

Untersuchungen zur Wirkung von neurotrophen
Wachstumsfaktoren auf die Proteintyrosin-
phosphorylierung und die depolarisationsinduzierte
Glutamatfreisetzung in Synaptosomen der Ratte

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Monica Schol-Tadić, geb. Schol
aus Braunfels

Gießen 2004

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Leiter: Prof. Dr. F. Dreyer
des Klinikums der Justus-Liebig Universität-Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Presek
Gutachter: Prof. Dr. Geyer

Tag der Disputation: 12. Juli 2005

Erklärung:

Ich, Frau Monica Schol-Tadić geborene Schol, erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

1	EINLEITUNG	4
1.1	NERVENZELLEN	4
1.1.1	<i>Aufbau und Aufgaben von Nervenzellen</i>	4
1.1.2	<i>Neuronale Plastizität</i>	6
1.2	SIGNALÜBERTRAGUNG VON ZELLEN	7
1.2.1	<i>Rezeptoren</i>	7
1.2.2	<i>Proteintyrosinkinasen</i>	9
1.3	WACHSTUMSFAKTOREN	11
1.3.1	<i>Neurotrophine und ihre Rezeptoren</i>	11
1.3.2	<i>Platelet-derived Growth Factor und PDGF-Rezeptoren</i>	14
2	ZIELE DER ARBEIT	17
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	MATERIAL	18
3.1.1	<i>Antikörper</i>	18
3.1.2	<i>Reagenzien</i>	18
3.1.3	<i>Wachstumsfaktoren</i>	20
3.1.4	<i>Enzyme und Inhibitoren</i>	21
3.2	METHODEN	21
3.2.1	<i>Herstellung von Synaptosomen aus Rattenhirn</i>	21
3.2.2	<i>In-vitro-Stimulation isolierter Synaptosomen aus Rattenhirn</i>	23
3.2.3	<i>Immunpräzipitation von Synaptosomenproteinen</i>	23
3.2.4	<i>Glutamatfreisetzung aus Synaptosomen der Ratte</i>	24
3.2.4.1	Gewinnung der Proben	24
3.2.4.2	Fluorimetrische Quantifizierung	26
3.2.4.2.1	Analyse der Überstände	26
3.2.4.2.2	Analyse der Vitalität der untersuchten Synaptosomen	27
3.2.4.3	Auswertung der Messergebnisse	28
3.2.5	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	29
3.2.6	<i>Immuno-(Western)-Blot</i>	30
4	ERGEBNISSE	33
4.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEINTYROSINPHOSPHORYLIERUNG	33

4.1.1	<i>Wirkung von BDNF auf die Proteintyrosinphosphorylierung</i>	33
4.1.1.1	Zeitabhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Proteintyrosinphosphorylierung	33
4.1.1.2	Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Proteintyrosinphosphorylierung	35
4.1.1.3	Analyse des an Tyrosinresten phosphorylierten Proteins P38.....	36
4.1.1.4	Wirkung von K252a auf die Proteintyrosinphosphorylierung nach BDNF-Stimulation	40
4.1.1.5	Wirkung von PP1 auf die Proteintyrosinphosphorylierung nach BDNF-Stimulation	42
4.1.1.6	Vergleich zwischen BDNF-Stimulation und KCl-Depolarisation.....	44
4.1.2	<i>Wirkung anderer neurotropher Wachstumsfaktoren auf die Proteintyrosinphosphorylierung</i>	46
4.1.2.1	Wirkung der Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4	46
4.1.2.2	Wirkung von PDGF-AB und PDGF-BB	48
4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR DEPOLARISATIONSINDUZIERTEN GLUTAMATFREISETZUNG	54
4.2.1	<i>Wirkung von BDNF auf die Glutamatfreisetzung</i>	54
4.2.2	<i>Zeitabhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Glutamatfreisetzung</i>	54
4.2.3	<i>Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Glutamatfreisetzung</i>	57
4.2.4	<i>Einfluss von K252a und PP1 auf die Wirkung von BDNF auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung</i>	58
4.2.5	<i>Wirkung anderer neurotropher Wachstumsfaktoren auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung</i>	60
4.2.5.1	Wirkung der Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4	60
4.2.5.2	Wirkung von PDGF-AB und PDGF-BB	62
5	DISKUSSION	64
5.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEINTYROSINPHOSPHORYLIERUNG	64
5.1.1	<i>Wirkung von BDNF auf die Proteintyrosinphosphorylierung von Rattensynaptosomen</i>	66
5.1.1.1	Signalvermittlung über den Trk-Rezeptor	67
5.1.1.2	Signalvermittlung über Mitglieder der Src-Familie	68

5.1.1.3	Möglichkeiten der Signaltransduktion von BDNF	69
5.1.1.4	Vergleich zwischen BDNF-Stimulation und KCl-Depolarisation.....	71
5.1.2	<i>Wirkung anderer neurotropher Wachstumsfaktoren auf die Proteintyrosinphosphorylierung</i>	<i>72</i>
5.1.2.1	Wirkung der Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4	72
5.1.2.2	Wirkung von PDGF-AB und PDGF-BB	72
5.1.3	<i>Synaptophysin wird durch BDNF an Tyrosinresten phosphoryliert</i>	<i>73</i>
5.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR DEPOLARISATIONSINDUZIERTEN GLUTAMATFREISETZUNG AUS SYNAPTOSOMEN DER RATTE	74
5.2.1	<i>Wirkung von BDNF auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung</i>	<i>75</i>
5.2.1.1	Vermittlung der Wirkung von BDNF auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung über den Trk-Rezeptor und über Mitglieder der Src-Familie	77
5.2.2	<i>Wirkung anderer neurotropher Wachstumsfaktoren auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung</i>	<i>79</i>
5.3	AUSBLICK.....	80
6	LITERATURVERZEICHNIS	82
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
8	ZUSAMMENFASSUNG	97
8.1	ZUSAMMENFASSUNG	97
8.2	SUMMARY	99
9	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	100
10	DANKSAGUNG	101
11	LEBENS LAUF	102

1 Einleitung

1.1 Nervenzellen

1.1.1 Aufbau und Aufgaben von Nervenzellen

Das zentrale Nervensystem setzt sich aus Neuronen und Gliazellen zusammen. Während die Nervenzellen der Signalweiterleitung dienen, sind die Gliazellen vorwiegend für den Erhalt des Elektrolytgleichgewichts verantwortlich.

Purkinje beschrieb 1839 als erster die Nervenzelle. Sie besteht aus einem Perikaryon, einem oder mehreren Dendriten und einem Axon. Dendriten bilden die afferente Komponente der Neuronen. Über axo-dendritische und axo-somatische Synapsen gelangen elektrische und chemische Signale an die Zielzelle. Dendriten können einzeln oder zu Hunderten an einem Neuron vorkommen, sich stark verzweigen oder kaum verzweigt sein. Im Gegensatz zu dem Axon fehlen ihnen die Neurofilamente.

Über das Axon werden Signale des Neurons an Nachbarzellen, aber auch an weit entfernt liegende Zellen, weitergegeben. Die Synapsen, die sich am Ende des Axons befinden, sind spezialisierte Verbindungskomplexe der Nervenzellen. Sie können chemischer und selten elektrischer Natur sein (Bennett, 1972). Die chemische Synapse besteht aus der präsynaptischen Membran, dem synaptischen Spalt, der zwischen 15 und 20 nm breit ist, und der postsynaptischen Membran, die einem Dendrit oder einem Perikaryon einer weiteren Nervenzelle, einer Muskelzelle oder anderen Zielzellen zugehörig sein kann. Im präsynaptischen Teil der Synapse sind die synaptischen Vesikel lokalisiert. Man unterscheidet zwischen kleinen und großen synaptischen Vesikeln. Eine typische Nervenendigung verfügt über 300 bis 500 synaptische Vesikel (Jahn et al., 1990).

Die kleinen synaptischen Vesikel mit einem Durchmesser von 40 bis 50 nm enthalten die Neurotransmitter. Die Neurotransmitter leiten sich entweder von allgemein verbreiteten Metaboliten ab, wie beispielsweise Acetylcholin, Glutamat, GABA, Glycin, Katecholamine, Histamin, Serotonin und ATP oder von Peptiden, die häufig posttranslational modifiziert sind (Link und Jahn, 1996). Die Membranen der

kleinen synaptischen Vesikel verfügen über spezifische Proteine, denen wichtige Funktionen bei der Aufnahme von Molekülen (Endozytose) und auch bei der Neurotransmitterfreisetzung (Exozytose) zugeordnet werden. Als Transporter dienen beispielsweise die V-ATPasen, die Protonen durch die Zellmembran schleusen. Andere Proteine, wie Synaptobrevin, Rab3A, Synaptophysin, SV2 und Synaptotagmin spielen eine wichtige Rolle bei der kontrollierten Exozytose - Neurotransmitteraufnahme, Kontaktaufnahme und Fusion mit der präsynaptischen Membran (Elferink und Scheller, 1995; Sudhof et al., 1995). Die großen synaptischen Vesikel mit einem Durchmesser von etwa einem Mikrometer enthalten Proteine, Neuropeptide und Monoamine (Floor und Leeman, 1985).

Synaptische Vesikel durchlaufen einen Zyklus, der auf Proteinwechselwirkungen basiert. Die Vesikel, die an der aktiven Zone andockt sind, werden auf die dem Kalziuminflux folgende rasche Exozytose vorbereitet. Nach erfolgter Exozytose werden die Vesikel wieder mittels klathrinvermittelter Endozytose in die Zelle aufgenommen. Nach Fusion mit dem Endosom werden die synaptischen Vesikel regeneriert und über einen Knospungsprozess wieder ins Zytosol freigesetzt. Anschließend werden Neurotransmitter durch aktiven Transport aufgenommen und die wiederbeladenen Vesikel an die aktive Zone transloziert. Die Effekte der Neurotransmitterfreisetzung und Vorgänge an der Synapse kann man besonders gut an Synaptosomen studieren. Dabei handelt es sich um aufgereinigte Nervendingungen. Diese verfügen auf der präsynaptischen Seite über eine große Anzahl synaptischer Vesikel und über Mitochondrien, wie man auf Abbildung 1 erkennen kann.

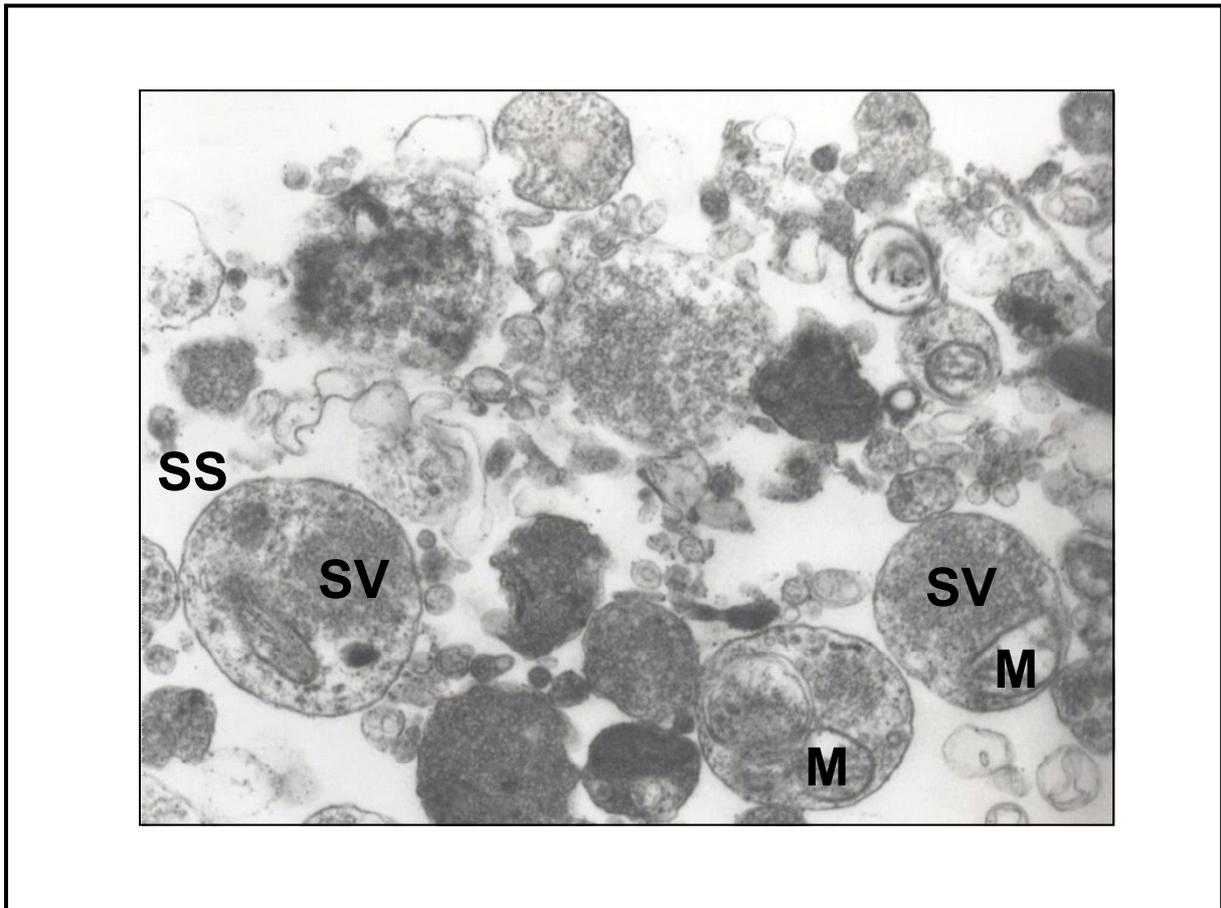


Abb.1: *Abbildung einer Synaptosomenpräparation. Die Synaptosomen (SS) verfügen über eine große Anzahl synaptischer Vesikel (SV) und über Mitochondrien (M). (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Marcus Rosenhagen)*

Die im präsynaptischen Teil der Synapse befindlichen Mitochondrien sind kleine Mitochondrien von 0,2 bis 0,5 µm Durchmesser. Diese verfügen über mitochondriale DNA. Daher sind selbst Synaptosomen als präparierte Nervendigungen mit Hilfe dieser DNA in der Lage Proteine zu synthetisieren (Gordon und Deaning, 1968).

1.1.2 Neuronale Plastizität

Die Effizienz der synaptischen Transmission ändert sich nicht nur während der Entwicklung des Nervensystems, sondern auch im ausdifferenzierten Nervensystem unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen. Durch synaptische Plastizität werden Leistungen des Gehirns wie Lernen und Gedächtnis möglich. Die Plastizität der synaptischen Übertragung wird entweder durch Veränderungen in der

präsynaptischen Neurotransmitterfreisetzung oder durch postsynaptische Veränderungen an den Rezeptoren verursacht. Daran sind auch die Neurotrophine, neuronale Wachstumsfaktoren, beteiligt (Kim et al., 1994). Die Neurotrophine Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT-3) stimulieren darüber hinaus die lokale Proteinsynthese, die für die Induktion der verstärkten synaptischen Aktivität nötig ist (Kang und Schuman, 1996).

Aktivitätsabhängige Plastizität synaptischer Kommunikation unterliegt komplexen Gehirnfunktionen. Afferente Stimulation der CA1-Region des Hippokampus zum Beispiel führt bei hochfrequenter Stimulation zu Langzeitpotenzierung (LTP) und bei niedrigfrequenter Stimulation zu Langzeitdepression (LTD), zwei zelluläre Substrate für Lernvorgänge (Bliss und Collingarde, 1993; Linden 1994). LTP in der CA1-Region führt zu einer Zunahme der BDNF- und NT-3-messenger Ribonukleinsäure (mRNA) (Patterson et al., 1992).

1.2 Signalübertragung von Zellen

1.2.1 Rezeptoren

Man kennt eine Vielzahl extrazellulärer Rezeptoren. Dazu gehören die G-Proteingekoppelten Rezeptoren, die ionenkanalgekoppelten Rezeptorproteine und die Rezeptoren, die über eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität verfügen. Letztere bestehen aus der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, dem transmembranären Teil und der intrazellulären katalytischen Domäne.

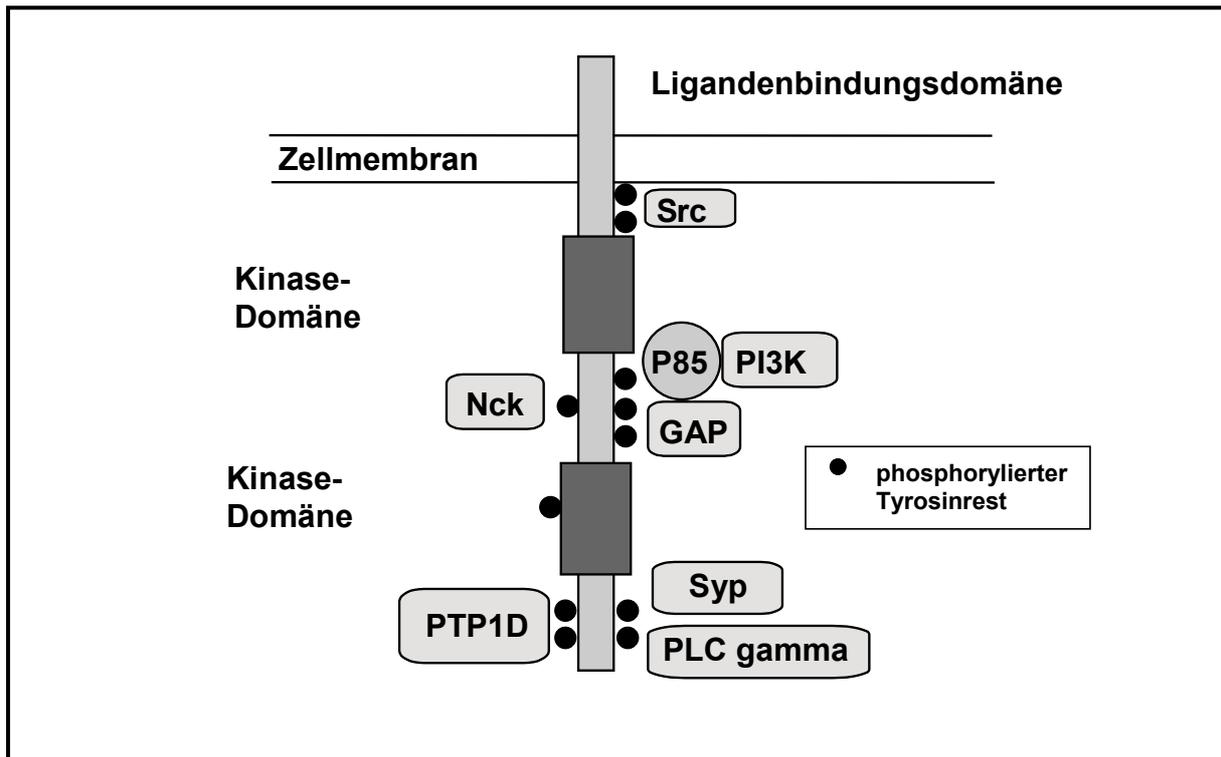


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Rezeptortyrosinkinase am Beispiel des PDGF-Rezeptors. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Dimerisierung und zur Aktivierung der Proteintyrosinkinase mit Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne an Tyrosinresten. Diese dienen in aktiviertem Zustand als Bindungsstellen für intrazelluläre Signalproteine (Src, Syp, PLC gamma, GAP, über p85 die PI3-Kinase, Nck und PTP1D). Die Kinasedomäne wird durch eine Insertionsregion in zwei Teile geteilt (modifiziert nach Mori et al., 1993).

Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem die Rezeptortyrosinkinasen, wie exemplarisch für den PDGF-Rezeptor in Abbildung 2 dargestellt. Nach Bindung des Liganden an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors. Dies führt zur Aktivierung der intrinsischen rezeptoreigenen Kinase. Nach Autophosphorylierung des Rezeptors können spezifische Adapterproteine, wie die Proteine Grb, Src und Shc (Pandey et al., 1996) über proteinspezifische Bindungsdomänen an spezifische Regionen des Rezeptors gebunden werden. Die Ausbildung eines Multi-Protein-Signalkomplexes führt zur Weiterleitung des Signals in das Zellinnere (Fantl et al., 1993).

1.2.2 Proteintyrosinkinasen

Das vom aktivierten Rezeptor ausgehende Signal führt zu intrazellulärer Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung. Man spricht von einer Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Kaskade. Die Signalproteine haben zwar verschiedene Strukturen und Funktionen, doch sie verfügen häufig über hochkonservierte, nichtkatalytische Domänen, die SH2- und SH3-Domänen (Src-homolog), die ihren Namen von dem Onkogenprodukt Src haben (Varmus et al., 1989).

Zu den Signalproteinen gehören die Mitglieder der Src-Familie. Sie vermitteln als Kinasen zwischen Rezeptortyrosinkinasen und dem Zellinneren. Es handelt sich um intrazelluläre Tyrosinkinasen.

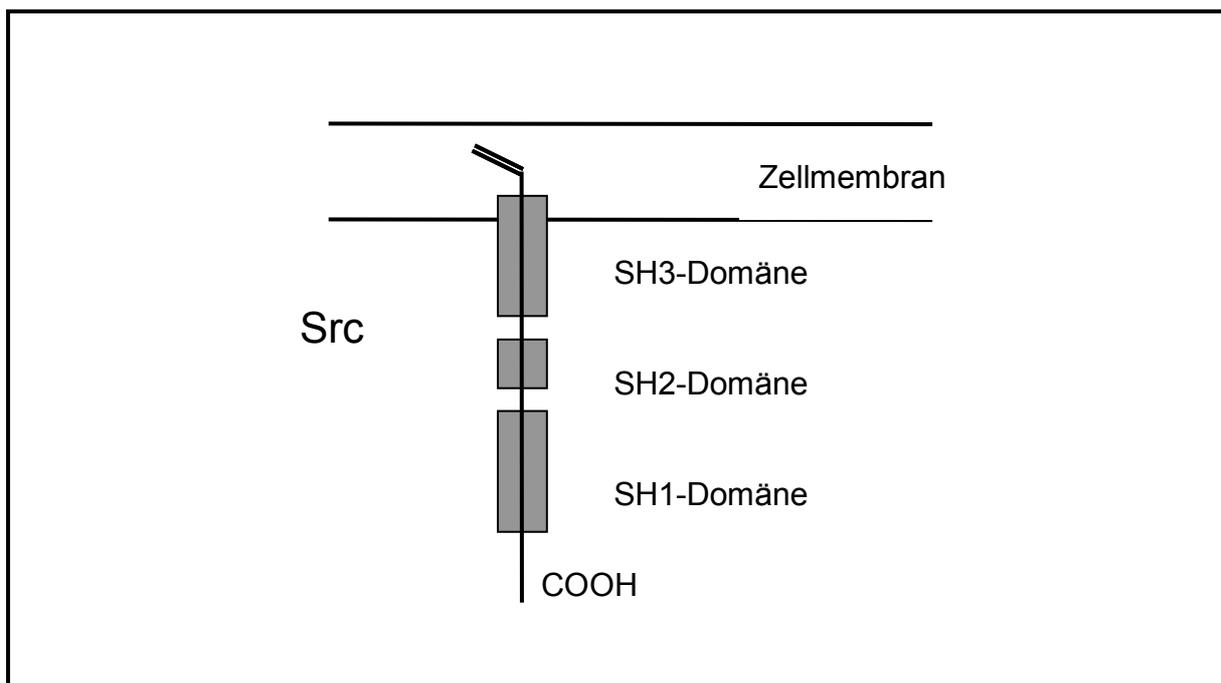


Abb. 3: Schematische Darstellung von c-Src als Prototyp der Src-Familie. Die intrazelluläre Proteintyrosinkinase Src, die weder eine extrazelluläre noch eine transmembranäre Domäne besitzt, ist über eine Myristinsäure (Doppellinie) in der Plasmamembran verankert. Sie verfügt über eine Kinase-Domäne (SH1) und über jeweils eine SH2- und SH3-Domäne (modifiziert nach Cantley, 1991).

Viele intrazelluläre Signalwege werden durch die Aktivierung von Proteinen der Src-Familie gesteuert. Zu der Familie der src-Proteine gehören Yes, Lyn, Fyn, Lck, Fsr und Blk. Sie sind an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert und verfügen, wie man in Abbildung 3 erkennen kann, über SH2- und SH3-Domänen, über welche sie sich an bestimmten Tyrosinresten der intrazellulären Domänen von Rezeptortyrosinkinasen anlagern können (Stover et al., 1996).

Für Src konnte eine direkte enzymatische Aktivierung nach Thrombinstimulation nachgewiesen werden (Liebenhoff et al., 1993, 1994). Auch an der neuronären Differenzierung von PC12-Zellen durch NGF ist Src beteiligt (Wood et al., 1993). In nicht-lymphoiden Zellen bindet Fyn mittels seiner SH2-Domäne an den aktivierten PDGF-Rezeptor. Dies hat eine Autophosphorylierung von Fyn und Aktivierung zur Folge (Hansen et al., 1997). Dass Mitglieder der Src-Familie auch an der Signaltransduktion der Neurotrophine beteiligt sind, ist schon länger bekannt: in PC12-Zellen kommt es durch NGF-Inkubation zu einer Src-abhängigen Veränderung der Zytoarchitektur (Altun-Gultekin und Wagner, 1996). Neuere Daten zeigen, dass auch die Proteintyrosinkinase Fyn an der Signalweiterleitung vom Trk-B-Rezeptor beteiligt ist (Iwasaki et al., 1998). Diese Annahme wird durch Co-Immunopräzipitation von Trk-B-Rezeptor und Fyn kortikaler Neurone bestätigt (Iwasaki et al., 1998). Die Assoziation erfolgt über die SH2-Domäne von Fyn. BDNF verdreifacht die Assoziation des Rezeptors mit dem Signalmolekül Fyn (Iwasaki et al., 1998).

Im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion folgen weitere Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse, Proteine werden aktiviert, andere deaktiviert. Über die Aktivierung von Ras und Raf kann eine Aktivierung der MAP-Kinase (Rozakis-Adcock et al., 1995) erfolgen. Die aktivierte MAP-Kinase leitet das Signal an genregulatorische Proteine weiter. Schließlich werden im Zellkern bestimmte Gene transskribiert oder die Transskription bestimmter Gene unterdrückt und so neue Proteine synthetisiert oder die Synthese von Proteinen eingestellt (Su und Karin, 1996).

1.3 Wachstumsfaktoren

Einer der ersten entdeckten Wachstumsfaktoren ist der Platelet-derived Growth Factor (PDGF). Man findet ihn und seine Rezeptoren auf Thrombozyten, aber auch auf vielen anderen Zellen, wie beispielsweise auf Neuronen (Vignais et al., 1995). Mittlerweile kennt man über 50 verschiedene Wachstumsfaktoren. Für jeden gibt es einen oder mehrere spezifische Rezeptoren, der das vom Wachstumsfaktor ausgehende Signal in das Zellinnere und somit auch an den Zellkern vermittelt. Neben Zellteilung und Wachstum vermitteln die Wachstumsfaktoren auch bei Differenzierung, Überleben, Apoptose, Bewegung und anderen speziellen Funktionen von Zellen.

1.3.1 Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Neurotrophine repräsentieren eine Familie von Wachstumsfaktoren, die wichtig ist für Wachstum, Differenzierung und Überleben verschiedener Populationen neuronaler Zellen. Zu den klassischen Neurotrophinen gehören Nerve Growth-factor (NGF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4 (NT-4), Neurotrophin-5 (NT-5), Neurotrophin-6 (NT-6) und Neurotrophin-7 (NT-7). Neben den klassischen Neurotrophinen kennt man auch die neurotrophen Proteine und Hormone wie Neurturin, Cardiotrophin-1, Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor (GDNF), GDNF-related Factor Persephin (Milbrand et al., 1998), PDGF und Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF). Sie unterscheiden sich im Aufbau und in ihrer Signaltransduktion von den Neurotrophinen, verfügen aber ebenfalls über neurotrophe Funktionen.

Die Neurotrophine ähneln sich sowohl strukturell als auch funktionell (Narhi et al., 1993). NGF wurde 1951 erstmals von Levi-Montalcini beschrieben und ist ein Homodimer à 26 kDa bestehend aus zwei Polypeptiden à 13 kDa. Trotzdem es sich um eine nicht-kovalente Bindung handelt, ist das Homodimer stabil, auch in niedrigen NGF-Konzentrationen (Bothwell and Shooter, 1977). Bildet sich ein Dimer aus, so liegen Aminoterminus und Carboxyterminus beider Polypeptidketten auf einer Seite (McDonald et al., 1991). Die Neurotrophin-Aminosäuresequenz, die für

die Bindung an den p75^{NTR}-Rezeptor verantwortlich ist, überschneidet sich zum Teil mit der Bindungsstelle, die die Bindung an den Trk-A-Rezeptor vermittelt (Ibanez et al., 1992).

1989 folgte die Entdeckung von BDNF durch Leibrock und Mitarbeiter. Die Aminosäuresequenz von BDNF ähnelt der von NGF. Es besteht eine 50%ige Übereinstimmung zwischen beiden Neurotrophinen ((Hohn et al., 1990)). Wegen dieser Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen wurden, um weitere Neurotrophine zu identifizieren, PCR-Versuche mit Primern unternommen, die diese ähnlichen, konservierten Sequenzen erkennen. Auf diese Weise konnten NT-3 und NT-4 nachgewiesen werden. NT-3 wurde von verschiedenen Spezies (Rosenthal et al., 1990) und NT-4 aus *Xenopus laevis* kloniert (Halböök et al., 1991). Ein weiteres Neurotrophin wurde aus Säugetierzellen kloniert. Da einige Wissenschaftler davon ausgehen, dass es sich hierbei um das Korrelat des NT-4 des Frosches handelt, andere Forscher jedoch glauben, dass es ein eigenständiges Neurotrophin ist, wird dieser Faktor als Neurotrophin-4 oder Neurotrophin-5 bezeichnet. Man bezeichnet dieses Neurotrophin daher zumeist als NT-4/5.

In den letzten Jahren wurden zwei weitere Neurotrophine kloniert. Sie konnten allerdings nur in Fischen nachgewiesen werden. Neurotrophin-6 wurde erstmals aus Zellen von *Xiphophorus maculatus* kloniert. Im Gegensatz zu den anderen Neurotrophinen wird NT-6 nicht im Zellkulturüberstand von produzierenden Zellen gefunden (Gotz et al., 1994). Neurotrophin-7 wurde aus dem Karpfen *Cyprinus carpio* (Lai et al., 1998) und aus dem Zebrafish *Danio rerio* (Nilsson, 1998) kloniert. Es besteht eine 66%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von NGF und NT-6, bzw. NT-7 der Fische ((Lai et al., 1998)).

An den p75^{NTR}-Rezeptor binden alle Neurotrophine als Liganden mit gleicher Affinität. Der Rezeptor verfügt über eine extrazelluläre Domäne mit einer vierfachen Wiederholung von 40 Aminosäuren, jeweils getrennt durch sechs Cysteinreste (siehe Abb. 4). Dem folgen eine einzelne transmembranäre und eine kleine intrazelluläre Domäne. Er ähnelt in seinem Aufbau dem Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor (Chao, 1994). Eine variable Fraktion von p75^{NTR} bildet ein Dimer aus (Grob et al., 1985). Der p75^{NTR}-Rezeptor ist an Serinresten phosphoryliert, diese Phosphorylierung ist allerdings unabhängig von der NGF-Stimulierung (Grob et al., 1985). Man vermutet, dass die Phosphorylierung entweder die Dimerisierung des Rezeptors oder die

Dimerisierung die Phosphorylierung verhindert. Vergleiche der p75-Sequenzen unterschiedlicher Säugetiere zeigen, dass die Aminosäuresequenz während der Evolution hoch konserviert wurde, vor allem die der transmembranären und juxtamembranären Regionen (Bothwell, 1995; Roux und Barker, 2002).

Da in Fibroblasten, die mit dem p75^{NTR}-Rezeptor transfiziert wurden, nur eine Bindung des Liganden an den Rezeptor und keine intrazellulären Effekte festgestellt werden und der Rezeptor durch seine intrazelluläre Domäne keine Bindungsstellen für Adapterproteine generieren kann, suchte man nach weiteren Rezeptoren der Neurotrophine, welche eine intrinsische Aktivität aufweisen. So folgte die Entdeckung der Tyrosin-Rezeptor-Kinase-(Trk)-Rezeptoren. Mittlerweile sind Trk-A-, Trk-B- und Trk-C-Rezeptoren bekannt (siehe Abbildung 4).

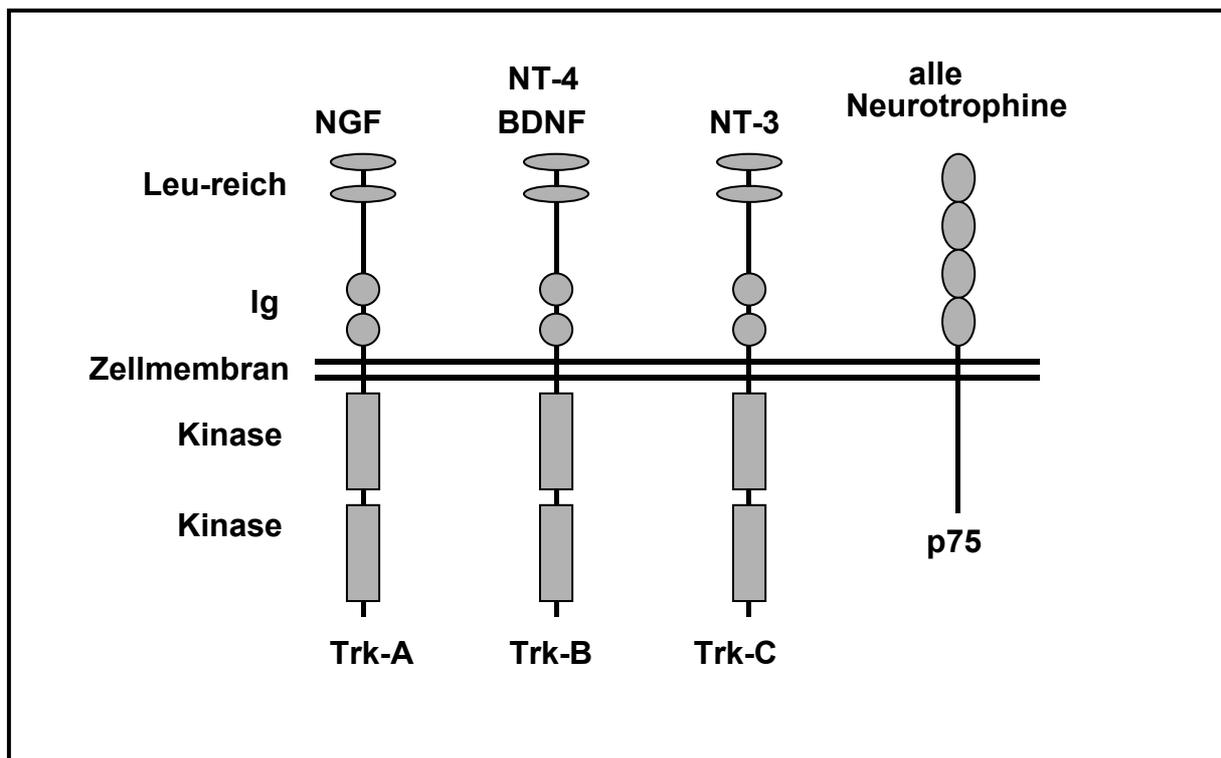


Abb. 4: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen den Neurotrophinen und ihren Rezeptoren. Alle Neurotrophine, auch NT-6 und NT-7, binden an den niedrigaffinen p75-Rezeptor, die Bindung an die hochaffinen Trk-Rezeptoren ist für die einzelnen Liganden spezifisch. NGF bindet an Trk-A, BDNF und NT-4 (NT-4/5) an Trk-B und NT-3 an Trk-C. Neben der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne mit der immunglobulinähnlichen Domäne (Ig), verfügen die Trk-Rezeptoren über eine transmembranäre und eine intrazelluläre Domäne. Letztere ist der Sitz der Tyrosinkinasedomäne (modifiziert nach Bothwell, 1995).

Die hochaffinen Trk-Neurotrophinrezeptoren werden von Neuronen des Zentralnervensystems, vor allem in der Hippocampusregion, exprimiert und ähneln sich in ihren Aminosäuresequenzen in 66 bis 68% (Lamballe et al. 1991a). Es handelt sich um Glycoproteine.

Der Trk-A-Rezeptor hat eine Molmasse von 140 kDa und bindet vorwiegend NGF. Neben NGF können auch NT-3 und NT-4 schwache Effekte über diesen Rezeptor auslösen, die Bindung von BDNF hingegen bewirkt keinerlei intrazelluläre Effekte. BDNF und NT-4 sind Liganden des Trk-B-Rezeptors; mit einer Molmasse von 145 kDa. In hohen Konzentrationen kann auch NT-3 an den Trk-B-Rezeptor binden (Squinto et al., 1991; Zirrgiebel et al., 1995). Der Rezeptor hat, wie auch der Trk-C-Rezeptor, eine Molmasse von 145 kDa. Über den Trk-C-Rezeptor führt nur NT-3 zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase (Lamballe et al., 1991b).

Neurotrophine sind an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen beteiligt, da sie Wachstum und Differenzierung von Neuronen steuern. Darüber hinaus sind Neurotrophine auch an dem Vorgang der Apoptose (Bunone et al., 1997), der synaptischen Plastizität, Alterungsprozessen und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt. Fehlen Neurotrophine und ihre Rezeptoren, so verkürzt sich die Lebenszeit von Mäusen und es kommt zu einem Verlust spezifischer Nervenzellpopulationen im peripheren und zentralen Nervensystem (Snider, 1994). Schaltet man allerdings den $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor in Mäusen aus, beobachtet man eine geringere Apoptoserate cholinergischer Neurone im Großhirn (Van der Zee et al., 1996).

1.3.2 Platelet-derived Growth Factor und PDGF-Rezeptoren

Der Platelet-derived Growth Factor (PDGF) besteht aus zwei Untereinheiten, die auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert sind (Betsholtz et al. 1986). Sie werden mit PDGF-A und PDGF-B bezeichnet und können miteinander zwei Homodimere, PDGF-AA und PDGF-BB, und ein Heterodimer, PDGF-AB von rund 30 kDa bilden. Diese Moleküle binden an unterschiedliche PDGF-Rezeptoren. PDGF wirkt auf die mitogene Aktivität glatter Muskelzellen (Bowen-Pope et al., 1984). Darüber hinaus spielt PDGF eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen wie der Embryogenese, der ZNS-Entwicklung, der Zellmigration. Aber auch bei

pathophysiologischen Prozessen wie Gewebe-Reparaturmechanismen, Krebs- und Atheroskleroseentstehung ist PDGF beteiligt (Ross, 1990). Außerdem werden auch neurotrophinähnliche Wirkungen und modulierende Effekte auf die synaptische Transmission diskutiert (Valenzuela et al., 1995; Valenzuela et al., 1997).

Man kennt alpha- und beta-PDGF-Rezeptoren (Seifert et al., 1989), die intrazellulär zu unterschiedlichen Signalen führen (Vassbotn et al., 1992). Beide Rezeptorproteine sind strukturell ähnlich aufgebaut (Westermarck, 1990); sie besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, einen transmembranären Teil und eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne (Claesson-Welsh et al., 1989) (siehe Abb. 2). Der glykosylierte PDGF-Rezeptor Alpha hat eine Molmasse von 170 kDa und der PDGF-Rezeptor beta von 180 kDa (Vassbotn et al., 1994). PDGF-Rezeptoren kommen in vielen Geweben, vorwiegend mesenchymalen Ursprungs, vor. Fibroblasten (Heldin et al., 1983), Mesangiumzellen, interstitielle Nierenzellen (Alpers et al. 1993), Thrombozyten, Endothelzellen, Gliazellen, Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems (Smits et al., 1991), glatte Muskelzellen des Uterus (Rodriguez-Martinez et al., 1992) und Trophoblastenzellen zählen zu den wichtigsten Zellen, die mit PDGF-Rezeptoren ausgestattet sind. Das Gehirn von Säugetieren verfügt über beide PDGF-Rezeptorvarianten (Smits et al., 1991; Smits et al., 1998).

Die Rezeptoren unterscheiden sich neben ihrer Verteilung auf den einzelnen Zelltypen in ihrer Ligandenbindungsspezifität. Der Alpha-Rezeptor bindet mit hoher Affinität PDGF-A- und -B-Ketten, der Beta-Rezeptor bindet nur PDGF-B-Ketten. Die Bindung des Liganden führt zur Dimerisierung des Rezeptors (Heldin et al., 1989). Deren Folge ist eine Rezeptor-Autophosphorylierung. An den aktivierten Rezeptor können sich verschiedene Signalmoleküle anlagern, wie dies in Abbildung 2 dargestellt ist. Dazu gehören, neben den in der Abbildung 2 gezeigten Proteinen, weitere Signalproteine: das Signalprotein Grb7 (Yokote et al., 1996), das Protein Shc (Yokote et al., 1994) sowie Crk-Proteine, welche Phospho-Tyr-762 als Bindungsstelle benutzen (Yokote et al., 1998).

Die Bindung an den Rezeptor erfolgt zumeist über SH2-Domänen dieser Signalproteine. Die Aktivierung des Rezeptors und Anlagerung der Signalproteine generieren intrazelluläre Signalkaskaden. Daran sind auch Mitglieder der Src-Familie beteiligt (Twamley-Stein et al., 1993). Die Proteintyrosinkinase des jeweiligen Src-

Familienmitglieds wird aktiviert. So konnte gezeigt werden, dass es zu einer durch PDGF induzierten Tyrosinphosphorylierung von Tyrosin 28 am N-Terminus von Fyn kommt. Dies hat eine Aktivierung von Fyn zur Folge (Hansen et al., 1997). PDGF bewirkt auch eine Translokation von Src von der Plasmamembran ins Zytosol (Walker et al., 1993).

2 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit soll dargestellt werden, wie die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF, NT-3, NT-4, PDGF-AB und PDGF-BB an der Steuerung verschiedener zellulärer Mechanismen beteiligt sind. Als Modellsysteme dienen aus Rattengehirnen der Wistar Ratte gewonnene Synaptosomen. Mit diesen soll geprüft werden:

1. Führen die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF, NT-3, NT-4, PDGF-AB und PDGF-BB zu einer Veränderung der Proteintyrosinphosphorylierung – und wenn ja, an welchen Proteinen? Wirken alle diese Wachstumsfaktoren gleich?
2. Sind diese Effekte konzentrations- und zeitabhängige Veränderungen?
3. Sind die Tyrosinkinaserzeptoren und die Mitglieder der Src-Familie an der Vermittlung der Veränderung des Phosphorylierungsmusters von Synaptosomenproteinen an Tyrosinresten durch NGF, BDNF, NT-3, NT-4, PDGF-AB und PDGF-BB beteiligt?
4. Haben die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF, NT-3, NT-4, PDGF-AB und PDGF-BB eine Auswirkung auf die depolarisationsinduzierte Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat?

Mit dieser Arbeit soll gezeigt werden, wie die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF, NT-3, NT-4, PDGF-AB und PDGF-BB auf die Modifikation des Phosphorylierungsmusters von Proteinen der Rattensynaptosomen wirken. Darüber hinaus ist zu klären, ob und in welcher Weise die untersuchten Wachstumsfaktoren die depolarisationsabhängige Glutamatfreisetzung modifizieren. Damit soll die Vorstellung über die Wirkung von NGF, BDNF, NT-3, NT-4, PDGF-AB und PDGF-BB auf Synaptosomen der Ratte erweitert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Synaptophysin Clone 7.2 Antikörper (Maus-Aszites)	Synaptic Systems
Anti-Synaptophysin Antikörper (monoklonales Maus-IgG)	Boehringer Mannheim
Anti-Phosphotyrosin 4G10 Antikörper (monoklonales Maus-IgG2)	Biomol (UBI)
Anti-Phosphotyrosin PY20 Antikörper	Leinco Technologies
Peroxydase-konjugierter Kaninchen Anti-Maus Antikörper	DAKO
Peroxydase-konjugierter Maus Anti-Kaninchen Antikörper	DAKO

3.1.2 Reagenzien

Reagens	Bezugsquelle
Acryl amid	Roth
Ammoniaklösung	Roth
APS 10% (Ammoniumpersulfat)	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bradford Reagens	BioRad
Butanol	Merck
Coomassie brilliant blue R250	Serva
Deoxycholat	Pharmacia
Dithiothreitol (DTT)	Serva
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
ECL (Western blotting detection system)	Amersham

Eisessig	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Baker Chemikalien
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Tritiplex III)	Merck
Ethyleneglycol-bis (β -Amino-ethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck
Folin-Reagens	Merck
γ -binding G-Sepharose	Pharmacia
Glukose	Merck
Hepes	Roth
HMW/LMW Markersubstanzen	Sigma
Hydrogenphosphat	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kupfersulfat x 5 H ₂ O	Merck
Magermilchpulver	Glücksklee
Magnesiumchlorid	Sigma
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Sigma
Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Fluka
MOPS	Roth
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	Merck
Natriumfluorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Di-Natriumphosphat	Sigma
Natriumtartrat	Merck
Natriumvanadat	Sigma
Nitrozellulose-Transfermembran	Schleicher & Schüll

N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Percoll	Pharmacia
Ponceau-S	Sigma
Protein-A-Sepharose	Pharmacia
Protein-A-Sepharose	Fluka
PVDF-Transfermembran	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure	Baker
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Tris-Aminomethan	Riedel de Hæn
Tris-HCl 10 mM	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20 (0,05%)	Sigma
Zinkchlorid	Merck

3.1.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktor	Bezugsquelle
Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)	TEBU
Nerve Growth Factor (NGF)	TEBU
Neurotrophin-3 (NT-3)	TEBU
Neurotrophin-4 (NT-4)	TEBU
Platelet-derived Growth Factor-AB (PDGF-AB)	TEBU
Platelet-derived Growth Factor-BB (PDGF-BB)	TEBU

3.1.4 Enzyme und Inhibitoren

Enzym / Inhibitor	Bezugsquelle
ϵ -Aminocapronsäure (6-Aminohexansäure)	Merck
Apyrase	Sigma
Benzamidin	Sigma
Glutamatdehydrogenase (GLDH)	Boehringer Mannheim
Leupeptin	Boehringer Mannheim
K252a	Calbiochem
NADP	Boehringer Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva
PP1	Pfizer

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von Synaptosomen aus Rattenhirn

Die Reinigung der Synaptosomen erfolgt nach der Methode von Harrison et al. (1988). Dazu wird eine Wistar-Ratte mit einem Gewicht von 200 bis 250 g durch Betäubung und anschließende Enthauptung getötet. Das gesamte Gehirn wird herauspräpariert. Zerebellum und Hirnstamm werden verworfen. Das Großhirn wird mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten und in 9 ml 4°C kalten Gradientenpuffer (0,32 M Saccharose, 1 mM EDTA, 0,25 mM DTT, pH-Wert 7,4) gegeben. Die weitere Präparation der Synaptosomen geschieht ebenfalls bei 4°C. Das in Gradientenpuffer aufgenommene Gehirn wird zehnmal bei 800 rpm in einem Homogenisatorröhrchen (Firma Braun) homogenisiert. Das gewonnene Homogenisat wird bei 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Du Pont). Der Überstand wird abgenommen, als „Überstand 1“ gekennzeichnet und auf Eis aufbewahrt. Das Sediment wird in 4 ml Gradientenpuffer resuspendiert, bei 800 rpm bei 4°C nochmals homogenisiert und erneut für 10 Minuten in einer Sorvall-Zentrifuge bei 1000 x g zentrifugiert. Man erhält so „Überstand 2“. Das Sediment wird verworfen. „Überstand 1“ und „Überstand 2“ werden zusammengebracht und mit

Gradientenpuffer auf insgesamt 12 ml aufgefüllt. Je 2 ml dieser Lösung werden auf 6 vorbereitete diskontinuierliche Percoll-Gradienten mit je 23%, 15%, 10% und 3% Percoll-Lösung geschichtet.

Diese Gradienten werden nun nach dem Erreichen der gewünschten Beschleunigung für 5 Minuten bei 32500 x g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation erhält man fünf Banden, welche von oben nach unten den Fraktionen eins bis fünf zugeordnet werden. Mit einer Pasteurpipette werden die Fraktionen drei und vier abgenommen. In Fraktion vier befinden sich die meisten homogenen Synaptosomen, obwohl der Anteil am Gesamtprotein sehr gering ist. Auch die Synaptosomen der Fraktion drei sind metabolisch und funktionell aktiv und werden daher mit den Synaptosomen aus Fraktion 4 zusammen für die weitere Präparation der Synaptosomen verwendet.

Die erhaltenen Synaptosomen werden zum Reinigen mit Krebs-Ringer-Hepes-Puffer (KRH-Puffer: 143 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,1 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes, 11 mM Glucose; pH-Wert 7,4) aufgenommen. Die Synaptosomen werden in dem KRH-Puffer für 20 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert und anschließend das entstandene Sediment zweimal mit KRH-Puffer gewaschen. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit 1,1 ml KRH-Puffer resuspendiert.

Dieses Verfahren ergibt eine Proteinkonzentration in der Synaptosomenlösung von etwa 5 mg/ml. Die genaue Bestimmung des Proteingehalts erfolgt mittels Proteinbestimmung nach dem durch Markwell et al. (1978) modifizierten Verfahren von Lowry et al. (1951). Dazu werden 200 μl der in KRH-Puffer aufgenommenen Synaptosomen mit 1 ml Reagenz versetzt. Dieses Reagenz besteht aus 100 Teilen Lösung 1 (0,16% Na-Tartrat, 0,4% NaOH, 2% Na_2CO_3 und 1% SDS) und einem Teil Lösung 2 (4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$). Dies wird 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 100 μl Lösung 4 (50% Folin-Reagens und 50% zweifach destilliertes Wasser) zugegeben, gemischt und erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die gemessene Extinktion bei 750 nm gegen den entsprechenden Leerwert (Puffer) kann in einer Standardkurve mit Rinderserumalbumin zugeordnet und so die Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.2.2 In-vitro-Stimulation isolierter Synaptosomen aus Rattenhirn

Synaptosomen werden wie unter 3.2.1 beschrieben aus dem Gehirn einer Wistar-Ratte gewonnen und in Eppendorfgefäße (1,5 ml Fassungsvermögen) aufgeteilt. Zunächst werden jeweils 45 µl der zuvor auf 4°C gekühlten Synaptosomen fünf Minuten bei 37°C erwärmt. Diese Synaptosomensuspension wird mit 5 µl Stimulans bzw. Kontrolllösung versetzt und dann für die angegebene Zeit stimuliert. Die Inkubation der Synaptosomen findet bei 37°C unter ständigem Schütteln in einem Thermomixer (Firma Eppendorf) bei 700 rpm statt. Die jeweils zugegebenen Substanzen, Konzentrationen und Inkubationszeiten werden bei dem jeweiligen Versuch angegeben.

Zur Beendigung der Reaktion werden 50 µl SDS-Probenpuffer (0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 1,43 M 2-Mercaptoethanol, 20 % (w/v) Glycerin, 6 M Harnstoff, 0,1% (w/v) Bromphenolblau) zugegeben und die Probe für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wird den Proben noch einmal SDS-Probenpuffer, im Verhältnis 1:2 mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt, zugegeben und erneut fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Die so erhaltene Probe kann durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert werden.

3.2.3 Immunpräzipitation von Synaptosomenproteinen

Synaptosomen werden wie unter 3.2.1 gewonnen. Neunzig Mikroliter der Synaptosomensuspension werden mit 10 µl BDNF, welches in KRH-Puffer aufgenommen wurde, mit einer Endkonzentration von 100 ng/ml bzw. mit Kontrolllösung (KRH-Puffer) für 20 Minuten stimuliert, und diese Proben dann mit jeweils 100 µl Lysis-Puffer (1% Triton X100, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH-Wert 7,3), 1 mM Vanadat, 10 µM Leupeptin, 10 µM Trasylol und 10 µM Pepstatin, 20 µM Benzamidin, 10 mM Epsilon-Aminokapronsäure, 40 mM Natriumfluorid) versetzt. Die Lyse der Zellen erfolgt bei 4°C für 20 Minuten. Während dieser Lyse muss der Ansatz mehrere Male gut durchmischt werden. Anschließend werden die Proben nach dem Erreichen der gewünschten Beschleunigung 10 Minuten bei 8800 x g abzentrifugiert. Das Sediment, welches die nicht gelösten Proteine beinhaltet, wird verworfen und der Überstand mit 10 µl Anti-Synaptophysin-

Antikörper (SY38-Antikörper) und zwei Stunden bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Der Ansatz wird dann mit 5 mg pro Probenansatz gewaschener und gequollener Protein-A-Sepharose versetzt und erneut eine Stunde lang bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Anschließend werden die Proben zwei Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 12000 x g abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Die Ansätze werden mit 1ml HEPES-Natrium-Triton-(HNT)-Waschpuffer (20mM HEPES, pH 7,4, 150mM NaCl, 0.1% Triton X100, 1mM Vanadat) versetzt und erneut zwei Minuten in der Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Dieser Reinigungsschritt erfolgt dreimal. Zuletzt werden die erhaltenen Sedimente mit 30µl SDS-Probenpuffer versetzt, geschüttelt und für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Die Überstände werden nach Zentrifugation vollständig auf ein SDS-Gel aufgetragen und analysiert.

3.2.4 Glutamatfreisetzung aus Synaptosomen der Ratte

3.2.4.1 Gewinnung der Proben

Synaptosomen werden wie in 3.2.1 beschrieben gewonnen, jeweils 90 µl der Synaptosomensuspension in Versuchsgefäße gebracht und in einer Sorvall-Zentrifuge bei 4°C nach Erreichen der gewünschten Beschleunigung bei 745 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird das Sediment mit 45 µl 37°C warmem KRH-Puffer resuspendiert und mit 5 µl Stimulans, welches in KRH-Pufferlösung verdünnt wird, bzw. mit Kontrolllösung (KRH-Puffer) für die jeweils angegebene Zeit bei 37°C in einem Thermomixer (Firma Eppendorf) stimuliert. Die Proben werden nach dieser Stimulation erneut nach Erreichen der gewünschten Beschleunigung bei 745 x g bei 4°C abzentrifugiert. Die nach diesem Zentrifugationsschritt erhaltenen Überstände werden verworfen und die sedimentierten Synaptosomen mit jeweils 750 µl 37°C warmem KRH-Puffer in Probengefäßen der Firma Eppendorf (Fassungsvolumen 2,5 ml) resuspendiert, für 5 Minuten bei 37°C auf einem Thermomixer (Firma Eppendorf) unter ständigem Schütteln inkubiert. Dann erfolgt die erneute Zugabe von 750 µl 37°C warmen KRH-Puffers für 5 Minuten und anschließend eine Zentrifugation der Proben nach Erreichen der gewünschten Beschleunigung für zwei Minuten bei 745 x g. Der Überstand, „Überstand 1“ genannt,

wird für die nachfolgenden Messungen im Fluorimeter (Kapitel 3.2.4.2.1) auf Eis aufbewahrt. Dieser „Überstand 1“ dient als Kontrolle, da intakte, undepolarisierte Synaptosomen unter diesen Bedingungen spontan nur wenig Glutamat freisetzen.

Die sedimentierten Synaptosomen werden erneut mit 750 µl 37°C warmen KRH-Puffers resuspendiert und fünf Minuten schüttelnd bei 37°C inkubiert. Es erfolgt eine Zugabe von 750 µl 37°C warmen KRH-Puffers mit hohem Kaliumgehalt (66 mM NaCl, 82 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 11 mM Glucose und 10 mM HEPES, pH-Wert 7,4) für fünf Minuten, um die Synaptosomen zu depolarisieren. Anschließend erneute Zentrifugation der Proben nach Erreichen der gewünschten Beschleunigung für zwei Minuten bei 745 x g. Auch der so erhaltene „Überstand 2“ wird für die nachfolgenden Messungen im Fluorimeter auf Eis aufbewahrt. Die sedimentierten Synaptosomen werden erneut mit 750 µl 37°C warmen KRH-Puffers resuspendiert und fünf Minuten schüttelnd bei 37°C inkubiert. Es erfolgt erneut eine Zugabe von 750 µl 37°C warmen KRH-Puffers mit hohem Kaliumgehalt für fünf Minuten, um die Synaptosomen abermals zu depolarisieren. Anschließend Zentrifugation der Proben nach Erreichen der gewünschten Beschleunigung für zwei Minuten bei 745 x g. Der gewonnene „Überstand 3“ wird für die nachfolgenden Messungen im Fluorimeter auf Eis aufbewahrt. Die sedimentierten Synaptosomen werden erneut mit 750 µl 37°C warmen KRH-Puffers resuspendiert und fünf Minuten schüttelnd bei 37°C inkubiert. Es erfolgt wiederum die Zugabe von 750 µl 37°C warmem KRH-Puffer mit hohem Kaliumgehalt für fünf Minuten, um die Synaptosomen ein drittes mal zu depolarisieren, Zentrifugation der Proben nach Erreichen der gewünschten Beschleunigung für zwei Minuten bei 745 x g. Der gewonnene „Überstand 4“ wird für die nachfolgenden Messungen im Fluorimeter auf Eis aufbewahrt.

Die erhaltenen Überstände „Überstand 1“ bis „Überstand 4“ werden im Fluorimeter mit Hilfe der Glutamatdehydrogenase auf ihren Glutamatgehalt untersucht. Die sedimentierten Synaptosomen „Sediment 4“ genannt, aus denen „Überstand 4“ gewonnen wurde, werden mit 1,5 ml 37°C warmem KRH-Puffer resuspendiert und mittels Fluorimetermessung auf ihre Fähigkeit überprüft, depolarisationsinduziert Glutamat freizusetzen (Kapitel 3.2.4.2.2).

3.2.4.2 Fluorimetrische Quantifizierung

3.2.4.2.1 Analyse der Überstände

Die in 3.2.4.1 erhaltenen Überstände „Überstand 1“ bis „Überstand 4“ werden mit Hilfe eines computergestützten Fluorimeters (Firma Aminco-Bowman, Fabrikat Series2 Luminescence Spectrometer) analysiert und mit dem Computerprogramm SLM AB2 (SLM-AMINCO) im „Time trace – Standard“ aufgezeichnet und bearbeitet. Hierbei kann die emittierte Fluoreszenz während der entsprechenden Zeit kontinuierlich gemessen werden. Die Extinktionswellenlänge beträgt 330 nm und die Emissionswellenlänge 460 nm.

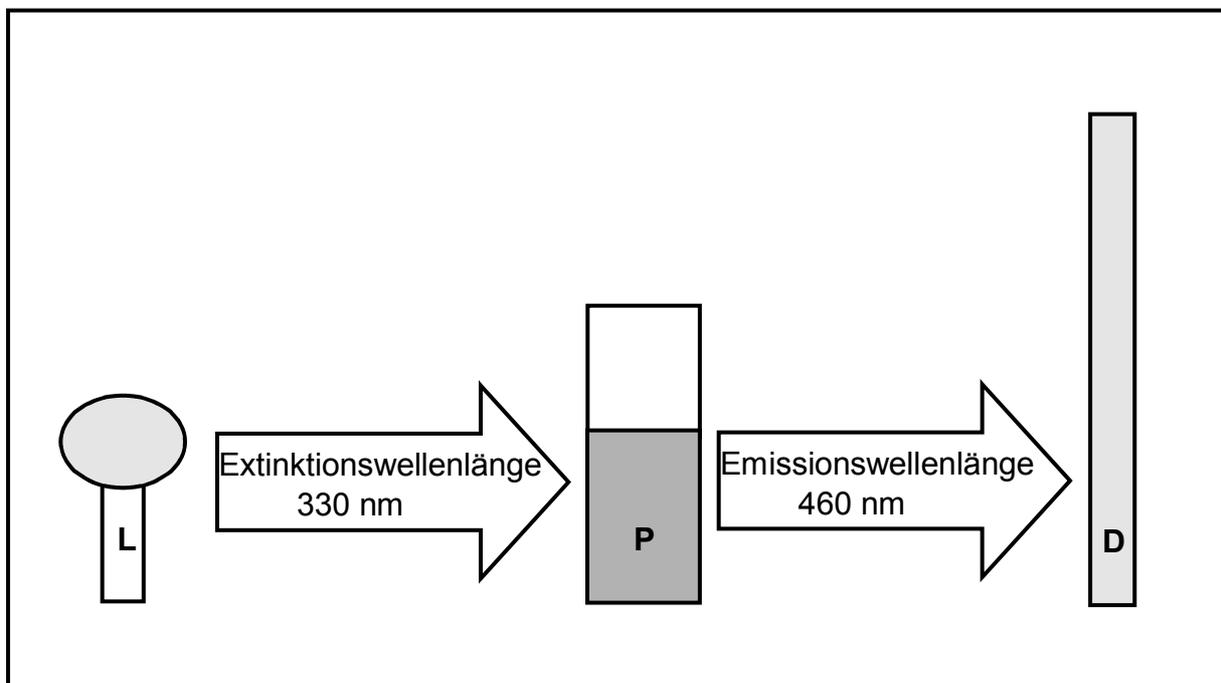


Abb. 5: Prinzip der Fluorimetermessung einer Probe (P). Die Lichtquelle (L) hat eine Extinktionswellenlänge von 330 nm und die Emissionswellenlänge beträgt 460 nm, die vom Detektor (D) detektiert wird. Die Fluoreszenz wird im „Time trace-Standard“ über die Zeit gemessen und aufgezeichnet.

Die Überstände „Überstand 1“ bis „Überstand 4“, mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 1,5 ml werden jeweils in einer Meßküvette fünf Minuten lang bei 37°C in dem Fluorimeter aufgewärmt. Dies geschieht unter ständigem Rühren durch Zugabe eines kleinen Magnetührers in die Meßküvette. Anschließend werden jeweils 15 µl NADP-Lösung (1 mM in H₂O) und 15 µl Kalziumlösung (1,3 mM in H₂O)

zugegeben und die Aufzeichnung der Messung begonnen. Nach 100 Sekunden erfolgt die Zugabe von 40 µl Glutamatdehydrogenase (1,25 U/µl). Die Messung wird weitere 400 Sekunden fortgesetzt. Die erhaltene Kurve wird ausgedruckt und anschließend ausgewertet.

3.2.4.2.2 Analyse der Vitalität der untersuchten Synaptosomen

Die Synaptosomen aus „Sediment 4“ werden mit Hilfe des Fluorimeters auf ihre Vitalität hin überprüft. Dazu werden sie zunächst in 1,5 ml auf 37°C erwärmten KRH-Puffer resuspendiert. Dies geschieht bereits in der Meßküvette des Fluorimeters unter ständigem Rühren. Anschließend werden sie mit 15 µl NADP-Lösung (1 mM in H₂O) und 15 µl Kalziumlösung (1,3 mM in H₂O) versetzt und nach 50 Sekunden 40µl GLDH (1,25U/µl) zugegeben. Dann wird zur Depolarisation der Synaptosomen 15 µl Kaliumchloridlösung (29 mM) zugegeben und die Messung für 400 Sekunden fortgesetzt.

Zuletzt werden die noch intakten Synaptosomen durch Zugabe von 20µl Triton X 100 (unverdünnt) zersetzt. Dabei kommt es zur Freisetzung des restlichen Glutamats, welches sich in den Zellsystemen befand und somit zu einem steilen Anstieg der detektierten Kurve.

3.2.4.3 Auswertung der Messergebnisse

Zur Auswertung wird die Differenz der ermittelten Fluoreszenzwerte zwischen dem 500-Sekunden-Wert und dem 100-Sekunden-Wert gebildet.

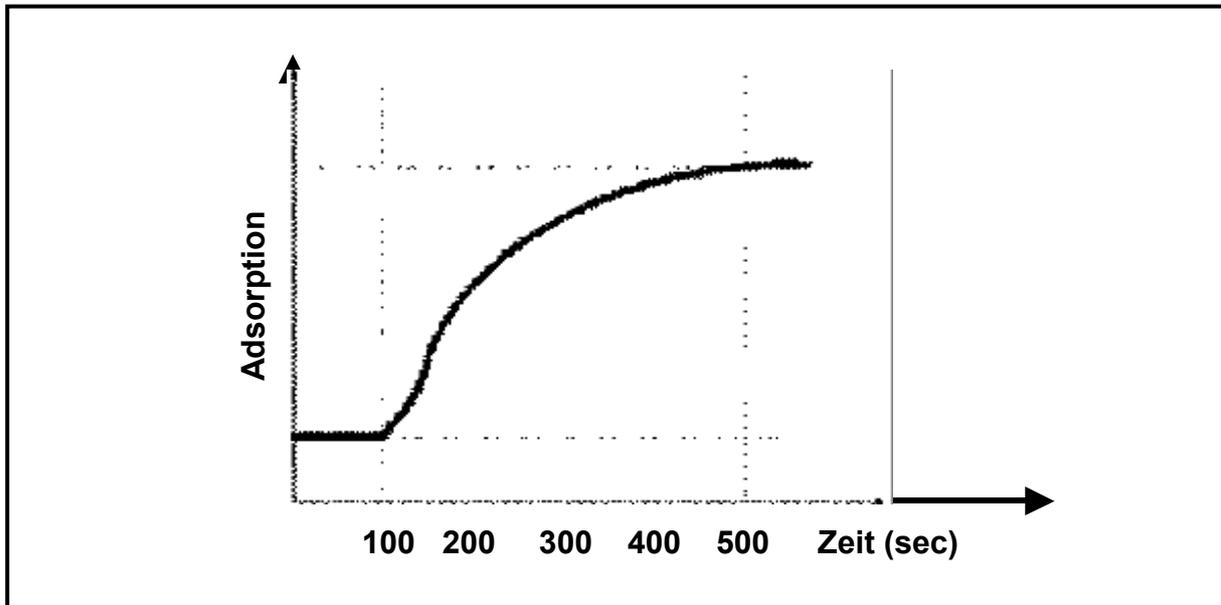


Abb.6: Schematische Darstellung der Fluorimetermessung der Glutamatfreisetzung aus Synaptosomen. Zum Zeitpunkt $t=0$ Sekunden werden zu dem zu messenden Ansatz mit einem Volumen von 1,5 ml 15 μ l NADP-Lösung (1 mM in H_2O) und 15 μ l Kaliumlösung (1,3 mM in H_2O) zugegeben. Zum Zeitpunkt $t=100$ Sekunden beginnt nach Zugabe von 40 μ l GLDH (1,25 U/ μ l) die eigentliche Messung, die nach 500 Sekunden beendet wird. Die Differenz zwischen dem 500- und dem 100-Sekunden-Wert dient zur Berechnung der einzelnen Messung.

Der durch die erste Depolarisation erhaltene Wert der Kontrolle dient als 100%-Wert. Die graphische und die statistische Auswertung erfolgen mit dem Programm „Prism“ der Firma GraphPad.

3.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wird nach Laemmli et al. (1970) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt über Flachgele in vertikalen Gelelektrophoresekammern (Firma BioRad). Zum Sammeln der Proteingemische werden ein fünfprozentiges „Sammelgel“ und zur Auftrennung mittels SDS-PAGE elfprozentige „Trenngele“ verwendet.

Lösungen	Sammelgel (10ml) 5%	Trenngel (20 ml) 11%
30% Acrylamid	1,76 ml	7,33 ml
0,8% Bisacrylamid		
0,62 M Tris-Puffer, pH 6.8	1,25 ml	-
0,75 M Tris-Puffer, pH 8.8	-	10,0 ml
20% (w/v) SDS	50 µl	100 µl
TEMED (unverdünnt)	10 µl	10 µl
10% (w/v) APS	50 µl	138 µl
zweifach dest. H ₂ O	6,88 ml	2,33 ml

Tab. 2: Pipettierplan zur Herstellung eines SDS-Gels für die Gelelektrophorese. Eingetragen sind die Volumina der Lösung für ein fünfprozentiges Vor-Gel und ein elfprozentiges Trenn-SDS-Gel.

Mit jeder SDS-PAGE wird ein Markergemisch aufgetragen (Methode von Weber und Osborn (1969)), welches zur Bestimmung der apparenten Molmassen der Proteine dient (dazu Kapitel 3.2.6).

Mit 10 ml einer Färbelösung aus 0,25% (w/v) Coomassie brillant blau, 45% (v/v) Methanol und 5% Essigsäure werden die Proteine der Gele nach der SDS-Gelelektrophorese oder nach dem Immuno-(Western)-Blot gefärbt. Die Färbelösung wird abgegossen und der Hintergrund des Gels durch die Zugabe von 10 ml einer Entfärberlösung aus 5% (v/v) Methanol und 5% (v/v) Essigsäure wieder entfärbt. Nach zweistündiger Inkubation in 10 ml zweifach destilliertem Wasser werden die SDS-Gele auf einem Geltrockner (Firma Biorad) für 2,5 Stunden bei 80°C getrocknet.

3.2.6 Immuno-(Western)-Blot

Nach der SDS-PAGE erfolgt bei vielen Versuchen statt einer Fixierung und Coomassie brillant Blau-Färbung ein Immuno-(Western)-Blot nach der Methode von Towbin et al. (1979), modifiziert nach Kamps und Sefton (1988). Dazu wird ein Blotsystem der Firma Biorad verwendet. Zunächst werden alle für den Immuno-(Western)-Blot notwendigen Teile, Schwämme, Transfermembran, Filterpapiere und das SDS-Gel in 4°C kaltem Blotpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 192 mM Glycin und 20% (v/v) Methanol) äquibriert. Anschließend werden die Teile nacheinander übereinandergebracht, so dass das Gel der Transfermembran direkt anliegt. Die so übereinander fixierten Teile werden dann luftblasenfrei in die Blot-Kammer gebracht. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Transfermembran erfolgt bei 4°C bei 1,2 mA pro cm².

Nach dem Transfer wird die Transfermembran in 10 ml einer 0,1%igen Ponceaurot-Lösung auf einem Schwenkschüttler angefärbt. Dies dient lediglich zur Kontrolle des erfolgreich durchgeführten Transfers und zur Markierung der Gelelektrophoresemarkers mit einem Bleistift. Die mit Ponceaurot-Lösung gefärbte Transfermembran wird mittels 10 ml TBS-T-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% (w/v) Tween20) auf dem Schwenkschüttler für fünf Minuten entfärbt.

Die Membran wird mit 10 ml einer 5%igen BSA-Lösung in TBS-T-Puffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken auf dem Schwenkschüttler inkubiert. Dies dient der Blockierung der nicht mit Proteinen bestückten Bereiche der Transfermembran. Anschließend wird die Membran zweimal kurz, einmal 15 Minuten und zweimal fünf Minuten mit 10 ml frischem TBS-T-Puffer gereinigt, um die überschüssige BSA-Lösung zu eliminieren.

Die Inkubation der Transfermembran mit dem ersten Antikörper erfolgt über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken auf einem Schwenkschüttler in 10 ml TBS-T-Puffer mit 1% BSA mit unterschiedlichen, dem jeweiligen Versuch zu entnehmenden, Konzentrationen des Erst-Antikörpers. Die Lösung mit dem Erst-Antikörper wird abgenommen. Danach wird die Membran zweimal kurz, einmal 15 Minuten und zweimal fünf Minuten mit frischem TBS-T-Puffer gewaschen, um die überschüssige Lösung des BSA-Antikörpermischs zu eliminieren.

Es folgt die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper, bei dem es sich entweder um einen peroxidasegekoppelten Maus- oder Kaninchen-Antikörper handelt, für eine Stunde

bei Raumtemperatur in 10 ml TBS-T-Puffer mit 1% BSA. Im letzten Reinigungsschritt wird die Membran erneut zweimal kurz, einmal 15 Minuten und viermal fünf Minuten mit jeweils 10 ml frischem TBS-T-Puffer gereinigt, um unspezifisch gebundene Antikörper zu beseitigen.

Die Transfermembran wird nach Herstellervorschrift mit der Chemilumineszenzlösung der Firma Amersham für eine Minute inkubiert, an der Luft kurz getrocknet und in eine Filmkassette luftblasenfrei unter eine Klarsichtfolie gelegt. Zum Nachweis der Lichtemission wird ein Kodak-Biomax-Light-Röntgenfilm für 5 bis 120 Sekunden aufgelegt und anschließend in einem Entwicklergerät (Protec, Processor-Technologie, Optimax) entwickelt. Die Bleistiftmarkierungen auf der Transfermembran werden auf den entwickelten Film übertragen, um die apparente Molmasse der Proteine bestimmen zu können.

Die bekannten Molmassen der Markersubstanzen werden auf halblogarithmischem Papier entsprechend ihrer Laufweite aufgetragen (Abb. 7). Die so erhaltenen Punkte werden untereinander verbunden.

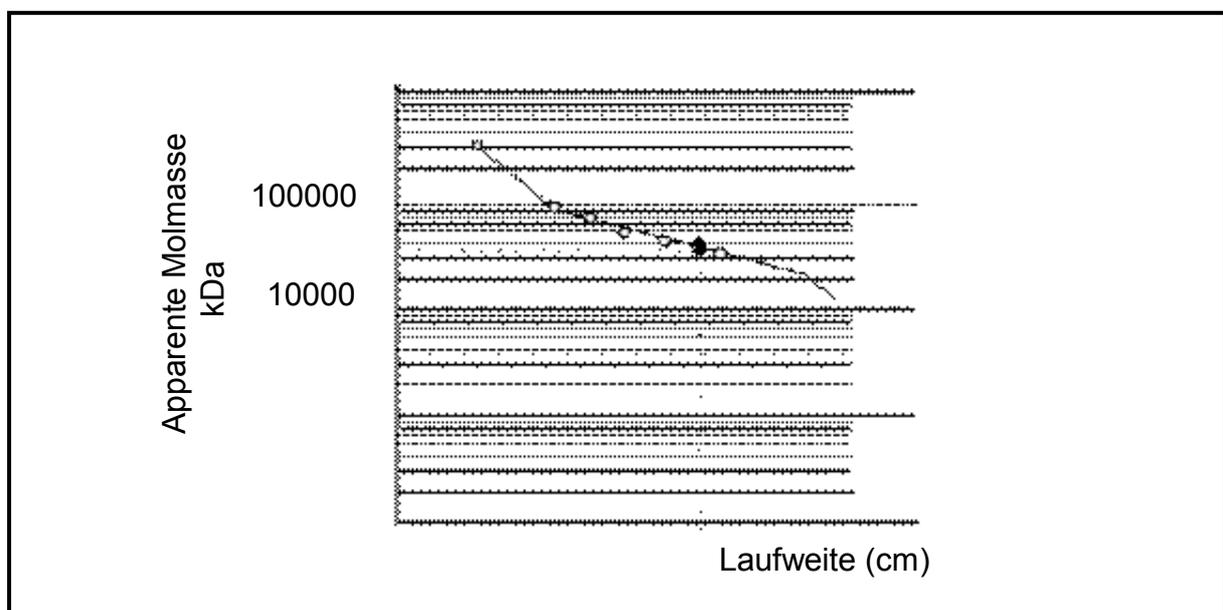


Abb. 7: Prinzip der Bestimmung der apparenten Molmasse eines Proteins im SDS-Gel mit Hilfe halblogarithmischen Millimeterpapiers. Die Markerproteine, deren Molmassen bekannt, sind entsprechend ihrer Laufweite (cm im Gel) aufgetragen (O) und miteinander verbunden. Anhand der resultierenden Kurve können nun die apparenten Molmassen anderer Proteine bestimmt werden (●).

Proteine unbekannter Molmasse können nun mit Hilfe des Graphen ermittelt werden. Entsprechend der Laufweite des zu untersuchenden Proteins wird der Schnittpunkt mit dem Graphen markiert und eine Parallele zur x-Achse gezeichnet. Der Schnittpunkt mit der y-Achse ergibt die gesuchte Molmasse. Da es sich hierbei allerdings nur um die im Gel bzw. aus dem Immuno-Blot ermittelte Molmasse handelt, spricht man von apparenter Molmasse.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Proteintyrosinphosphorylierung

4.1.1 Wirkung von BDNF auf die Proteintyrosinphosphorylierung

Der neurotrophe Wachstumsfaktor BDNF führt nach der Bindung an den Trk-B-Rezeptor zu einer Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase. Es soll zunächst untersucht werden, ob es durch die Stimulation von Synaptosomen der Ratte mit dem Neurotophin BDNF zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Veränderung der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten kommt.

4.1.1.1 Zeitabhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Proteintyrosinphosphorylierung

Zunächst soll gezeigt werden, ob es in Synaptosomen zu einer zeitabhängigen Proteintyrosinphosphorylierung nach BDNF-Stimulation kommt.

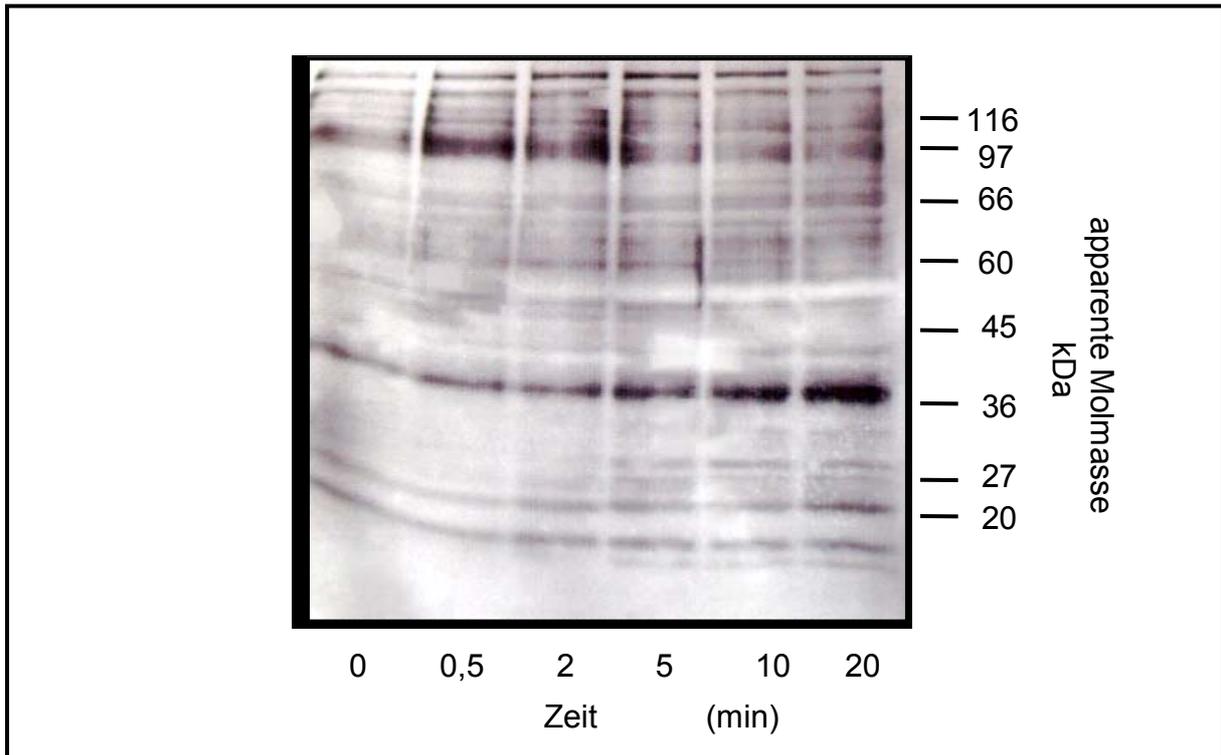


Abb. 8: Zeitabhängigkeit der Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten durch BDNF in Rattensynaptosomen. Synaptosomen werden präpariert (siehe Kapitel 3.2.1) und mit 100 ng/ml BDNF für 0, 0,5, 2, 5, 10 und 20 Minuten stimuliert (siehe Kapitel 3.2.2). Anschließend werden die Proteine mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.2.5) aufgetrennt und ein Immuno-(Western)-Blot mit 0,5 µg/ml 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörpern von der Maus als Erst- und einem peroxidasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) (3.2.6) durchgeführt. Am rechten Rand sind die jeweiligen Molmassen der Markerproteine eingetragen. Repräsentative Darstellung von 5 Experimenten.

Bei Stimulation der Synaptosomen mit 100 ng/ml BDNF kommt es zu einer zeitabhängigen Zunahme der Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten (Abb. 8). Analysiert man die Molmassen der im Phosphotyrosinmuster veränderten Proteine, wie dies in Kapitel 3.2.5 beschrieben ist, so sieht man eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung von Proteinen mit der apparenten Molmasse 140-130, 126, 62-61, 38, 25 und 22 kDa an ihren Tyrosinresten.

Maximale Effekte werden bei einer Stimulationsdauer von 20 Minuten erreicht. Eine längere Stimulation führt zu einer Dephosphorylierung dieser Proteine an Tyrosinresten (nicht abgebildet).

4.1.1.2 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Proteintyrosinphosphorylierung

Im Folgenden soll analysiert werden, ob unterschiedliche Konzentrationen des Neurotrophins BDNF auf die Phosphorylierung von Synaptosomenproteinen an Tyrosinresten einen Einfluss haben.

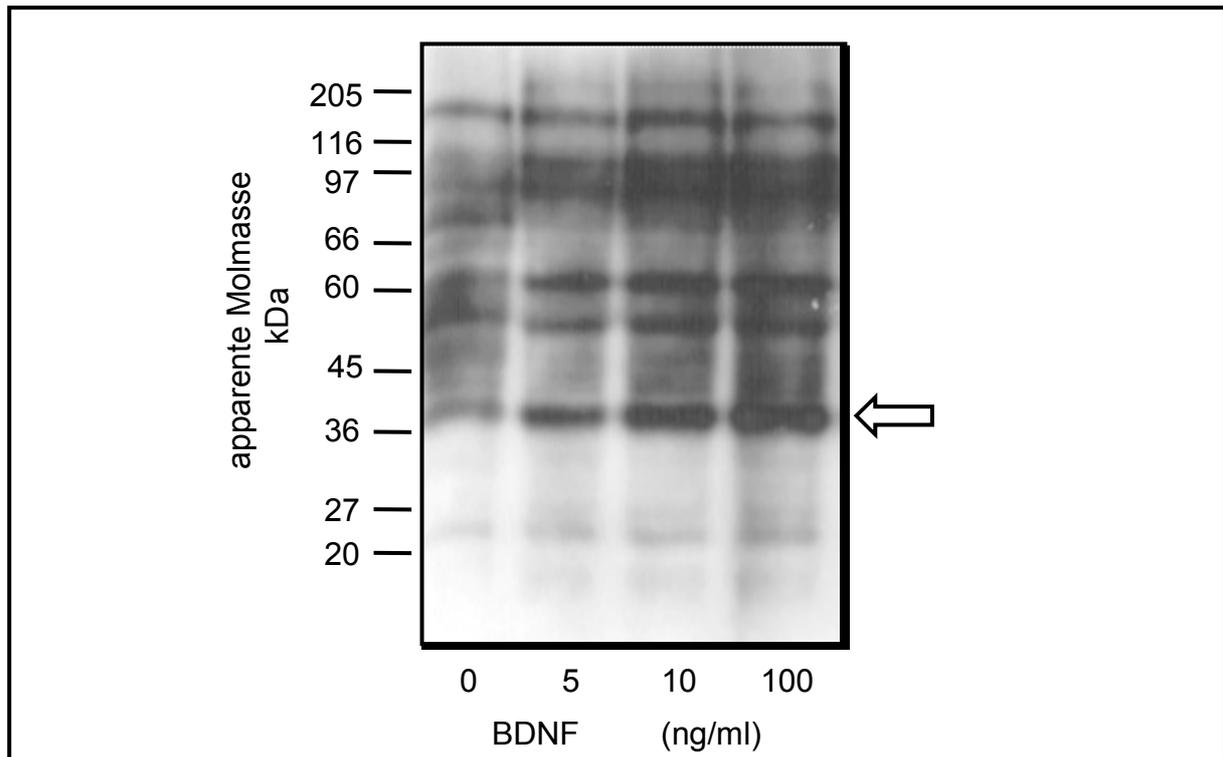


Abb. 9: Konzentrationsabhängigkeit der Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten durch BDNF in Rattensynaptosomen. Synaptosomen werden präpariert (3.2.1) und für 0, 5, 10 und 100 ng/ml BDNF (untere Kastenreihe) 20 Minuten stimuliert (3.2.2). Anschließend werden die Proteine mittels SDS-PAGE (3.2.5) aufgetrennt und ein Immuno-(Western)-Blot mit 0,5 µg/ml 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörpern von der Maus als Erst- und einem peroxydasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper durchgeführt (3.2.6). Am linken Rand sind die jeweiligen Molmassen der Markerproteine eingetragen, der Pfeil markiert die Modifikation der Proteintyrosinphosphorylierung eines Proteins mit der apparenten Molmasse von 38 kDa. Repräsentative Darstellung von 4 Experimenten.

Die Stimulation der Synaptosomen führt zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Phosphorylierung verschiedener Proteine an Tyrosinresten, unter anderem auch ein Protein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa (Abb. 9). Maximale Effekte werden bei einer BDNF-Konzentration von 100 ng/ml erreicht. Eine

Erhöhung der BDNF Konzentration auf 200 ng/ml führt in weiteren Experimenten zu keiner Zunahme der Phosphorylierung von Synaptosomenproteinen an Tyrosinresten verglichen mit den Effekten einer Stimulation mit 100 ng/ml.

4.1.1.3 Analyse des an Tyrosinresten phosphorylierten Proteins P38

Am deutlichsten erscheint die Zunahme der Tyrosinphosphorylierung eines Proteins mit der apparenten Molmasse von 38 kDa.

Ein integrales Membranprotein der kleinen synaptischen Vesikel mit einer molaren Masse von 38 kDa ist Synaptophysin. Es spielt eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Exozytose von Neurotransmittern. Synaptophysin wird in Synaptosomen kalziumabhängig an Serinresten phosphoryliert (Rubenstein et al., 1993). Auch an Tyrosinresten kann Synaptophysin phosphoryliert werden, wie Pang und Mitarbeiter (1988) sowohl in gereinigten synaptischen Vesikeln als auch in Synaptosomen zeigen konnten.

Um ein ähnliches Laufverhalten des Phosphoproteins mit der apparenten Molmasse von 38kDa, welches durch die BDNF-Stimulation zeit- und konzentrationsabhängig an Tyrosinresten phosphoryliert wurde (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.2) und Synaptophysin darzustellen, wird ein Vergleich im Immuno-(Western)-Blot durchgeführt.

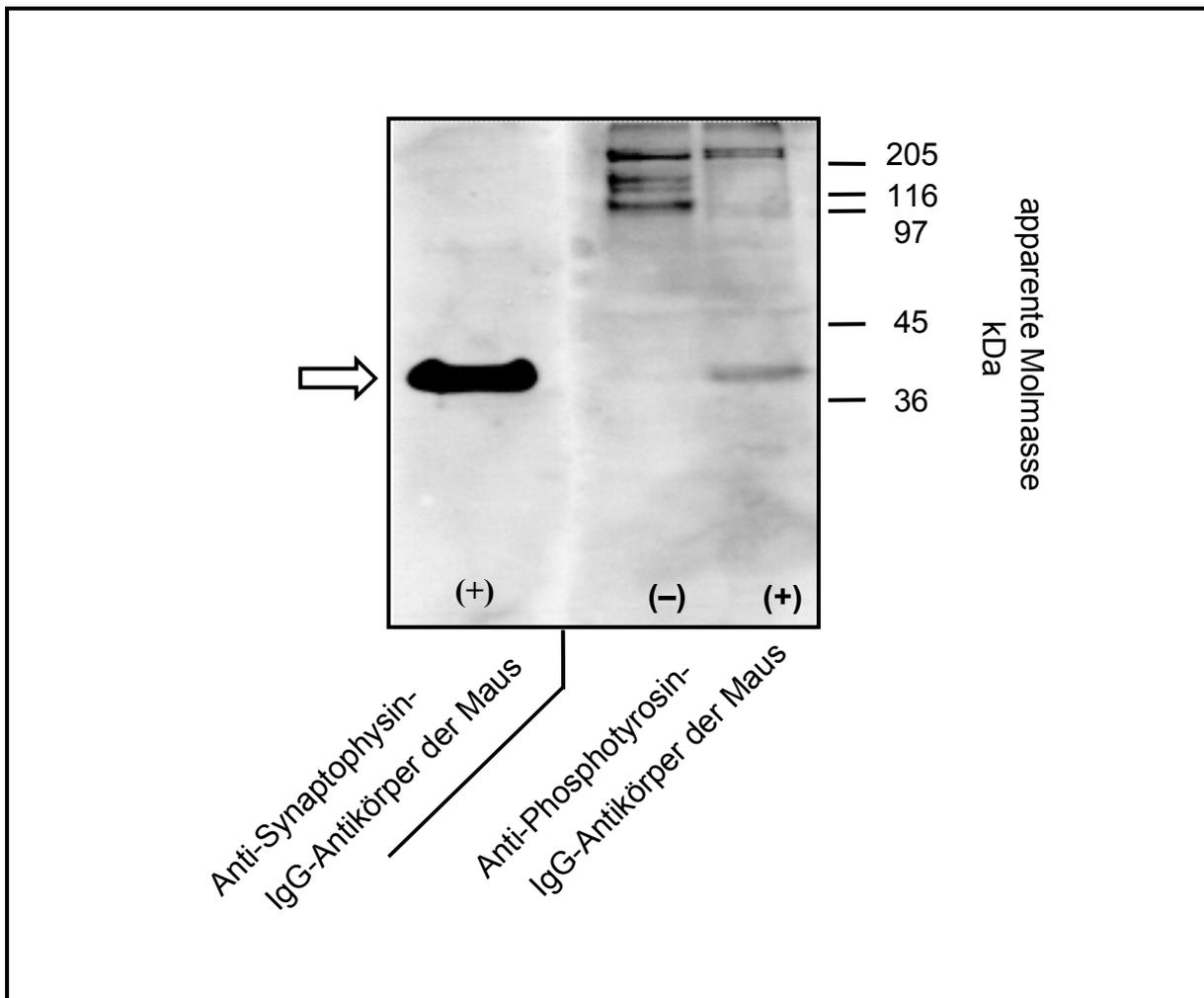


Abb. 10: Laufverhalten von p38 und Synaptophysin im Immuno-(Western)-Blot. Synaptosomen werden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben gewonnen und mit 100 ng/ml BDNF für Null (-) und 20 (+) Minuten wie in Kapitel 3.2.2 stimuliert, mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.2.5) aufgetrennt, ein Immuno-(Western)-Blot (Kapitel 3.2.6) durchgeführt und die Membran vor der Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern zerschnitten. Die rechte Hälfte wird mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörpern von der Maus (Konzentration 0,5 µg/ml) als Erstantikörper inkubiert; die linke Hälfte des Immuno-(Western)-Blots mit dem SY38-Anti-Synaptophysin-IgG-Antikörper von der Maus (Konzentration 0,5 µg/ml) als Erstantikörper inkubiert. Als zweiter Antikörper dient ein peroxydasegekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Konzentration 1:2000). Am rechten Rand sind die jeweiligen Molmassen der Markerproteine aufgetragen. Der Pfeil am linken Rand markiert das Protein mit der apparenten Molmasse von 38kDa. Repräsentative Darstellung von 3 Experimenten.

Man erkennt in Abbildung 10, dass es sich bei dem Protein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa um ein Protein handeln muss, welches ein gleiches Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel besitzt, wie das Protein Synaptophysin. Die Berechnung der apparenten Molmasse von 38 kDa ist korrekt. Ob es sich allerdings

bei dem von uns betrachteten Protein tatsächlich um Synaptophysin handelt, kann mit diesem Experiment nicht hinreichend geklärt werden.

In der Annahme, es könnte sich um das Vesikelprotein Synaptophysin handeln, wird eine Immunpräzipitation (Kapitel 3.2.3) mit dem für Synaptophysin spezifischen SY-38-Antikörper durchgeführt und die Proteine nach SDS-PAGE mittels Immuno-(Western)-Blot analysiert.

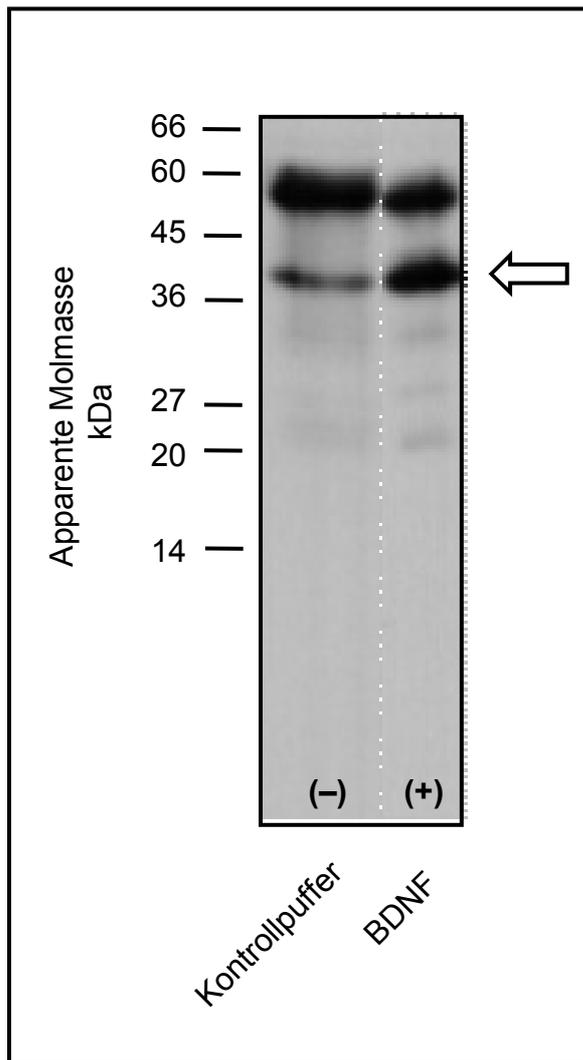


Abb. 11: Auswertung der Phosphorylierung des Proteins Synaptophysin an Tyrosinresten nach Immunpräzipitation. Präparierte Synaptosomen (3.2.1) werden mit Kontrollpuffer (-) bzw. mit 100 ng/ml BDNF (+) für 20 Min. stimuliert und mit dem SY-38-Anti-Synaptophysin-Antikörper von der Maus präzipitiert (Kap. 3.2.3). Anschließend erfolgt eine SDS-PAGE (Kap. 3.2.5) und ein Immuno-(Western)-Blot (3.2.6) mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörper von der Maus (0,5µg/ml) als Erst- und einem peroxydasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper. Links Molmassen der Markerproteine. Der Pfeil markiert das Protein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa. n=3 Experimente.

Dieses Immunpräzipitationsexperiment zeigt, dass das an Tyrosinresten durch BDNF-Stimulation phosphorylierte Protein mit der apparenten Molmasse 38 kDa Synaptophysin sein muss (Abb. 11). Darüber hinaus ist die schwere Kette des verwendeten Antikörpers der Immunfällung im Immuno-(Western)-Blot zu erkennen.

4.1.1.4 Wirkung von K252a auf die Proteintyrosinphosphorylierung nach BDNF-Stimulation

Im Folgenden ist zu klären, ob die zeit- und konzentrationsabhängigen BDNF-induzierten Effekte auf die Phosphorylierung von Synaptosomenproteinen an Tyrosinresten über den p75-Rezeptor oder den Trk-B-Rezeptor vermittelt werden. Dazu dient der spezifische Inhibitor für Trk-Rezeptortyrosinkinasen K252a (siehe Abb. 12).

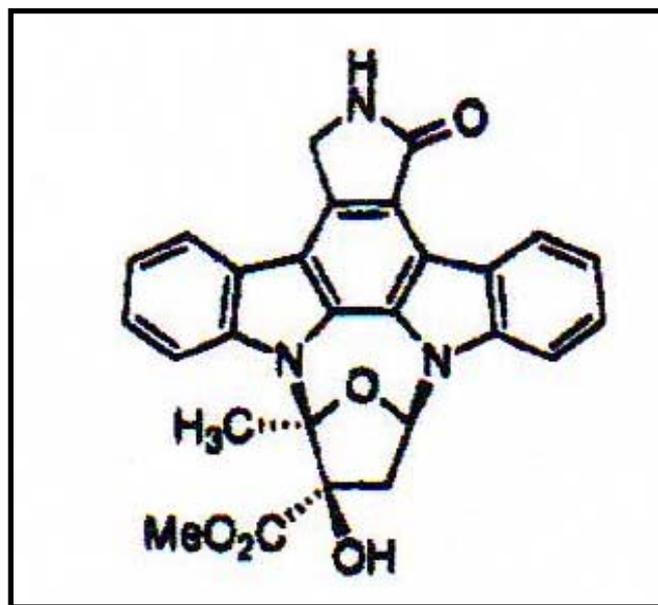


Abb. 12: Strukturformel von K252a, einem spezifischen Trk-Rezeptor-Inhibitor (Wood et al., 1995).

Dieser Rezeptortyrosinkinaseinhibitor ist spezifisch für die Neurotrophinrezeptoren Gp140trkA, Gp145trkB und Gp145trkC. K252a hat keinen Effekt auf die Rezeptortyrosinkinase des PDGF- und des EGF-Rezeptors (Tapley et al., 1992).

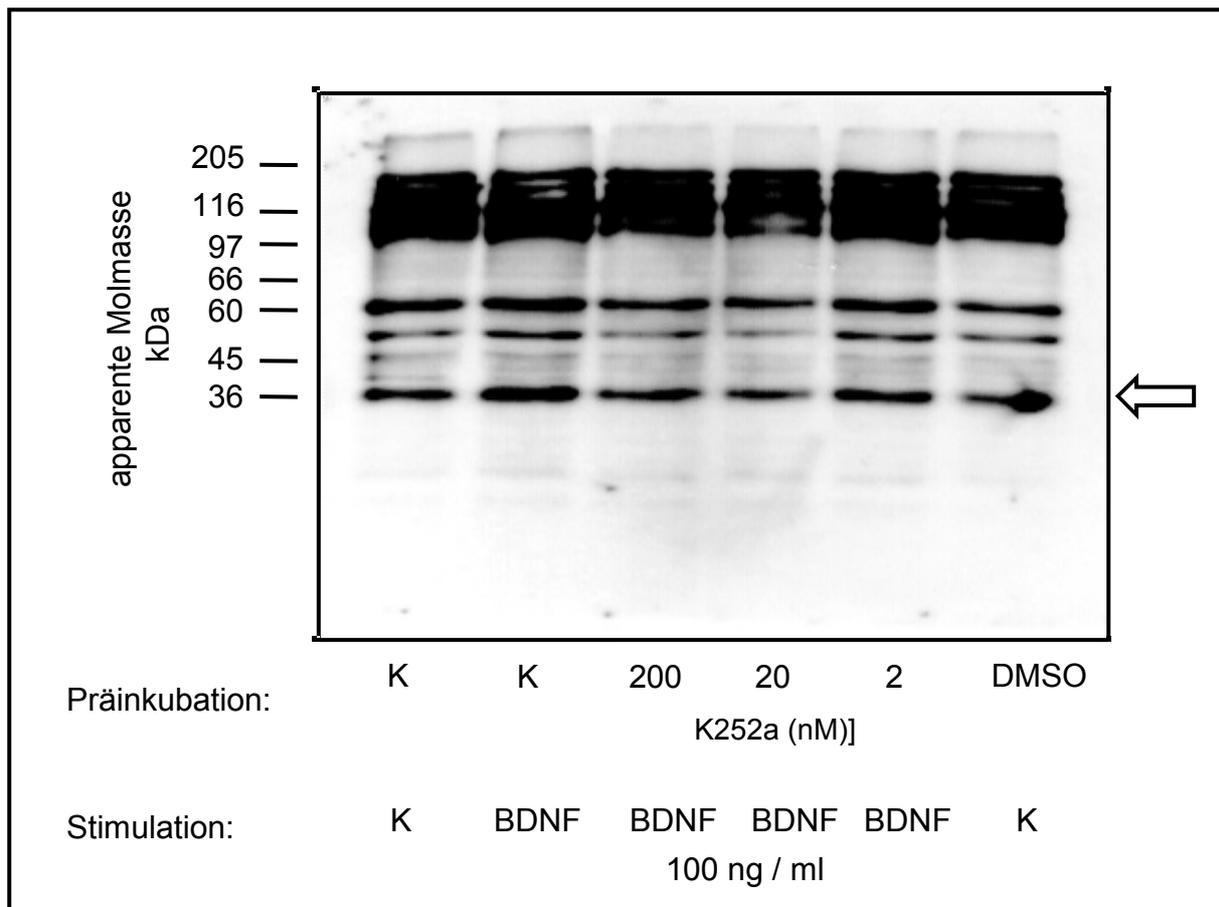


Abb. 13: Der Trk-B-spezifische Inhibitor K252a verhindert die BDNF-induzierte Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten. Synaptosomen werden wie unter 3.2.1 beschrieben präpariert und zunächst mit 5 μ l K252a 200, 20 und 2 nM, bzw. mit Kontrollpuffer (K, obere Reihe) oder 0,5% DMSO 15 Min. vorinkubiert und anschließend mit 5 μ l BDNF (100ng/ml Endkonzentration) bzw. KRH-Puffer (K, untere Reihe) für 20 Minuten stimuliert. Nach SDS-PAGE (3.2.5) erfolgt die weitere Analyse mittels eines Immuno-(Western)-Blot mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörper von der Maus (0,5 μ g/ml) als Erst- und einem peroxydasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper (3.2.6). Am linken Rand sind die jeweiligen Molmassen der Markerproteine eingetragen, der Pfeil am rechten Bildrand zeigt das Protein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa.

Man erkennt in Abbildung 13, dass die Zunahme der Tyrosinphosphorylierung durch den Trk-Inhibitor bereits mit 2 mM K252a fast vollständig aufgehoben werden kann, eine Steigerung dieses Effektes durch höhere Konzentrationen an K252a ist nicht möglich. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste, die durch BDNF vermittelt wird, erfolgt demnach durch die Signaltransduktion mittels des TrkB-Rezeptors. DMSO (0,5%) und auch der KRH-Puffer alleine haben keine Auswirkung auf die BDNF-vermittelte Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten.

4.1.1.5 Wirkung von PP1 auf die Proteintyrosinphosphorylierung nach BDNF-Stimulation

Mitglieder der Src-Familie könnten an der Signalweiterleitung von BDNF über den Trk-Rezeptor ins Zellinnere beteiligt sein. Um dies zu überprüfen, wird der Src-Familien-Inhibitor PP1 verwendet (Hanke et al., 1996; Liu et al., 1999), der die Kinase-Aktivität der Mitglieder der Src-Familie hemmt, indem er als kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindung wirkt (Hanke et al., 1997).

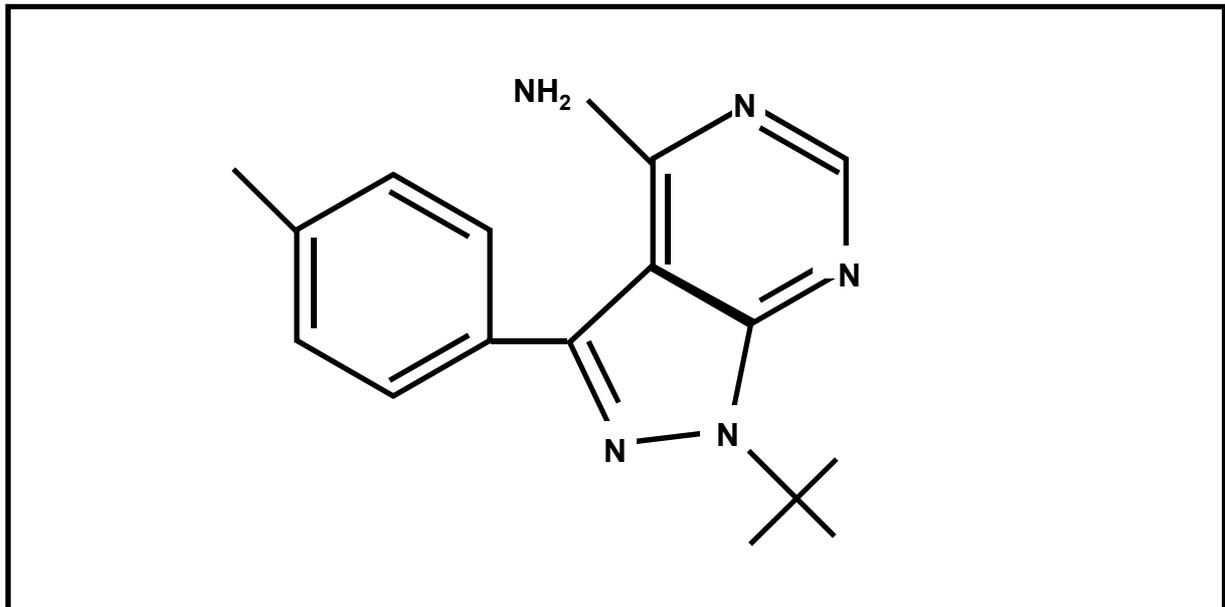


Abb. 14: Strukturformel des Src-Familien-Inhibitors PP1 (1-Tert-Butyl-3-p-Tolyl-1H-Pyrazolo(3,4-d)Pyrimidin-4-ylamin).

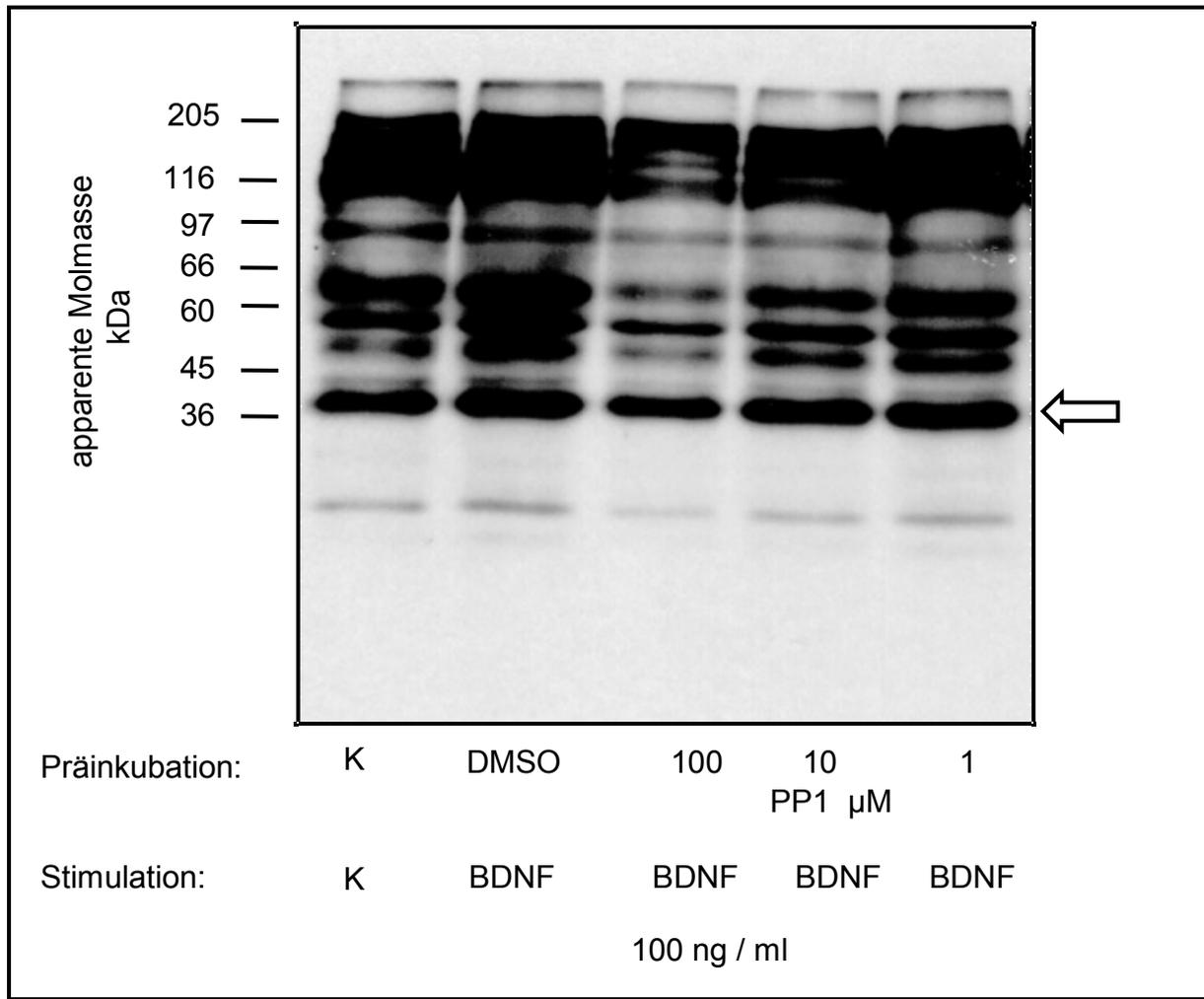


Abb. 15: PP1 verhindert die durch BDNF induzierte Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten in Synaptosomen der Ratte. Synaptosomen werden wie unter 3.2.1 beschrieben präpariert und zunächst mit 5 μl PP1 (100, 10 und 1 μM , obere Kastenreihe), bzw. mit Kontrollpuffer (K, obere Kastenreihe) oder 0,5% DMSO (DMSO, obere Kastenreihe) 15 Minuten vorinkubiert und anschließend mit 5 μl BDNF (100ng/ml Endkonzentration, untere Kastenreihe) bzw. KRH-Puffer (K, untere Kastenreihe) für 20 Minuten stimuliert. Nach SDS-PAGE (Kap. 3.2.5) erfolgt die weitere Analyse mittels Immuno-(Western)-Blot mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörper von der Maus (0,5 $\mu\text{g/ml}$) als Erst- und einem peroxydasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper (Kap. 3.2.6). Am linken Rand sind die jeweiligen apparenten Molmassen der Markerproteine eingetragen. Der Pfeil am rechten Bildrand markiert das Protein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa. Exemplarische Abbildung von 4 Versuchen.

In diesem Versuch (Abb. 15) wird durch PP1 bereits bei einer Konzentration von 1 μM die durch BDNF erzielte Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten vermindert. Bei einer Konzentration von 10 μM werden Phosphorylierungsmuster wie in den nicht mit BDNF behandelten Kontrollen erreicht. Sowohl in den Kontrollen mit 0,5% DMSO als auch mit KRH-Puffer wird keine Inhibition der Phosphorylierung durch die BDNF-Stimulation beobachtet.

Dieser Versuch zeigt eine Beteiligung der Familienmitglieder der Src-Proteine an der Vermittlung der Tyrosinphosphorylierung durch BDNF in gereinigten Nervenendigungen.

4.1.1.6 Vergleich zwischen BDNF-Stimulation und KCl-Depolarisation

Bei der Depolarisation von Synaptosomen werden verschiedene Proteine an ihren Tyrosinresten phosphoryliert und dephosphoryliert. Woodrow und Mitarbeiter konnten bereits 1992 an Synaptosomenpräparaten diesen Zusammenhang darstellen. Mit einem Medium, das 41 mM Kalium enthält, wurden Synaptosomenproteine mit den Molmassen 39, 104, 135 und 160 kDa an Tyrosinresten phosphoryliert.

Im Folgenden soll das Phosphorylierungsmuster der Proteine von Synaptosomen der Ratte an Tyrosinresten bei Depolarisation mit Kalium und durch die Stimulation mit BDNF verglichen werden.

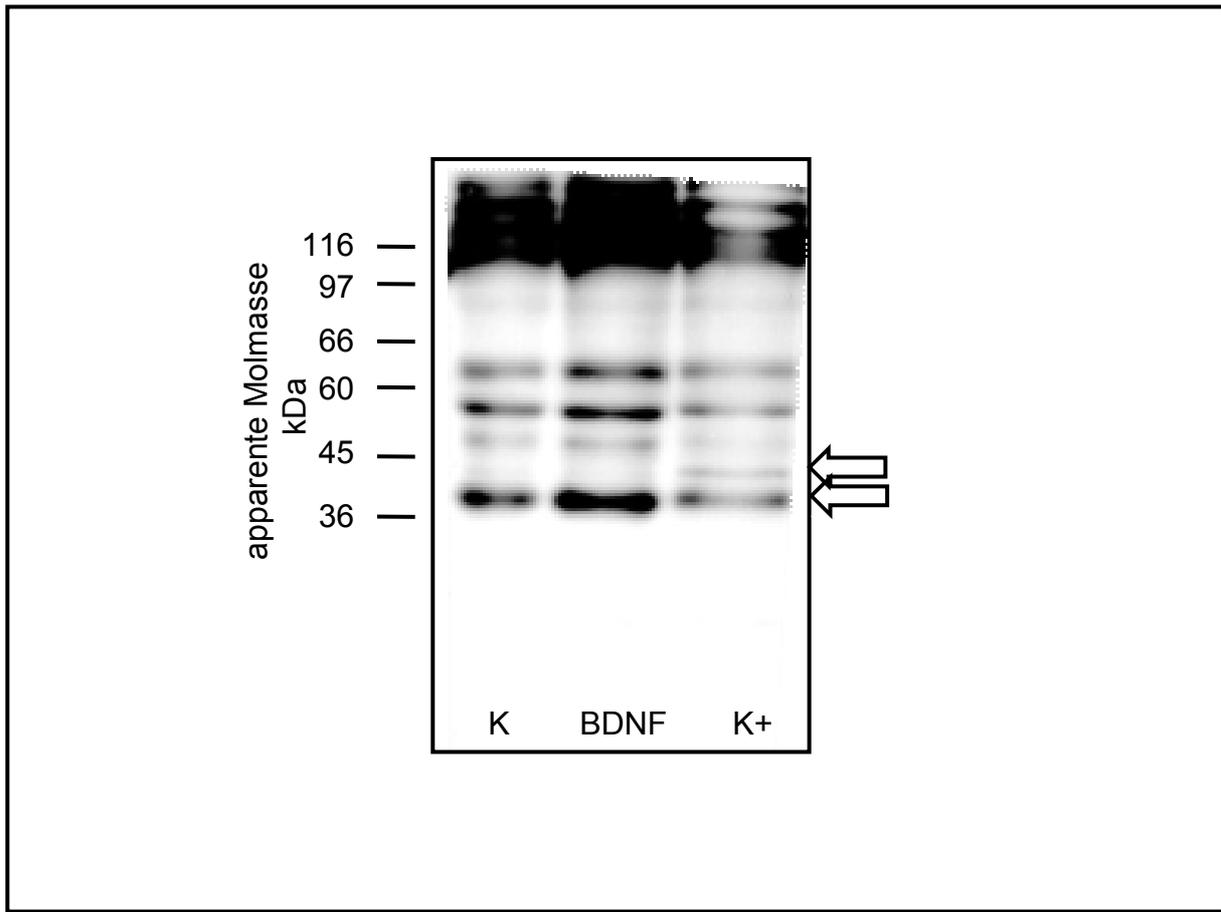


Abb. 16: Unterschiede im Phosphorylierungsmuster der Proteine an Tyrosinresten von KCl-depolarisierten im Vergleich zu BDNF-stimulierten Synaptosomen der Ratte. Synaptosomen werden wie in Kap. 3.2.1 beschrieben gewonnen, mit Pufferlösung als Kontrolle (K) 1 Minute inkubiert, mit BDNF (BDNF) stimuliert (Endkonzentration 100 ng/ml, 20 Minuten) oder mit KCl (K+, Endkonzentration 41mM), 1 Minute depolarisiert wie in Kap. 3.2.2 beschrieben. Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (Kap. 3.2.5). Die weitere Analyse erfolgt mittels eines Immuno-(Western)-Blot mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörper von der Maus (0,5 µg/ml) als Erst- und einem peroxydasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper (Kap. 3.2.6). Am linken Rand sind die jeweiligen Molmassen der Markerproteine eingetragen, die Pfeile rechts markieren die Phosphorylierung der Proteine an Tyrosinresten mit der apparenten Molmasse von 38 und 40-41 kDa.

Man sieht auf Abbildung 16, dass bei der einminütigen Depolarisation von Synaptosomen mit KCl (41 mM Endkonzentration) vorwiegend ein Protein mit einer apparenten Molmasse von 40-41 kDa an Tyrosinresten phosphoryliert wird. Das durch Inkubation mit BDNF tyrosinphosphorylierte Protein mit der apparenten Molmasse 38 kDa wird durch den Vorgang der Depolarisation mit KCl nicht tyrosinphosphoryliert.

4.1.2 Wirkung anderer neurotropher Wachstumsfaktoren auf die Proteintyrosinphosphorylierung

4.1.2.1 Wirkung der Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4

Zu den klassischen Neurotrophinen gehören neben BDNF auch NGF, NT-3 und NT-4. Im Folgenden soll nun geklärt werden, ob es sich bei dem beobachteten Effekt um ein für das Neurotrophin BDNF typisches Muster der Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten handelt, oder ob auch durch NGF, NT-3 und NT-4 ähnliche Muster der Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation von Rattensynaptosomen auftreten.

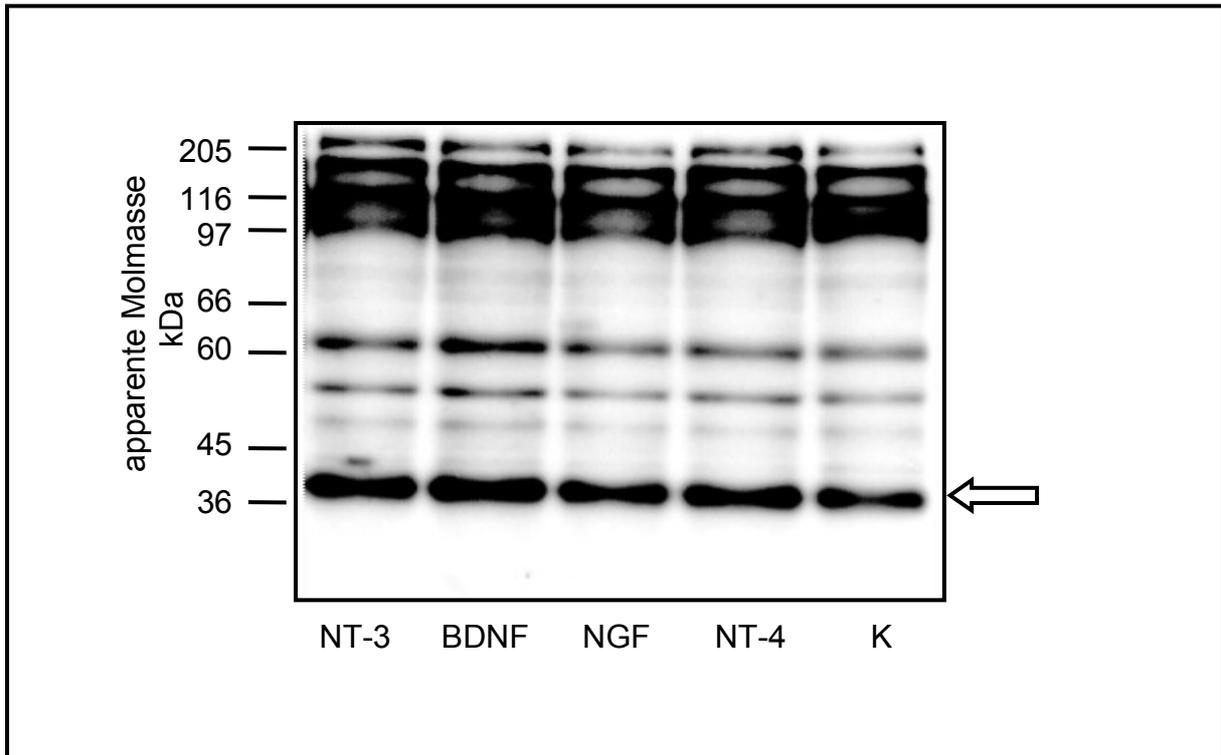


Abb. 17: Die Stimulation mit BDNF, aber auch mit den Neurotrophenen NGF, NT-3 und NT-4 führt zu einer Modifikation der Phosphorylierung von Synaptosomenproteinen an Tyrosinresten. Synaptosomen werden wie unter Kap. 3.2.1 beschrieben präpariert und mit NT-3, BDNF, NGF und NT-4 (Endkonzentration je 100 ng/ml) oder Kontrollpuffer (K = KRH-Puffer) für 20 Minuten stimuliert. Nach SDS-PAGE PAGE (3.2.5) erfolgt die weitere Analyse mittels Immuno-(Western)-Blot mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörper von der Maus (0,5 µg/ml) als Erst- und einem peroxydasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper (Kap. 3.2.6). Am linken Rand sind die jeweiligen Molmassen der Markerproteine eingetragen. Der Pfeil markiert die Proteinbande mit der apparenten Molmasse von 38 kDa (n=5).

Vergleicht man das Muster der Phosphorylierung an Tyrosinresten (Abb. 17) der mit NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 stimulierten Synaptosomen, so erkennt man vor allem einen Unterschied in der Stärke der Phosphorylierung des Proteins mit der apparenten Molmasse von 38 kDa (p38). Die semiquantitative densitometrische Analyse dieser Bande (Pfeil in Abb. 17) ist in Tabelle 3 dargestellt.

Neurotrophin	Vielfaches der Kontrolle mit KRH-Puffer
Neurotrophin 3 (NT-3)	2,3
Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)	2,4
Nerve Growth Factor (NGF)	1,1
Neurotrophin 4 (NT4)	1,6

Tab.3: *Semiquantitative Auswertung der Phosphorylierung des 38 kDa-Proteins an Tyrosinresten mit dem Computerprogramm ImageMaster. Es wurden Mittelwerte aus 5 Immuno-(Western)-Blotanalysen gebildet.*

Die höchste Ausbeute an Proteinphosphorylierung von p38 wird durch BDNF-Stimulation erreicht. Dem folgen in absteigender Reihenfolge NT-3, NT-4 und zuletzt NGF, welches keinen Effekt im Vergleich zu den Kontrollwerten mit KRH-Pufferlösung auf die Phosphorylierung dieses Proteins aufweist.

4.1.2.2 Wirkung von PDGF-AB und PDGF-BB

Wie oben bereits erwähnt, wurden auch für die aus Thrombozyten stammenden Wachstumsfaktoren PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB neurotrophe Wirkungen beschrieben. Diese Faktoren vermitteln ihr Signal nicht über den Neurotrophinrezeptor an die Zielzellen, sondern über spezifische PDGF-Rezeptoren, die ebenfalls Tyrosinkinaseaktivität besitzen. Eine Stimulation von Synaptosomen der Ratte mit PDGF-AB und -BB sollte, da das Gehirn über die nötigen PDGF-Rezeptoren Alpha und Beta verfügt (siehe Kap. 1.3.2), zu einer Änderung der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten führen. Um diese Annahme zu untersuchen, werden Synaptosomen präpariert und mit PDGF-BB und PDGF-AB stimuliert.

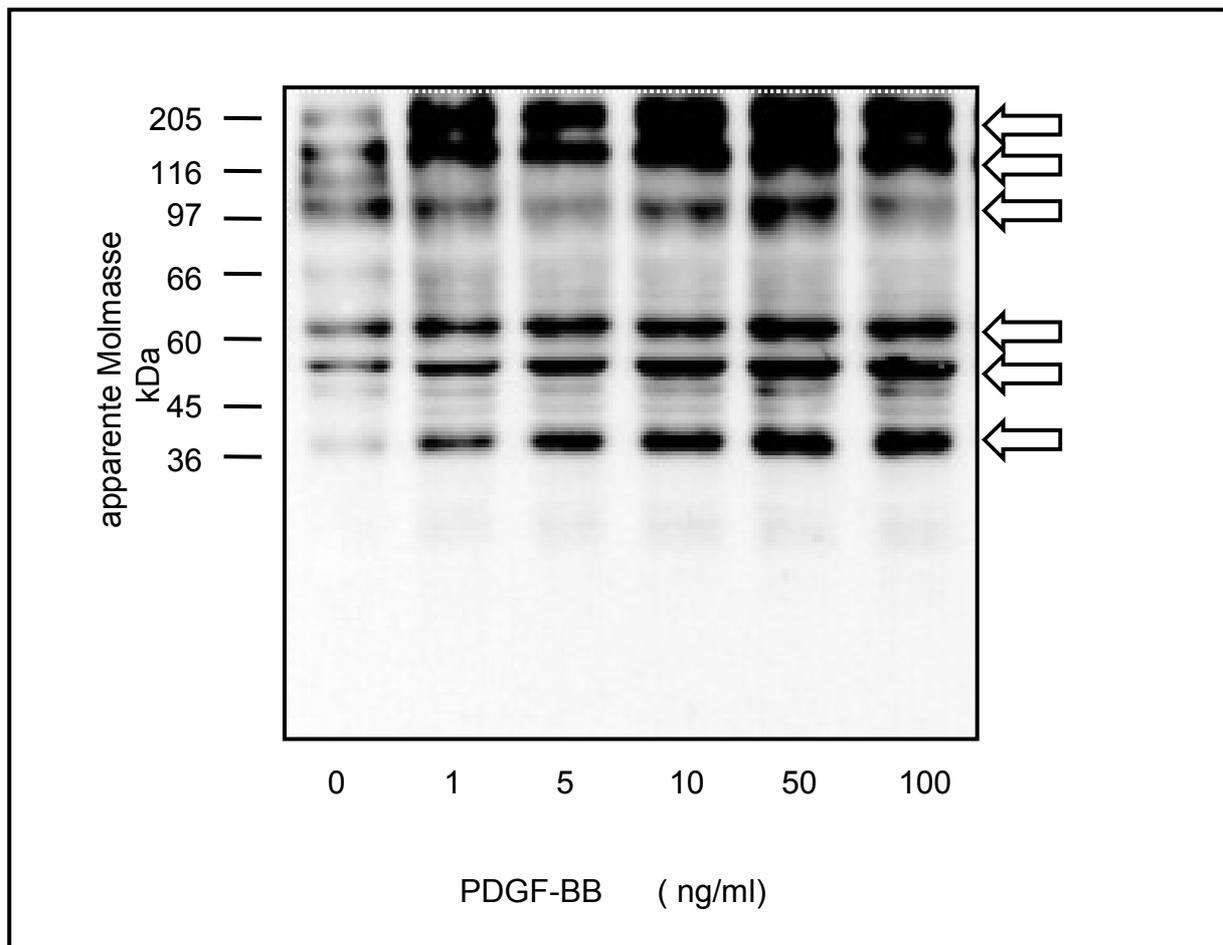


Abb.18 A: Synaptosomen zeigen eine von der PDGF-BB-Konzentration abhängige Zunahme der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten. Synaptosomen werden wie unter Kap. 3.2.1 beschrieben präpariert und mit PDGF-BB in einer Konzentration von 0, 1, 5, 10, 50 und 100 ng/ml für 20 Minuten stimuliert. Nach SDS-PAGE (3.2.5) erfolgt die weitere Analyse mittels Immuno-(Western)-Blot mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörper von der Maus (0,5 µg/ml) als Erst- und einem peroxidasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper (3.2.6). Am linken Rand sind die jeweiligen apparenten Molmassen der Markerproteine eingetragen. Die Pfeile am rechten Rand markieren die Proteine, die an Tyrosinresten phosphoryliert werden (38, 54, 60-62, 100, 120 und 170 kDa). Exemplarische Abbildung von 4 Experimenten.

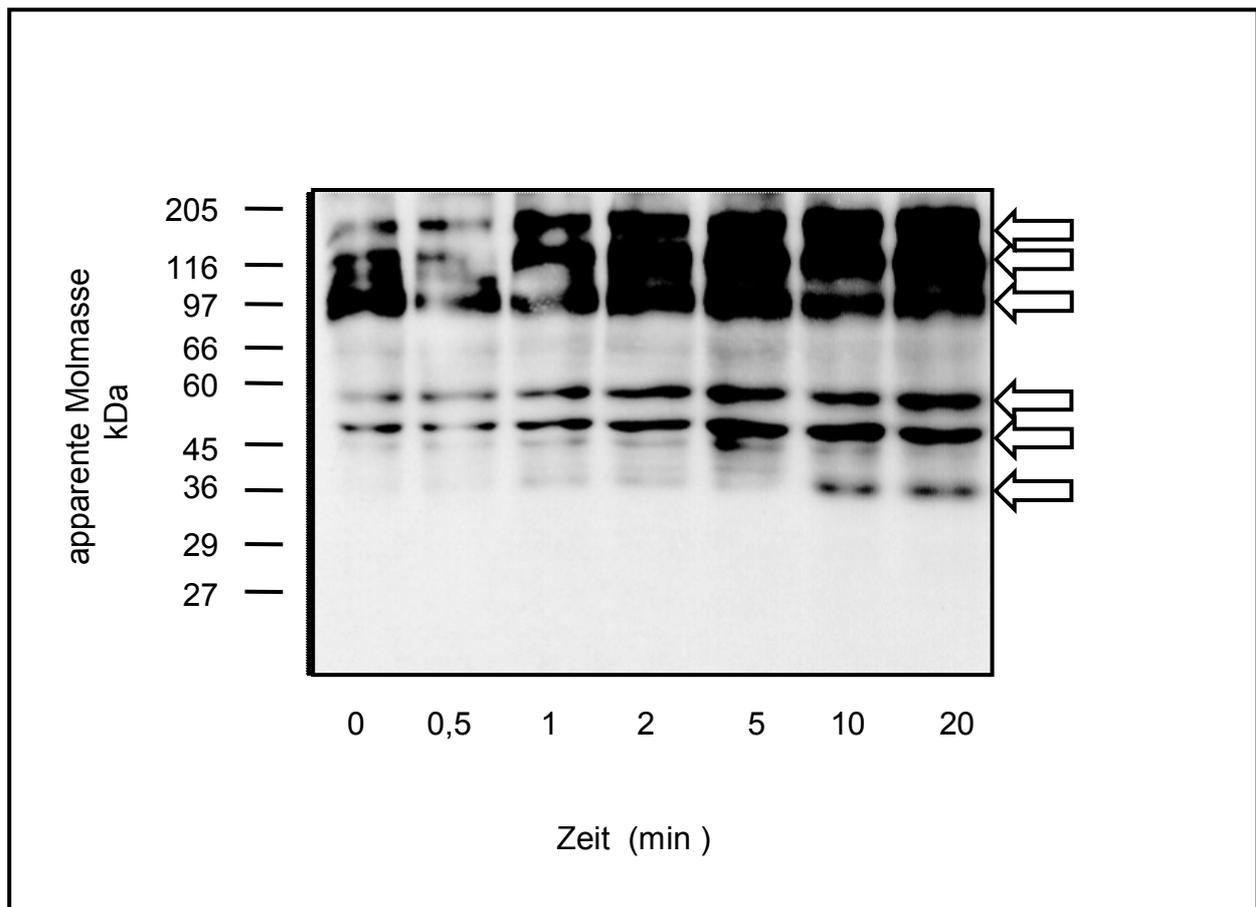


Abb. 18 B: Synaptosomen zeigen eine von der PDGF-BB-Stimulation zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten. Synaptosomen werden wie unter Kap. 3.2.1 beschrieben präpariert und mit PDGF-BB in einer Konzentration von 50 ng/ml für 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20 Minuten stimuliert. Nach SDS-PAGE (Kap. 3.2.5) erfolgt die weitere Analyse mittels Immuno- (Western)-Blot mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörper von der Maus (0,5 µg/ml) als Erst- und einem peroxydasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper (Kap. 3.2.6). Am linken Rand sind die jeweiligen apparenten Molmassen der Markerproteine eingetragen. Am rechten Rand sind die Proteine mit Pfeilen markiert, die an Tyrosinresten zeitabhängig phosphoryliert werden (38, 54, 60-62, 100, 120 und 170 kDa). Exemplarische Abbildung von 4 Experimenten.

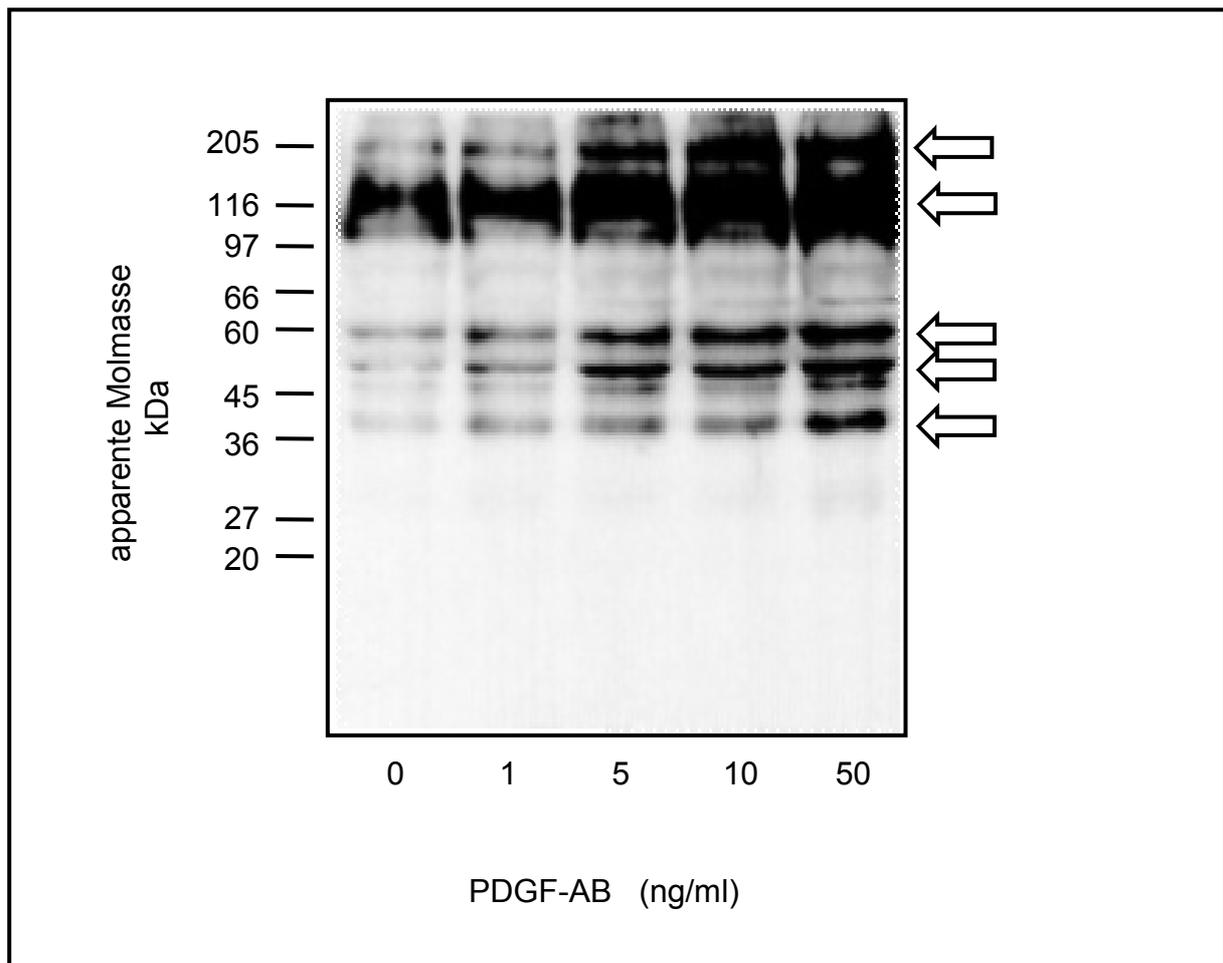


Abb. 19A: Synaptosomen zeigen eine von der PDGF-AB-Konzentration abhängige Zunahme der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten. Synaptosomen werden wie unter 3.2.1 beschrieben präpariert und mit PDGF-AB in einer Konzentration von 0, 1, 5, 10 und 50 ng/ml für 10 Minuten stimuliert. Nach SDS-PAGE (Kap. 3.2.5) erfolgt die weitere Analyse mittels Immuno-(Western)-Blot mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörper von der Maus (0,5 µg/ml) als Erst- und einem peroxydasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper (Kap. 3.2.6). Am linken Rand sind die jeweiligen Molmassen der Markerproteine eingetragen. Die Pfeile zeigen die Proteine, die an Tyrosinresten phosphoryliert werden (apparente Molmasse 38, 50, 60-62, 120 und 180-190 kDa). Exemplarische Abbildung von 4 Experimenten.

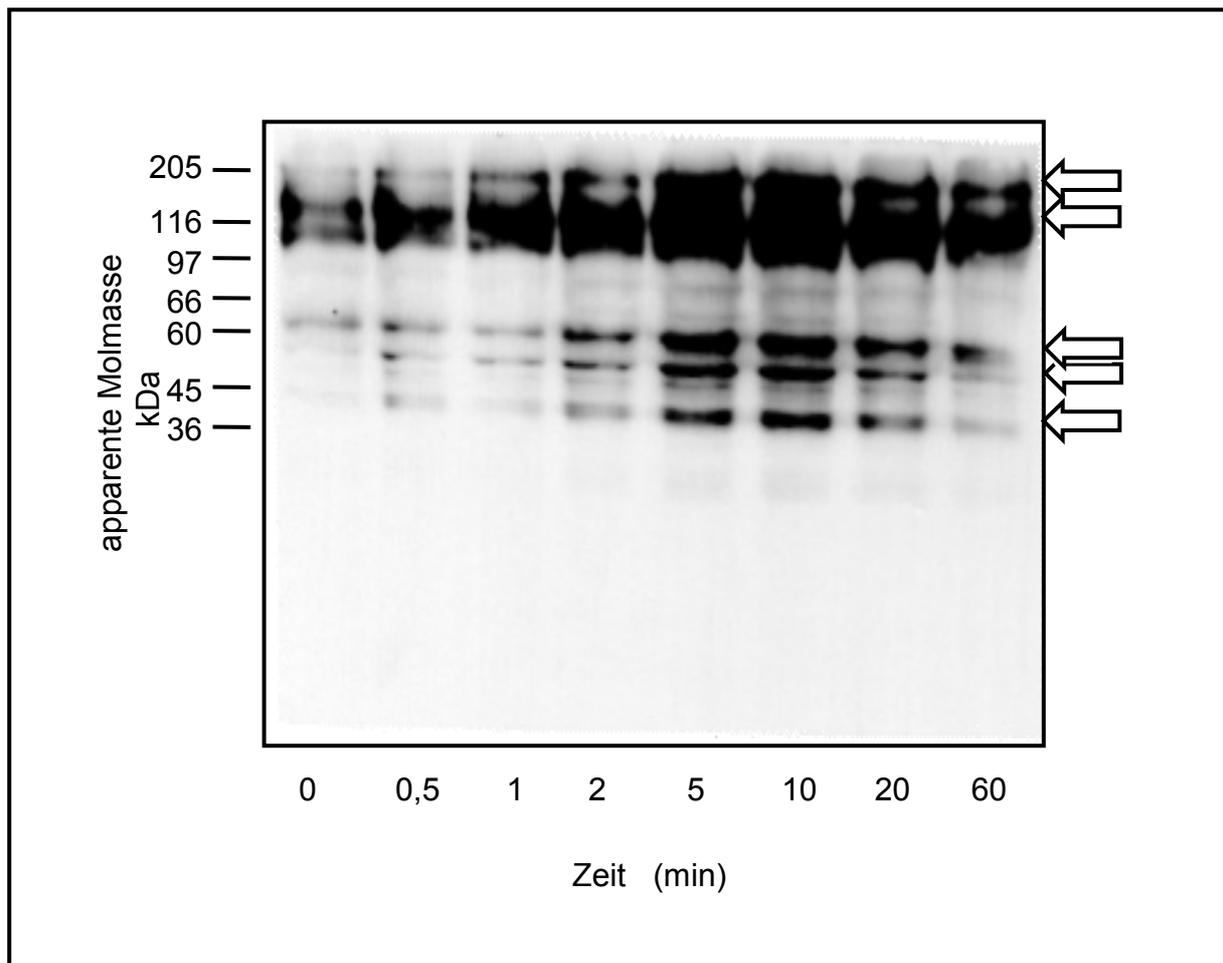


Abb. 19B: Synaptosomen zeigen eine von der PDGF-AB-Stimulation zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten. Synaptosomen werden wie unter Kap. 3.2.1 beschrieben präpariert und mit PDGF-AB in einer Konzentration von 50 ng/ml für 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 und 60 Minuten stimuliert. Nach SDS-PAGE (Kap. 3.2.5) erfolgt die weitere Analyse mittels Immuno- (Western)-Blot mit dem 4G10-Anti-Phosphotyrosin-IgG-Antikörper von der Maus (0,5 µg/ml) als Erst- und einem peroxydasegekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:2000) als Zweitantikörper (Kap. 3.2.6). Am linken Rand sind die Molmassen der Markerproteine eingetragen, die Pfeile rechts zeigen die Proteine, die an Tyrosinresten durch PDGF-AB-Stimulation eine Phosphorylierung erfahren (apparente Molmasse 38, 50, 60-62, 120 und 180-190 kDa). Exemplarische Abbildung von 4 Experimenten.

Auch die Stimulation von Synaptosomen der Ratte mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB und PDGF-AB, die nicht zu den klassischen Neurotrophenen zu rechnen sind, führt zu einer Modifikation der Phosphorylierung der Synaptosomenproteine an Tyrosinresten (Abb. 18A, 18B, 19A und 19B). Neben dem schon aus den BDNF-Stimulationen bekannten Protein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa fällt hier die Tyrosinphosphorylierung eines Proteins mit einer apparenten Molmasse von 60-

62 kDa auf. Es wird sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig an Tyrosinresten phosphoryliert, sowohl durch Stimulation mit PDGF-BB als auch mit PDGF-AB. Außerdem werden Proteine mit der apparenten Molmasse von 170, 130-120, 100, 54 kDa durch PDGF-BB und mit der apparenten Molmasse von 190-180, 120, 50 kDa durch PDGF-AB an ihren Tyrosinresten zeit- und konzentrationsabhängig phosphoryliert.

4.2 Untersuchungen zur depolarisationsinduzierten Glutamatfreisetzung

Es ist bereits länger bekannt, dass die Neurotrophine zu einer Modifikation der Neurotransmitterfreisetzung aus Nervenzellen führen. So konnte bereits 1994 von Knipper et al. durch eine Stimulation von Hippokampussynaptosomen der Ratte mit Neurotrophinen eine Zunahme der depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung gezeigt werden. Durch Pascual et al. (2001) konnte darüber hinaus beschrieben werden, dass BDNF selbst sowohl in kortikalen Nervendingungen als auch in kortikalen Astrozyten zu einer Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat führt.

Es soll nun untersucht werden, ob nach vorausgegangener Stimulation von Synaptosomen mit Neurotrophinen eine repetitive Depolarisation zu einer Modifikation der Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat führt.

4.2.1 Wirkung von BDNF auf die Glutamatfreisetzung

4.2.2 Zeitabhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Glutamatfreisetzung

Es soll überprüft werden, ob die Stimulation von Synaptosomen mit Neurotrophinen bei repetitiver Depolarisation zu einer vermehrten Glutamatfreisetzung führt. Dazu wird, wie in Kap. 3.2.4 beschrieben, nach zuvor erfolgter BDNF-Stimulation die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat nach dreimaliger Depolarisation untersucht.

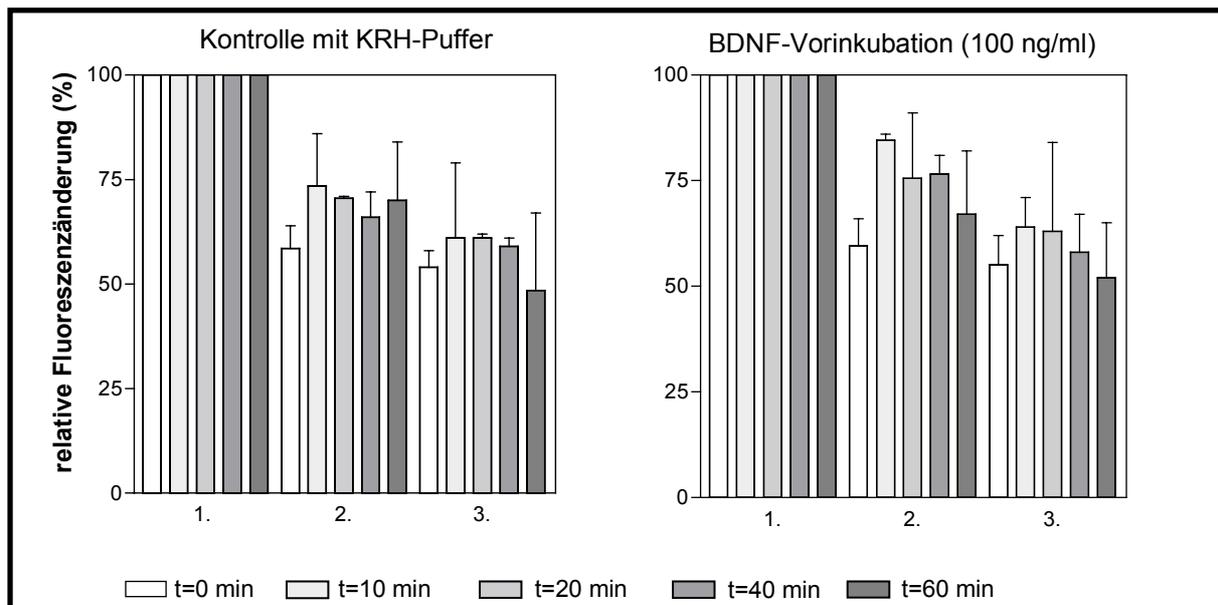


Abb. 20A: Zeitabhängigkeit der depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung nach BDNF-Vorinkubation. Synaptosomen werden präpariert (Kap. 3.2.1) und nach 0, 10, 20 und 60minütiger Inkubation mit KRH-Puffer (Abb. 20A, linker Kasten) bzw. BDNF (100ng/ml) (Abb. 20A, rechter Kasten) dreimal depolarisiert (Kap. 3.2.4.1) (Stimulation 1-3) und die Überstände im Fluorimeter auf den Glutamatgehalt analysiert (Kap. 3.2.4.2, 3.2.4.3). Die Auswertung der Experimente erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism. Es wurden $n=3$ Experimente für 10, 40 und 60 Minuten und $n=10$ Experimente für 0 und 20 Minuten durchgeführt, die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM.

Alleinige BDNF-Inkubation führt ohne Depolarisation nicht zu einer vermehrten Glutamatfreisetzung aus Synaptosomen (Daten sind nicht abgebildet). Führt man allerdings repetitive Depolarisationen wie in Kap. 3.2.2 beschrieben durch, so erhält man nach Vorinkubation der Synaptosomen mit BDNF (100ng/ml) eine Steigerung der depolarisationsinduzierten Glutamatfreisetzung (Abb. 20A). Am deutlichsten ist dies nach einer zwanzigminütigen Vorinkubation mit BDNF. Dabei sind alle drei Depolarisationsschritte verglichen mit der jeweiligen Kontrolle signifikant ($p \leq 0,05$) (Abb. 20B).

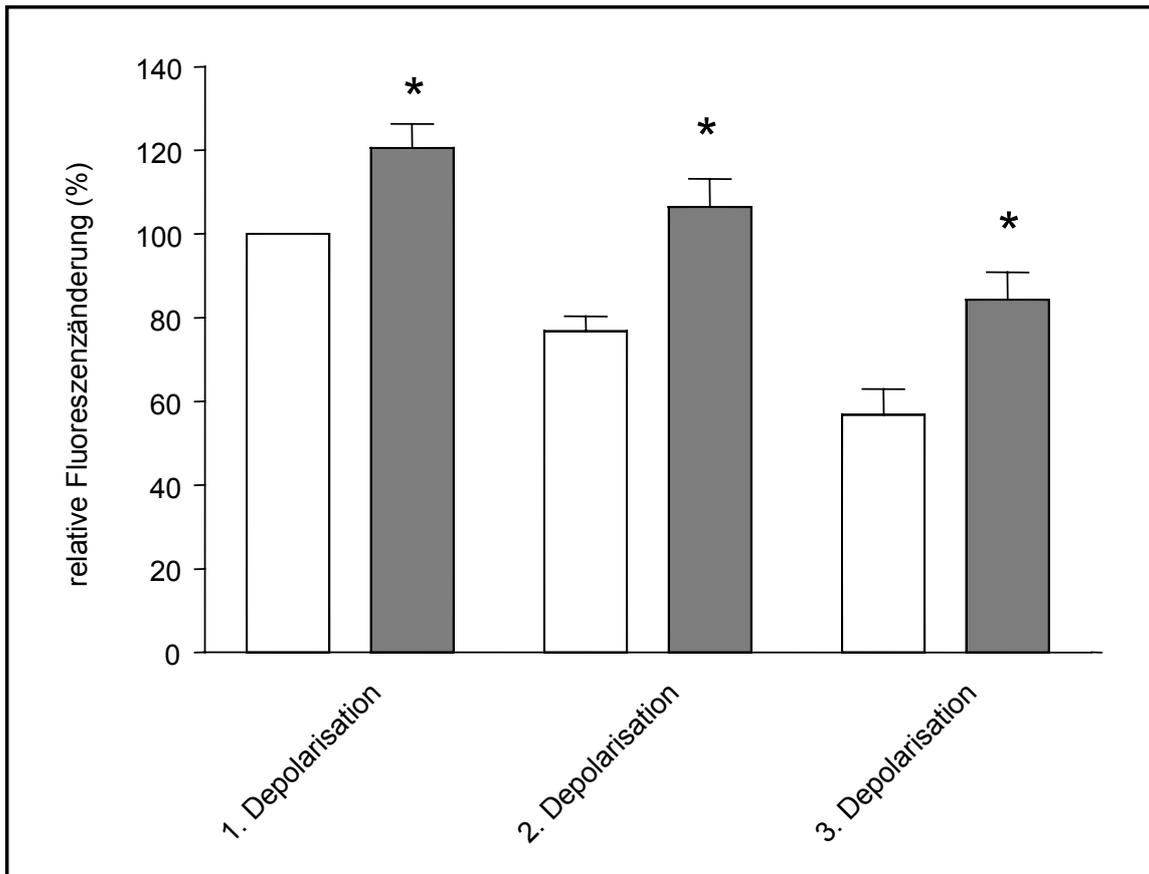


Abb. 20B: Depolarisationsabhängige Glutamatfreisetzung nach zwangigminütiger Stimulation mit 100 ng/ml BDNF. Aus den Daten von Abb. 20A werden die Werte für die Glutamatfreisetzung nach 0 Minuten für die Kontrolle (weißer Balken) und nach 20 minütiger BDNF-Stimulation (100 ng/ml) (dunkelgrauer Balken) gegenübergestellt. Die Anzahl der Experimente beträgt $n=10$; die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM. * $p \leq 0,05$.

Die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung sinkt nach länger andauernder BDNF-Vorinkubation von 40 und 60 Minuten wieder ab und unterscheidet sich nicht mehr signifikant von den Kontrollwerten (siehe Abb. 20A).

4.2.3 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Glutamatfreisetzung

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass BDNF-Vorinkubation zeitabhängig von der jeweiligen Stimulation mit BDNF zu einer Steigerung der durch repetitive Depolarisation induzierten Glutamatfreisetzung führt. Im Folgenden soll nun geklärt werden, ob die Konzentration von BDNF einen Einfluss auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung hat.

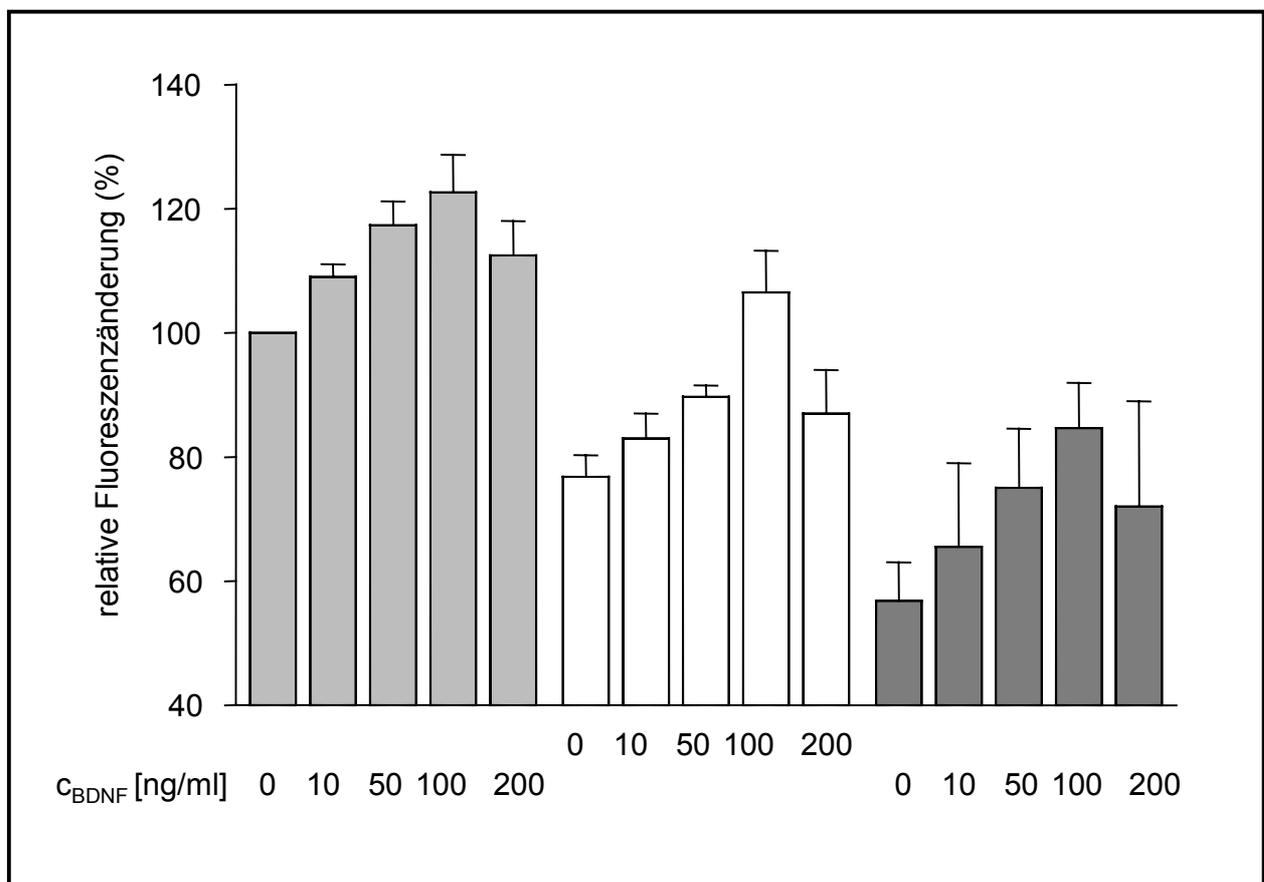


Abb. 21: Konzentrationsabhängigkeit der depolarisationsabhängigen Glutamat-Freisetzung nach zwanzigminütiger BDNF-Stimulation. Synaptosomen werden präpariert (3.2.1) und 20 Minuten mit 0, 10, 50, 100 und 200 ng/ml BDNF stimuliert, dreimalig repetitiv depolarisiert (3.2.4.1) und die Überstände im Fluorimeter auf den Glutamatgehalt analysiert (3.2.4.2, 3.2.4.3). Die hellgrauen Balken zeigen die erste, die weißen Balken die zweite und die dunkelgrauen Balken die dritte Depolarisation. Die Auswertung der Experimente erfolgt mit dem Computerprogramm GraphPad Prism. $n=10$ bei $c_{\text{BDNF}} = 0$ ng/ml, $n=2$ bei $c_{\text{BDNF}} 10$ ng/ml, $n=3$ bei $c_{\text{BDNF}} 50$ ng/ml, $n=10$ bei $c_{\text{BDNF}} 100$ ng/ml, $n=2$ bei $c_{\text{BDNF}} 200$ ng/ml. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM.

Neben der Dauer der BDNF-Stimulation (Abb. 20A) ist der beobachtete Effekt auch von der BDNF-Konzentration abhängig (Abb. 21). Die optimale Konzentration für die depolarisationsabhängige Glutamatfreisetzung nach vorausgegangener Stimulation der Synaptosomen mit BDNF beträgt 100 ng/ml (Abb. 21). Niedrigere Konzentrationen, hier 10 ng/ml und 50 ng/ml, erhöhen die Glutamatfreisetzung weniger stark. Erhöht man die BDNF-Konzentration auf 200 ng/ml, so kommt es zu keiner weiteren Steigerung der depolarisationsinduzierten Glutamatfreisetzung. Als optimale Vorinkubationsbedingungen stellen sich eine BDNF-Konzentration von 100 ng/ml und eine Stimulationsdauer von 20 Minuten dar.

Führt man mehr als drei aufeinanderfolgende Depolarisationen durch, kommt es wieder zu einer Angleichung der Glutamatfreisetzung an die Kontrollwerte (Daten nicht dargestellt). Zudem ist der Versuch, mehr als vier repetitive Depolarisationen während eines Experimentes durchzuführen, durch die kurze Überlebenszeit der Synaptosomen bei 37°C limitiert.

4.2.4 Einfluss von K252a und PP1 auf die Wirkung von BDNF auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung

Der Trk-Inhibitor K252a und der Src-Familien-Inhibitor PP1 führen, wie in Kapitel 4.1.1.4 und 4.1.1.5 gezeigt werden konnte, zu einer Hemmung der Proteintyrosinphosphorylierung nach BDNF-Stimulation. Es soll nun gezeigt werden, ob die durch Stimulation mit 100 ng/ml BDNF für 20 Minuten induzierte Steigerung der depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung durch Vorinkubation mit K252a bzw. PP1 gehemmt wird.

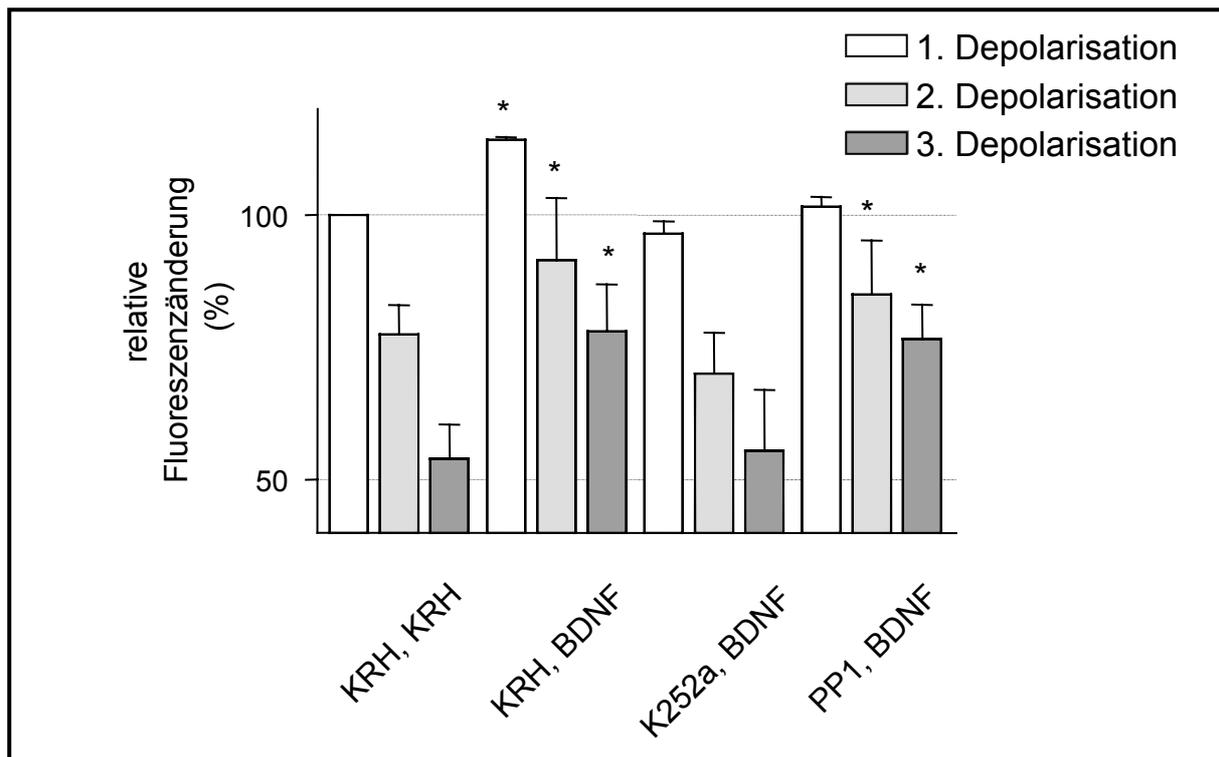


Abb. 22: Wirkung von K252a und PP1 auf die durch BDNF-Stimulation erreichte depolarisationsabhängige Steigerung der Glutamatfreisetzung aus Rattensynaptosomen. Synaptosomen werden präpariert (Kap. 3.2.1) und 15 Minuten mit PP1 (100 μ M) bzw. mit K252a (200 nM) vorinkubiert, 20 Minuten mit 100 ng/ml BDNF stimuliert, wie in Kap. 3.2.4 beschrieben. Es folgt eine dreimalige Depolarisation. Die Überstände werden im Fluorimeter auf den Glutamatgehalt analysiert (Kap. 3.2.4.2 und 3.2.4.3) (weißer Balken = 1. Depolarisation, grauer Balken = 2. Depolarisation, dunkelgrauer Balken = 3. Depolarisation). Die Auswertung der Experimente erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism. Die Anzahl der Experimente beträgt $n=3$. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM. * $p \leq 0,05$.

Die durch BDNF verstärkte Glutamatfreisetzung wird durch Präinkubation mit KRH-Puffer und 0,5% DMSO nicht beeinflusst (Daten nicht abgebildet).

Sowohl durch Vorinkubation der Synaptosomen mit K252a (200 nM) als auch mit PP1 (100 μ M) lassen sich die durch BDNF-Stimulation erreichten Effekte für die erste Depolarisation vollständig inhibieren (Abb. 22, weiße Balken im Diagramm). PP1 zeigt allerdings in den beiden anschließend durchgeführten Depolarisationen keine inhibierende Wirkung auf die Glutamatfreisetzung mehr. K252a hingegen weist auch in der zweiten Depolarisation noch einen inhibitorischen Effekt auf.

Die beobachteten Effekte durch PP1 und K252a sind als substanzspezifisch anzusehen und, wie in weiteren Experimenten gezeigt werden konnte, keine Resultate der Inkubationsdauer oder des Lösemittels (diese Daten sind nicht abgebildet).

4.2.5 Wirkung anderer neurotropher Wachstumsfaktoren auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung

4.2.5.1 Wirkung der Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4

Es soll im Folgenden dargestellt werden, dass neben BDNF auch die Stimulation von Synaptosomen der Ratte durch die Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4 zu einer Zunahme der depolarisationsinduzierten Glutamatfreisetzung bei repetitiver Depolarisation führen.

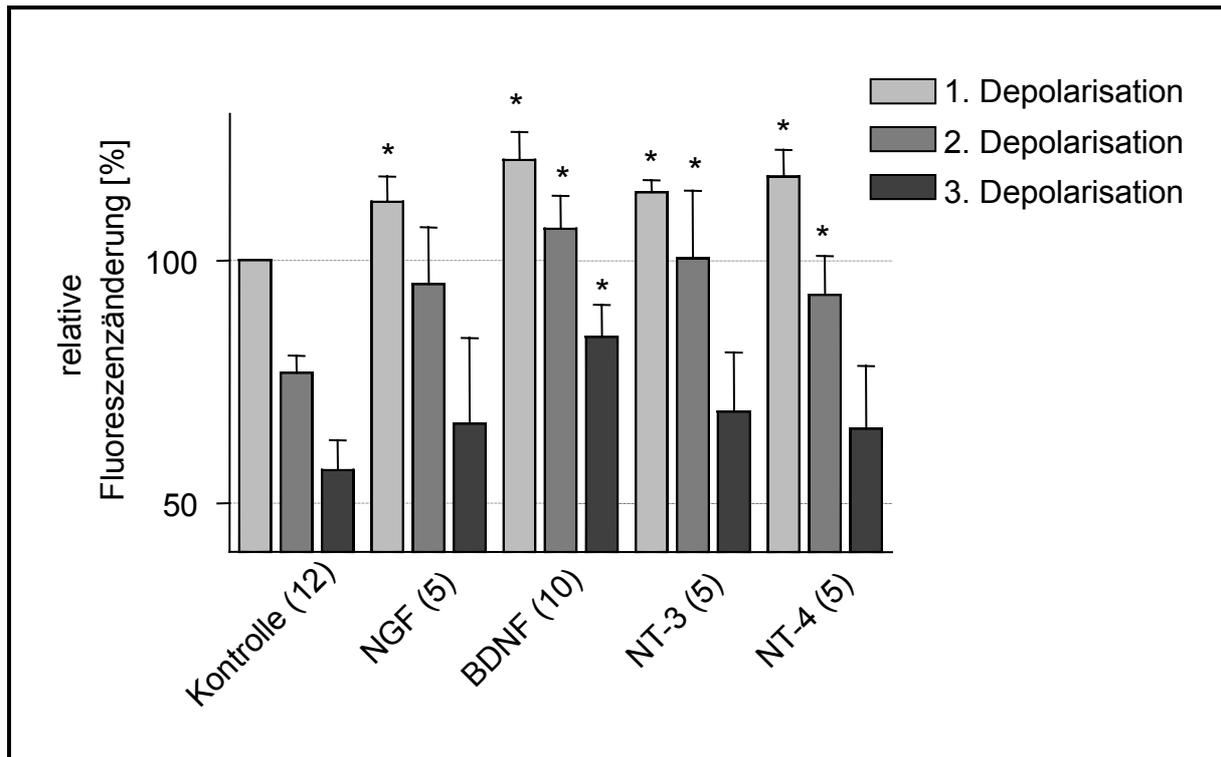


Abb. 23: Stimulation von Synaptosomen mit NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 führt zu einer Zunahme der depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung. Synaptosomen werden präpariert (3.2.1) und 20 Minuten mit 100 ng/ml NGF, 100 ng/ml BDNF, 100 ng/ml NT-3 und 100 ng/ml NT-4 stimuliert. Es folgt eine dreimalige repetitive Depolarisation (3.2.4.1). Die Überstände werden im Fluorimeter auf ihren Glutamatgehalt analysiert (3.2.4.2, 3.2.4.3). Die Auswertung der Experimente erfolgte mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism. Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM. * $p \leq 0,05$ (siehe auch Tab. 5).

Nicht nur BDNF (Kap. 4.2.1.1, 4.2.1.2), sondern auch die Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4 führen nach zwanzigminütiger Stimulation von Synaptosomen zu einer Erhöhung der depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung (Abb. 23). Um zu ermitteln, ob die unter Abbildung 23 gezeigten Werte signifikant sind, wird ein ungepaarter t-Test durchgeführt.

	1. Dep. (P value)	2. Dep. (P value)	3. Dep. (P value)
NGF	0.0019 *	0.0584	0.5202
BDNF	0.0008 *	0.005 *	0.0063 *
NT-3	< 0.0001 *	0.034 *	0.3454
NT-4	0.0001 *	0.0464 *	0.5034

Tab. 5: Ermittlung der Signifikanz der Unterschiede depolarisationsabhängiger Glutamatfreisetzung nach zwanzigminütiger Inkubation mit NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 (100 ng/ml) gegenüber dem Kontrollversuch (KRH-Puffer). Es werden die Daten aus Abb. 23 verwendet und analysiert. Die Berechnung erfolgt mittels ungepaartem t-Test der ermittelten Daten mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism. Die Anzahl der Experimente beträgt: Kontrolle mit KRH-Puffer n=12, NGF n=5, BDNF n=10, NT-3 n=5, NT-4 n=5. (*p≤0,05).

Wie Tabelle 5 zeigt, ist bei NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 unter den oben genannten Bedingungen in dem ersten Depolarisationsschritt ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) gegenüber der Kontrolle nachzuweisen. Während jeder weiteren Depolarisation zeigt NGF keine, die anderen Neurotrophine in der zweiten Depolarisation weiterhin signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollwerte. Nur BDNF weist während aller drei aufeinanderfolgenden Depolarisationen signifikante Unterschiede der depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzungen verglichen mit der Kontrolle auf.

4.2.5.2 Wirkung von PDGF-AB und PDGF-BB

PDGF-AB und PDGF-BB zählen, wie bereits beschrieben, zu den neurotrophen Proteinen. Sie führen, wie in Kapitel 4.1.2.2 gezeigt, zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von Synaptosomenproteinen an Tyrosinresten. Ob sie darüber hinaus auch zu einer Steigerung der depolarisationsinduzierten Glutamatfreisetzung führen, soll im Folgenden untersucht werden.

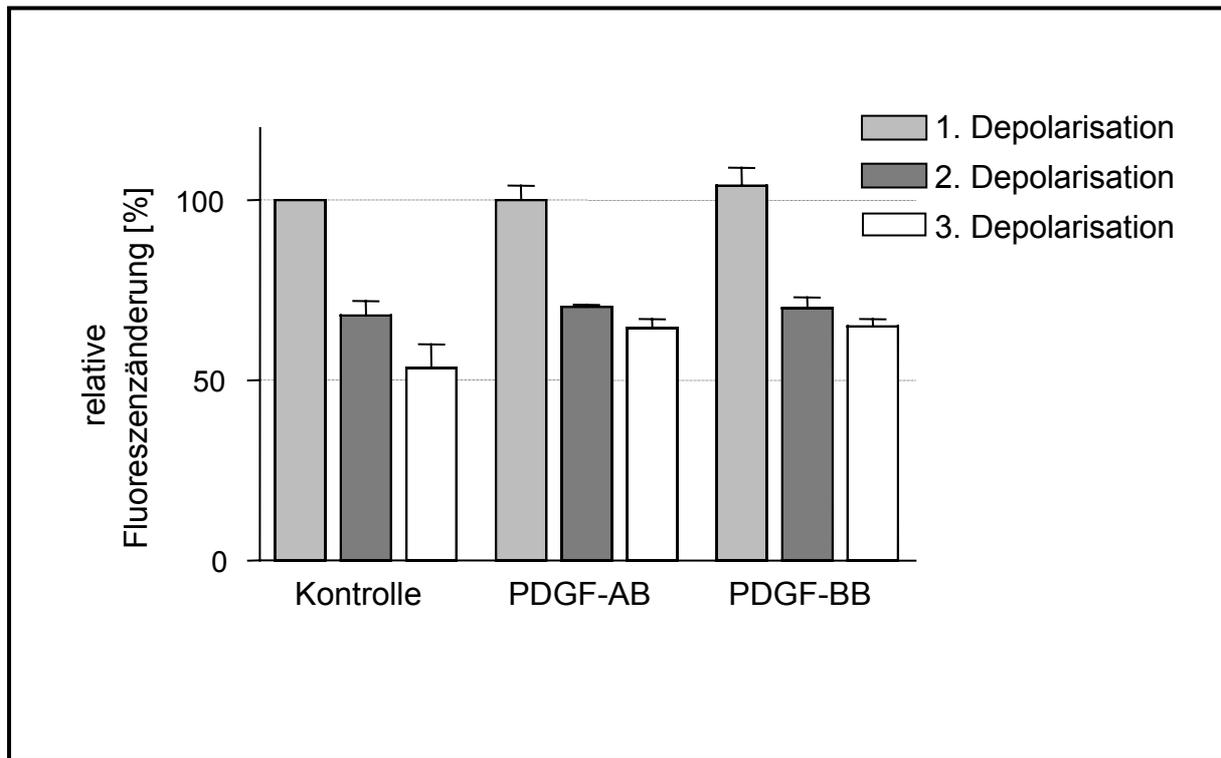


Abb. 24: Stimulation mit PDGF-AB (10 ng/ml) und PDGF-BB (100 ng/ml) für 10 Minuten haben keinen Einfluss auf die durch repetitive Depolarisation induzierte Glutamatfreisetzung aus Synaptosomen. Synaptosomen werden präpariert (3.2.1) und 10 Minuten mit 10 ng/ml PDGF-AB bzw. 10 Minuten mit 100 ng/ml PDGF-BB stimuliert, wie unter 3.2.4 beschrieben, dreimalig depolarisiert und die Überstände im Fluorimeter auf den Glutamatgehalt analysiert (3.2.4.2, 3.2.4.3). Die Auswertung der Experimente erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM. N=2. * $p \leq 0,05$.

Eine Wirkung auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung, wie sie durch Stimulation von Rattensynaptosomen mit NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 gezeigt werden konnte (Abb. 23, Tab. 5), tritt bei zwanzigminütiger Stimulation mit PDGF-AB (10 ng/ml) und PDGF-BB (100 ng/ml) nicht auf (Abb. 24). Ein Effekt auf die depolarisationsabhängige Glutamatfreisetzung zeigt sich nicht.

5 Diskussion

Bei der Analyse der Wirkungen von Wachstumsfaktoren gilt das Hauptaugenmerk längst nicht mehr allein dem durch diese induzierten Wachstum und der Differenzierung. Es rücken immer neue Effekte wie Apoptose, neuronale Plastizität, Neurotransmitterfreisetzung und Krebsentstehung ins wissenschaftliche Interesse.

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei der vielen Wirkungen von NGF, BDNF, NT-3, NT-4, PDGF-AB und PDGF-BB dargestellt werden. Zum einen deren Effekte auf die Phosphorylierung von Synaptosomenproteinen an Tyrosinresten, zum anderen deren Wirkung auf die durch repetitive Depolarisation induzierte Glutamatfreisetzung.

5.1 Untersuchungen zur Proteintyrosinphosphorylierung

Neuronen werden durch eine Vielzahl neuronaler Wachstumsfaktoren stimuliert. Dazu gehören die klassischen Neurotrophine NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 (4/5), NT-6 und NT-7 sowie neurotroph wirkende Proteine und Hormone wie GDNF, Neurturin, Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Persephin, Cardiotrophin-1 und PDGF (Milbrandt et al., 1998).

Neurotrophe Faktoren werden traditionell als sekretorische Proteine gesehen (Abb. 25), die das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Nervenzellen steuern. Dies geschieht nicht nur während der Embryogenese (ElShamy und Ernfers 1997; Baig und Khan, 1996), sondern auch im ausdifferenzierten Nervensystem. Auch in anderen Geweben des ausgewachsenen Säugertiers wirken neurotrophe Wachstumsfaktoren über spezifische Rezeptoren auf Zellen ein (Bramham et al., 1996). So konnte gezeigt werden, dass BDNF als endothelialer Zellüberlebensfaktor für die Stabilisierung der intramyokardialen Gefäße benötigt wird (Donovan et al., 2000). Die Tatsache, dass neurotrophe Wachstumsfaktoren durch zerebrale Aktivität vermehrt produziert und sezerniert werden, macht ihre Rolle in aktivitätsabhängigen Prozessen wie der Entwicklung von Synapsen und der synaptischen Plastizität möglich (Lu und Figurov, 1997). Sie wirken mit bei der Entstehung von Lernen und Gedächtnis (Fischer et al., 1994; Torasdotter et al., 1998). Die neurotrophen

Moleküle werden über drei Wege von Zellen sezerniert und so an die Nervenzelle herangebracht (Abb. 25):

1. autokrin
2. parakrin
3. von der Zielzelle sezerniert

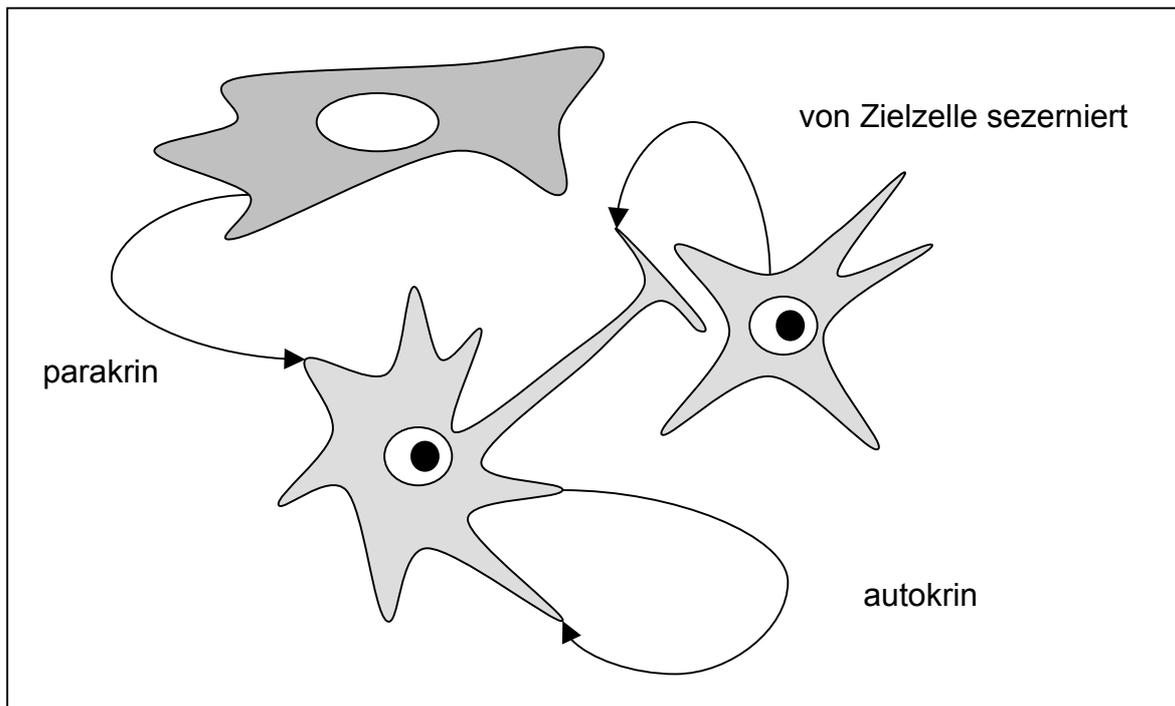


Abb. 25: Neurotrophe Proteine werden autokrin, parakrin oder durch die Zielzelle sezerniert und wirken so auf die Nervenzelle ein (modifiziert nach D.G. Hardie, 1990).

Stimulierung spezifischer Rezeptoren durch Wachstumsfaktoren führt zur Aktivierung der intrazellulär gelegenen Kinasen und damit zu einer Autophosphorylierung und anschließenden Dimerisierung des Rezeptors. So werden neue Bindungsstellen für intrazelluläre Signalmoleküle, unter anderem Sos, Ras, Raf, Src und MAP-Kinase, geschaffen (Anderson et al., 1990; Heerssen und Segal, 2002). Sie interagieren mit den durch Autokatalyse des Rezeptors entstandenen Bindungsstellen und bringen teilweise nach eigener Aktivierung eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, die vorwiegend durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen an Tyrosin-, Threonin- und Serinresten geschieht.

Die intrazelluläre Signalkaskade, die der Bindung eines neurotrophen Faktors an seinen spezifischen membranständigen Rezeptor folgt, ist nur teilweise bekannt. Ein

dichtes Netz intrazellulärer Signalmoleküle ist daran beteiligt. Dazu gehören unter anderem die Proteine Shc, Ras, Raf, PKC, Phospholipase-gamma (Zirrgiebel et al., 1995) Src, Fyn, MAP-Kinase (Rajan und McKay, 1998). Über den Trk-MAP-Kinase-Signalweg wird auch Synapsin I an drei Stellen an Serinresten phosphoryliert. Es handelt sich um die Serinreste Ser62, Ser67 und Ser549 (Jovanovic et al., 1996). In embryonalen kultivierten Rattenhippocampuspyramidenzellen führt die Zugabe von 50 ng/ml NT-3 zu einer Phosphorylierung des Trk-C Rezeptors und verschiedenen anderen intrazellulären Proteinen an Tyrosinresten. Dazu gehören die Phosphoproteine mit der Molmasse von 42, 44, 49, 55 und 95 kDa (Knipper et al., 1994). Das durch BDNF-Inkubation erzielte Proteinphosphorylierungsmuster unterscheidet sich teilweise von dem durch NT-3-Inkubation beobachteten Muster (Knipper et al., 1994). Tucker und Fadool (2002) konnten zeigen, dass durch BDNF-Stimulation bestimmte Kalziumkanäle an ihren Tyrosinresten phosphoryliert werden.

5.1.1 Wirkung von BDNF auf die Proteintyrosinphosphorylierung von Rattensynaptosomen

Neben den von Knipper und Mitarbeitern (1994) beschriebenen Proteinen sind noch viele andere, zum Teil noch nicht näher charakterisierte Proteine in den Prozess der neurotrophinvermittelte Signaltransduktion von Nervenzellen eingebunden. Das zeigt sich auch, wenn man die verschiedenen Proteine betrachtet, die nach zwanzigminütiger Stimulation von Synaptosomen der Ratte mit 100 ng/ml BDNF eine Tyrosinphosphorylierung erfahren. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, gehören dazu v.a. die Proteine mit der apparenten Molmasse von 22, 25, 38, 61-62, 126 und 130-140 kDa. Dieser beobachtete Effekt ist zeit- und konzentrationsabhängig, wobei eine mehr als zwanzigminütige Stimulation mit einer Abnahme der Phosphorylierung einhergeht - die an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine werden nach einer Stunde wieder dephosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Es scheint, als sei die Signalübertragung durch BDNF nach dieser Zeit weitgehend abgeschlossen.

5.1.1.1 Signalvermittlung über den Trk-Rezeptor

Neurotrophine binden neben dem Pan-Neurotrophin-Rezeptor p75 an spezifische Rezeptoren, die Tyrosinkinase-(Trk)-Rezeptoren Trk-A, Trk-B und Trk-C (Abb. 4). K252a ist ein spezifischer Inhibitor dieser Neurotrophinrezeptoren (Tapley et al., 1992), welcher auch im millimolaren Bereich keine Wirkung auf andere Proteintyrosinkinasen wie EGF- und PDGF-Rezeptoren sowie auf die Onkogenprodukte von v-src und v-fms hat (Tapley et al., 1992).

Die Wirkung auf die Phosphorylierung von Synaptosomenproteinen, die durch die Stimulation mit 100 ng/ml BDNF für 20 Minuten erreicht wird, kann durch vorherige Inkubation der Rattensynaptosomen mit K252a inhibiert werden (Abb. 13). Bereits eine 20-minütige Präinkubation mit 2nM K252a führt zu einer fast vollständigen Unterdrückung der BDNF-induzierten Proteintyrosinphosphorylierung von Synaptosomenproteinen. Wird die Molarität des Inhibitors auf 20 bzw. 200 nM erhöht, so kommt es zu einer kompletten Supprimierung des BDNF-vermittelten Effektes auf die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten. Möglich ist allerdings, dass die hohen Konzentrationen von K252a zu unspezifischen Effekten führen könnten. So ist die IC50 für K252a als Serin/Threonin-Proteinkinaseinhibitor 10 bis 30 nM, die IC50 als TrkA-Inhibitor 3 nM (Tapley et al., 1992). Nicht auszuschließen erscheint daher, dass K252a in höheren Konzentrationen auch andere Kinasen der Rattensynaptosomen hemmt.

Das BDNF-Signal wählt also für die beobachteten Effekte der Proteintyrosinphosphorylierung vorwiegend den Weg über den hochaffinen Trk-Rezeptor und nur zu einem geringen Teil über den niedrigaffinen p75^{NTR}-Rezeptor. Dieser Rezeptor besitzt keine Autophosphorylierungsmöglichkeit und kann, nach extrazellulärer Ligandenbindung, daher intrazellulären Adaptermolekülen keine neue Bindungsstellen präsentieren. Außerdem ist dieser niedrigaffine Rezeptor nicht selektiv gegenüber den einzelnen Neurotrophinen. Eine bevorzugte Signaltransduktion über die spezifischeren hochaffinen Trk-Rezeptoren kann zu einer feineren Abstimmung der Signaltransduktion und somit der Signalwirkung der einzelnen Neurotrophine führen (Lamballe et al., 1991a). Daher ist es nicht verwunderlich, wenn die vorgelegte Arbeit zeigt, dass die intrazelluläre Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten nach Stimulation mit BDNF vor allem über den hochaffinen Trk-Rezeptor gesteuert wird.

5.1.1.2 Signalvermittlung über Mitglieder der Src-Familie

Viele intrazelluläre Signalwege werden durch die Aktivierung von Src-Proteinen (Abb. 3) vermittelt. Für Src konnte eine direkte enzymatische Aktivierung bei der Thrombinstimulation nachgewiesen werden (Liebenhoff et al., 1993; Liebenhoff et al., 1994). Auch in die Differenzierung von PC12-Zellen, die durch NGF ausgelöst wird, ist Src eingebunden (Wood et al., 1993). In nicht-lymphoiden Zellen bindet Fyn mittels seiner SH2-Domäne an den aktivierten PDGF-Rezeptor. Dies hat eine Phosphorylierung von Fyn an Tyrosinresten und dessen Kinase-Aktivität zur Folge (Hansen et al., 1997). Dass Mitglieder der Src-Familie (siehe dazu auch Kapitel 1.2.2) ebenfalls an der Signaltransduktion der Neurotrophine beteiligt sind, ist schon länger bekannt. In PC12-Zellen kommt es durch NGF-Inkubation zu einer Src-abhängigen Veränderung der Zytoarchitektur der Zellen (Altun-Gultekin und Wagner, 1996). Neuere Daten zeigen, dass auch die Tyrosinkinase Fyn an der Signalweiterleitung des Trk-B-Rezeptor beteiligt ist (Iwasaki et al., 1998). Das Fyn-Protein befindet sich sowohl in Nerven- als auch in Gliazellen.

PP1, ein Inhibitor für Mitglieder der Src-Familie (Hanke et al., 1996; Orlicek et al., 1999), inhibiert die durch BDNF induzierte Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten in Synaptosomen der Ratte. Abbildung 15 zeigt, dass durch Verwendung von 1 μM PP1 bereits die durch BDNF-Stimulation erzielten Effekte auf die Tyrosinphosphorylierung der Proteine inhibiert werden. Präinkubation von Rattensynaptosomen mit 10 μM und 100 μM PP1 für 15 Minuten verhindert vollständig die BDNF-vermittelte Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten. Einschränkend muss allerdings ergänzt werden, dass PP1 auch als direkter Inhibitor der Bcr-Abl-Kinase und c-Kit, einem SCF-Rezeptor, fungiert (Tatton et al., 2003). Darüber hinaus konnten Bain und Mitarbeiter (2003) zeigen, dass PP1 auch CSK, SAPK2a, SAPK2b und CK1 hemmt. Ob die verwendeten PP1-Konzentrationen zu einer zusätzlichen Inhibition der zuvor genannten Proteine führen und diese in die intrazelluläre Signaltransduktion von BDNF involviert sind, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

Die beteiligten Src-Kinasen müssen in der Kette der Signalmoleküle weit oben, nahe dem Rezeptor angesiedelt sein. Nur so ist eine solch umfassende Inhibition der

BDNF-induzierten Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten denkbar. Diese Annahme wird auch von Co-Immunopräzipitationsexperimenten von Trk-B-Rezeptor und Fyn aus einem Zelllysate kortikaler Neuronen bestätigt (Iwasaki et al., 1998). Die Assoziation erfolgt über die SH2-Domäne von Fyn in vitro. Durch BDNF-Inkubation kann die Assoziation des Rezeptors mit dem Signalmolekül Fyn verdreifacht werden (Iwasaki et al., 1998).

Src wird in Synaptosomen der Ratte, wie von Oude Weernik et al. gezeigt werden konnte (in Vorbereitung), sowohl durch Depolarisation mit 30 mM KCl als auch durch fünfminütige BDNF-Stimulation (50 ng/ml) aktiviert. Verglichen zur Kontrolle steigt durch BDNF-Inkubation vor allem die Aktivität der Triton X-100-unlöslichen Src-Proteinfraktion um durchschnittlich 70%, die Aktivität der löslichen Fraktion erhöht sich nur um durchschnittlich 30%. Durch KCl-Depolarisation nimmt die Aktivität der löslichen Proteinfraktion um durchschnittlich 50% zu, die der Triton X-100-unlöslichen Fraktion nur um etwa 10%.

5.1.1.3 Möglichkeiten der Signaltransduktion von BDNF

Wie in den vorausgegangenen Kapiteln dargestellt wurde, führt der Weg von BDNF über Phosphorylierung bestimmter Proteine der Rattensynaptosomen an Tyrosinresten. Beteiligt sind der TrkB-Rezeptor und Mitglieder der Src-Familie ins Zellinnere. Ein mögliches Modell der erweiterten Signaltransduktion des BDNF-Signals in Nervenendigungen zeigt Abbildung 26.

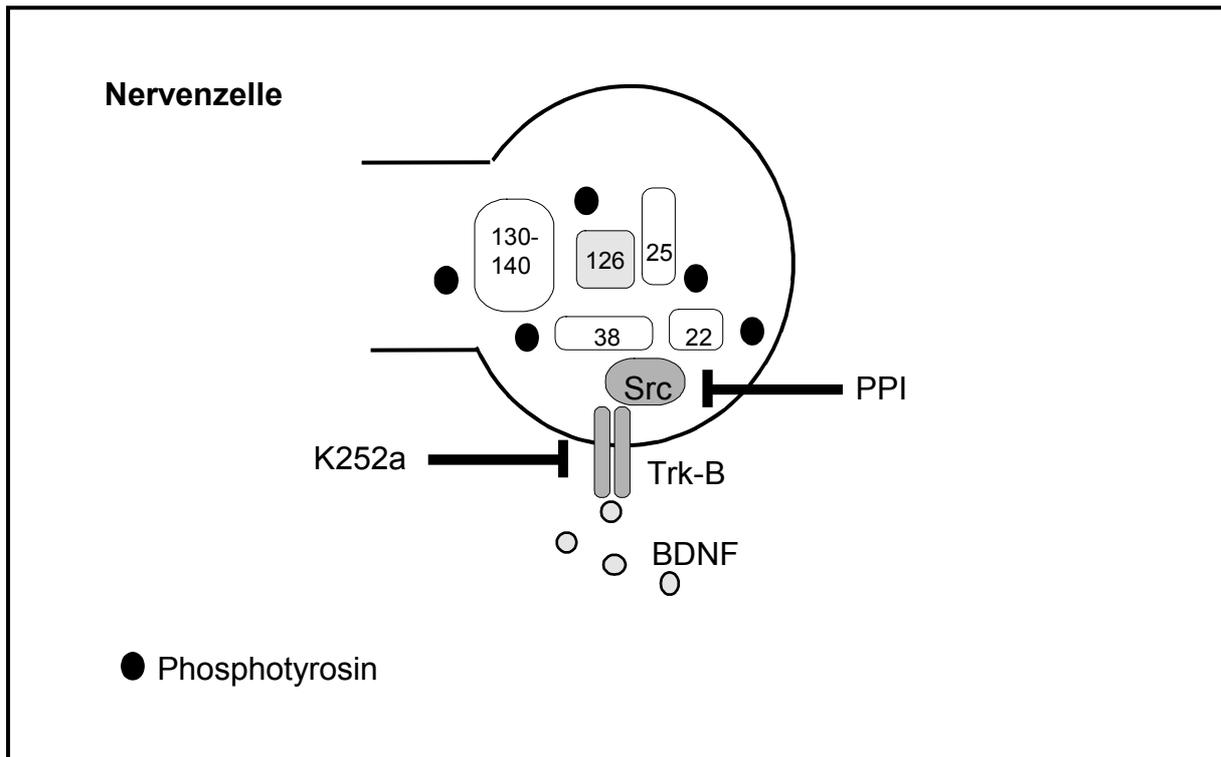


Abb. 26: Schematische Darstellung der Proteine, die an der Signalweiterleitung von BDNF in die gereinigten Nervendigungen der Ratte beteiligt sein könnten. Nach Stimulation von Synaptosomen mit BDNF kommt es zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Tyrosinphosphorylierung der Proteine mit der apparenten Molmasse von 22, 25, 38, 126 und 130-140 kDa. Dieser Effekt kann durch K252a und PP1 inhibiert werden.

Das extrazelluläre Signal wird durch Bindung von BDNF an die Ligandenbindungsdomäne des TrkB-Rezeptors mit anschließender Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase in die Zelle weitergeleitet. Diese Signaltransduktion kann durch K252a und PP1 inhibiert werden. An die intrazelluläre Domäne des TrkB-Rezeptors binden über spezifische Bindungsstellen Signalmoleküle und bewirken eine intrazelluläre Signalkaskade, welche unter anderem einen Prozess der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten (Abb. 26) zur Folge hat. BDNF-vermittelt kommt es zu einer Tyrosinphosphorylierung der Proteine mit der apparenten Molmasse von 22, 25, 38, 126 und 130-140 kDa. Schließlich werden im Zellkern mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren bestimmte Gene transskribiert bzw. die Transkription bestimmter Gene unterdrückt und neue Proteine synthetisiert oder die Synthese von Proteinen eingestellt (Su und Karin, 1996). Da Synaptosomen nur über einen inkompletten Proteinbiosyntheseapparat verfügen, ist dies mit gereinigten Nervenendigungen nicht zu untersuchen.

5.1.1.4 Vergleich zwischen BDNF-Stimulation und KCl-Depolarisation

Die durch BDNF induzierte Proteintyrosinphosphorylierung in gereinigten Nervenendigungen unterscheidet sich grundlegend von dem durch Depolarisation hervorgerufenen Phosphorylierungsmuster. Mit einem Medium, das 41mM Kalium enthält, konnten Woodrow et al. schon 1992 zeigen, dass Synaptosomenproteine mit den Molmassen 39, 104, 135 und 160 kDa an Tyrosinresten phosphoryliert werden.

Wie Abbildung 16 zeigt, wird durch eine dreiminütige KCl-Depolarisation von Synaptosomen der Ratte ein Protein mit der apparenten Molmasse von 40-41 kDa an Tyrosinresten phosphoryliert. Ob es sich dabei um das von Woodrow beschriebene pp39 oder um die MAP-Kinase mit einer Molmasse von 41 kDa oder ein anderes Protein handelt, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Das Protein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa wird durch diesen Depolarisationsversuch im Gegensatz zur Stimulation mit BDNF nicht tyrosinphosphoryliert.

Insgesamt unterscheidet sich die depolarisationsinduzierte Phosphorylierung von Synaptosomenproteinen der Ratte an Tyrosinresten deutlich von der durch Wachstumsfaktoren vermittelten Proteintyrosinphosphorylierung. Dies weist darauf hin, dass unterschiedliche intrazelluläre Signalproteine an der Übermittlung der Depolarisation und des Wachstumsfaktorsignals beteiligt sind. Sowohl die Depolarisation als auch BDNF stimulieren allerdings, abhängig von der intra- und extrazellulären Kalziumkonzentration, eine Freisetzung von Glutamat aus gereinigten Nervenendigungen der Ratte (Pascual et al., 2001).

5.1.2 Wirkung anderer neurotropher Wachstumsfaktoren auf die Proteintyrosinphosphorylierung

5.1.2.1 Wirkung der Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4

Auch die anderen in dieser Arbeit untersuchten Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4 induzieren eine Phosphorylierung von Synaptosomenproteinen an Tyrosinresten (Abb. 18). Dies wurde bereits von Knipper et al. (1994) für die Proteine der gereinigten Nervendingungen gezeigt.

Betrachtet man das Protein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa, zeigt sich durch Stimulation mit NT-3 und NT-4 eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung dieses Proteins an seinen Tyrosinresten (Abb. 18). Im Vergleich zum Kontrollwert führt NT-3 zu einer 2,3-fachen und NT-4 zu einer 1,6-fachen Steigerung (Tab. 4). NGF zeigt bei der semiquantitativen densitometrischen Auswertung keinen Effekt auf die Phosphorylierung des 38kDa-Proteins an Tyrosinresten (Tab. 3).

5.1.2.2 Wirkung von PDGF-AB und PDGF-BB

Neben den klassischen Neurotrophinen gibt es noch eine Reihe neurotropher Proteine und Hormone (siehe Kap. 1.3.1). Dazu gehören auch die aus Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB. Man kennt zwei verschiedene PDGF-Rezeptoren: PDGF-Rezeptor Alpha und PDGF-Rezeptor beta. Säugetiernervenzellen verfügen über beide Rezeptoren (Smits et al., 1991; Smits et al., 1998), so dass alle PDGF-Dimere an diese Rezeptoren binden können (siehe Kap. 1.3.2).

Durch Stimulation von Synaptosomen der Ratte mit PDGF-BB und PDGF-AB kommt es, wie bereits für die klassischen Neurotrophine gezeigt werden konnte, zur zeit- und konzentrationsabhängigen Phosphorylierung multipler Proteine an Tyrosinresten (Abb. 19A, 19B, 20A und 20B). Neben der deutlichen Phosphorylierung eines Proteins mit der apparenten Molmasse von 60-62kDa und 38 kDa durch PDGF-AB und PDGF-BB, werden Proteine mit der apparenten Molmasse von 50, 120 und 180-

190 k Da durch PDGF-AB und von 54, 100, 120-130 und 170 kDa durch PDGF-BB an ihren Tyrosinresten phosphoryliert. Die Vielzahl verschiedener intrazellulärer Proteine, welche PDGF-abhängig tyrosinphosphoryliert werden, ist nicht verwunderlich. Alleine der PDGF-Rezeptor dient, nach erfolgter Aktivierung durch den extrazellulär bindenden Liganden, unter anderem als Bindungsstelle für die intrazellulären Signalproteine Src, Syp, PLC gamma, GAP, über p85 die PI3-Kinase, Nck und PTP D (siehe Abb. 2).

Die Proteine mit der apparenten Molmasse von 170 bzw. 180-190 kDa könnten die PDGF-Rezeptoren sein. Der glykosylierte PDGF-Rezeptor Alpha hat eine Molmasse von 170 kDa und der PDGF-Rezeptor beta von 180 kDa, wie Vassbotn et al. 1994 zeigten. Sie werden durch die Bindung der Liganden an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne an Tyrosinresten der intrazellulären Domäne autophosphoryliert.

Bei den an Tyrosinresten phosphorylierten Proteinen nach Stimulation mit den neurotrophen Proteinen PDGF-AB und PDGF-BB wird wie durch BDNF ein Protein mit den apparenten Molmassen 38 kDa an seinen Tyrosinresten phosphoryliert. Ob es sich hierbei um das integrale Vesikelprotein Synaptophysin handelt, müssen weitere Experimente klären.

5.1.3 Synaptophysin wird durch BDNF an Tyrosinresten phosphoryliert

Synaptophysin ist ein integrales Membranprotein der kleinen synaptischen Vesikel mit einer molaren Masse von 38 kDa. Es wird in Synaptosomen kalziumabhängig an Serinresten phosphoryliert (Rubenstein et al., 1993). Auch an Tyrosinresten kann Synaptophysin phosphoryliert werden, wie Pang et al. 1988 sowohl in gereinigten synaptischen Vesikeln als auch in Synaptosomen zeigen konnten. Langzeitpotenzierung (LTP) führt im Gyrus dentatus der Ratte zu einer Zunahme der Phosphorylierung von Synaptophysin an Tyrosinresten und zu einer Zunahme der endogenen Glutamatfreisetzung. Diese Effekte sind durch Tyrphostin AG 879, einen Tyrosinkinase-Inhibitor, blockierbar (Mullany und Lynch, 1998). Synaptophysin

interagiert direkt mit Src. Src ist in der Lage Synaptophysin zu phosphorylieren (Barnekow et al., 1990).

Wie in Kap. 4.1.1 und 4.1.6 dargestellt, wird durch die Stimulation mit BDNF, NT-3 und NT-4, nicht aber nach Stimulation mit NGF ein Protein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa an Tyrosinresten phosphoryliert. Es zeigt das gleiche Laufverhalten wie Synaptophysin (Kap. 4.1.2, Abb. 10). Die Auswertung der Immunpräzipitation mit dem Synaptophysinantikörper SY38 zeigt, dass es sich um Synaptophysin handelt (Abb. 11). Es ist wahrscheinlich, dass Synaptophysin in Synaptosomen der Ratte an der Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren BDNF, NT-3 und NT-4 beteiligt ist, da es eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Exozytose von Neurotransmittern einnimmt.

5.2 Untersuchungen zur depolarisationsinduzierten Glutamatfreisetzung aus Synaptosomen der Ratte

Neben Wachstum und Differenzierung des Nervensystems dienen die klassischen Neurotrophine, BDNF, NGF, NT-3 und NT-4 und die anderen neurotrophen Faktoren auch im reifenden und ausgereiften Gewebe als Signalmoleküle, die an der synaptischen Plastizität beteiligt sind (Stoop und Poo, 1995). Über eine Signaltransduktion vom Rezeptor zum Zytosol regulieren viele neurotrophe Faktoren die schnell ablaufenden neuronalen Funktionen, wie beispielsweise die Freisetzung von Neurotransmittern (Levine, 1995). Dies konnten bereits 1994 Knipper und Mitarbeiter an gereinigten Hippokampussynaptosomen der Ratte zeigen. Darüber hinaus steigert BDNF die Neurotransmitterfreisetzung aus dem visuellen Kortex der Ratte (Sala et al., 1998), aus kultivierten hippokampalen und kortikalen Neuronen (Li et al., 1998; Takei et al., 1998) und auch aus kortikalen Astrozyten (Pascual et al., 2001).

Die Neurotransmitterfreisetzung durch Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran wird durch den auf ein Aktionspotential folgenden Kalziumeinstrom in die Nervenzelle induziert. Welche Konzentrationen an Neurotransmitter freigesetzt werden, ist allerdings nicht alleine durch den Kalziumeinstrom determiniert. Dies resultiert vielmehr daraus, wie viele synaptische Vesikel sich, „angedockt“ und zur Exozytose bereit, an der aktiven Zone der

präsynaptischen Membran befinden (Elferink und Scheller, 1995). Eine Möglichkeit, die Anzahl der zur Exozytose bereitgestellten „angedockten“ Vesikel zu erhöhen, ist die Stimulation der Nervenzelle mit neuronalen Wachstumsfaktoren. So konnten Tyler und Pozzo-Miller (2001) zeigen, dass BDNF-Stimulation die Zahl der an der aktiven Zone „angedockten“ Vesikel erhöht. Dies führt dann in der präsynaptischen Nervendingung zu einer Erhöhung des Exozytosepools und kann die Neurotransmitterfreisetzung aus dieser Zelle erhöhen.

Ein solcher Mechanismus wird für die Regulation der „Synaptic strength“ diskutiert. Wachstumsfaktoren können in eben diesen Mechanismus eingreifen.

5.2.1 Wirkung von BDNF auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung

Die Stimulation gereinigter Nervendingungen mit NGF und BDNF führt, wie bereits Knipper und Mitarbeiter 1994 zeigen konnten, zu einer gesteigerten depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung aus Hippokampussynaptosomen der Ratte. Darüber hinaus induziert auch BDNF selbst in zerebrokortikalen Nervendingungen abhängig von der intra- und extrazellulären Kalziumkonzentration die Freisetzung von Glutamat (Pascual et al., 2001).

Die Stimulation von Synaptosomen aus dem Rattenkortex mit BDNF führt zu einer signifikanten Zunahme der durch repetitive Depolarisation induzierten Glutamatfreisetzung, wobei dieser Prozess von der Dauer und der Konzentration der Stimulation mit BDNF abhängig ist (Abb. 20A, 20B und Abb. 21).

Die Synaptosomen setzen allerdings nicht spontan vermehrt Glutamat frei, wie dies beispielsweise von Pascual und seinen Mitarbeitern (2001) beschrieben wird, sondern zeigen in der gewählten Versuchsanordnung nur depolarisationsbedingt eine Zunahme. Diese wird, betrachtet man den relativen Wert verglichen mit dem Kontrollexperiment, auf 120% in der ersten Depolarisation erhöht. Vergleicht man die zweiten Depolarisationen gegeneinander, so ist der BDNF-Stimulationseffekt noch deutlicher, da die depolarisationsabhängige Glutamatfreisetzung auf 142% gesteigert wird. Der Effekt hält trotz einmaliger Neurotrophinapplikation über drei Depolarisationszyklen hinweg an (Abb. 27).

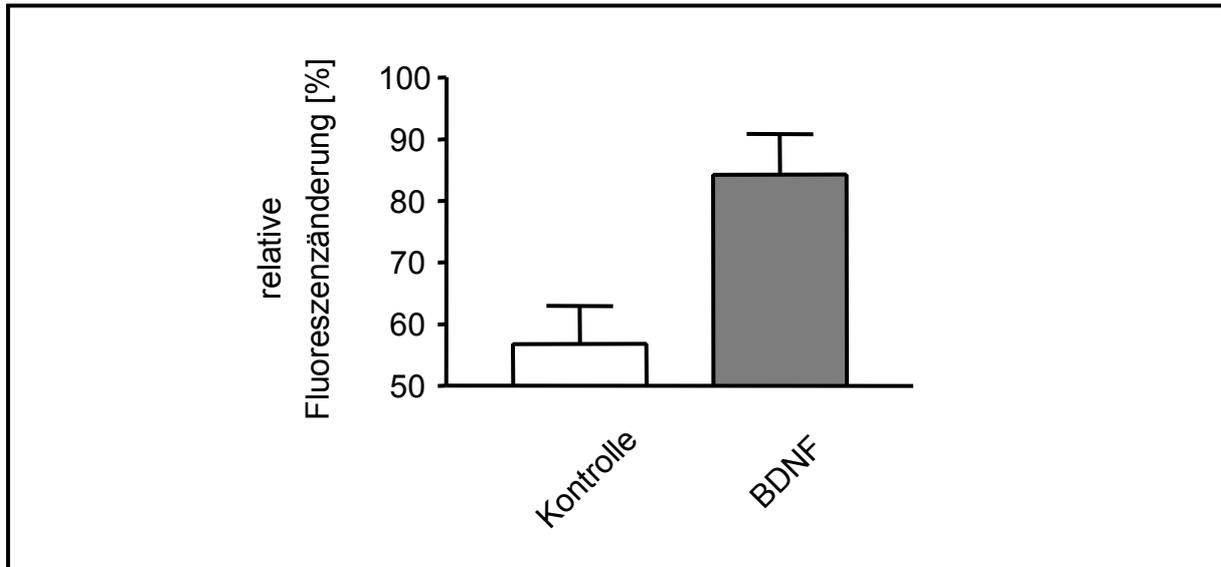


Abb. 27: Der Vergleich der Kontrollwerte mit den Werten nach BDNF-Stimulation (100 ng/ml, 20 Minuten) zeigt auch in der dritten Depolarisation noch deutlich, dass die depolarisationsabhängige Glutamatfreisetzung nach BDNF-Stimulation gesteigert ist. Anzahl der Experimente $n=10$, Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM. (Daten aus Quelldaten zu Abb. 20).

Erst nach durchschnittlich vier Depolarisationszyklen gleicht sich die depolarisationsabhängige Glutamatfreisetzung nach BDNF-Stimulation wieder den Werten der unbehandelten Synaptosomen an, was zum einen daran liegen kann, dass der Nachschub an synaptischen Vesikeln erschöpft ist, zum anderen aber auch an der relativ kurzen Vitalität der Synaptosomen.

Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass BDNF den Pool der synaptischen Vesikel, welcher zur Freisetzung bereit steht (readily releasable pool, RRP), erhöht und so selbst bei repetitiver Depolarisation zu einer erhöhten Glutamatfreisetzung aus den Synaptosomen der Ratte führt (Abb.29).

5.2.1.1 Vermittlung der Wirkung von BDNF auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung über den Trk-Rezeptor und über Mitglieder der Src-Familie

Der Tyrosinkinase-Inhibitor K252a wurde bereits in den vorausgegangenen Abschnitten als Inhibitor für Trk-Rezeptoren beschrieben. Wie Abbildung 24 zeigt, verhindert die Inkubation von Synaptosomen mit K252a (200 nM, 15 minütige Präinkubation) die durch BDNF-Stimulation gesteigerte depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung. Zu bemerken ist allerdings, dass bereits durch die lange Vorinkubationszeit vor der BDNF-Stimulation der BDNF-Effekt deutlich geringer ausfällt als in den nicht vorinkubierten Synaptosomen. K252a blockiert über die zwei ersten Depolarisationsschritte hinweg die BDNF-vermittelte Steigerung der depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung.

Dies zeigt, dass BDNF sein Signal, welches zu einer depolarisationsabhängigen Steigerung der Glutamatfreisetzung aus den Synaptosomen der Ratte führt, nicht über den $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor an die Zielzelle weitergibt, sondern überwiegend mit Hilfe des TrkB-Rezeptors. Auch Tyler und Pozzo-Miller (2001) konnten mittels K252a zeigen, dass die BDNF-abhängige Erhöhung der „angedockten“ Vesikel über die BDNF-TrkB-Signalkaskade weitergeleitet wird.

PP1 wurde bereits eingehend als Inhibitor der Kinasen der Src-Familie beschrieben. Vorinkubation mit diesem Inhibitor führt in Synaptosomen der Ratte nur zu einer transienten Blockierung der nach BDNF-Stimulation erreichten depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung (Abb. 24). Die freigesetzte Glutamatkonzentration entspricht nur in der ersten Depolarisation der der Kontrollsynaptosomen. Betrachtet man die folgenden beiden Depolarisationen, so ist kein inhibierender Effekt mehr zu erkennen.

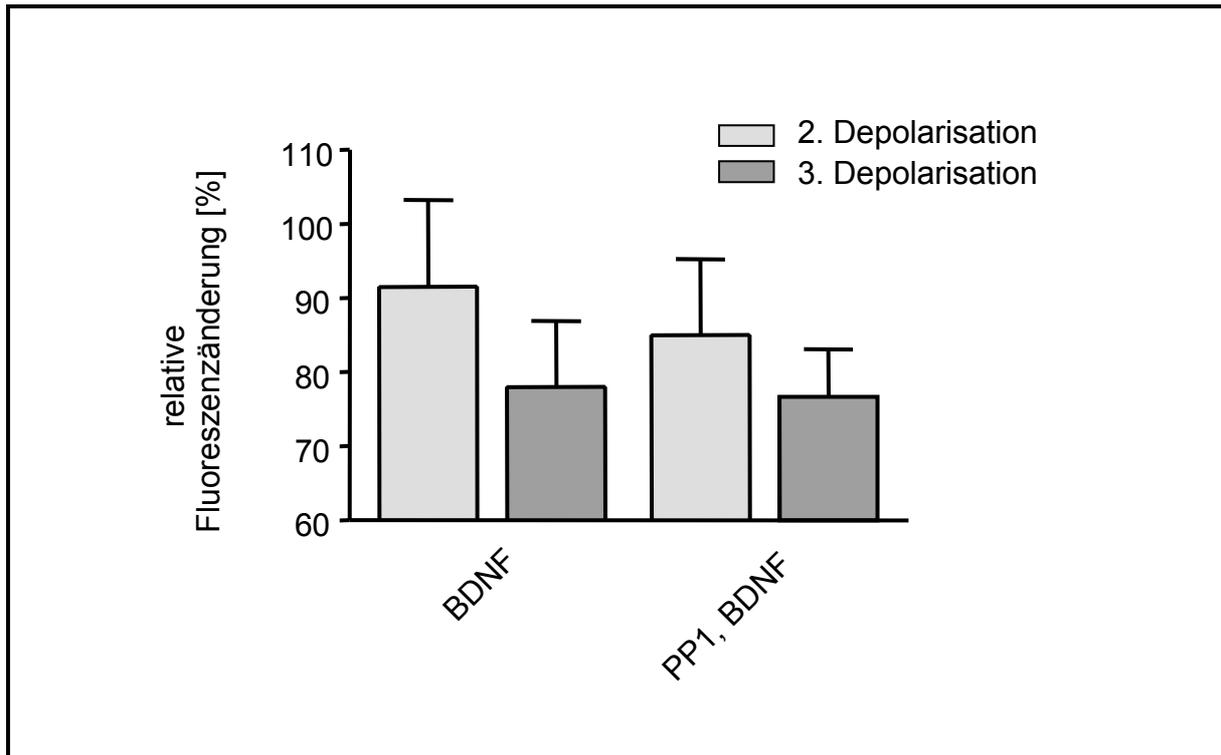


Abb. 28: PP1 führt bei der 2. und 3. Depolarisation nicht mehr zu einer Inhibition des BDNF-Effektes (Daten aus Quelldaten zu Abb. 24). Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM.

Mitglieder der Src-Familie dienen demnach als Vermittler zwischen dem TrkB-Rezeptor und der nach BDNF-Stimulation erfolgenden Steigerung der depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung; es handelt sich allerdings um einen Effekt, der nur in der ersten Depolarisation nachweisbar ist. Ob es sich bei dem fehlenden Inhibitionseffekt von PP1 auf die repetitive depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung nach BDNF-Stimulation, wie in Abbildung 28 gezeigt ist, um einen Effekt durch die Verdrängung des Inhibitors aus seiner Bindungsstelle am Src-Molekül durch die multiplen Reinigungs- und Zentrifugationsschritte, die in diesem Experiment nötig sind, handelt, oder ob es sich wirklich nur um einen transienten Inhibitionseffekt des Src-Inhibitors PP1 handelt muss in Folgeexperimenten geklärt werden.

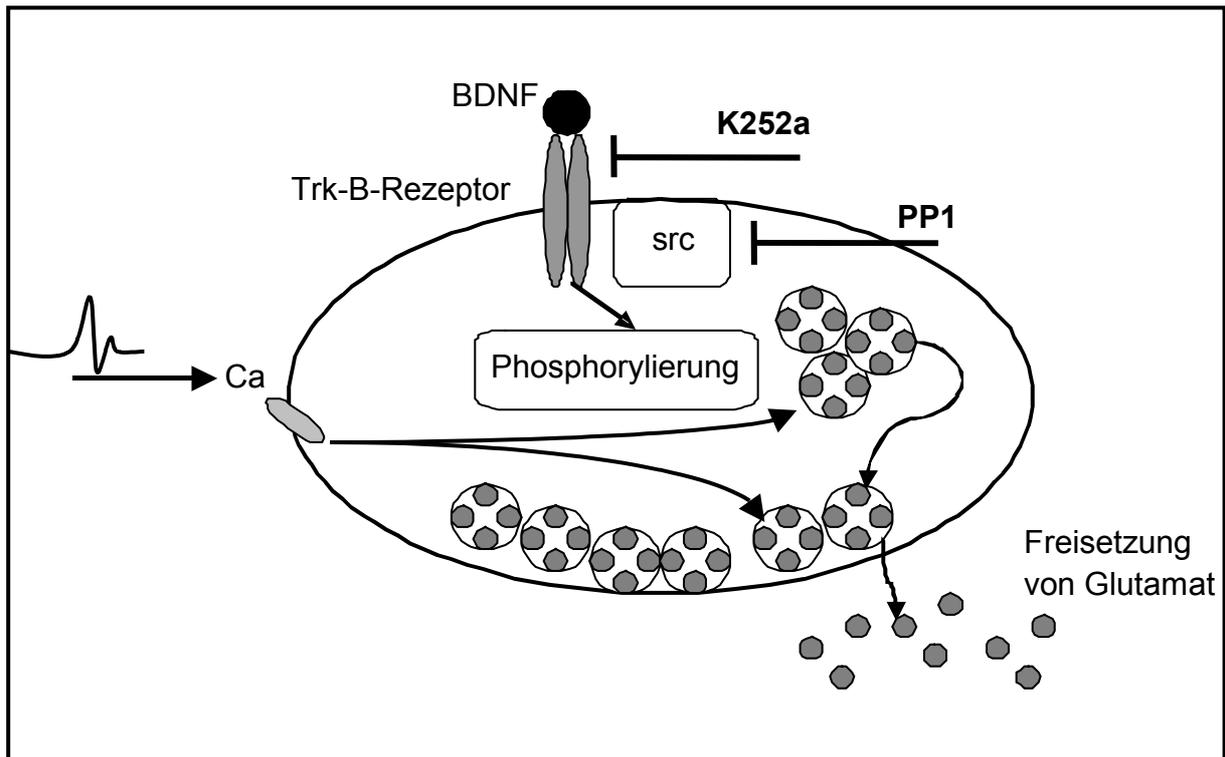


Abb. 29: Schematische Darstellung der nach Stimulation mit BDNF erfolgten Steigerung der depolarisationsabhängigen Freisetzung von Glutamat aus Synaptosomen der Ratte. Die depolarisationsinduzierte Steigerung der Glutamatfreisetzung wird über den TrkB-Rezeptor an die Zelle vermittelt. Mitglieder der Src-Familie sind in die Steigerung der depolarisations-abhängigen Glutamatfreisetzung involviert. Über eine Erhöhung der an der aktiven Zone „angedockten“ synaptischen Vesikel vergrößert sich der Exozytosepool und somit die Menge an Neurotransmitter, die nach erneuter Depolarisation freigesetzt werden kann. K252a und PP1 sind als entsprechende Inhibitoren eingezeichnet.

5.2.2 Wirkung anderer neurotropher Wachstumsfaktoren auf die depolarisationsinduzierte Glutamatfreisetzung

Vergleicht man die nach BDNF-Stimulation erfolgte Steigerung der depolarisationsabhängigen Glutamatfreisetzung aus Synaptosomen der Ratte mit den Effekten, welche eine Stimulation mit NGF, NT-3 und NT-4 erzeugt, so zeigt sich, dass sich die Neurotrophine deutlich voneinander unterscheiden (Abb. 23).

Alle Neurotrophine führen nach erfolgter Stimulation zu einem Anstieg der Glutamatfreisetzung nach erstmaliger Depolarisation (Tab. 5). NGF allerdings hat einen deutlich schwächeren Effekt als BDNF, NT-3 und NT-4. Die Resultate für die

zweite Depolarisation zeigen, dass sich die mit NGF stimulierten Synaptosomen nicht mehr signifikant von den Kontrollsynaptosomen unterscheiden. Die Stimulation mit BDNF, NT-3 und NT-4 führt auch in der zweiten Depolarisation zu einer gesteigerten Glutamatfreisetzung. Für die dritte Depolarisation zeigt alleine die Stimulation mit BDNF noch eine signifikante Steigerung der depolarisationsabhängigen Freisetzung von Glutamat.

Bekannt ist, dass PDGF N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren in kultivierten Hippokampusneuronen inhibiert, da PDGF Long-Term-Inhibition der NMDA-Rezeptorfunktion induziert (Valenzuela et al., 1996). Ein synthetisches Peptid (ANFLVWEIVRKKP), das der PDGF-BB-Kette nachgeahmt ist und welches als PDGF-Antagonist wirkt, induziert eine gesteigerte Histaminfreisetzung aus peritonealen Mastzellen der Ratte (Fujii et al., 1997). Diese Daten eröffnen die Möglichkeit, dass auch der Wachstumsfaktor PDGF an der Modifikation der depolarisationsinduzierten Glutamatfreisetzung beteiligt sein könnte. Die in Abbildung 23 gezeigten Ergebnisse der Experimente mit den neurotrophen Proteinen PDGF-AB und PDGF-BB zeigten unter den gewählten Bedingungen allerdings keinen Effekt auf die depolarisationsabhängige Glutamatfreisetzung.

5.3 Ausblick

Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten ist ein Mechanismus der Signaltransduktion. Dies gilt, wie diese Arbeit zeigt, auch für die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF, NT-3, NT-4, PDGF-AB und PDGF-BB in Synaptosomen der Ratte. Welche Proteine an der intrazellulären Signaltransduktion dieser Wachstumsfaktoren neben den jeweiligen Rezeptorproteinen und den Mitgliedern der Src-Proteine noch beteiligt sind, muss weiter aufgeklärt werden. Vor allem Proteine, die an der Exozytose von Neurotransmittern beteiligt sind, könnten hierbei eine wichtige Rolle spielen. Dazu sind Immunpräzipitationsversuche mit mutmaßlich an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen, welche an Tyrosinresten phosphoryliert werden können, nötig. Die Untersuchung von knock-out Mäusen kann weiteren Aufschluss über die an der Signaltransduktion involvierten Proteine geben. So konnten Jovanovic und Mitarbeiter (2000) zeigen, dass die durch BDNF induzierte

Erhöhung der Glutamatfreisetzung bei Mäusen, die nicht über Synapsin I und Synapsin II verfügen, deutlich vermindert wird.

Es muss des Weiteren genau aufgeklärt werden, ob es sich bei den durch Wachstumsfaktorinkubation beobachteten tyrosinphosphorylierten Proteinen um eine einfache Proteintyrosinphosphorylierung bereits vorhandener Proteine handelt oder ob eine Neusynthese nötig ist.

BDNF und NT-3 stimulieren, wie Kang und Schumann beschreiben (1996), die lokale Proteinsynthese, was für die Induktion der verstärkten synaptischen Aktivität nötig ist. Um dies genauer untersuchen zu können, sind Inhibitoren der Proteinsynthese einsetzbar. Bradley und Sporns konnten 1999 an kultivierten kortikalen Neuronen zeigen, dass für die BDNF-abhängige Steigerung der Exozytose lediglich die Translation, nicht aber die Transskription nötig ist. Die RNA-Synthesehemmer Actinomycin D und 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl Benzimidazol (DRB) hatten keinen Einfluss auf die BDNF-Effekte, wohl aber die eingesetzten Translationsinhibitoren.

Schließlich gilt es, den Wirkmechanismus von Neurotrophen auf die Neurotransmitterfreisetzung aufzuklären. Auch hierbei können Knockout-Tiere, wie die häufig eingesetzte BDN-Knockout-Maus hilfreich sein. Mit Hilfe solcher Tiere konnten Pozzo-Miller und Mitarbeiter (1999) zeigen, dass quantitativ an deren untersuchten CA1-Synapsen deutlich weniger „angedockte“ synaptische Vesikel im Bereich der aktiven Zone zu finden sind.

Durch diese vorgelegte Arbeit konnte gezeigt werden, dass neurotrophe Substanzen an der Signaltransduktion von Nervenzellen durch Modifikation der Proteintyrosinphosphorylierung beteiligt sind. Inwieweit dies und vor allem die nach BDNF-Inkubation gesteigerte depolarisationsabhängige Glutamatfreisetzung Einfluss auf die synaptische Plastizität und somit auf Lernen und Gedächtnis haben, sollte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

Alpers, C.E., Seifert, R.A., Hudkins, K.L., Johnson, R.J., Bowen-Pope, D.F. (1993). PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int* 43: 286-294.

Anderson, D., Koch, C.A., Grey, L., Ellis, C., Moran, M.F., Pawson, T. (1990). Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* 250: 979-982.

Bain, J., McLauchlan, H., Elliot, M., Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371:199-204.

Baig, M.A., Khan, M.A. (1996). The induction of neurotrophin and TRK receptor mRNA expression during early avian embryogenesis. *Int J Dev Neurosci* 14: 55-60.

Barnekow, A., Jahn, R., Scharf, M. (1990). Synaptophysin: a substrate for the protein tyrosine kinase pp60c-src in intact synaptic vesicles. *Oncogene* 5: 1019-1024.

Bennett, M.V. (1972). Electrical versus chemical neurotransmission. *Res Publ Assoc Res. Nerv Ment Dis* 50: 58-90.

Bliss, T.V., Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.

Bothwell, M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 18: 223-253.

Bothwell, M.A., Shooter, E.M. (1977). Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *J Biol Chem* 252: 8532-8536.

Bowen-Pope, D.F., Ross, R., Seifert, R.A. (1985). Locally acting growth factors for vascular smooth muscle cells: endogenous synthesis and release from platelets. *Circulation* 72: 735-740.

Bradley, J., Sporns, O. (1999). BDNF-dependent enhancement of exocytosis in cultured cortical neurons requires translation but not transcription. *Brain Research* 815: 140-149.

Bramham, C.R., Southard, T., Sarvey, J.M., Herkenham, M., Brady, L.S. (1996). Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *J Comp Neurol* 368: 371-382.

Bunone, G., Mariotti, A., Compagni, A., Morandi, E., Della-Valle, G. (1997). Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 14: 1463-1470.

Cantley, L.C., Anger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Braziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S., (1991). Oncogenes and Signal transduction. *Cell* 64: 281-302.

Chao, M.V. (1994). The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 25: 1373-1385.

Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Westermark, B., Heldin, C.H. (1989). cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4917-4921.

Donovan, M.J., Lin, M.I., Wiegand, P., Ringstedt, T., Kraemer, R., Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S, Hempstead BL (2000). Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 127: 4531-4540.

Elferink, L.A., Scheller, R.H. (1995). Synaptic vesicle proteins and regulated exocytosis. *Prog Brain Res* 105: 79-85.

ElShamy, W.M., Ernfors, P. (1997). Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 complement and cooperate with each other sequentially during visceral neuron development. *J Neurosci* 17: 8667-8675.

Fantl, W.J., Johnson, D.E., Williams, L.T. (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 62: 453-481.

Fesce, R., Valtorta, F., Meldolesi, J. (1996). The membrane fusion machine and neurotransmitter release. *Neurochem Int* 28: 15-21.

Fischer, W., Sirevaag, A., Wiegand, S.J., Lindsay, R.M., Bjorklund, A. (1994). Reversal of spatial memory impairments in aged rats by nerve growth factor and neurotrophins 3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8607-8611.

Floor, E., Leeman, S.E. (1985). Evidence that large synaptic vesicles containing substance P and small synaptic vesicles have a surface antigen in common in rat. *Neurosci Lett* 60: 231-237.

Fujii, T., Yokoyama, H., Li, G.F., Tada, H. (1997). A peptide antagonist derived from PDGF induces histamine release from rat cells. *Biol Pharm Bull* 20: 79-81.

Gelderloos, J.A., Rosenkranz, S., Bazenet, C., Kazlauskas, A. (1998). A role for Src in signal relay by the platelet-derived growth factor alpha receptor. *J Biol Chem* 273: 5908-5915.

Gordon, M.W., Deanin, G.G. (1968). Protein synthesis by isolated rat brain mitochondria and synaptosomes. *J Biol Chem* 243: 4222-4226.

Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M., Thoenen, H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372: 266-269.

Grob, P.M., Ross, A.H., Koprowski, H., Bothwell, M. (1985). Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 260: 8044-8049.

Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A., Connelly, P.A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src-family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent cell activation. *J Biol Chem* 271: 695-701.

Hansen, K., Alonso, G., Courtneidge, S.A., Ronnstrand, L., Heldin, C.H. (1997). PDGF-induced phosphorylation of Tyr28 in the N-terminus of Fyn affects Fyn activation. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 355-362.

Hansen, K., Ronnstrand, L., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. (1997). Phosphorylation of a 72-kDa protein in PDGF-stimulated cells which forms complex with c-Crk, c-Fyn and Eps15. *FEBS Lett* 409: 195-200.

Hardie, D.C. (1990) Biochemical messengers: Hormones, Neurotransmitters and Growth Factors. London. Chapman and Hall.

Harrison, S.M., Jarvie, P.E., Dunkley, P.R. (1988). A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: viability of subcellular fractions. *Brain Res* 441: 72-80.

Heerssen, H.M., Segal, R.A. (2002). Location, location, location: A spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci* 25:160-165.

Heldin, C.H., Ek, B., Ronnstrand, L. (1983). Characterization of the receptor for platelet-derived growth factor on human fibroblasts. Demonstration of an intimate relationship with a 185,000-Dalton substrate for the platelet-derived growth factor-stimulated kinase. *J Biol Chem* 258: 10054-10061.

Heldin, C.H., Ernlund, A., Rorsman, C., Ronnstrand, L. (1989). Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *J Biol Chem* 264: 8905-8912.

Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., Barde, YA. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344: 339-341.

Iwasaki, Y., Gay, B., Wada, K., Koizumi, S. (1998). Association of the Src family tyrosine kinase Fyn with TrkB. *J Neurochem* 71: 106-111.

Jahn, R., Hell, J., Maycox, P.R. (1990). Synaptic vesicles: Key organelles involved in neurotransmission. *J Physiol* 84:128-133.

Jovanovic, J.N., Benfenati, F., Siow, Y.L., Sihra, T.S., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Greengard, P., Czernik, A.J. (1996). Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 3679-3683.

Jovanovic, J.N., Czernik A.J., Fienberg A.A., Greengard P., Sihra T.S. (2000). Synaptins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neurosci* 3: 323-329.

Kang, H., Schuman, E.M. (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273: 1402-1406.

Kim, H.G., Wang, T., Olafsson, P., Lu, B. (1994). Neurotrophin 3 potentiates neuronal activity and inhibits gamma-aminobutyrategic synaptic transmission in cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12341-12345.

Knipper, M., Beck, A., Rylett, J., Breer, H. (1993). Neurotrophin induced second messenger responses in rat brain synaptosomes. *Neuroreport* 4: 483-486.

Knipper, M., da-Penha-Berzaghi, M., Blochl, A., Breer, H., Thoenen, H., Lindholm, D. (1994). Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 6: 668-671.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lai, K.O., Fu, W.Y., Ip, F.C., Ip, N.Y. (1998). Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci* 11: 64-76.

Lamballe, F., Klein, R., Barbacid, M. (1991a). The trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Princess Takamatsu Symp* 22: 153-170.

Lamballe, F., Klein, R., Barbacid, M. (1991b). TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66: 967-979.

Levine, E.S., Dreyfus, C.F., Black, I.B., Plummer, M.R. (1995). Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8074-8077.

Li, Y.X., Zhang, Y., Lester H.A., Schuman E.M., Davidson N. (1998). Enhancement of Neurotransmitter Release Induced by Brain-Derived Neurotrophic Factor in cultured Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 18: 10231-10240.

Liebenhoff, U., Brockmeier, D., Presek, P. (1993). Substrate affinity of the protein tyrosine kinase pp60c-src is increased on thrombin stimulation of human platelets. *Biochem J* 295:41-48.

Liebenhoff, U., Greinacher, A., Presek, P. (1994). The protein tyrosine kinase pp60c-src is activated upon platelet stimulation. *Cell Mol Biol Noisy-le-grand* 40: 645-652.

Liebenhoff U, Brockmeier D, Presek P. (1993) .Substrate affinity of the protein tyrosine kinase pp60c-src is increased on thrombin stimulation of human platelets. *Biochem J.* 1;295:41-8

Linden, D.J. (1994). Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 12: 457-472.

Liu, Y., Bishop, A., Wilucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Ubersax, J., Blethrow, J., Morgan, B.O., Shokat, K.M. (1999). Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol* 6: 671-678.

Llinas, R., Sugimori, M., Silver, R.B. (1992). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256: 677-679.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*;193:265-75.

Lu, B., Figurov, A. (1997). Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev Neurosci* 8: 1-12.

Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 15;87:206-10.

McDonald, N.Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A., Blundell, T.L. (1991). New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 354: 411-414.

Milbrandt, J., de-Sauvage, F.J., Fahrner, T.J., Baloh, R.H., Leitner, M.L., Tansey, M.G., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Kotzbauer, P.T., Simburger, K.S., Golden, J.P., Davies, J.A., Vejsada, R., Kato, A.C., Hynes, M., Sherman, D., Nishimura, M., Wang, L.C., Vandlen, R., Moffat, B., Klein, R.D., Poulsen, K., Gray, C., Garcés, A., Johnson, E.M. Jr. (1998). Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20: 245-253.

Montmayeur, J.P., Valius, M., Vandenheede, J., Kazlauskas, A. (1997). The platelet-derived growth factor beta receptor triggers multiple cytoplasmic signaling cascades that arrive at the nucleus as distinguishable inputs. *J Biol Chem* 272: 32670-32678.

Mori, S., Ronnstrand, L., Yokote, K., Engstrom, A., Courtneidge, S.A., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. (1993). Identification of two juxtamembrane

autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. *EMBO J* 12: 2257-2264.

Narhi, L.O., Rosenfeld, R., Talvenheimo, J., Prestrelski, S.J., Arakawa, T., Lary, J.W., Kolvenbach, C.G., Hecht, R., Boone, T., Miller, J.A. (1993). Comparison of the biophysical characteristics of human brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and nerve growth factor. *J Biol Chem* 268: 13309-13317.

Nilsson, A.S., Fainzilber, M., Falck, P., Ibanez, C.F. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett* 424: 285-290.

Pandey, A., Liu, X., Dixon, J.E., Di Fiore, P.P., Dixit, V.M. (1996). Direct association between the Ret receptor tyrosine kinase and the Src homology 2-containing adapter protein Grb7. *J Biol Chem* 271: 10607-10610.

Pang, D.T., Wang, J.K., Valtorta, F., Benfenati, F., Greengard, P. (1988). Protein tyrosine phosphorylation in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 762-766.

Pascual, M., Climent, E., Guerri, C. (2001). BDNF induces glutamate release in cerebrocortical nerve terminals and in cortical astrocytes. *Neuroreport* 12: 2673-2677.

Patterson, S.L., Grover, L.M., Schwartzkroin, P.A., Bothwell, M. (1992). Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9: 1081-1088.

Pozzo-Miller, L.D., Gottschalk, W., Zhang, L., McDermott, K., Du, J., Gopalakrishnan, R., Oho, C., Sheng, Z.H., Lu, B. (1999). Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci* 19: 4972-4983.

Presek, P., Jessen, S., Dreyer, F., Jarvie, P.E., Findik, D., Dunkley, P.R. (1992). Tetanus toxin inhibits depolarization-stimulated protein phosphorylation in rat cortical

synaptosomes: Effect on synapsin I phosphorylation and translocation. *J Neurochem* 59: 1336-1343.

Rajan, P., McKay, R.D. (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* 18: 3620-3629.

Rodriguez-Martinez, H., Persson, E., Hurst, M., Stanchev, P. (1992). Immunohistochemical localization of platelet-derived growth factor receptors in the porcine uterus during the oestrous cycle and pregnancy. *Zentralbl Veterinarmed A* 39: 1-10.

Ross, R., Bowen-Pope, D.F., Raines, E.W. (1990). Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327: 155-169.

Rozakis-Adcock, M., van-der-Geer, P., Mbamalu, G., Pawson, T. (1995). MAP kinase phosphorylation of mSos1 promotes dissociation of mSos1-Shc and mSos1-EGF receptor complexes. *Oncogene* 11: 1417-1426.

Rosenthal, A., Goeddel, D.V., Nguyen, T., Lewis, M., Shih, A., Laramée, G.R., Nikolics, K., Winslow, J.W. (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 4: 767-773.

Roux, P.P., Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signalling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67: 203-233.

Rubenstein, J.L., Greengard, P., Czernik, A.J. (1993). Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin. *Synapse* 13: 161-172.

Sala, R., Viegli, A., Rossi, F.M., Pizzorusso, T., Bonanno, G., Raiteri, M., Maffe, C. (1998). Nerve growth factor and BDNF increase neurotransmitter release in the rat visual cortex. *Eur J Neurosci* 10: 2185-2191.

Seifert, R.A., Hart, C.E., Phillips, P.E., Forstrom, J.W., Ross, R., Murray, M.J., Bowen-Pope, D.F. (1989). Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* 264: 8771-8778.

Smits, A., Funa, K. (1998). Platelet-derived growth factor (PDGF) in primary brain tumours of neuroglial origin. *Histol Histopathol* 13: 511-520.

Smits, A., Kato, M., Westermark, B., Nister, M., Heldin, C.H., Funa, K. (1991). Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF): Rat neuronal cells possess functional PDGF beta-type receptors and respond to PDGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8159-8163.

Snider, W.D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77: 627-638.

Squinto, S.P., Stitt, T.N., Aldrich, T.H., Davis, S., Bianco, S.M., Radziejewski, C., Glass, D.J., Masiakowski, P., Furth, M.E., Valenzuela, D.M. (1991). TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 65: 885-893.

Stoop, R., Poo, M.M. (1995). Potentiation of transmitter release by ciliary neurotrophic factor requires somatic signaling. *Science* 267: 695-699.

Stover, D.R., Furet, P., Lydon, N.B. (1996). Modulation of the SH2 binding specificity and kinase activity of Src by tyrosine phosphorylation within its SH2 domain. *J Biol Chem* 271: 12481-12487.

Su, B., Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 8: 402-411.

Sudhof, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653.

Takei, N., Numakawa, T., Kozaki, S., Naoto, S., Endo, Y., Takahashi, M., Hatanaka, H. (1998), Brain-derived Neurotrophic Factor Induces Rapid and Transient Release of Glutamate through the Non-exocytotic Pathway from Cortical Neurons. *J Biol Chem* 273: 27620-27624.

Tapley, P., Lamballe, F., Barbacid, M. (1992). K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7: 371-381.

Tatton, L., Morley, G.M., Chopra, R., Khwaja, A. (2003), The src-selective Kinase Inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl Tyrosine Kinases. *J Biol Chem* 278: 4847-4853.

Torasdotter, M., Metsis, M., Henriksson, B.G., Winblad, B., Mohammed, A.H. (1998). Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav Brain Res* 93: 83-90.

Tucker, K. and Fadool, D.A. (2002). Neurotrophin modulation of voltage-gated potassium channels in rat through TrkB receptors is time and sensory experience dependent. *J Physiol* 542: 413-429.

Twamley-Stein, G.M., Pepperkok, R., Ansorge, W., Courtneidge, S.A. (1993). The Src family tyrosine kinases are required for platelet-derived growth factor-mediated signal transduction in NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7696-7700.

Tyler, J., Pozzo-Miller, L.D. (2001). BDNF enhances Quantal Neurotransmitter Release and Increases the Number of Docked Vesicles at the Active Zones of Hippocampal excitatory Synapses. *J Neurosci* 21: 4249-4258.

Valenzuela, C.F., Kazlauskas, A., Brozowski, S.J., Weiner, J.L., Demali, K.A., McDonald, B.J., Moss, S.J., Dunwiddie, T.V., Harris, R.A. (1995). Platelet-derived growth factor receptor is a novel modulator of type A gamma-aminobutyric acid-gated ion channels. *Mol Pharmacol* 48: 1099-1107.

Valenzuela, C.F., Kazlauskas, A., Weiner, J.L. (1997). Roles of platelet-derived growth factor in the developing and mature nervous systems. *Brain Res Brain Res Rev* 24: 77-89.

Valenzuela, C.F., Xiong, Z., MacDonald, J.F., Weiner, J.L., Frazier, C.J., Dunwiddie, T.V., Kazlauskas, A., Whiting, P.J., Harris, R.A. (1996). Platelet-derived growth factor induces a long-term inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function. *J Biol Chem* 271: 16151-16159.

Van-der-Zee, C.E., Ross, G.M., Riopelle, R.J., Hagg, T. (1996). Survival of cholinergic forebrain neurons in developing p75 NGFR-deficient mice. *Science* 274: 1729-1732.

Varmus, H., Hirai, H., Morgan, D., Kaplan, J., Bishop, J.M. (1989). Function, location, and regulation of the src protein-tyrosine kinase. *Princess Takamatsu Symp* 20: 63-70.

Vassbotn FS, Havnen OK, Heldin CH, Holmsen H. (1994). Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J Biol Chem.* 13;269:13874-9.

Vassbotn FS, Ostman A, Siegbahn A, Holmsen H, Heldin CH. (1992). Neomycin is a platelet-derived growth factor (PDGF) antagonist that allows discrimination of PDGF alpha- and beta-receptor signals in cells expressing both receptor types. *J Biol Chem.*;267:15635-41.

Vignais, L., Oumesmar, B.N., Baron-VanEvercooren, AB. (1995). PDGF-alpha receptor is expressed by mature neurones of the central nervous system. *Neuroreport* 6: 1993-1996.

Walker, F., deBlaquiere, J., Burgess, A.W. (1993). Translocation of pp60c-src from the plasma membrane to the cytosol after stimulation by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 268: 19552-19558.

Westermarck, B., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. (1990). Structural and functional aspects of platelet-derived growth factor and its receptors. *Ciba Found Symp* 150: 6-14, discussion 14-22.

Wood, K.W., Qi, H., D'Arcangelo, G., Armstrong, R.C., Roberts, T.M., Halegoua, S. (1993). The cytoplasmic raf oncogene induces a neuronal phenotype in PC12 cells: a potential role for cellular raf kinases in neuronal growth factor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5016-5020.

Wood, L., Stoltz, B.M., Dietrich, H.J., (1995), Total Synthesis of (+)- and (-)-K252a. *J Am Chem Soc.* 117: 10413-14.

Woodrow, S., Bissoon, N., Gurd, J.W. (1992). Depolarization-dependent tyrosine phosphorylation in rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 59: 857-862.

Yokote, K., Hellman, U., Ekman, S., Saito, Y., Ronnstrand, L., Saito, Y., Heldin, C.H., Mori, S. (1998). Identification of Tyr-762 in the platelet-derived growth factor alpha-receptor as the binding site for Crk proteins. *Oncogene* 16: 1229-1239.

Yokote, K., Margolis, B., Heldin, C.H., Claesson-Welsh, L. (1996). Grb7 is a downstream signaling component of platelet-derived growth factor alpha- and beta-receptors. *J Biol Chem* 271: 30942-30949.

Yokote, K., Mori, S., Hansen, K., McGlade, J., Pawson, T., Heldin, C.H., Claesson-Welsh, L. (1994). Direct interaction between Shc and the platelet-derived growth factor beta-receptor. *J Biol Chem* 269: 15337-15343.

Zirrgiebel, U., Ohga, Y., Carter, B., Berninger, B., Inagaki, N., Thoenen, H., Lindholm, D. (1995). Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: involvement of protein kinase C in neuronal survival. *J Neurochem* 65: 2241-2250.

7 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BSA	bovines Serumalbumin
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
Crk	Adapterprotein welches über SH2- und SH3-Domänen verfügt
cSrc	zelluläres Src-Protein (zelluläres Produkt des Onkogens des Rous-Sarkom-Virus)
Drk	"Downstream of "Rezeptor-Kinase
Fyn	Proteintyrosinkinase p59fyn
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDNF	Glial Cell Line derived Neurotrophic Factor
GLDH	Glutamatdehydrogenase
Grb2/7	Growth factor receptor-bound protein 2/7
KCl	Kaliumchlorid
KRH	Krebs-Ringer-Hepes Puffer
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
MAP-Kinase	Mitogen-activating Protein
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
Nck	zytoplasmprotein welches über SH2 und SH3-Domänen verfügt
NGF	Nerve Growth Factor
NT	Neurotrophin
PC12-Zellen	Phaeochromozytom-Zellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PTP1D	Protein Tyrosin Phosphatase PTP1D
PLC gamma	Phospholipase C - gamma
Rab	GTPase der Ras-Familie
Raf	eine Serin-Threonin Kinase

Ras	kleines G-Protein
SDS	Sodiumdodezylsulfat
SH	Src-homolog
Shc	Src homologes und Kollagen-Protein
Sos	Son of Seventhless-Protein
SV2	Protein der synaptischen Vesikel 2
Trk	Tyrosin-Rezeptor-Kinase
V-ATPase	ATPasen der Vesikel der Zellen
vSrc	virales Src-Protein (virales Produkt des Onkogens des Rous-Sarkom-Virus)
ZNS	zentrales Nervensystem

8 Zusammenfassung

8.1 Zusammenfassung

Die neurotrophen Wachstumsfaktoren NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 sowie PDGF, steuern über spezifische Rezeptoren ihre Wirkung an Nervenzellen. Neben Wachstum von Neuronen und deren Differenzierung kommt es durch diese Faktoren aber auch zu weiteren Zellantworten. Eine für die neuronale Aktivität besonders wichtige Antwort ist die Neurotransmitterfreisetzung, da so die neuronale Signaltransduktion gesteuert wird. Als Zellsystem eignen sich zum Studium von Vorgängen der Neurotransmitterfreisetzung Synaptosomen, in denen der nötige Exozytoseapparat vorhanden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nach vorheriger Inkubation von aus Rattenhirn gewonnenen Synaptosomen mit den Neurotrophen NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 eine Zunahme der depolarisationsinduzierten Glutamatfreisetzung erreicht werden kann. Diese ist, wie für BDNF nachgewiesen werden konnte, zeit- und konzentrationsabhängig. Für die Wachstumsfaktoren PDGF-AB und PDGF-BB konnte ein solcher Effekt nicht gezeigt werden. Über welche intrazelluläre Signalkaskade die Wachstumsfaktoren ihre Zellanwort vermitteln, ist noch immer nicht vollständig geklärt. In den Synaptosomen der Ratte befindet sich nur ein inkompletter Proteinbiosyntheseapparat, so dass sie sich für die Studien der Langzeitantwort auf neurotrophe Wachstumsfaktoren nicht eignen. Die Untersuchungen zeigen auf, dass die intrazelluläre Antwort auf Stimulation von Rattensynaptosomen mit den Neurotrophen NGF, BDNF, NT-3 und NT-4, sowie mit den Wachstumsfaktoren PDGF-AB und PDGF-BB über Phosphorylierung von Proteinen an ihren Tyrosinresten vermittelt wird. Dies, so konnte nachgewiesen werden, ist abhängig von der Dauer sowie von der Konzentration der Stimulation der Zellsysteme mit dem Wachstumsfaktor BDNF. Ein während dieser Zellantwort an Tyrosinresten phosphoryliertes Protein ist ein Synaptosomenprotein mit der apparenten Molmasse von 38 kDa. In Immuno-(Western)-Blots sowie mit Hilfe von Immunfällungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Protein um Synaptophysin handelt. Die intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung durch Stimulation von Synaptosomen mit BDNF

unterscheidet sich deutlich von dem nach Depolarisation der Synaptosomen erhaltenen Proteintyrosin-phosphorylierungsmuster.

8.2 Summary

Neurotrophic growth factors like NGF, BDNF, NT-3, NT-4 and PDGF exert their effects by acting on specific receptors on neurons. Neuronal growth and differentiation are evoked by these growth factors. Furthermore, neurotransmitter release is triggered by these growth factors, thereby regulating neuronal signal transduction.

Synaptosomes contain the necessary exocytose system, thus being appropriate to study the mechanisms of neurotransmitter release. In the present work, it has been shown that incubation of rat cerebral synaptosomes with NGF, BDNF, NT-3 and NT4, respectively, increases the depolarization-induced glutamate release. In the case of BDNF, this effect depends on time and concentration of incubation. Moreover, the analysis of PDGF-AB and -BB revealed no change of depolarization-induced glutamate release.

The intracellular signal cascade triggered by growth factors is still not fully understood. Rat cerebral synaptosomes do not contain the complete system necessary for protein biosynthesis, thus being inappropriate for the studies on long-term responses on neurotrophic growth factors. The present investigation shows that the intracellular response on stimulation with NGF, BDNF, NT-3, NT-4, PDGF-AB and PDGF-BB, respectively, is triggered by tyrosine phosphorylation of proteins. In the case of BDNF, this effect is time- and concentration-dependent. During this cellular response a synaptosomal protein with an apparent molar mass of 38 kDa gets phosphorylated at its tyrosine residues. Further experiments demonstrated that this protein is synaptophysin. Intracellular tyrosine phosphorylation by BDNF-triggered synaptosomal stimulation is markedly different from the protein tyrosine phosphorylation pattern evoked by depolarization of synaptosomes.

9 Eigene Veröffentlichungen

1. Appel, N., Decker, K., Eberl, M., Freist, A., Geis, S., Haas, M., Hackl, M., Kost, H., Kriese, J., Krumscheid, R., Linnertz, H., Starke, H., Tyczka, J., Wuhrer, M. (1998) BSE, Creutzfeld-Jakob & Co. oder ist Wahnsinn übertragbar?. Gießen. Kletsmeier
2. Weernink, P.A.O., Schol, M., Presek, P. (1997). Brain-derived neurotrophic factor induces protein tyrosine phosphorylation in rat nerve terminals. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355:Suppl 218.

10 Danksagung

Mein Dank richtet sich in erster Linie an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. P. Presek, dessen Hilfe, Rat und Engagement für mich von hohem Wert waren. Auch seiner Frau Andrea Iffert und seinem Sohn Levin Presek möchte ich für die Wärme, die sie mir und meiner Familie entgegenbrachten, herzlich danken.

Darüberhinaus danke ich den Forschungsgruppen des Rudolf-Buchheim-Instituts, insbesondere Prof. Dr. F. Dreyer und Prof. Dr. H. Teschemacher, deren fachliche Kompetenz, aber vor allem auch deren Empathie mich immer begleiten werden. Danke auch an Petra Kronich, die mir mit ihrem Wissen stets zur Seite stand.

Danken möchte ich auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die mich als Stipendiatin im Rahmen des Graduiertenkollegs für Molekulare Biologie und Pharmakologie gefördert hat.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann André und unseren Kindern, die sich in großer Geduld üben mussten und mich zu jeder Zeit liebevoll unterstützten. Ebenso danke ich meinen Eltern, deren Lebenspartnern und meinen Großeltern, ohne die mein Studium und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären.

11 Lebenslauf

Name: Monica Schol-Tadić, geborene Schol
Geburtstag: 16. August 1973
Geburtsort: Braunfels
Adresse: Otto-Wels-Straße 6, 65439 Flörsheim am Main

SCHULAUSBILDUNG

1979-1984 Grundschule Naunheim, Wetzlar
1984-1990 August-Bebel Gesamtschule, Wetzlar
1990-1993 Goetheschule, Gymnasiale Oberstufe, Wetzlar

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

1993-2000 Studium der Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen, und Université Henri Warembourg, Lille, Frankreich.

1996 Beginn der vorliegenden Arbeit bei Herrn Prof. Dr. P. Presek am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

1997-99 Stipendiatin der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Graduiertenkolleg für Molekulare Biologie und Pharmakologie

BERUFLICHE WEITERBILDUNG

2000-2002 Ärztin im Praktikum, Neurologische Klinik, Städtische Kliniken Frankfurt am Main/Höchst, Chefarzt Prof. Dr. H. J. Schütz

seit 6/2002 Assistenzärztin, Neurologische Klinik, Städtische Kliniken Frankfurt am Main/Höchst, Chefarzt Prof. Dr. H. J. Schütz