

Thorsten Lenhard
Dr.med.

Neuroprotektive und genregulatorische Funktionen von Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in einem *in vitro* Exzitotoxizitätsmodell des Hippokampus

Geboren am 03.11.1966 in Mannheim
Reifeprüfung am 14.06.1986 in Ladenburg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1990 bis SS 1997
Physikum am 25.03.1992 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 27.10.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. K. Unsicker

Der Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) wurde als erster Wachstumsfaktor einer neuen, wachsenden Unterfamilie innerhalb der Transforming growth factor-beta-(TGF- β)-Überfamilie beschrieben. Zunächst wurde seine neurotrophe Wirkung für Motoneurone und dopaminerge Neurone entdeckt. Eine neuroprotektive Bedeutung im Rahmen von Läsionsmodellen wurde später für dopaminerge Neurone, für unterschiedliche axotomierte Neurone und erst kürzlich in einem *in vivo*-Ischämiemodell beschrieben. GDNF vermittelt seine zelluläre Wirkung über einen heteromeren Rezeptorkomplex aus dem Glykosyl-phosphatidyl-inositol-verankerten GDNF-family member receptor alpha-1 (GFR α -1) und dem Protoonkogen c-Ret, einer transmembranären Rezeptortyrosinkinase (RTK).

Ziel der Arbeit war es zunächst, zu untersuchen, ob GDNF auch in einem akut-neurotoxischen *in vitro*-Paradigma eine neuroprotektive Funktion haben würde. Dazu diente ein *in vitro*-Exzitotoxizitätsmodell (Glutamat-vermittelte Toxizität) hippokampaler Neurone. Vorbefunde sprachen bereits für eine biologische Funktion von GDNF bei einer Glutamat-vermittelten Neurotoxizität. FGF-2 diente dabei als Referenzsubstanz. Eine FGF-2-vermittelte Neuroprotektivität nach exzitotoxischer Neuronenschädigung ist weithin akzeptiert. Weiterhin sollte untersucht werden, ob GDNF mit anderen neurotrophen Faktoren kooperiert. Dazu wurde auch die Regulation von GDNF und seinen Rezeptoren in hippokampalen Neuronen durch Wachstumsfaktoren untersucht. Aus Vorbefunden war bekannt, dass FGF-2 die GDNF-mRNA in einer neuronalen Tumorzelllinie hochreguliert.

Basis aller zellbiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen waren hippokampale Neurone, die am 18. Embryonaltag (E18) von Wistar-Ratten präpariert und *in vitro* kultiviert wurden. Wesentlich für das Studium von Wachstumsfaktoreffekten auf hippokampale Neurone war ein serumfreies Kultursystem, das in dieser Arbeit etabliert wurde. Für die zellbiologischen Experimente wurden die mit Wachstumsfaktoren vorbehandelten Kulturen in einer definierten Salzlösung unterschiedlichen toxischen Konzentrationen von Glutamat ausgesetzt. Die Überlebensrate behandelter Neurone (Viabilität) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zweidimensional bestimmt: einerseits wurden NSE-immunreaktive Neurone ausgezählt, andererseits wurde der LDH-Gehalt in den Kulturüberständen enzymkolorimetrisch bestimmt.

Zur Untersuchung einer hippokampalen Regulation von GDNF-mRNA und deren Rezeptoren *in vitro* diente eine kompetitive Polymerase-Kettenreaktion (cRT-PCR) als quantitative Methode. Die dazu benötigten internen Standards (Kompetitoren) wurden aus RT-PCR-Produkten hippokampaler Gesamt-RNA kloniert. Dazu wurde eine sogenannte AT-Klonierungsstrategie verwendet. GDNF wurde mit einem Enzym-gekoppelten Immunnachweis (ELISA) quantifiziert. Mittels Immunoblotting ist eine Regulation von GFR α -1 und c-Ret bestimmt worden. Zur Untersuchung von Phosphorylierungszuständen von Mitgliedern der GDNF/c-Ret-Signaltransduktionskaskade dienten Immunpräzipitations- und Immunblottingexperimente.

Die Regulation von antiapoptotischen Genen durch GDNF und FGF-2 in den hippokampalen Neuronenkulturen wurde mittels einer semiquantitativen PCR-Methode untersucht. Eine Glutamat-induzierte apoptotische Chromatinfragmentierung wurde mit Hilfe des sogenannten „DNA-Ladderings“ bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass GDNF - ähnlich effizient wie FGF-2 - einen Glutamat-medierten Zelltod betroffener Neurone verhindern kann. Beide Faktoren, GDNF und FGF-2, wirken in ihrer Neuroprotektivität nicht nur synergistisch. Vielmehr scheint GDNF für die FGF-2-vermittelten Effekte essentiell zu sein. So konnte die FGF-2-Wirkung durch einen blockierenden anti-GDNF-Antikörper aufgehoben werden. FGF-2 induziert sowohl GDNF als auch GFR α -1 in hippokampalen Neuronenkulturen und scheint sich somit mit GDNF möglicherweise selbst seinen Kooperationspartner zu induzieren. Das Maß der GDNF-Signaltransduktion könnte auf Ebene der Rezeptoren durch die Induktion von GFR α -1 reguliert werden.

Sowohl GDNF als auch FGF-2 regulieren die bcl-2- und die bcl-xL-mRNA, beides antiapoptotische Gene der selben Genfamilie. Die Regulation antiapoptotischer Gene scheint eine gemeinsame Endstrecke der Signaltransduktionskaskaden von GDNF und von FGF-2 zu sein, um einen Glutamat-medierten apoptotischen Neuronentod zu verhindern. Dementsprechend reduzieren beide Faktoren die apoptotische nukleosomale Chromatinfragmentierung nach Glutamatoxizität.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass endogenes, d.h. durch FGF-2 in hippokampalen Neuronen induziertes GDNF, zu einer Erk- und Akt-Phosphorylierung führt (Kinasen des GDNF/c-

Ret-Signaltransduktionsweges: Akt/PI3-Kinaseweg, Erk/MAP-Kinaseweg). Diese Phosphorylierung konnte durch einen GDNF-blockierenden Antikörper unterbunden werden. Die Aktivierung des MAP-Kinaseweges (Erk) steigert die transkriptionelle Aktivität von Neuronen und könnte für die Induktion der Gene der bcl-Familienmitglieder verantwortlich sein. Die Akt-Phosphorylierung hingegen führt ihrerseits zur Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine, u.a auch zu einer Deaktivierung proapoptotischer Mediatoren (z.B. Bad). So reguliert GDNF einerseits über bcl-2/-xL antiapoptotische Gene positiv und über Akt proapoptotische Mediatoren negativ und scheint so die Überlebenswahrscheinlichkeit Glutamat-geschädigter Neurone zu erhöhen.

In der Zusammenschau der Ergebnisse wurde in dieser Arbeit nicht nur gezeigt, dass GDNF eine neuroprotektive Wirkung auf einen Glutamat-medierten Neuronentod hat. Vielmehr scheint GDNF für die lange bekannte FGF-2-Neuroprotektivität essentiell zu sein. Möglicherweise stellen beide Faktoren in ihrer Beziehung zueinander einen Teil eines *in vivo* wirksamen „Netzwerkes“ unterschiedlich ineinandergreifender neuroprotektiver Faktoren dar. Beide regulieren Elemente der Apoptose und scheinen so insbesondere nach exzitotoxischer Neuronenschädigung den programmierten Zelltod zu verhindern. Hier eröffnen sich für die Zukunft interessante Ansatzmöglichkeiten, antiapoptotisch wirkende Wachstumsfaktoren, möglicherweise in Kombination mit anderen Pharmaka, im klinischen Einsatz auf ihre therapeutische Wirksamkeit nach ischämischer Hirnschädigung zu prüfen.