

Prisca-Maryla Henheik

Dr. sc. hum.

Identifizierung und Charakterisierung von GDNF und TGF- β 1 als neurotrophe Komponenten sekretorischer Speicherorganellen boviner chromaffiner Zellen

Geboren am 17.08.1962 in Ebstorf

Reifeprüfung am 14.05.1981 in Dannenberg

Studiengang der Fachrichtung Chemie Diplom vom WS 1981 bis SS 1994

Vordiplom am 16.02.1989 an der Universität Göttingen

Diplom am 06.05. 1994 an der Universität Göttingen

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. K. Unsicker

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die neurotrophe Aktivität isoliert aus den sekretorischen Speicherorganellen boviner chromaffiner Zellen bzw. freigesetzt nach cholinergem Stimulation kultivierter chromaffiner Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren.

Die Isolierung der für die neurotrophe Aktivität verantwortlichen Proteine wurde mit proteinchemischen Reinigungsmethoden versucht. Bei allen Aufreinigungsschritten diente der hochspezifische Assay an Ciliarganglien-Neuronen als Kontrolle für eine mögliche Anreicherung der neurotrophen Aktivität. Zunächst sollte eine möglichst vollständige Trennung der neurotrophen Aktivität von Chromogranin A, der Hauptkomponente des Proteingemisches chromaffiner Granula, erzielt werden. Dies wurde mit Hilfe von zwei Trennverfahren, der präparativen isoelektrischen Fokussierung und der Affinitäts-Chromatographie an Heparin-Sepharose, erreicht. Die isoelektrische Fokussierung charakterisierte basische Proteine, die im pH-Bereich von 9,0 bis 9,2 fokussierten, als neurotroph. Bei der Affinität der neurotrophen Aktivität zu Heparin handelte es sich um eine lockere Bindung, die bereits durch 0,6 M NaCl eluiert wurde. Darüberhinaus ergab die Inkubation mit N-Glykosidase F eine Verschiebung der Molekulargewichte der Proteine, so daß auf ein Vorhandensein von Glykoproteinen geschlossen werden konnte. Bei den sich anschließenden Aufreinigungsversuchen war jedoch keine neurotrophe Aktivität mehr zu detektieren. Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, daß zwei

synergistisch wirkende Faktoren nur gemeinsam eine neurotrophe Aktivität aufwiesen. Die verschiedenen proteinchemischen Methoden führten zur Trennung der Komponenten und daher immer zum Verlust der neurotrophen Aktivität.

Für zwei von chromaffinen Zellen synthetisierte Wachstumsfaktoren, TGF- β 1 und GDNF, konnte durch Immunpräzipitation und anschließendem Western Blot die Lokalisation in chromaffinen Granula und deren Freisetzung in das Kulturmedium kultivierter chromaffiner Zellen nach cholinergem Stimulus gezeigt werden. Der Freisetzungsmodus schien Calcium-abhängig zu sein, da einerseits die Blockade der Calciumkanäle durch Verapamil die Carbachol-stimulierte Freisetzung beider Faktoren reduzierte und andererseits die Gabe eines Calcium-Ionophors zur Freisetzung der Faktoren ausreichte.

Der Nachweis, daß es sich bei diesen in chromaffinen Granula lokalisierten Wachstumsfaktoren, TGF- β 1 und GDNF, um die für die neurotrophe Aktivität verantwortlichen gesuchten Proteine handelte, gelang durch die fast vollständige Neutralisation der Aktivität an Ciliarganglien-Neuronen von GDNF und TGF- β 1 im Proteingemisch chromaffiner Granula, durch für diese Faktoren spezifische Antikörper.

Als Gegenprobe wurden die gereinigten rekombinanten Proteine getestet. TGF- β 1 und GDNF hatten einzeln appliziert keinen überlebensfördernden Effekt auf Ciliarganglien-Neurone. Die kombinierte Gabe von beiden Faktoren resultierte in einer CNTF-vergleichbaren Aktivität. Dieser Synergismus von TGF- β und GDNF konnte in vitro nicht nur für das Überleben von Ciliarganglien-Neuronen, sondern auch für Spinalganglien-Neurone und auch für die sympathischen Neurone des Grenzstrangs des Hühnchens gezeigt werden.

Als dem Synergismus zugrundeliegender molekularer Mechanismus wurde der Einfluß von TGF- β auf die GPI-Verankerung des Alpha-Rezeptors (GFR- α) von GDNF untersucht. TGF- β schien an der Bereitstellung des GFR- α beteiligt zu sein.

Zusammenfassend kann man sagen, daß es im Rahmen dieser Dissertation gelungen ist, die für die neurotrophe Aktivität verantwortlichen Proteine im Proteingemisch chromaffiner Granula als die in Synergie agierenden Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und GDNF zu identifizieren.