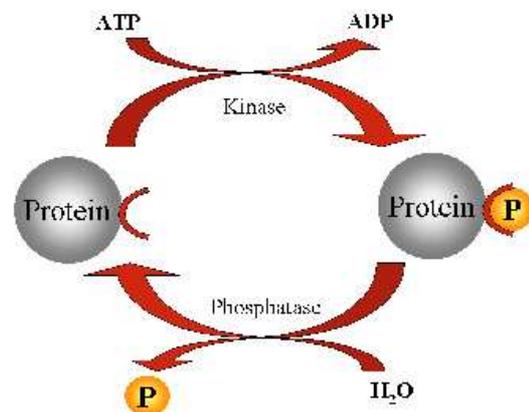


Abb. 1.2-1:
Reversible Phosphorylierung von Proteinen

bestimmend. Somit tragen nicht nur Kinasen durch Phosphorylierung, sondern ebenso Phosphatasen durch Dephosphorylierung entscheidend zur Proteinregulation bei, schalten über ihre Substrate Signalwege an oder ab und lösen so in der Zelle sowohl kurz- als auch langfristige Effekte aus (Herzig und Neumann, 2000).

Störungen des Gleichgewichts von Phosphorylierung und Dephosphorylierung bleiben erwartungsgemäß nicht ohne Folgen. So beruhen die Wirkungen diverser Toxine und Pathogene letzten Endes auf einer veränderten Proteinphosphorylierung (Cohen, 2001). Der Phosphataseinhibitor Okadainsäure zum Beispiel wird gebildet in marinen Dinoflagellaten, reichert sich in Schwämmen und Meeresfrüchten an und ist die Hauptursache von Muschelvergiftungen (Haystead et al., 1989; Cohen et al., 1990).

Anomale Phosphorylierung ist außerdem Ursache vieler Krankheiten, darunter Diabetes, chronische entzündliche Erkrankungen und Krebs; könnte man den normalen Phosphorylierungsstatus durch spezifische Substanzen, beispielsweise Proteinkinase-Inhibitoren, wiederherstellen, wären solche Erkrankungen möglicherweise ursächlich therapierbar (Cohen, 2001).

1.2.2 Einteilung der Phosphatasen

Nicht jede Aminosäure wird auch tatsächlich phosphoryliert; bei höheren Organismen beschränkt sich das im wesentlichen auf Serin, Threonin und Tyrosin für die Bildung von O-Phosphaten sowie Histidin für die Entstehung von N-Phosphoamidaten. Dem entsprechend gibt es O- und N- (Histidin-) Phosphatasen, wobei die erste Gruppe aus drei Superfamilien besteht: den Proteintyrosin-Phosphatasen (PTP), zu denen auch die *Dual-Specificity*-Phosphatasen gehören, und den Serin/Threonin-Phosphatasen, die sich ihrerseits nach phylogenetischen Gesichtspunkten in Phosphoproteinphosphatasen (PPP) und magnesiumabhängige Proteinphosphatasen (PPM) weiter unterteilen lassen (zitiert nach Klumpp und Krieglstein, 2002).

Im humanen Genom werden etwa 40 Serin/Threonin-Phosphatasen codiert; ihnen stehen mehr als 300 Serin/Threonin-Kinasen gegenüber (Sim et al., 2003). Ihre Einteilung in Subtypen und die entsprechende Benennung richten sich nach ihren biochemischen Eigenschaften: Typ1 wird durch hitzestabile Inhibitorproteine gehemmt und dephosphoryliert bevorzugt die β -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase, während Typ2 gegen diese Inhibitoren unempfindlich ist und die α -Untereinheit vorzieht. Typ2 lässt sich in weitere Untergruppen gliedern: 2A wird spontan aktiv, 2B benötigt dafür Ca^{2+} , 2C ist magnesiumabhängig (McGowan and Cohen, 1988). Außerdem unterscheiden sie sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Phosphataseinhibitoren wie Microcystin oder Okadainsäure, welche PP1, PP2A und in höheren Konzentrationen auch PP2B hemmen, die PP2C aber nicht beeinflussen (MacKintosh et al., 1990; Cohen et al., 1990)

1.2.3 Die Proteinphosphatase 2C

Während sich die Sequenzen der PP-Phosphatasen stark ähneln, besitzt die PP2C keine Homologie zu ihnen oder zu anderen bekannten Phosphatasen (Das et al., 1996). Sie ist das definierende Mitglied der PPM-Familie; Verwandte finden sich sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten, etwa die SpoIIE Phosphatase aus *Bacillus subtilis* (Bork et al., 1996) oder an ABI1 (Meyer et al., 1994) und KAPP-1 (Stone et al., 1994) aus *Arabidopsis thaliana*. In Säugern gehört neben den PP2C-Isoformen auch die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase zur Familie (Ingebritsen and Cohen, 1983; Barford, 1996).

Proteinphosphatasen des Typs 2C sind magnesiumabhängige, monomere Enzyme; Hinweise auf regulatorische Untereinheiten gibt es nicht (McGowan und Cohen, 1988; Barford, 1996). Gegenwärtig sind in Säugerzellen mindestens zehn verschiedene Typ 2C-Phosphatasen bekannt. Sie teilen sich sechs konservierte Motive und lassen sich anhand der Aminosäuresequenz in Motiv I in zwei Gruppen einteilen (Komaki et al., 2003). Mitglieder der ersten Gruppe enthalten die Sequenz RXXME/QD; dazu gehören neben PP2C α und PP2C β auch FIN13/PP2C γ , PP2C δ , PP2C ϵ , Wip1, CaMKPase/POPX1 und CaMKPase-N/POPX2. PP2C ζ und NERPP-2 enthalten die Sequenz KXXXNED und bilden die zweite Gruppe (Komaki et al., 2003).

Die Isoformen PP2C α und PP2C β sind von allen am besten charakterisiert. Von der α -Isoform existieren zwei Spleißvarianten (Mann et al., 1992; Takekawa et al., 1998), von der β -Isoform sind bislang sechs beschrieben (Terasawa et al., 1993; Hou et al., 1994; Kato et al., 1995; Marley et al., 1998; Seroussi et al. 2001; zitiert nach Komaki et al., 2003). Sowohl die PP2C α als auch die PP2C β werden ubiquitär exprimiert; die besonders hohe Expression der PP2C α im Zytoplasma von Neuronen wurde beschrieben (Lifschitz-Mercer et al., 2001). Die Größe der Enzyme ist mit jeweils rund 42 kDa (α bzw. β 2) vergleichbar; die elektrophoretische Mobilität der PP2C α ist ein wenig geringer als die der PP2C β 2, obwohl sie etwas kleiner ist (Cheng et al., 2000). Allein von der PP2C α wurde bislang die Struktur beschrieben (Das et al., 1996; Abb. 1.2-1); verschiedenen Hypothesen zum Trotz ist der exakte Wirkmechanismus bislang ungeklärt (Jackson et al., 2003).

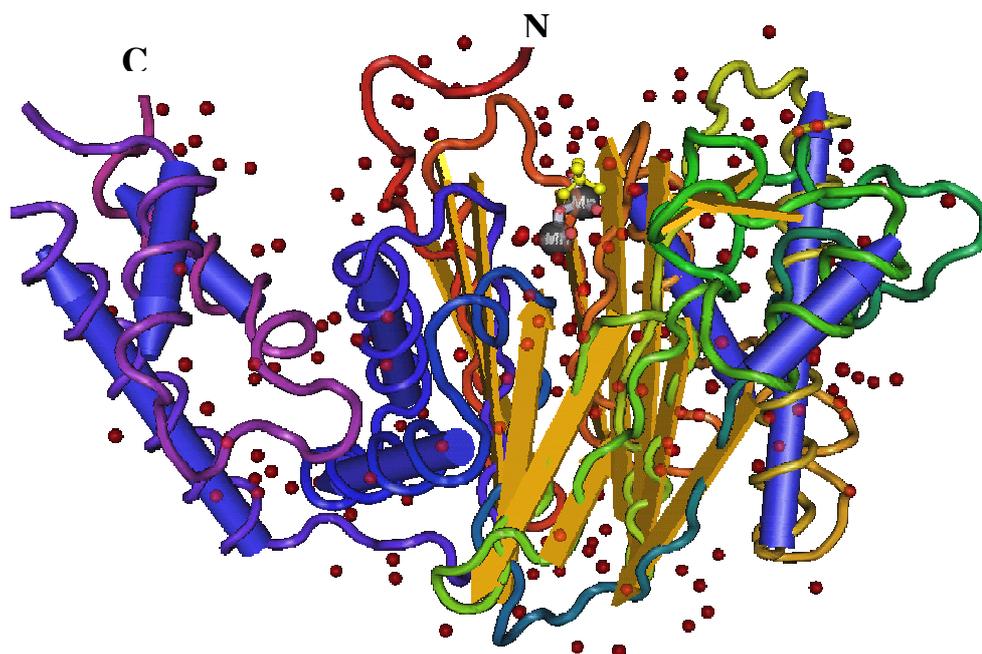


Abb. 1.2-2: Struktur der PP2C α

Die aminoterminal, katalytische Domäne der PP2C α besteht aus sechs α -Helices (blaue Pfeile) und elf β -Faltblättern (goldfarbene Pfeile). Die C-terminale, 90 Aminosäuren lange Domäne aus drei α -Helices ist typisch für die Säuger-PP2C. Im katalytischen Zentrum, dominiert von einem zentralen β -Sandwich, werden zwei Manganionen von vier Aspartatresten, einem Glutamatrest und sechs Wassermolekülen koordiniert. (Das et al., 1996; Barford, 1996).

Abbildung erstellt mit Cn3D 4.1 unter Verwendung der Daten von Das et al. (1996) aus der Molecular Modelling-Datenbank (MMDB) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Wang et al., 2000). Kugeln: Lösungsmittelmoleküle.

Tab. 1.2-1: Substrate der PP2C (Auswahl)

Substrat	Literatur
AMPK (<i>5'-AMP-activated protein kinase</i>)	Davies et al., 1995 Marley et al., 1996 Moore et al., 1991 Velasco et al., 1998
Axin	Strovel et al., 2000
Bad	Klumpp et al., 2003
CaMK II (<i>Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase type II</i>)	Fukunaga et al., 1993
Cdk2 (<i>cyclin-dependent kinase 2</i>)	Cheng et al., 2000 Johnson et al., 2002
Cdk6 (<i>cyclin-dependent kinase 6</i>)	Cheng et al., 2000
CFTR (<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)	Dahan et al., 2001 Luo et al., 1998 Travis et al., 1997 Zhu et al., 1999
CSAD (<i>Cysteine sulfinic acid decarboxylase</i>)	Tang et al., 1997 Wu et al., 1998
DARPP-32 (<i>Dopamine- /cAMP-regulated phosphoprot., 32kDa</i>)	Desdouts et al., 1998
Glutamatrezeptor mGluR3	Flajolet et al., 2003
Glykogenphosphorylase	Ingebritsen et al., 1983 Ortmeyer, 1997
Glykogensynthase	Ingebritsen et al., 1983 Ortmeyer, 1997
HMG-CoA-Reduktase	Ching et al., 1997
HMG-CoA-Reduktase-Kinase	Ingebritsen und Cohen, 1983
Hormonsensitive Lipase HSL	Olsson und Belfrage, 1987 Yeaman et al., 1994
MKK3b	Hanada et al., 1998
MKK4	Hanada et al., 1998
MKK6	Hanada et al., 1998 Takekawa et al., 1998
MKK7	Hanada et al., 1998
Moesin	Hishiya et al., 1999
NPR-A	Bryan und Potter, 2002
p38	Takekawa et al., 1998
Phospholamban	McDougall et al., 1991
Phosphorylasekinase	Ingebritsen et al., 1983
SEK1	Takekawa et al., 1998
TAK1	Hanada et al., 2001 Li et al., 2003

Die PP2C-Isoenzyme sind an vielen Vorgängen in der Zelle beteiligt. Die durch den Wachstumsfaktor FGF-4 induzierbare PP2C γ /FIN13 kommt vor allem im Nukleus proliferierender Gewebe vor und ist dort an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Guthridge et al., 1997), ähnlich Wip1, die ebenfalls im Zellkern lokalisiert ist, nach ionisierender Strahlung durch p53 induziert wird und zum Wachstumsstopp der Zelle beiträgt (Fiscella et al., 1997). Für die zytoplasmatischen Enzyme PP2C α und PP2C β sind viele Substrate bekannt (vgl. Tab. 1.2-1); ihre Aktivität hat Auswirkungen auf Ionenkanäle wie CFTR, auf den Zellzyklus, auf Fett- und Neurotransmitterstoffwechsel und über die Beeinflussung stressaktivierter Apoptosesignalwege auch auf den aktiven Zelltod. Ein weiteres Substrat konnte durch Klumpp et al. identifiziert werden: das proapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bad (Klumpp et al., 2003).

1.2.4 Die Proteinphosphatase 2C, Bad und der neuronale Zelltod

Bad, der *Bcl2-antagonist of cell death*, gehört zu den proapoptotischen Bcl-2-Proteinen. Seine einzige Bcl-2-homologe Domäne, BH3, ist notwendig und hinreichend für die Heterodimerisierung mit den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-xL; Bad bildet keine Homodimere und bindet auch nicht an Bax (Yang et al., 1995; Otilie et al., 1997). Humanem Bad fehlen im Vergleich zum murinen 42 Aminosäuren am N-Terminus, seine Wirkung ist jedoch gleich (Otilie et al., 1997).

Der Mechanismus der Bad-vermittelten Apoptose wurde von vielen Gruppen untersucht (Zha et al., 1997; Datta et al., 2000; Yaffe and Elia, 2001; Masters et al., 2001): Unphosphoryliertes Bad bildet über seine BH3-Domäne einen stabilen Komplex mit Bcl-2 bzw. Bcl-xL. Dadurch sind Bcl-2 und Bcl-xL gebunden und können nicht mehr mit Bax, dem Bcl-2-assoziierten X-Protein, interagieren: Während sie normalerweise mit Bax dimerisieren und so seine proapoptotischen Eigenschaften neutralisieren, gibt es nun genügend freies Bax, das seinerseits oligomerisiert, unter anderem über Porenbildung in der Mitochondrienmembran die Freisetzung zelltodfördernder Stoffe wie Cytochrom c induziert und dadurch Apoptose vermittelt (vgl. Abb. 1.2-3; Yang et al., 1995; Bae et al., 2001).

Ist Bad aber phosphoryliert, kann es von 14-3-3-Proteinen gebunden werden und damit nicht mehr mit antiapoptotischen Verwandten dimerisieren; zudem macht eine Phosphorylierung innerhalb der BH3-Domäne (an S¹⁵⁵) die Bindung schon aus sterischen Gründen unmöglich (Datta et al., 2000; Zhou et al., 2000).

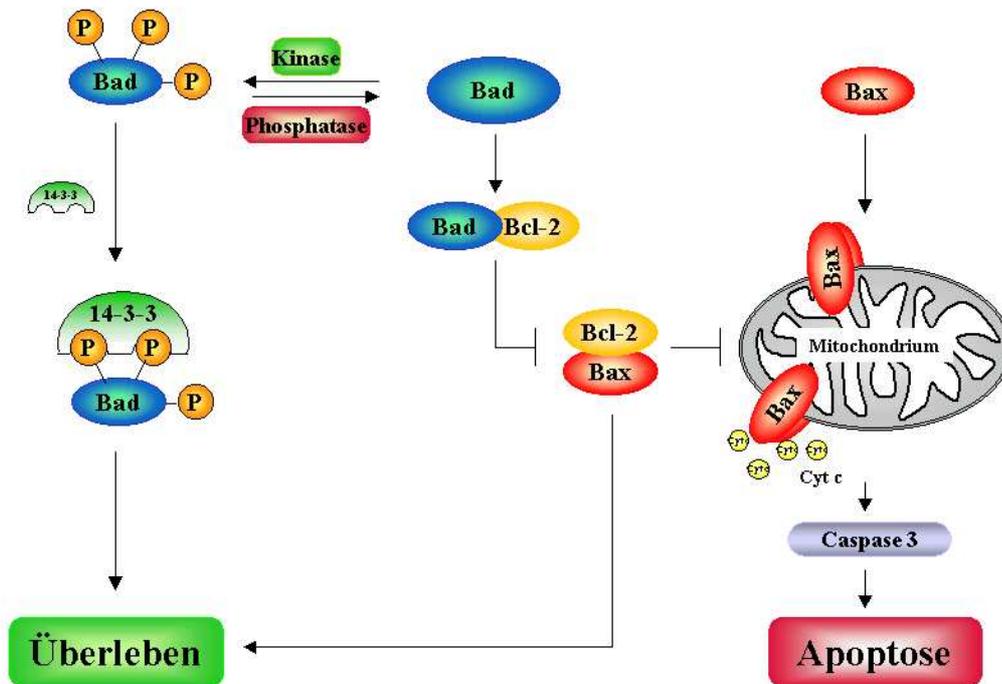


Abb. 1.2-3: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Bad und Apoptose
(Erläuterungen siehe Text)

Zum jetzigen Zeitpunkt sind sieben verschiedene Phosphorylierungsstellen von Bad bekannt; sechs davon befinden sich innerhalb von nur 58 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins (Klumpp et al., 2004; vgl. Abb. 1.2-4). Alle sind im Bad der Maus, der Ratte und, obwohl das Protein beträchtlich kürzer ist, auch in dem des Menschen enthalten; die Positionsangaben beziehen sich in der Regel auf die murine Sequenz (vgl. Tab. 1.2-2).

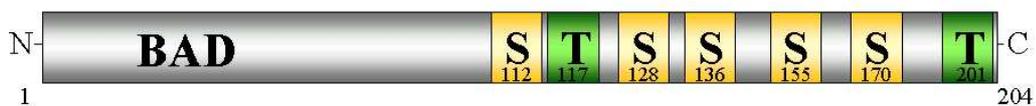


Abb. 1.2-4: Phosphorylierungsstellen von Bad
Die Nummerierung der Phosphorylierungsstellen bezieht sich auf die murine Sequenz.

Tab. 1.2-2: Vergleich der Bad-Proteine verschiedener Spezies

	SV	AA	kDa	P1 (S)	P2 (T)	P3 (S)	P4 (S)	P5 (S)	P6 (S)	BH3- Dom.
Maus	-	204	22	112	117	128	136	155	170	147-161
Ratte	2	α :205 β :220	α : 22 β : 27	113	118	129	137	156	171	148-162
Mensch	-	168	19	75	80	91	99	118	134	110-124

(SV: Spleißvarianten; AA: Aminosäuren; P: Phosphorylierungsstelle; S: Serin; T: Threonin)

Die an der reversiblen Phosphorylierung von Bad beteiligten Proteinkinasen sind vielfältig (vgl. Klumpp et al., 2004); involviert sind unter anderem PKA (Lizcano et al., 2000; Harada et al., 1999), PKB (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997), PKC (Bertolotto et al., 2000), RSK (Bonni et al., 1999; Tan et al., 1999) und JNK1 (Donovan et al., 2002).

Während Phosphorylierung von S128 die Apoptose zu fördern scheint (Donovan et al., 2002), hat sie an den übrigen Stellen in der Regel antiapoptotische Effekte (Konishi et al., 2002): Phosphoryliertes Bad wird an zytoplasmatische Proteine gebunden und ist inaktiv (Zha et al., 1996). So liegen S¹¹² und S¹³⁶ jeweils in einer Konsensussequenz für die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen (D'Agata et al., 1998). Dies sind saure, α -helikale Bindeproteine von rund 30 kDa; die sieben bekannten Isoformen besitzen recht ähnliche Sequenzen, sind in Säugerzellen reichlich vorhanden und liegen dort als Homo- oder Heterodimere vor (Aitken et al., 1995; Yaffe und Smerdon, 2001). Sie selbst besitzen keine katalytische Domäne oder Funktion (Aitken et al., 1995), verändern aber durch Bindung an Proteine wie p53 (Waterman et al., 1998) oder Cdc25 (Conklin et al., 1995) deren Aktivität und greifen so in viele zelluläre Prozesse ein – durch Komplexbildung mit phosphoryliertem Bad auch in die Apoptose. Dabei ist die Phosphorylierung an S¹³⁶ essentiell für die Bindung an 14-3-3 (Masters et al., 2001), die an S¹¹² wirkt verstärkend: Gleichzeitiges Vorhandensein von zwei möglichen 14-3-3-Bindungsstellen im gleichen Protein kann die Affinität verdreißigfachen (Yaffe et al., 1997).

Die Phosphorylierungsstelle S¹⁵⁵ liegt in der BH3-Domäne von Bad; ist sie phosphoryliert, kann Bad mit Bcl-2 oder Bcl-xL aus sterischen und elektrostatischen Gründen nicht mehr heterodimerisieren (Zhou et al., 2000). Ist Bad bereits an Bcl-2 oder Bcl-xL gebunden, kann es immer noch an S¹³⁶ phosphoryliert werden; dadurch werden 14-3-3-Proteine rekrutiert, welche wiederum die S¹⁵⁵-Bindungsstelle dem Angriff überlebensfördernder Kinasen besser zugänglich machen (Datta et al., 2000), besonders der PKA, die dort eine optimale Konsensussequenz vorfindet und S¹⁵⁵ daher besonders effektiv phosphoryliert (Lizcano et al., 2000; Zhou et al., 2000). Wenn S¹⁵⁵ phosphoryliert ist, stört das die Interaktion zwischen BH3-Domäne und der hydrophoben Bindetasche seines Partners: Die Bindung löst sich, Bcl-2 bzw. Bcl-xL kann Bax wieder neutralisieren und so die Apoptose verhindern (Datta et al., 2000; Hirai und Wang, 2001).

Phosphorylierung von Bad hemmt also die Apoptose; entsprechend wirkt die Entfernung von Phosphatresten apoptosefördernd. Diese Dephosphorylierung übernehmen eine Reihe von Serin/Threonin-Phosphatasen, darunter PP1 (Ayllón et al., 2000), PP2A (Chiang et al., 2001), PP2B (Wang et al., 1999) – und die PP2C, die pS¹¹², pS¹³⁶ und pS¹⁵⁵ dephosphorylieren kann (Klumpp et al., 2003). Der letzte Befund legt nahe, dass die PP2C über Bad-Dephosphorylierung an der Auslösung von Apoptose beteiligt sein könnte.

1.2.5 Funktionelle Analyse der PP2C

Fettsäuren können die Proteinphosphatase 2C aktivieren

Die Aktivität der Proteinphosphatase 2C ist magnesiumabhängig. Für das Erreichen der maximalen Aktivität *in vitro* werden mit 10 bis 20 mM unphysiologisch hohe Mg²⁺-Konzentrationen benötigt; dies war mit ein Grund, weshalb man die Bedeutung der PP2C *in vivo* lange unterschätzte (Tsuiki et al., 1988). Schließlich entdeckten Klumpp und Mitarbeiter, dass in Gegenwart bestimmter Fettsäuren die Aktivität der PP2C-Isoformen α und β deutlich erhöht ist und zugleich die maximale Aktivität bei wesentlich niedrigeren Mg²⁺-Konzentrationen erreicht wird (Klumpp et al., 1998).

Nur Fettsäuren mit bestimmten chemischen und strukturellen Eigenschaften aktivieren die PP2C: Sie müssen mindestens 15 Kohlenstoffatome lang sein und eine cis-konfigurierte Doppelbindung enthalten. Zusätzliche Doppelbindungen können die Aktivierung nicht weiter steigern, Verbindungen mit trans-konfigurierter Doppelbindung sind wirkungslos (Klumpp et al., 1998). Außerdem muss die Säuregruppe frei vorliegen; der entsprechende Ester aktiviert die PP2C nicht (Klumpp et al., 2001). Die Ölsäure, eine einfach ungesättigte C18-Säure, deren Doppelbindung (Δ^9) cis-konfiguriert ist, erfüllt alle geforderten Bedingungen und aktiviert sowohl die rekombinante als auch die natürliche PP2C (Klumpp et al., 1998). Für die maximale Aktivierung in Gegenwart von BSA war eine Konzentration von 500 μM notwendig, bei Verzicht auf BSA konnte sie auf 300 μM reduziert werden (Klumpp et al., 2001).

Der Fettsäureeinfluss auf die PP2C ist außerdem substratabhängig: Die Aktivität der PP2C steigt nur, wenn sie ein Protein dephosphorylieren soll; gegenüber peptidischen Substraten fehlt der Effekt oder wird die Dephosphorylierungsrate sogar verringert (Krieglstein et al., 2003).

Interessanterweise lösen Fettsäuren, die die Kriterien für die Aktivierung der PP2C erfüllen, in verschiedenen neuronalen Zellkulturmodellen Apoptose aus (Ahlemeyer et al., 2001; Klumpp et al., 2002; Grzeschik, 2003). Diese Beobachtung lässt einen Zusammenhang zwischen der PP2C-Aktivierung und der Induktion von neuronaler Apoptose vermuten; der zugrundeliegende Mechanismus ist bislang nicht gesichert, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die Dephosphorylierung von Bad dabei eine Rolle spielt (Klumpp and Krieglstein, 2002).

Ansätze zur Verringerung der Aktivität der Proteinphosphatase 2C

Bislang ist es nicht möglich, die PP2C durch Hemmstoffe selektiv auszuschalten; gängige Phosphataseinhibitoren wie Okadainsäure, Cantharidin und seine Analoga, Calyculin A oder Microcystin hemmen sie nicht (Herzig und Neumann, 2000; McCluskey et al., 2002). Da das Ausschalten der PP2C in der Maus letal ist, stehen auch entsprechende *Knockout*-Tiere nicht zur Verfügung.

Eine funktionelle Analyse der PP2C ist daher nur möglich, wenn es gelingt, das Enzym in kultivierten Zellen auszuschalten oder zumindest herunterzuregulieren. Dies kann man beispielweise durch Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden erreichen; eine neuere Methode ist die RNA-Interferenz (RNAi). Sie beruht auf dem von Fire und Mitarbeitern 1998 erstmals beschriebenen Phänomen, dass von außen in die Zelle eingeschleuste doppelsträngige RNA in diversen Organismen und Zelltypen den Abbau der komplementären mRNA verursacht, so deren Translation verhindert und damit letztlich die Menge des Zielproteins in der Zelle stark reduziert (Fire et al., 1998; Tuschl, 2001; Arenz und Schepers, 2003). Das Prinzip ist ebenso einfach wie elegant und grundsätzlich auf jede beliebige mRNA-Sequenz anwendbar – auch auf die der PP2C.

1.3 Fragestellungen

Die Deregulation der Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei vielen pathologischen Zuständen, darunter neurodegenerative Erkrankungen, Krebs und Schlaganfall.

Die Expression des Tumorsuppressors p53 ist nach globaler Ischämie in den besonders empfindlichen hippokampalen CA1-Neuronen längerfristig erhöht (McGahan et al., 1998, Gillardon et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob der p53-Inhibitor Pifithrin- α die neuronale Schädigung in einem Modell der transienten Vorderhirnischämie der Ratte zu reduzieren vermag.

Fettsäuren, die bestimmte Strukturmerkmale aufweisen, können die Proteinphosphatase 2C (PP2C) aktivieren (Klumpp et al., 1998). Die Induktion von Apoptose durch die PP2C-aktivierende Ölsäure wurde in verschiedenen neuronalen Primärkulturen gezeigt (Klumpp et al., 2002, Grzeschik, 2003); hier sollte ein entsprechendes Modell zur Schädigung humaner Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) etabliert und charakterisiert werden.

Dieses Modell sollte unter anderem der Korrelation der PP2C-Aktivierung verschiedener Fettsäuren bzw. Fettsäurederivate mit ihrer apoptoseauslösenden Wirkung dienen.

In vitro kann die PP2C das proapoptische Bcl-2-Protein Bad dephosphorylieren (Klumpp et al., 2003); hier sollte der Frage nachgegangen werden, ob dies auch in der Zelle passiert. Dazu war zunächst der Nachweis der Expression und Kolokalisation von PP2C und Bad in SH-SY5Y-Zellen zu erbringen; außerdem sollte der Effekt der ölsäurevermittelten PP2C-Aktivierung auf den Phosphorylierungszustand von zellulärem Bad untersucht werden.

Die RNA-Interferenz (RNAi) verhindert die Entstehung eines Proteins auf posttranskriptionaler Ebene; insbesondere zur Erforschung von Genfunktionen gewinnt sie mehr und mehr an Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte sie für den *Knockdown* der PP2C-Isoformen α und β in SH-SY5Y-Zellen etabliert werden; mangels spezifischer und effektiver Inhibitoren war die Reduktion der PP2C-Menge in der Zelle die einzige Möglichkeit, ihren Einfluss zu reduzieren bzw. auszuschalten.

Die Ölsäurebehandlung der RNAi-Zellen sollte schließlich darüber Aufschluss geben, ob die PP2C in der ölsäureinduzierten Apoptose tatsächlich eine Rolle spielt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verwendet:

- a) männliche Wistar-Ratten (Körpergewicht: 250-300g; Charles-River, Sulzfeld) für die globale Ischämie und
- b) tragende Sprague-Dawley-Ratten (Charles-River, Sulzfeld) für die Entnahme von Embryonen (E18) zur Anlage von kortikalen Primärkulturen.

Alle Ratten wurden in einem klimatisierten Tierstall unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $23 \pm 1^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchte $55 \pm 5\%$, zwölfstündiger Hell-Dunkel Rhythmus) gehalten und hatten freien Zugang zu Standardfutter (Altromin[®], Lage) und Trinkwasser. Hiervon ausgenommen waren lediglich die Ratten, die für die globale Ischämie verwendet wurden: Sie erhielten bei ansonsten gleichen Bedingungen in den letzten zwölf Stunden vor dem Versuch kein Futter.

Die Gewinnung der Primärkulturen sowie die Durchführung der transienten globalen Ischämie geschahen unter Beachtung des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland und der Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen. Es wurde darauf geachtet, dass die Beeinträchtigung der Tiere möglichst gering war.

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Gibco, Eggenstein
Amersham ECL Kit	Amersham, Buckinghamshire, England
Amino- ϵ -capronsäure	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Gatersleben
Antibiotika-Lösung (Penicillin/Streptomycin)	Gibco, Eggenstein
B27-Supplement	Gibco, Eggenstein
Bepanthen® Augensalbe	Roche, Grenzach-Wyhlen
Blue/Orange Loading Dye 6 \times	Promega, Heidelberg
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA-Standard	Sigma, Taufkirchen
Calpaininhibitor	Sigma, Taufkirchen
dATP 100 mM	Promega, Heidelberg
dCTP 100 mM	Promega, Heidelberg
dGTP 100 mM	Promega, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$	Sigma, Taufkirchen
DNA-Größenstandard	Promega, Heidelberg
dTTP 100 mM	Promega, Heidelberg
EDTA	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Elaidinsäure	Sigma, Taufkirchen
Ethanol 96%	Lenz Chemie, Westerburg
Ethanol 96% (unvergällt)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix	ABgene, Epsom (UK)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Marburg

Fluothane	Zeneca GmbH, Frankfurt/Main
Formalin	Merck, Darmstadt
GBX Developer/Replenisher	Sigma, Taufkirchen
GBX Fixer/Replenisher	Eastman Kodak, New York, USA
Gentamicinsulfat	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Sigma, Taufkirchen
Ham's F12	Gibco, Eggenstein
Heparin	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Riedl de Haen, Seelze
Kaliumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Kresylechtviolett	Merck, Darmstadt
Lachgas	Messer-Grießheim, Siegen
L-Glutamin	Sigma, Taufkirchen
Linolsäure	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumsulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$	Sigma, Taufkirchen
Medizinischer Sauerstoff	Messer-Grießheim, Siegen
MEM (mit Earle's Salzen, ohne Glutamin/ Natriumhydrogencarbonat)	Gibco, Eggenstein
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl_2	Merck, Darmstadt
MgCl_2 (25 mM)	Advanced Biotechnologies, Hamburg
MicroBCA Protein Assay System	Interchim, Montlucon, Frankreich
Natirumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Riedl de Haen, Seelze
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Taufkirchen

Natriumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Sigma, Taufkirchen
Natriumtetraborat	Sigma, Taufkirchen
Neurobasal [®] Medium	Gibco, Eggenstein
Nilblau A	Sigma, Taufkirchen
Oligo-dT-Primer	MWG Biotech, Freiburg
Oligofectamine [®]	Gibco, Eggenstein
Oligonukleotide	Qiagen, Heidelberg
Ölsäure	Sigma, Taufkirchen
Ölsäuremethylester	Sigma, Taufkirchen
OptiMEM [®]	Gibco, Eggenstein
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
PCR-Primer	MWG Biotech, Freiburg
Pferdeserum	PAA, Marburg
Phosphataseinhibitor-Cocktail I und II	Sigma, Taufkirchen
Pifithrin- α -hydrobromid	Tocris über BIOTREND, Köln
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenamin	Sigma, Taufkirchen
Poly-L-lysin	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
RNase-Inhibitor	Promega, Heidelberg
RNeasy-Kit	Qiagen, Heidelberg
Rotihistol	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese [®] 30 (30 % Acrylamid) Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma, Taufkirchen
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen
Stearinsäure	Merck, Darmstadt
Sterilium [®]	Bode Chemie, Hamburg
Suxamethoniumchlorid	ASTA, Frankfurt/Main
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Transkriptionspuffer 10 \times	Boehringer-Mannheim, Mannheim
Trichloressigsäure	Sigma, Taufkirchen

Trimethaphancamsylat	Hoffmann-La Roche, Basel
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton [®] X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Trypsin 1:250, aus Schweinepankreas	Sigma, Taufkirchen
Trypsininhibitor Type II-O	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Vectastasin ABC Kit (mit Peroxidase)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma, Taufkirchen
Xylocain-Gel [®] 2%	Astra, Wedel
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	PAA, Marburg

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Cellstar [®] Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Chirurgischer Faden	Ethicon, Norderstedt
Corning [®] Sterilfilter (0,22 µm)	Corning, New York, USA
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser, 24 mm ø	Kobe, Marburg
Einmalspritzen	Transcoject, Neumünster
Falcon [®] Zellkulturflaschen	Fisher Scientific, Schwerte
Fixierschrauben	Hülden, Düren
Hybond Nitrocellulosemembran	Amersham, Buckinghamshire, England
Kanülen	Servoprax, Wesel
Kodak X-OMAT AR Film	Eastman Kodak, New York, USA
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotiterplatte Nunc-Immuno [™]	Nunc, Roskilde, Dänemark
Millex [®] Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore, Bedford, USA
Objektträger, 76 x 26 mm	IDL, Nidderau
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturschalen (Ø 35 bzw. 60mm), Multiwells 24er	Fisher Scientific, Schwerte

2.1.4 Antikörper

Tab. 2.1-1: Erstantikörper

α-Tubulin	monoklonal	Maus	Sigma, Taufkirchen
Bad	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, USA
Bad	monoklonal	Maus	Cell Signaling, Beverly, USA
Caspase-3	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, USA
phosphoBad-112	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, USA
phosphoBad-136	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, USA
phosphoBad-155	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, USA
PP2Cα	polyklonal	Kaninchen	AG Klumpp, Münster
PP2Cβ2	polyklonal	Kaninchen	AG Klumpp, Münster

Tab. 2.1-2: Zweitantikörper

anti-Kaninchen IgG HRP-konj.	Esel	Amersham, Braunschweig
anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	Ziege	Vector Labs., Burlingame, USA
anti-Maus IgG HRP-konj.	Schaf	Amersham, Braunschweig
anti-Maus IgG, biotinyliert	Pferd	Vector Labs., Burlingame, USA
Texas Red[®] anti-Kaninchen IgG	Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Texas Red[®] anti-Maus IgG	Pferd	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

2.1.5 Geräte

Autoklav	HICLAVE HV-110 L, HMC, Tokio, Japan
Beatmungspumpe	Rhema Labortechnik, Hofheim
Blottingapparatur	Biometra, Göttingen
Blutdruckmessung	Hellige Recomed, Hellige, Freiburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 150	Zeiss, Jena
Halothanverdampfer	Vapor Halothan; Drägerwerk, Lübeck
Hitzesterilisator	TV 40 UT, Memmert, Emmerdingen
Konfokales Laserscanning-Mikroskop	LSM 510; Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge	Microfuge [®] R Centrifuge, Beckman
Lichtmikroskop	Olympus [®] OM-4Ti; Olympus, Tokio, Japan
PCR-Gerät	PCR-Sprint, Hybaid, Heidelberg

pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Photometer	BioMate3, ThermoSpectronic, Dreieich
Pumpe	Laboport, KNF Neuberger, Freiburg
Reinstwasser-Anlage	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg
Schwanenhalslampe	KL1500, Schott, Mainz
Spannungsquelle	Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia, Freiburg
Temperaturkontrolle	TempControl 2203, TSE Systems, Bad Homburg
Ultraschallgerät	Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Waagen	BL3100, Sartorius, Göttingen P163, Mettler-Toledo, Giessen
Werkbänke	Envirco C424 H, Ceag Schirp, Borken; Lamin Air ELB 2448, Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Sepatech Biofuge 13, Heraeus Hanau

2.1.6 Software

Zeiss LSM Image Browser 3.2	Zeiss, Jena
WinSTAT	Microsoft
Microsoft Excel	Microsoft

2.2 Transiente Vorderhirnischämie der Ratte

2.2.1 Durchführung der transienten Vorderhirnischämie der Ratte

Für die Erzeugung einer reversiblen globalen Hirnischämie bei der Ratte wurde das 2-VO-Modell (*2-vessel occlusion*; 2-Gefäßverschlussmodell) nach Smith et al. (1984) verwendet, modifiziert nach Sauer (1987) und Schaper (1999).

Männliche Wistar-Ratten (250-300 g) wurden über eine Atemmaske mit 2% Halothan in Stickoxydul/Sauerstoff (70:30 (V/V)) narkotisiert; der Narkoseeintritt wurde durch Reflexprüfung (Zwicken der Hinterpfote) sichergestellt. Im Operationsgebiet wurde das Fell mit einem Einmalrasierer entfernt. Bepanthen® Augen- und Nasensalbe sollte das Austrocknen der Cornea verhindern.

Während der Ischämie wurden Gehirn- und Körpertemperatur unabhängig voneinander bei 37°C gehalten. Hierbei wurde die Körpertemperatur rektal gemessen und über rückgekoppeltes Heizsystem durch einen beheizbaren OP-Tisch aufrechterhalten.

Ein Schnitt in die Schädelhaut der Ratte ermöglichte das Anbringen eines Temperaturfühlers zwischen Haut und Schädelknochen; er steuerte eine Rotlichtlampe, die ihrerseits bei Bedarf den Schädel erwärmte und so die Gehirntemperatur konstant hielt.

Zur Blutdruckmessung wurde die Schwanzwurzelarterie freipräpariert, distal abgebunden und mit einem Polyethylen Schlauch (0,5/1mm) katheterisiert. Über einen Dreiweghahn wurde der Katheter mit einer 1 ml-Spritze und einem Druckaufnehmer verbunden. Mit der Spritze wurden 0,2 ml einer Heparinlösung (1% Heparin in physiologischer Kochsalzlösung) verabreicht, um die Blutgerinnung zu vermeiden.

Neben der Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks (in mmHg) erfolgte auch die Entnahme von Blutproben fünf Minuten nach Ende der Ischämie über diesen Katheter. Anhand dieser Proben wurden mit einem Blutgasanalysator die Partialdrücke von Sauerstoff und Kohlendioxid sowie der pH-Wert bestimmt.

Außerdem wurde der Halsbereich der Ratte eröffnet, die rechte Vena jugularis freipräpariert, distal abgebunden und proximal mit einer Mikroklemme abgeklemmt. Durch einen Einschnitt in das Gefäß wurde ein weicher, flexibler

Silikonschlauch (0,5/1,3 mm) eingeführt und bis zur Vena cava superior vorgeschoben. Mit Hilfe einer 10 ml-Spritze wurden nun zur Vermeidung der Blutgerinnung über diesen Katheter 0,75 ml Heparinlösung infundiert.

Anschließend wurden die Arteriae communis freipräpariert, wobei besonders darauf geachtet wurde, den anliegenden Nervus vagus nicht zu verletzen. Beide Arterien wurden mit einem Faden locker umschlungen, ohne den Blutfluss zu beeinträchtigen. Danach wurde die Trachea stumpf freigelegt und mit Hilfe eines Führungsdrahtes mit einem Polyethylenschlauch (1,57/2,08 mm) intubiert. Dieser Tubus wurde an eine Kleintierbeatmungspumpe angeschlossen und das Atemvolumen auf 2,5 – 3,2 ml, die Atemfrequenz auf etwa 50 pro Minute eingestellt.

Sofort nach der Intubation wurde die Halothanzufuhr beendet und das Tier über den Katheter der Vena jugularis mit einer Suxamethoniumchloridlösung (5mg/kg) muskelrelaxiert.

Auf gleichem Wege wurde dann Trimetaphancamsylat (5 mg/kg) verabreicht; die Substanz senkte den Blutdruck der Ratte auf etwa 60-80 mmHg. Arterienklemmen an beiden Carotiden unterbrachen den Blutfluss zum Gehirn. Durch Blutentnahme mit einer Spritze über den Jugularisvenenkatheter und Reinfusion soweit nötig wurde der Blutdruck über einen Zeitraum von zehn Minuten bei 40 mmHg gehalten; dies sollte sicherstellen, dass das Gehirn nicht trotz abgeklemmter Carotiden über Kollateralen doch noch mit Blut versorgt wurde.

Nach der Ischämie wurden die Arterienklemmen entfernt und das entnommene Blut rasch reinfundiert. Anschließend Applikation von 0,5 ml einer 0,6 M Natriumbicarbonatlösung sollte einer systemischen Azidose vorbeugen. Abschließend wurden die Katheter entfernt, die jeweiligen Gefäße abgebunden, die Wunden vernäht und mit Xylocain®-Gel versorgt. Die Tiere wurden so lange mit Lachgas/Sauerstoff weiterbeatmet, bis die Spontanatmung einsetzte. Nach der Extubation wurden sie zwei Stunden lang unter einer Wärmelampe bei einer Umgebungstemperatur von 30°C gehalten und anschließend in den Tierstall gebracht.

2.2.2 Arzneistoffgabe

Für die Untersuchung des Einflusses von p53-Inhibitoren auf die Folgen der transienten Vorderhirnischämie wurden die Tiere vor dem Eingriff mit Pifithrin- α behandelt.

Die Dosierung orientierte sich am Körpergewicht der Tiere und betrug 2 mg/kg, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung mit 0,5% DMSO; Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Menge Vehikel. In beiden Fällen erfolgte die Verabreichung intraperitoneal, eine Stunde vor der Ischämie.

Physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)

NaCl	9 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

2.2.3 Perfusion der Ratten

Sieben Tage nach der Ischämie wurde den Ratten in tiefer Halothannarkose der Brustraum geöffnet und das Herz freigelegt. Durch einen Schnitt in die linke Herzkammer wurde ein Metallkatheter eingeführt, bis zur Aorta vorgeschoben und mit einer Aortenklemme in dieser Position fixiert. Ein weiterer Schnitt in die rechte Herzkammer verbesserte den Abfluss von Blut und Perfusionslösungen.

Mit Hilfe einer Perfusionspumpe wurden nun mit einer Flussrate von etwa 50 ml/min nacheinander je 250 ml kalter physiologischer Kochsalzlösung und Formaldehydlösung 4% perfundiert.

Physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) (→ 2.2.2)

Formaldehydlösung 4%

NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O	9,39 g
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	71,20 g
Formaldehyd	500 ml
Aqua dest.	ad 5000 ml

2.2.4 Entnahme der Gehirne

Nach der Perfusion wurden die Ratten mit Hilfe einer Guillotine dekapitiert, das Fell oberhalb der Fissura longitudinalis eingeschnitten und vom Schädel abgezogen.

Mit einer Schere wurde die Schädelkalotte bis zum Bregma aufgetrennt, die Knochen der Hemisphären abgenommen und die Dura mittels einer chirurgischen Pinzette entfernt. Die Gehirne wurden dann mit einem Spatel herausgehoben und in Formaldehydlösung überführt, wo sie bis zur weiteren Aufarbeitung verblieben.

2.2.5 Aufarbeitung formalinfixierter Rattengehirne

Bei der Weiterverarbeitung der in Formalin konservierten Gehirne wurde zunächst das Gewebe 1-2 Stunden unter fließendem Wasser ausgewaschen. Anschließend wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Toluol lipophilisiert, bevor die Gehirne in Metallrähmchen mit 60°C warmem Paraplast ausgegossen wurden. Bei Raumtemperatur erstarrte das Paraplast wieder. Aus diesen Blöcken konnten dann Schnitte von 8 µm Dicke für die histologische Auswertung angefertigt werden. Sie wurden zur Glättung in ein heißes Wasserbad gelegt und schließlich auf Objektträger aufgezogen.

2.2.6 Histologische Färbung der Gehirnschnitte

Die quantitative Auswertung erfolgte im CA1-Band des Hippocampus nach Cölestinblau/Säurefuchsinfärbung.

Dazu wurden die Schnitte zunächst mit Rotihistol (3 × 5 min) und einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 80%, 70%; jeweils 5 Minuten) entparaffinisiert. Dann wurden sie in Cölestinblau-Lösung getaucht, mit Aqua dest. kurz gespült und für 5-10 min in ein Säurefuchsinbad gegeben. Nachdem die Schnitte eine kurze Behandlung in Eisessig, eine aufsteigende Alkoholreihe und ein fünfminütiges Rotihistolbad absolviert hatten, wurden sie mit Corbit-Balsam und einem Deckgläschen versehen.

Durch diese Färbung erschienen geschädigte Neurone stark geschrumpft; sie waren durch Säurefuchsin intensiv rot gefärbt. Gesunde Neurone wurden durch Cölestinblau schwach bläulich gegengefärbt.

Cölestinblau-Lösung 1%

Cölestinblau	1,0 g
Ammoniumeisen(II)-sulfat	1,0 g
Salzsäure konz.	0,5 ml
Aqua dest.	ad 100,0 ml

Säurefuchsinlösung 1%

Säurefuchsin	1,0 g
Aqua dest.	ad 100,0 ml

2.2.7 Bestimmung des ischämischen Schadens

Um das Ausmaß der Schädigung im CA1-Band des Hippocampus zu bestimmen, wurden die gefärbten Schnitte mit Hilfe eines Mikroskops bei 160-facher Vergrößerung ausgewertet. Geschädigte und gesunde Neurone des CA1-Bandes wurden gezählt, die Schädigung von linker und rechter Hemisphäre jeden Gehirns arithmetisch gemittelt und schließlich als prozentualer Anteil geschädigter Neurone angegeben.

2.3 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur

Die Vorbereitung der Kulturgefäße, Herstellung der sterilen Kulturmedien und Lösungen, Präparation der embryonalen kortikalen Primärkultur, Pflege der Zelllinien sowie die Behandlung der Zellkulturen erfolgten in sterilen Werkbänken mit laminar horizontaler oder vertikaler Luftführung.

Glasgeräte wurden vor Gebrauch in einem Trockenschrank für zwei Stunden bei 180°C hitzesterilisiert, Wasser, Schraubdeckel für Flaschen sowie Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipetten bei 121°C und 2 bar 60 min autoklaviert. Wässrige Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt und anschließend sterilfiltriert.

Zellkulturmedien wurden vor ihrer Verwendung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Kultivierung der Primärkulturen wie auch der Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C/5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 bis 95 %.

2.4 Präparation und Kultivierung von embryonalen kortikalen Rattenneuronen

Anlage und Kultivierung der embryonalen kortikalen Rattenneurone erfolgte nach einer modifizierten Methode von Mattson et al. (1993).

2.4.1 Vorbereitung der Kulturschalen

Um die Haftung der Zellen auf den Kulturschalen zu verbessern, wurden diese am Tag vor der Präparation mit einer PEI-(Polyethylenimin)-Lösung beschichtet. Nach zweistündiger Inkubation der Schalen mit jeweils 1 ml (Ø 35 mm) bzw. 2 ml (Ø 60 mm) wurden sie dreimal mit je 1,5 bis 2 ml sterilem Aqua dest. gespült. Die Sterilisation der geöffneten Schalen erfolgte in einer entsprechenden Werkbank durch dreißigminütige Bestrahlung mit UV-Licht.

Die Schalen wurden anschließend mit 1 ml (\varnothing 35 mm) bzw. 2 ml (\varnothing 60 mm) MEM+ befüllt und bis zur Präparation bei 5 % CO₂/37°C und 90-95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Boratpuffer

Borsäure	1,24 g
Natriumtetraborat	1,90 g
H ₂ O	ad 400,0 ml
pH 8,4 (eingestellt mit NaOH)	

PEI 5 %

PEI (50 %) 1:10 mit H₂O verdünnen

PEI-Beschichtungslösung

PEI 5 %	0,4 ml
Boratpuffer	ad 400,0 ml

2.4.2 Präparation embryonaler kortikaler Rattenneurone

Alle Schritte der Präparation erfolgten in einer sterilen Werkbank. Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert; Trypsin und Trypsininhibitor, die Instrumente, die Stereolupe sowie verwendete Kulturschalen wurden kurz vor der Präparation zur Sterilisation 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

Sprague-Dawley-Ratten, Gestationstag 18, wurden in tiefer Halothannarkose durch Genickbruch getötet. Das Abdomen wurde geöffnet und der Uterus samt Inhalt entnommen. Anschließend wurden die Embryonen dekapitiert, der Schädel mit einer Schere geöffnet, das Gehirn mittels Schere und Pinzette vorsichtig herauspräpariert und schließlich in kaltes HBSS überführt.

Die Cortices wurden unter einer Stereolupe freipräpariert und 15 min mit einer Trypsinlösung (1 mg/ml in HBSS) inkubiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Spülen mit 10 ml HBSS wurden die Cortices mit einer Trypsininhibitor-Lösung (1 mg/ml in HBSS) behandelt, zweimal mit je 10 ml HBSS gewaschen und schließlich in einem Volumen von 4 ml HBSS mit Hilfe einer Glaspipette etwa 20× trituriert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde mit HBSS auf ein der Zahl der eingesetzten Gehirne entsprechendes Volumen

eingestellt (0,4 ml pro Gehirn). Danach wurde die Suspension in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt, 1:2 mit HBSS verdünnt und bei 1000 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in frischem HBSS resuspendiert und anschließend 1:2 mit MEM+ verdünnt.

Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde dann die Zellzahl pro Milliliter ermittelt, bevor die Zellen mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/cm² in PEI-beschichtete und mit MEM+ gefüllte Kulturschalen ausgesät wurden. Fünf Stunden später erfolgte nach kurzem Spülen der Zellen mit Neurobasal pH 7,2 ein Medienwechsel von MEM+ auf Neurobasal pH 7,2. Bis zur Verwendung wurden die Neurone bei 5% CO₂/ 37°C im Brutschrank inkubiert, mit einem Medienwechsel am 5. Kulturtag.

HBSS 10x

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

HBSS 1x

Gentamicinsulfat	5,0 mg
HEPES	1,2 g
HBSS 10x	50,0 ml
H ₂ O	ad 500 ml
pH 7,2 (eingestellt mit HCl)	

Minimal Essential Medium pH 7,2 (MEM+)

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

Neurobasalmedium pH 7,2

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

2.5 Kultivierung humaner Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)

2.5.1 Charakterisierung der SH-SY5Y-Zellen

Bei den SH-SY5Y-Zellen handelt es sich um einen stabilen Subklon der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH, die 1970 aus einem Tumor einer vierjährigen Patientin gewonnen wurde (Biedler et al., 1973). Sowohl Ursprungslinie als auch Subklon besitzen einen charakteristischen Marker: Chromosom 1 hat eine zusätzliche Kopie von 1q, d.h. es liegt eine Trisomie 1q vor.

SH-SY5Y-Zellen haben eine Verdopplungszeit von durchschnittlich etwa 48 Stunden. Sie wachsen adhärent als polygonale Zellen mit kleinen Ausläufern, neigen allerdings zur Bildung von Aggregaten: Die Zellen bilden Klumpen und lösen sich vom Kulturgefäß.

2.5.2 Kultivieren von humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)

SH-SY5Y-Zellen wurden in serumhaltigem Ham's F12/MEM in Falcon® Zellkulturflaschen (250 ml, 75 cm²) kultiviert. Verbrauchtes Medium wurde alle 2-3 Tage durch frisches ersetzt.

Waren die Zellen konfluent, wurden sie im Verhältnis 1:3 oder 1:4 gesplittet: Nach Waschen mit serumfreiem Ham's F12/MEM wurden sie fünf Minuten lang bei 37°C mit 3-4 ml einer Trypsinlösung inkubiert. Zugabe von 5 ml serumhaltigem Kulturmedium stoppte die Reaktion. Anschließend wurden die Zellen gesammelt und bei 800 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und diese Zellsuspension auf mit jeweils 10 ml Medium befüllte Kulturflaschen verteilt.

Die Kryokonservierung der Zellen folgte im wesentlichen dem gleichen Protokoll; für die Resuspendierung wurde frisch hergestelltes Einfriermedium verwendet. Nach der Trituration wurden die Zellen in Kryoröhrchen gegeben und diese in Watte verpackt bei -80°C eingefroren; die Polsterung sorgte für zellschonendes langsames Herunterkühlen. Nach einigen Tagen wurden die Röhrchen zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurde das Röhrchen direkt ins 37°C warme Wasserbad gestellt und die Zellen anschließend möglichst schnell in eine Kulturflasche mit 10 ml Medium überführt. Um DMSO-Reste zu entfernen wurde das Medium am folgenden Tag gewechselt.

Ham's F12/MEM (serumhaltig)

HAM's F12	250 ml
MEM (mit Earl's Salzen und Glutamat)	250 ml
FCS	50 ml
Non-essential AA	6 ml
Pen/Strep	2 ml

Ham's F12/MEM (serumfrei)

HAM's F12	250 ml
MEM (mit Earl's Salzen und Glutamat)	250 ml
Non-essential AA	6 ml
Pen/Strep	2 ml

Trypsinlösung

Trypsin	100 mg
Na-EDTA	20 mg
Ham's F12/MEM serumfrei	ad 100 ml

Einfriermedium

FCS	1 ml
DMSO	1 ml
Ham's F12/MEM serumhaltig	ad 10 ml

2.5.3 Differenzieren der SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden in Anlehnung an das Protokoll von Tieu et al., 1999, mit Staurosporin differenziert. Dazu wurden nach dem Splitten 5×10^4 Zellen pro cm^2 in mit Poly-L-lysin beschichtete und mit 2 ml serumhaltigem Kulturmedium befüllte Kulturschalen ausgesät.

Am folgenden Tag wurden $30 \mu\text{l}$ einer $2 \mu\text{M}$ Staurosporinlösung zugegeben; die Endkonzentration an Staurosporin betrug damit 30 nM .

2.5.4 Beschichtung mit Poly-L-lysin

SH-SY5Y-Zellen neigen dazu, Cluster zu bilden und sich vom Kulturgefäß abzulösen. Bei der normalen Kultivierung der Zelllinie spielt das eine untergeordnete Rolle, sodass die hierzu verwendeten Kulturflaschen nicht speziell vorbehandelt werden mussten. Für die Verwendung in Zellkulturexperimenten wurden die Schalen allerdings mit Poly-L-lysin beschichtet: Geschädigte Zellen zeigen besonders starke Ablösung, und dieses Phänomen erschwert die Auswertung. Auch für die Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen wurden beschichtete Schalen verwendet, um den Ausläufern der Zellen das Anhaften zu erleichtern.

Für die Beschichtung wurde eine Poly-L-lysin-Lösung mit einer 60 ml-Spritze in die Kulturschalen sterilfiltriert (\varnothing 35mm: 1,5 ml) und diese dann 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zwei Mal mit sterilem Aqua dest. gespült, in jede Schale 1,5 ml steriles Aqua dest. gegeben und für mindestens sechs Stunden bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde erneut gespült, alle Flüssigkeit gründlich abgesaugt und die Schalen verschlossen bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Kurz vor Gebrauch wurden die geöffneten Schalen in einer sterilen Werkbank 20 Minuten mit UV bestrahlt, um eventuell vorhandene Keime abzutöten.

Borsäurelösung 1,25%

Borsäure	1,25 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Boraxlösung 1,91%

Natriumtetraborat	1,91 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Poly-L-lysin-Lösung

Poly-L-lysin (MG 300 000-700 000)	1 mg
Borsäurelösung 1,25%	5 ml
Boraxlösung 1,91%	5 ml

2.6 Apoptoseinduktion und Detektion

2.6.1 Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen und kortikalen Neuronen

Bei der Ölsäure handelt es sich um eine einfach ungesättigte Fettsäure (18:1, cis- Δ^9), die recht licht- und oxidationsempfindlich ist. Um Qualitätsverluste zu minimieren, wurde die Substanz aliquotiert und bei -20°C unter einer N_2/CO_2 -Mischung gelagert.

Für jede Behandlung wurde eine frische Portion zu 31,68 μl (entsprechend 100 μmol Substanz) aufgetaut; nicht verwendete Ölsäure wurde hinterher verworfen.

Da Ölsäure sehr lipophil und damit im wässrigen Kulturmedium nur wenig löslich ist, wurde DMSO als Lösungsvermittler eingesetzt: Das Aliquot wurde mit DMSO ad 1 ml verdünnt und mit Hilfe eines Vortexers gründlich gemischt; es resultierte eine 100 mM-Stammlösung.

Für die Behandlung der SH-SY5Y-Zellen wurde diese Stammlösung sofort mit serumfreiem Ham's F12/MEM zur gewünschten Konzentration verdünnt; bei einer Standardkonzentration von 150 μM entsprach das 1,5 μl pro Milliliter Medium. Erneut wurde gründlich gemischt, um eine möglichst homogene Verteilung der Ölsäure im Medium zu erreichen.

Die Kulturen, die mindestens 80% Konfluenz erreicht hatten, wurden zunächst mit serumfreiem Medium gespült; so wurden Serumreste entfernt, die ansonsten die Wirkung der Ölsäure beeinträchtigt hätten. Anschließend wurde das vorbereitete Behandlungsmedium auf die Zellen gegeben und alles im

Brutschrank inkubiert. Nach Ende des Versuchs wurden die Zellen entweder mit Paraformaldehyd fixiert und gefärbt oder mit Lysispuffer für den Western Blot geerntet.

Die Ölsäurebehandlung der kortikalen Primärkulturen folgte derjenigen der SH-SY5Y-Zellen. Kulturmedium war hier Neurobasalmedium, das für diesen Zweck keinen Zusatz von B27-Zusatz enthalten durfte. Verwendet wurden in allen Fällen Neurone vom Kulturtag 7.

Ham's F12/MEM serumfrei (→ 2.5.2)

Neurobasalmedium ohne B27-Zusatz

HEPES	0,5725 g
Glutamin	0,0880 g
Gentamicinsulfat	0,0125 g
Neurobasal®	500 ml

2.6.2 Behandlung mit weiteren Fettsäuren und Fettsäureestern

Neben der Ölsäure (18:1, cis- Δ^9), wurden auch Stearinsäure (18:0), Elaidinsäure (18:1, trans- Δ^9), Linolsäure (18:2, cis- Δ^9 /cis- Δ^{12}) sowie der Methylester der Ölsäure zur Behandlung von SH-SY5Y-Zellen sowie von embryonalen kortikalen Neuronen verwendet. In allen Fällen wurde wie bei der Ölsäurebehandlung verfahren: 100 μ mol der bei -20°C gelagerten Substanz wurden in DMSO ad 1 ml gelöst, in Kulturmedium ohne Serum bzw. B27 der Zielkonzentration entsprechend verdünnt und auf die mit serumfreiem Medium gespülten Zellen gegeben.

2.6.3 Staurosporinbehandlung von SH-SY5Y-Zellen

Staurosporin (STS) ist ein nicht-selektiver Proteinkinase-Inhibitor (Herbert et al., 1990) aus *Streptomyces* spp. (Omura et al., 1977). Der Stoff ist zytotoxisch und löst in vielen Zelllinien und Primärkulturen Apoptose aus (Tamaoki et al., 1986). In geringen Konzentrationen kann Staurosporin zur Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen verwendet werden (Jalava et al., 1992). Zur längerfristigen

Lagerung wurde Staurosporin als 1mM Stammlösung in DMSO in 20 µl-Portionen bei -20°C aufbewahrt. Vor der Behandlung der Zellen wurde jeweils ein frisch aufgetautes Aliquot 1:100 mit Kulturmedium verdünnt, und dieser Ansatz dann der gewünschten Endkonzentration entsprechend in die Kulturschalen gegeben; bei z.B. einer Zielkonzentration von 200 nM und 1 ml Medium in der Schale waren das 2 µl. Nach Behandlungsende wurden die Zellen formalinfixiert und apoptotische Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt.

2.6.4 Bestimmung der Apoptose mit Hoechst 33258

Hoechst 33258 (Abb. 2.6-1) ist ein lipophiler kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der die Zellmembran von intakten wie geschädigten Zellen durchdringt und im Zellkern an AT-reiche Sequenzen der DNA bindet (Araki et al., 1985; Latt und Stetten, 1976; Latt und Wohlleb, 1975). Ergebnis ist eine blaue Färbung des Nukleus, zu beobachten unter dem Fluoreszenzmikroskop (Exzitationsmaximum 352 nm, Emissionsmaximum 461 nm). Apoptotische Zellen besitzen einen geschrumpften oder fragmentierten Zellkern mit kondensiertem Chromatin und weisen eine weit stärkere Fluoreszenz auf als gesunde mit einem intakten Nukleus, was sie leicht unterscheidbar macht.

Zur Färbung mit Hoechst 33258 wurden die behandelten Kulturen mit kaltem PBS gewaschen und 30 Minuten mit Paraformaldehydlösung 4% fixiert. Danach wurden die Zellen mit einer Lösung von Hoechst 33258 in Methanol (10 µg/ml) bedeckt bei Raumtemperatur für weitere 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurde nochmals mit PBS gewaschen, bevor die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und ausgezählt werden konnten.

Zur Ermittlung des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen wurden pro Kulturschale mehrere Stellen mit insgesamt mindestens 200 Zellkernen ausgezählt.

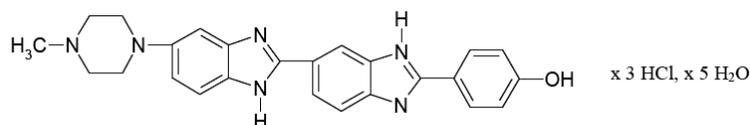


Abb. 2.6-1: Strukturformel des Kernfarbstoffs Hoechst 33258

PBS

KH ₂ PO ₄	0,144 g
Na ₂ HPO ₄	0,526 g
NaCl	9,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Paraformaldehydlösung 4%

Paraformaldehyd	20 g
Aqua dest.	500 ml

2.6.5 Nilblaufärbung zur Detektion von Lipiden in der Zelle

Nilblau A ist ein Gemisch aus einem roten Oxazon, das neutrale Lipide anfärbt, und einem blauen, basischen Oxazin, das mit Phospholipiden und freien Fettsäuren interagiert. Der Farbstoff kann zur Lokalisierung und Quantifizierung von Lipiden in der Zelle verwendet werden (Dunningham, 1968; Ostle und Holt, 1982); die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop.

Die Zellen wurden nach Ende der Fettsäurebehandlung 30 Minuten mit Paraformaldehyd 4% fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend für weitere 60 Minuten mit der Nilblaulösung inkubiert. Nach erneutem gründlichen Waschen mit PBS konnten die Zellen mit dem Mikroskop angesehen werden; es wurden jeweils repräsentative Aufnahmen gemacht.

Paraformaldehydlösung 4% → 2.6.4

Nilblaulösung

Nilblau	1 mg
PBS	100 ml

2.7 Aufschluss von Zellen für das Western Blotting

2.7.1 Proteinextraktion aus Zellen

Die Extraktion der Proteine aus SH-SY5Y-Zellen sowie aus embryonalen kortikalen Neuronen erfolgte nach Spülen der Schalen mit eiskaltem PBS; die Zellen wurden mit Lysispuffer versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers in Eppendorfgefäßen gesammelt.

Die Proben wurden durch Behandlung mit Ultraschall homogenisiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Lysispuffer mit SDS (für Western Blotting)

Glycerol 1,0 ml	1,0 ml
SDS 10%	3,0 ml
Tris pH 6,8 0,5 M	2,5 ml
Aqua dest.	2,5 ml
PMSF 1 M	10,0 µl
Trypsininhibitor 5 mg/ml	14,0 µl
Calpaininhibitor I 10 µM	100,0 µl

Lysispuffer (für die Immunpräzipitation)

Phosphataseinhibitor-Cocktail I	50 µl
Phosphataseinhibitor-Cocktail II	50 µl
PMSF 1 M	5 µl
Trypsininhibitor 5 mg/ml	8 µl
Calpaininhibitor I 10 µM	50 µl
PBS	5 ml

Phosphataseinhibitor-Cocktail I enthält Cantharidin, Bromotetramisol und Microcystin und hemmt viele Serin/Threonin-Phosphatasen sowie die alkalische Phosphatase. Phosphataseinhibitor-Cocktail II enthält Natriumsalze von Orthovanadat, Orthomolybdat, Tartrat und Imidazol und hemmt Tyrosinphosphatasen.

2.7.2 Bestimmung der Proteinmenge

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde durch die BCA-Methode (Smith et al., 1985) unter Verwendung eines entsprechenden Kits photometrisch bestimmt: Die Proteine aus der Probe reduzieren Cu^{2+} ; Cu^+ bildet mit Bicinchoninsäure einen purpurfarbenen Komplex, der bei 570 nm vermessen werden kann.

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe einer Eichgeraden ermittelt; sie basierte auf einer Standardreihe aus 7 BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 0 bis 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS, hergestellt aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml).

Jeweils 5 μl der zu bestimmenden Proben wurden mit 95 μl PBS verdünnt. Anschließend wurden sowohl Standardlösungen als auch Proben mit jeweils 500 μl der nach Herstellervorschrift frisch hergestellten BCA-Lösung für 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Schließlich wurden 2 \times 200 μl eines jeden Ansatzes auf eine Mikrotiterplatte gegeben und mit einem Plattenreader bei 570 nm photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand der Standardkurve errechnet.

BCA-Lösung (Kit)

Reagenz A: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Natriumtartrat, NaOH 0,2N

Reagenz B: Bicinchoninsäure 4% in H_2O

Reagenz C: $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 4% in H_2O

gebrauchsfertige Lösung: 24 T Reagenz A, 25 T Reagenz B, 1 T Reagenz C

Albuminstandard

Rinderserumalbumin (BSA) 2 mg/ml

NaCl 0.9 %

NaN_3 0.05 %

2.8 Immunpräzipitation

2.8.1 Prinzip der Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation wird die Interaktion von Antigen und Antikörper ausgenutzt, um gezielt Proteine aus einem Zelllysate zu isolieren und anzureichern. Das Lysat wird mit dem Antikörper inkubiert; er erkennt das Antigen und bildet mit ihm einen Komplex. Anschließend gibt man eine Aufschlämmung von Protein A-Sepharose in PBS hinzu. Protein A ist Protein aus *Staphylococcus aureus* mit hoher Affinität zur Fc-Region von mono- und polyklonalen IgG-Antikörpern vieler Spezies; durch Binden an Sepharose wird es immobilisiert und kann pro Molekül mindestens zwei Moleküle IgG binden (Amersham Purification Handbook, o.J.).

Die Sepharose wird schließlich mitsamt der Antigen-Antikörper-Komplexe vom übrigen Lysat abgetrennt. In Kombination mit einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blotting verfügt man damit über eine sehr spezifische Methode zur Detektion von Proteinen in Zelllysaten.

2.8.2 Vorbereitung der Protein A-Sepharose

45 mg der Protein A-Sepharose wurden in einem Eppendorfgefäß mit 150 µl Lysispuffer für die Immunpräzipitation versetzt und anschließend 3 Stunden lang bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 2500 rpm zentrifugiert und drei Mal mit Lysispuffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet 1:1 mit Lysispuffer verdünnt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Lysispuffer für die Immunpräzipitation → 2.7.1

2.8.3 Immunpräzipitation

Die Zellysate für die Immunpräzipitation wurden gewonnen wie in 2.7.1 beschrieben; die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte auch hier nach der BCA-Methode.

Eine Menge Lysat, die 200 µg Protein entsprach, wurde mit Aqua dest. auf 200 µl verdünnt, mit 1,5 µl polyklonalem Bad-Antikörper versetzt und über Nacht bei 4°C auf den Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 25 µl der Protein A-Sepharose-Mischung versetzt, alles durch Vortexen gut vermischt und erneut für mindestens vier Stunden inkubiert.

Danach wurde der Ansatz drei Mal mit kaltem Lysispuffer gewaschen (3000 rpm, 4°C, 3 Minuten); die Überstände wurden jeweils vorsichtig – um den Verlust von Immunkomplexen zu vermeiden – abgenommen und verworfen. Schließlich wurde das Pellet mit 10 µl Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten auf 95°C erhitzt, um die Probe zu denaturieren und die Antigen-Antikörper-Komplexe von der Sepharose abzutrennen.

Der Überstand wurde für eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blotting verwendet; die entsprechenden Protokolle siehe unter 2.9. ; die Detektion erfolgte mit den phosphoBad-Antikörpern.

Lysispuffer für die Immunpräzipitation → 2.7.1

Probenpuffer

Tris	157,5 mg
SDS	1,0 g
2-Mercaptoethanol	1,0 ml
Glycerin	2,0 ml
Bromphenolblau	6,0 mg
pH 6,8 (eingestellt mit HCl vor Bromphenolblauzugabe)	

2.9 SDS-PAGE und Western Blotting

2.9.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die SDS-PAGE Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 15% verwendet. Die bei der Herstellung verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel (15 %, für 10 Gele)

Trenngelpuffer	15 ml
H ₂ O	15 ml
Rotiphorese [®] 30	35 ml
TEMED	50 µl
APS (20 %)	100 µl

Trenngelpuffer

Tris	182 g
SDS	4 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 8,8 (eingestellt mit HCl)	

Sammelgel (für 10 Gele)

Rotiphorese [®] 30	3 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
H ₂ O	12 ml
TEMED	30 µl
APS (20 %)	60 µl

Sammelgelpuffer

Tris	60,5 g
SDS	4,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 6,8 (eingestellt mit HCl)	

APS (20 %)

APS	200 mg
H ₂ O	ad 1 ml

2.9.2 SDS-PAGE

Verwendet wurden Zelllysate, deren Proteingehalt zuvor durch einen BCA-Assay bestimmt worden war. Sie wurden bei -80°C gelagert und vor der Verwendung auf Eis aufgetaut. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden mit Aqua dest. ad $18\ \mu\text{l}$ verdünnt und im Verhältnis 1:5 mit Probenpuffer versetzt. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 95°C wurden die Proben in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert und anschließend in einer SDS-PAGE den Molekulargewichten der enthaltenen Proteine entsprechend aufgetrennt. Um eine Zuordnung der Proteinbanden zu einem bestimmten Molekulargewicht zu ermöglichen, wurde auf jedes Gel auch ein gefärbter Proteinmarker-Standard aufgetragen:

122 kDa β -Galaktosidase	(E. coli)
79 kDa BSA	(Rinderserum)
47 kDa Ovalbumin	(Hühnereiweiß)
33 kDa Carboanhydrase	(Rindererythrozyten)
24 kDa β -Lactoglobulin	(Kuhmilch)
20 kDa Lysozym	(Hühnereiweiß)

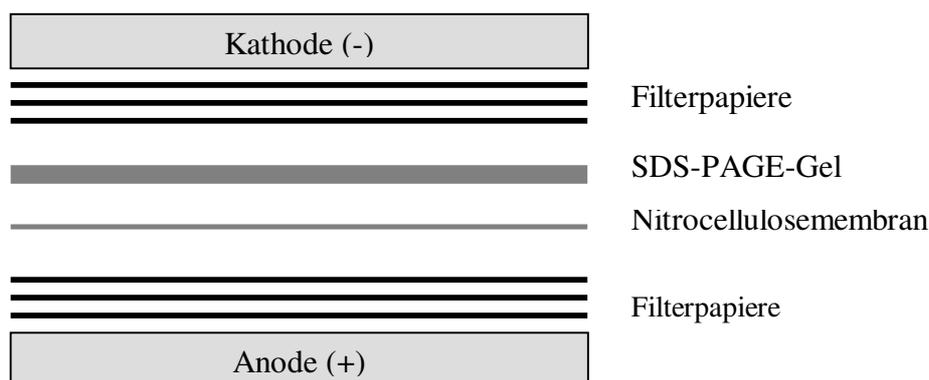
Probenpuffer → 2.8.3

Elektrophoresepuffer

Tris	3,0 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml

2.9.3 Western Blotting

Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine durch Western Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin et al., 1979). Dazu wurden zunächst das Gel, die Membran sowie die benötigten Filterpapiere in Transferpuffer equilibriert und nach folgendem Schema in die Blottingapparatur geschichtet:



Nach 25 (Bad, Caspase-3) bzw. 40 Minuten (PP2C α/β) bei 250 mA war der Transfer abgeschlossen; die Membran wurde für 15 Minuten in ein Ponceaurot S-Bad eingelegt, um die Proteine zu fixieren und außerdem durch Anfärben aller Proteine zu überprüfen, ob das Blotting gleichmäßig und erfolgreich war (Salinovich und Montelaro, 1986). Anschließend wurde die Membran mit TBST gründlich gewaschen und eine Stunde lang auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit Blockpuffer I inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST wurde der primäre Antikörper in Blockpuffer II daraufgegeben und bei 4°C über Nacht dort belassen.

Am nächsten Tag wurde drei Mal zehn Minuten mit TBST gewaschen, die Membran eine Stunde lang mit dem Zweitantikörper in Blockpuffer I behandelt, erneut gewaschen und schließlich eine Minute mit ECL-(Enhanced Chemoluminescence) Lösung inkubiert. Durch die Reaktion des in der Lösung enthaltenen Substrats mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper wurde Licht emittiert, mit dessen Hilfe in einer Dunkelkammer die spezifischen Signale auf einen Kodak-Film übertragen wurden. Die Dauer der Exposition hing dabei jeweils von der Stärke der Signale ab. Der belichtete Film wurde schließlich entwickelt, fixiert und getrocknet.

Ponceaurot S-Lösung

Ponceau S rot	2 g
Trichloressigsäure	15 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Transferpuffer

Tris	3,027 g
Glycin	14,4 g
Methanol	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

TBST

Tris	1,211 g
NaCl	8,765 g
Tween 20	1 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH 7,5 (eingestellt mit HCl)	

Blockpuffer I (5% Milch/TBST)

Milchpulver	1 g
TBST	20 ml

Blockpuffer II abhängig vom verwendeten Erstantikörper; siehe Tabelle 2.9-2

Tabelle 2.9-1: Erstantikörper

Protein	aus	Quelle	Konz.	Blockpuffer II
Caspase 3	Kaninchen	Cell Signaling	1:500	5% Milch/TBST
Bad	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000	5% BSA/TBST
pBad-112	Kaninchen	Cell Signaling	1:500	5% BSA/TBST
pBad-136	Kaninchen	Cell Signaling	1:500	5% BSA/TBST
pBad-155	Kaninchen	Cell Signaling	1:500	5% BSA/TBST
PP2C α	Kaninchen	AG Klumpp	1:1000	5% BSA/TBST
PP2C β	Kaninchen	AG Klumpp	1:1000	5% BSA/TBST
α -Tubulin	Maus	Sigma	1:10000	5% Milch/TBST

Tabelle 2.9-2: Zweitantikörper

1. AK aus	2. AK	Quelle	Konz.	in
Kaninchen	anti-Kaninchen IgG HRP-konj.	Amersham	1:2500	5% Milch/TBST
Maus	anti-Maus IgG HRP-konj.	Amersham	1:3000	5% Milch/TBST

(HRP: "horseradish peroxidase", Meerrettichperoxidase)

2.10 Immunzytochemie

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die Zellen in Kulturschalen mit eingelegtem Deckgläschen (Ø 24 mm) kultiviert und behandelt.

2.10.1 Immunzytochemische Detektion mit Texas-Red®

Zur immunzytochemischen Detektion von Bad in der Zelle wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas Red® (Titus et al., 1982; Abb. 2.10-1) gekoppelter Zweitantikörper verwendet.

Nach der Behandlung wurden die Zellen 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Paraformaldehydlösung 4% fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung fünf Minuten mit einer 0,2%igen Lösung von Triton X-100 in PBS inkubiert. Nach erneutem

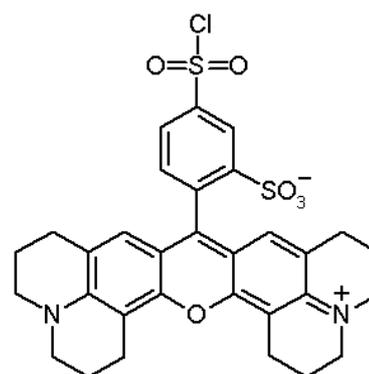


Abb. 2.10-1: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs Texas Red®

gründlichen Waschen mit PBS wurden die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer II behandelt, um unspezifische Bindestellen zu maskieren. Über Nacht wurden die Zellen bei 4°C mit einer Lösung des Primärantikörpers in Blockpuffer II inkubiert, am nächsten Tag erneut mit PBS gewaschen und dann für eine Stunde mit einem Texas Red-gekoppelten anti-Maus-Antikörper bedeckt. Aufgrund der Labilität des Farbstoffes wurde dieser wie auch alle weiteren Schritte unter Lichtschutz durchgeführt. Schließlich wurde nochmals mit PBS gewaschen, bevor die Deckgläschen auf einen Objektträger aufgebracht und mit handelsüblichem Nagellack fixiert und versiegelt wurden. Nach dem Trocknen wurden die Zellen mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops betrachtet; die Anregung erfolgte mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 543 nm und einer Emissionswellenlänge größer 585 nm. Alle fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen eines Versuches waren jeweils für die Gruppe repräsentativ und wurden mit der gleichen Laserintensität und der gleichen Detektorsensitivität gemacht, um die Immunreaktivität zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen vergleichen zu können.

2.10.2 Immunzytochemische Detektion mit Fluoroisothiocyanat (FITC)

Die immunzytochemische Detektion von PP2C α und PP2C β erfolgte nach Kopplung mit Fluoroisothiocyanat (FITC; Abb. 2.10-2).

Bis zur Behandlung mit dem Zweitantikörper folgte das Protokoll dem von Texas-Red® (\rightarrow 2.10.1); zum Blockieren wurde Blockpuffer I verwendet. Statt mit Texas-Red® wurden die Zellen hier eine Stunde lang mit einem biotinylierten anti-Kaninchen-Zweitantikörper inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit einer FITC-

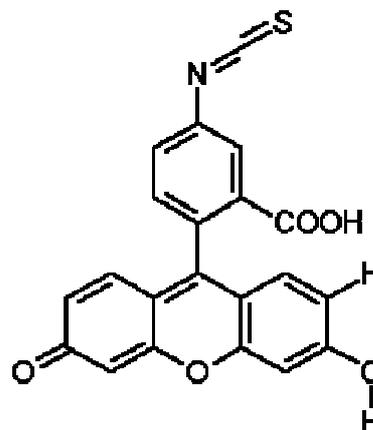


Abb. 2.10-2: Strukturformel von Fluoroisothiocyanat (FITC)

Lösung (6 μ l/ml PBS) eine weitere Stunde unter Lichtschutz behandelt. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen wie oben auf Objektträgern fixiert und schließlich ebenfalls mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop ausgewertet. Die Anregung erfolgte hier mit einem Argon-Laser; die optimale Anregungswellenlänge von FITC beträgt 494 nm, die der Emission 518 nm.

2.10.3 Immunzytochemische Doppelfärbung PP2C β und Bad

Die Verwendung von Erstantikörpern, die in verschiedenen Spezies hergestellt wurden – im vorliegenden Fall anti-Bad in der Maus, anti-PP2C β im Kaninchen – ermöglicht die gleichzeitige immunzytochemische Detektion beider Proteine in der Zelle, da jeweils spezifische Zweitantikörper eingesetzt werden können.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die PP2C β mit FITC nach obenstehendem Protokoll markiert; nach Entfernen der FITC-Lösung wurde allerdings nicht gleich eingedeckelt, sondern mit Blockpuffer II geblockt und anschließend die Texas-Red®-Färbung wie üblich durchgeführt.

Nach dem Eindeckeln konnten die Zellen auch hier mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop betrachtet werden; da die Spektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Texas-Red® und FITC weit genug auseinanderliegen, war es durch ein so genanntes Multitracking mit Verwendung unterschiedlicher Filtersätze möglich, beide getrennt aufzunehmen. Die Überlagerung der Aufnahmen ermöglichte den Lokalisationsvergleich der untersuchten Proteine.

Paraformaldehydlösung 4% → 2.6.4

PBS → 2.6.4

Triton X-100 0,2%

Triton X-100	20 µl
PBS	ad 10 ml

Blockpuffer I

Ziegenserum	1 ml
PBS	ad 10 ml

Blockpuffer II

Pferdeserum	1 ml
PBS	ad 10 ml

Erstantikörper-Lösung

Antikörper	10 µl
Blockpuffer	ad 1000 µl

Zweitantikörper-Lösung

anti-Kaninchen IgG biotin.	5 µl
Blockpuffer	ad 1000 µl

FITC-Lösung

FITC-Avidin	6 µl
PBS	ad 1000 µl

2.11 RNA-Interferenz (RNAi)

2.11.1 Grundlagen der RNA- Interferenz

Nach endogener Produktion oder künstlicher Einführung von doppelsträngiger siRNA (*small interfering RNA*) wird die mRNA, die der siRNA-Sequenz komplementär ist, gezielt abgebaut und dadurch bei unveränderter Transkription die Translation verhindert (Bosher und Labouesse, 2000; Milhavet et al., 2003). In der Zelle dient dieses posttranskriptionelle Gen-Silencing (PTGS) der Abwehr artfremder Gene, etwa zur Zerstörung des Genoms von RNA-Viren (Ruiz et al., 1998).

Die Effekte dieses evolutionär konservierten Mechanismus' wurden zunächst in der Pflanze beobachtet, als der Versuch, die Farbe von Petunien durch Einschleusen eines Gens zu intensivieren, zum Ausschalten des homologen Gens und Verlust der Farbe führte (Napoli et al., 1990; Jorgensen et al., 1996). Nach der Entdeckung von Fire et al., dass die Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in *C. elegans* ein viel effektiveres Gensilencing bewirkt als die Antisense-Technik (Fire et al., 1998), wurde die Methode zunehmend verfeinert und in einer Reihe von Systemen angewendet. So konnte gezeigt werden, dass die RNA-Interferenz in vielen Organismen funktioniert, darunter *C. elegans* (Fire et al., 1998; Tabara et al., 1999), Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Waterhouse et al., 1998; Chuang und Meyerowitz, 2000), Pilze (Catalanotto et al., 2000), Insekten wie *Drosophila* (Kennerdell und Carthew, 2000; Elbashir et al., 2001b), aber auch Säugerzellen (Elbashir et al., 2001a; Caplen et al., 2001) inklusive Maus-Oozyten, Embryonen und embryonalen Stammzellen (Wianny und Zernicka-Goetz, 2000). Auch neuronale embryonale hippokampale und kortikale Primärkulturen der Ratte konnten erfolgreich behandelt werden (Krichevsky und Kosik, 2002), und sogar in vivo, im lebenden Tier, ist die Anwendung möglich (McCaffrey et al., 2002; Lewis et al., 2002).

Abgesehen von der zumeist transienten Herunterregulation des Zielproteins durch von außen zugeführte Nukleinsäuren ist inzwischen auch die Expression von siRNA in der Zelle selbst und damit die dauerhafte Verringerung etabliert; ermöglicht wird dies durch die Anwendung spezieller Vektorsysteme (Brummelkamp et al., 2002).

2.11.2 Das Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNA-Interferenz beruht darauf, dass von außen eingeführte doppelsträngige RNA in der Zelle abgebaut wird, die entstehenden Fragmente zur spezifischen Zerstörung der mRNA des Zielproteins führen und so ihre Translation verhindern.

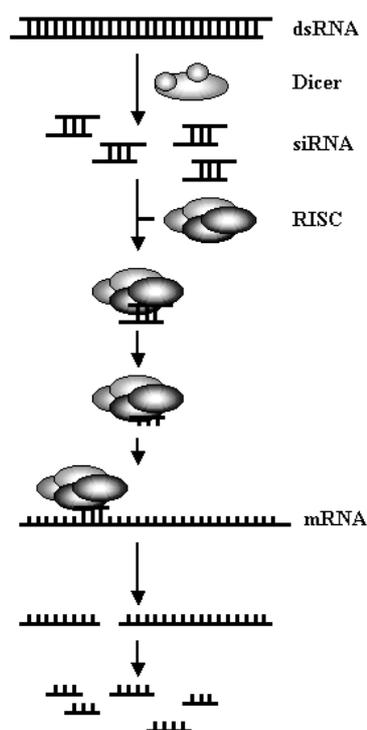


Abb. 2.11-1: Mechanismus der RNA-Interferenz

Dicer zerschneidet dsRNA in 21-23 nt-Fragmente, die siRNA; der Enzymkomplex RISC bindet und entwindet sie. Der antisense-Strang der siRNA dirigiert RISC zur komplementären mRNA, die anschließend abgebaut wird.

dsRNA: doppelsträngige RNA, siRNA: small interfering RNA; RISC: RNA-induced silencing complex

Von außen zugeführte dsRNA wird in der Zelle zu Fragmenten von 21 bis 23 Nukleotiden Länge, der siRNA, zerschnitten, die der eigentliche Vermittler der RNAi ist und für den Abbau der Ziel-mRNA sorgt (Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000). Dicer, ein multimeres RNase III-Enzym, ist für das Schneiden der dsRNA verantwortlich (Bernstein et al., 2001). Die entstehenden siRNA-Stücke besitzen eine Hydroxylgruppe am 3'-Ende und werden am 5'-Ende phosphoryliert; unphosphorylierte siRNA ist wirkungslos (Nykänen et al., 2001).

Die siRNA wird in den Enzymkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) integriert und dort ATP-abhängig entwunden (Elbashir et al., 2001c) und danach vom RIS-Komplex als Führer benutzt, mit dessen Hilfe er die komplementäre Ziel-mRNA durch Basenpaarung erkennt (Nykänen et al., 2001). Eine in RISC enthaltene Endonuklease schneidet dann die mRNA etwa in der Mitte der Region, die an die siRNA-Sequenz gebunden ist (Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001c). In einer zweiten, unabhängigen Reaktion werden anschließend die mRNA-Stücke durch zelluläre Exonukleasen weiter abgebaut (Holen et al., 2002).

So wird bei unveränderter Transkription die Translation verhindert und damit die Menge des Zielproteins reduziert; vollständig eliminiert wird es in der Regel nicht, da die komplette Depletion der mRNA die Ausnahme ist.

Obwohl Nebeneffekte der siRNA im Nukleus beschrieben sind, nämlich die Beeinflussung von Chromatin und die Unterdrückung der Transkription des Zielgens (Dudley und Goldstein, 2003), laufen die Prozesse der eigentlichen RNAi grundsätzlich im Zytoplasma der Zelle ab (Zeng und Cullen, 2002).

Anders als bei Organismen wie *C. elegans* oder *Drosophila* ist die RNAi mit dsRNA in Säugerzellen nicht ohne weiteres durchführbar: Sie reagieren auf längere doppelsträngige RNA-Stücke mit der Aktivierung verschiedener Signalwege, die zur Hemmung der Proteinbiosynthese und zum Zelltod führen:

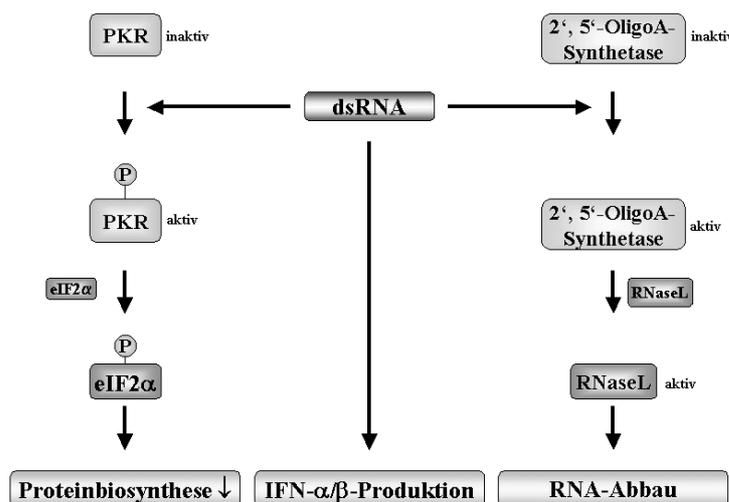


Abb. 2.11-2: Effekte von dsRNA in Säugerzellen

In Säugerzellen hemmt dsRNA über die PKR die Proteinbiosynthese, aktiviert das Interferonsystem und führt über 2',5'-Oligosynthetase und RNaseL zum Abbau von RNA. (Nach McManus und Sharp, 2002). (dsRNA: doppelsträngige RNA; PKR: dsRNA-abh. Proteinkinase; eIF2 α : Elongationsfaktor 2 α)

Die dsRNA aktiviert sequenzunabhängig das Interferonsystem und damit auch eine Reihe von interferoninduzierten Genen. Die dsRNA-abhängige Proteinkinase PKR, ein Bestandteil des Abwehrsystems gegen Viren (Clemens, 1997), phosphoryliert und inaktiviert den Transkriptionsfaktor eIF2 α und hemmt so unspezifisch die Proteinsynthese; die ebenfalls aktivierte 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase verursacht eine unspezifische Hydrolyse der mRNA und rRNA durch Aktivierung der RNaseL (Stark et al., 1998; Kaufman, 1999). Diese unspezifischen Effekte kann man umgehen, indem man in Säugerzellen nicht dsRNA, sondern gleich siRNA-Stücke einschleust; sie sind mit nur 21 bis 23 Nukleotiden zu kurz für die Aktivierung der PKR (Elbashir et al., 2001a). Allerdings konnte inzwischen auch bei einigen siRNAs in Abhängigkeit von der Sequenz und der Art des Einschleusens in die Zelle die Aktivierung des Interferonsystems beobachtet werden (Sledz et al., 2003; Moss und Taylor, 2003); eventuelle unspezifische Effekte müssen bei der Dateninterpretation berücksichtigt und nach Möglichkeit entsprechende Kontrollen durchgeführt werden.

2.11.3 Auswahl der Oligonukleotidsequenzen für die RNAi

2.11.3.1 Richtlinien zur Auswahl der Sequenzen

Für die Auswahl der siRNA-Sequenz gibt es keine absoluten Regeln, wohl aber eine Reihe von Empfehlungen, die auf empirischen Daten beruhen (Tuschl, 2001; Elbashir et al., 2002) und die Erfolgsaussichten erhöhen.

1. Auswahl der Targetregion

Die Region, gegen die sich die siRNA richtet, wird anhand der cDNA-Sequenz ausgewählt. Bereiche in der Nähe von Start- bzw. Stoppcodon sollten vermieden werden, ebenso 5'- oder 3'-UTRs (*untranslated regions*); eventuell könnten Translations-Initiations-Komplexe und /oder UTR-bindende Proteine die Bindung der siRNA oder des RISC-Komplexes an die mRNA stören.

2. Suche nach dem Sequenzmotiv 5'-AA(N19)TT

Das Motiv 5'-AA(N19)TT ist die Zielsequenz der Wahl; der Sense-Strang des siRNA-Duplex korrespondiert dann zu 5'-(N19)TT, während der Antisense-Strang komplementär zur Position 1-21 des 23nt-Stückes synthetisiert wird.

Enthält die cDNA des Zielproteins das Motiv nicht, kann man auf 5'-AA(N21) oder 5'-NA(N21) ausweichen.

Der GC-Gehalt sollte nach Möglichkeit um die 50% betragen, allerdings variiert er bei funktionierenden siRNAs durchaus zwischen 30 und 70%. Allerdings sollten nicht mehr als drei G oder 3 C in einer Reihe vorkommen, da sich sonst häufig Agglomerate bilden, die die RNAi stören.

3. BLAST-Suche

Die BLAST-Suche (*Basic local alignment search tool*), etwa in der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) soll sicherstellen, dass sie ausgewählte Targetsequenz nur in der eigentlichen Ziel-mRNA auftaucht und keine anderen Gene beeinflusst werden.

2.11.3.2 siRNA-Sequenzen für die Versuche mit PP2C α und β

Für das Ausschalten der Proteinphosphatase 2C α und 2C β stand eine Reihe von siRNA-Oligonukleotiden zur Verfügung, die gegen unterschiedliche Regionen der kodierenden Sequenz der PP2C α bzw. PP2C β gerichtet waren (vgl. Abb. 2.11-3). Sie wurden alle auf ihre Wirksamkeit getestet; am Ende wurde für die Herunterregulation der PP2C α standardmäßig Sequenz $\alpha 3$, für PP2C β die Sequenz $\beta 2$ verwendet.

PP2C α - Sequenz 1

Target	AAG TAA TCC GCT GGA GAA AGA
sense	r(GUA AUC CGC UGG AGA AAG A)d(TT)
antisense	r(UCU UUC UCC AGC GGA UUA C)d(TT)

PP2C α - Sequenz 2

Target	AAG TAG TCG ACA CCT GTT TGT
sense	r(GUA GUC GAC ACC UGU UUG U)d(TT)
antisense	r(ACA AAC AGG UGU CGA CUA C)d(TT)

PP2C α - Sequenz 3

Target AAG TAC CTG GAA TGC AGA GTA
sense r(GUA CCU GGA AUG CAG AGU A)d(TT)
antisense r(UAC UCU GCA UUC CAG GUA C)d(TT)

PP2C α - Sequenz 4

Target AAA GGT CCT ACT GAG CAG CTT
sense r(AGG UCC UAC UGA GCA GCU U)d(TT)
antisense r(AAG CUG CUC AGU AGG ACC U)d(TT)

PP2C β - Sequenz 1

Target GCG TAA TGT TAT TGA AGC TGT
sense r(GUA AUG UUA UUG AAG CUG U)d(CG)
antisense r(ACA GCU UCA AUA ACA UUA C)d(CG)

PP2C β - Sequenz 2

Target AAT GTT ATT GAA GCT GTT TAT
sense r(UGU UAU UGA AGC UGU UUA U)d(TT)
antisense r(AUA AAC AGC UUC AAU AAC A)d(TT)

2.11.3.3 Vorbereitung der siRNA nach Erhalt

Die doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotide (Qiagen) wurden lyophilisiert im Reinheitsgrad HPP entsprechend einer Reinheit von >90 Prozent bezogen. In dieser Form wurden sie bis zum erstmaligen Gebrauch bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde das Lyophilisat mit 1 ml des mitgelieferten sterilen siRNA-Suspensionspuffers rekonstituiert. Um die korrekte Anlagerung von Sense- und Antisense-Strängen sicherzustellen sowie eventuell während der Lyophilisierung entstandene Aggregate wieder aufzulösen und so die Effektivität der siRNA zu vergrößern, wurde der Ansatz für 1 Minute auf 90°C erhitzt und anschließend eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die resultierende Stocklösung ($20\ \mu\text{M}$) wurde aliquotiert und sofort im Versuch eingesetzt bzw. bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Zusammensetzung des siRNA-Suspensionspuffers pH 7,4

Kaliumacetat 100 mM
HEPES-KOH 30 mM
Magnesiumacetat 2 mM

PP2C α

		siRNA
...		
481	ACACAAGATCACAAACC AAGTAATCCGCTGGAGAAAGA ACGAATTCAGAATGCAGGTGGG 1	
161	T Q D H K P S N P L E K E R I Q N A G G	
541	TCTGTAATGATTGAGCGTGTGAATGGCTCTCTGGCTGTATCGAGGGCCCTTGGGGATTTT	
181	S V M I Q R V N G S L A V S R A L G D F	
601	GATTACAAATGTGTCCATGGA AAAGGTCCTACTGAGCAGCTT GTCTCACCAGAGCCTGAA 4	
201	D Y K C V H G K G P T E Q L V S P E P E	
661	GTCCATGATATTGAAAGATCTGAAGAAGATGATCAGTTCATTATCCTTGCAATGTGATGGT	
221	V H D I E R S E E D D Q F I I L A C D G	
721	ATCTGGGATGTTATGGGAAATGAAGAGCTCTGTGATTTTGTAAAGATCCAGACTTGAAGTC	
241	I W D V M G N E E L C D F V R S R L E V	
781	ACTGATGACCTTGAGAAAGTTTGCAATC AAGTAGTCGACACCTGTTTGT ATAAGGGAAGT 2	
261	T D D L E K V C N E V V D T C L Y K G S	
841	CGAGACAACATGAGTGTGATTTTGTATCTGTTTTCCAAATGCACCCAAAGTATCGCCAGAA	
281	R D N M S V I L I C F P N A P K V S P E	
901	GCAGTGAAGAAGGAGGCAGAGTTGGAC AAGTACCTGGAATGCAGAGTA GAAGAAATCATA 3	
301	A V K K E A E L D K Y L E C R V E E I I	
...		

PP2C β

...	
1021	ATCTTGTCTGCAGAAAATATCCCAAATTTGCCTCCTGGGGGAGGTCTTGCTGGCAA GCGT
341	I L S A E N I P N L P P G G G L A G K R
1081	AATGTTATTGAAGCTGT TTATAGTAGACTGAATCCACATAGAGAAAGTATGGGGGTGCT
361	N V I E A V Y S R L N P H R E S D G G A
...	

...	
1021	ATCTTGTCTGCAGAAAATATCCCAAATTTGCCTCCTGGGGGAGGTCTTGCTGGCAAGCGT
341	I L S A E N I P N L P P G G G L A G K R
1081	AATGTTATTGAAGCTGTTTAT AGTAGACTGAATCCACATAGAGAAAGTATGGGGGTGCT
361	N V I E A V Y S R L N P H R E S D G G A
...	

Abb. 2.11-3: Lokalisation der Oligonukleotidsequenzen für die RNA-Interferenz

Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt aus der humanen cDNA-Sequenz der PP2C α bzw. PP2C β ; die Zielsequenzen, die für die RNAi ausgewählt wurden, sind hervorgehoben. Ergänzend wird die Aminosäuresequenz der Proteine angegeben.

2.11.4 Prinzip der Lipofektion

Bei der Lipofektion werden die Oligonukleotide mit Hilfe kationischer Lipide in die Zelle eingeschleust. Zunächst wurden liposomale Formulierungen, bei denen ein Mix aus kationischen und neutralen Lipiden eine Doppelschichtstruktur ausbildet, für die Transfektion von DNA entwickelt (Felgner et al., 1987; Bennet et al., 1992), nach Entdeckung der RNA-Interferenz aber auch erfolgreich zum Einbringen von doppelsträngigen RNA-Stücken benutzt (Elbashir et al., 2001a).

Neben den liposomalen gibt es nichtliposomale, eine mizelläre Struktur ausbildende Formulierungen; ihnen ist gemein, dass ihre positiv geladene Oberfläche mit den negativ geladenen Phosphatresten der Nukleinsäuren interagiert und so ein Transfektionskomplex entsteht, der in die Zelle aufgenommen wird.

Für die Durchführung der Lipofektion gibt es nur grobe Richtlinien; in jedem Fall ist eine Optimierung der Bedingungen mit Blick auf die verwendete Zelllinie notwendig (Felgner et al., 1994). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Transfektionsreagenz Oligofectamine® benutzt; es wurde schon zuvor erfolgreich für die Transfektion von Säugerzellen mit siRNA verwendet (Elbashir et al., 2001a; Harborth et al., 2001).

2.11.5 Transfektion von SH-SY5Y-Zellen in der Kulturschale

Zur Transfektion der SH-SY5Y-Zellen in der Kulturschale wurden die Zellen nach dem Splitten in definierter Zahl ($3 \cdot 10^4$ /cm²) in Kulturmedium ohne Antibiotika ausgesät; dieses wurde am folgenden Tag durch OptiMEM® ersetzt.

Die eigentliche Transfektion erfolgte am dritten Tag. Zuerst wurde ein weiterer Medienwechsel durchgeführt und dabei in jede Schale (Ø 35 mm) 2 ml OptiMEM® gegeben. Die benötigte Menge des Transfektionsreagenzes Oligofectamine®, in der Regel 3 µl pro Schale entsprechend 1,5 µl/ml Medium, wurde im Verhältnis 1:5 mit OptiMEM® gemischt und für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Außerdem wurden für jede Schale 3 µl der 20µM-siRNA-Stocklösung 1:15 in OptiMEM® verdünnt. Danach wurden die beiden Ansätze (die Oligofectamine®-Verdünnung abzüglich der Menge, die zur Behandlung der Kontrollgruppe nötig war) vereinigt, mit einer Pipette vorsichtig

vermischt und weitere zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Mischung auf die zu transfizierenden Schalen verteilt; die Endkonzentration von Oligofectamine® war dort 1,5 µl/ml, die der siRNA 30 nM. Jeweils eine Kontrollgruppe wurde nur mit OptiMEM® bzw. OptiMEM® plus Oligofectamine® behandelt, um eventuelle Effekte des Medium oder des Transfektionsreagenzes auszuschließen.

Zu festgelegten Zeitpunkten, üblicherweise nach 24, 48 und 72 Stunden, wurden die Zellen geerntet, entweder zur Proteingewinnung mit Lysispuffer für Western Blotting oder zur Isolation der RNA mit dem entsprechenden Puffer des RNeasy® Kits.

Lysispuffer für Western Blotting → 2.7.1

2.11.6 Transfektion von SH-SY5Y-Zellen in Suspension

Da der Transfektionserfolg in der Kulturschale zu wünschen übrig ließ, wurden die SH-SY5Y-Zellen schließlich in Suspension transfiziert. Abweichend vom vorherigen Protokoll wurden die Zellen nach dem Splitten in OptiMEM® suspendiert, die entsprechend 2.11.5 vorbereiteten Transfektionslösungen zugegeben und die Suspension dann mit OptiMEM® auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Pro $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden 12 µl Oligofectamine® und je 9 µl der siRNA-Stocklösungen für PP2C α und PP2C β verwendet; der Transfektionsansatz enthielt also 8 µl/ml Oligofectamine® und war bezüglich jeder Sequenz 120 nM.

Die zu transfizierenden Zellen wie auch die entsprechenden Kontrollgruppen wurden in Falcon®-Röhrchen im 37°C warmen Wasserbad inkubiert und im Abstand von 30 Minuten durch Aufschütteln resuspendiert. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit Hilfe einer Glaspipette vereinzelt und jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen in eine mit Poly-L-lysin beschichtete und mit 2 ml Kulturmedium gefüllte Schale (\varnothing 60 mm) gegeben. Auch hier wurden die Zellen zu festgelegten Zeitpunkten geerntet.

Sollten die Zellen anschließend mit Ölsäure behandelt werden, so wurden sie in mit Poly-L-lysin beschichtete 24er-Multiwells ausgesät; die Zelldichte betrug $1,5 \times 10^5$ /cm².

2.12 Untersuchung der Messenger-RNA

2.12.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Für die Extraktion von Gesamt-RNA aus SH-SY5Y-Zellen wurde ein RNA-Isolierungskit (RNeasy-Kit, Qiagen) verwendet.

Die Zellen wurden mit 600 μ l Lysispuffer versetzt, mit Hilfe eines Zellschabers gesammelt und anschließend mit einer sterilen Einmal-Spritze und einer 20 Gauge-Kanüle durch fünfmaliges Triturieren homogenisiert.

Im nächsten Schritt wurden 600 μ l Ethanol 70% zugegeben und die Probe auf die RNeasy Mini-Säule gegeben. Die enthaltene Gesamt-RNA band an die Silicagel-Membran des Röhrchens; sonstige Bestandteile wurden in mehreren Zentrifugationsschritten (10000 rpm, jeweils 1 min, Raumtemperatur) unter Verwendung von Waschpuffern mit hohen Salzkonzentrationen ausgewaschen. Schließlich wurde die gebundene RNA mit 35 μ l RNase-freiem Aqua dest. eluiert und diese Lösung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.12.2 Gehaltsbestimmung der Gesamt-RNA

Die RNA-Konzentration im Eluat wurde durch photometrische Messung bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von RNA, bestimmt.

Hierzu wurde die RNA im Verhältnis 1 zu 120 mit Aqua dest. verdünnt und mit einem Photometer vermessen.

$$\text{Konzentration Gesamt-RNA} = OD \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml (für Messung in Wasser)}$$

Für die beschriebene Verdünnung bedeutet das:

$$\text{Konzentration Gesamt-RNA} = OD \times 4800 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Gesamtausbeute} = \text{Konzentration} \times \text{Volumen der Probe [ml]}.$$

Da auch Verunreinigungen wie Proteine im UV-Bereich absorbieren, schloss sich eine erneute photometrische Messung an, diesmal bei 280 nm (Absorption der

aromatischen Aminosäuren). Das Absorptionsverhältnis 260/280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit des Eluats. Liegt der Quotient zwischen 1,7 und 2,0 (gemessen in wässriger Lösung), ist die RNA-Lösung nicht verunreinigt.

Für die reverse Transkription wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

2.12.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

2.12.3.1 Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient dazu, mRNA in cDNA umzuschreiben.

Der *Reaktionsansatz* setzte sich wie folgt zusammen:

5 µg Gesamt-RNA	
10× PCR-Puffer	5,0 µl
MgCl ₂ 25 mM	5,0 µl
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	2,5 µl
DTT 0,4 mM	2,5 µl
Oligo-dT-Primer	2,5 µl
Aqua dest. steril	ad 45,0 µl

Die Komponenten wurden gemischt und für 5 min auf 65°C erhitzt, um eventuelle Sekundärstrukturen zu denaturieren. Im Anschluss sorgte sofortiges Kühlen mit Eis dafür, dass die Primärstruktur der RNA intakt blieb.

Danach wurde 1 µl einer RNase-Inhibitor-Lösung (40 U/µl) zugegeben, bevor 250 U der MMLV-Reversen Transkriptase die Reaktion starteten. Der ganze Ansatz wurde eine Stunde lang bei 37°C im PCR-Ofen inkubiert; in dieser Zeit schrieb die reverse Transkriptase die mRNA in cDNA um. Am Ende der Reaktion wurde das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen der Probe auf 95°C inaktiviert. Die erhaltene einzelsträngige cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.12.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird die zuvor durch die reverse Transkription erhaltene cDNA amplifiziert. Hierzu werden spezifische Oligonukleotide benötigt, welche als Primer für eine thermostabile DNA-Polymerase dienen.

Tabelle 2.12-1: PCR-Primer

Target	Richtung	Sequenz	Position
β-Actin	Vorwärts	5'-ATT TGG CAC CAC ACT TTC TAC-3'	1583-1603
	Rückwärts	5'-TCA CGC ACG ATT TCC CTC TCA G-3'	2406-2426
PP2Cα	Vorwärts	5'-ATG GGA GCA TTT TTA GAC AAG C-3'	1-22
	Rückwärts	5'- TTA CCA CAT ATC ATC TGT TGA TG-3'	1126-1148
PP2Cβ	Vorwärts	5'-ATG GGT GCA TTT TTG GAT AAA C-3'	1-22
	Rückwärts	5'-ATC ACT TTC TCT ATG TGG ATT C-3'	1092-1114

Tab. 2.12-2: PCR-Bedingungen

Target	Denaturierung 30 s	Annealing 60 s	Zyklenzahl	Extension 120 s
β-Actin	95°C	55°C	30	72°C
PP2Cα	95°C	57°C	10	72°C
		62°C	25	
PP2Cβ	95°C	50°C	35	72°C

Reaktionsansatz für die PCR

cDNA-Lösung	10 μ l
Extensor PCR Master Mix	7 μ l
Sense-Primer (10 pM)	5 μ l
Antisense-Primer (10 pM)	5 μ l

Nach der RT-PCR wurde mit einem Aliquot der eingesetzten cDNA eine β -Actin-PCR durchgeführt: Dies diente als Nachweis der Konformität der eingesetzten Gesamt-RNA und sollte Fehler bei der Gehaltsbestimmung oder während der RT-Reaktion ausschließen.

2.12.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auswertung der RT-PCR

Die Fluoreszenzdetektion der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (40 µl/100 ml).

Zur Herstellung des Agarosegels wurde 1 g Agarose mit 100 ml TBE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle zu einer klaren Lösung aufgeköcht. War diese auf 70°C abgekühlt, wurden 40 µl Ethidiumbromid zugegeben, durch Schwenken untergemischt und das Ganze luftblasenfrei in eine Gelkammer ausgegossen.

War das Gel nach etwa einer Stunde völlig erstarrt, wurde es in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit TBE-Puffer 1 × etwa 1 cm hoch bedeckt. Danach wurde der Gelkamm entfernt, die Taschen mit einer Mischung aus jeweils 2 µl Probenpuffer (Blue/Orange Loading Dye 6×), 5 µl sterilem Aqua dest. und 5 µl der PCR-Probe bzw. des DNA-Markers beladen und schließlich eine einstündige Elektrophorese bei 100 V durchgeführt. Der DNA-Marker, der DNA-Fragmente definierter Länge enthält, diente als Größenstandard.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe des roten Farbstoffs Ethidiumbromid. Der zeigt in Lösung eine nur leichte Fluoreszenz; interkaliert er aber mit DNA, wird diese Fluoreszenz enorm verstärkt: Durchleuchtet man das Agarosegel nach der Elektrophorese mit Hilfe eines Transilluminators (hier: MWG Biotech, Ebersberg) mit UV, wird Ethidiumbromid zur Emission im orangeroten Bereich (ca. 560 nm) angeregt - die DNA-Banden werden sichtbar. Dabei ist die Intensität der Banden der DNA-Menge proportional.

Die Dokumentation erfolgte mit einem Videodokumentationssystem.

TBE-Puffer 10 ×

Tris	121,1 g
Borsäure	61,8 g
EDTA	7,40 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

TBE-Puffer 1 ×

TBE-Puffer 10 ×	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

2.13 Statistik

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel und WinSTAT.

Zum Vergleich der Gruppen der Zellkultur-Experimente wurde eine Varianzanalyse kombiniert mit dem Scheffé-Test durchgeführt. Die Auswertung der Untersuchungen mit der globalen Vorderhirnischämie erfolgte durch den t-Test nach Student.

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (S.D.) angegeben; ein Signifikanzniveau $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

Die Signifikanzniveaus werden in den Diagrammen wie folgt dargestellt:

Signifikanzniveau (p)	Symbol
< 0,05	*
< 0,01	**
< 0,001	***

3 Ergebnisse

3.1 Neuroprotektion durch Pifithrin- α im Modell der transienten Vorderhirnischämie der Ratte

Die Induktion einer globalen Ischämie im Rattenhirn führt zu neuronaler Schädigung in verschiedenen Gehirnregionen, wobei die selektiv vulnerablen CA1-Neurone des Hippocampus besonders betroffen sind (Pulsinelli et al., 1982). Sie sterben nicht sofort, sondern erst etwa 72 Stunden nach der Ischämie und zeigen dabei deutliche apoptotische Merkmale (Petito et al., 1987; Zhu et al., 1998).

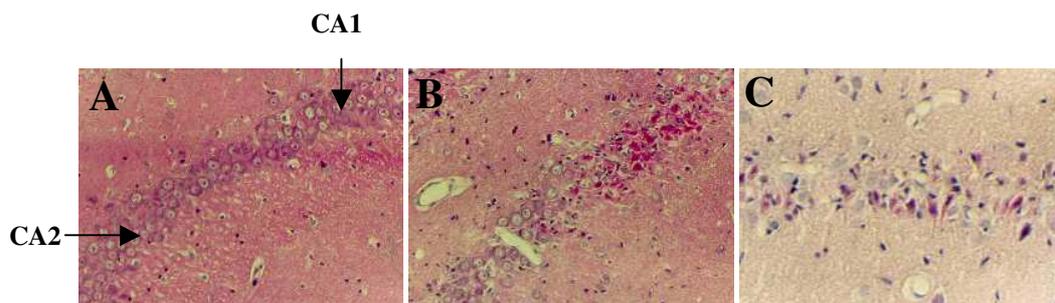


Abb. 3.1-1: Die globale Ischämie schädigt die CA1-Neurone des Hippocampus

Sieben Tage nach der globalen Ischämie ist die neuronale Schädigung in CA1-Band manifest. Während beim Kontrolltier alle Neurone intakt sind (A), sind die CA1-Neurone des ischämischen Gehirns stark geschädigt und erscheinen nach Kresylviolettacetat-Färbung intensiv rot (B, C); die CA2-Neurone dagegen sind nicht betroffen und infolge der Gegenfärbung mit Cölestinblau schwach bläulich gefärbt.

3.1.1 Einfluss von Pifithrin- α auf die neuronale Schädigung

Der p53-Antagonist Pifithrin- α konnte sowohl im Zellkulturmodell an embryonalen hippocampalen Neuronen der Ratte (Culmsee et al., 2001) neuroprotektive Wirkung zeigen, als auch im Tiermodell nach fokaler zerebraler Ischämie der Maus, wo er die Infarktgröße im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren reduzierte (Culmsee et al., 2001). Auf dieser Basis wurde untersucht, ob die Substanz auch bei der transienten Vorderhirnischämie der Ratte, also im Falle einer globalen statt einer fokalen Ischämie, neuroprotektiv wirkt.

Zu diesem Zweck wurde Pifithrin- α (2 mg/kg) eine Stunde vor Beginn der Ischämie intraperitoneal appliziert. Verglichen mit den Kontrolltieren war das Ausmaß der Schädigung im CA1-Band des Hippokampus nach Vorbehandlung mit Pifithrin- α signifikant reduziert (Abb. 3.1-2).

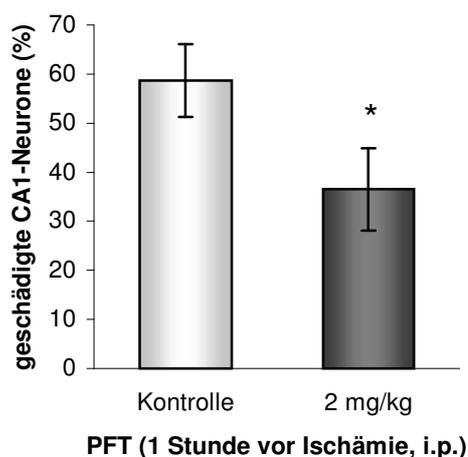


Abb. 3.1-2:

Protektiver Effekt von Pifithrin- α bei Applikation 1 h vor globaler Ischämie an der Ratte

Die Tiere wurden 1 Stunde vor Beginn der Ischämie mit 2 mg/kg PFT α i.p. behandelt. Kontrolltiere erhielten nur Vehikel (0,5% DMSO in NaCl 0,9%).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Zahl der geschädigten Neurone im CA1-Band des Hippocampus, 7 Tage nach der Ischämie. * $p < 0,05\%$ im Vergleich zur Kontrolle (unabhängiger t-Test nach Student).

3.1.2 Einfluss von Pifithrin- α auf die physiologischen Parameter

Als physiologische Parameter wurden das Körpergewicht, die Partialdrücke von O_2 und CO_2 im Blut, der pH-Wert des arteriellen Blutes sowie der mittlere arterielle Blutdruck gemessen.

3.1.2.1 Effekte auf das Körpergewicht

Das Gewicht der Ratten sowohl der Kontroll- als auch der Pifithrin-Gruppe wurde vor der Ischämie sowie sieben Tage nach dem Eingriff kurz vor Entnahme der Gehirne ermittelt. Dabei gab es bezüglich des Körpergewichts keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 3.1-3).

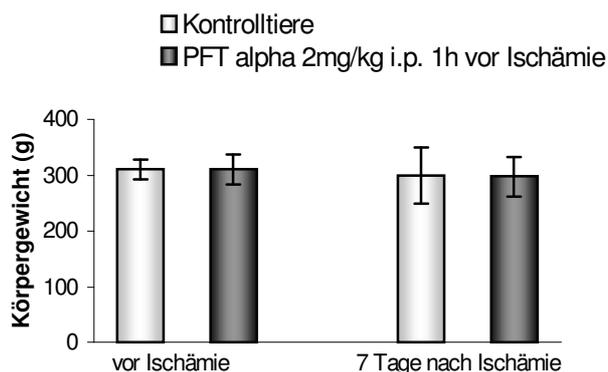


Abb. 3.1-3: Behandlung mit Pifithrin- α hat keinen Einfluss auf das Körpergewicht

Die Tiere wurden 1 h vor Ischämie mit 2 mg/kg Pifithrin- α i.p. behandelt; Kontrolltiere erhielten lediglich Vehikel (0,5% DMSO in NaCl 0,9%). Das Gewicht der Ratten wurde jeweils vor und 7 Tage nach der Ischämie ermittelt. Beide Male gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und Kontrolltieren. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.1.2.2 Effekte auf den Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck der Tiere wurde zu drei Zeitpunkten gemessen: Erstens zu Beginn des Eingriffs direkt nach Präparation des entsprechenden Katheters, zweitens unmittelbar vor Beginn der Ischämie und schließlich zehn Minuten nach Ende der Ischämie.

Pifithrin- α zeigte keinerlei Effekt auf den mittleren arteriellen Blutdruck (Abb. 3.1-4)

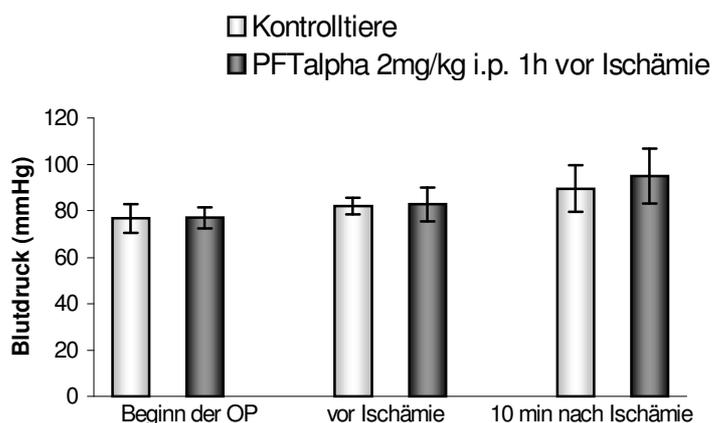


Abb. 3.1-4: Behandlung mit Pifithrin- α hat keinen Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck

Die Tiere wurden 1 h vor Ischämie mit 2 mg/kg Pifithrin- α i.p. behandelt; Kontrolltiere erhielten lediglich Vehikel (0,5% DMSO in NaCl 0,9%). Der Blutdruck der Ratten wurde jeweils zur Beginn der Operation, direkt vor und zehn Minuten nach der Ischämie gemessen. Dabei gab es zu keinem der drei Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen behandelten und Kontrolltieren. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.1.2.3 Effekte auf die physiologischen Blutparameter

Der pH-Wert des arteriellen Blutes wie auch die Partialdrücke von O₂ und CO₂ wurden jeweils vor und zehn Minuten nach Ischämie gemessen. Im Vergleich mit der Kontrolle hatte die Vorbehandlung mit Pifithrin keine Effekte auf die entsprechenden Parameter (Tab. 3.1-1).

Tab. 3.1-1: Effekt von Pifithrin- α auf pO₂, pCO₂ und pH-Wert bei der globalen Ischämie

	pO ₂ (mmHg)	pCO ₂ (mmHg)	pH
Kontrollgruppe			
vor Ischämie	137 ± 25	45 ± 5	7,35 ± 0,04
10 min nach Ischämie	176 ± 26	44 ± 6	7,37 ± 0,02
PFTα (2 mg/kg i.p., 1 h vor Ischämie)			
vor Ischämie	140 ± 27	42 ± 7	7,35 ± 0,03
10 min nach Ischämie	186 ± 24	40 ± 4	7,38 ± 0,02

Die Partialdrücke von Sauerstoff (pO₂) und Kohlendioxid (pCO₂) sowie der Blut-pH wurden vor der Ischämie sowie 10 min nach Ende der Ischämie gemessen. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und solchen mit Pifithrin α -Behandlung festgestellt. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.2 Expression von PP2C α , PP2C β und Bad in SH-SY5Y-Zellen und in embryonalen kortikalen Neuronen der Ratte

3.2.1 Expression von PP2C α und PP2C β

PP2C α und PP2C β sind zwei Isoenzyme der Proteinphosphatase 2C; beide werden *in vitro* durch bestimmte Fettsäuren aktiviert (Klumpp et al., 1998). Vor der Erforschung ihrer Rolle in der Apoptose musste zunächst ihre Expression in den verwendeten Zellen überprüft werden. Dazu dienten gereinigte polyklonale Antikörper gegen PP2C α bzw. PP2C β ; beide stammen aus dem Labor von Prof. S. Klumpp, die sie für die vorliegende Arbeit großzügig zur Verfügung stellte.

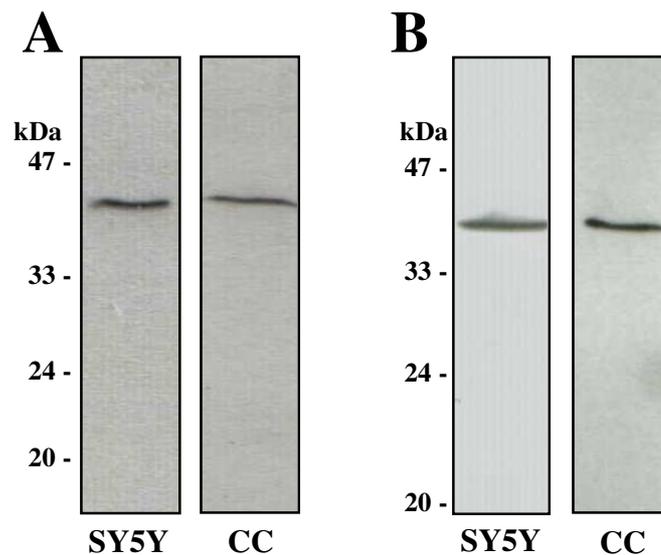


Abb. 3.2-1: Western Blot-Detektion von PP2C α und PP2C β in SH-SY5Y-Zellen und in kortikalen Neuronen

Sowohl in SH-SY5Y-Zellen als auch in embryonalen kortikalen Neuronen wurde PP2C α als einzelnes Signal bei etwa 45 kDa detektiert (A). Auch der Antikörper gegen PP2C β war sehr spezifisch und lieferte eine einzelne Bande bei etwa 42 kDa (B).

Für die in etwa gleiche Signalintensität des Antikörpers gegen PP2C α (vgl. Abb. 3.2-1(A)) in den beiden Systemen sind allerdings unterschiedliche Proteinmengen nötig: bei den abgebildeten Western Blots wurden für SH-SY5Y 25 μ g, für die kortikalen Neuronen dagegen 70 μ g Gesamtprotein eingesetzt; Grund für das schlechtere Erkennen sind geringfügige Unterschiede in den Aminosäuresequenzen.

Der Antikörper wurde ursprünglich gegen die bovine Sequenz entwickelt (Klump und Selke, 2000). Die ist identisch mit der humanen; die Sequenzen aus Maus und Ratte jedoch unterscheiden sich an Position 376, wo Threonin durch Alanin ersetzt ist (Abb. 3.2-2). Trotzdem ist der Antikörper auch zur Detektion der Ratten- PP2C α geeignet, was die Blots aus Abb. 3.2-1 (A) belegen.

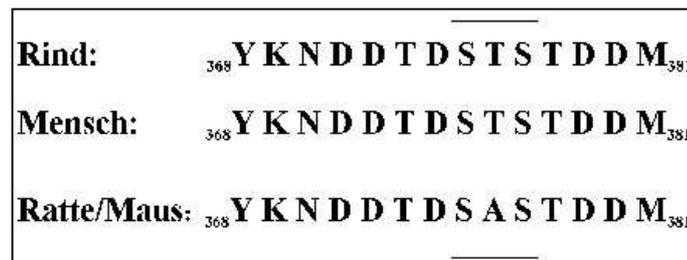


Abb. 3.2-2: Vergleich der PP2C α -Sequenzen aus verschiedenen Spezies

Die Antikörper gegen PP2C α bzw. PP2C β sind so spezifisch, dass beide Isoformen in SH-SY5Y-Zellen auch gleichzeitig nebeneinander detektiert werden konnten (Abb. 3.2-3):

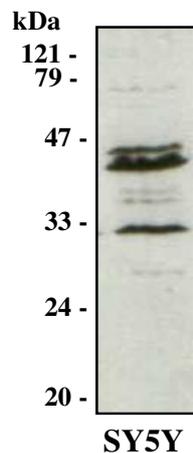


Abb. 3.2-3:

PP2C α und β sind in SH-SY5Y-Zellen gleichzeitig detektierbar

Die zusätzliche Bande bei 32 kDa rührt daher, dass PP2C α in Anlehnung an (Klump und Selke, 2000) nicht mit dem gereinigten Antikörper, sondern mit dem Serum (1:50.000) detektiert wurde.

3.2.2 Expression von Bad

Das proapoptotische Protein Bad ist ein Substrat der Proteinphosphatase 2C (Klumpff et al., 2003) und möglicher Mittler zwischen ihr und dem apoptotischen Zelltod.

Durch Western Blotting und anschließende Detektion mit einem Antikörper gegen Bad wurde dessen Expression in SH-SY5Y-Zellen wie auch in den kortikalen embryonalen Neuronen bestätigt (Abb. 3.2-4).

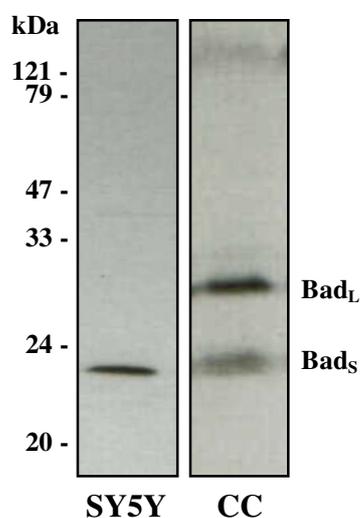


Abb. 3.2-4:

Western Blot-Detektion von Bad in SH-SY5Y-Zellen und kortikalen Neuronen
In beiden Systemen ist Bad sehr spezifisch detektierbar; in den humanen SH-SY5Y-Zellen als singuläre Bande bei 23 kDa, in den Rattenneuronen als doppelte Bande bei 23 bzw. 27 kDa, entsprechend den beiden Spleißvarianten Bad_L und Bad_S (Hamnér et al., 2001, Danial et al., 2003)

3.2.3 Immunzytochemische Detektion von PP2C α , PP2C β und Bad

Damit zwei Proteine miteinander interagieren können, müssen sie in räumlicher Nähe zueinander vorliegen. Darum wurde im nächsten Schritt die Lokalisation der PP2C-Isoformen α und β sowie von Bad innerhalb der Zellen untersucht.

Dazu wurden die gleichen PP2C-Antikörper wie bei der Western Blot-Detektion benutzt; die Verwendung eines monoklonalen Bad-Antikörpers aus der Maus (Abb. 3.2-5) statt des üblicherweise verwendeten polyklonalen aus dem Kaninchen ermöglichte die gleichzeitige immunzytochemische Detektion von PP2C β und Bad.

Die Färbungen zeigten, dass alle drei Proteine im Zytoplasma vorliegen; PP2C β wird darüber hinaus auch noch im Kern exprimiert.

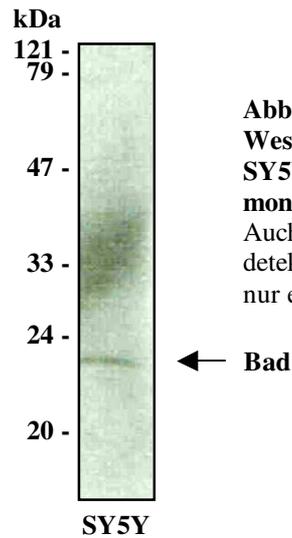


Abb. 3.2-5:
Western Blot-Detektion von Bad in SH-SY5Y-Zellen mit Hilfe eines monoklonalen Bad-Antikörpers
 Auch der monoklonale Antikörper detektiert Bad sehr spezifisch und liefert nur eine einzelne Bande bei 23 kDa.

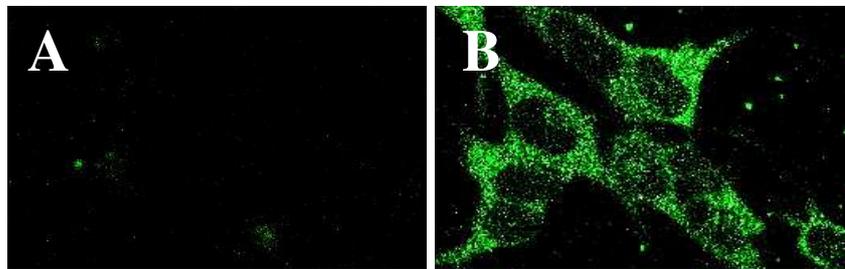


Abb. 3.2-6: PP2C α ist im Zytoplasma von SH-SY5Y-Zellen lokalisiert
 Die Immunfärbung zeigt, dass die PP2C α sich im Zytosol der SH-SY5Y-Zellen befindet; der Kern ist deutlich ausgespart (B). Für die Kontrolle (A) wurden die Zellen ohne Erstantikörper inkubiert, um unspezifische Signale durch den Zweitantikörper bzw. durch Autofluoreszenz auszuschließen.

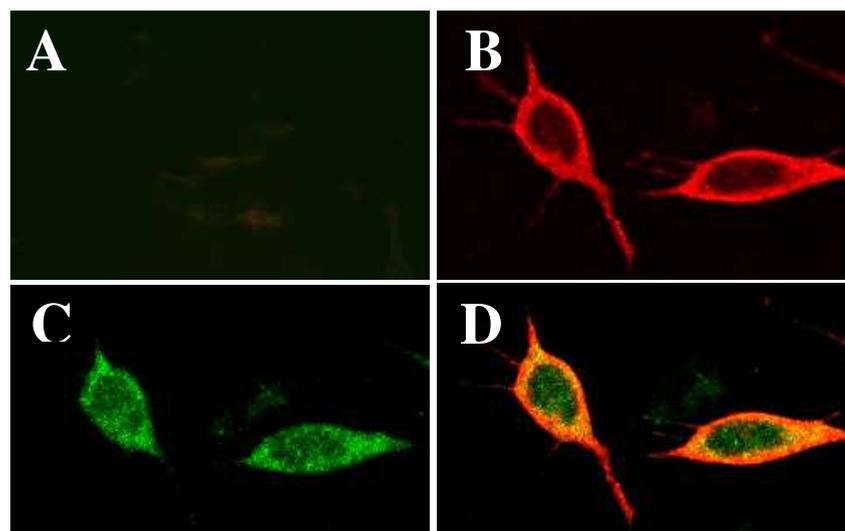


Abb. 3.2-7: Bad ist im Zytoplasma, PP2C β im Zytoplasma und in geringeren Maß im Nukleus von SH-SY5Y-Zellen lokalisiert
 Die Doppelfärbung zeigte die gemeinsame Lokalisation von Bad (B) und PP2C β (C) im Zytoplasma von SH-SY5Y-Zellen; die PP2C β ist außerdem im Kern vorhanden. Abb. (D) zeigt die Überlagerung beider Aufnahmen. Die Kontrolle (A) wurde ohne den Erstantikörper inkubiert.

3.2.4 Staurosporindifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen hat keinen Einfluss auf die Expression von PP2C α , PP2C β und Bad

Differenzierung beeinflusst die Expression diverser Proteine in den Zellen; dazu gehören neben neuronalen Markern wie Neuropeptid Y oder GAP-43 auch apoptoserelevante Proteine wie Bcl-2 und p53 (Tieu et al., 1999).

Daher wurde auch überprüft, ob sich die Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen auf die Spiegel der Proteinphosphatase 2C oder Bad auswirkt.

3.2.4.1 Staurosporin induziert die Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen

Staurosporin, ein nicht-selektiver Proteinkinase-Inhibitor (Herbert et al., 1990) aus *Streptomyces* spp. (Omura et al., 1977) induziert dosisabhängig Apoptose in vielen Zelltypen, auch in SH-SY5Y-Zellen (Abb. 3.2-8).

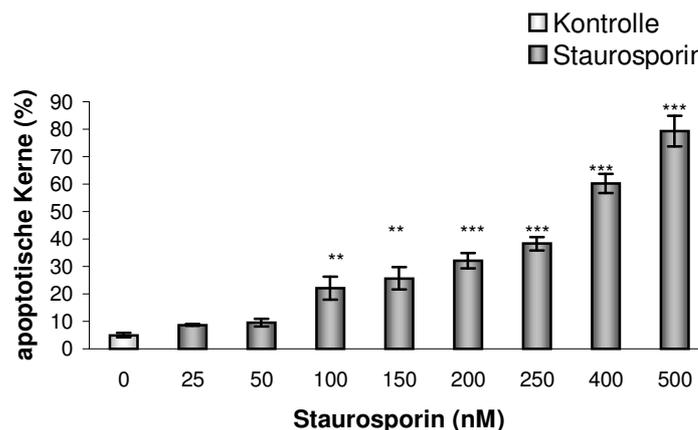
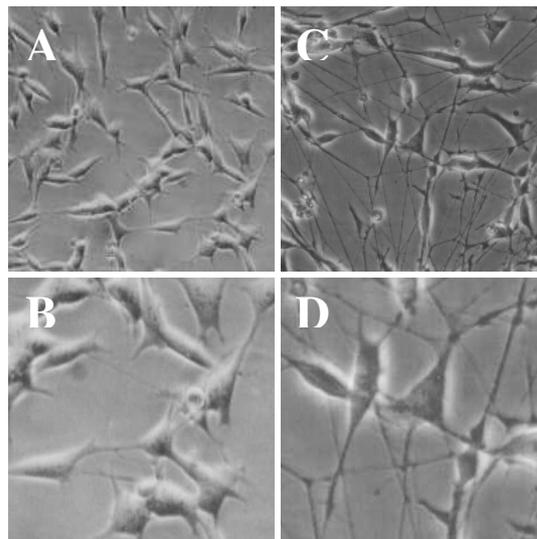


Abb. 3.2-8: Staurosporin induziert konzentrationsabhängig Apoptose in SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 Stunden mit Staurosporin in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt, die Kontrolle wurde lediglich mit Vehikel inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert, mit Hoechst 33258 angefärbt und der Anteil der apoptotischen Kerne unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Kerne in Prozent \pm Standardabweichung. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Verwendet man Staurosporin in geringen Konzentrationen, so bleibt die massive Apoptose aus; stattdessen stoppt die Proliferation, und die Zellen differenzieren (Jalava et al., 1992; Prince und Orelund, 1997). Die kleinen Ausläufer der Zellen verlängern sich deutlich und bilden schließlich ein dichtes Netzwerk, das dem von Neuronen ähnelt (Abb. 3.2-9).

**Abb. 3.2-9:****Morphologischer Vergleich von undifferenzierten und differenzierten SH-SY5Y-Zellen**

SH-SY5Y-Zellen wurden zur Differenzierung mit 30 nM Staurosporin inkubiert. Nach fünf Tagen hatte sich das Aussehen der Zellen deutlich gewandelt: Verglichen mit nicht differenzierten Zellen (A, B) bildeten die staurosporinbehandelten ein dichtes Netzwerk aus (C, D).

3.2.4.2 Vergleich der Expressionsniveaus von PP2C α , PP2C β und Bad

Der Western Blot zeigte keine differenzierungsbedingte Veränderung der PP2C α -, PP2C β - oder Bad-Menge in der Zelle (Abb. 3.2-10). Die Doppelfärbung von PP2C β und Bad bestätigte diesen Befund (Abb. 3.2-11).

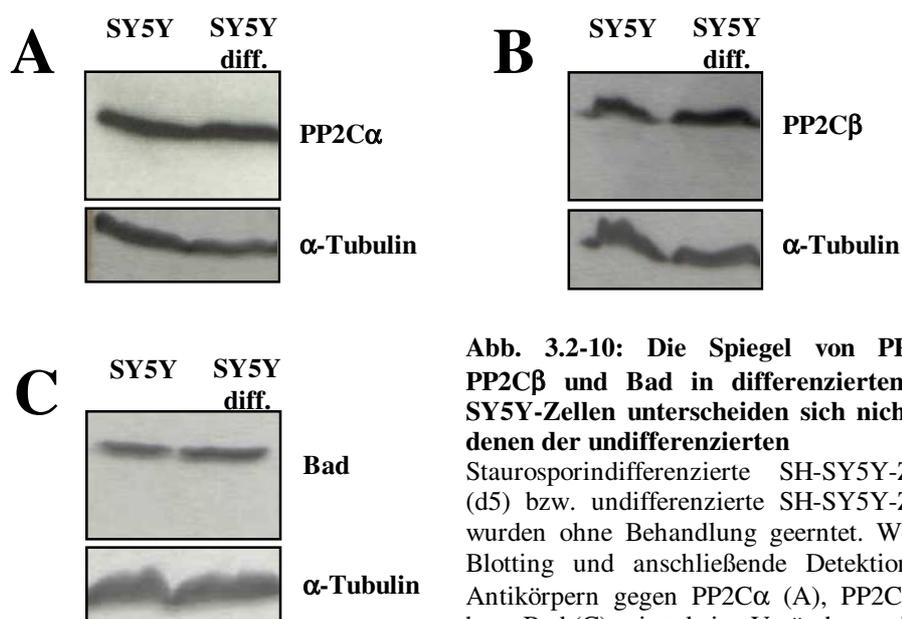


Abb. 3.2-10: Die Spiegel von PP2C α , PP2C β und Bad in differenzierten SH-SY5Y-Zellen unterscheiden sich nicht von denen der undifferenzierten

Staurosporindifferenzierte SH-SY5Y-Zellen (d5) bzw. undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen wurden ohne Behandlung geerntet. Western Blotting und anschließende Detektion mit Antikörpern gegen PP2C α (A), PP2C β (B) bzw. Bad (C) zeigte keine Veränderung in den Expressionsniveaus der jeweiligen Proteine.

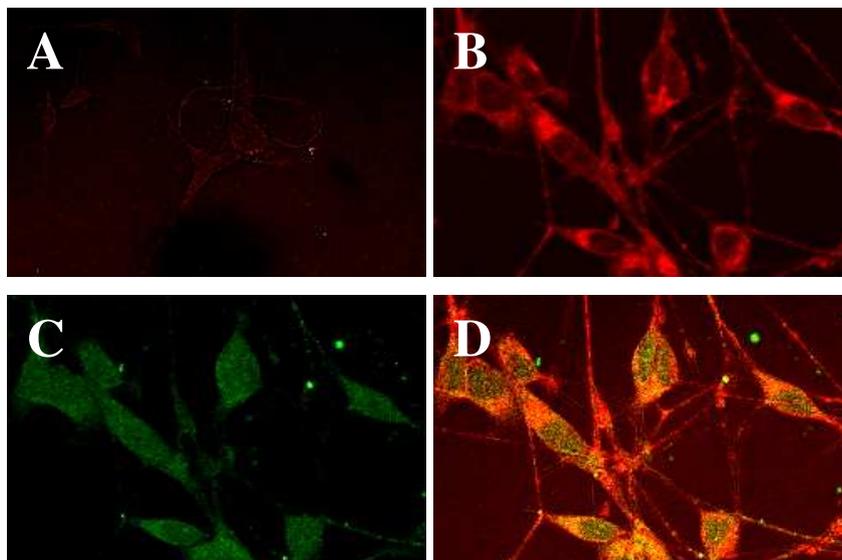


Abb. 3.2-11: Doppelfärbung von PP2C β und Bad in differenzierten SH-SY5Y-Zellen

Doppelfärbung von staurosporindifferenzierten SH-SY5Y-Zellen (d5) zeigte das gemeinsame Vorkommen von Bad (B) und PP2C β (C) im Zytoplasma. Die PP2C β ist außerdem im Kern vorhanden; in den Zellausläufern ist sie dagegen, anders als Bad, kaum detektierbar. (D) zeigt die Überlagerung beider Aufnahmen. Die Kontrolle (A) wurde ohne den Erstantikörper inkubiert.

3.3 Etablierung eines Modells zur Ölsäureschädigung von SH-SY5Y-Zellen

3.3.1 Effekte der Ölsäure in Gegenwart von Serum

Behandlung mit Ölsäure in Konzentrationen ab etwa 100 μM in serumfreiem Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) löst in Hühnerembryoneuronen dosisabhängig Apoptose aus (Klumpp et al., 2002). Den gleichen Effekt hat die Ölsäure auf embryonale kortikale Neurone der Ratte – allerdings nur dann, wenn das Kulturmedium keinen BSA-haltigen B27-Zusatz enthält (Grzeschik, 2003).

Dies legt nahe, dass Ölsäure in Gegenwart von Serum bzw. Serumbestandteilen nicht schädigt; zur Überprüfung dieses Sachverhaltes am Modell der SH-SY5Y-Zellen wurde zunächst eine Behandlung mit unterschiedlichen Ölsäurekonzentrationen in Kulturmedium mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Effekte der Ölsäure auf die Zellen (Abb. 3.3-1).

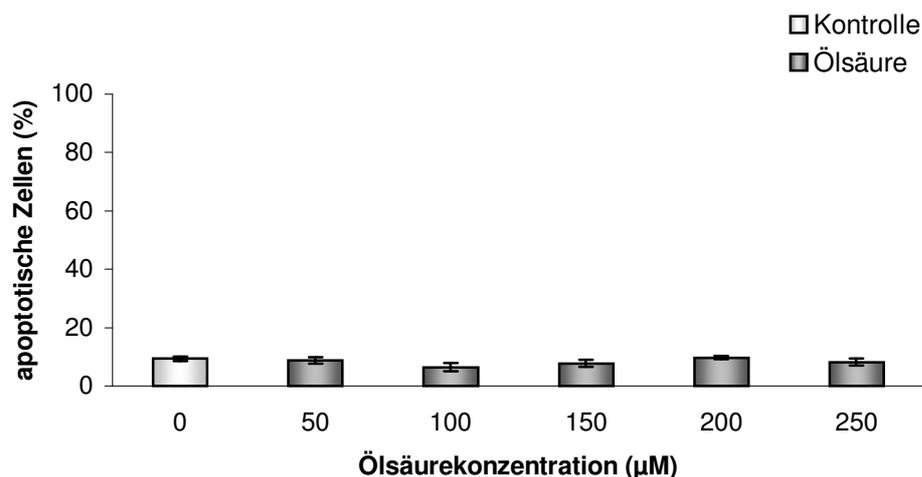


Abb. 3.3-1: Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen in Gegenwart von Serum

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Ölsäure in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Verwendet wurde das übliche Kulturmedium mit einem Serumgehalt von 10%. Die Kontrollgruppe wurde mit Vehikel inkubiert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit Hoechst 33258 angefärbt. Durch die Behandlung wurde die Zahl der apoptotischen Zellen nicht erhöht. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellkerne in Prozent \pm Standardabweichung.

3.3.2 Effekte der Ölsäure bei reduziertem Serumgehalt

Die Schädigung mit Ölsäure in Gegenwart von Serum war somit auch hier nicht möglich. Bevor allerdings die Behandlung in serumfreiem Medium erfolgte, musste zuerst ausgeschlossen werden, dass der Serumentzug für sich alleine bereits toxisch ist. Daher wurde im nächsten Schritt die Auswirkung des Serumentzugs auf SH-SY5Y-Zellen untersucht.

Das gewöhnliche Kulturmedium enthält 10% (v/v) FCS. Während des Versuchs wurden die Zellen über einen Zeitraum von 48 Stunden mit Kulturmedium inkubiert, dem geringere Mengen Serum zugesetzt worden waren. Der Konzentrationsbereich variierte dabei von 0 bis 5%, eine Kontrollgruppe wurde in normalem Medium mit 10% FCS kultiviert.

Es zeigte sich, dass die Zellen den Serumentzug ohne Probleme überstanden und sich die Zahl der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Gruppe mit Medium mit normalem Serumgehalt (10%) nicht erhöht hatte (Abb. 3.3-2).

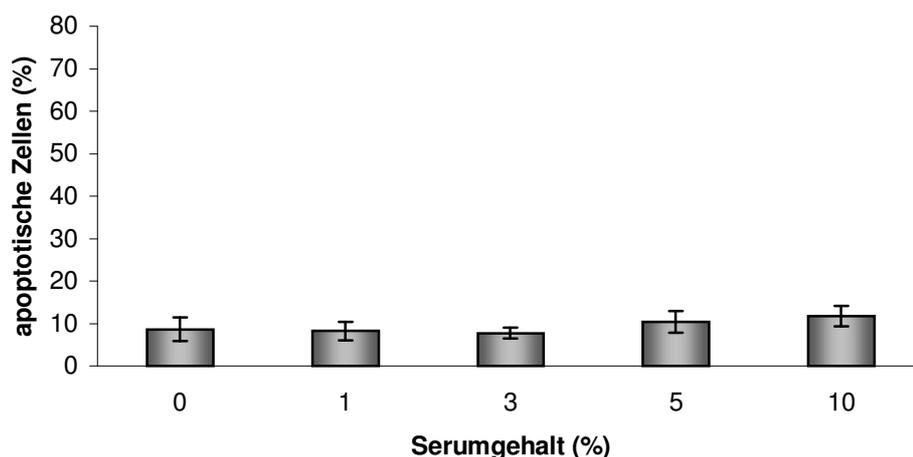


Abb. 3.3-2: Reduktion des Serumanteils im Kulturmedium über 48 Stunden hat keinen schädigenden Effekt auf SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Kulturmedium inkubiert, das unterschiedliche Mengen an Serum enthielt, wobei der Konzentrationsbereich vom kompletten Serumentzug bis zum normalen Kulturmedium mit einem Serumanteil von 10% reichte. Nach 48 Stunden wurde fixiert und die Kerne mit Hoechst 33258 gefärbt. Der Anteil der apoptotischen Zellen erhöhte sich dabei durch den Serumentzug nicht. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen \pm Standardabweichung in Prozent.

Im folgenden Versuch wurde der Serumentzug mit einer Ölsäurebehandlung kombiniert, um herauszufinden, wie groß der Einfluss der Serumkonzentration auf die Effekte der Ölsäure ist. Die Ansätze erhielten auch diesmal unterschiedliche Konzentrationen an Serum, kombiniert mit 200 μ M Ölsäure.

Nach sechsständiger Behandlung zeigte sich, dass sich die Zahl der apoptotischen Zellen nur bei völligem Verzicht auf Serum signifikant erhöht hatte (Abb. 3.3-3). Im gewählten Konzentrationsbereich gab es auch keinen erkennbaren linearen Zusammenhang zwischen FCS-Anteil und Ölsäureeffekt: Schon eine Serumgehalt von nur 1% verhinderte die Apoptoseinduktion, und der Anteil geschädigter Zellen lag auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

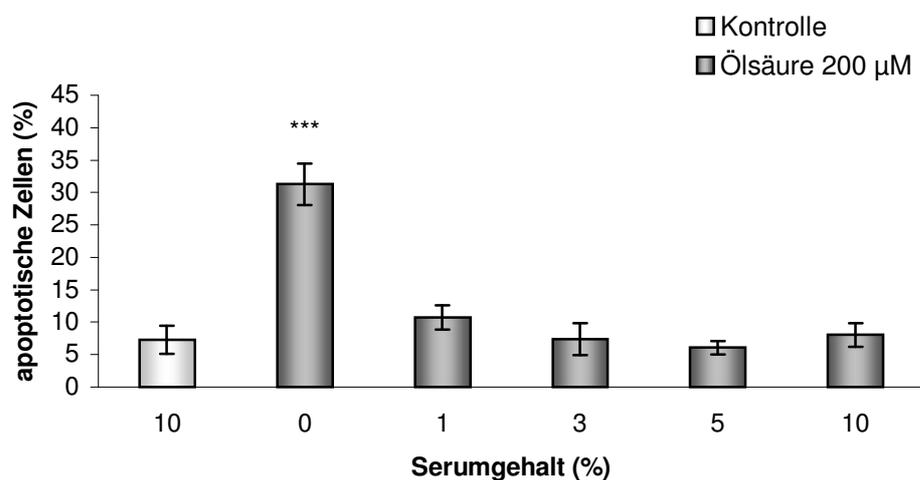


Abb. 3.3-3: Effekt der Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen in Abhängigkeit von der Serumkonzentration

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Medium inkubiert, das neben unterschiedlichen Mengen Serum auch 200 μ M Ölsäure enthielt; bei der Kontrollgruppe wurde dem Medium 0,2% DMSO zugesetzt. Nach 6 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit Hoechst 33258 gefärbt. Die Ölsäurebehandlung führte nur dann zu einem signifikanten Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen, wenn sie in serumfreiem Medium durchgeführt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Kerne \pm Standardabweichung in Prozent. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.3 Morphologie der SH-SY5Y-Zellen nach Ölsäurebehandlung

Die Behandlung mit Ölsäure hatte deutliche Auswirkungen auf das Aussehen der SH-SY5Y-Zellen. Normalerweise sind die Zellen länglich polygonal und besitzen kleinere Ausläufer. Nach der Behandlung mit Ölsäure zeigten sich im Zytosol kleine Fetttropfchen, die Zellen wurden zunehmend runder und begannen zu schrumpfen (Abb. 3.3-4).

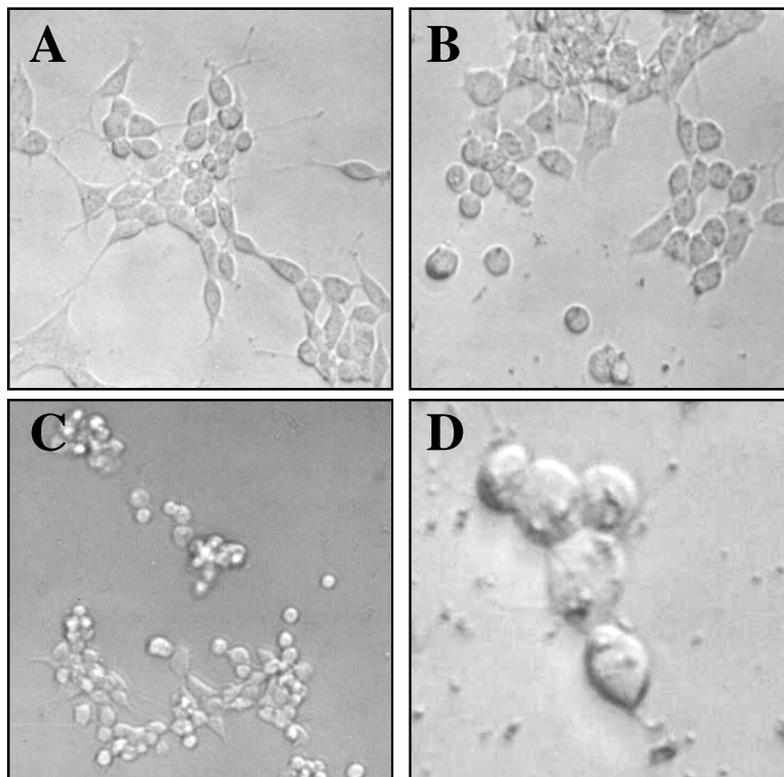


Abb. 3.3-4: Morphologische Veränderungen von SH-SY5Y-Zellen nach Behandlung mit Ölsäure

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 150 μ M Ölsäure in serumfreiem Medium/0,15% DMSO behandelt; die Kontrollgruppe (A) wurde lediglich mit Vehikel inkubiert. Nach drei Stunden waren behandelte Zellen bereits deutlich runder und hatten zu schrumpfen begonnen (B); der Effekt war nach sechs Stunden noch deutlicher zu erkennen (C; D). Die Kontrollzellen hingegen behielten ihre ursprüngliche Gestalt.

3.3.4 Nilblaufärbung von SH-SY5Y-Zellen nach Ölsäurebehandlung

Soll die Ölsäure in der Zelle einen Effekt auslösen, muss sie zunächst ins Innere der Zelle gelangen. Um dies zu demonstrieren, wurden SH-SY5Y-Zellen nach der Behandlung mit 150 μM Ölsäure mit Nilblau gefärbt, das mit Lipiden und Fettsäuren interagiert (Dunningham, 1968; Ostle and Holt, 1982). Anschließend konnte durch Fluoreszenzdetektion mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop gezeigt werden, dass die Ölsäure rasch in die Zelle aufgenommen wurde und sich im Zytosol Fetttröpfchen bildeten.

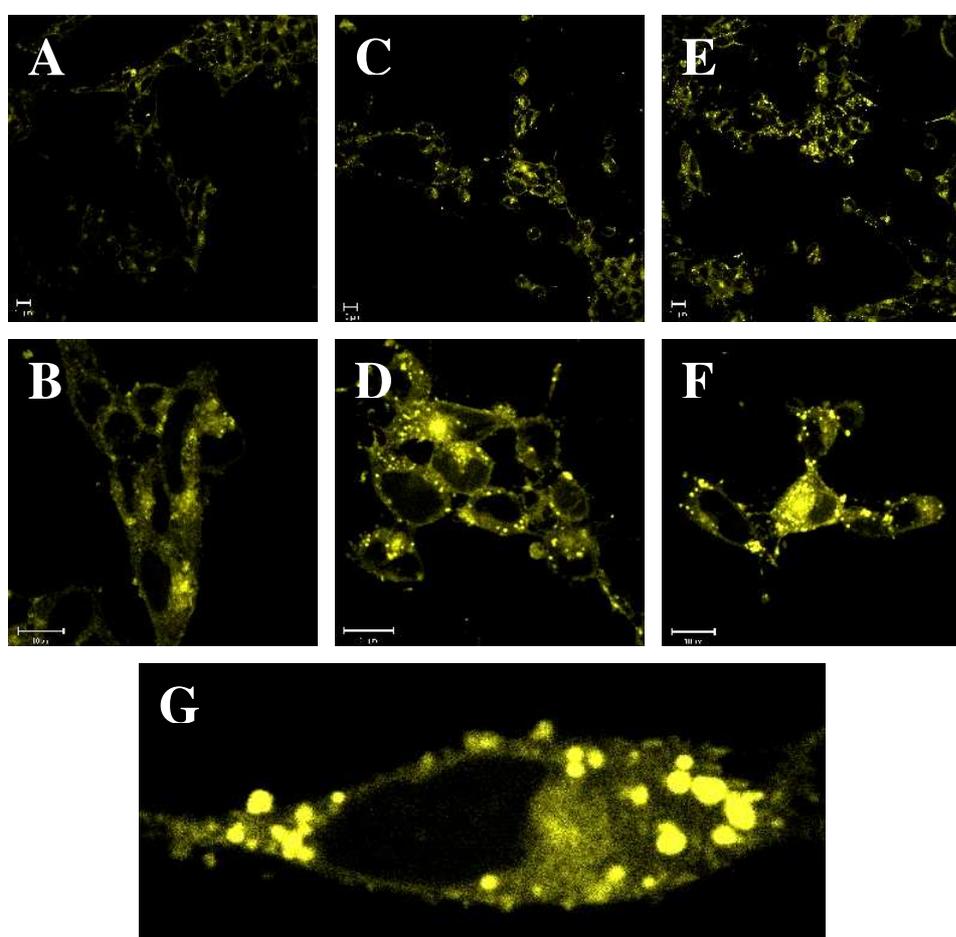


Abb. 3.3-5: Aufgenommene Ölsäure bildet Lipidtröpfchen im Zytosol von SH-SY5Y-Zellen
SH-SY5Y-Zellen wurden nach der Behandlung mit Ölsäure 150 μM in serumfreiem Medium fixiert und mit Nilblau angefärbt. Die Aufnahmen des konfokalen Laserscanning-Mikroskops (Helium-Neon-Laser) zeigen, dass die Ölsäure in die Zellen aufgenommen wurde. Die Kontrolle (A, B), die mit Vehikel behandelt worden war, zeigte nur eine leichte, durch endogene Fettsäuren bedingte Färbung. Im Zytosol der ölsäurebehandelten Zellen dagegen waren bereits nach einer (C, D) bzw. nach zwei (E-G) Stunden stark fluoreszierende Lipidtröpfchen zu erkennen.

3.3.5 Zeitabhängigkeit der Ölsäurewirkung auf SH-SY5Y-Zellen

Die Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen von rund 7 auf etwa 32% wurde durch sechsstündige Behandlung mit Ölsäure erreicht. Im folgenden wurde nun der Frage nachgegangen, ob der Effekt zeitabhängig ist und längere Inkubation zu höherer Schädigung führt.

Erneut wurden SH-SY5Y-Zellen mit 200 μ M Ölsäure in serumfreiem Medium; behandelt; zusätzlich wurden die Zellen zwischen Entfernen des normalen Kulturmediums und Zugabe des Ölsäuremediums mit serumfreiem Medium gespült, um den Zellen anhaftende Serumreste zu entfernen. Dies führte zu einer weiteren Erhöhung der Apoptoserate nach 6 Stunden auf nun etwa 50% (Abb. 3.3-6). Außerdem ist die Ölsäureschädigung deutlich zeitabhängig: Die Färbung mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33258 zeigte, dass die Induktion von Apoptose bereits nach drei Stunden signifikant war, und sich der Anteil der apoptotischen Zellen verglichen mit dem der serumfrei inkubierten Kontrollgruppe nach 24 Stunden auf rund 80% erhöht hatte.

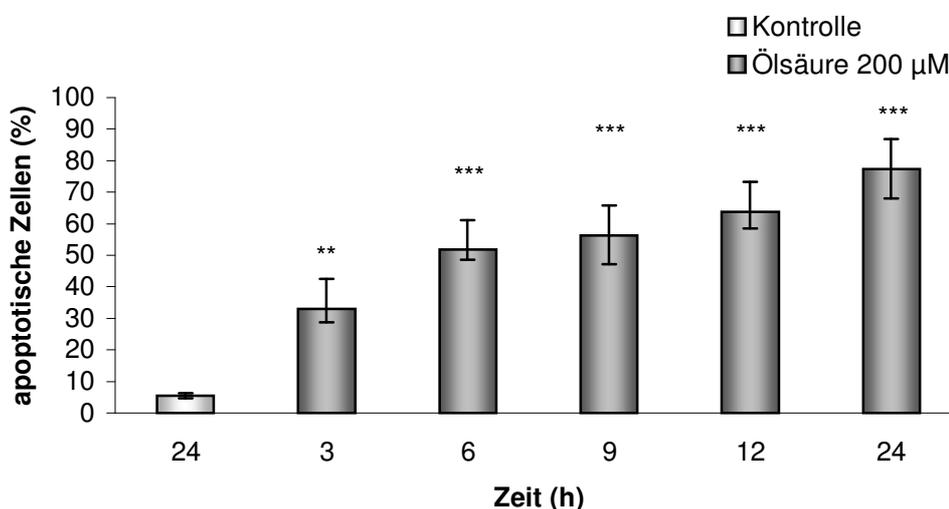


Abb. 3.3-6: Ölsäure induziert in Abhängigkeit von der Zeit Apoptose in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit 200 μ M Ölsäure in serumfreiem Kulturmedium behandelt. Die Kontrolle wurde mit Vehikel (serumfreies Medium mit 0,2% DMSO) inkubiert. Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 zeigte einen signifikanten, zeitabhängigen Anstieg apoptotischer Zellkerne im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen \pm Standardabweichung in Prozent. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.6 Konzentrationsabhängigkeit der Ölsäurewirkung auf SH-SY5Y-Zellen

In einem weiteren Versuch wurde nun die Konzentrationsabhängigkeit der Ölsäurewirkung untersucht. Die Behandlung der SH-SY5Y-Zellen erfolgte wie oben in serumfreiem Medium, allerdings mit unterschiedlichen Mengen Ölsäure. Die Zellen wurden nach 24 Stunden fixiert und mit Hoechst 33258 gefärbt. Es zeigte sich, dass das Ausmaß der Schädigung auch von der Konzentration der Ölsäure abhängig ist: Während 50 μM noch keine Apoptose auslösten, war sie bei 100 μM bereits hochsignifikant und stieg bei höheren Konzentrationen auf Werte zwischen 70 und 80% (Abb. 3.3-7). Dies wurde schon bei 150 μM erreicht; höhere Ölsäurekonzentrationen konnten das nicht mehr steigern.

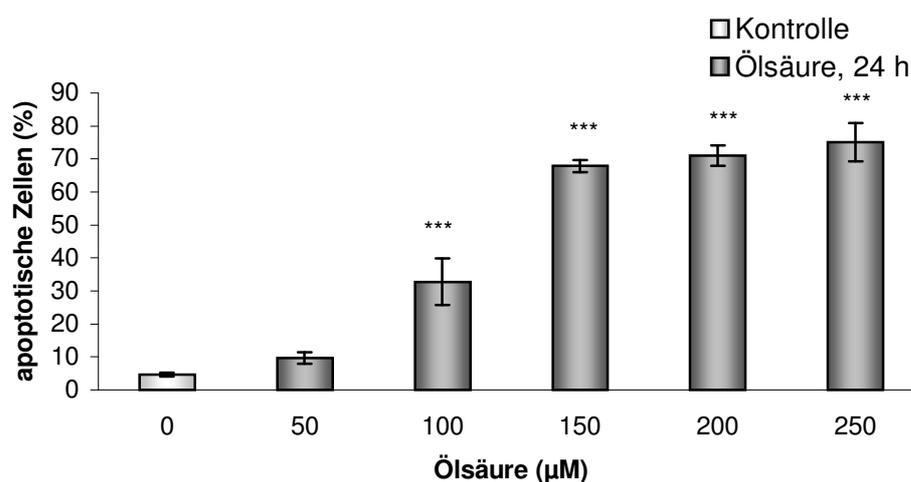


Abb. 3.3-7: Ölsäure induziert in Abhängigkeit von der Konzentration Apoptose in SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen Ölsäure in serumfreiem Kulturmedium behandelt. Die Kontrolle wurde mit Vehikel (serumfreies Medium mit 0,2% DMSO) inkubiert. Färbung der Kerne mit Hoechst 33258 zeigte einen signifikanten, konzentrationsabhängigen Anstieg apoptotischer Zellkerne nach der Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen \pm Standardabweichung in Prozent. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.7 Vergleich der Ölsäureeffekte auf SH-SY5Y-Zellen und embryonale kortikale Rattenneuronen

Behandlung mit Ölsäure induziert auch in embryonalen kortikalen Rattenneuronen zeit- und konzentrationsabhängig Apoptose (Grzeschik, 2003). Beim Vergleich der Ölsäureeffekte auf die Neuroblastomzellen mit denen auf die Neurone waren keine prinzipiellen Unterschiede erkennbar (Abb. 3.3-8).

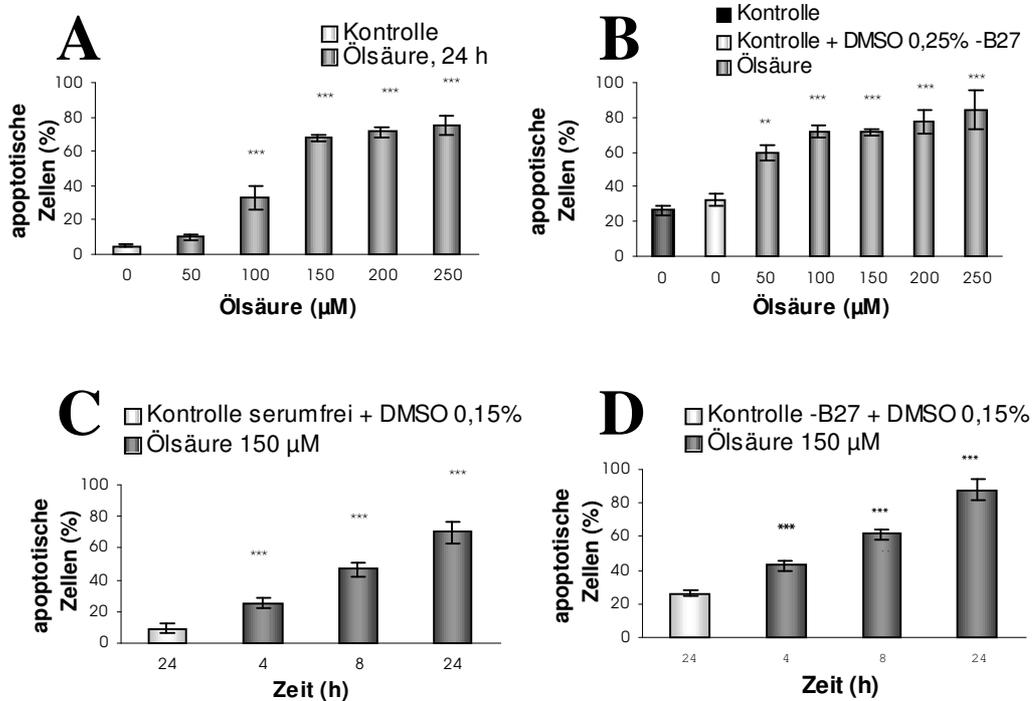


Abb. 3.3-8: Vergleich der Ölsäureeffekte auf SH-SY5Y-Zellen und kortikale Neurone

Die Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen über 24h (A) führte konzentrationsabhängig zum Anstieg der apoptotischen Zellen. Die gleiche Behandlung führte in embryonalen kortikalen Rattenneuronen zu einem entsprechenden Ergebnis (B). Die Kontrolle wurde jeweils mit Vehikel behandelt, bei (B) wurde zusätzlich eine Kontrollgruppe mit Neurobasalmedium mit B27-Zusatz inkubiert. Ebenfalls vergleichbar ist die Zeitabhängigkeit der Schädigung mit 150 µM Ölsäure; der Anteil apoptotischer Zellen war sowohl in SH-SY5Y-Zellen (C) als auch in den Neuronen (D) bereits nach 4 Stunden hochsignifikant.

Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent \pm Standardabweichung. ** $p < 0,01$, *** $p > 0,001$, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.8 Untersuchung der Caspase 3-Aktivierung nach Ölsäurebehandlung

Obwohl der zelluläre Selbstmord prinzipiell auch ohne Caspase 3 ablaufen kann, ist deren Aktivierung doch ein eindeutiger Hinweis auf Apoptose. Diese Aktivierung zeigt sich üblicherweise in einer Zunahme der reifen Caspase 3 (Cohen, 1997).

Nach der Behandlung embryonaler kortikaler Neurone mit 150 μ M Ölsäure war in der Frühphase der Schädigung keine Aktivierung der Caspase 3 zu erkennen; nach 24 Stunden allerdings wurde eine deutliche Zunahme des reifen Enzyms beobachtet (Abb. 3.3-9): Die Caspase 3 war aktiviert.

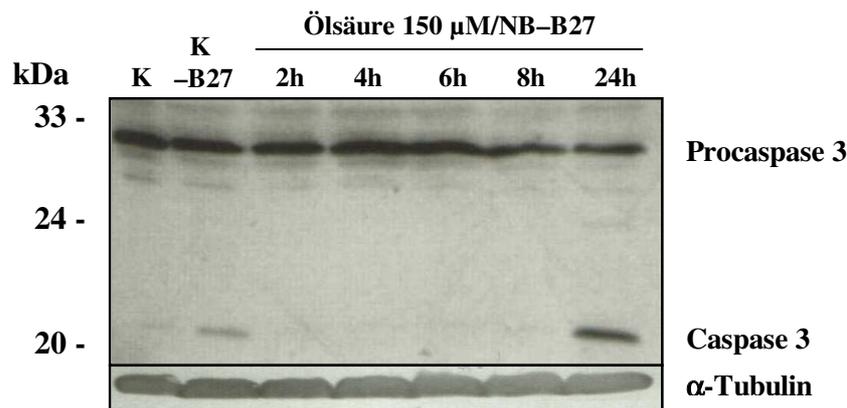


Abb. 3.3-9: Späte Aktivierung von Caspase-3 in embryonalen kortikalen Neuronen nach Behandlung mit Ölsäure 150 μ M

In den ersten acht Stunden nach Beginn der Behandlung sowie in der mit normalem Kulturmedium inkubierten Kontrollgruppe war zwar die inaktive Procaspase 3 detektierbar, nicht aber die apoptoserelevante Caspase 3 selbst. Nach 24 Stunden war in der Kontrollgruppe ohne B27 etwas reife Caspase 3 zu erkennen; in der ölsäurebehandelten Gruppe war sie deutlich aktiviert.

3.3.9 Detektion von PP2C α , PP2C β und Bad nach Ölsäurebehandlung

Um zu überprüfen, ob die ölsäurevermittelte Aktivierung der PP2C *in vivo* zu einer Veränderung ihrer Expression führt, wurden PP2C α und PP2C β in Lysaten entsprechend behandelter Zellen durch Western Blotting detektiert.

Weder in SH-SY5Y-Zellen noch in embryonalen kortikalen Neuronen bewirkte die Ölsäurebehandlung eine Veränderung der Expression von PP2C α (Abb. 3.3-10) oder PP2C β (Abb. 3.3-11).

Auch die Untersuchung des PP2C-Substrates Bad zeigte keine Veränderung der Proteinmenge nach Ölsäurebehandlung (Abb. 3.3-12).

Neben der Detektion der genannten Proteine mittels Western Blotting wurde auch eine immunzytochemische Doppelfärbung von PP2C β und Bad in ölsäurebehandelten SH-SY5Y-Zellen durchgeführt (Abb. 3.3-13). Eine Regulation war auch hier nicht erkennbar.

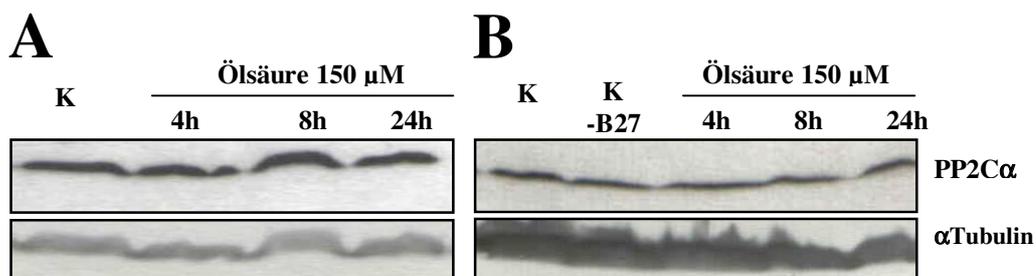


Abb. 3.3-10: Die Western Blot-Detektion nach Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen oder embryonalen kortikalen Neuronen zeigte keine Regulation der PP2C α

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 150 μ M Ölsäure in serumfreiem Medium behandelt; die Kontrollgruppe wurde mit serumfreiem Medium + 0,15% DMSO inkubiert. Die Western Blot-Detektion von PP2C α zeigte keine Veränderung der Proteinmenge im Verlauf der Ölsäurebehandlung (A). Auch in embryonalen kortikalen Neuronen blieb der PP2C α Spiegel während der Ölsäurebehandlung unverändert (B).

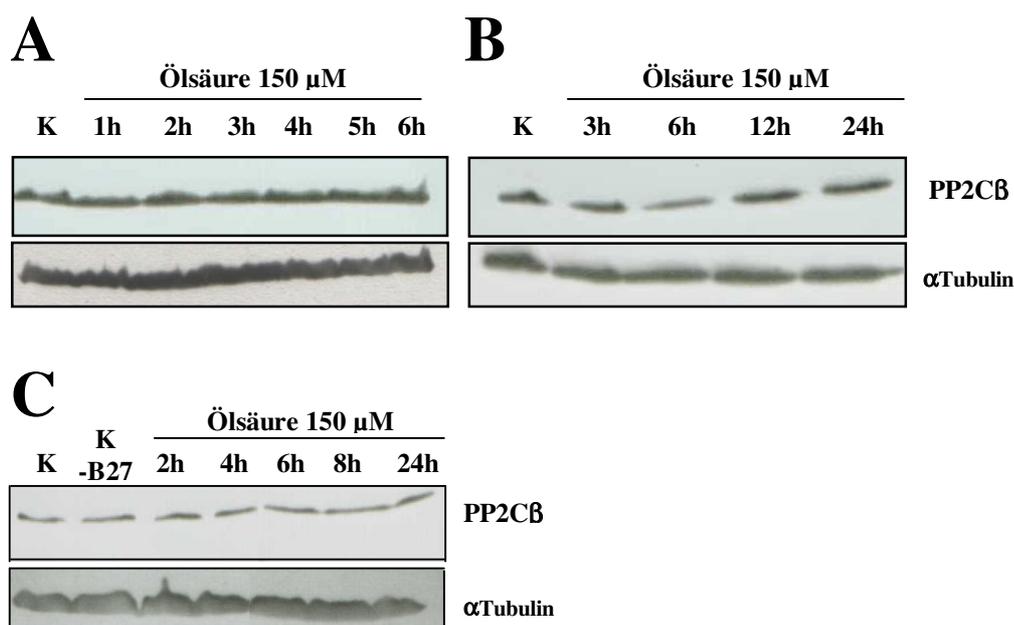


Abb. 3.3-11: Die Western Blot-Detektion nach Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen oder embryonalen kortikalen Neuronen zeigte keine Regulation der PP2Cβ

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 150 μM Ölsäure in serumfreiem Medium behandelt; die Kontrollgruppe wurde mit serumfreiem Medium + 0,15% DMSO inkubiert. Die Western Blot-Detektion von PP2Cβ ließ weder in der Frühphase der Schädigung (A) noch zu späteren Zeitpunkten (B) eine Regulation erkennen. Auch in embryonalen kortikalen Neuronen blieb die PP2Cβ-Menge während der Ölsäurebehandlung unverändert (C).

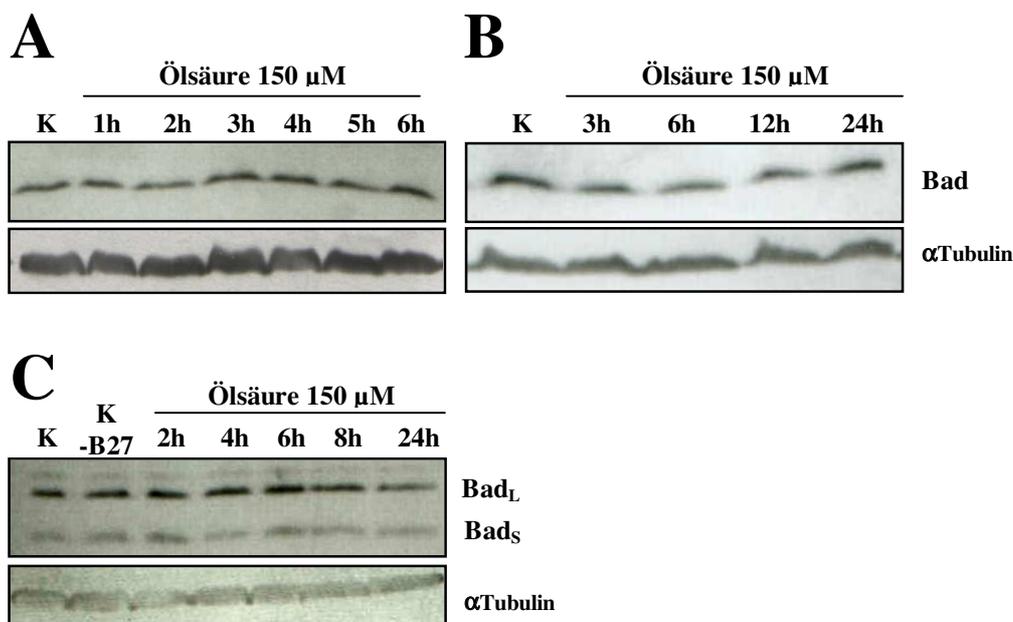


Abb. 3.3-12: Die Western Blot-Detektion nach Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen oder embryonalen kortikalen Neuronen zeigte keine Regulation von Bad

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 150 μM Ölsäure in serumfreiem Medium behandelt; die Kontrollgruppe wurde mit serumfreiem Medium + 0,15% DMSO inkubiert. Die Western Blot-Detektion von Bad ließ weder in der Frühphase der Schädigung (A) noch zu späteren Zeitpunkten (B) eine Regulation erkennen. Auch in embryonalen kortikalen Neuronen blieb der Bad-Spiegel während der Ölsäurebehandlung unverändert (C).

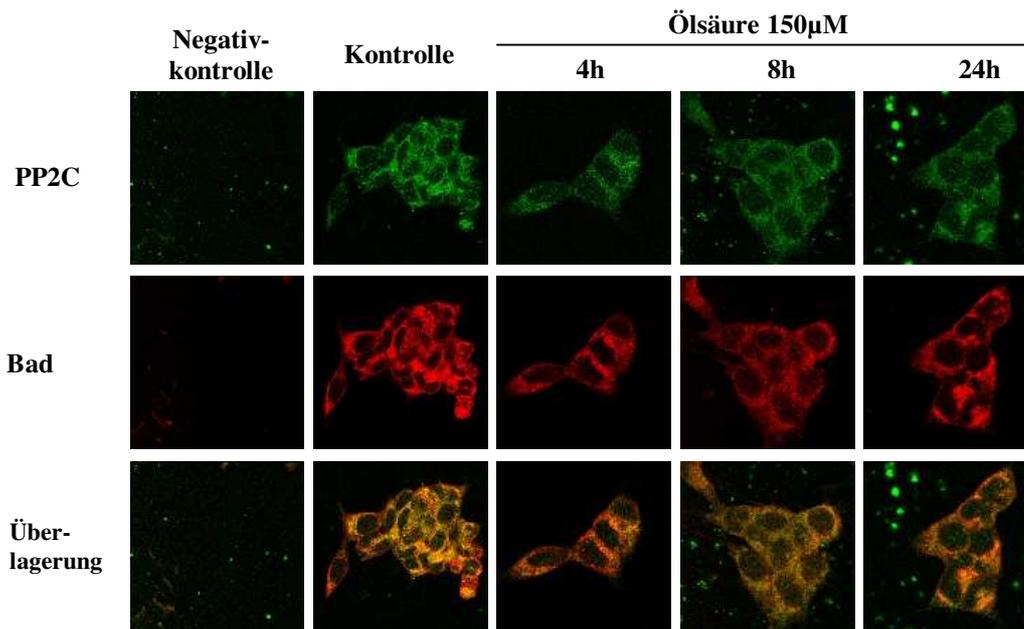


Abb. 3.3-13: Die immunzytochemische Detektion von PP2C β und Bad in SH-SY5Y-Zellen nach der Behandlung mit Ölsäure bestätigte die Western Blot-Befunde
SH-SY5Y-Zellen wurden mit Ölsäure 150 μ M in serumfreiem Medium/0,15% DMSO behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. Wie bereits der Western Blot ließ auch die Doppelfärbung von PP2C β und Bad keine Veränderungen erkennen. Die Negativkontrolle wurde ohne Erstantikörper inkubiert.

3.3.10 Untersuchung der Bad-Phosphorylierung nach Ölsäurebehandlung

Die PP2C kann *in vitro* verschiedene Aminosäurereste von Bad dephosphorylieren (Klumpp et al., 2003). Hier sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit PP2C-aktivierender Ölsäure den Phosphorylierungsgrad von Bad in SH-SY5Y-Zellen beeinflusst.

Für diese Tests standen phosphospezifische Antikörper gegen pBad-S¹¹², pBad-S¹³⁶ und pBad-S¹⁵⁵ zur Verfügung. Leider ließ deren tatsächliche Spezifität zu wünschen übrig. Um die Detektion zu verbessern, wurde eine Immunpräzipitation mit dem spezifischen Antikörper gegen Gesamt-Bad durchgeführt. Die Western Blots wurden dann mit den pBad-Antikörpern inkubiert. Nach der Detektion wurden die gleichen Blots mit dem Antikörper gegen Gesamt-Bad behandelt, um die Lage der pBad-Banden zu verifizieren und gleichzeitig das Verhältnis pBad/Gesamt-Bad abschätzen zu können.

Allerdings war in keinem der drei Fälle eine eindeutige Regulation der Bad-Phosphorylierung nach Ölsäurebehandlung zu erkennen.

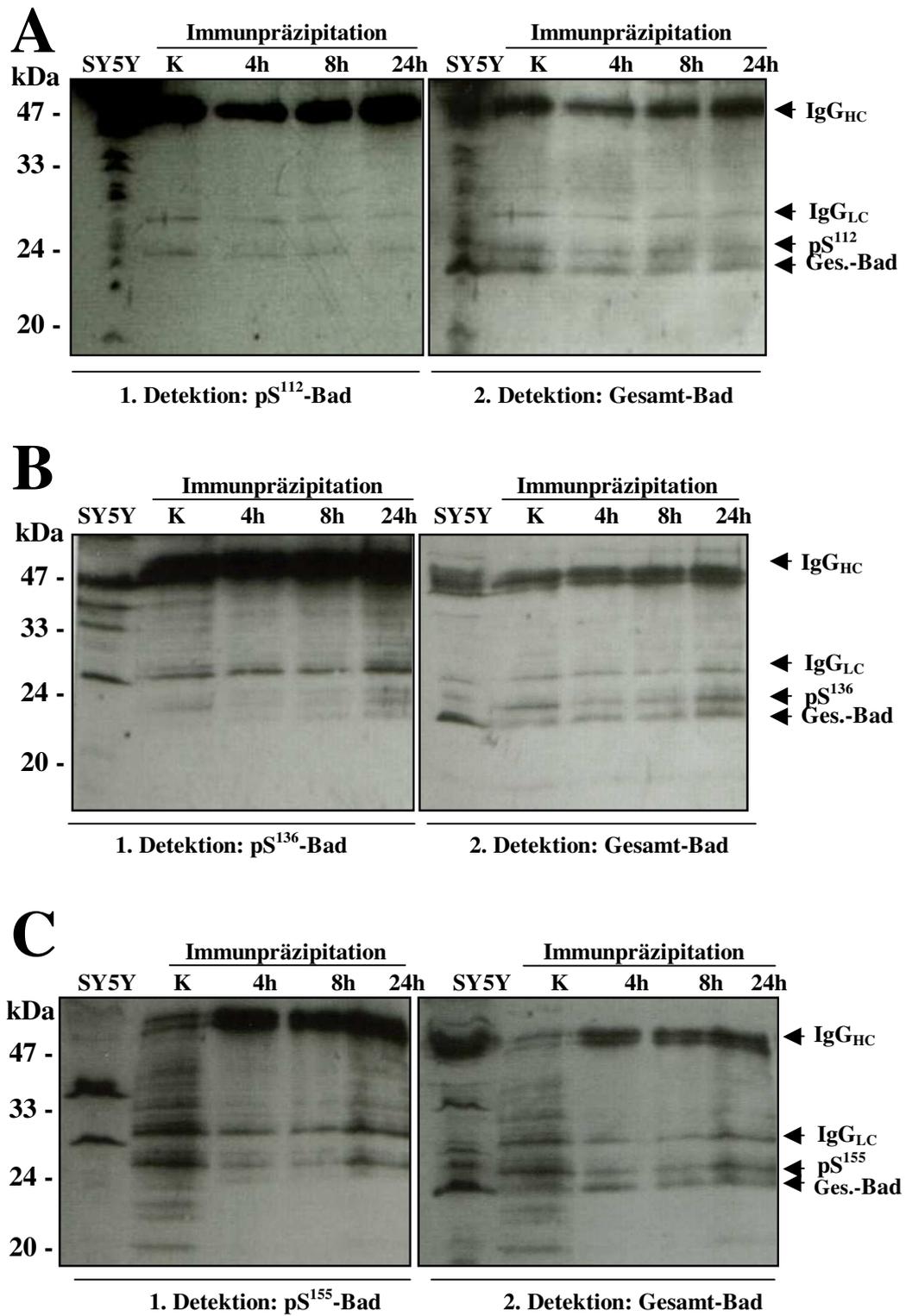


Abb. 3.3-14: Immunpräzipitation mit anschließender Detektion von pBad-S¹¹², pBad-S¹³⁶ und pBad-S¹⁵⁵ nach Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen
Erläuterungen s. nächste Seite

Beschriftung zu Abb. 3.3-14:

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 150 μ M Ölsäure in serumfreiem Medium behandelt; die Kontrollgruppe wurde mit serumfreiem Medium + 0,15% DMSO inkubiert. Nach der Lyse wurde eine Immunpräzipitation mit dem polyklonalen Antikörper gegen Gesamt-Bad/Protein A-Sepharose durchgeführt. Auf die mit „SY5Y“ bezeichnete Bahn wurde ein nach dem üblichen Protokoll für Western Blot gewonnenes Zelllysate aus unbehandelten SH-SY5Y-Zellen aufgetragen. Der Nachweis des phosphorylierten Bad-Proteins erfolgte mit den phosphospezifischen Antikörpern gegen pBad-S¹¹² (A), pBad-S¹³⁶ (B) beziehungsweise pBad-S¹⁵⁵ (C).

In allen drei Fällen zeigte sich, dass bei Verwendung der üblichen Zelllysate (SY5Y) viele unspezifische Signale auftraten, während an der Stelle, an der sich die pBad-Bande befinden sollte, nichts zu erkennen war. Die immunpräzipitierten Gruppen dagegen wurden gut detektiert; die erhaltene pBad-Bande wurde jeweils im direkten Anschluss durch den Nachweis von Gesamt-Bad identifiziert. Allerdings konnte bei keiner der drei Phosphorylierungsstellen eine eindeutige Regulation beobachtet werden; das Verhältnis von pBad zu Gesamt-Bad änderte sich nicht merklich.

IgG_{LC}: Immunglobulin, light chain/leichte Kette

IgG_{HC}: Immunglobulin, heavy chain/schwere Kette

3.4 Untersuchungen zur fettsäureinduzierten Apoptose in SH-SY5Y-Zellen und in embryonalen kortikalen Neuronen

Fettsäuren können die Proteinphosphatase 2C aktivieren, sofern sie eine Reihe struktureller Voraussetzungen erfüllen (Klumpff et al., 1998). Konkret gilt dabei für Fettsäuren mit mehr als 15 Kohlenstoffatomen, dass sie über mindestens eine, zudem cis-konfigurierte, Doppelbindung verfügen müssen; die Säurefunktion muss frei vorliegen.

Wird eine dieser Bedingungen nicht erfüllt, bleibt die Aktivität der PP2C unverändert:

Tab. 3.4-1: Zusammenhang zwischen Fettsäuren und der Aktivierung der PP2C

Substanz		Konfiguration	Säurefunktion	PP2C-Aktivierung
Ölsäure	18:1	cis	ja	ja
Stearinsäure	18:0	-	ja	nein
Elaidinsäure	18:1	trans	ja	nein
Ölsäuremethylester	18:1	cis	nein	nein
Linolsäure	18:2	cis/cis	ja	ja

Für die PP2C-aktivierende Ölsäure konnte bereits gezeigt werden, dass sie in der Lage ist, in unterschiedlichen Zellsystemen Apoptose auszulösen.

Geht man davon aus, dass dieser Effekt unter den gewählten Versuchsbedingungen auf eine Aktivierung der PP2C zurückzuführen ist, so sollten Substanzen, die nicht alle Kriterien erfüllen, keine Apoptose auslösen.

Aus diesem Grund wurde das apoptoseauslösende Potential einiger Substanzen untersucht, die sich von der Ölsäure jeweils hinsichtlich eines Merkmals unterscheiden.

3.4.1 Stearinsäure: der Einfluss der Doppelbindung

Im Gegensatz zur einfach ungesättigten Ölsäure besitzt die Stearinsäure keine Doppelbindung. *In vitro* kann sie deshalb die PP2C nicht aktivieren (Klumpp et al., 1998).

Zur Prüfung ihres Effekts *in vivo* wurden, dem Ölsäureprotokoll folgend, SH-SY5Y-Zellen bzw. embryonale kortikale Rattenneurone mit unterschiedlichen Stearinsäurekonzentrationen behandelt. In keinem der beiden Systeme konnte dadurch Apoptose ausgelöst werden (Abb. 3.4-1).

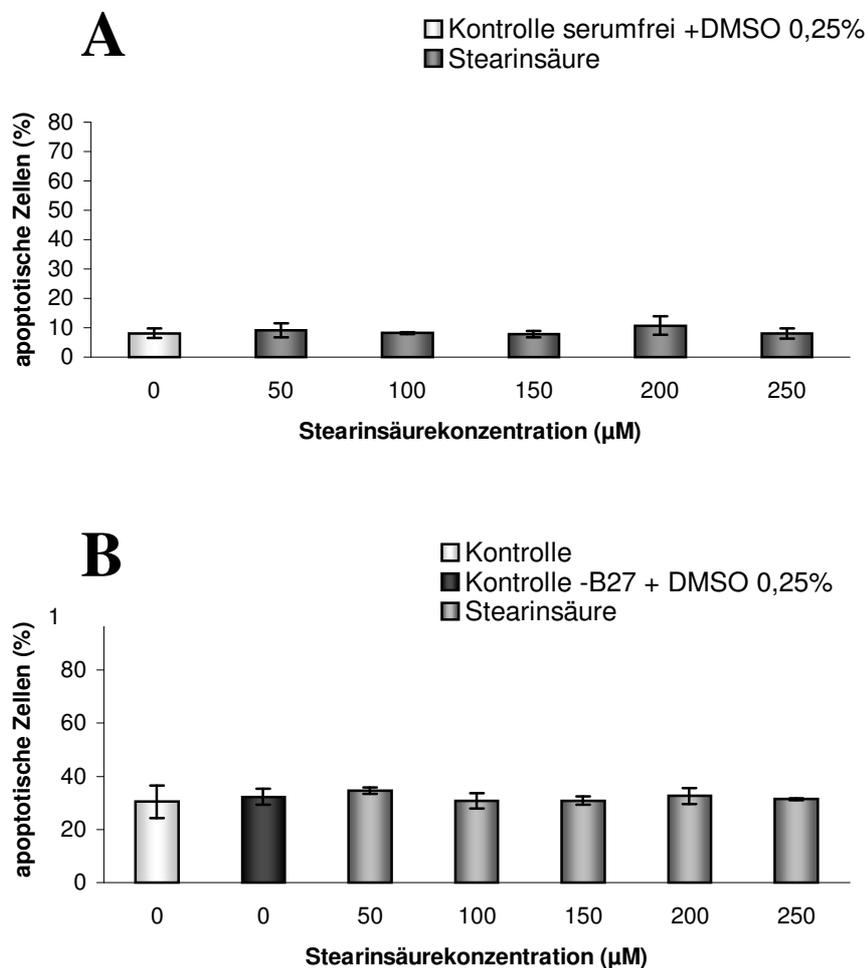


Abb. 3.4-1: Einfluss der Stearinsäure auf SH-SY5Y-Zellen und kortikale Neurone

SH-SY5Y-Zellen (A) bzw. embryonale kortikale Rattenneurone (B) wurden mit Stearinsäure unterschiedlicher Konzentration behandelt, nach 24 Stunden fixiert und mit Hoechst 33258 gefärbt. In beiden Fällen blieb der Anteil der apoptotischen Zellen unverändert. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent \pm Standardabweichung.

3.4.2 Elaidinsäure: cis- gegenüber trans-Konfiguration

Ölsäure und Elaidinsäure sind cis-trans-Isomere; die trans-konfigurierte Elaidinsäure kann *in vitro* die Aktivität der PP2C nicht erhöhen (Klump et al., 1998).

Erneut wurden sowohl SH-SY5Y-Zellen als auch embryonale kortikale Rattenneurone 24 Stunden lang behandelt, diesmal mit Elaidinsäure in unterschiedlichen Mengen. Auch hier zeigte die Hoechstfärbung keine Zunahme der apoptotischen Zellen; anders als das cis-Isomer hatte Elaidinsäure keinen schädigenden Effekt (Abb. 3.4-2; Abb. 3.4-3).

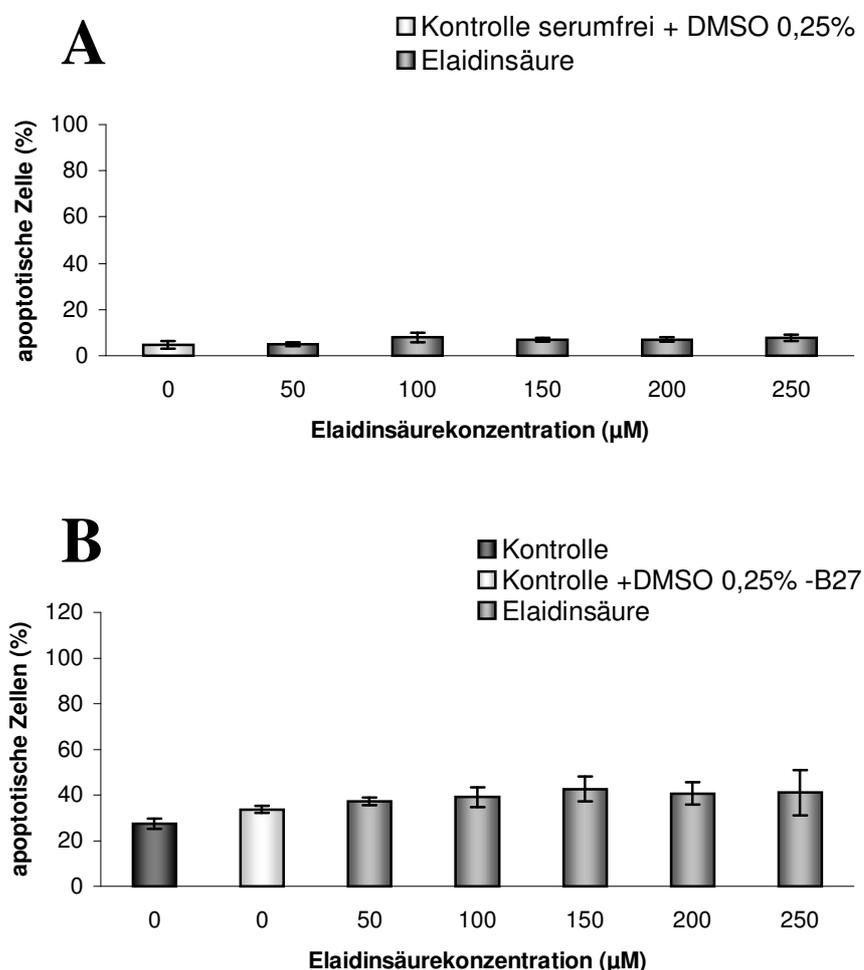


Abb. 3.4-2: Einfluss von Elaidinsäure auf SH-SY5Y-Zellen bzw. auf kortikale embryonale Rattenneurone

SH-SY5Y-Zellen (A) bzw. embryonale kortikale Rattenneurone (B) wurden mit Elaidinsäure unterschiedlicher Konzentration behandelt, nach 24 Stunden fixiert und mit Hoechst 33258 gefärbt. In beiden Fällen blieb der Anteil der apoptotischen Zellen unverändert. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent \pm Standardabweichung.

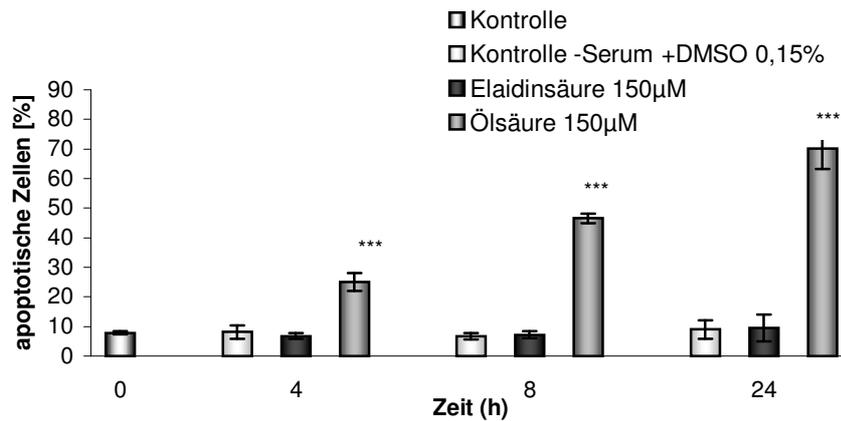


Abb. 3.4-3: Vergleich der Effekte von Ölsäure und Elaidinsäure auf SH-SY5Y-Zellen
 SH-SY5Y-Zellen wurden mit 150µM Ölsäure bzw. Elaidinsäure behandelt; eine Kontrollgruppe wurde mit normalem Kulturmedium, die übrigen mit Vehikel inkubiert. Während die Elaidinsäure keine schädigenden Effekte hatte, löste Ölsäure zeitabhängig Apoptose aus. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent \pm Standardabweichung. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle bzw. zur Elaidinsäuregruppe (Varianzanalyse, Scheffé-Test)

Die unterschiedliche Wirkung auf die Zellen beruht nicht darauf, dass die Elaidinsäure schlechter in die Zellen aufgenommen wird; dies zeigen entsprechende Aufnahmen nach Färbung mit Nilblau:

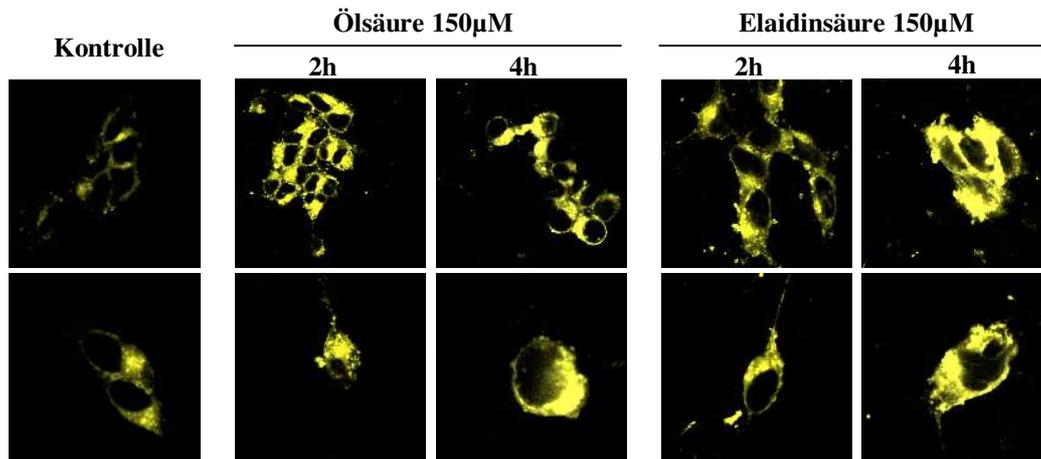


Abb. 3.4-4:
 Ölsäure und Elaidinsäure wurden von SH-SY5Y-Zellen gleichermaßen aufgenommen
 SH-SY5Y-Zellen wurden mit 150 µM Ölsäure bzw. Elaidinsäure behandelt. Die Kontrollgruppe wurde mit Vehikel (serumfreiem Medium mit 0,15% DMSO) inkubiert. Nach zwei bzw. vier Stunden wurden die Zellen fixiert und mit Nilblau gefärbt. Die Aufnahmen des konfokalen Laserscanning-Mikroskops zeigen, dass Ölsäure und Elaidinsäure in vergleichbaren Mengen in die Zellen aufgenommen wurden.

3.4.3 Ölsäuremethylester: der Einfluss der Säurefunktion

Das Vorhandensein einer Carboxylgruppe, wie bei Ölsäure der Fall, ist für die PP2C-Aktivierung mit entscheidend. Im Ölsäuremethylester liegt die Säurefunktion allerdings nicht mehr frei vor; dem entsprechend wirkt er nicht aktivierend (Klumpp et al., 2001)

Auch auf SH-SY5Y-Zellen und auf embryonale kortikale Rattenneurone hatte der Ester keinen erkennbaren Einfluss: Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation mit unterschiedlichen Ester-Konzentrationen war der Anteil der apoptotischen Zellen in beiden Fällen unverändert (Abb. 3.4-5).

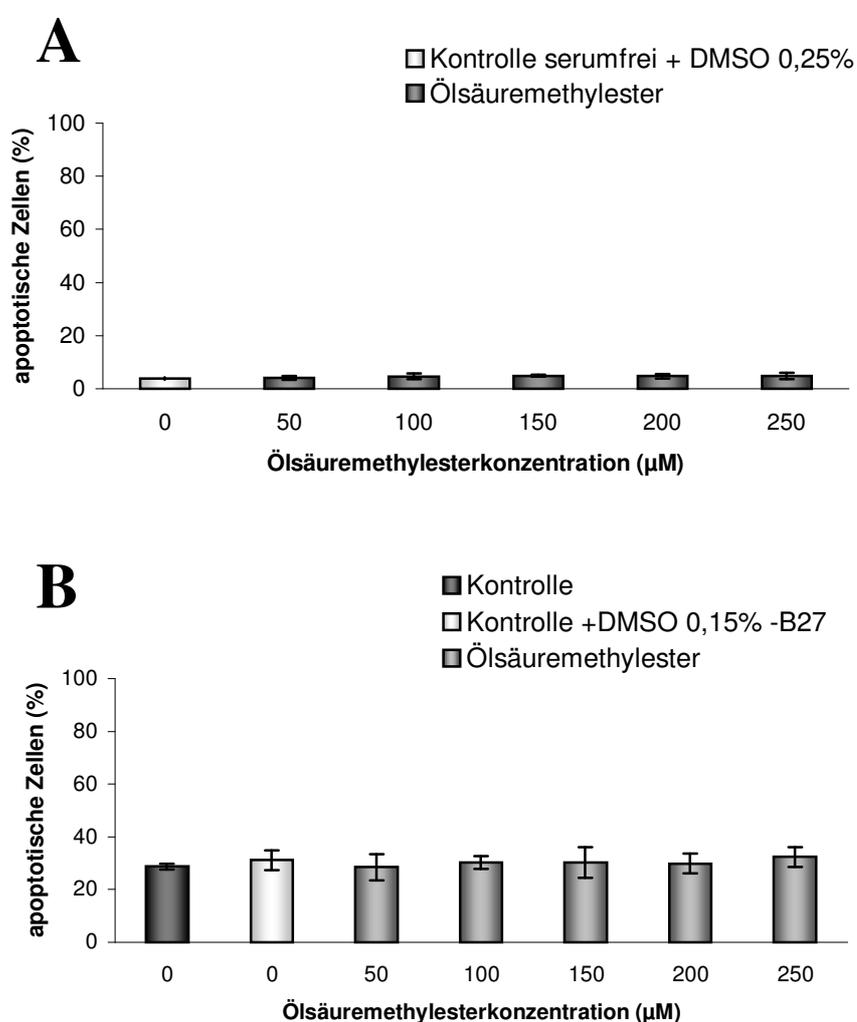


Abb. 3.4-5: Einfluss von Ölsäuremethylester auf SH-SY5Y-Zellen bzw. kortikale Neurone
SH-SY5Y-Zellen (A) bzw. embryonale kortikale Rattenneurone (B) wurden mit Ölsäuremethylester unterschiedlicher Konzentration behandelt, nach 24 Stunden fixiert und mit Hoechst 33258 gefärbt. In beiden Fällen blieb der Anteil der apoptotischen Zellen unverändert. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent \pm Standardabweichung.

Auch die Untersuchung der Aktivierung von Caspase 3 nach der Behandlung embryonaler kortikaler Neurone zeigte deutliche Unterschiede zwischen der Ölsäure und ihrem Methylester: Nach 24-stündiger Inkubation mit Ölsäuremethylester war nur eine sehr schwache Zunahme an reifer Caspase 3 zu erkennen, die sich nicht von derjenigen der Kontrolle ohne B27-Supplementation unterschied (Abb. 3.4-6); die Behandlung mit Ölsäure dagegen hatte zu einer deutlichen Aktivierung der Caspase 3 geführt.

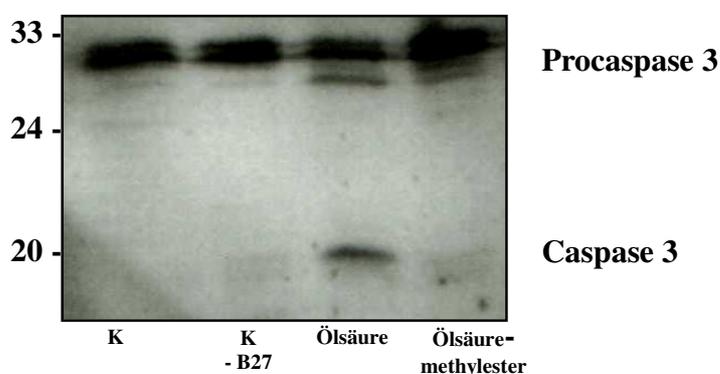


Abb. 3.4-6: Western Blot-Detektion von Caspase-3 in embryonalen kortikalen Neuronen nach Behandlung mit Ölsäure bzw. Ölsäuremethylester

Die Neurone wurden über 24 Stunden mit Ölsäure 150 μ M bzw. Ölsäuremethylester 150 μ M in Neurobasal -B27 + 0,15% DMSO behandelt; die Kontrolle K-B27 wurde in Vehikel, die Kontrolle K in Neurobasal + B27 inkubiert.

Die Detektion von Caspase 3 im Western Blot zeigte einen deutlichen Anstieg des Caspase 3-Spiegels nach Ölsäurebehandlung, während er beim Methylester auf Kontrollniveau blieb.

Dass der Methylester der Ölsäure keine Apoptose auslöst, liegt nicht an mangelnder Penetration der Zellmembran: Auch der Ester wird in SH-SY5Y-Zellen aufgenommen und akkumuliert im Zytoplasma (Abb. 3.4-7).

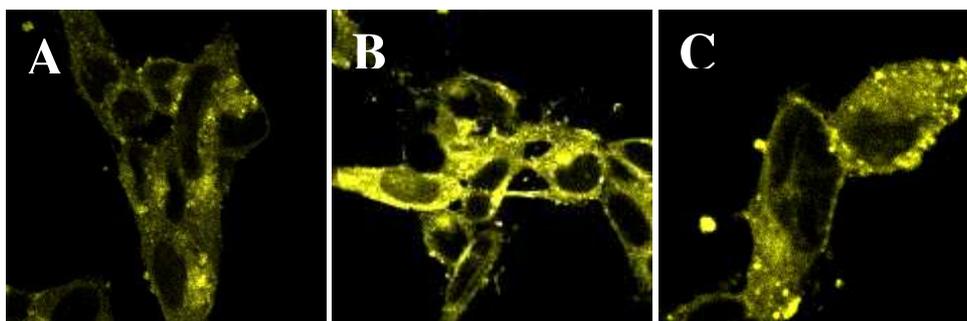


Abb. 3.4-7: Ölsäuremethylester wird in SH-SY5Y-Zellen aufgenommen

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 150 μM Ölsäuremethylester behandelt. Die Kontrollgruppe (A) wurde mit Vehikel (serumfreies Medium mit 0,15% DMSO) inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen fixiert und mit Nilblau gefärbt. Die Aufnahmen des konfokalen Laserscanning-Mikroskops zeigen, dass Ölsäuremethylester in die Zellen aufgenommen wurde.

In vitro antagonisiert Ölsäuremethylester dosisabhängig den PP2C-aktivierenden Effekt von Ölsäure (Klumpp, persönliche Mitteilung). Daher wurde untersucht, ob dieser Effekt auch in Zellkulturexperimenten auftritt und die Kombination mit Ölsäuremethylester die apoptoseinduzierende Wirkung der Ölsäure auf SH-SY5Y-Zellen und Neurone verringert.

Daher wurden SH-SY5Y-Zellen bzw. embryonale kortikale Neurone mit Ölsäure, dem Ester und Kombinationen daraus behandelt. Das Ergebnis war überraschend: In Kombination mit dem selbst nicht toxischen Methylester schädigte die Ölsäure bei gleicher Konzentration im Behandlungsmedium viel effektiver (Abb. 3.4-8):

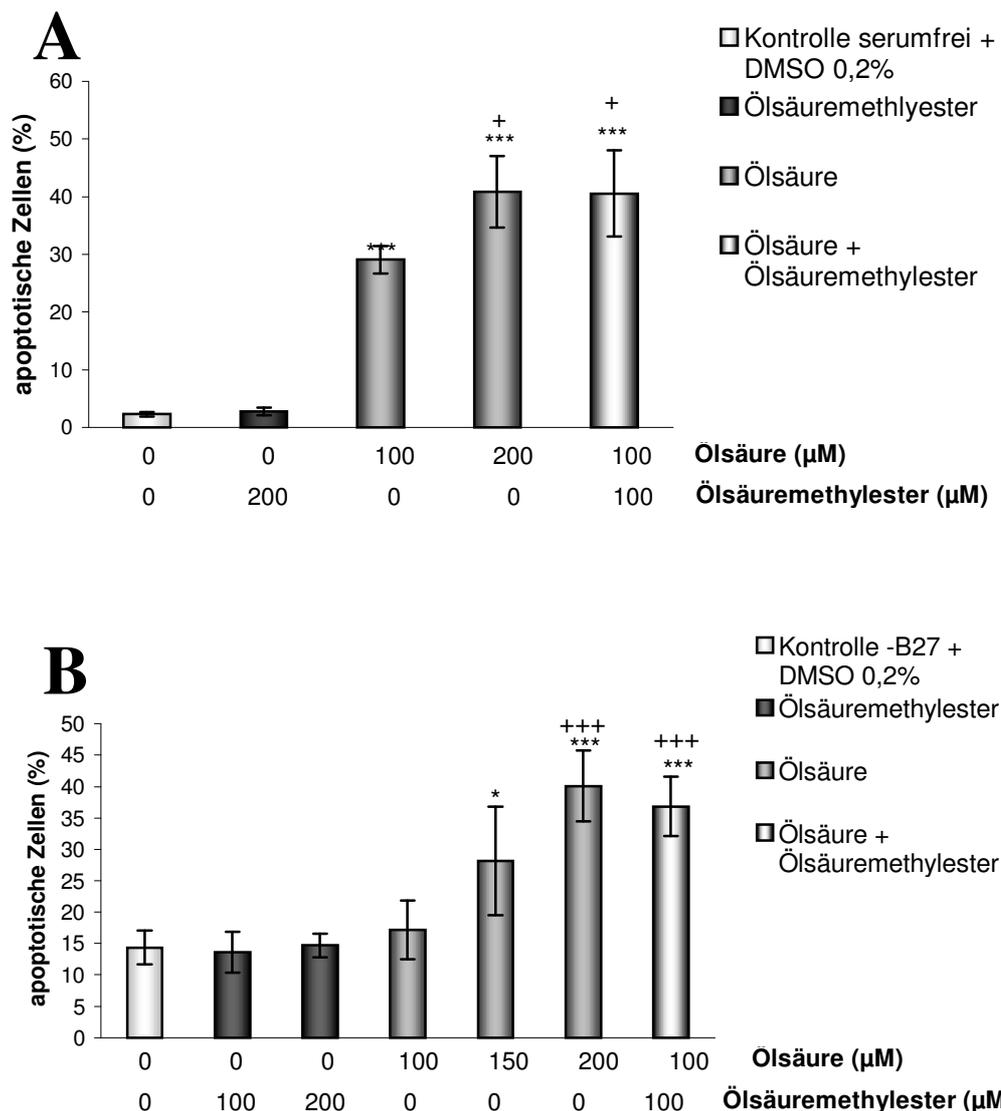


Abb. 3.4-8: Kombination mit Ölsäuremethylester verstärkt die apoptoseinduzierenden Effekte der Ölsäure auf SH-SY5Y-Zellen und auf embryonale kortikale Neurone

SH-SY5Y-Zellen wurden für 6 Stunden (A), embryonale kortikale Neurone für 8 Stunden (B) mit Ölsäuremethylester und Ölsäure alleine und in Kombination behandelt. Die Kontrollen wurden jeweils mit Vehikel inkubiert. Ölsäuremethylester alleine schädigte die Zellen nicht; Ölsäure induzierte konzentrationsabhängig Apoptose in beiden Zelltypen. Kombination der Ölsäure mit dem Ester führte zu einer signifikanten Verstärkung ihrer Wirkung.

Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Kerne in Prozent \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, bezogen jeweils auf die Kontrolle resp. auf die Behandlung mit Ölsäuremethylester alleine; + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$, bezogen jeweils auf die Gruppe mit $100\mu\text{M}$ Ölsäure (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.4.4 Linolsäure: die Positivkontrolle

Schließlich wurde eine Fettsäure untersucht, die alle geforderten Kriterien für die Aktivierung der PP2C erfüllt: die Linolsäure. Sie unterscheidet sich von der Ölsäure lediglich durch das Vorhandensein einer weiteren Doppelbindung. Auch sie aktiviert auch *in vitro* die PP2C und ist dabei in ihrer Potenz der Ölsäure vergleichbar (Klumpp et al., 1998).

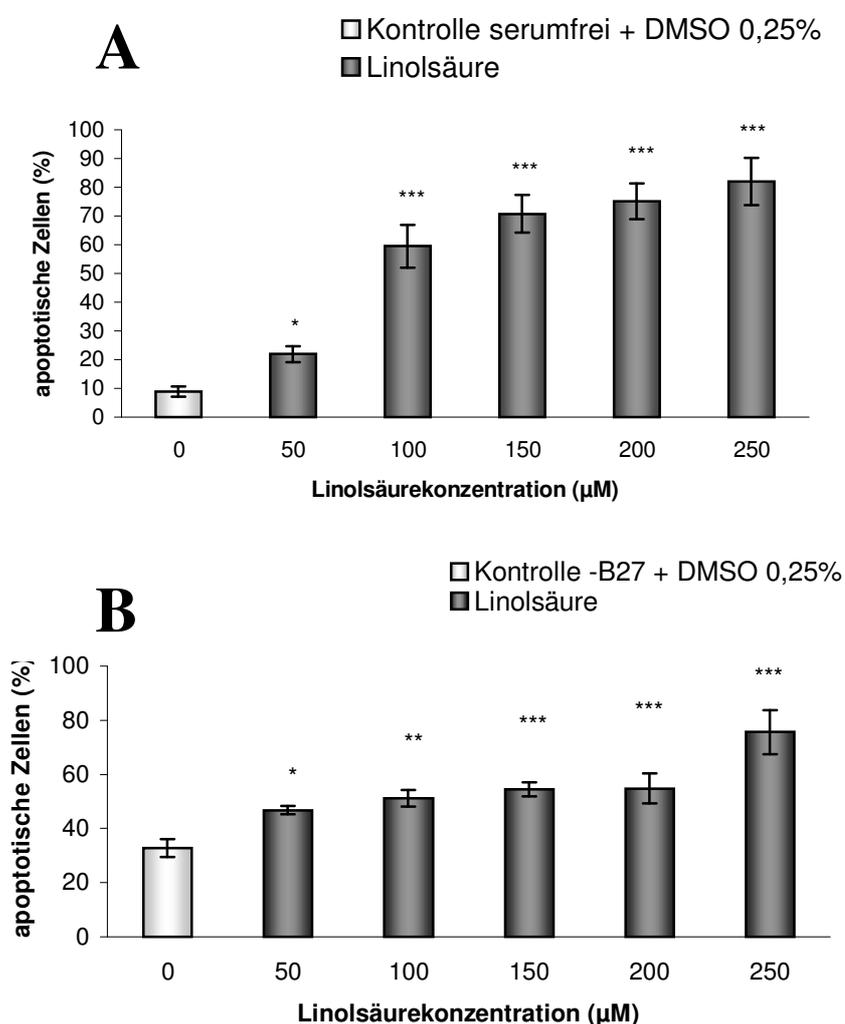


Abb. 3.4-9: Einfluss von Linolsäure auf SH-SY5Y-Zellen bzw. auf kortikale Neurone

SH-SY5Y-Zellen (A) bzw. embryonale kortikale Rattenneurone (B) wurden mit Linolsäure unterschiedlicher Konzentration inkubiert, nach 24 Stunden fixiert und mit Hoechst 33258 gefärbt. Beide Male führte diese Behandlung zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test)

Tatsächlich erhöhte Linolsäure in unterschiedlichen Konzentrationen in SH-SY5Y-Zellen wie in embryonalen kortikalen Rattenneuronen den Anteil der apoptotischen Zellen beträchtlich (Abb. 3.4-9). Die Effekte waren sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig und entsprachen weitestgehend denen der Ölsäure (Abb. 3.4-10).

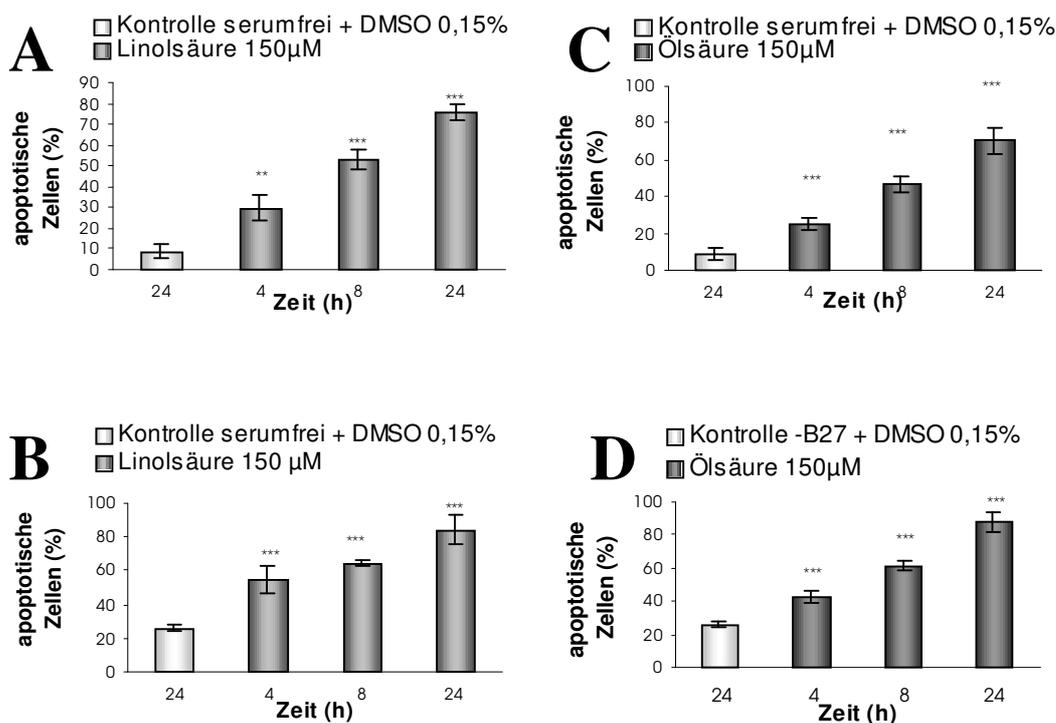


Abb. 3.4-10: Linolsäure und Ölsäure haben vergleichbare Effekte auf SH-SY5Y-Zellen sowie auf embryonale kortikale Neuronen

Behandlung von SH-SY5Y-Zellen (A) bzw. von embryonalen kortikalen Rattenneuronen (B) mit 150µM Linolsäure führte zeitabhängig zum Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen, detektiert durch Kernfärbung mit Hoechst 33258. Das Ausmaß der Schädigung entsprach den Effekten der identischen Menge Ölsäure, ebenfalls in SH-SY5Y- (C) bzw. kortikalen Neuronen (D). Dargestellt sind sie Mittelwerte der apoptotischen Zellen in Prozent \pm Standardabweichung. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, jeweils bezogen auf die Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.5 Etablierung eines Systems zum simultanen *Knockdown* von PP2C α und PP2C β in SH-SY5Y-Zellen

Ziel der Bemühungen war die Etablierung der RNA-Interferenz (RNAi) in SH-SY5Y-Zellen; auf diesem Weg sollte die Expression von PP2C α und PP2C β verringert und die Untersuchung ihrer Funktion in der Zelle möglich werden.

Zu diesem Zweck sollten chemisch synthetisierte siRNA-Oligonukleotide mittels Lipofektion in die Zelle eingeschleust werden und dort durch gezielten Abbau der mRNA von PP2C α und PP2C β deren Translation zum Protein verhindern.

Der Erfolg der RNAi ist generell von vielen Faktoren abhängig. Bestehende Protokolle für andere Systeme dienen lediglich der Orientierung, letztlich müssen die optimalen Versuchsbedingungen für jeden Zelltyp und jedes Zielprotein ausgetestet und etabliert werden.

Unter der Annahme, dass die ausgewählten siRNA-Sequenzen grundsätzlich funktionieren, bedeutet das für die eigentliche Transfektion, dass zunächst ein geeignetes, das heißt für die betreffende Zelllinie nicht toxisches, Transfektionsreagenz ausgewählt werden muss. Ferner muss die optimale Zelldichte für die Transfektion ermittelt werden, ebenso wie die effektivste Konzentration an Lipofektionsreagenz wie auch an siRNA.

Ist ein erfolgreiches Transfektionsprotokoll etabliert, so muss auch der zeitliche Verlauf der Herunterregulation untersucht werden; auch hier gibt es beträchtliche Differenzen zwischen verschiedenen Proteinen, unter anderem bedingt durch ihre Stabilität und die Umschlagsrate in der Zelle. Gerade für den Fall, dass eine Schädigung der Zellen während der *Knockdown*-Phase geplant ist, etwa um die Beteiligung eines Proteins an den entsprechenden apoptotischen Signalkaskaden zu untersuchen, ist die Kenntnis des zeitlichen Profils unumgänglich.

3.5.1 Auswahl eines geeigneten Lipofektionsreagenzes

Die RNA-Interferenz wird durch doppelsträngige RNA-Stücke von 21 Nukleotiden Länge vermittelt. Um ihre Wirkung entfalten zu können, muss diese siRNA zunächst in die Zelle eingeschleust werden; bei der Lipofektion wird diese Aufgabe je nach Formulierung von kationischen Liposomen oder Polyaminverbindungen übernommen. Es stehen eine Reihe von Reagenzien verschiedener Hersteller zur Verfügung; einige davon wurden getestet, um ein für SH-SY5Y-Zellen gut verträgliches Produkt zu finden.

Die Reagenzien wurden in den Konzentrationen eingesetzt, die in den entsprechenden Produktinformationen empfohlen wurden. Behandlungsmedium war OptiMEM®, eine serum- und antibiotikafreie Abwandlung von MEM, das für Transfektionsversuche gut geeignet ist (Saffer and Hughes, 1986).

Von den drei getesteten Lipofektionsreagenzien war schließlich nur Oligofectamine® gut verträglich für die SH-SY5Y-Zellen; Lipofectamine® und RNAifect® erhöhten den Anteil apoptotischer Zellen auf jeweils rund 60 Prozent (Abb. 3.5-1) und kamen daher für die Transfektion nicht in Frage.

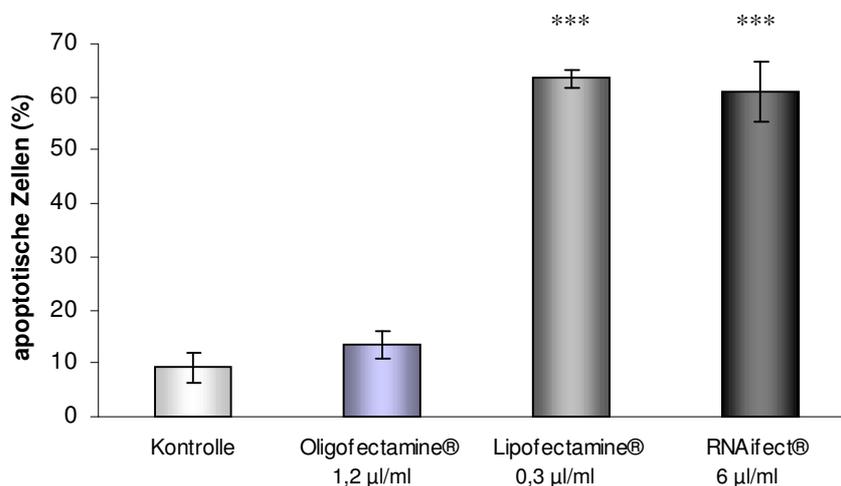


Abb. 3.5-1: Toxische Effekte verschiedener Lipofektionsreagenzien auf SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden über 72 Stunden hinweg mit den Lipofektionsreagenzien in den angegebenen Konzentrationen behandelt; Vehikel war OptiMEM®. Die Kernfärbung mit Hoechst 33528 zeigte, dass sowohl Lipofectamine® als auch RNAifect® den Anteil apoptotischer Zellen signifikant erhöht hatten; Oligofectamine® dagegen hatte keinen schädigenden Effekt und war daher am besten verträglich.

Dargestellt sind die Mittelwerte apoptotischer Zellen in Prozent \pm Standardabweichung. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Um herauszufinden, ob und wenn ja, ab welcher Konzentration auch Oligofectamine® für SH-SY5Y-Zellen toxisch ist, wurde nun eine Konzentrationsreihe erstellt; die Zellen wurden über 72 Stunden hinweg mit unterschiedlichen Mengen des Reagenzes in OptiMEM® inkubiert.

Es zeigte sich, dass Oligofectamine® nicht in beliebiger Menge vertragen wird; ab einer Konzentration von 3 µl/ml kam es auch hier zu einer signifikanten Schädigung der Zellen (Abb. 3.5-2). Das bedeutete, dass für die Transfektion nach Möglichkeit geringere Mengen eingesetzt werden sollten.

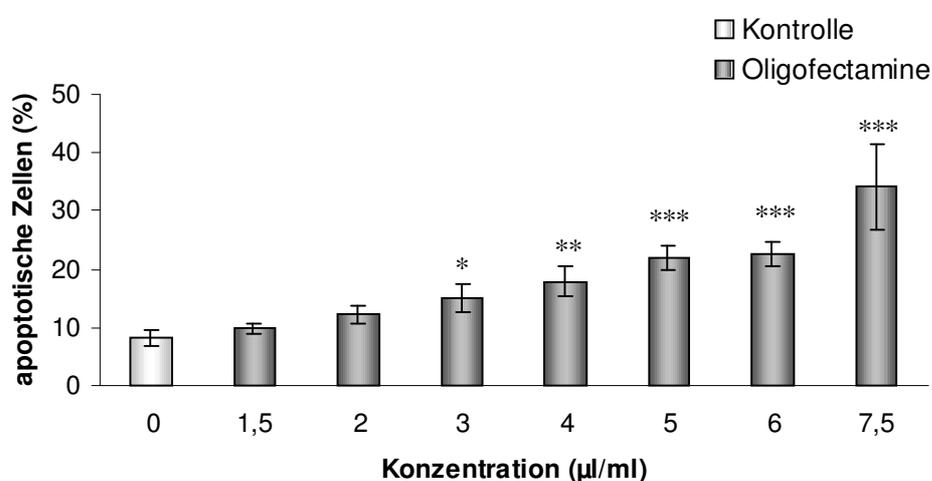


Abb. 3.5-2: Toxische Effekte des Lipofektionsreagenzes Oligofectamine auf SH-SY5Y-Zellen
SH-SY5Y-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen Oligofectamine in OptiMEM® inkubiert. Nach 72 Stunden wurden sie fixiert und die Kerne mit Hoechst 33258 gefärbt. Ab einer Konzentration von 3 µl/ml war die Zunahme an apoptotischen Zellen signifikant, geringere Mengen wurden besser vertragen.

Dargestellt sind die Mittelwerte apoptotischer Zellen in Prozent \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.5.2 Test der siRNA-Oligonukleotide für die PP2C α -RNAi

Zum *Knockdown* der PP2C α standen vier verschiedene chemisch synthetisierte Oligonukleotide zur Verfügung. In einem ersten orientierenden Versuch wurden sie parallel auf ihre Wirksamkeit überprüft: So sollte ermittelt werden, welche am effektivsten ist.

Die Überprüfung der Wirkung auf RNA-Ebene zeigte bei allen untersuchten Sequenzen eine mehr oder weniger ausgeprägte Verminderung der mRNA-Spiegel der PP2C α 24 Stunden nach der Transfektion (Abb. 3.5-3); am ausgeprägtesten war der Effekt bei Sequenz 3. Nach 48 Stunden hatten sich die RNA-Spiegel wieder normalisiert und entsprachen dem Niveau der Kontrollen.

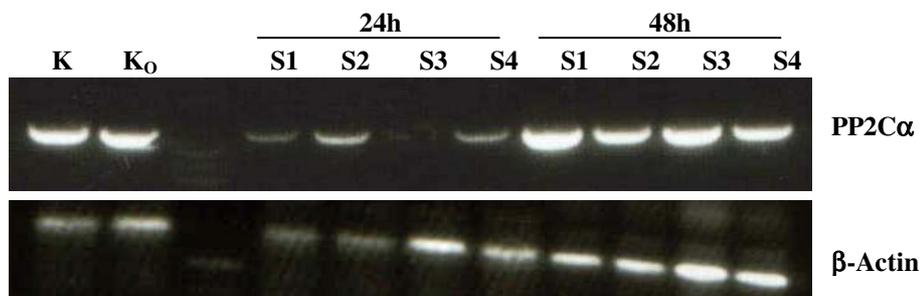


Abb. 3.5-3: Überprüfung der mRNA-Niveaus der PP2C α nach der Transfektion von SH-SY5Y-Zellen mit verschiedenen siRNA-Sequenzen

SH-SY5Y-Zellen wurden mit vier doppelsträngigen Oligonukleotiden (S1-S4) gegen die mRNA der PP2C α transfiziert. Die Zelldichte betrug etwa 5×10^4 Zellen/cm²; Behandlungsmedium war OptiMEM®, Transfektionsreagenz Oligofectamine® (1,5 μ l/ml). Die Kontrollgruppe K wurde lediglich mit Medium, Gruppe K₀ mit Medium und Oligofectamine® inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die RNA aus den Zellen isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Nach Elektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel war in allen Fällen eine Abnahme der mRNA 24 Stunden nach der Transfektion zu beobachten, am deutlichsten bei Sequenz 3.

Im nächsten Versuch, durchgeführt nach dem gleichen Protokoll, wurden statt der mRNA-Niveaus die Proteinspiegel überprüft. Die Detektion mit einem spezifischen anti-PP2C α -Antikörper zeigte, dass die Regulation des Proteins lange nicht so ausgeprägt war; allenfalls Sequenz 3 hatte eine leichte Reduktion bewirkt (Abb. 3.5-4A). Das war auch bei der Wiederholung des Versuchs so; allerdings war die Verminderung hier nach 48 statt nach 24 Stunden zu sehen (Abb. 3.5-4B).

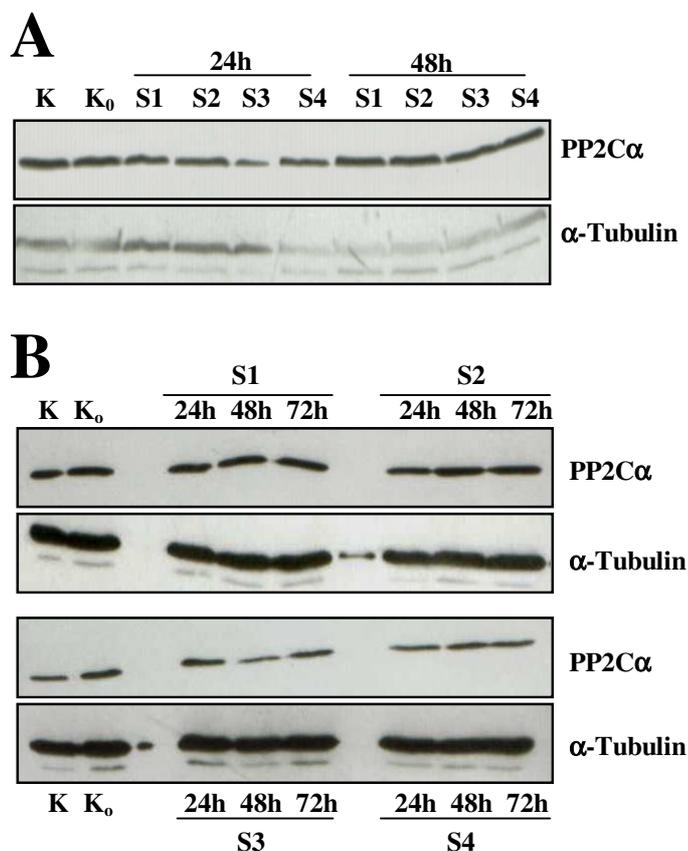


Abb. 3.5-4: Überprüfung der Proteinspiegel der PP2Cα nach der Transfektion mit verschiedenen siRNA-Sequenzen

SH-SY5Y-Zellen wurden mit vier doppelsträngigen Oligonukleotiden (S1-S4) gegen die mRNA der PP2Cα transfiziert. Die Zelldichte betrug etwa 5×10^4 Zellen/cm²; Behandlungsmedium war OptiMEM®, Transfektionsreagenz Oligofectamine® (1,5 µl/ml). Die Kontrollgruppe K wurde lediglich mit Medium, Gruppe K₀ mit Medium und Oligofectamine® inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Proteinspiegel der PP2Cα mittels Western Blot untersucht.

Beim ersten Versuch (A) war allenfalls 24 Stunden nach der Transfektion mit Sequenz 3 eine Veränderung zu sehen, ansonsten war keine Regulation erkennbar. Die Wiederholung (B) lieferte ein entsprechendes Ergebnis, allerdings war hier die Verminderung der PP2Cα erst nach 48 Stunden detektierbar.

3.5.3 Einfluss der Zelldichte auf den Transfektionserfolg

Nachdem das bisher verwendete Protokoll zu keiner befriedigenden Reduktion von PP2C α geführt hatte, sollte es nun weiter optimiert werden. Da nach ersten Erkenntnissen die Sequenz 3 am vielversprechendsten war, wurde sie auch in den nachfolgenden Versuchen verwendet.

Die Zelldichte spielt eine wichtige Rolle bei der Transfektion von kultivierten Zellen; ihr Optimum ist stark von der verwendeten Linie abhängig und schwankt zwischen 30 und 70% (Elbashir et al., 2002).

Bei ansonsten unveränderten Versuchsbedingungen wurden hier drei verschiedene Zelldichten untersucht. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte, 24 beziehungsweise 48 Stunden nach der Transfektion, wurde eine Veränderung des Proteinniveaus der PP2C α beobachtet, gleichgültig, ob die Zelldichte nun $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ oder $8 \cdot 10^4$ Zellen/cm 2 betrug (Abb. 3.5-5).

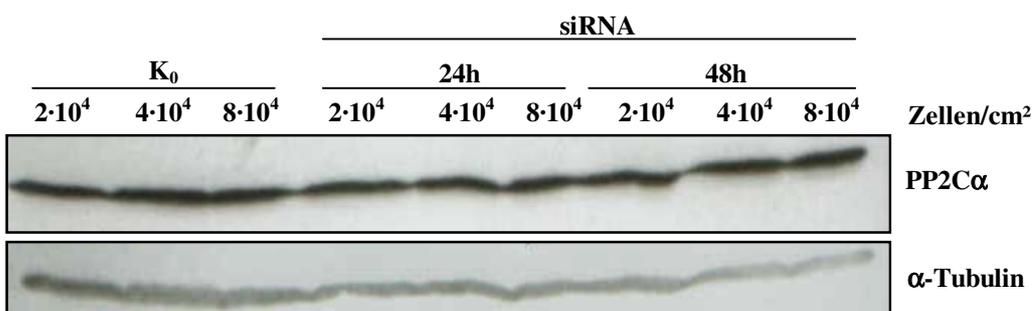


Abb. 3.5-5: Einfluss der Zelldichte bei der Transfektion von SH-SY5Y-Zellen auf die Proteinspiegel der PP2C α

SH-SY5Y-Zellen wurden siRNA (Endkonzentration 30 nM) gegen PP2C α transfiziert. Die Zelldichte variierte und betrug 2×10^4 , 4×10^4 oder 8×10^4 Zellen/cm 2 ; Behandlungsmedium war OptiMEM®, Transfektionsreagenz Oligofectamine® (1,5 μ l/ml). Die jeweiligen Kontrollgruppen K₀ wurden mit Medium und Oligofectamine® inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die PP2C α -Menge mittels Western Blot untersucht.

Bei keiner der Gruppen wurde eine Veränderung des Proteinspiegels erreicht.

3.5.4 Einfluss der siRNA-Menge auf den Transfektionserfolg

Der Erfolg der RNAi ist nicht nur von der Sequenz der eingesetzten siRNA-Oligonukleotide abhängig; Faktoren wie Reinheit und Menge beeinflussen das Ergebnis ebenso. Für die bisherigen Versuche wurde die siRNA in einer Endkonzentration von 30 nM zur Transfektion eingesetzt; jetzt wurde sie auf 80 nM erhöht. Einmal wurde wie zuvor die Sequenz 3 verwendet, beim zweiten Versuch wurden die Sequenzen 1 und 3 zu gleichen Teilen kombiniert.

Das Ergebnis entsprach dabei im wesentlichen den früheren Resultaten: Nach 24 Stunden war bei Sequenz 3 alleine eine leichte Reduktion des Proteinniveaus zu verzeichnen, die allerdings noch immer nicht befriedigend war (Abb. 3.5-6A). Bei der Kombination war die Verminderung deutlicher, wobei allerdings auch bei der Kontrolle weniger Protein vorhanden war, was eventuelle toxische Effekte vermuten lässt (Abb. 3.5-6B).

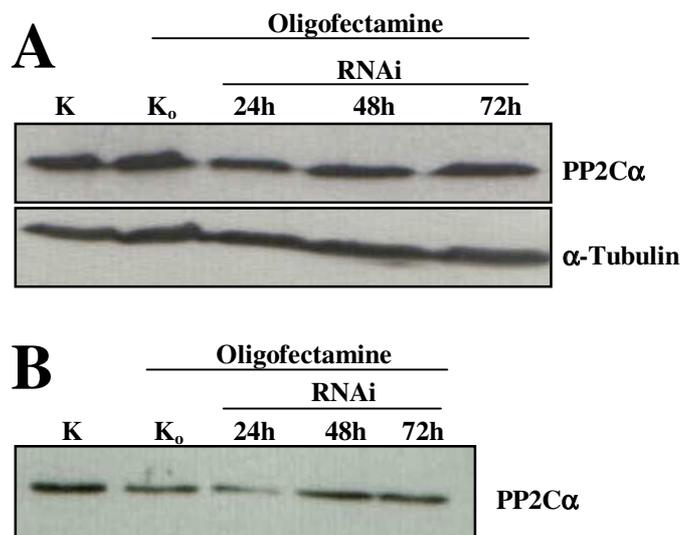


Abb. 3.5-6: Einfluss der siRNA-Menge auf den Erfolg der PP2Cα-RNAi

SH-SY5Y-Zellen wurden mit siRNA gegen PP2Cα transfiziert; ihre Endkonzentration im Transfektionsansatz war 80 nM. Für Versuch (A) wurde Sequenz 3 verwendet; für Versuch (B) wurden die Sequenzen 1 und 3 zu gleichen Teilen kombiniert. Die Zelldichte betrug etwa 5×10^4 Zellen/cm²; Behandlungsmedium war OptiMEM®, Transfektionsreagenz Oligofectamine® (1,5 µl/ml). Die Kontrolle K wurde nur mit Medium, die Kontrolle K₀ mit Medium und Oligofectamine® inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Proteinspiegel der PP2Cα mittels Western Blot untersucht.

Bei Versuch (A) führte die erhöhte Konzentration der Sequenz 3 zu einer leichten Reduktion der Proteinmenge. Die Kombination der beiden Sequenzen 1 und 3 führte zu einer deutlicheren Verminderung; allerdings ist auch bei der Kontrolle K₀ der PP2Cα-Spiegel etwas verringert.

3.5.5 Test der Sequenz 1 für die PP2C β -RNAi

Nicht nur die PP2C α , auch die PP2C β sollte mittels RNAi herunterreguliert werden. Zu Beginn stand hierfür lediglich die Sequenz 1 zur Verfügung; bei der Untersuchung ihrer Wirksamkeit wurde das gleiche Protokoll verwendet wie zuvor bei der PP2C α .

Nicht nur die Durchführung des Versuchs, auch das Ergebnis war das gleiche: Während die mRNA der PP2C β 24 Stunden nach der Transfektion deutlich verringert war, hatte das keine erkennbaren Auswirkungen auf die Menge des Proteins; sie war sowohl nach 24 als auch 48 Stunden unverändert (Abb. 3.5-7).

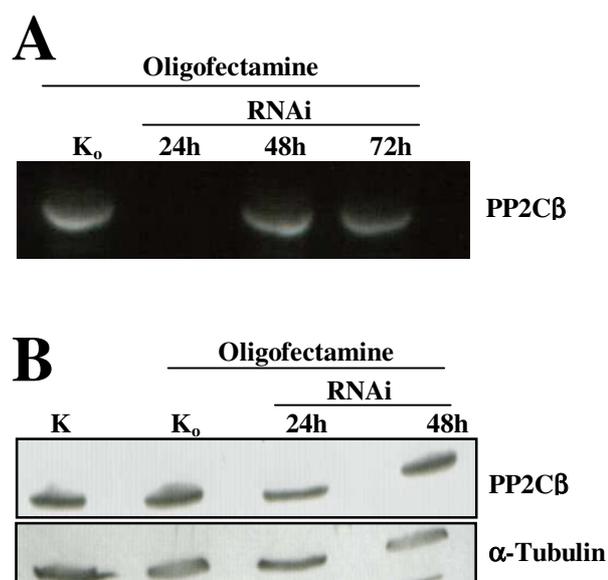


Abb. 3.5-7: Effekte der Transfektion von SH-SY5Y-Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden auf den mRNA- bzw. Proteinspiegel der PP2C β

SH-SY5Y-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden (PP2C β -Sequenz 1; Endkonzentration 30 nM) transfiziert. Die Zelldichte betrug etwa 5×10^4 Zellen/cm²; Behandlungsmedium war OptiMEM®, Transfektionsreagenz Oligofectamine® (1,5 μ l/ml). Die Kontrollgruppe K wurde lediglich mit Medium, Gruppe K₀ mit Medium und Oligofectamine® inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die RNA aus den Zellen isoliert und eine RT-PCR durchgeführt; bei einem zweiten Versuch wurden die Zellen für den Western Blot geerntet.

Das Resultat entsprach dem der PP2C α -RNAi: Während nach 24 Stunden im Agarosegel kein Signal auszumachen war (A), blieb die detektierte Proteinmenge praktisch unverändert (B).

3.5.6 Kombinierte Transfektion von SH-SY5Y-Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden zum *Knockdown* von PP2C α und PP2C β

Für die nachfolgenden Versuche wurde das Transfektionsprotokoll in einem wesentlichen Punkt geändert: Statt die Zellen wie bisher in Kulturschalen auszusäen und am folgenden Tag zu behandeln, wurde nun direkt nach dem Splitten der Zellen in Suspension transfiziert.

Grund für die Umstellung war die Neigung der SH-SY5Y-Zellen zur Clusterbildung: Nach der Aussaat war der Zellrasen oft nicht gleichmäßig; stattdessen hatten sich häufig Klumpen gebildet. Grundsätzlich bedeutete das für die Zellen im Inneren des Aggregats, dass sie nicht so gut transfiziert werden konnten, da die Oberfläche, die mit dem Transfektionsmedium in Kontakt kommt, reduziert war. In Suspension dagegen werden die Zellen ständig umspült, was die Aufnahme der Transfektionskomplexe verbessern sollte.

Leider führte auch das veränderte Protokoll nicht unmittelbar zum Erfolg (Abb. 3.5-8):

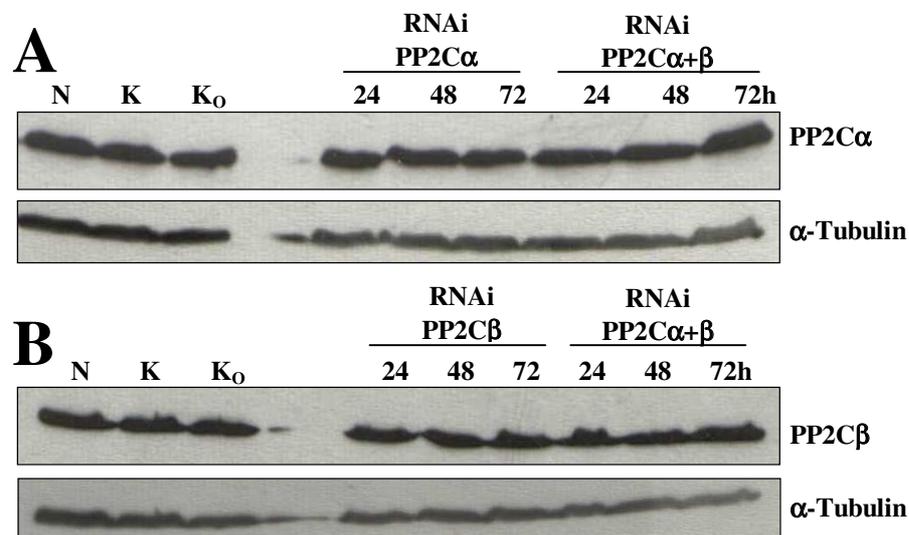


Abb. 3.5-8: Effekte der Suspensionstransfektion mit siRNAs gegen PP2C α und PP2C β
 SH-SY5Y-Zellen wurden in Medium suspendiert (10^6 Zellen/ml). Die Kontrollgruppe N wurde mit normalem Kulturmedium, Gruppe K mit OptiMEM®, Gruppe K₀ mit Medium und Oligofectamine® inkubiert. Die Oligofectamine®-Konzentration betrug stets 8 μ l/ml. Eine Gruppe der Zellen wurde nur mit siRNA gegen PP2C α (Sequenz PP2C α -3; 120 nM), eine nur mit solcher gegen PP2C β (Sequenz PP2C β -1; 120 nM), die letzte Gruppe mit der Kombination der siRNAs (je 120nM) transfiziert; die Transfektion dauerte 4 Stunden. Die Detektion beider Zielproteine im Western Blot zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Regulation.

Eine Regulation von PP2C α oder PP2C β war weder 24, 48 noch 72 Stunden nach der Transfektion zu beobachten. Die Wiederholung des Versuchs unter Verwendung der zweiten siRNA-Sequenz gegen PP2C β (PP2C β -Sequenz 2) führte zu einem entsprechenden Ergebnis (Abb. 3.5-9); auch hier war die Expression der PP2C α nach der kombinierten Transfektion unverändert, und die der PP2C β allenfalls nach 24 Stunden ein wenig reduziert (Abb. 3.5-9).

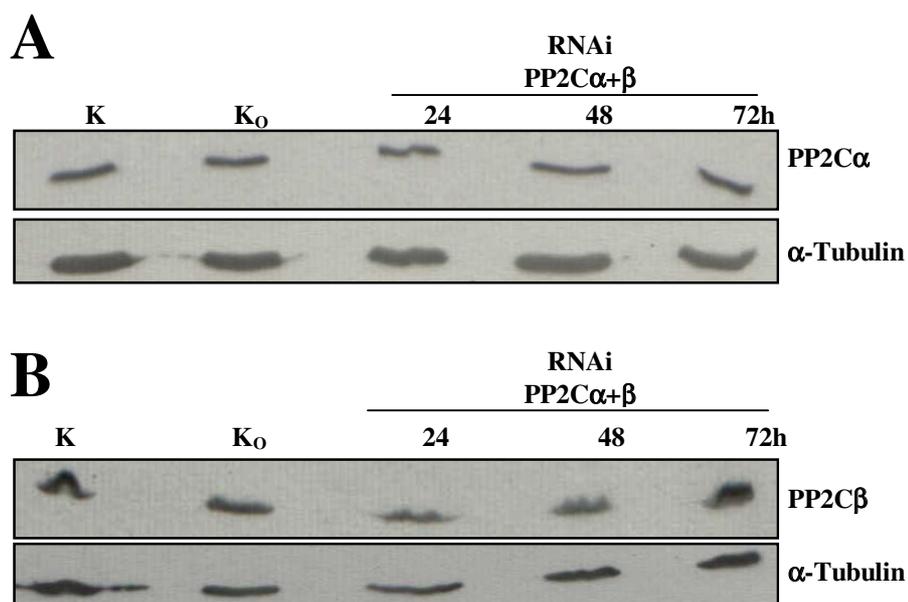


Abb. 3.5-9: Wiederholung der Suspensionstransfektion von SH-SY5Y-Zellen mit siRNAs gegen PP2C α und PP2C β

SH-SY5Y-Zellen wurden in OptiMEM® suspendiert (10⁶ Zellen/ml) und über einen Zeitraum von vier Stunden gleichzeitig mit siRNAs gegen PP2C α (Sequenz PP2C α -3; 120 nM), und PP2C β (Sequenz PP2C β -2; 120 nM) behandelt. Die Kontrollgruppe K wurde nur mit OptiMEM®, Gruppe K₀ mit OptiMEM® und Oligofectamine® inkubiert. Die Oligofectamine®-Konzentration betrug stets 8 μ l/ml.

Der Western Blot zeigte erneut keine Regulation der PP2C α . Auch der Spiegel der PP2C β blieb weitgehend unverändert und war allenfalls nach 24 Stunden ein wenig reduziert.

Die nächsten Maßnahmen zur Verbesserung des Protokolls bestanden zum ersten darin, dass die Zeitpunkte verändert wurden, an denen die Expression des Proteins überprüft wurde. So sollte ausgeschlossen werden, dass zwar eine Regulation der Zielproteine stattfindet, diese aber übersehen wird. Konkret wurden nun fünf Zeitpunkte zwischen acht und 48 Stunden nach Beginn der Transfektion untersucht. Zweitens wurde die Oligofectamine®-Konzentration im Transfektionsansatz von 8 auf 10 µl/ml erhöht. Außerdem wurden verbrauchsbedingt jeweils neue Chargen der siRNA-Oligonukleotide verwendet.

Die Neuerungen zeigten tatsächlich Wirkung: Sowohl die PP2C α als auch die PP2C β waren in den transfizierten SH-SY5Y-Zellen nun deutlich herunterreguliert; der Effekt war bereits acht Stunden nach der Transfektion vorhanden. Die Proteinspiegel blieben jeweils noch für mindestens weitere 16 Stunden reduziert; nach 48 Stunden hatten sie das Niveau der Kontrolle wieder erreicht (Abb. 3.5-10). Die Western Blot-Befunde wurden durch die immunzytochemische Detektion der PP2C α und PP2C β bestätigt (Abb. 3.5-11).

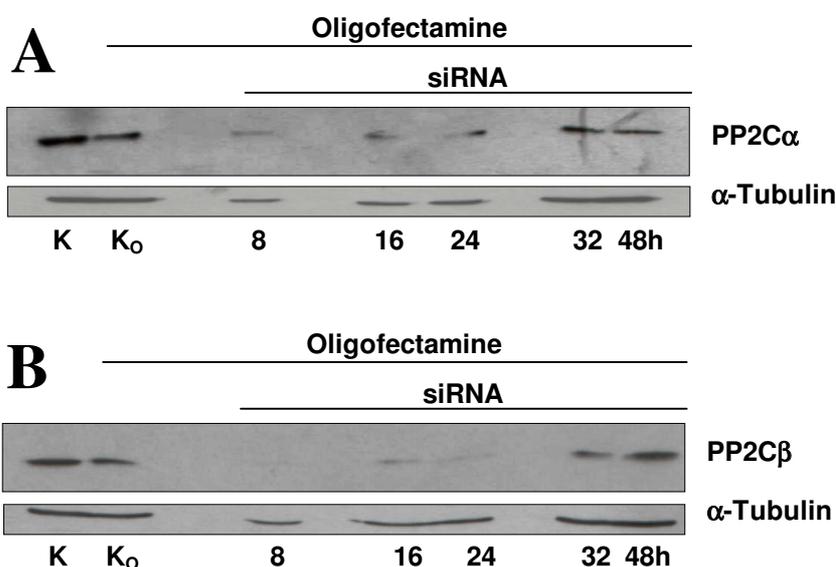


Abb. 3.5-10: Wiederholung der Suspensionstransfektion von SH-SY5Y-Zellen mit siRNAs gegen PP2C α und PP2C β unter veränderten Bedingungen

SH-SY5Y-Zellen wurden in OptiMEM® suspendiert (10⁶ Zellen/ml) und über einen Zeitraum von vier Stunden gleichzeitig mit siRNAs gegen PP2C α (Sequenz PP2C α -3; 120 nM), und PP2C β (Sequenz PP2C β -2; 120 nM) behandelt. Die Kontrollgruppe K wurde nur mit OptiMEM®, Gruppe K₀ mit OptiMEM® und Oligofectamine® inkubiert. Die Oligofectamine®-Konzentration betrug stets 10 µl/ml.

Im Western Blot zeigte sich eine deutliche Regulation von PP2C α (A) und PP2C β (B), deren Menge bereits nach acht Stunden reduziert war.

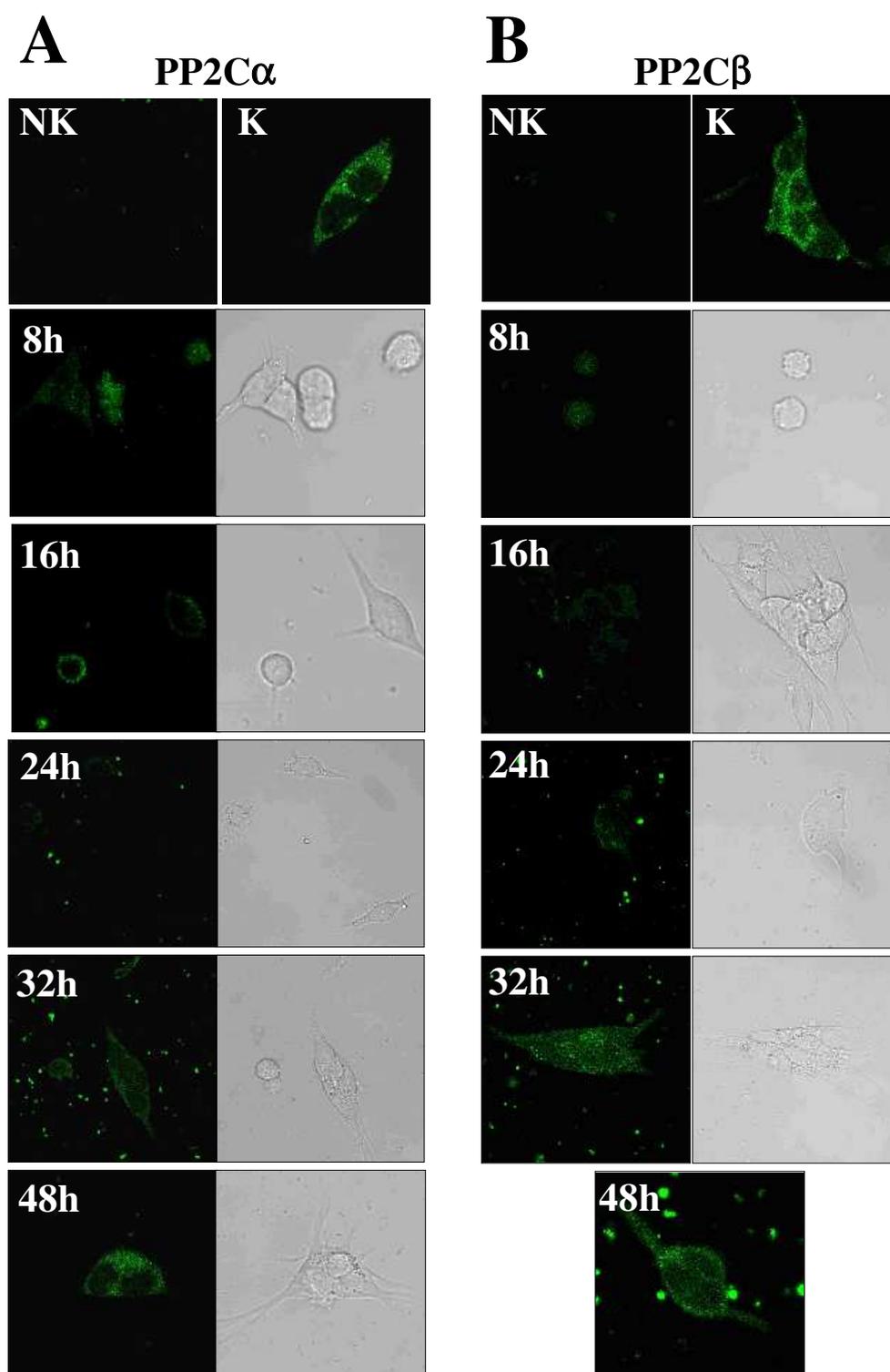


Abb. 3.5-11: Immunzytochemische Detektion des *Knockdowns* von PP2C α und PP2C β
 Transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und PP2C α bzw. PP2C β durch Immunzytochemie detektiert. Die Kontrolle (K) entsprach K₀ und war nicht transfiziert; die Negativkontrolle (NK) bestand aus transfizierten Zellen, die ohne Erstantikörper inkubiert worden waren. Die Aufnahmen des konfokalen Laserscanning-Mikroskops zeigen den zeitlichen Verlauf des *Knockdowns*, der bereits nach 8 Stunden evident, für mindestens weitere 16 Stunden vorhanden und 48 Stunden nach der Transfektion verschwunden war.

Im Rahmen des gleichen Versuchs wurde zusätzlich die Expression von Bad in den transfizierten Zellen untersucht. Dies sollte sicherstellen, dass die Regulation der PP2C-Isoformen nicht die Folge einer unspezifischen toxischen Wirkung der siRNA gewesen war.

Es zeigte sich, dass das Bad-Protein von der siRNA-Behandlung nicht beeinflusst wurde; die Intensität der Signale und damit die Expression von Bad blieb über den gesamten beobachteten Zeitraum hinweg unverändert (Abb. 3.5-12).

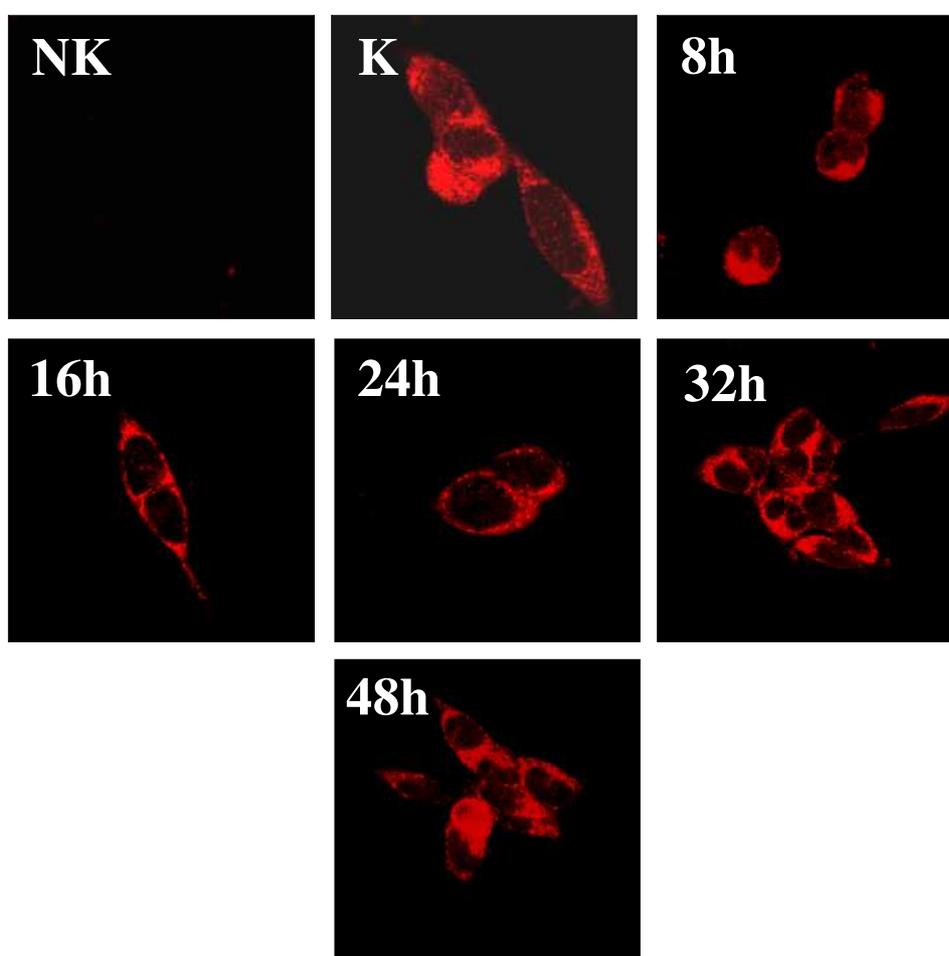


Abb. 3.5-12: Immunzytochemische Detektion zeigt keine Veränderung der Bad-Expression in RNAi-Zellen

Mit siRNAs gegen PP2C α und PP2C β transfiziert SH-SY5Y-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert; Bad wurde durch Immunzytochemie detektiert. Die Kontrolle (K) entsprach K_O und war nicht transfiziert; die Negativkontrolle (NK) bestand aus transfizierten Zellen, die ohne Erstantikörper inkubiert wurden. Die Aufnahmen des konfokalen Laserscanning-Mikroskops zeigen zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung der Bad-Expression in den Zellen.

3.5.7 *Knockdown* von PP2C α und PP2C β vermindert die ölsäureinduzierte Schädigung von SH-SY5Y-Zellen

Nachdem es nun möglich war, die Menge der PP2C-Isoenzyme α und β in der Zelle zu reduzieren, konnte die Rolle der PP2C in der Ölsäureschädigung von SH-SY5Y-Zellen näher untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen wie zuvor transfiziert und in der *Knockdown*-Phase dem üblichen Schädigungsprotokoll folgend mit 100 μ M Ölsäure inkubiert. Wie durch Western Blot-Kontrolle festgestellt, waren die Proteinspiegel zum Zeitpunkt der Behandlung, hier 16 Stunden nach Beginn der Transfektion, tatsächlich reduziert (Abb. 3.5-13).

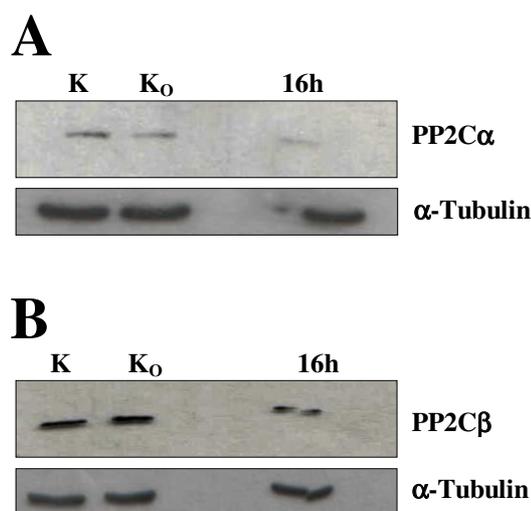


Abb. 3.5-13:

Zum Zeitpunkt der Ölsäureschädigung waren PP2C α und PP2C β herunterreguliert SH-SY5Y-Zellen wurden in Suspension (10⁶ Zellen/ml) über einen Zeitraum von vier Stunden hinweg gleichzeitig mit siRNAs gegen PP2C α (Sequenz PP2C α -3; 120 nM), und PP2C β (Sequenz PP2C β -2; 120 nM) transfiziert. Die Kontrollgruppe K wurde nur mit OptiMEM®, Gruppe K₀ mit OptiMEM® und Oligofectamine® inkubiert. Die Oligofectamine®-Konzentration betrug 10 μ l/ml.

Die Herunterregulation der PP2C α und PP2C β in der Zelle konnte die Schädigung durch Ölsäure nicht verhindern; allerdings war sie im Vergleich zur der Kontrollgruppe, die zuvor mit OptiMEM®/Oligofectamine® worden war, signifikant verringert (Abb. 3.5-14): Die Reduktion der PP2C α und PP2C β war damit protektiv.

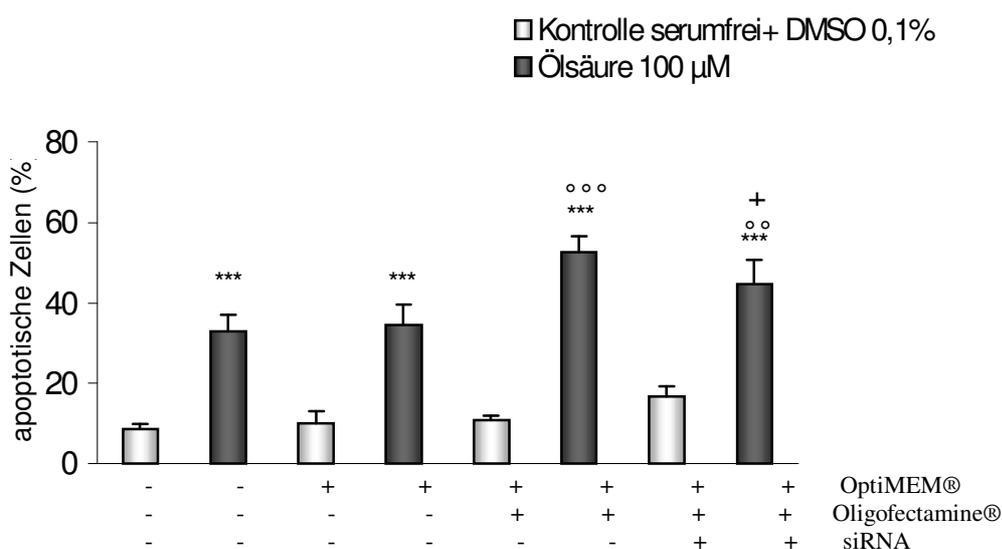


Abb. 3.5-14: Downregulation der PP2C α und PP2C β durch RNAi reduzierte die ölsäureinduzierte Schädigung von SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen mit unterschiedlicher Vorbehandlung (Kulturmedium/ OptiMEM®/ OptiMEM® + Oligofectamine®/Transfektion) wurden mit 100 µM Ölsäure in serumfreiem Kulturmedium vier Stunden lang behandelt; anschließend wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch Färbung mit Hoechst 33258 bestimmt.

In allen Fällen waren die Zellen verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe hochsignifikant geschädigt. Zuvor mit Oligofectamine® behandelte Gruppen waren signifikant stärker geschädigt als jene, die vor der Ölsäurebehandlung nur mit Kulturmedium oder OptiMEM® inkubiert worden waren. Die transfizierten Zellen waren verglichen mit der korrespondierenden Gruppe ohne siRNA weniger stark geschädigt: Die Herunterregulation der PP2C α und β war damit protektiv.

Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen Zellen \pm Standardabweichung in Prozent. *** p<0,001 jeweils zur Kontrolle; °°° p<0,001 zu den ölsäurebehandelten Gruppen, die nicht mit Oligofectamine® inkubiert wurden. + p<0,05 im Vergleich zur korrespondierenden Gruppe ohne siRNA.

4 Diskussion

4.1 Neuroprotektion durch Pifithrin- α am Modell der transienten Vorderhirnischämie der Ratte

4.1.1 Die transiente Vorderhirnischämie der Ratte

Eine Reihe von Tiermodellen ermöglicht die Untersuchung zerebraler ischämischer Schädigungen *in vivo*. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Verschluss der Karotiden bei gleichzeitiger Blutdrucksenkung eine transiente globale Ischämie im Rattenhirn erzeugt (Smith et al., 1984). Diese verursacht neuronale Schäden in verschiedenen Gehirnregionen, wobei das Striatum, vor allem aber das CA1-Band des Hippokampus betroffen ist (Pulsinelli et al., 1982).

Die Schädigung wird nicht unmittelbar manifest, sondern tritt vielmehr mit Verzögerung ein; bis zum Tod der CA1-Neurone vergehen rund 72 Stunden (Petito et al., 1987; Zhu et al., 1998). Dabei ist der exakte Mechanismus des Untergangs noch nicht endgültig geklärt; in jedem Fall spielen viele Faktoren eine Rolle, darunter freie Radikale (Nelson et al., 1992), erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel (Nakamura et al., 1999), Zytokine (Yamasaka et al., 1995) sowie diverse Proteasen (Arai et al., 1991).

Ob der Zelltod nach der globalen Ischämie nekrotischen oder apoptotischen Mechanismen folgt, wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert (Desphande et al., 1992; Nitatori et al., 1995). Schließlich wurde deutlich, dass apoptotische Prozesse für den Untergang der hippokampalen CA1-Neurone zumindest mitverantwortlich sind (Bredesen, 1995; Choi, 1996; MacManus und Linnik, 1997; Zhu et al., 1998). Beispielsweise konnte das Auftreten der apoptotischen DNA-Leiter in Neuronen des CA1-Bandes nachgewiesen werden (Okamoto et al., 1993; Sei et al., 1994); Caspase 3, ein Schlüsselmolekül der Apoptose, war nach transientser Ischämie in den vulnerablen Neuronen hochreguliert (Gillardon et al., 1997; Chen et al., 1998; Ni et al., 1998).

Nicht zuletzt sind auch Mitglieder der Bcl-2-Familie am Geschehen beteiligt: So konnte nach globaler Ischämie die Hochregulation proapoptotischer

Vertreter wie Bax und die Herunterregulation antiapoptotischer wie Bcl-2 und Bcl-xL in den Neuronen gezeigt werden (Hara et al., 1996; Chen et al., 1996; Krajewski et al., 1995; Chen et al., 1998). Die Beteiligung der Apoptose an der Schädigung macht die transiente globale Ischämie zu einem geeigneten Modell für die Untersuchung antiapoptotischer, neuroprotektiver Substanzen.

Physiologische Parameter beeinflussen das Ergebnis

Die physiologischen Parameter können das Ausmaß der Schädigung wesentlich beeinflussen. Um auszuschließen, dass Pifithrin einige dieser Parameter verändert und dadurch eine neuroprotektive Wirkung vortäuscht, wurden während der Untersuchung Temperatur, Blutdruck, pH-Wert sowie Blutgase kontrolliert.

Hypothermie während der globalen Ischämie wirkt neuroprotektiv (Widmann et al., 1993; Iwai et al., 1993). Dafür verantwortlich sind etwa der verlangsamte Verbrauch energiereicher Phosphate, die verminderte Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren, eine Erhöhung des zerebralen Blutflusses oder die rasche Normalisierung der nach Ischämie erniedrigten Proteinbiosynthese (Yager et al., 1993; Ginsberg et al., 1993; Kuluz et al., 1993; Widmann et al., 1993). Um Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten sowie Fehleinschätzungen der Pifithrin-Wirkung zu vermeiden, wurde die Körpertemperatur während der Ischämie mit einem Temperaturregler sowie in den zwei Stunden danach mit Hilfe einer Wärmelampe konstant gehalten (Seif el Nasr et al., 1992).

Durch die verringerte Perfusion während der Ischämie ist auch die Gehirntemperatur erniedrigt (Minamisawa et al., 1990); um daraus resultierende protektive Effekte auszuschließen, wurde die Gehirntemperatur während der Operation mit Hilfe eines Temperaturreglers bei 37°C konstant gehalten.

Auch der Blutdruck wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Ischämie kontrolliert; dadurch wurde sichergestellt, dass Pifithrin nicht den systemischen Blutdruck der behandelten Tiere verändert und so das Ergebnis beeinflusst.

Auch der pH-Wert des Blutes wurde überprüft: Eine Azidose fördert die Ausbildung des neuronalen Schadens (Nagai et al., 1993). Sie kann unter anderem durch eine Hyperglykämie verursacht werden: Infolge der Unterversorgung mit Sauerstoff während der Ischämie ist die anaerobe Umsetzung der Glukose zu Laktat begünstigt; ist das Glukoseangebot entsprechend groß, wird auch viel Laktat gebildet, akkumuliert, und der pH-Wert sinkt (Duverger und McKenzie, 1988; Nagai et al., 1993). Um Schwankungen der Blutzuckerwerte und dadurch verursachte Unterschiede des Blut-pH-Wertes zu vermeiden, wurde allen Ratten zwölf Stunden vor der Ischämie das Futter entzogen.

4.1.2 Neuroprotektion durch Pifithrin- α nach globaler Ischämie

Der Tumorsuppressor p53 spielt beim neuronalen Zelltod eine wichtige Rolle; in seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor beeinflusst er die Expression einer Reihe p53-induzierbarer Gene (Sheikh und Fornace 2000; Woods und Vousden, 2001), während er teilweise andere Transkriptionsfaktoren, etwa NF κ B, blockiert (Webster und Perkins, 1999). Unabhängig von der Transkription stimuliert p53 die Translokation von Bax zum Mitochondrium (Deng und Wu, 2000; Gao et al., 2001), aktiviert Caspasen (Ding et al., 2000) und wandert sogar selbst zum Mitochondrium, um dort die Apoptose zu beeinflussen (Marchenko et al., 2000).

Die Expression von p53 korreliert mit dem neuronalen Zelltod nach DNA-Schädigung und Behandlung mit Glutamat (Xiang et al., 1998; Cregan et al., 1999). Außerdem ist p53 am Absterben der Neurone nach einem Schlaganfall beteiligt (Li et al., 1994; Culmsee et al., 2001). Nach globaler Ischämie ist die p53-Expression in den selektiv vulnerablen Neuronen des CA1-Bandes längerfristig erhöht (McGahan et al., 1998; Gillardon et al., 1999), was eine Beteiligung an ihrem Untergang nahe legt.

Pifithrin- α ist ein synthetischer p53-Inhibitor (Komarov et al., 1999; Culmsee et al., 2001; vgl. Abb. 4.1-1). Er agiert unterhalb von p53 und hemmt seine Transkriptionsaktivität: Während die Spiegel von p53 unverändert bleiben, wird seine Translokation in den Kern und sein Binden an die DNA verhindert; infolge dieser Intervention kann p53 die Expression proapoptotischer Proteine nicht mehr steigern, die Apoptoserate wird reduziert (Culmsee et al., 2001).

Ursprünglich wurde Pifithrin- α in der Hoffnung entwickelt, mit seiner Hilfe gesundes Gewebe vor den Auswirkungen der Chemotherapie bei Krebserkrankungen zu bewahren (Komarov et al., 1999). Inzwischen konnte seine protektive Wirkung in verschiedenen Modellen gezeigt werden:

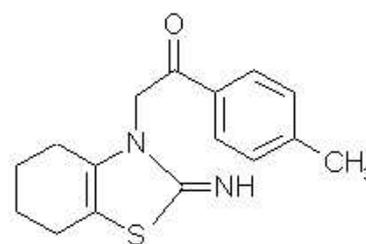


Abb. 4.1-1: Strukturformel des p53-Inhibitors Pifithrin- α

Pifithrin- α schützt unter anderem Mäuse vor tödlichen Dosen γ -Strahlung (Komarova et al., 1999), verringert die Infarktgröße nach fokaler zerebraler Ischämie in der Maus (Culmsee et al., 2001) und unterdrückt Hitzeschock- wie auch Glukokortikoid-induzierte Apoptosesignalwege in Fibroblasten und Krebszellen (Komarova et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Pifithrin- α auch im Modell der transienten globalen Ischämie der Ratte neuroprotektiv wirkt. Dazu wurden die Tiere eine Stunde vor Beginn der Ischämie behandelt; die Dosierung entsprach mit 2 mg/kg Körpergewicht (i.p.) derjenigen, die bereits im Mausmodell protektiv war (Culmsee et al., 2001). Prinzipiell ist die verabreichte Menge variierbar, allerdings ist Vorsicht geboten: Zu niedrige Dosierungen sind nicht ausreichend wirksam, bei zu hohen, etwa 4 mg/kg, treten toxische Effekte auf, und der neuroprotektive Effekt verschwindet (Culmsee et al., 2001; Leker et al., 2004).

Die Auswertung der neuronalen Schädigung im CA1-Band des Hippokampus sieben Tage nach der Ischämie zeigte, dass der Anteil der geschädigten Neurone in der Pifithrin-behandelten Gruppe verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert war. Damit war die Vorbehandlung mit Pifithrin- α neuroprotektiv; da die physiologischen Parameter, sprich Gewicht, Gehirn- und Körpertemperatur, Blutdruck, Blutgase und pH-Wert im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht verändert waren, ist dieser Effekt kein Artefakt, sondern eine echte Arzneistoffwirkung.

Pifithrin- α wirkt als p53-Inhibitor also nicht in kultivierten Zellen antiapoptotisch (Culmsee et al., 2001; Duan et al., 2002; Komarova et al., 2003; Liu et al., 2004; Murphy et al., 2004): Das Molekül ist klein, stabil und lipophil genug, um ZNS-gängig zu sein (Culmsee et al., 2001) und kann darum nach intraperitonealer oder intravenöser Verabreichung auch im Tiermodell neuroprotektiv sein – und zwar nicht nur nach fokaler (Culmsee et al., 2001; Leker et al., 2004), sondern auch nach globaler Ischämie (Abb. 4.1-2).

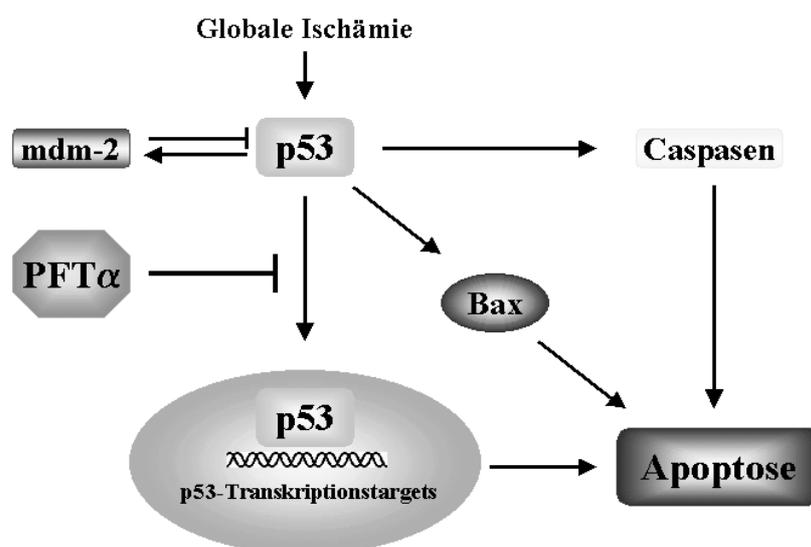


Abb. 4.1-2: p53-Hemmung durch Pifithrin- α (PFT- α) nach globaler Ischämie

4.2 Korrelation von PP2C-Aktivierung und fettsäureinduzierter Apoptose in SH-SY5Y-Zellen und kortikalen Neuronen

Die reversible Phosphorylierung ist ein wichtiger Mechanismus zur posttranslationalen Regulation von Proteinen. Phosphatasen, also jene Enzyme, die für das Entfernen der Phosphatreste verantwortlich sind, wurden lange Zeit unterschätzt; erst in neuerer Zeit erkannte man ihre Bedeutung und das Potential, das in ihnen steckt.

Die Proteinphosphatase 2C, monomere Serin/Threonin-Phosphatase und definierendes Mitglied der PPM-Familie, gehört zu diesen lange vernachlässigten Enzymen. Mit ein Grund dafür ist ihre Abhängigkeit von unphysiologisch hohen Mengen zweiwertiger Mangan- bzw. Magnesiumionen zur vollen Aktivierung. Doch unter bestimmten Voraussetzungen ist es möglich, diese Abhängigkeit auszuschalten: In Gegenwart von Fettsäuren mit bestimmten Strukturmerkmalen ist die PP2C auch bei physiologischen Magnesiumkonzentrationen voll aktiviert (Klumpp et al., 1998). Das lässt vermuten, dass die PP2C auch *in vivo* eine Rolle spielt, und tatsächlich ist sie über die Dephosphorylierung der unterschiedlichsten Substrate an vielen zellulären Prozessen beteiligt (1.2.4).

Fettsäuren, die die PP2C aktivieren, erfüllen bestimmte strukturelle Voraussetzungen (Klumpp et al., 1998; Abb. 4.2-1). Dazu gehört, dass sie mindestens 15 C-Atome lang und damit hinreichend lipophil sind; die Säurefunktion ist frei. Außerdem sind sie oxidierbar, d.h. sie besitzen mindestens eine Doppelbindung; diese liegt etwa in der Mitte des Moleküls und ist cis-konfiguriert.

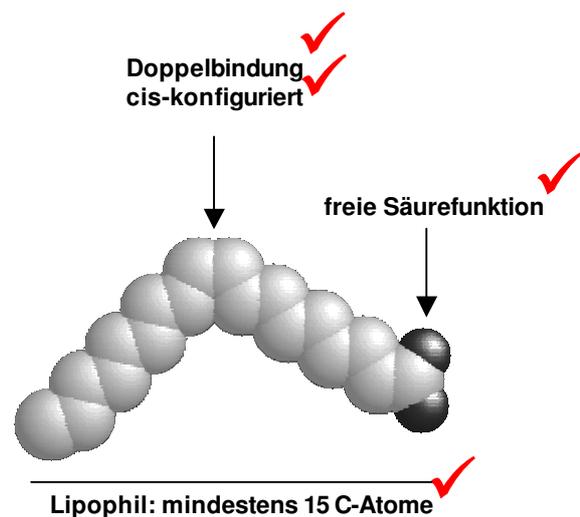


Abb. 4.2-1: Strukturelle Voraussetzungen für die Aktivierung der PP2C
(gezeigt am Beispiel der Ölsäure)

Ölsäure induziert zeit- und konzentrationsabhängig Apoptose in SH-SY5Y-Zellen

Ölsäure (18:1, cis- Δ^9) erfüllt alle strukturellen Voraussetzungen für die Aktivierung der PP2C. Tatsächlich erhöht sie *in vitro* die Aktivität von PP2C α und PP2C β unabhängig davon, ob es sich um rekombinantes oder natives Protein handelt (Klumpp et al., 1998).

In kultivierten Hühnerembryoneuronen konnte durch Behandlung mit Ölsäure in Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{M}$ Apoptose induziert werden (Klumpp et al., 2002), ebenso in embryonalen kortikalen Neuronen oder einer hippokampalen Mischkultur aus der Ratte (Grzeschik, 2003).

Generell gibt es zu den apoptoseauslösenden Eigenschaften der Ölsäure wie auch der anderer ungesättigter Fettsäuren widersprüchliche Berichte; teils wurden antiapoptotische (Hardy et al., 2000; Eitel et al., 2002; Lu et al., 2003), teils proapoptotische Wirkungen (Leaver et al., 2002; Cheng et al., 2003; Healy et al., 2003) beobachtet. Ob die Behandlung mit Ölsäure zum Erfolg, also zur Schädigung, führt, ist von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängig, beispielsweise vom verwendeten Zelltyp, der eingesetzten Konzentration oder der Anwesenheit störender Begleitstoffe.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein Schädigungsmodell in humanen Neuroblastomzellen SH-SY5Y etabliert und optimiert. Schließlich konnte bei einer Behandlungsdauer von 24 Stunden mit einer Ölsäurekonzentration $\geq 100 \mu\text{M}$ eine signifikante Schädigung erzielt werden. Bei mit der standardmäßig verwendeten Konzentration von $150 \mu\text{M}$ behandelten Zellen war der Anteil apoptotischer Zellen bereits nach etwa vier Stunden signifikant erhöht. Dabei deckte sich das Schädigungsprofil von SH-SY5Y-Zellen weitestgehend mit dem von kultivierten embryonalen kortikalen Rattenneuronen.

Unabdingbar war in beiden Fällen der Verzicht von Serum im Behandlungsmedium; für die Neuronen wurde Neurobasal ohne den sonst üblichen BSA-haltigen B27-Zusatz verwendet, für die SH-SY5Y-Zellen Kulturmedium ohne FCS. Ähnliches wurde im übrigen auch *in vitro* beobachtet, wo für die maximale Aktivierung der PP2C in Gegenwart von BSA eine Ölsäurekonzentration von $500 \mu\text{M}$ notwendig war, während ohne schon $300 \mu\text{M}$ ausreichten (Klumpp et al., 2001).

Wenn Serum im Medium die Schädigung verhindert, liegt das mit hoher Wahrscheinlichkeit daran, dass es die Ölsäure abfängt: Serumalbumin besitzt mehrere Bindestellen für C12- bis C18-Säuren; die Ölsäure bindet mit hoher Affinität (Bojesen und Bojesen, 1998; Bhattacharya et al., 2000; Choi et al., 2002). Der Fettsäure-Albumin-Komplex wird teilweise stabilisiert durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Säuregruppe und positiv geladenen Resten des BSA-Moleküls; wichtiger für die Stabilität sind allerdings die Wechselwirkungen der Alkylkette mit hydrophoben Aminosäuren von Albumin (Spector, 1975; Parks et al., 1983). In jedem Fall wird so die Menge freier Fettsäuren im Behandlungsmedium drastisch reduziert, und dadurch reicht die aufgenommene Ölsäure für die Apoptoseinduktion nicht mehr aus.

Der ölsäureinduzierte Zelltod ist unabhängig von Caspase 3

Die Caspase 3 ist ein wichtiges apoptoseförderndes Protein (Kuida et al., 1996). In der Zelle liegt sie als inaktives, dimeres Zymogen vor (Boatright et al., 2003); als Reaktion auf eine Reihe apoptoseauslösender Ereignisse wird diese Procaspase 3 durch Schneiden aktiviert (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die reife Caspase 3 dient häufig als Apoptosemarker, ihre Entstehung kann unter anderem durch Western Blot-Detektion verfolgt werden.

Die Berichte bezüglich der Caspase 3-Aktivierung nach der Ölsäurebehandlung sind widersprüchlich. So wurde in kultivierten Hühnerembryoneuronen (Klumpp et al., 2002), pankreatischen β -Zellen (Wrede et al., 2002) und YAC-1 Lymphomzellen (Puertollano et al., 2003) eine Caspaseabhängigkeit beobachtet, in HL-60-Zellen (Mizotani und Inoue, 2002) sowie verschiedenen Primärkulturen von Rattenneuronen (Grzeschik, 2003) dagegen nicht. Wie beim Schädigungsmodell überhaupt ist auch hier zu vermuten, dass die Abweichungen durch die unterschiedlichen Systeme und Protokolle bedingt sind. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Caspase 3-Aktivierung untersucht, und zwar nach der Behandlung embryonaler kortikaler Neurone mit 150 μ M Ölsäure. Wie zuvor bei Grzeschik (2003) wurde auch hier in den ersten acht Stunden der Behandlung trotz bereits hochsignifikanter Schädigung keine Zunahme reifer Caspase 3 festgestellt – die ölsäureinduzierte Apoptose war also auch in diesem Fall Caspase 3-unabhängig.

Allerdings wurden diesmal auch spätere Zeitpunkte untersucht, und tatsächlich war die Caspase 3 24 Stunden nach Beginn der Ölsäurebehandlung deutlich aktiviert.

Die Kombination der frühen Schädigung mit der späten Aktivierung von Caspase 3 wurde bereits zuvor beobachtet, beispielsweise nach der Apoptoseinduktion in Brustkrebszellen durch Glyceroltrinitrat (Millet et al., 2002) oder in SH-SY5Y-Zellen durch Platinverbindungen (Donzelli et al., 2004). Auch nach PDT-Behandlung (*photodynamic therapy*) von Krebszellen wird die Caspase 3 erst zu einem Zeitpunkt aktiviert, an dem die entscheidenden Prozesse längst eingesetzt haben (Xue et al., 2001); hier wurden regelmäßige, 50 kbp lange DNA-Fragmente gefunden, was eine Beteiligung des Apoptoseinduzierenden Faktors (*apoptosis-inducing factor*, AIF) nahe legt, der aus dem Mitochondrium freigesetzt zum Kern transloziert und dort caspaseunabhängig die DNA-Fragmentierung in Bruchstücke von typischerweise 50 kbp verursacht (Susin et al., 1999; Daugas et al., 2000). Die Möglichkeit einer AIF-Beteiligung an der Ölsäureschädigung ist noch zu klären.

In jedem Fall sind die Caspaseaktivierung und die Ereignisse, die sie vermittelt, für den eigentlichen Schädigungsmechanismus nicht relevant.

Die PP2C-Aktivierung korreliert mit der Apoptoseinduktion

Ölsäure aktiviert die PP2C *in vitro* und induziert sowohl in SH-SY5Y-Zellen als auch in embryonalen kortikalen Neuronen Apoptose. Um diese beiden Eigenschaften zu korrelieren, wurden Fettsäuren bzw. Fettsäurederivate untersucht (Abb. 4.2-2), die die PP2C nicht aktivieren und demnach unter den gewählten Versuchsbedingungen auch keine Apoptose auslösen dürften.

Tatsächlich zeigte sich, dass weder die gesättigte Stearinsäure, noch die trans-konfigurierte Elaidinsäure, noch der Methylester der Ölsäure die Zellen schädigen konnten; die Linolsäure dagegen, die alle Anforderungen für die PP2C-Aktivierung erfüllt, schädigte ebenso schnell und effektiv wie die Ölsäure.

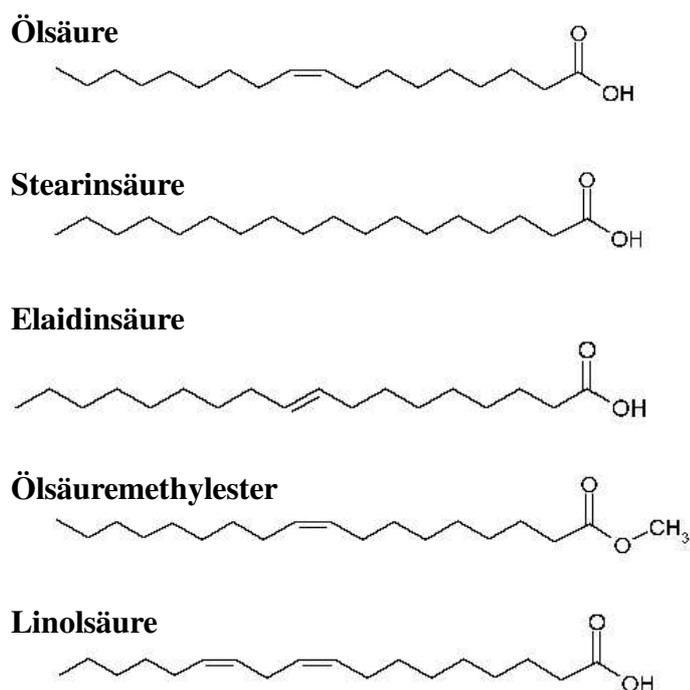


Abb. 4.2-2: Strukturformeln der untersuchten Fettsäuren

Wenn die Elaidinsäure, wie im übrigen für verschiedene Systeme beschrieben (Klumpp et al., 2002; Grzeschik, 2003; Funari et al., 2003), im Gegensatz zur Ölsäure keine Apoptose auslöst, so liegt das nicht an mangelnder Aufnahme in die Zelle: Durch Nilblaufärbung und Detektion mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop konnte gezeigt werden, dass es diesbezüglich zwischen den beiden Isomeren keine Unterschiede gibt. Beide Fettsäuren werden rasch in die Zelle aufgenommen und bilden schließlich im Zytoplasma Lipidtröpfchen, ein Phänomen, das zuvor bereits in ölsäurebehandelten Makrophagen beobachtet wurde (Chen et al., 2002). Die Behandlung mit Ölsäuremethylester lieferte ein entsprechendes Ergebnis, auch er wurde schnell aufgenommen und in Form von Fetttröpfchen deponiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Schädigung auf eine spezifische Wirkung der Ölsäure zurückzuführen ist und nicht einfach die Folge einer Überladung der Zelle mit Fett war.

Insgesamt kann man zusammenfassen, dass alle untersuchten Fettsäuren, die die PP2C aktivieren, sowohl in SH-SY5Y-Zellen als auch in embryonalen kortikalen Neuronen Apoptose auslösten, während die nicht-aktivierenden das nicht vermochten (Tab. 4.2-1): Die PP2C-Aktivierung korreliert mit der Apoptoseinduktion.

Tab. 4.2-1:
Zusammenhang zwischen Struktur und PP2C-Aktivierung bzw. Apoptoseinduktion

Substanz		Konfiguration	Säurefunktion	PP2C-Aktivierung	Apoptose
Ölsäure	18:1	cis	ja	ja	ja
Stearinsäure	18:0	-	ja	nein	nein
Elaidinsäure	18:1	trans	ja	nein	nein
Ölsäuremethylester	18:1	cis	nein	nein	nein
Linolsäure	18:2	cis/cis	ja	ja	ja

Kombination mit Ölsäuremethylester verstärkt die Ölsäurewirkung

Ölsäuremethylester aktiviert die PP2C nicht (Klumpp et al., 2001); kombiniert man ihn *in vitro* mit Ölsäure, wird deren aktivierende Wirkung reduziert (Klumpp, persönliche Mitteilung).

Anders sah es bei der Behandlung von kultivierten Zellen aus: Sowohl in SH-SY5Y-Zellen als auch in kortikalen Neuronen war die Schädigung nach der Kombinationsbehandlung stärker als bei der Inkubation mit der entsprechenden Menge Ölsäure alleine.

Für dieses Phänomen sind verschiedene Erklärungsansätze möglich. So kann die unterschiedliche Affinität der beiden Substanzen zu zellulären Bindeproteinen eine Rolle spielen: In der Zelle ist die Konzentration freier und damit potentiell apoptotisch wirkender Fettsäuren gering, der größte Teil ist an Proteine gebunden. Nun ist die Bindungsaffinität von der Hydrophobizität abhängig: Je lipophiler das Molekül, desto größer die Affinität (Richieri et al., 2000). Aufgrund seiner Methylgruppe ist der Ester lipophiler als die Säure; denkbar ist also, dass er aufgrund seiner höheren Affinität zu den fettsäurebindenden Proteinen der Zelle Bindekapazitäten blockiert oder sogar die Ölsäure verdrängt, dadurch die Menge an freier Ölsäure in der Zelle erhöht und so den apoptotischen Effekt verstärkt.

Eine alternative Erklärung berücksichtigt die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Ölsäure (Linden und Routtenberg, 1989). Dies geschieht teils direkt, teils indirekt über eine Steigerung der Diacylglycerolsynthese sowie die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Verkest et al., 1988; Diaz-Guerra et al., 1991; Khan et al., 1993; Chen et al., 2002). Ölsäure verursacht die Translokation der PKC-Isoformen α , $\beta 1$ und δ vom Zytoplasma zur Membran (Chen et al., 2002), wo sie Diacylglycerol und Phosphatidylserin binden und dadurch aktiviert werden. Anders als PKC θ und ϵ , die über Bad-Phosphorylierung das Überleben der Zelle fördern (Bertolotto et al., 2000), sind in Abhängigkeit vom jeweils untersuchten System für die PKC α (Powell et al., 1996; Nowak, 2002), PKC $\beta 1$ (Knox et al., 1993; McFarlane und Manzel, 1994) und PKC δ (Lu et al., 1997; Reyland et al., 1999) proapoptotische Wirkungen beschrieben (Übersicht bei Gutcher et al., 2003). Ölsäureethylester und andere Fettsäureacyl ester selbst aktivieren die PKC nicht, allerdings verstärkt die Kombination mit Fettsäuren deren PKC-aktivierende Wirkung signifikant (Seifert et al., 1987; Holian et al., 1989; Shinomura et al., 1991). Somit ist denkbar, dass unter normalen Umständen ein Teil der proapoptotischen Wirkung der Ölsäure auf die PKC-Aktivierung zurückzuführen ist, und eben dieser Anteil durch die Kombination mit dem Ester so weit vergrößert wird, dass dies für eine signifikante Steigerung der Schädigung bei unveränderter Ölsäurekonzentration ausreicht.

4.3 Einfluss der Ölsäurebehandlung auf PP2C α , PP2C β und Bad

Expression von PP2C α , PP2C β und Bad in SH-SY5Y-Zellen und Neuronen

Da die Proteinphosphatase 2C und ihr Substrat Bad in der Zelle untersucht werden sollten, musste zunächst sichergestellt werden, dass sie in der gewählten Zelllinie oder Primärkultur auch exprimiert werden.

Mittels Western Blot-Analyse konnten beide Isoformen der PP2C sowohl in SH-SY5Y-Zellen als auch in embryonalen kortikalen Neuronen spezifisch detektiert werden; gleiches galt für Bad.

Staurosporindifferenzierung hat keinen Einfluss auf die Expressionsniveaus

Auch der mögliche Einfluss der Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen auf die Expression von PP2C und Bad wurde untersucht. Die Behandlung mit niedrigen Dosen Staurosporin, in diesem Fall 30 nM, führt innerhalb von einigen Tagen zu einem Stopp der Proliferation, die Zellen entwickeln längere Ausläufer und bilden schließlich ein dichtes Netzwerk aus. Neben den morphologischen gibt es im Verlauf der Differenzierung auch eine Reihe biochemischer und funktioneller Veränderungen: So ist die Membran staurosporindifferenzierter Zellen leichter erregbar, und während die DNA-Synthese sinkt, steigt die Expression neuronen- und differenzierungstypischer Proteine wie Neuropeptid Y, neuronenspezifischer Enolase oder GAP-43 (Jalava et al., 1993; Tieu et al., 1999). Auch an der Apoptose beteiligte Proteine sind betroffen: Nach Staurosporindifferenzierung ist die Expression von antiapoptotischem Bcl-2 reduziert, die von apoptoseförderndem p53 dagegen erhöht (Tieu et al., 1999).

Die Untersuchung durch Western Blot zeigte keine Veränderungen der PP2C α , PP2C β oder Bad-Expression durch die Differenzierung.

PP2C α , PP2C β und Bad sind in SH-SY5Y-Zellen kolokalisiert

Belegt ist die Dephosphorylierung von Bad durch PP2C *in vitro* (Klumpp et al., 2003). Sollen sie auch in der Zelle miteinander interagieren, müssen sie im gleichen Kompartiment lokalisiert sein.

Die hohe Spezifität der Antikörper gegen PP2C α , PP2C β und Bad machte auch ihren immunzytochemischen Nachweis möglich. Dabei zeigte sich, dass PP2C α und PP2C β mit Bad im Zytoplasma kolokalisiert sind. Im Zellkern wurde kein Bad exprimiert; dies deckt sich mit Beschreibungen aus der Literatur, wonach Bad im Zytosol lokalisiert bzw. bedingt durch die Dimerisierung mit Bcl-2 oder Bcl-xL mit der Mitochondrienmembran assoziiert ist (Zha et al., 1997 ; Kitada et al., 1998). Auch PP2C α war im Nukleus nicht detektierbar - anders als die β -Isoform, die im Kern zwar nicht so reichlich wie im Zytoplasma, aber dennoch vorhanden war; dies bestätigt einen früheren Befund von Wenk und Mitarbeitern, demzufolge PP2C β im Kern und im Zytosol lokalisiert ist (Wenk und Mieskes, 1995).

Die unterschiedliche Lokalisation der beiden Isoformen ist ein Hinweis darauf, dass sie trotz hoher Sequenzidentität nicht notwendig das exakt gleiche Substratspektrum besitzen; tatsächlich hat die PP2C α eine höhere Affinität zum metabotropen Glutamatrezeptor 3 (Flajolet et al., 2003), und die stressaktivierte Kinase TAK1 wird zwar von PP2C β , nicht aber von PP2C α dephosphoryliert (Hanada et al., 2001).

PP2C α , PP2C β und Gesamt-Bad sind nach Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen oder kultivierten embryonalen kortikalen Neuronen unverändert

Die Western Blot-Detektion von PP2C α und PP2C β zeigte, dass die jeweiligen Proteinspiegel durch die Behandlung mit Ölsäure weder in SH-SY5Y-Zellen noch in der embryonalen kortikalen Neuronenkultur beeinflusst wurden; allerdings hat die Menge eines Proteins nur bedingte Aussagekraft über seine tatsächliche Aktivität.

Das proapoptotische Bcl-2-Protein Bad wurde ebenfalls detektiert; auch hier gab es keine erkennbare Veränderung der Proteinmenge. Allerdings kann die PP2C nur den Phosphorylierungsgrad von Bad, nicht aber die Expression beeinflussen; es muss also das eigentliche Substrat, nämlich Phospho-Bad (pBad), untersucht werden.

Untersuchung der Bad-Phosphorylierung an S¹¹², S¹³⁶ und S¹⁵⁵ nach Ölsäurebehandlung von SH-SY5Y-Zellen

Die Untersuchung der Bad-Phosphorylierung nach der Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit Ölsäure sollte einen Hinweis darauf liefern, ob Bad tatsächlich *in vivo* von PP2C dephosphoryliert wird.

Die Western Blot-Detektion der jeweiligen Phosphoproteine mit den entsprechenden Antikörpern lieferte allerdings unbefriedigende Ergebnisse; während es eine Reihe starker, aber unspezifischer Banden gab, waren an der richtigen Stelle keine oder nur sehr schwache Signale zu erkennen. Möglicherweise ist die Menge an pBad in der (Neuroblastom-) Zelle zu gering, um auf diesem Weg einwandfrei detektiert zu werden.

Daher wurde eine Immunpräzipitation mit dem spezifischen Antikörper gegen Gesamt-Bad durchgeführt; die gewonnenen Lysate wurden für einen Western Blot verwendet und mit den unterschiedlichen pBad-Antikörpern detektiert. Im Anschluss wurden die Membranen erneut inkubiert, diesmal mit dem Antikörper gegen Gesamt-Bad; so sollte erstens die pBad-Bande zweifelsfrei identifiziert werden, und zweitens das Mengenverhältnis von pBad und Gesamt-Bad zu den jeweiligen Zeitpunkten ermittelt werden. Eine eindeutige Regulation von phosphoryliertem Bad war allerdings in keinem der drei Fälle, pBad-S¹¹², pBad-S¹³⁶ und pBad-S¹⁵⁵, zu beobachten; der Anteil von pBad am gesamten Bad-Protein veränderte sich nicht.

Das muss nicht zwingend bedeuten, dass die PP2C ihre apoptosefördernde Wirkung nicht über Bad vermittelt. Möglich, dass schon die Dephosphorylierung vergleichsweise geringer Mengen von Bad ausreicht, um das empfindliche Gleichgewicht der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine in Richtung Apoptose zu verschieben, die verwendete Detektionsmethode aber nicht empfindlich genug ist, die geringe Veränderung zu erfassen. In diesem Fall würden spezifischere Antikörper gegen phosphoryliertes Bad ein besseres Resultat versprechen. Alternativ könnte auch die Analyse der Interaktion zwischen PP2C und Bad mittels FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) oder ein Ausschalten des Bad-Proteins zur Klärung seiner Beteiligung an der fettsäureinduzierten Apoptose beitragen.

4.4 Etablierung eines RNAi-Modells zum simultanen *Knockdown* der PP2C α und PP2C β in SH-SY5Y-Zellen

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind keine Stoffe bekannt, welche die PP2C spezifisch und effektiv hemmen; klassische Phosphataseinhibitoren wie Okadainsäure oder Microcystin beeinflussen ihre Aktivität nicht nennenswert (Bialojan und Takai, 1988; MacKintosh et al., 1990; Übersicht bei McCluskey et al., 2002). Damit ist eine funktionelle Analyse der PP2C nur möglich, wenn es gelingt, das Enzym in der Zelle auf einem anderen Weg auszuschalten.

4.4.1 Expressionsregulation durch RNA-Interferenz

Es existiert eine Reihe molekularbiologischer Ansätze, die Menge bzw. Aktivität eines bestimmten Proteins in der Zelle zu verringern. Der Angriff am fertigen Protein kann durch peptidische Antikörper erfolgen. Daneben ist auch der Einsatz von Aptameren möglich, d.h. von kurzen DNA- oder häufiger RNA-Sequenzen definierter dreidimensionaler Struktur, die mit hoher Affinität und Spezifität an ein funktionelles Protein binden und es deaktivieren (Jayasena, 1999). Auf Expressionsebene wirken Ribozyme: Diese katalytisch aktiven Nukleinsäuremoleküle bauen die mRNA ab und verhindern so ihre Translation (Cech et al., 1981; Kruger et al., 1982). Auch die einzelsträngigen Antisense-Oligonukleotide wirken zumindest teilweise über eine Hemmung der Translation, entweder indem sie die mRNA binden und damit blockieren, oder durch Aktivierung der RNase H, welche die mRNA abbaut; außerdem können sie im Kern mit der DNA hybridisieren und auf diesem Weg das Spleißen verhindern (Lee und Roth, 2003).

Eine neuere und überaus vielversprechende Methode, die in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung gewonnen hat, ist die RNA-Interferenz, kurz RNAi. Sie unterbricht die Genexpression auf der mRNA-Ebene. Dabei macht sie sich einen endogenen Mechanismus zunutze, der in den Zellen vieler Organismen, in Pflanzen ebenso wie in Nematoden, Insekten oder in Säugerzellen, dafür sorgt, dass fremde doppelsträngige RNA erkannt und in regelmäßige Stücke zerschnitten wird; die Fragmente vermitteln anschließend den Abbau

komplementärer mRNA im Zytosol (Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000; Hammond et al., 2001; Hannon, 2002). Biologisch wichtig ist dieser Mechanismus unter anderem bei der Verteidigung gegen Viren, deren genetische Information auf diesem Weg eliminiert wird (Ruiz et al., 1998).

Für die RNAi in Säugerzellen muss siRNA verwendet werden

Was bei *C. elegans* oder *Drosophila* problemlos funktioniert, führt in Säugerzellen zu unerwünschten Effekten: Auch sie interpretieren das Eindringen der dsRNA als Virusinfektion, reagieren allerdings mit der Aktivierung des Interferonsystems: Die durch dsRNA aktivierte Kinase PKR phosphoryliert den Transkriptionsfaktor eIF2 α (Manche et al., 1992) und schaltet so allgemein die Translation ab, die ebenfalls aktivierte RNase L (Minks et al., 1979) zerstört die mRNA. Schließlich geht die Zelle zugrunde (McManus und Sharp, 2002).

Diese unerwünschten Reaktionen lassen sich umgehen, indem man statt dsRNA siRNA einschleust: Sie ist zwar ebenfalls doppelsträngig, für die Aktivierung der Interferonabwehr aber zu kurz (Elbashir et al., 2001a). Da die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verwendeten SH-SY5Y-Zellen humanen Ursprungs sind, wurde auch hier auf siRNA zurückgegriffen.

Der Vorgehensweise von Elbashir und Mitarbeitern folgend wurden die hier verwendeten Oligonukleotide chemisch synthetisiert und mittels Lipofektion in die Zellen eingebracht (Elbashir et al., 2001a).

Grundsätzlich gibt es zur chemischen Synthese eine Reihe von Alternativen, etwa die Möglichkeit der *in vitro*-Transkription von dsRNA, die dann mit Hilfe der Endonuklease RNase III zu siRNA geschnitten wird; diese wird anschließend in die Zelle transfiziert (Myers et al., 2003). Darüber hinaus wurden Systeme entwickelt, die die Bildung der siRNA in der Zielzelle selbst ermöglichen: Entsprechende Vektoren sorgen für die Expression von *small hairpin RNAs* (shRNAs), die anschließend durch Dicer zur siRNA geschnitten werden (Yu et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002; Paddison et al., 2002). Neben den DNA-basierten Vektoren existieren auch entsprechende virale Systeme, die auf Retro- (Devroe und Silver, 2002), Lenti- (Rubinson et al., 2003) oder Adenoviren (Shen et al., 2003) zurückgreifen.

Im Vergleich zur exogenen Synthese der siRNA-Oligonukleotide haben die endogenen Anwendungen den Vorteil, dass der Effekt der RNAi länger anhält: Ist das Zielprotein nach der Lipofektion der siRNA nur innerhalb eines mehr oder minder engen Zeitfensters herunterreguliert, so sorgt die endogene Expression der siRNA für einen längerfristig stabilen *Knockdown* (Scherr et al., 2003).

Versuche, die Wirkung der von außen zugeführten siRNA durch chemische Modifikationen an den Enden des RNA-Moleküls zu verlängern, waren teilweise erfolgreich; eine Sequenz mit zwei 2'-*O*-methyl RNA-Nukleotiden am 5'-Ende und vier methylierten Monomeren am 3'-Ende war ebenso aktiv wie das nicht modifizierte Molekül, hatte aber verlängerte Effekte (Amarzguioui et al., 2003; Kurreck, 2003).

Die siRNA-Sequenzen für den Knockdown von PP2C α und PP2C β

Ölsäure aktiviert sowohl die PP2C α als auch die PP2C β (Klumpp et al., 1998). Insofern war es nicht ausreichend, nur eine der beiden Isoformen herunterzuregulieren; ein simultaner *Knockdown* war das Ziel. Das gleichzeitige Ausschalten zweier Proteine durch RNAi ist nicht ganz unproblematisch, da der zeitliche Verlauf der Herunterregulation für verschiedene Proteine durchaus unterschiedlich sein kann, bedingt unter anderem durch Abweichungen in Menge und Halbwertszeit. Allerdings sind sich die beiden PP2C-Isoformen recht ähnlich, was die Erfolgsaussichten erhöhen dürfte.

Die Sequenz der Oligonukleotide wird anhand der cDNA des Zielproteins festgelegt. Für die Auswahl der siRNAs existiert eine Reihe von Regeln, die in erster Linie auf Beobachtungen und Erfahrungen basieren; ihre Beachtung erhöht die Erfolgsaussichten der RNAi (Elbashir et al., 2001b; Tuschl, 2001). Auch die Sequenzen, die gegen die PP2C α und PP2C β zur Verfügung standen, wurden im wesentlichen nach diesen Regeln ausgesucht (2.11.3).

In der jüngeren Vergangenheit wurde verstärkt nach Gemeinsamkeiten funktionierender siRNA-Sequenzen geforscht, um so ein effektiveres Design zu ermöglichen. Dabei zeigte sich, dass für eine erfolgreiche RNAi nicht nur die Sequenz der siRNA, sondern auch ihre thermodynamische Stabilität entscheidend ist; besonders wichtig ist diese für die initiale Erkennung der siRNA durch RISC (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003; Reynolds et al., 2004).

So wurden einige weitere Eigenschaften wirksamer siRNAs definiert: Sie nämlich sind an bestimmten Stellen thermodynamisch instabil (Abb. 4.4-1). Das betrifft unter anderem die Schnittstelle in der Mitte der Sequenz, etwa zwischen Basenpaar 9 und 14, wo beim Abbau der mRNA der siRNA/mRNA-Komplex geschnitten wird (Khvorova et al., 2003). Außerdem wird ein siRNA-Strang, dessen 5'-Ende infolge einer Häufung von A/U wenig stabil ist, besser in RISC eingebaut und entwunden (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003). Sequenzen, die diese Voraussetzungen erfüllen, ähneln in erstaunlicher Weise einer anderen RNA-Sorte, der *microRNA* (miRNA). Während bisher keine endogene siRNA im Säuger identifiziert werden konnte (Doench et al., 2003), wurde miRNA in Pflanzen oder Nematoden ebenso nachgewiesen wie in Säugerzellen (Lagos-Quintana et al., 2001), wo sie mittels Dicer aus Haarnadelstrukturen von etwa 70 nt Länge geschnitten werden und als reife, 21-23 nt lange einzelsträngige RNA die Translation der mRNA verhindert, anders als die siRNA allerdings, ohne sie dabei zu zerstören (Grishok et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2001).

Auch reife miRNA-Sequenzen besitzen ein instabiles 5'-Ende, und letzten Endes sind funktionierende siRNAs in der Regel solche, die den natürlich vorkommenden miRNAs in Bezug auf Stabilität und thermodynamisches Profil besonders ähnlich sind (Khvorova et al., 2003); inzwischen wurde darüber hinaus gezeigt, dass siRNA auch als miRNA funktionieren kann (Doench et al., 2003; Zeng et al., 2003).

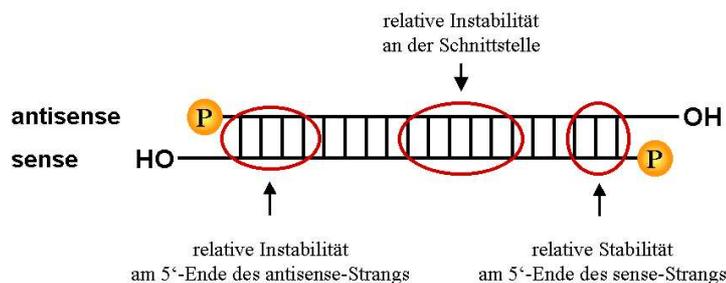


Abb. 4.4-1: Eigenschaften effektiver siRNA-Oligonukleotide (modif. nach Silva et al., 2003)

Ein auf dieser Basis und unter Berücksichtigung weiterer, länger bekannter Parameter wie etwa den Empfehlungen zum GC-Gehalt der Sequenz, von Reynolds und Mitarbeitern definierter Algorithmus (Reynolds et al., 2004) wurde nachträglich auf die im Rahmen dieser Arbeit verfügbaren siRNA-Sequenzen angewendet (Tab. 4.4-1). Für bestimmte Eigenschaften werden hier Punkte vergeben; funktionierende siRNAs sollten mindestens sechs Punkte erreichen. Obwohl die Effektivität nicht zwingend mit dem Punktwert korreliert, ist die Aussicht, dass Sequenzen mit Werten < 6 zum Erfolg führen, recht gering (Reynolds et al., 2004). Es zeigte sich, dass sämtliche siRNAs gegen die PP2C α oder PP2C β über dem geforderten Mindestwert lagen.

Tab. 4.4-1: Anwendung des Algorithmus von Reynolds et al. auf die siRNA-Sequenzen gegen PP2C α und PP2C β

		PP2C α Sequenz 1	PP2C α Sequenz 2	PP2C α Sequenz 3	PP2C α Sequenz 4	PP2C β Sequenz 1	PP2C β Sequenz 2
I	GC 30-52%	1	1	1	1	—	—
II	A/U Pos.15-19	4	4	3	3	2	5
III	palindrom-neg.	1	1	1	1	1	1
IV	A Pos.19 sense	1	—	1	—	—	—
V	A Pos. 3 sense	1	1	1	—	1	—
VI	U Pos.10 sense	1	—	—	1	1	—
VII	nicht G/C an Pos. 19 sense	1	1	1	1	1	1
VIII	nicht G Pos.13	1	1	1	—	1	1
Σ		11	9	9	7	7	8

Für die Versuche wurden PP2C α -Sequenz 3 und PP2C β -Sequenz 2 verwendet, weil sie in den orientierenden Versuchen zu Beginn am besten funktioniert hatten.

Transfektion der SH-SY5Y-Zellen

Prinzipiell funktionierende siRNA-Sequenzen allein garantieren allerdings noch nicht den Erfolg der RNAi; auch Menge und Qualität der siRNA spielen eine Rolle. Zuviel ist zytotoxisch, zuwenig bringt kein befriedigendes Ergebnis. Synthesebedingte Verunreinigungen, etwa Salze oder Proteine, aber auch Stücke mit falscher Sequenz oder einer Länge von mehr als 30 Basenpaaren beeinträchtigen das Resultat.

Auch die Transfizierbarkeit der verwendeten Zelllinie an sich beeinflusst das Ergebnis der RNAi, ebenso wie der aktuelle Zustand, in dem sie sich befindet. Bei adhärennten Zellen ist auch die Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion entscheidend; allerdings gibt es wie so oft auch hier keine verbindlichen Regeln, die optimale Zelldichte kann von Linie zu Linie stark variieren und liegt im allgemeinen zwischen 30 und 70% Konfluenz .

Die Transfektionsmethode spielt ebenfalls eine Rolle. Verbreitet ist die Elektroporation, bei der ein Spannungsimpuls die Bildung von Poren in der Zellmembran verursacht; die Oligonukleotide können durch sie in die Zelle hinein (Wong und Neumann, 1982). Die Methode ist effektiv, bringt aber meist eine hohe Mortalität mit sich. Weniger Stress für die Zellen bedeutet da die Lipofektion, also das Einschleusen der siRNA im Komplex mit kationischen Liposomen oder vergleichbaren Formulierungen. Diese Reagenzien dürfen in der eingesetzten Menge für die Zellen nicht schädlich sein und müssen darüber hinaus die jeweilige siRNA ausreichend gut komplexieren. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das Transfektionsreagenz Oligofectamine® verwendet, das speziell für das Einschleusen von kurzen Nukleotidsequenzen entwickelt wurde. Auf die Verwendung des üblichen Kulturmediums wurde verzichtet: Es enthält Antibiotika, die in Verbindung mit dem Lipofektionsreagenz toxische Wirkungen haben können; auch das enthaltene Serum stört, unter anderem können Enzyme enthalten sein, welche die siRNA abbauen und damit deaktivieren (Qiagen Transfection Ressource Book, 2002). Stattdessen wurde OptiMEM® verwendet, eine für die Transfektion von Zellen gut geeignete Variante von MEM (Saffer und Hughes, 1986), die ihre Eignung vielfach unter Beweis gestellt hat.

4.4.2 *Knockdown von PP2C α und PP2C β durch RNAi*

Ziel der Bemühungen war die Etablierung eines Systems, in dem gleichzeitig beide PP2C-Isoenzyme α und β herunterreguliert werden konnten, um auf diesem Weg mehr über die Funktion der PP2C in der Zelle und ihre Beteiligung an Signalwegen, insbesondere der Apoptose, zu gewinnen.

Nach einer Reihe von Experimenten, bei denen durch Variation der Versuchsparameter das optimale Protokoll gefunden werden sollte, gelang schließlich die Etablierung eines Modells, bei dem PP2C α und PP2C β von SH-SY5Y-Zellen innerhalb des etwa gleichen Zeitfensters herunterreguliert waren. Dies wurde erreicht, indem die Zellen direkt nach dem Splitten in OptiMEM® suspendiert und transfiziert wurden. Während der vierstündigen Inkubation mit den Oligofectamine®/siRNA-Komplexen sorgte regelmäßiges Aufschütteln dafür, dass die Zellen stets von Transfektionsmedium umspült wurden; im Vergleich zur Transfektion adhärenter, aber aggregierter SH-SY5Y-Zellen konnten die Komplexe so besser in die Zellen aufgenommen werden.

Die zum Einschleusen notwendige Menge Oligofectamine® betrug 10 μ l/ml. Zwar war diese Konzentration beim Toxizitätstest zu Beginn der Untersuchungen bereits schädlich für die Zellen, aber hier wurden die Zellen nur vier Stunden statt 72 damit inkubiert, so dass in Anbetracht der stark verkürzten Zeitspanne keine größeren Schäden zu befürchten waren. Diese Vermutung wurde bestätigt, als entsprechend behandelte Zellen mit Hoechst 33258 gefärbt und die apoptotischen Kerne gezählt wurden: Ihr Anteil hatte sich im Vergleich zur oligofectaminefrei inkubierten Kontrollgruppe nicht erhöht. Die Transfektionszeit selbst war vergleichsweise kurz, allerdings konnte mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide gezeigt werden, dass sie zur Transfektion von SH-SY5Y-Zellen ausreichend ist (Faber, persönliche Mitteilung).

Die Reduktion des Proteinspiegels war sowohl bei PP2C α als auch bei PP2C β bereits nach acht Stunden evident; das ist etwas früher als in vielen Veröffentlichungen, wobei allerdings dort häufig der 24 Stunden-Wert der früheste untersuchte Zeitpunkt ist. Für die Transfektion mit dsRNA ist nachgewiesen, dass die mRNA-Spiegel bereits nach zwei Stunden deutlich

reduziert sind (Zamore et al., 2000); bei einer entsprechend kurzen Halbwertszeit des Zielproteins ist auch mit einer frühen Abnahme der Proteinmenge zu rechnen.

Die Regulation bewegte sich bei mehreren unabhängigen Experimenten stets im gleichen Rahmen, was das Zeitfenster und den Grad der Reduktion betrifft; kleinere Schwankungen ließen sich allerdings trotz Verwendung des exakt gleichen Protokolls nicht vermeiden; immerhin handelt es sich bei einer Zellkultur um ein lebendes System mit den entsprechenden Unwägbarkeiten. Auch die für die Experimente verwendeten Materialien können Unterschiede im Ergebnis bedingen; so wurde auch im Rahmen der für diese Arbeit gemachten Untersuchungen beobachtet, dass unterschiedliche Chargen der gleichen siRNA-Sequenz bei unverändertem Protokoll zu durchaus unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

Neben der Western Blot-Detektion wurde die Regulation von PP2C α und PP2C β auch durch eine Immunzytochemie verfolgt. Sie bestätigte die Ergebnisse, zeigte aber gleichzeitig auch, dass nicht alle Zellen gleichermaßen transfiziert worden waren; bei einem kleineren Teil der SH-SY5Y-Zellen hatte sich die Intensität der Färbung nicht verändert. Allerdings verwundert das nicht, eine hundertprozentige Transfektion ist keinem Fall zu erwarten. Auch Bad als unabhängiges Protein wurde immunzytochemisch detektiert; anders als bei PP2C änderte sich die Intensität und damit die Expression während der RNAi nicht. Dies zeigt, dass die Regulation der Phosphatase die Folge der RNAi war und nicht auf unspezifischen toxischen Effekten beruhte.

4.5 Beteiligung der PP2C am ölsäureinduzierten Zelltod in SH-SY5Y-Zellen

Durch die RNAi bot sich nun die Möglichkeit, die PP2C α und PP2C β in den SH-SY5Y-Zellen herunterzuregulieren und in der Folge ihre Funktion zu analysieren.

Optimal ist es, wenn die gesamte Behandlung während der *Downregulation* abgeschlossen werden kann; so wird vermieden, dass der Proteinspiegel während der Behandlung wieder ansteigt und dies das Ergebnis verfälscht. Im vorliegenden

Fall bot die RNAi ein Zeitfenster von etwa zwanzig Stunden für die Behandlung, für die Ölsäureschädigung unter normalen Bedingungen mehr als ausreichend.

Im Versuch wurde 16 Stunden nach der Transfektion behandelt; zu diesem Zeitpunkt waren erstens die Proteine herunterreguliert, zweitens waren seit der Aussaat bereits 12 Stunden vergangen und die Zellen hafteten fest genug an der Kulturschale, um behandelt und fixiert zu werden. Zu früheren, ebenfalls denkbaren Zeitpunkten führen die Inkubation und insbesondere die nachfolgenden notwendigen Waschschriffe zum Ablösen der Zellen, was die Auswertung des Versuchs empfindlich stört.

Schließlich wurden die RNAi-Zellen nach dem üblichen Protokoll mit Ölsäure behandelt. Anhand entsprechender Kontrollgruppen konnte gezeigt werden, dass zuvor mit Oligofectamine® inkubierte Zellen den Einflüssen der Ölsäure gegenüber deutlich empfindlicher waren: Sie waren signifikant stärker geschädigt. Möglicherweise fördern und beschleunigen anhaftende Oligofectamine®-Reste auf der Zelloberfläche die Aufnahme der Ölsäure. Beim Vergleich der RNAi-Zellen mit der entsprechenden, Oligofectamine®-behandelten Kontrolle aber zeigte sich, dass die Reduktion der PP2C auch zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Apoptoserate geführt hatte: Die PP2C ist damit an der ölsäureinduzierten Apoptose von SH-SY5Y-Zellen beteiligt.

Wenn die RNAi-Zellen trotz reduzierter PP2C-Spiegel nicht unempfindlich gegenüber der Ölsäure waren, ist nicht völlig überraschend, zumal die PP2C zwar herunterreguliert, aber mitnichten ganz verschwunden war; auch das verbliebene Enzym kann Apoptose vermitteln – nur eben nicht mehr im selben Umfang.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die PP2C nicht allein für das Geschehen verantwortlich ist: Immerhin ist die Ölsäure kein sonderlich spezifischer Aktivator der PP2C und beeinflusst neben ihr weitere Proteine in der Zelle, die zumindest theoretisch auch zur Apoptose beitragen können; dass die Ölsäure Apoptose und nicht Nekrose auslöst, ist inzwischen gesichert (Wrede et al., 2002).

Zu den vielfältigen Wirkungen der Ölsäure, die im übrigen auch als neurotropher Faktor wirken kann (Medina und Taberero, 2002; Granda et al., 2003), zählt unter anderem die Freisetzung von Neurotransmittern aus Synaptosomen (Rhoads et al., 1983; Troeger et al., 1984), von Calciumionen

(Siafaka-Kapadou et al., 1997), von NO (Maestre et al., 2003) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Maestre et al., 2003; Puertollano et al., 2003); sie aktiviert neben der PKC auch die Proteinphosphatase 5 (Skinner et al., 1999), die Proteinphosphatase 2B (Kessen et al., 1999), die cAMP-aktivierte Proteinkinase AMPK (Clark et al., 2004), die Phospholipasen C (Kobayashi et al., 2004) und D (Chalifour und Kanfer, 1982) sowie die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) (Hardy et al., 2000). Der an der Apoptose beteiligte PPA-Rezeptor (*peroxisome proliferator-activated receptor*) wird von der Ölsäure ebenfalls aktiviert (Braissant et al., 1996; Cullingford et al., 1998; Wolfrum et al., 2001). Interessant ist auch ihre Wirkung in Verbindung mit humanem Lactalbumin: HAMLET (*human α -lactalbumin made lethal to tumor cells*) ist ein Komplex, in dem die Ölsäure Lactalbumin in einer zytotoxischen Konformation stabilisiert; er induziert Apoptose in humanen und murinen Tumorzelllinien (Svensson et al., 2000; Düringer et al., 2003; Svanborg et al., 2003), bringt Papillome der Haut zum Verschwinden (Gustafsson et al., 2004) und bewirkt den Untergang von humanen Glioblastomzellen ohne Beeinträchtigung des umgebenden gesunden Gewebes (Fischer et al., 2004).

Die Ölsäure hat auch Auswirkungen auf das Mitochondrium: So wurde nach entsprechender Behandlung eine Entkopplung der mitochondrialen Phosphorylierung beobachtet (Ogawa et al., 1988), die Membranpermeabilität stieg infolge einer Zunahme von proapoptotischem Bax an, wodurch Cytochrom c und andere apoptosefördernde Substanzen vermehrt freigesetzt wurden (Duval et al., 2002; Maestre et al., 2003; Epanand et al., 2004).

Dies legt die Vermutung nahe, dass an der ölsäureinduzierten Apoptose eine ganze Reihe von Faktoren mitwirkt. In jedem Fall aber zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen, dass die PP2C einer dieser Faktoren ist und in der ölsäureinduzierten Apoptose tatsächlich eine Rolle spielt; Inhibitoren der PP2C könnten daher in apoptotische Vorgänge, und möglicherweise nicht nur in solche, die durch Fettsäuren ausgelöst wurden, eingreifen und die Zellen vor dem Untergang bewahren.

5 Zusammenfassung

Störungen der neuronalen Apoptose sind an einer ganzen Reihe von Krankheitsbildern beteiligt, darunter so häufige wie Krebs, neurodegenerative Erkrankungen und Schlaganfall. Daher ist es wichtig, die zugrundeliegenden Signalwege zu untersuchen, um die Zusammenhänge aufzuklären und die Möglichkeit der therapeutischen Intervention zu schaffen.

Im ersten Teil der vorliegenden Untersuchungen wurden die neuroprotektiven Eigenschaften des p53-Inhibitors Pifithrin- α im *in vivo*-Modell der transienten globalen Ischämie der Ratte getestet. Die Vorbehandlung mit dem Hemmstoff konnte die Schädigung der hippocampalen CA1-Neurone reduzieren; Pifithrin- α war damit neuroprotektiv.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung der Rolle der Proteinphosphatase 2C in der ölsäureinduzierten Apoptose. Die Isoformen α und β dieser magnesiumabhängigen Serin/Threonin-Phosphatase werden durch Fettsäuren mit definierten Strukturmerkmalen aktiviert. Für die PP2C-aktivierende Ölsäure konnte im übrigen gezeigt werden, dass sie in bestimmten Systemen Apoptose hervorruft.

Um herauszufinden, ob zwischen diesen Ereignissen ein Zusammenhang besteht, wurde zunächst ein Modell etabliert, in dem die Ölsäure in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y konzentrations- und zeitabhängig Apoptose auslöst. Schließlich wurde gezeigt, dass PP2C-aktivierende Fettsäuren sowohl SH-SY5Y-Zellen als auch kultivierte embryonale kortikale Neurone der Ratte schädigen konnten, während nicht-aktivierende zwar ebenso gut von den Zellen aufgenommen wurden, aber keine Apoptose zu induzieren vermochten.

PP2C α wird im Zytosol der SH-SY5Y-Zellen exprimiert, die PP2C β zusätzlich im Zellkern. Die Behandlung mit Ölsäure änderte nichts an der durch Western Blotting und Immunzytochemie detektierten PP2C-Menge in der Zelle.

Auch das PP2C-Substrat Bad wurde untersucht; da es ebenfalls im Zytosol lokalisiert ist, kann es prinzipiell auch in der Zelle mit der PP2C interagieren. Allerdings konnten nach der Behandlung mit Ölsäure eine Regulation weder von Gesamt-Bad noch von phosphoryliertem Bad, detektiert nach Immunpräzipitation, gezeigt werden. Zur Klärung der Beteiligung von Bad an der ölsäureinduzierten Apoptose sind daher weitere Untersuchungen notwendig.

Da gegenwärtig noch keine spezifischen PP2C-Inhibitoren verfügbar sind, wurde ein Modell etabliert, in dem mit Hilfe der RNA-Interferenz durch gezielten Abbau der entsprechenden mRNA die PP2C α und PP2C β spezifisch und gleichzeitig herunterreguliert werden konnten. Schließlich wurden die RNAi-Zellen während des Zeitfensters der *Downregulation* nach dem üblichen Protokoll mit Ölsäure behandelt: Verglichen mit der entsprechenden Kontrolle waren die SH-SY5Y-Zellen mit reduziertem PP2C-Gehalt weniger stark geschädigt.

Die Proteinphosphatase 2C ist also an der ölsäureinduzierten Apoptose von SH-SY5Y-Zellen beteiligt; ihre Hemmung, sei es durch *Knockdown* oder Inhibitoren, reduziert den Zelltod und könnte damit eine Möglichkeit auch zum therapeutischen Eingriff bei Zuständen mit pathologisch gesteigerter Apoptose bieten.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlemeyer B, Selke D, Schaper C, Klumpp S, Krieglstein J (2001): Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. *Eur J Pharmacol* 430: 1-7
- Aitken A, Jones D, Soneji Y, Howell S (1995): 14-3-3 proteins: biological function and domain structure. *Biochem Soc Trans* 23: 605-611
- Alnemri ES (1997): Mammalian cell death proteases: a family of high conserved aspartate specific cystein proteases. *J Cell Biochem* 64: 33-42
- Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, Prydz H (2003): Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 31: 589-595
- American Heart Association (2001): 2002 Heart and stroke statistical update. Dallas, Texas: American Heart Association
- Amersham Purification Handbook o.J.
- Antonsson B (2001): Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family ‘killer -proteins’ and their victim, the mitochondrion. *Cell Tiss Res* 306: 347-361
- Arai A, Vanderklish P, Kessler M, Lee K, Lynch G (1991): A brief period of hypoxia causes proteolysis of cytoskeletal proteins in hippocampal slices. *Brain Res* 555: 276-280
- Araki T, Tohno Y, Takakusu A, Yamada MO (1985): Polarization fluorometry of nucleosome DNA structure with Hoechst 33258 fluorochrome. *Cell Mol Biol.* 31: 407-12
- Arends M, Morris R, Wyllie A (1990): Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136, 593-608.
- Arenz C, Schepers U (2003): RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application? *Naturwissenschaften* 90: 935-359
- Ayllón V, Martinez AC, Garcia A, Cayla X, Rebollo A (2000): Protein phosphatase 1 α is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *Embo J* 19: 2237-2246
- Bae J, Hsu SY, Leo CP, Zell K, Hsueh AJ (2001): Underphosphorylated BAD interacts with diverse antiapoptotic Bcl-2 family proteins to regulate apoptosis. *Apoptosis* 6: 319-330
- Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M (1993): mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 12: 461-468
- Barford D (1996): Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* 21: 407-412

- Barkett M, Xue D, Horvitz HR, Gilmore TD (1997): Phosphorylation of I κ B- α inhibits its cleavage by caspase CPP32 *in vitro*. *J Biol Chem* 272: 29419-29422
- Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JE, Mirabelli CK (1992): Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 41: 1023-1033
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366
- Bertoletto C, Maulon L, Filippa N, Baier G, Auberger P (2000): Protein kinase C θ und ϵ promote T-cell survival by a Rsk-dependent phosphorylation and inactivation of Bad. *J Biol Chem* 275: 37246-37250
- Bhattacharya AA, Grune T, Curry S (2000): Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium- and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* 303: 721-732
- Biajolan C, Takai A (1988): Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256: 283-90
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973): Morphology and Growth, tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Res* 33: 2643-2652
- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen I, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR (2003): A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11: 529-541
- Bojesen IN, Bojesen E (1998): Nature of the elements transporting long-chain fatty acids through the red cell membrane. *Membrane Biol* 163: 169-1818
- Bollen M, Beullens M (2002): Signaling by protein phosphatases in the nucleus. *Trends Cell Biol* 12: 138-145
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999): Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286: 1358-1362
- Bork P, Brown NP, Hegyi H, Schultz J (1996): The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Sci* 5: 1421-1425
- Bosher JM, Labouesse M (2000): RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2: E31-E36
- Braissant O, Fougelle F, Scott C, Dauca M, Wahli W (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α - β / δ and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366

- Bredesen DE (1995): Neural apoptosis. *Ann Neurol* 38: 839-851
- Bronner LL, Kanter DS, Manson JE (1995): Primary prevention of stroke. *New Engl J Med* 333: 1392-1400
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553
- Bryan PM, Potter LR (2002): The atrial natriuretic peptide receptor (NPR-A/GC-A) is dephosphorylated by distinct microcystin-sensitive and magnesium-dependent protein phosphatases. *J Biol Chem* 277: 16041-16047
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA (2001): Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9742-9747
- Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C (2000): Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404: 245
- Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ (1981): *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27: 487-497
- Chalifour R, Kanfer JN (1982): Fatty acid activation and temperature perturbation of rat brain microsomal phospholipase D. *J Neurochem* 39: 299-305
- Chen J, Graham SH, Nakayama M, Zhu RL, Jin K, Stetler RA, Simon RP (1997): Apoptotic repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 2-10
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP (1998): Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18: 4914-4928
- Chen J, Zhu RL, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin K, Stetler RA, Simon RP, Graham SH (1996): Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem* 67: 64-71
- Chen JS, Greenberg AS, Wang SM (2002): Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 86: 784-791
- Cheng A, Kaldis P, Solomon MJ (2000): Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C alpha and beta 2 isoforms. *J Biol Chem* 275: 34744-34749
- Cheng J, Ogawa K, Kuriki K, Yokoyama Y, Kamiya T, Seno K, Okuyama H, Wang J, Luo C, Fuji T et al. (2003): Increased intake of n-3 polyunsaturated fatty acids elevates the level of apoptosis in the normal sigmoid colon of patients polypectomized for adenomas/tumors. *Cancer Lett* 193: 17-24

- Chiang CW, Harris G, Ellig C, Masters SC, Subramanian R, Shenolikar S, Wadzinski BE, Yang E (2001): Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin 3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood* 97: 1289-1297
- Ching YP, Kobayashi T, Tamura S, Hardie DG (1997): Specificity of different isoforms of protein phosphatase-2A and protein phosphatase-2C studied using site-directed mutagenesis of HMG-CoA reductase. *FEBS Lett* 411: 265-268
- Choi DW (1996): Ischemia-induced neural apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 6: 667-672
- Choi JK, Ho J, Curry S, Qin D, Bittman R, Hamilton JA (2002): Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin. *J Lipid Res* 43: 1000-1010
- Chuang CF, Meyerowitz EM (2000): Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4985-4990
- Clark H, Carling D, Saggerson D (2004): Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. *Eur J Biochem* 271: 2215-2224
- Clemens MJ (1997): Pkr: a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 945-959
- Cohen GM (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16
- Cohen P (2000): The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 25: 596-601
- Cohen P (2001): The role of protein phosphorylation in human health and disease. *Eur J Biochem* 268: 5001-5010
- Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y (1990): Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 15: 98-102
- Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, Cesi V, Srinivasula SM, Alnemri S, Calabretta B (2001): Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol Cell Biol* 21: 3025-3036
- Conklin DS, Galaktionov K, Beach D (1995): 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7892-7896
- Cory S, Adams JM (2002) : The Bcl2-Family : regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647-656
- Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitrou J (1981): Detection of a common feature in several human tumor cell lines- a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 41-45

- Cregan SP, MacLaurin JG, Craig CG, Robertson GS, Nicholson DW, Park DS, Slack RS (1999): Bax-dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19: 7860-7869
- Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB (1998): Distribution of mRNA encoding the peroxisome proliferator-activated receptor α , β , and γ and the retinoic receptors α , β , and γ in rat nervous system. *J Neurochem* 70: 1366-1375
- Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, Greig NH, Mattson MP (2001): A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid β -peptide. *J Neurochem* 77: 220-228
- Cutler NR, Sramek JJ (2001): Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: challenges for drug development. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25: 27-57
- D'Agata V, Magro G, Travali S, Musco S, Cavallaro S (1998): Cloning and expression of the programmed cell death regulator Bad in the rat brain. *Neurosci Lett* 243: 137-140
- Dahan D, Evagelidis A, Hanrahan JW, Hinkson DA, Jia Y, Luo J, Zhu T (2001): Regulation of the CFTR channel by phosphorylation. *Pflugers Arch* 443: S92-S96
- Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygl SP, Korsmeyer SJ (2003): BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424: 952-956
- Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D (1996): Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J* 15: 6798-6709
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters SC, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997): Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241
- Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME (2000): 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6: 41-51
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000): Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14: 729-739
- Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG (1995): 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* 377: 421-425

- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G (1997): Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278: 687-689
- Deng Y, Wu X (2000) : Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12050-12055
- Desdouits F, Siciliano JC, Nairn AC, Greengard P, Girault JA (1998): Dephosphorylation of Ser-137 in DARPP-32 by protein phosphatases 2A and 2C: different roles in vitro and in striatonigral neurons. *Biochem J* 330: 211-216
- Desphande J, Bergstedt K, Linden T, Kalimo H, Wieloch T (1992): Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. *Exp Brain Res* 88: 91-105
- Devroe E, Silver PA (2002): Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* 2:15
- Diaz-Guerra MJ, Junco M, Bosca L (1991): Oleic acid promotes changes in the subcellular distribution of protein kinase C in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 266: 23568-23576
- Ding HF, Lin YL, McGill G, Juo P, Zhu H, Blenis J, Yuan J, Fisher DE (2000): Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J Biol Chem* 275: 38905-38911
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated review. *Trends Neurosci* 22: 391-397
- Doench JG, Petersen CP, Sharp PA (2003): siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17: 438-442
- Dombradi V, Krieglstein J, Klumpp S (2002): Regulating the regulators – conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO Rep* 3: 120-124
- Donovan N, Becker EBE, Konishi Y, Bonni A (2002): JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem* 277: 40944-40949
- Donzelli E, Carfi M, Miloso M, Strada A, Galbiati S, Bayssas M, Griffon-Etienne G, cavaletti G, Petruccioli MG, Tredici G (2004): Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurooncol* 67: 65-73
- Duan W, Zhu X, Ladenheim B, Yu QS, Guo Z, Oyler J, Cutler RG, Cadet JL, Greig NH, Mattson MP (2002): p53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental parkinsonism. *Ann Neurol* 52: 597-606
- Dudley NR, Goldstein B (2003): RNA interference: silencing in the cytoplasm and the nucleus. *Curr Opin Mol Ther* 5: 113-117

- Dunningham MG (1968): The use of Nile blue sulphate in the histochemical identification of phospholipids. *Stain Technol* 43: 249-256
- Düringer C, Hamiche A, Gustafsson L, Kimura H, Svanborg C (2003): HAMLET interacts with histones and chromatin in tumor cell nuclei. *J Biol Chem* 278: 42131-42135
- Duval C, Auge N, Frisach MF, Casteilla L, Salvayre R, Negre-Salvayre (2002): Mitochondrial oxidative stress is modulated by oleic acid via an epidermal growth factor receptor-dependent activation of glutathione peroxidase. *J Biochem* 367: 889-894
- Duverger D, McKenzie ET (1988): The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial blood pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:449-461
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997): Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57, 1835-1840.
- Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Haring HU, Kellerer M (2002): Different role of saturated and unsaturated fatty acids in β -cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 853-856
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001a): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature* 411: 494-498
- Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002): Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26: 199-213
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001b): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001c): Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20: 6877-6888
- Epanand RF, Martinou JC, Montessuit S, Epanand RM (2004): Fatty acids enhance membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochem J* 377: 509-516
- Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (1994): Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 269: 2550-2561

- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987): Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413-7417
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811
- Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, Vande Woude GF, O'Connor PM, Appella E (1997) : Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6048-6053
- Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K (2003): Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10: 76-100
- Fischer W, Gustafsson L, Mossberg AK, Gronli J, Mork S, Bjerkgvig R, Svanborg C (2004): Human α -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastom cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival. *Cancer Res* 64: 2105-2112
- Flajolet M, Rakhilin S, Wang H, Starkova N, Nuangchamnong N, Nairn AC, Greengard P (2003): Protein phosphatase 2C binds selectively to and dephosphorylates metabotropic glutamate receptor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 16006-16011
- Fukunaga K, Kobayashi T, Tamura S, Miyamoto E (1993): Dephosphorylation of autophosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 268: 133-137
- Funari SS, Barcelo F, Escriba PV (2003): Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes. *J Lipid Res* 44: 567-575
- Gao CF, Ren S, Zhang L, Nakajima T, Ichinose S, Hara T, Koike K, Tsuchida N (2001): Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 265: 145-151
- Gillardon F, Böttier B, Schmitz B, Zimmermann M, Hossmann KA (1997): Activation of CPP-32 protease in hippocampal neurons following ischemia and epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 50: 16-22
- Gillardon F, Spranger M, Tiesler C, Hossmann KA (1999): Expression of cell death-associated phospho-c-Jun and p53-activated gene 608 in hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 73: 138-143
- Ginsberg MD, Globus MYT, Dietrich WD, Busto R (1993): Temperature modulation of ischemic brain injury – a synthesis of recent advances. In: *Progress in brain research* 96 (Kogure K, Hossmann KA, Siesjö BK, eds) Elsevier Science Publisher, New York, S. 13-21

- Granda B, Tabernero A, Tello V, Medina JM (2003): Oleic acid induces GAP-43 expression through a protein kinase C-mediated mechanism that is independent of NGF but synergistic with NT-3 and NT-4/5. *Brain Res* 988: 1-8
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001): Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23-34
- Grzeschik SM (2003): On the role of superoxide dismutase and protein phosphatase type-2C beta in neuronal cell death. Dissertation, Marburg
- Guegan C, Vila M, Rosoklja G, Hays AP, Przedborski S (2001): Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic trophic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 21: 6569-6576
- Gustafsson L, Leijonhufvud I, Aronsson A, Mossberg AK, Svanborg C (2004): Treatment of skin papillomas with topical alpha-lactalbumin-oleic acid. *N Engl J Med* 350: 2663-2672
- Gutcher I, Webb PR, Anderson NG (2003): The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell Mol Life Sci* 60: 1061-1070
- Guthridge MA, Bellosta P, Tavoloni N, Basilico C (1997): FIN13, a novel growth-factor inducible serine-threonine phosphatase which can inhibit cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 17: 5485-5498
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ (2001): Post-transcriptional gene-silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Gen* 2: 110-119
- Hamnér S, Arumäe U, Li-Ying Y, Sun YF, Saarma M, Lindholm D (2001): Functional characterization of two splice variants of rat Bad and their interaction with Bcl-w in sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 17: 97-106
- Hanada M, Kobayashi T, Ohnishi M, Ikeda S, Wang H, Katsura K, Yanagawa Y, Hiraga A, Kanamaru R, Tamura S (1998): Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Lett* 437: 172-176
- Hanada M, Ninomyia-Tsuji J, Komaki K, Ohnishi m, Katsura K, Kanamaru R, Matsumoto K, Tamura S (2001): Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 276: 5753-5759
- Hannon GJ (2002): RNA interference. *Nature* 418: 244-251

- Hara A, Iwai T, Niwa M, Uematsu T, Yoshimi N, Takana T, Mori H (1996): Immunohistochemical detection of Bax and Bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res* 711: 249-253
- Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ (1999): Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 3: 413-422
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K (2001): Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114: 4557-4565
- Hardy S, Langelier Y, Prentki M (2000): Oleate activates phosphoinositide 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res* 60: 6353-6358
- Haupt T, Maya R, Kazanietz A, Oren M (1997): Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296-299
- Haystead TA, Sim AT, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG (1989): Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337: 78-81.
- Healy DA, Watson R, Newsholme P (2003): Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids increase neutral lipid accumulation, caspase activation and apoptosis in a neutrophil-like, differentiated HL-60 cell line. *Clin Sci* 104: 171-179
- Herbert JM, Seban E, Maffrand JP (1990): Characterization of specific binding sites for [³H]-staurosporine on various protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun*. 171: 189-195
- Herzig S, Neumann J (2000) : Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80: 173-210
- Hirai I, Wang HG (2001): Survival-factor-induced phosphorylation of Bad results in its dissociation from Bcl-x(L) but not Bcl-2. *Biochem J* 359: 345-352
- Hishiya A, Ohnishi M, Tamura S, Nakamura F (1999): Protein phosphatase 2C inactivates F-actin binding of human platelet moesin. *J Biol Chem* 274: 26705-26712
- Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H (2002): Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30: 1757-1766
- Holian O, Kumar R, Nyhus LM (1989): Fatty acyl esters potentiate fatty acid induced activation of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 160: 1110-1116

- Hou EW, Kawai Y, Miyasaka H, Li SS (1994): Molecular cloning and expression of cDNAs encoding two isoforms of protein phosphatase 2C β from mouse testis. *J Biochem Mol Biol Int* 32: 773-780
- Huang DC, Strasser A (2000): BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103: 839-842
- Hutchins JB, Barger SW (1998): Why neurons die. Cell death in the nervous system. *Anat Rec* 253: 79-90.
- Ingebritsen TS, Cohen P (1983): The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem* 132: 255-261
- Ingebritsen TS, Foulkes JG, Cohen P (1983): The protein phosphatases involved in cellular regulation. 2. Glycogen metabolism. *Eur J Biochem* 132: 263-274
- Iwai T, Niwa M, Yamada H, Nozaki M, Tsurumi K (1993): Hypothermic prevention of the hippocampal damage following ischemia in Mongolian gerbils: comparison between intraschemic and brief postischemic hypothermia. *Life Sci* 52: 1031-1038
- Jackson MD, Fjeld CC, Denu JM (2003): Probing the function of conserved residues in the serine/threonine phosphatase PP2C α . *Biochem J* 42: 8513-8521
- Jalava A, Akerman K, Heikkila J (1993): Protein kinase inhibitor, staurosporine, induced a mature neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells through an alpha-, beta, and zeta-protein kinase C-independent pathway. *J Cell Physiol* 155: 301-312
- Jalava A, Heikkila J, Lintunen M, Akerman K, Pahlman S (1992): Staurosporine induces a neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells that resembles that induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate(TPA). *FEBS Lett* 300: 114-118
- Jayasena SD (1999): Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 45: 1628-1650
- Johnson LN, De Moliner E, Brown NR, Song H, Barford D, Endicott JA, Noble ME (2002): Structural studies with inhibitors of the cell cycle regulatory kinase cyclin-dependent protein kinase 2. *Pharmacol Ther* 93: 113-124
- Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA (1996): Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* 31: 957-973
- Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacrose R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacrose S, Simone S, Bucci R, Farber E (2002): Cell death: Apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol* 21: 165-170

- Kato S, Terasawa T, Kobayashi T, Ohnishi M, Sasahara Y, Kusuda K, Yanagawa Y, Hiraga A, Matsui Y, Tamura S (1995): Molecular cloning and expression of mouse Mg²⁺-dependent protein phosphatase beta-4 (type 2C β -4). *Arch Biochem Biophys* 318: 387-393
- Kaufman RJ (1999): Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11693-11695
- Kelekar A, Thompson CB (1998): Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8: 324-330
- Kennerdell JR, Carthew RW (2000): Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* 18: 896-898
- Kerr JFR, Gobé GC, Winterford CM, Harmon BV (1995): Anatomical methods in cell death. In: Cell death (Schwaetz LM, Osborne BA, eds.) New York, Academic Press, S.1-27
- Kerr JFR, Harmon BV (1991): Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In: *Apoptosis: The molecular basis of cell death* (Tomei LD and Cope FO, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, S. 5-29
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basal biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
- Kessen U, Schaloske R, Aichele A, Mutzel R (1999): Ca²⁺/Calmodulin-independent activation of calcineurin from Dictyostelium by unsaturated long chain fatty acids. *J Biol Chem* 274: 37821-37826
- Khan WA, Blobel G, Halpern A, Taylor W, Wetsel WC, Burns D, Loomis C, Hannun YA. (1993): Selective regulation of protein kinase C isoenzymes by oleic acid in human platelets. *J Biol Chem* 268: 5063-5068
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209-216
- Kitada S, Krajewska M, Zhang X, Scudiero D, Zapata JM, Wang HG, Shabaik A, Tudor G, Krajewski S, Myers TG, Johnson GS, Sausville EA, Reed JC (1998): Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. *Am J Pathol* 152: 51-61
- Klumpp S, Krieglstein J (2002): Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Curr Opin Pharmacol* 2: 458-462
- Klumpp S, Mäurer A, Zhu Y, Aichele D, Pinna LA, Krieglstein J (2004): Protein kinase CK2 phosphorylates Bad at threonine-117. *Neurochem Internat* 45: 747-752
- Klumpp S, Selke D (2000): Purification and characterization of protein phosphatase type 2C in photoreceptors. *Methods Enzymol* 315: 570-578

- Klumpp S, Selke D, Ahlemeyer B, Schaper C, Krieglstein J (2002): Relationship between protein phosphatase type-2C activity and induction of apoptosis in cultured neuronal cells. *Neurochem Int* 41: 251-259
- Klumpp S, Selke D, Hermesmeier J (1998): Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg^{2+} : stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 437: 229-232
- Klumpp S, Selke D, Krieglstein J (2001): Protein phosphatases and neuronal apoptosis. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia* (Krieglstein J, Klumpp S, eds.) Medpharm Publisher, Stuttgart, S. 95-104
- Klumpp S, Selke D, Krieglstein J (2003): Protein phosphatase type 2C dephosphorylates BAD. *Neurochem Int* 42: 555-560
- Knox KA, Johnson GD, Gordon J (1993): A study of protein kinase C isozyme distribution in relation to Bcl2 expression during apoptosis of endothelial cells in vivo. *Exp Cell Res* 207: 68-73
- Kobayashi M, Mutharasan RK, Feng J, Roberts MF, Lomasney JW (2004): Identification of hydrophobic interactions between proteins and lipids: Free fatty acids activate phospholipase C δ 1 via allosterism. *Biochemistry* 43: 7522-7533
- Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, Hui-Liang Y, Smialek J, Virmani R (2000): Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol* 157: 1259-1268
- Komaki KI, Katsura K, Ohnishi M, Li MG, Sasaki M, Watanabe M, Kobayashi T, Tamura S (2003): Molecular cloning of PP2C η , a novel member of the protein phosphatase 2C family. *Biochem Biophys Acta* 1630: 130-137
- Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV (1999): A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285: 1733-1737
- Komarova EA, Neznanov N, Komarov PG, Chernov MV, Wang K, Gudkov AV (2003): p53 inhibitor pifithrin α can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 278: 15465-15468
- Konishi Y, Lehtinen M, Donovan N, Bonni A (2002): Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol Cell* 9: 1005-1016
- Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, Reed JC (1995): Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* 15: 6364-6376
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC (1993): Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53: 4701-4714

- Krichevsky AM, Kosik KS (2002): RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11926-11929
- Kriegelstein J, Selke D, Maaßen A, Klumpp S (2003): Activity of PP2C β is increased by divalent cations and lipophilic compounds depending on the substrate. *Methods Enzymol* 366: 282-289
- Kroemer G, Reed JC (2000): Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6: 513-519
- Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR (1982): Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147-157
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan CY et al. (1996): Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384: 368-372
- Kuluz JW, Prado R, Chang J, Ginsberg MD, Schleine CL, Busto R (1993): Selective brain cooling increases cortical cerebral blood flow in rats. *Am Physiol* 265: H824-H827
- Kurreck J (2003): Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270: 1628-1644
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858
- Lane DP (1992): p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16
- Latt SA, Stetten G (1976): Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Histochem Cytochem.* 24: 24-33
- Latt SA, Wohlleb JC (1975): Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 52: 297-316
- Leaver HA, Rizzo M, Whittle IR (2002): Antitumour actions of highly unsaturated fatty acids: cell signalling and apoptosis. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 66: 1-3
- Lee LK, Roth CM (2003): Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. *Curr Opin Biotechnol* 14: 505-511
- Leist M, Single B, Castoldi F, Kühnle S, Nicotera P (1997): Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185, 1481-1486.
- Leker RR, Aharaonowiz M, Greig NH, Ovadia H (2004): The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: effects of the p53 inhibitor pifithrin α . *Exp Neurol* 187: 478-486

- Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H (2002): Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32: 107-108
- Li MG, Katsura K, Nomiyama H, Komaki K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Kobayashi T, Tamura S (2003): Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2C ϵ). *J Biol Chem* 278: 12013-12021
- Li Y, Chopp M, Zhang ZG, Zaloga C, Niewenhuis L, Gautam S (1994): p53-immunoreactive protein and p53 mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25: 849-855
- Lifschitz-Mercer B, Sheinin Y, Ben-Meir D, Bramante-Schreiber L, Leider-Trejo L, Karby S, Smorodinsky NI, Lavi S (2001): Protein phosphatase 2C α expression in normal human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 116: 31-39
- Linden DJ, Routtenberg A (1989): cis-Fatty acids, which activate protein kinase C, attenuate Na⁺ and Ca²⁺ currents in mouse neuroblastoma cells. *J Physiol* 19: 95-119
- Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, Chua BH (2004): Pifithrin- α protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H933-H939
- Lizcano JM, Morrice N, Cohen P (2000): Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J* 349: 547-557
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whitemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW (1993): Apoptosis is induced by β -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7951-7955
- Lu Z, Hornia A, Jiang YW, Zang Q, Ohno S, Foster DA (1997): Tumour promotion by depleting cells of protein kinase C δ . *Mol Cell Biol* 17: 3418-3428
- Lu Z, Mu YM, Wang BA, Li XL, Lu JM, Pan CY, Yanase T, Nawata H (2003): Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 1002-1007
- Luo J, Pato MD, Riordan JR, Hanrahan JM (1998): Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am J Physiol* 274: C1397-C1410
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990): Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* 264: 187-192

- MacManus JP, Linnik MD (1997): Gene expression induced by cerebral ischemia: An apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 815-832
- Maestre I, Jordan J, Calvo S, Reig JA, Cena V, Soria B, Prentki M, Roche E (2003): Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the β -cell line INS-1. *Endocrinology* 144: 335-345
- Majno G, Joris I (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146(1): 3-15
- Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB (1992): Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 12: 5238-5248
- Mann DJ, Campell DG, McGowan CH, Cohen PTW (1992): Mammalian protein serine/threonine phosphatase 2C: cDNA cloning and comparative analysis of amino acid sequences. *Biochim Biophys Acta* 1130: 100-104
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM (2000): Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275: 16202-16212
- Marley AE, Kline A, Crabtree C, Sullivan JE, Beri RK (1998): The cloning expression and tissue distribution of human PP2C β . *FEBS Lett* 431: 121-124
- Marley AE, Sullivan JE, Carling D, Abbott WM, Smith GJ, Taylor IW, Carey F, Beri RK (1996): Biochemical characterization and deletion analysis of recombinant human protein phosphatase 2C alpha. *Biochem J* 320: 801-806
- Martin LJ (2001): Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury. *Int J Mol Med* 7: 455-478
- Masters JN, Finch CE, Sapolsky RM (1989): Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons does not involve deoxyribonucleic acid cleavage. *Endocrinology* 124, 3083-3088.
- Masters SC, Yang H, Datta SR, Greenberg ME, Fu H (2001): 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol* 60: 1325-1331
- Mattson MP (2000): Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 120-129
- Mattson MP, Duan W, Pedersen WA, Culmsee C (2001): Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis* 6: 69-81
- Mattson MP, Zhang Y, Bose S (1993): Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. *Exp Neurol* 121: 1-13

- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA (2002): RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-39
- McCluskey A, Sim ATR, Sakoff JA (2002): Serine-threonine protein phosphatase inhibitors: development of potential therapeutic strategies. *J Med Chem* 45: 1151-1175
- McDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991): Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196: 725-734
- McFarlane DE, Manzel L (1994): Activation of β isozyme of protein kinase C (PKC β) is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL-60 promyelocytes. Studies with PKC β defective PET mutant. *J Biol Chem* 269: 4327-4331
- McGahan L, Hakim AM, Robertson GS (1998): Hippocampal myc and p53 expression following transient global ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 56: 133-145
- McGowan CH, Cohen P (1988): Protein phosphatase-2C from rabbit skeletal muscle and liver: a Mg²⁺-dependent enzyme. *Methods Enzymol* 159: 416-426
- McManus MT, Sharp PA (2002): Silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Gen* 3: 737-747
- Medina JM, Tabernero A (2002): Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons. *J Physiol Paris* 96: 265-271
- Meier P, Finch A, Even G (2000): Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801
- Meyer K, Leube MP, Grill E (1994): A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455
- Milhavet O, Gary DS, Mattson MP (2003): RNA Interference in biology and medicine. *Pharmacol Rev* 55: 629-648
- Miller LJ, Marx J (1998): Apoptosis. *Science* 281 : 1301
- Millet A, Bettaieb A, Renaud F, Prevotat L, Hammann A, Solary E, Mignotte B (2002): Influence of the nitric oxide donor glyceryl trinitrate on apoptotic pathways in human colon cancer cell lines. *Gastroenterology* 123: 235-246
- Minamisawa H, Møllergård P, Smith ML, Bengtsson F, Theander S, Boris-Møller F, Siesjö BK (1990): Preservation of brain temperature during ischemia in rats. *Stroke* 21: 758-764
- Minks MA, West DK, Benveniste S, Baglioni C (1979): Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2'-5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem* 254: 10180-10183

- Mizotani K, Inoue I (2002): The mechanism of apoptosis by the oleic acid in HeLa cells: caspase-independent pathway by induction of I κ B β . *J Saitama Med School* 29: 117-123
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George DL, Levine AJ (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245
- Moore F, Weekes J, Hardie DG (1991): Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur J Biochem* 199: 691-697
- Moss EG, Taylor JM (2003): Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system. *Nat Cell Biol* 5: 771-772
- Mukerjee N, McGinnis KM, Park YH, Gnegy ME, Wang KK (2000): Caspase-mediated proteolytic activation of calcineurin in thapsigargin-mediated apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 379: 337-343
- Murphy PJ, Galigniana MD, Morishima Y, Harrell JM, Kwok RP, Ljungman M, Pratt WB (2004): Pifithrin- α inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J Biol Chem* epub
- Myers JW, Jones JT, Meyer T, Ferrell JE (2003): Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat Biotechnol* 21: 324-328
- Nagai Y, Naruse S, Weiner WM (1993): Effect of hyperglycemia on changes of brain lactic acid and intracellular pH produced by ischemia. *NMR Biomed* 6: 1-6
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) : Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* 403: 98-103
- Nakamura T, Minamisawa H, Katayama Y, Ueda M, Terashi A, Nakamura K, Kudo Y (1999): Increased intracellular Ca²⁺ concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: a possible cause of delayed neuronal death. *Neurosci* 88: 57-67
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R: (1990): Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible so-suppression of homologues genes *in trans*. *Plant Cell* 2: 279-289
- Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA (1992) : Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol* 263 : H1356-H1362
- Ni B, Wu X, Su Y (1998): Transient forebrain global ischemia induces a prolonged expression of the caspase 3 mRNA in rat hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 : 248-256

- Nicotera P, Leist M, Manzo L (1999): Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20, 46-51.
- Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibana K, Kominami E, Uchiyama Y (1995): Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 15: 1001-1011
- Nowak G (2002): PKC α and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺-transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem* 277: 43377-43388
- Nykänen A, Haley B, Zamore PD (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-321
- Ogawa M, Yoshida S, Ogawa T, Shimada T, Takeshita M (1988): Effect of oleic acid on mitochondrial oxidative phosphorylation in rat brain slices. *Biochem Int* 17: 773-782
- Okamoto M, Matsumoto M, Ohtsuki T, Taguchi A, Mikoshiba K, Yanagihara T, Kamada T (1993): Internucleosomal DNA-cleavage involved in ischemia-induced neuronal death. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1356-1362
- Olsson H, Belfrage P (1987): The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone-sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-1, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. *Eur J Biochem* 168: 399-405
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993): Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619
- Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, Takahashi Y, Masuma R (1977): A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 30: 275-282
- Ortmeyer HK (1997): Relationship of glycogen synthase and glycogen phosphorylase to protein phosphatase 2C and cAMP-dependent protein kinase in liver of obese rhesus monkeys. *Obes Res* 5: 613-621
- Ostle AG, Holt JG (1982): Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* 44: 238-241
- Ottillie S, Diaz JL, Horne W, Chang J, Wang Y, Wilson G, Chang S, Weeks S, Fritz LC, Oltersdorf T (1997): Dimerization properties of human Bad. *J Biol Chem* 272: 30866-39872
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ Conklin DS (2002): Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16: 948-958

- Parks JS, Cistola DP, Small DM, Hamilton JA (1983): Interactions of the carboxyl group of oleic acid with bovine serum albumin: a ^{13}C NMR study. *J Biol Chem* 258: 9262-9269
- Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F (1987): Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 37: 1281-1286
- Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE (1995): Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 15: 3775-3787
- Powell CT, Brittis NJ, Stee D, Hug H, Heston WD, Fair WR (1996): Persistent membrane translocation of protein kinase C α during 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced apoptosis of LNCaP human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ* 7: 419-428
- Prince JA, Orelund J (1997): Staurosporine differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. *Brain Res Bull* 43: 515-523
- Puertollano MA, de Pablo MA, Alvarez de Cienfuegos G (2003): Polyunsaturated fatty acids induce cell death in YAC-1 lymphoma by a caspase-3-independent mechanism. *Anticancer Res* 23: 3905-3910
- Pulsinelli WA, Brierly JB, Plum F (1982): Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498
- Qiagen Transfection Resource Book (2002)
- Reinhart BJ, Bartel DP (2002): Small RNAs correspond to centromeric heterochromatin repeats. *Science* 297: 1831
- Reylund M, Anderson S, Matassa AA, Barzen KA, Quissell DO (1999): Protein kinase C δ is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary acinar cells. *J Biol Chem* 274: 19115-19123
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004): Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22: 326-330
- Rhoads DE, Osburn LD, Peterson NA, Raghupathy E (1983): Release of neurotransmitter amino acids from synaptosomes: enhancement of calcium-independent efflux by oleic and arachidonic acids. *J Neurochem* 41: 531-537
- Richieri GV, Ogata RT, Zimmerman AW, Veerkamp JH, Kleinfeld AM (2000): Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochemistry* 39: 7197-7204
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Zhang M, McManus MT, Gertler FB, Scott ML *et al.* (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33: 401-406

- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC (1998) : Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10: 937-946
- Saffer JD, Hughes DL (1986): Improved transfection of CV-1 and COS 1 cells using reduced serum medium. *Nucleic Acids Res* 14: 3604
- Salinovich O, Montelaro RC (1986): Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156: 341-347
- Santoro MF, Annand RR, Robertson MM, Peng YW, Brady MJ, Mankovich JA, Hackett MC, Ghayur T, Walter G, Wong WW, Giegel DA (1998): Regulation of protein phosphatase 2A activity by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem* 273: 13119-13128
- Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW (1997): Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275: 983-986
- Sauer D (1987): Die Hemmung neuronaler Nekrosen durch Pharmaka im Hippocampus der Ratte nach Ischämie. Dissertation, Marburg
- Savill J, Fadok V (2000): Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-788
- Schaper C (1999): Untersuchungen zur Wirkung von 5-HT_{1A}-Agonisten gegen den apoptotischen Zelltod nach zerebraler Ischämie der Ratte. *Dissertation*, Marburg.
- Scherr M, Morgan MA, Eder M (2003): Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem* 10: 245-256
- Schuchmann M, Galle PR, Kanzler S (2002): Apoptose in der Klinik. *Medizinische Klinik* 97: 738-746
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003): Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208
- Sei Y, von Lubitz DKJE, Basile AS, Borner MM, Lin RCS Skolnick P, Fossum LH (1994): Internucleosomal DNA fragmentation in gerbil hippocampus following forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 171: 179-182
- Seif el Nasr M, Nuglich J, Krieglstein J (1992): Prevention of ischemia-induced cerebral hypothermia by controlling the environmental temperature. *J Pharmacol Meth* 27: 23-26
- Seifert R, Schachtele C, Schultz G (1987): Activation of protein kinase C by cis- and trans-octadecadienoic acids in intact human platelets and its potentiation by diacylglycerol. *Biochem Biophys Res Commun* 149: 762-768

- Seroussi E, Shani N, Ben-Meir D, Chajut A, Divinski I, Faier S, Gery S, Kary S, Kariv-Inbal Z, Sella O, Smorodinsky NI, Lavi S (2001): Uniquely conserved non-translated regions are involved in generation of the major transcripts of protein phosphatase 2C β . *J Mol Biol* 312: 439-451
- Sheikh MS, Fornace AJ (2000) : Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 182: 171-181
- Shen C, Buck AK, Liu X, Winkler M, Reske SN (2003): Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett* 539: 111-114
- Shi YF, Szalay MG, Paskar L, Sahai BM, Boyer M, Singh B, Green DR (1990): Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J Immunol* 144: 3326-3333
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999): Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 411-412
- Shinomura T, Asaoka Y, Oka M, Yoshida K, Nishizuka Y (1991): Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5149-5153
- Siafaka-Kapadou A, Hanahan DJ, Javors MA (1997): Oleic acid-induced Ca²⁺-mobilization in human platelets: Is oleic acid an intracellular messenger? *J Lipid Mediat Cell Signal* 15: 215-232
- Silva JM, Sachidanandam R, Hannon GJ (2003): Free energy lights the path toward more effective RNAi. *Nat Genet* 35: 303-305
- Sim ATR, Baldwin ML, Rostas JA, Holst J, Ludowyke RI (2003): The role of serine/threonine protein phosphatases in exocytosis. *Biochem J* 373: 641-659
- Skinner J, Sinclair C, Romeo C, Armstrong D, Charbonneau H, Rossie S (1999): Purification of a fatty acid-stimulated protein serine/threonine phosphatase from bovine brain and its identification as a homolog of protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 272: 22646-22671
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003): Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5: 834-839
- Smith ML, Bendek G, Dahlgren M, Roosen I, Wieloch T, Siesjö BK (1984): Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69: 385-401
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of Protein Using Bicinchonic Acid. *Anal Biochem* 150 : 76-85, 1985
- Spector AA (1975): Fatty acid binding to plasma albumin. *J Lipid Res* 16: 165-179

- Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Bruck W, Jellinger K, Lassmann H: (1999): Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granuvacuolar degeneration of Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am J Pathol* 155: 1459-1466
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998): How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264
- Stone JM, Collinge MA, Smith RD, Horn MA, Walker JC (1994): Interaction of a protein phosphatase with an Arabidopsis serine-threonine receptor kinase. *Science* 266: 793-795
- Strovel ET, Wu D, Sussman DJ (2000): Protein phosphatase 2C α dephosphorylates axin and activates LEF-1-dependent transcription. *J Biol Chem* 275: 2399-2403
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446
- Svanborg C, Agerstam H, Aronson A, Bjerkvig R, Düringer C, Fischer W, Gustafsson L, Hallgren O, Leijonhuvud I, Linse S, Mossberg AK, Nilsson H, Petterson J, Svensson M (2003): HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism – cellular, molecular, and therapeutic aspects. *Adv Cancer Res* 88: 1-29
- Svensson M, Håkansson A, Mossberg AK, Linse S, Svanborg C (2000): Conversion of a α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4221-4226
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999): The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99: 123-132
- Takekawa M, Maeda T, Saito H (1998): Protein phosphatase 2C α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *Embo J* 17: 4744-4752
- Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F (1986): Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 135: 397-402
- Tang XW, Hsu CC, Schloss JV, Faiman MD, Wu E, Yang CY, Wu JY (1997): Protein phosphorylation and taurine biosynthesis in vivo and in vitro. *J Neurosci* 17: 6947-6951
- Teodoro JG, Branton PE (1997): Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 71: 1739-1746

- Terasawa T, Kobayashi T, Murakami T, Ohnsihi M, Kato S, Tanaka O, Kondo H, Yamamoto H, Takeuchi T, Tamura S (1993): Molecular cloning of a novel isotype of Mg²⁺-dependent protein phosphatase β (type 2C β) enriched in rain and heart. *Arch Biochem Biophys* 307: 342-349
- Thompson CB (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998): Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316
- Tieu K, Zuo DM, Yu PH (1999): Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of Bcl-2 and p53 Proteins. *J Neurosci Res* 58: 426-436
- Titus JA, Haugland R, Sharrow SO, Segal DM (1982): Texas Red, a hydrophilic, red-emitting fluorophore for use with fluorescein in dual parameter flow microfluorometric and fluorescence microscopic studies. *J Immunol Methods* 50: 193-204
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4
- Travis SM, Berger HA, Welsh MJ (1997): Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11055-11060
- Troeger MB, Rafalowska U, Erecinska M (1984): Effect of oleate on neurotransmitter transport and other plasma membrane functions in rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 42: 1735-1742
- Tsuiki S, Hiraga A, Kikuchi K, Tamura S (1988): Purification of an Mg²⁺-dependent protein phosphatase. *Methods Enzymol* 159: 437-446
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2000): Bcl-2 regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 7: 1174-1181
- Tuschl T (2001): RNA Interference and Small Interfering RNAs. *Chembiochem* 2: 239-245
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442
- Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999): Cell death in development. *Cell* 96: 245-254
- Velasco G, Gomez del Pulgar T, Carling D, Guzman M (1998): Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components. *FEBS Lett* 439: 317-320

- Verkest V, McArthur M, Hamilton S (1988): Fatty acid activation of protein kinase C: dependence on diacylglycerol. *Biochem Biophys Res Commun* 152: 825-829
- Vila M, Przedborski S (2003): Targeting programmed cell death in neurological diseases. *Nat Rev Neurosci* 4: 1-11
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000): Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310
- Vousden KH, Lu X (2002): Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC (1999): Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284: 339-343
- Wang Y, Geer LY, Chappey C, Kans JA, Bryant SH (2000): Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trend Biochem Sci* 25: 300-302
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998): Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13959-13964
- Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD (1998): ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* 19: 175-178
- Webster GA, Perkins ND (1999): Transcriptional cross talk between NF- κ B and p53. *Mol Cell Biol* 19: 3484-3495
- Wei MC, Zon WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, Macreor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001): Proapoptotic BAX and BAK: a requisite ateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292: 727-730
- Wenk J, Mieskes G (1995): Cytosolic and nuclear localization of protein phosphatase 2C β 1 in COS and BHK cells. *Eur J Cell Biol* 68: 377-386
- Wianny F, Zernicka-Goetz M (2000): Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2: 70-75
- Widmann C, Gibson S, Johnson GL (1998): Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 273: 7141-7144
- Widmann R, Miyazawa T, Hossmann KA (1993): Protective effect of hypothermia on hippocampal injury after 30 minutes of forebrain ischemia in rats is mediated by postischemic recovery of protein synthesis. *J Neurochem* 61: 200-209

- Wolfrum C, Borman CM, Borchers T, Spener F (2001): Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors α and γ -mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2323-2328
- Wong TK, Neumann E (1982): Electric field mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 584-587
- Woo RA, McLure K, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PW (1998): DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 394: 700-704
- Wood DE, Newcomb EW (1999): Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274: 8309-8315
- Woods DB, Vousden KH (2001): Regulation of p53-function. *Exp Cell Res* 264: 56-66
- Wrede CE, Dickson LM, Lingohr MK, Briaud I, Rhodes CJ (2002): Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic β -cells (INS-1). *J Biol Chem* 277: 49676-49684
- Wu JY, Tang XW, Schloss JV, Faiman MD (1998): Regulation of taurine biosynthesis and its physiological significance in the brain. *Adv Exp Med Biol* 442: 339-345
- Wyllie AH (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous activation. *Nature* 284: 555-556
- Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS (1998): Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 18: 584-587
- Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL (2001): Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event. *Exp Cell Res* 263: 145-155
- Yaffe MB, Elia AE (2001): Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol* 13: 131-138
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gambelin SJ, Smedron SJ, Cantley LC (1997): The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91: 961-971
- Yaffe MB, Smerdon SJ (2001): Phosphoserine/threonine binding domains: You can't pSERious? *Structure* 9: R33-R38
- Yager J, Towfighi J, Vannucci RC (1993): Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res* 34: 525-529

- Yamasaki Y, Matsuo Y, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K (1995): Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke* 26: 318-322
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson C, Korsmeyer SJ (1995): Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-291
- Yeaman SJ, Smith GM, Jepson CA, Wood SL, Emmison M (1994): The multifunctional role of hormon-sensitive lipase in lipid metabolism. *Adv Enzyme Regul* 34: 355-370
- Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG (1997): Viruses and apoptosis. *Br Med Bull* 53: 509-521
- Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL (2002): RNA interference by expression of short-interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553
- Yuan J, Yankner BA (2000): Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000): RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33
- Zeng Y, Cullen BR (2002) : RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 8: 855-860
- Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2003): MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9779-9784
- Zha J, Harada H, Osipov K, Jöckel J, Korsmeyer SJ (1997): BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 272: 24101-24104
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996): Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87: 619-628
- Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittmann RN (2000): Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* 151: 483-494
- Zhu T, Dahan D, Evagelidis A, Zheng S, Luo J, Hanrahan JW (1999): Association of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 274: 29102-29107
- Zhu Y, Culmsee C, Semkova I, Kriegelstein J (1998): Stimulation of β 2-adrenoreceptors inhibits apoptosis in the rat brain after forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 1032-1039

Publikationen

Culmsee C, Siewe J, Junker V, Retiounskaia M, Schwarz S, Camandola S, El-Metainy S, Behnke H, Mattson MP, Krieglstein J (2003): Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor- κ B transcriptional activities determines cell survival or death in neurons. *J Neurosci* 23: 8586-8595

Zhu Y, Schwarz S, Ahlemeyer B, Grzeschik S, Klumpp S, Krieglstein J (2004): Oleic acid causes apoptosis and dephosphorylates Bad. (angenommen durch *Neurochem Int*)

Teilnahme an Kongressen

- 08.-12. Juli 2001 EMBO Conference, Marburg
 ‘Protein Phosphorylation and Protein Phosphatases’
- 21.-24. Juli 2002 9th International Symposium of
 Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg
01. April 2004 The Israel Society for Biochemistry & Molecular Biology
 (ISBMB), Annual Meeting 2004, Tel Aviv, Israel
- 25.-28. Juli 2004 10th International Symposium of
 Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg
 Poster:
 Schwarz S, Klumpp S, Krieglstein J:
 „Downregulation of protein phosphatase 2C via RNA
 interference attenuates oleic acid-induced damage of SH-
 SY5Y cells“

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stephanie Schwarz	
Geburtsdatum	29. Januar 1976	
Geburtsort	Rodalben (Kreis Südwestpfalz)	
Eltern	Benno Schwarz Ruth Schwarz geb. Dechert	
Schule	1982-1986	Grundschule Leimen-Merzalben
	1986-1995	Leibniz-Gymnasium Pirmasens
	Juni 1995	Abitur
Studium	WS 95/96	Immatrikulation im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
	08/1997	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Mainz. Bestanden.
	04/2000	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Mainz. Bestanden
Praktikum	05/2000-10/2000	Hecht-Apotheke, Mainz-Hechtsheim
	11/2000-04/2001	Apotheke der Dr.-Horst-Schmidt-Kliniken (HSK), Wiesbaden
Approbation	05/2001	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Mainz. Bestanden.
	05/2001	Approbation als Apothekerin
Berufliche Tätigkeit	ab 07/2001	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg Anfertigung einer Promotionsarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein