

**Untersuchungen von intrazellulären Signalwegen
bei neuraler Determinierung und Differenzierung *in vitro*:
Einfluß von GAP-43 und Bcl-2**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
vorgelegt von

Christina Esdar
geb. in Rahden/Westfalen

Mainz, 2000

Dekan: Prof. Dr. J. Markl

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.03.1997 bis zum 24.01.2000 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. A. Maelicke am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des Fachbereichs Medizin unter Betreuung von Herrn Privatdozent Dr. T. Herget angefertigt.

***" What is perhaps the most intriguing question of all is
whether the brain is powerful enough
to solve the problem of its own creation."***

Gregor Eichele, 1992

Meinen Eltern gewidmet.

Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt Herrn Dr. Thomas Herget. Durch seine grundlegenden Ideen sowie durch seine stetige Bereitschaft zu kritischen aber auch fruchtbaren Diskussionen hat er versucht, mir die Wissenschaft nahezubringen, und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. A. Maelicke danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seinem Labor durchführen zu können sowie für sein entgegengebrachtes Interesse und wertvolle Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. G. Technau danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie.

Dem Fonds der chemischen Industrie danke ich für die Gewährung eines Chemiefonds-Stipendiums für Doktoranden.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Ingrid Koziollek-Drechsler für ihr großes Engagement sowie für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Frau Helga Taschner und Frau Dr. Danuta Dormann danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei allen technischen Fragen und Problemen.

Bei meinen Mitstreitern im Labor Silke, Georg, Marek, Nicole und Carola bedanke ich mich ganz herzlich für den großen Zusammenhalt, für viele aufmunternde Worte und für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die mir in bester Erinnerung bleiben wird.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe dafür bedanken, daß aufgrund der gegenseitigen Unterstützung sowie der selbstverständlichen Hilfsbereitschaft stets eine positive Stimmung herrschte.

Für ihre Freundschaft danke ich ganz besonders Anja, Backo, Christian, Ivana, Manfred, Sascha und Tiziana.

Meinen Eltern sowie meiner Schwester Claudia, die mich während der letzten Jahre mit ihrer Fürsorge begleitet und uneingeschränkt unterstützt haben, danke ich von ganzem Herzen.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMCA	Aminomethylcoumarin
Amp.	Ampicillin
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BBS	BES-gepufferte Kochsalzlösung
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BES	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Choloamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Ci	<i>Curie</i> (1Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel)
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Zählereignis pro Minute
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
Cy3	Indocarbocyanin
Da	<i>Dalton</i>
dbcAMP	cyclisches Dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphat
DAB	Diaminobenzamidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSP	Dithiobis(succinimidyl propionat)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	Embryonales Karzinom
ECL	<i>enhanced</i> Chemilumineszenz
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Serum fötaler Rinder (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL2	<i>fluorescence light 2</i> (Licht der Wellenlänge 585 nm)
FSC	Partikelgröße (<i>forward scatter</i>)
g	Erdbeschleunigung [$9,8 \text{ m/s}^2$]
GAP-43	<i>growth associated protein of 43 kDa</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
HMWS	Proteinstandard für hohe Molekulargewichtsbereiche (<i>high molecular weight standard</i>)
HS	Hoch-Salz (<i>high salt</i>)

Ig	Immunglobulin
IPG	Immobilon pH Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria & Bertani</i>
LFMP	Magermilchpulver (<i>low fat milk powder</i>)
LMWS	Proteinstandard für niedrige Molekulargewichtsbereiche (<i>low molecular weight standard</i>)
LS	Niedrig-Salz (<i>low salt</i>)
mAk	monoklonaler Antikörper
MARCKS	<i>myristoylated alanine-rich C kinase substrate</i>
min.	Minute(n)
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NCNF	<i>neuronal cell nuclear factor</i>
NTA	<i>Nitrilotriacetic Acid</i>
OD	optische Dichte
p.a.	zur Analyse (<i>per analysis</i>)
pAS	polyklonales Antiserum
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Phorbolsterdibutyrat
pd(N) ₆	zufällig zusammengesetzte Hexanukleotide (<i>phospho-deoxy-hexanucleotides</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pl	isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)-natriumsalz
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RA	<i>all-trans</i> Retinsäure
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Svedbergeinheit
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sek.	Sekunde(n)
SSC	Partikelgranularität (<i>sideward scatter</i>)
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen-diamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
ü.N.	über Nacht
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
WGA	Weizenkeimagglutinin (<i>wheat germ agglutinin</i>)
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I	Einleitung	
1.	Neurale Entwicklung	1
1.1	Proteinkinase C und neurale Differenzierung	1
1.2	GAP-43 ("growth associated protein of 43 kDa")	2
1.2.1	Biochemische Eigenschaften von GAP-43	2
1.2.2	GAP-43 und neurale Differenzierung	3
1.2.3	GAP-43 und Signaltransduktion	5
2.	Apoptose der programmierte Zelltod	6
2.1	Neurale Apoptose	7
2.2	Bcl-2 ("break chromosome locus-2")	8
2.2.1	Biochemische Charakterisierung von Bcl-2	8
2.2.2	Expression und Funktion von Bcl-2 im Nervensystem	8
3.	Das PCC7-Mz1-Zellmodell	10
3.1	Subklone der PCC7-Mz1-Zellen	12
3.2	RA-induzierte Signalwege in PCC7-Mz1-Zellen	12
4.	Problemstellung und Durchführung	14
II	Material und Methoden	
1.	Material	17
1.1	Chemikalien und andere Reagenzien	18
1.1.1	Zellbiologische Arbeiten	18
1.1.2	Molekularbiologische Arbeiten	19
1.1.3	Proteinbiochemische Arbeiten	20
1.2	Standardpuffer und Kulturmedien	21
1.3	Radioaktive Materialien	22
1.4	Antikörper und Seren	22
1.4.1	Primärantikörper für Western-Blot Analysen	22
1.4.2	Primärantikörper für Immunfluoreszenzanalysen	23
1.4.3	Sekundärantikörper	23
1.5	Primer und Desoxyribonukleotide	23
1.6	Bakterienstamm	24
1.7	Vektoren	24
1.7.1	pcDNA3-Bcl-2	24
1.7.2	pcDNA3-SV40-Bcl-2	25
1.7.3	pcDNA3-SV40-GAP-43	25
1.8	Zelllinien	25
1.8.1	PCC7-Mz1	25
1.8.2	PCC7-MzN	25
1.8.3	Swiss 3T3-Fibroblasten	25
1.8.4	COS-1 Zellen	25

2.	Zellbiologische Methoden	26
2.1	Kultivierung der Zelllinie PCC7-Mz1 und ihrer Varianten	26
2.2	Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen und ihrer Varianten	26
2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	27
2.4	Fixierung von PCC7-Mz1-Zellen	28
2.5	Immunfluoreszenzanalyse von PCC7-Mz1-Zellen	28
2.6	DNA-Synthese Assay	29
2.7	Aufbringen von PCC7-Mz1-Zellen auf Adhäsionsobjektträger	30
2.8	Transiente Transfektion	30
2.9	Stabile Transfektion von PCC7-Mz1-Zellen	31
2.10	WST-1 Test	32
2.11	Durchflußcytometrie	32
2.12	<i>In vivo</i> Markierung von PCC7-Mz1-Zellen mit Orthophosphat	33
2.13	<i>In vivo</i> Markierung von PCC7-Mz1-Zellen mit Palmitinsäure	34
3.	Molekularbiologische Methoden	35
3.1	DNA-Klonierung	35
3.1.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	35
3.1.2	Restriktionsspaltung von DNA	35
3.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
3.1.4	Dephosphorylierung von Vektoren	36
3.1.5	Ligation von DNA	37
3.2	Herstellung kompetenter Bakterien	37
3.3	Transformation kompetenter Bakterien	38
3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	38
3.4.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	38
3.4.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	39
3.5	Northern-Blot Analyse	40
3.5.1	Präparation von Gesamt-RNA	40
3.5.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	41
3.5.3	Northern-Blot Transfer	42
3.5.4	Radioaktive Markierung von DNA-Proben	42
3.5.5	Hybridisierung von Northern-Blot Membranen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	43
3.6	Primer Extension Analysen	44
3.6.1	Isolierung von poly-(A) ⁺ -RNA	44
3.6.2	Radioaktive Markierung der Primer	45
3.6.3	Hybridisierung und Primer Extension Reaktion	45
3.6.4	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	46
3.7	Qualitative Analyse von Apoptose	46
3.7.1	DNA-Extraktion	46
3.7.2	Gelelektrophorese zur Analyse von DNA-Leiternmustern	47
3.8	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	47
3.8.1	Herstellung von cDNA	47
3.8.2	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR	48
4.	Proteinbiochemische Methoden	50
4.1	Western-Blot Analyse	50
4.1.1	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
4.1.2	Protein-Transfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen	52

4.1.3	Immunfärbung der Protein-Membran und "enhanced" Chemilumineszenz (ECL)-Nachweis	53
4.1.4	Coomassie Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen und PVDF-Membranen	53
4.2	Protein-Extraktion aus Säuger-Zellen	54
4.3	Fraktionierung von Zellextrakten in Cytoplasma- und Membran-Fraktion	55
4.4	Fraktionierung von Zellextrakten in S100- und Mitochondrien-Fraktion	56
4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	56
4.6	Immunpräzipitation	57
4.7	Nachweis von Glykoproteinen	58
4.8	" <i>in vivo</i> Cross-linking" Assay	59
4.9	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gel)	60
4.9.1	Vorbereitung der Zellextrakte	60
4.9.2	Isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE	61

III Ergebnisse

1.	Rolle von GAP-43 bei der neuronalen Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen	62
1.1	Expression von GAP-43 während der RA-induzierten Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen	65
1.1.1	Expression auf mRNA-Ebene	62
1.1.2	Die beiden GAP-43 mRNAs werden durch zwei verschiedene Promotoren generiert	62
1.1.3	Expression auf Protein-Ebene	65
1.1.4	Zelluläre Lokalisation von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen	65
1.1.5	Expression von GAP-43 in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen	68
1.1.6	GAP-43 als PKC-Substrat in neuronalen Vorläuferzellen	68
1.2	Herstellung stabil transfizierter Mz-GAP-43 Klone	71
1.2.1	Klonierung des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3-SV40-GAP-43	71
1.2.2	Transiente Transfektion von GAP-43 in COS-1 Zellen	72
1.2.3	Stabile Transfektion von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen	73
1.2.4	Expression von GAP-43 in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9	74
1.3	Biochemische Charakterisierung von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen und in Mz-GAP-43 Klonen	77
1.3.1	Subzelluläre Lokalisierung von GAP-43	77
1.3.2	GAP-43 wird nach PKC-Phosphorylierung nicht transloziert	78
1.3.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese des GAP-43 Proteins	79
1.3.4	GAP-43 ist palmitoyliert	81
1.3.5	GAP-43 wird nicht glykosyliert	82
1.4	GAP-43 interagiert mit Calmodulin	85
1.5	Einfluß von GAP-43 auf die neurale Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen	90
1.5.1	Differenzierungspotential der Mz-GAP-43 Klone	90
1.5.2	Expression von Markermolekülen in Mz-GAP-43 Klonen	93
1.5.3	Reifung der Neurone der Mz-GAP-43 Klone	95

	Seite	
1.5.4	Expression des Transkriptionsfaktors NCNF in den Mz-GAP-43 Klonen	97
1.5.5	Mz-GAP-43 Klone werden durch Laminin nicht in den P-Phänotyp revertiert	98
2.	Einfluß von Bcl-2 auf die RA-induzierte Differenzierung und Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen	101
2.1	Expression von Bcl-2 in PCC7-Mz1-Zellen	101
2.2	Herstellung und Charakterisierung stabil transfizierter Mz-Bcl-2 Klone	102
2.2.1	Klonierung des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3-SV40-Bcl-2	102
2.2.2	Stabile Transfektion von Bcl-2 in PCC7-Mz1-Zellen	103
2.2.3	Expression von Bcl-2 in differenzierenden Zellen	105
2.2.4	Vergleich zwischen CMV- und SV40-Promoter kontrollierter Bcl-2 Expression	106
2.3	Regulation des apoptotischen Programms durch Bcl-2	108
2.3.1	Bcl-2 reduziert die RA-induzierte Apoptose	108
2.3.2	Bcl-2 senkt die Caspase-Aktivität	110
2.3.3	Bcl-2 blockiert die RA-induzierte Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien	111
2.3.4	Bcl-2 inhibiert den Ceramid-induzierten Zelltod	112
2.3.5	Bcl-2 vermittelt Schutz gegen verschiedene apoptotische Stimuli	114
2.4	Bcl-2 reguliert den Zellzyklus der PCC7-Mz1-Zellen	115
2.4.1	Wachstumskurven der Mz-Bcl-2 Klone	115
2.4.2	Generationszeiten von PCC7-Mz1-Zellen und Mz-Bcl-2 Klonen	116
2.4.3	Bcl-2 beeinflusst die G1/G0-Phase der PCC7-Mz1-Zellen	120
2.4.4	Die Bcl-2 Überexpression führt zur Aktivierung des Retinoblastoma-Proteins	122
2.5	Einfluß von Bcl-2 auf die neurale Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen	124
2.5.1	Differenzierungspotential der Mz-Bcl-2 Klone	124
2.5.2	Expression neuronaler Markerproteine in Mz-Bcl-2 Klonen	126
2.5.3	Morphologie der Neurone der Mz-Bcl-2 Klone	129
IV	Diskussion	
1.	Frühe Expression von GAP-43 während der neuronalen Entwicklung	132
2.	GAP-43 fördert die Ausprägung des neuronalen Phänotyps von PCC7-Mz1-Zellen	134
3.	Multiple Effekte von Bcl-2 während der frühen neuronalen Entwicklung	137
3.1	Bcl-2 inhibiert Apoptose in pluripotenten neuronalen Vorläuferzellen	137
3.2	RA induziert in PCC7-Mz1-Zellen den mitochondrialen Apoptose Signalweg	140
3.3	Bcl-2 verlängert den Zellzyklus neuronaler Vorläuferzellen	142
3.4	Einfluß von Bcl-2 auf die neurale Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen	143

	Seite	
3.4.1	Das Differenzierungspotential wird durch Bcl-2 nicht verändert	143
3.4.2	Mz-Bcl-2 Kulturen enthalten weniger Neurone	144
3.4.3	Veränderte Morphologie der Neurone durch Bcl-2	145
4.	Ausblick	147
V	Zusammenfassung	150
VI	Literaturverzeichnis	152

I Einleitung

1. Neurale Entwicklung

Das zentrale Nervensystem (ZNS) höherer Säugetiere stellt eines der komplexesten sowie hoch organisiertesten Systeme der Natur dar und wird aus mehr als 10^{12} Neuronen sowie 5 bis 10-mal mehr glialen Zellen gebildet (MCKAY, 1989; HE & ROSENFELD, 1991; STRUHL, 1991). Während der embryonalen Gehirnentwicklung entstehen aus pluripotenten Stammzellen des Neuroektoderms eine Vielzahl an spezialisierten neuronalen und glialen Zelltypen. Die Zelldiversifizierung und Spezifizierung dieser pluripotenten Stammzellen zum endgültig differenzierten, reifen Phänotyp verläuft über mehrere determinierende Entwicklungsstadien, in denen das Proliferations- und Differenzierungspotential der Zellen immer weiter restringiert wird (TEMPLE & QIAN, 1996). Die Kontrolle dieser Differenzierungsprozesse erfolgt sowohl durch Signale aus der Umgebung als auch durch intrinsische Regulationsmechanismen, die bis jetzt jedoch noch wenig verstanden sind.

Durch die Untersuchungen von an der neuralen Entwicklung beteiligten intrazellulären Signalwegen wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, einen Beitrag zur weiteren Aufklärung der molekularen Mechanismen der Vertebraten-Gehirnentwicklung zu leisten.

1.1 Proteinkinase C und neurale Differenzierung

Durch äußere Einflüsse aktivierte, zelluläre Signaltransduktionsprozesse sind entscheidend an der Regulation neuraler Entwicklung beteiligt, wobei den Mitgliedern der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase C (PKC)-Genfamilie eine wichtige Rolle zugesprochen wird. Das zentrale Nervensystem der Säuger stellt das einzige Gewebe dar, das alle bisher klonierten 11 PKC-Isoformen exprimiert. Eine neuronenspezifische Funktion von PKC konnte bisher für verschiedene Prozesse wie Langzeitpotenzierung (LTP) (LOVINGER & ROUTTENBERG, 1988; SON *et al.*, 1996), Langzeitdepression (LTD) (LINDEN & CONNER, 1991), Neuritenwachstum (HUNDLE *et al.*, 1995), Modulation der neuronalen Plastizität (ROUTTENBERG, 1985; BIEWENGA *et al.*, 1996), Neurotransmitterausschüttung (DEKKER *et al.*, 1989; ZAMPONI *et al.*, 1997), synaptische Signaltransmission (SWARTZ *et al.*, 1993) sowie Kontrolle von Differenzierung (TANAKA & NISHIZUKA, 1994) und Apoptose (MAILHOS *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Da über die genauen molekularen Mechanismen, die zwischen der Aktivierung von PKC und der daraus resultierenden zellulären Antwort ablaufen, jedoch noch wenig bekannt ist, bietet die Untersuchung von PKC Substraten eine Möglichkeit, die Beteiligung von PKC an neuralen Entwicklungsvorgängen mechanistisch zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluß des neuronenspezifischen PKC Substrats GAP-43 auf neurale Determinierungs- und Differenzierungsprozesse untersucht.

1.2 GAP-43 ("growth associated protein of 43 kDa")

GAP-43 - auch als B-50, Neuromodulin, F1, p57, pp46 bezeichnet - ist ein an der präsynaptischen Plasmamembran assoziiertes Phosphoprotein, das eines der Hauptsubstrate für die Proteinkinase C (PKC) im Gehirn darstellt. Eine besonders starke GAP-43-Expression läßt sich während der neuronalen Entwicklung (BIFFO *et al.*, 1990; DANI *et al.*, 1991) sowie während Regenerationsprozessen reifer Neurone (CAMPBELL *et al.*, 1991; SCHADEN *et al.*, 1994) nachweisen. In adulten, terminal differenzierten Neuronen wird GAP-43 dagegen meistens nur noch schwach exprimiert. Die Diversität der experimentellen Ansätze, bei denen GAP-43 bis Mitte der achtziger Jahre zunächst unter verschiedenen Namen identifiziert wurde, lieferte erste Indizien für die wichtige Bedeutung, die GAP-43 für die physiologische Funktion des Nervensystems besitzt. Nach der Klonierung der cDNA konnte dann gezeigt werden, daß es sich bei den unterschiedlichen Untersuchungen jeweils um das gleiche Protein handelt (BENOWITZ & ROUTTENBERG, 1987). GAP-43 liegt im Genom als singuläres ("single copy") Gen vor (BASI *et al.*, 1987), das etwa 50 kb groß ist und aus 3 Exons besteht (GRABCZYK *et al.*, 1990; NEDIVI *et al.*, 1992).

1.2.1 Biochemische Eigenschaften von GAP-43

Bei GAP-43 handelt es sich um ein hydrophiles, saures Protein mit einem pI-Wert von 4,5, das hitze- sowie alkalistabil ist. Die Sequenz von GAP-43 ist innerhalb der verschiedenen Spezies hochkonserviert und speziesabhängig 226 bis 247 Aminosäuren lang. Obwohl die cDNA für ein Protein von etwa 23 kDa kodiert, weist GAP-43 in der SDS-PAGE eine apparente molekulare Masse von etwa 43 kDa auf. Aufgrund der ungewöhnlichen Aminosäurezusammensetzung - GAP-43 enthält kaum hydrophobe dafür aber ungewöhnlich viele saure Aminosäuren (25%) und viele Alanin-Reste (17%) - liegen viele Ladungen im Protein vor (MASURE *et al.*, 1986), die zu einer schwächeren SDS-Bindung und damit zu dem anormalen Laufverhalten in der SDS-PAGE führen (BENOWITZ *et al.*, 1987).

Die Hauptfunktionsdomäne von GAP-43 liegt aminoterminal (Aminosäuren 1-56) (GISPEN *et al.*, 1991) und ist für die Membranbindung des Proteins verantwortlich (Abb. 1). Die schwache Hydrophobizität dieser Domäne reicht jedoch für die Verankerung des Proteins an die Membran nicht aus. Die posttranslationale Palmitylierung der Cysteinreste 3 und 4 (SKENE & VIRAG, 1989) ist dagegen für die Membranbindung mitverantwortlich (ZUBER *et al.*, 1989a). Der aminoternale Bereich des Proteins enthält außerdem die Phosphorylierungsstelle für PKC (Serin⁴¹) (APEL *et al.*, 1990; OEHRLEIN *et al.*, 1996) sowie eine 12 – 15 Aminosäure lange IQ-Domäne, die die Bindung von Calmodulin ermöglicht (ALEXANDER *et al.*, 1988; CHAPMAN *et al.*, 1991). Anhand von massenspektroskopischen Analysen konnten zudem die Aminosäuren Threonin⁸⁷ und Serin¹⁵² als Phosphorylierungsstellen für Prolin-gerichtete Proteinkinasen, zu denen u.a. die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) zählen, identifiziert werden

(TANIGUCHI *et al.*, 1994). Desweiteren wurde *in vitro* eine Phosphorylierung von GAP-43 durch die Casein Kinase II am Serin¹⁹² und Serin¹⁹³ beschrieben (PISANO *et al.*, 1988; APEL *et al.*, 1991), deren physiologische Funktion jedoch noch unbekannt ist.



Abb. 1: Schematische Darstellung von GAP-43

Die ersten 56 Aminosäuren bilden die hydrophobe Effektordomäne von GAP-43, über die das Protein mit der Membran assoziiert. Durch die Palmitylierung der Cysteine 3 und 4 wird die Membranverankerung verstärkt. Der Serinrest 41 wird von PKC phosphoryliert. Zusätzlich liegt im Bereich der PKC-Phosphorylierungsstelle eine IQ-Domäne, die für die Bindung von Calmodulin verantwortlich ist.

1.2.2 GAP-43 und neurale Differenzierung

Die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen weisen darauf hin, daß GAP-43 eine wichtige Rolle beim Wachstum sowie der Wegfindung axonaler Ausläufer besitzt und modulierend in die Verknüpfungen der neuronalen Ausläufer involviert ist (BIEWENGA *et al.*, 1996; BENOWITZ & ROUTTENBERG, 1997). So wird GAP-43 während der neuronalen Entwicklung und während Regenerationsprozessen nach der Synthese rasch in axonale Neurite transportiert (SKENE & WILLARD, 1981; GOSLIN *et al.*, 1990), wo es zur Akkumulierung an der Plasmamembran axonaler Wachstumskegel kommt (GOSLIN & BANKER, 1990). Die ektopische Expression von GAP-43 in der Pheochromocytoma-Zelllinie PC12 führt nach NGF ("Neuronal Growth Factor")-Induktion zu einer verstärkten Ausbildung neuronaler Ausläufer (YANKNER *et al.*, 1990), und in nicht-neuronalen Zelllinien (COS, NIH 3T3) bewirkt die ektopische Expression von GAP-43 sogar die Entstehung von Filopodien (ZUBER *et al.*, 1989b). GAP-43 scheint jedoch nicht essentiell für die Initiation des Neuritenwachstums zu sein, da in einem GAP-43-defizienten PC12-Subklon die Neuritenausbildung durch NGF noch induzierbar ist (BAETGE & HAMMANG, 1991). Daß GAP-43 demnach eher eine regulatorische und modulierende Funktion in den Wachstumskegeln sich entwickelnder Ausläufer besitzt, wurde *in vitro* an Primärkulturen sensorischer Neurone gezeigt. Die Herunterregulation von GAP-43 mittels GAP-43 antisense-

Oligonukleotiden führt zur Entwicklung von dünnen neuronalen Ausläufern mit atrophierten Wachstumskegeln (AIGNER & CARONI, 1993; AIGNER & CARONI, 1995). Auch die Analyse von Mäusen, bei denen das GAP-43 Gen ausgeschaltet wurde, weist auf eine modulatorische GAP-43 Funktion bei der Gehirnentwicklung hin. Während der Embryogenese kommt es zu falschen synaptischen Verknüpfungen und zur fehlerhaften Wanderung axonaler Ausläufer, da bestimmte Orientierungssignale in den Wachstumskegeln nicht richtig verarbeitet werden. Diese Hirndefekte sind für die stark eingeschränkte Lebensfähigkeit homozygoter Mutanten verantwortlich. Nur etwa 10% der Tiere überleben die ersten drei Wochen nach der Geburt (STRITTMATTER *et al.*, 1995). In transgenen Mäusen mit einer Überexpression von GAP-43 treten spontane Spreizungen und Verzweigungen ("sprouting") in den Ausläufern reifer Neurone auf, weshalb GAP-43 eine wichtige Rolle für die Umsetzung intrinsischer Wachstumssignale zugesprochen wird (AIGNER *et al.*, 1995).

Die Einflüsse von GAP-43 auf das Wachstum und die Entwicklung axonaler Ausläufer scheinen durch die Regulation der Cytoskelett-Organisation vermittelt zu werden. So konnte gezeigt werden, daß GAP-43 mit einigen Proteinen des Cytoskeletts wie Aktin (MOSS *et al.*, 1990; ESDAR, 1996; HE *et al.*, 1997) und Fodrin (RIEDERER & ROUTTENBERG, 1999) interagieren kann. Während die GAP-43 Expression in den meisten Regionen des adulten Säugergehirns abnimmt, läßt sich noch eine hohe Menge an GAP-43 in assoziativen Bereichen wie dem Neocortex, den Pyramidalzellen des Hippocampus sowie dem limbischen System nachweisen (NEVE *et al.*, 1988; MEBERG *et al.*, 1991). Dieses Expressionsmuster weist auf eine Beteiligung von GAP-43 an Prozessen neuronaler Plastizität hin. So scheint phosphoryliertes GAP-43 in die Aufrechterhaltung von hippocampalen Langzeitpotentialen involviert zu sein (MEBERG *et al.*, 1993; SHEU *et al.*, 1993; NAMGUNG *et al.*, 1997). Desweiteren konnte eine Regulation der Neurotransmitter-Freisetzung durch phosphoryliertes GAP-43 gezeigt werden. Antikörper, die gegen die PKC Phosphorylierungsstelle von GAP-43 gerichtet sind, inhibieren die Ca^{2+} -induzierte Ausschüttung von Noradrenalin (DEKKER *et al.*, 1989; HENS *et al.*, 1995) sowie Glutamat (HENS *et al.*, 1997) aus Synaptosomen.

Die Ergebnisse neuerer Arbeiten weisen jedoch darauf hin, daß GAP-43 nicht nur in die Ausbildung und Verzweigung neuronaler Ausläufer involviert ist, sondern auch schon an früheren Ereignissen des neuronalen Differenzierungsprozesses beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, daß GAP-43 *in vitro* und *in vivo* schon sehr früh während der neuralen Differenzierung in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird und dort bereits funktionell ist (ESDAR *et al.*, 1999a). Zudem konnte in der Embrokarzinomzelllinie P19 demonstriert werden, daß durch die Ausschaltung des GAP-43 Gens die Entstehung neuronaler Phänotypen inhibiert wird (MANI *et al.*, 2000).

1.2.3 GAP-43 und Signaltransduktion

GAP-43 ist ein Hauptsubstrat für PKC im zentralen Nervensystem und scheint in bedeutende neuronale Signaltransduktionsprozesse involviert zu sein. Das Protein enthält nur eine einzige Phosphorylierungsstelle für PKC in Position Serin⁴¹ (APEL *et al.*, 1990; NIELANDER *et al.*, 1990), wobei gezeigt werden konnte, daß alle bisher identifizierten konventionellen und neuen PKC-Isoformen GAP-43 *in vitro* phosphorylieren können (OEHRLEIN *et al.*, 1996). Die Funktion von GAP-43 wird entscheidend durch die PKC vermittelte Phosphorylierung reguliert. So konnte durch Mutationen der PKC Phosphorylierungsstelle sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert werden, daß nur phosphoryliertes GAP-43 modulierend am Wachstum und der Verzweigung von Neuriten beteiligt ist (WIDMER & CARONI, 1993; AIGNER *et al.*, 1995).

Zwei bedeutende zelluläre Signalwege können durch GAP-43 kontrolliert werden. Zum einen werden durch die Bindung von Calmodulin (ALEXANDER *et al.*, 1987; CHAPMAN *et al.*, 1991; CHAO *et al.*, 1996) Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Prozesse beeinflusst (CHAKRAVARTHY *et al.*, 1999). Die Affinität von GAP-43 für Calmodulin wird durch PKC-Phosphorylierung sowie durch Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gesenkt (ALEXANDER *et al.*, 1988; APEL *et al.*, 1990). Eine Beteiligung von GAP-43 und Calmodulin an einer potentiellen Signalkaskade in axonalen Nervenendigungen wird folgendermaßen diskutiert: Die Depolarisierung der präsynaptischen Membran bewirkt einen Einstrom von Ca²⁺-Ionen durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle, wodurch PKC aktiviert und GAP-43 phosphoryliert wird. Die erhöhte Freisetzung von Calmodulin führt dann zur Stimulierung der Calmodulin abhängigen Kinase II, die durch die Phosphorylierung von Synapsin die Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln initiiert (BENFENATI *et al.*, 1992; CECCALDI *et al.*, 1995). GAP-43 fungiert somit als ein Speicher für Calmodulin in axonalen Nervenendigungen (SKENE, 1990).

Desweiteren ist GAP-43 in den Wachstumskegeln als ein endogener Regulator des G_o-Proteins, welches im Gehirn das häufigste G-Protein darstellt, beschrieben worden (STRITTMATTER *et al.*, 1992). G-Proteine werden von integralen Membranrezeptoren aktiviert und vermitteln in ihrem GTP-gebundenen Zustand die Signalweiterleitung in der Zelle. GAP-43 wirkt am G_o-Protein als intrazellulärer Austauschfaktor ("exchange factor"), indem es die GDP-Abgabe reguliert und die Bindung von GTP(-γ-S) an G_o stimuliert (STRITTMATTER *et al.*, 1990; STRITTMATTER *et al.*, 1991). Eine Steigerung der Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren konnte ebenfalls nach der ektopischen Expression von GAP-43 in *Xenopus* Oocyten demonstriert werden (STRITTMATTER *et al.*, 1993). Die Palmytylierung der Cysteine 3 und 4 von GAP-43 inhibiert die Aktivierung von G_o (SUDO *et al.*, 1992). Somit konnte gezeigt werden, daß neben der extrazellulären, Rezeptor-gekoppelten auch eine intrazelluläre Regulation G-Protein-abhängiger Prozesse möglich ist.

Die beiden beschriebenen, von GAP-43 kontrollierten Signaltransduktionswege scheinen jedoch unabhängig voneinander reguliert zu werden und damit unterschiedliche zelluläre

Funktionen zu besitzen, da die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Prozessen im Gegensatz zur Bindung von Calmodulin von der Phosphorylierung durch PKC nicht beeinflusst wird (CHAPMAN *et al.*, 1992).

2. Apoptose der programmierte Zelltod

Neben Teilung, Wachstum und Differenzierung einer Zelle besitzt auch der Zelltod wichtige physiologische Funktionen sowohl für die Entwicklung eines Organismus als auch zur Aufrechterhaltung der Zellhomeostase.

Während es beim nekrotischen Zelltod zu Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigungen kommt (HASLETT, 1992), ist der apoptotische Zelltod, der auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, ein genetisch regulierter, aktiver und energieabhängiger Prozeß, der zur kontrollierten Eliminierung der betroffenen Zelle führt (KERR *et al.*, 1972). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß Apoptose in viele biologische Prozesse der Embryonalentwicklung, des Immunsystems, der Metamorphose sowie von hormonabhängigen Atrophien involviert ist (ARENDS & WYLLIE, 1991; ELLIS *et al.*, 1991; COHEN *et al.*, 1992). Die Deregulation apoptotischer Mechanismen wird dagegen mit einer Vielzahl von pathologischen Zuständen wie Krebs, Autoimmunerkrankungen und neurodegenerativen Störungen assoziiert (THOMPSON, 1995; NICHOLSON, 1996). Morphologisch wird eine apoptotische Zelle durch die Kondensation des Cyto- und des Nukleoplasmas, die Abschnürung von Membranpartikeln ("membrane blebbing") sowie durch die Auflösung der Zelle in von intakten Membranen umhüllte apoptotische Körperchen charakterisiert. Auf molekularer Ebene läßt sich Apoptose bei fast allen Zelltypen durch die internukleosomale Fragmentierung der genomischen DNA (WYLLIE, 1980) sowie durch die Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin an die äußere Seite der Zellmembran (FADOK *et al.*, 1992) nachweisen. Während verschiedene extra- und auch intrazelluläre Signale zelltypabhängig zur Auslösung von Apoptose führen können, sind die an der Exekutionsphase beteiligten Moleküle vom Nematoden bis zum Säuger hochkonserviert (YUAN *et al.*, 1993; HENGARTNER & HORVITZ, 1994). Eine entscheidende Rolle für die zelluläre Ausführung des apoptotischen Programms wird der Caspase ("Cystein-dependent aspartate specific protease")-Multigenfamilie, von der bisher 14 Mitglieder identifiziert werden konnten, zugesprochen (ALNEMRI *et al.*, 1996; COHEN, 1997; THORBERRY & LAZEBNIK, 1998; KUMAR, 1999). Diese Cystein-Proteasen liegen als Proenzyme in der Zelle vor und werden nach Apoptose-Induktion proteolytisch aktiviert. Einige Caspasen sind bei der Weiterleitung des apoptotischen Signals in der frühen Phase des Zelltods involviert ("initiator caspases"), während andere Isoformen durch die Spaltung spezifischer Substrate am kontrollierten Abbau der Zelle während der Exekutionsphase beteiligt sind ("effector caspases"). Eine ebenso große

Bedeutung für die Regulation des Apoptose-Prozesses besitzen die Mitglieder der Bcl-2-Multigenfamilie, deren Eigenschaften und Funktionen im Abschnitt 2.2 ausführlich beschrieben werden.

2.1 Neurale Apoptose

Während der Entwicklung des zentralen Nervensystems werden 20 – 80% der gebildeten Neurone durch Apoptose wieder entfernt (OPPENHEIM, 1991). Als Gründe für ihr Absterben werden Neuorganisationen des neuronalen Netzwerks, Korrekturen falscher Verknüpfungen sowie transiente Funktionen eliminiertes Zellen diskutiert (BUREK & OPPENHEIM, 1998; PETTMANN & HENDERSON, 1998). Weiterhin wird angenommen, daß Neurone während der Entwicklung im Überschuß gebildet werden und daher mit ihren Nachbarzellen um Kontakte zu Zielzellen, welche sie mit überlebensnotwendigen neurotrophen Faktoren versorgen, konkurrieren. Dieser als "Neurotrophe Strategie" bezeichnete Prozeß stellt sicher, daß nur Neurone mit ausreichenden Innervationen zu Zielzellen überleben (RAFF, 1992; RAFF *et al.*, 1993; ARENAS & PERSSON, 1994; SNIDER, 1994).

Die Ergebnisse aktueller Arbeiten weisen auf einen neuen Typ des neuronalen, programmierten Zelltods hin. So konnte in verschiedenen Systemen demonstriert werden, daß neuronale Zellen bereits sehr früh während der Neurogenese - noch vor ihrem Kontakt zu Zielzellen - apoptotisch sterben (BLASCHKE *et al.*, 1996; YAGINUMA *et al.*, 1996). Während der Hühnchen Entwicklung konnte Apoptose in noch proliferierenden Zellen des Neuralrohrs am Embryonaltag E2-E3 nachgewiesen werden (HOMMA *et al.*, 1994), wobei apoptotische Prozesse für das Schließen des Neuralrohrs essentiell zu sein scheinen (WEIL *et al.*, 1997). Im murinen Cortex wurden apoptotische Zellen, die ebenfalls noch proliferativen Charakter besaßen, bereits ab dem Embryonaltag E10 identifiziert (BLASCHKE *et al.*, 1996). Desweiteren konnten neurale Apoptoseprozesse auf der Ebene neuraler Vorläuferzellen beschrieben werden (HERGET *et al.*, 1998). Da die physiologische Funktion dieser sehr frühen neuronalen Apoptose bis jetzt noch kaum identifiziert werden konnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, die Bedeutung früher neuraler Apoptoseereignisse in den Kontext neuraler Determinierungs- und Differenzierungsvorgänge einzuordnen. Um nähere Erkenntnisse über die Mechanismen und die Regulation des programmierten Zelltods während der frühen neuronalen Entwicklung zu gewinnen, wurde der Einfluß des Bcl-2 Proteins auf frühe Apoptose-assoziierte neurale Determinierungs- und Differenzierungsprozesse charakterisiert.

2.2 Bcl-2 ("break chromosome locus-2")

2.2.1 Biochemische Charakterisierung von Bcl-2

Das antiapoptotische Bcl-2 Protein ist der Prototyp der nach ihm benannten Bcl-2 Multigenfamilie. Bcl-2 wurde ursprünglich aufgrund einer chromosomalen Translokation in humanen folliculären Lymphomen identifiziert (TSUJIMOTO *et al.*, 1984; BAKHSHI *et al.*, 1985). Interessanterweise konnte damals gezeigt werden, daß Bcl-2 als erstes Onkogen seine Wirkung nicht durch die Stimulation der Proliferationsrate sondern durch die Inhibition des Zellsterbens ausübt (VAUX *et al.*, 1988; MCDONNELL *et al.*, 1989). Bcl-2 ist ein 26 kDa großes, integrales Membranprotein, das hauptsächlich in der äußeren Mitochondrienmembran aber auch im endoplasmatischen Retikulum sowie in der Kernmembran lokalisiert ist (HOCKENBERRY *et al.*, 1990; MONAGHAN *et al.*, 1992). Die wichtige Bedeutung von Bcl-2 als Apoptose-Regulator wird dadurch hervorgehoben, daß mit dem *ced-9* Gen ("cell effector death") bereits im Nematoden *C. elegans* ein funktionell und strukturell stark konserviertes Homolog von Bcl-2 nachgewiesen werden konnte (HENGARTNER *et al.*, 1992; HENGARTNER & HORVITZ, 1994).

Die 15 bisher beschriebenen Mitglieder der Bcl-2-Multigenfamilie besitzen einen regulierenden sowie modulierenden Einfluß auf apoptotische Prozesse (WHITE, 1996; REED, 1997a; ADAMS & CORY, 1998; GROSS *et al.*, 1999). Da sowohl anti- als auch proapoptotisch wirkende Bcl-2 verwandte Proteine, die Homo- und Heterodimere ausbilden können, identifiziert wurden, scheint zum einen das Verhältnis von Apoptose-induzierenden zu Apoptose-inhibierenden Molekülen über das Schicksal einer Zelle zu entscheiden (OLTVAI *et al.*, 1993). Desweiteren konnte durch die Arbeiten der letzten Jahre demonstriert werden, daß antiapoptotische Bcl-2 Proteine ihre Funktion durch die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität ausüben, indem sie die Freisetzung von Cytochrom c und weiteren Apoptose-induzierenden Faktoren (AIF: "apoptosis-inducing factor") in das Cytoplasma sowie die anschließende Aktivierung von Caspasen inhibieren (KLUCK *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1997; REED, 1997b; GREEN & REED, 1998).

2.2.2 Expression und Funktion von Bcl-2 im Nervensystem

Während der Embryonalentwicklung des Nervensystems findet man die stärkste Expression von Bcl-2, wobei sich das Protein in der Maus ab dem Embryonaltag E10 detektieren läßt (ABE-DOHMAE *et al.*, 1993; MARTINOUE *et al.*, 1994a). Nach Abschluß der neuralen Differenzierung ist Bcl-2 im adulten Gehirn kaum noch nachweisbar (MERRY *et al.*, 1994), wohingegen das Protein in den Neuronen des peripheren Nervensystems erhalten bleibt (MERRY *et al.*, 1994; MIYASHITA *et al.*, 1994). Durch mehrere Arbeiten konnte demonstriert werden, daß Bcl-2 *in vitro* sowohl in verschiedenen neuralen Zelllinien als auch in neuronalen Primärkulturen protektiv gegenüber unterschiedlichen apoptotischen Stimuli wirkt. So schützt Bcl-2 PC12 Zellen vor Apoptose nach Entzug von Serum und Wachstumsfaktoren sowie nach Glutamat-Behandlung und oxidativen

Schädigungen (ZHONG *et al.*, 1993a, b; MAH *et al.*, 1993; BATISTATOU *et al.*, 1993; KANE *et al.*, 1993). In Primärkulturen sympathischer und sensorischer Neurone blockiert Bcl-2 ebenfalls die durch Entfernung von neurotrophen Wachstumsfaktoren induzierte Apoptose (GARCIA *et al.*, 1992; ALLSOPP *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse konnten *in vivo* durch Analysen von transgenen Mäusen, bei denen eine neuronenspezifische Bcl-2 Überexpression induziert wurde, bestätigt werden (MARTINO *et al.*, 1994b; FARLIE *et al.*, 1995; ZANJANI *et al.*, 1996). In diesen Tieren wird sowohl das entwicklungsabhängige Absterben von Neuronen inhibiert, was sich in einer Gehirn-Hypertrophie widerspiegelt, als auch durch Nervenschädigungen hervorgerufenen Zellsterben verhindert. Desweiteren sind die Neurone von Bcl-2 überexprimierenden Mäusen gegen fokale Ischaemien geschützt (LINNIK *et al.*, 1995; LAWRENCE *et al.*, 1996). Untersuchungen des Nervensystems von Mäusen, bei denen die Expression des bcl-2 Gens ausgeschaltet wurde, haben gezeigt, daß während der Embryonalentwicklung weder offensichtliche neurodegenerative Störungen noch massives Zellsterben auftraten (VEIS *et al.*, 1993; NAKAYAMA *et al.*, 1994). Hierbei wird vermutet, daß das antiapoptotische Bcl-x_L Protein, welches die größte Homologie zu Bcl-2 im Vergleich aller Mitglieder der Bcl-2 Multigenfamilie aufweist (BOISE *et al.*, 1993), aufgrund funktioneller Redundanz die protektive Rolle von Bcl-2 übernehmen kann (GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 1995). Postnatal kommt es in den Bcl-2 defizienten Mäusen jedoch zum verstärkten Zellsterben von Neuronen des zentralen sowie des peripheren Nervensystems, so daß die Tiere innerhalb von einem Monat nach der Geburt sterben (MICHAELIDIS *et al.*, 1996; PINON *et al.*, 1997).

Während die neuroprotektive Funktion von Bcl-2 somit deutlich belegt werden konnte, ist ein möglicher Einfluß von Bcl-2 auf neurale Differenzierungsprozesse noch weitgehend unklar. So wurde in PC12 Zellen gezeigt, daß eine Überexpression von Bcl-2 keinen Effekt auf das durch neurotrophe Faktoren induzierte Neuritenwachstum ausübt (BATISTATOU *et al.*, 1993). Dagegen beschrieben Uchiyama und Mitarbeiter, daß Bcl-2 die Neuritogenese von PC12 Zellen in serumfreiem, nicht aber in serumhaltigem Medium fördert (SATO *et al.*, 1994). Auch von Suzuki und Tsutomi (1998) wird ein positiver Einfluß von Bcl-2 auf die neurale Differenzierung von PC12 Zellen postuliert. In der humanen Tumorzelllinie Paju, bei der es zu einer spontanen neuronalen Differenzierung kommt, induziert die Überexpression von Bcl-2 ebenfalls eine verstärkte Verzweigung und Spreizung der neuronalen Ausläufer (ZHANG *et al.*, 1996).

Da in den oben beschriebenen Studien jedoch lediglich die Funktion von Bcl-2 für spätere neurale Differenzierungsereignisse - wie die Ausbildung neuraler Ausläufer - untersucht wurde, sollte in dieser Arbeit zum ersten Mal der Einfluß von Bcl-2 auf frühe neurale Entwicklungsprozesse wie Zellstammbaumentscheidungen und Musterbildung analysiert werden.

3. Das PCC7-Mz1-Zellmodell

Die Analyse neuraler Entwicklungsvorgänge ist auf zellulärer und molekularer Ebene *in vivo* nur begrenzt möglich. Zum einen stellt das Neuroepithel im Anfangsstadium der neuralen Entwicklung eine kaum manipulierbare, kleine Zellpopulation dar. Desweiteren befinden sich die Zellen in späteren Phasen in unterschiedlich weit fortgeschrittenen Reifungsgraden, so daß die untersuchten Ereignisse keinem genauen Differenzierungsstadium zugeordnet werden können. Durch die Verwendung von primären embryonalen Zellen wird versucht, die *in vivo* Situation möglichst weitgehend nachzustellen. Da Primärkulturen jedoch ebenfalls stets Zellen unterschiedlicher Vorläuferstadien enthalten, können auch mit diesen Systemen keine exakten Analysen von Differenzierungsprozessen durchgeführt werden. Daher bieten zur neuralen Differenzierung induzierbare Zelllinien, wie EC ("embryocarcinom") und ES ("embryonic stem") - Zelllinien, ein geeignetes Modell für die Untersuchung von neuraler Entwicklung. Diese Kulturen bestehen aus einer homogenen Population von pluripotenten Stammzellen, die *in vitro* kultivierbar sind und parallel zur Differenzierung induziert werden können. Implantiert man diese EC-Zellen in frühe Maus-Embryonen, so unterliegen sie dem Entwicklungspotential ihrer Umgebung und verhalten sich wie embryonale Zellen. Somit eignen sich EC-Zelllinien als Modelle, um neurale Differenzierung *in vitro* zu untersuchen (SMITH *et al.*, 1987; MCBURNEY *et al.*, 1988).

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit das PCC7-Mz1-Zellmodell für die Analyse von Signaltransduktionsprozessen, die an neuralen Determinierungs- und Differenzierungsereignissen beteiligt sind, verwendet.

Die PCC7-Mz1-Zellen sind ein Subklon der PCC7-AzaR1-Zellen (Klon 1009), welche von den PCC7-S-Zellen, die einem spontanen testikulären Tumor des rekombinanten Inzuchtmäusestammes RI 129 x C57Bl/6J entstammen, abgeleitet sind (PFEIFFER *et al.*, 1981; PAULIN *et al.*, 1982). Proneural determinierte Stammzellen dieser Embryokarzinomzelllinie differenzieren nach Zugabe des chemischen Induktors *all-trans* Retinsäure (RA) in ein stabiles Muster neuraler Zellderivate, wobei die Determinierung der einzelnen Zelltypen innerhalb von ein bis zwei Tagen abgeschlossen ist (LANG *et al.*, 1989) (Abb. 2). Der zeitliche Ablauf der Entstehung der Zellderivate korreliert mit den Entwicklungsprozessen im Säugergehirn. So entwickeln sich zunächst neuronale Phänotypen, die sich in einem zellulären Netzwerk organisieren. Danach entstehen Fibroblasten und später Astroglia-Zellen, die gemeinsam einen Zellrasen unter den Neuronen ausbilden. Endothelzellen kommen in dieser Zellschicht in sehr geringer Zahl vor. Der relative Anteil der verschiedenen Zelltypen an der Gesamtpopulation ist reproduzierbar, was durch immunocytochemische Analysen zelltypspezifischer Markerproteine demonstriert werden konnte (LANG *et al.*, 1989). Die neuronalen Derivate der PCC7-Mz1-Zellen erlangen etwa zwei Wochen nach Induktion der Differenzierung Polarität und generieren Aktionspotentiale (BERGER *et al.*, 1997), so daß die differenzierten Zellen als reife Phänotypen

bezeichnet werden können. Parallel zu den Determinierungs- und Differenzierungsprozessen stirbt innerhalb der ersten 24 Stunden nach Behandlung mit RA ein definierter Teil der Kultur durch Apoptose (Abb. 2), was anhand der Analyse typischer Apoptose-Merkmale, wie die Spaltung der chromosomalen DNA und die Aktivierung von Caspasen, nachgewiesen werden konnte (HERGET *et al.*, 1998). Dieser programmierte Zelltod ist keine Folge des Mangels an trophischen Faktoren im Medium, sondern scheint durch RA induzierte genregulatorische Prozesse ausgelöst zu werden, und funktionell mit dem neuronalen Differenzierungsprozess sowie der Etablierung von Zellstammbäumen in PCC7-Mz1-Zellen verbunden zu sein (HERGET *et al.*, 1998).

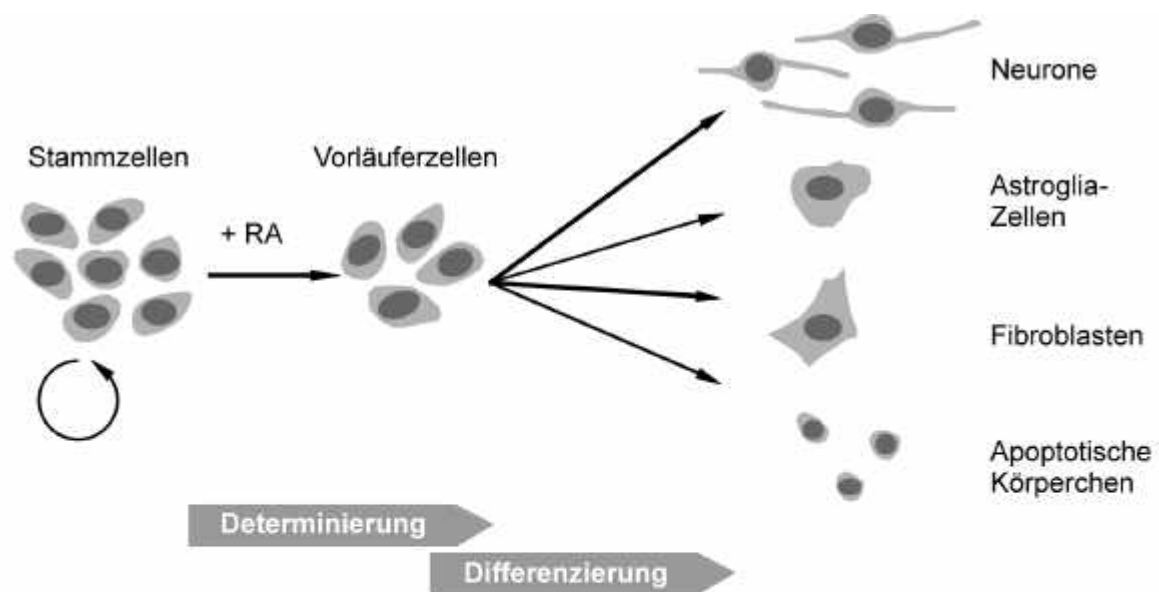


Abb. 2: Schema der Determinierung und Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen

Die pluripotenten Stammzellen der murinen Teratokarzinomzelllinie PCC7-Mz1 wachsen unabhängig von anderen Zellen. Nach Zugabe physiologischer Konzentrationen des Morphogens Retinsäure (RA) differenzieren sie in ein stabiles Muster von Derivaten des Neuroektoderms und bilden nach ca. zwei Wochen ein neurales Netzwerk aus Neuronen, Fibroblasten und Astroglia-Zellen. Innerhalb von 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung stirbt ein reproduzierbarer Anteil (ca. 25%) der Stammzellen apoptotisch.

1.1 Subklone der PCC7-Mz1-Zellen

Durch Subklonierungen des parentalen PCC7-Mz1-Klons konnten drei verschiedene Gruppen von Klonen isoliert werden, die sich deutlich in ihrem Differenzierungspotential unterscheiden (LANG *et al.*, 1989; HEIERMANN *et al.*, 1992; JOSTOCK *et al.*, 1998). Während Klone vom P-Typ das gleiche Differenzierungsmuster wie der Ursprungsklon PCC7-Mz1 aufweisen, differenzieren Subklone vom N (neuronalen)-Typ unter Standardbedingungen ausschließlich in neuronale Zellen, die jedoch durch das Fehlen von Astroglia-Zellen nur wenige Tage lebensfähig sind. Klone des O-Typs entwickeln ebenfalls hauptsächlich neuronale Derivate mit einem geringen Anteil an Fibroblasten und Astroglia-Zellen. Interessanterweise wurden keine Subklone isoliert, die ausschließlich Zelltypen flacher Morphologie bilden, was darauf hinweist, daß der neuronale Entwicklungsweg der dominante Entwicklungsweg ("default pathway") ist. Subklone des N-Typs scheinen jedoch nicht grundsätzlich auf ein neuronales Zellschicksal festgelegt zu sein, da sie durch Differenzierung auf Laminin-beschichteten Wachstumsflächen (LANG *et al.*, 1989) sowie durch die Cokultivierung mit murinen Gehirnzellen des Embryonaltags 13 (E13) und durch die Zugabe des Wachstumsfaktors FGF-2 wieder in den P-Phänotyp revertiert werden können (JOSTOCK *et al.*, 1998). Die MzN-Zellen sind daher vermutlich stärker für den neuronalen Differenzierungsweg determiniert als die parentalen PCC7-Mz1-Zellen (LANG *et al.*, 1989). Diese Arbeiten konnten auch zeigen, daß nicht nur die durch RA induzierten Signale sondern auch weitere parakrine Signale für die Musterbildung der PCC7-Mz1-Zellen verantwortlich sind (JOSTOCK *et al.*, 1998).

1.2 RA-induzierte Signalwege in PCC7-Mz1-Zellen

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die an der Regulierung der neuralen Differenzierung beteiligt sind, wurden neurogene Kontrollgene sowie deren Genprodukte identifiziert. Da *all-trans* Retinsäure (RA) die neuralen Differenzierungsprozesse und Apoptose in PCC7-Mz1-Zellen auslöst, wurde das Expressionsmuster sowie die mögliche Funktion der Retinsäure-Rezeptoren (RAR) untersucht. Während die RAR α 1-Isoform konstitutiv in PCC7-Mz1-Zellen exprimiert wird und damit vermutlich das induktive RA-Signal empfängt, werden ein bis drei Stunden nach Behandlung mit RA die Isoformen RAR α 2 und RAR β 2 exprimiert (HEIERMANN *et al.*, 1992). Die Gene RAR α 2 und RAR β 2 scheinen somit primäre Zielgene des RAR α 1 zu sein, und ihre Genprodukte sind möglicherweise als Transkriptionsfaktoren durch die Kontrolle der Genexpression an der Weiterleitung des RA-Signals sowie an frühen neuralen Determinierungsprozessen beteiligt. Ferner konnte ein weiterer Transkriptionsfaktor in PCC7-Mz1-Zellen nachgewiesen werden, der in die genregulatorischen Kaskaden, die für die Ausprägung des neuralen Zellstammbaums verantwortlich sind, involviert ist. Aufgrund von

Expressionsanalysen wird dieser nukleäre Rezeptor als "neuronal cell nuclear factor" (NCNF) bezeichnet. NCNF könnte als reprimierender Kernrezeptor die Expression solcher Gene unterdrücken, deren Genprodukte zur Ausprägung eines nicht-neuronalen Phänotyps führen würden (BAUER *et al.*, 1997).

Neben dem Verständnis der durch RA induzierten genregulatorischen Ereignisse ist es auch wichtig, die zellulären Signaltransduktionswege, die an den Differenzierungsprozessen sowie am apoptotischen Programm der PCC7-Mz1-Zellen beteiligt sind, aufzuklären. So scheinen die einzelnen Mitglieder der Proteinkinase C (PKC)-Genfamilie aufgrund der im neuronalen Differenzierungsverlauf zeitlich und zelltypspezifisch streng regulierten Expression der verschiedenen Isoformen modulatorisch in die Differenzierungsprozesse einzugreifen (OEHRLEIN *et al.*, 1998). Eine regulatorische Funktion von PKC auf die neurale Differenzierung und Apoptose konnte nicht nachgewiesen werden, da weder die Aktivierung noch die Inhibition von PKC einen signifikanten Einfluß auf das Differenzierungsmuster sowie auf den durch RA ausgelösten Zelltod der PCC7-Mz1-Zellen bewirkte (OEHRLEIN *et al.*, 1998; HERGET *et al.*, 1998). Desweiteren konnte die Bedeutung des sekundären Botenstoffes Ceramid für die RA-induzierte neurale Differenzierung und Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen aufgeklärt werden (OEHRLEIN-KARPI, 1998; ESDAR *et al.*, 1999b). Ceramide sind als wichtige Signalmoleküle des Sphingomyelin-Kreislaufs in verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation (FISHBEIN *et al.*, 1993), Differenzierung (OKAZAKI *et al.*, 1990) und Apoptose (OBEID *et al.*, 1993; JARVIS *et al.*, 1994) involviert. In PCC7-Mz1-Stammzellen führt die Zugabe von Ceramiden zu Apoptose nicht aber zur Induktion von Differenzierung. Ferner konnte gezeigt werden, daß der endogene Ceramid-Gehalt durch die Behandlung mit RA innerhalb von 24 Stunden etwa 3 bis 4-fach ansteigt. Diese Zunahme von Ceramid wird durch die Aktivierung des *de novo*-Synthese Weges und nicht durch die Hydrolyse von Sphingomyelin induziert (ESDAR *et al.*, 1999b).

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften stellt das PCC7-Mz1-Zellmodell somit ein sehr gut geeignetes System zur Untersuchung von frühen neuronalen Determinierungs- und Differenzierungsprozessen sowie damit assoziierten apoptotischen Vorgängen dar. Der Vorteil von PCC7-Mz1-Zellen gegenüber anderen Zellmodellen wie der Pheochromocytomazelllinie PC12 besteht darin, daß Differenzierung und Apoptose durch den gleichen Stimulus (RA) induziert werden (Abb. 2) und damit der *in vivo* Situation entsprechend parallel untersucht werden können. Desweiteren kann das Differenzierungsmuster der PCC7-Mz1-Zellen gut auf die *in vivo* Situation projiziert werden, da ausschließlich Zelltypen neuroektodermaler Herkunft entstehen. Andere Embryokarzinomzelllinien wie die F9-, NG2- oder P19-Zellen produzieren dagegen neben ektodermalen Phänotypen auch solche mesodermalen oder endodermalen Ursprungs. Zudem kann die Differenzierung dieser Zelllinien auch spontan auftreten, und das

Muster der gebildeten Derivate ist nur begrenzt reproduzierbar (JONES-VILLENEUVE *et al.*, 1982; KOOPMAN & COTTON, 1987; SMITH *et al.*, 1987).

4. Problemstellung und Durchführung

Mit der PCC7-Mz1-Zelllinie steht ein geeignetes *in vitro* Modell zur Verfügung, um die Analyse neuraler Entwicklung unter kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen durchzuführen, was aufgrund der Komplexität des Säugergehirns *in vivo* kaum möglich ist. Da in PCC7-Mz1-Zellen nach Zugabe von *all-trans* Retinsäure (RA) frühe neurale Determinierungs- und Differenzierungsprozesse sowie damit assoziierte apoptotische Ereignisse gleichzeitig induziert werden, können beide Vorgänge parallel, wie sie auch *in vivo* ablaufen, zellbiologisch und biochemisch analysiert werden.

Verschiedene zellbiologische Aspekte der neuralen Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen, wie die Entwicklung der unterschiedlichen neuralen Phänotypen, die Entstehung von Polarität und die Generierung von Aktionspotentialen der Neurone sowie Prozesse der Zellstammbaumentscheidungen und Musterbildung, wurden in früheren Arbeiten untersucht (LANG *et al.*, 1989; BERGER *et al.*, 1997; JOSTOCK *et al.*, 1998). Desweiteren wurde die Expression von durch RA induzierten neurogenen Genen identifiziert und ihre Bedeutung für die neurale Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen analysiert (HEIERMANN *et al.*, 1992; BAUER *et al.*, 1997). Weitere Einblicke in die RA-induzierten Signaltransduktionsprozesse, die während der neuralen Entwicklung und Apoptose ablaufen, wurden anhand von Untersuchungen der Proteinkinase C (PKC) und des sekundären Botenstoffs Ceramid erlangt (OEHRLEIN *et al.*, 1998; ESDAR *et al.*, 1999b).

Zum weiteren Verständnis der intrazellulären Signalwege, die der neuralen Determinierung, Differenzierung und Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen zugrunde liegen, sollte in dieser Arbeit die Funktion zweier Schlüsselmoleküle dieser Prozesse - GAP-43 und Bcl-2 - charakterisiert werden. Dadurch sollte es möglich sein, neue Erkenntnisse über die molekularen Vorgänge neuraler Zellstammbaumentscheidungen und Musterbildung zu erlangen.

Als ein Hauptsubstrat für PKC im Nervensystem scheint das neuronenspezifische GAP-43 Protein Einfluß auf neurale Entwicklungsvorgänge auszuüben. Daher sollte durch die Untersuchungen der Expression von GAP-43 auf mRNA- und auf Protein-Ebene zunächst gezeigt werden, wann GAP-43 während des RA-induzierten neuralen Differenzierungsverlaufs der PCC7-Mz1-Zellen exprimiert wird. Durch immunocytochemische Analysen wurde die intrazelluläre Lokalisierung sowie die zelltypspezifische Verteilung des Proteins beschrieben. Ob GAP-43 bereits während der sehr frühen neuralen Differenzierung funktionell ist, sollte durch DNA-Synthese Assays sowie durch "*in vivo* Phosphorylierungsexperimente" demonstriert werden.

Da GAP-43 in bisherigen Studien vor allem eine Funktion während der Neuritogenese zugeschrieben wurde, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob GAP-43 bereits in frühe neurale Determinierung und Zellstammbaumentscheidungen involviert ist. Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurden Zelllinien, die eine Überexpression von GAP-43 aufwiesen, erzeugt. Anhand von Western-Blot Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen sollte die stabile Überexpression des Proteins demonstriert werden. Durch die biochemische Charakterisierung des endogenen und des überexprimierten GAP-43 Proteins konnte die Funktionalität des ektopischen GAP-43 gezeigt werden. Dazu mußte sowohl die subzelluläre Lokalisation des Proteins als auch der Effekt einer PKC-vermittelten Phosphorylierung auf eine mögliche Translokation charakterisiert und zwischen PCC7-Mz1-Zellen und den Mz-GAP-43 Klonen verglichen werden. Aufgrund des großen Einflusses posttranslationaler Modifikationen auf die Funktionen eines Proteins wurde eine potentielle Palmitoylierung sowie Glykosylierung von GAP-43 nachgewiesen. Da die Identifizierung von Interaktionspartnern bei der Aufklärung der Aufgabe eines Proteins hilfreich ist, sollte ein "*in vitro* cross-linking Assay" etabliert werden, durch den an GAP-43 bindende Proteine nachgewiesen werden konnten.

Ob GAP-43 in neurale Zellstammbaumentscheidungen und die Musterbildung der PCC7-Mz1-Zellen involviert ist, sollte durch die Bestimmung des Differenzierungspotentials der GAP-43 überexprimierenden Klone untersucht werden. Unterschiede bezüglich der Expression von zelltypspezifischen Markermolekülen sowie von Merkmalen reifer Neurone sollten zwischen den PCC7-Mz1-Zellen und den Mz-GAP-43 Klonen analysiert werden. Zur Aufklärung eines potentiellen Zusammenhangs zwischen der Überexpression von GAP-43 sowie der Etablierung des neuronalen Phänotyps von PCC7-Mz1-Zellen wurde die Expression von RA-regulierten neurogenen Kontrollgenen charakterisiert. Außerdem sollte der Einfluß verschiedener Faktoren (Laminin, FGF-2) auf das Differenzierungspotential der GAP-43 überexprimierenden Klone analysiert werden.

Das antiapoptotische Bcl-2 Protein besitzt als Prototyp einer in die Regulation des Apoptose-Prozesses involvierten Multigenfamilie einen Einfluß auf die Kontrolle neuraler Apoptosevorgänge. Daher sollte zunächst die Expression von Bcl-2 während des RA-induzierten Differenzierungsverlaufs in PCC7-Mz1-Zellen analysiert werden. Ob Bcl-2 am Apoptose-Programm der PCC7-Mz1-Zellen beteiligt ist, sollte durch die Etablierung von Bcl-2-überexprimierenden Klonen untersucht werden. Die stabile Überexpression von Bcl-2 in den isolierten Zelllinien konnte durch Western-Blot Analysen nachgewiesen werden. Anhand von Vitalitätstests wurde der Effekt von Bcl-2 auf die RA-induzierte Apoptose bestimmt. Weiterhin sollte die chromosomale DNA-Fragmentierung, die Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol und die Aktivierung von Caspasen in den Bcl-2 überexprimierenden Klonen analysiert werden. Da Ceramide als sekundäre Botenstoffe während des RA-induzierten Apoptoseprozesses von PCC7-Mz1-Zellen identifiziert werden konnten, sollte der Einfluß von Bcl-2 auf die Ceramid-

abhängige Apoptose untersucht werden. Desweiteren wurde durch die Verwendung weiterer, unphysiologischer Apoptose-Stimuli getestet, ob Bcl-2 in PCC7-Mz1-Zellen einen generellen Apoptose-Schutz vermitteln kann. Da die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 in Zusammenhang mit einem Einfluß auf den Zellzyklus diskutiert wird, sollte gezeigt werden, ob Bcl-2 einen Effekt auf Proliferation, Generationszeiten sowie auf die Kontrolle des Zellzyklusses der PCC7-Mz1-Zellen ausübt. Ob durch die Überexpression von Bcl-2 das Differenzierungspotential der PCC7-Mz1-Zellen verändert wird, wurde anhand von Expressionsanalysen zelltypspezifischer Markerproteine untersucht. Durch den Vergleich des Differenzierungsbildes von PCC7-Mz1- und Mz-Bcl-2-Kulturen konnte die potentielle Bedeutung der Apoptose für die Musterbildung der PCC7-Mz1-Zellen bestimmt werden.

II Material und Methoden

1. Material

Geräte und Materialien:

Adhäsionsobjektträger

Brutschrank: •Stericult
•Zellkultur

Deckgläser (2 cm²)

Densitometer: Gel Doc 1000

Elektrophoresekammer für Agarosegele

Elektrophoresekammer für PAGE mit Gelküvetten

Elektrophorese-System für PAGE Hoefer SE 600

Elektrophorese-System für Sequenzgele

(Sequi-Gen® GT Nukleinsäure Elektrophoresekammer)

FACScan 2.0

Filme: •Farbdiafilme
(Kodak Ektachrom 400 ASA)
•Röntgenfilme
(Fuji Medical X-Ray RX, Kodak X-OMAT AR)

Hybridisierungssofen: Personal Hyb™

Immunoreader NJ-200

Mikroskope: •Invertmikroskop IM35
•Zeiss Axiophot mit HBO 50 W Lampe
und MC63 Photozubehör
-Fluoreszenzfiltersatz
grün: H546/287915
blau: 450-490/487909
Multiband: 25/487925
-Optik
Plan-Neofluarobjektive 32x, 40x
Plan-Apochromatobjektiv 63x

Midi Doc Gel-Dokumentationssystem

Objektträger (76 x 26 mm)

Phosphoimager G250-Molecular Imager

Bezugsquelle:

BioRad/München

Labotech/Göttingen

Heraeus/Hanau

Assistent/Sodenheim

BioRad/München

Werkstatt des Instituts für

Physiologische Chemie und
Pathobiochemie, Mainz

Phase/Mölln

Pharmacia/Freiburg

BioRad/München

BectonDickinson/Heidelberg

Stratagene/Heidelberg

Teknunc/Dänemark

Zeiss/Oberkochen

Zeiss/Oberkochen

Zeiss/Oberkochen

Zeiss/Oberkochen

Zeiss/Oberkochen

Zeiss/Oberkochen

Zeiss/Oberkochen

Herolab/Wiesloch

Menzel-Gläser/Mainz

BioRad/München

Photometer: PMQ 3	Zeiss/Oberkochen
Radioaktivitätsmeßgerät: Liquid-Scintillations-Analyzer Tri-Carb1600 CA	Packard/Frankfurt
Semi-Dry-Blot-Apparatur	Phase/Mölln
Spannungsquelle Power-Pack 35/60	Phase/Mölln
Sterilbank, Laminar-Fallstrom Bank	Nunc/Wiesbaden
Thermocycler: Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer/Conneticut
Vakuumgeltrockner SE 1160	Bachofer/Reutlingen
Zählkammer, Neubauer	Assistent/Sodenheim
Zentrifugen:	Sorvall/Bad Nauheim
•Kühlzentrifuge RC-5 Superspeed	Kontron/Offenbach
•Kühlzentrifuge Centrikon T-124	Heraeus/Hanau
•Tischzentrifuge Labofuge GL	Eppendorf/Hamburg
•Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf/Hamburg
•Tischzentrifuge 5417C	Beckmann/München
•Ultrazentrifuge TL100	

Steriles Kunststoffmaterial zum Aufbewahren von Lösungen und für die Zellkultur wurde von den Firmen Costar/Bodenheim, Greiner/Frickenhausen, Falcon(BD)/Heidelberg und Nunc/Wiesbaden bezogen.

1.1 Chemikalien und andere Reagenzien

1.1.1 Zellbiologische Arbeiten

Substanz:

all-trans Retinsäure

N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure (BES)

Bromdesoxyuridin

C₆-Ceramid (N-Hexanyl-D-*erythro*-Sphingosin)

C₂-Dihydroceramid (N-Acetyl-D-*erythro*-Dihydrosphingosin)

dbcAMP (cyclisches Dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphat)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)

EscortTM Transfektionsreagenz

G418 (Geneticin)

Laminin

Bezugsquelle:

Sigma/Deisenhofen

Sigma/Deisenhofen

Sigma/Deisenhofen

Alexis/Grünberg

Calbiochem/Bad Soden

Roche Biochemicals/

Mannheim

Merck/Darmstadt

Life Technologies/Karlsruhe

Sigma/Deisenhofen

Life Technologies/Karlsruhe

Roche Biochemicals/

Mannheim

Paraformaldehyd (PFA)	Sigma/Deisenhofen
<i>p</i> -Phenylendiamin	Sigma/Deisenhofen
Phorbol-12,13-dibutyrat (PDB)	Sigma/Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma/Deisenhofen
Serum fetaler Kälber (FCS)	Roche Biochemicals/ Mannheim
Staurosporin	Alexis/Grünberg
Trypanblau-Lösung	Seromed/Berlin
WST-1	Roche Biochemicals/ Mannheim

1.1.2 Molekularbiologische Arbeiten

Substanz:

Agar
 Agarose
 Ampicillin

 Borsäure
 Bromphenolblau
 Caseinhydrolysat (Peptone 140)
 dNTPs
 EDTA
 Ethidiumbromid

 Ficoll 400

 Gelfiltrationsmaterial Sephadex-G75
 Hefeextrakt
 Heringssperma DNA
 LM-Agarose (*low melt*)

 MOPS
 Nucleobond® AX Kit
 Nylonmembran Hybond N
 Oligotex™ mRNA Kit

Bezugsquelle:

Sigma/Deisenhofen
 Sigma/Deisenhofen
 Roche Biochemicals/
 Mannheim
 Sigma/Deisenhofen
 Serva/Heidelberg
 Life Technologies/Karlsruhe
 Pharmacia/Freiburg
 Merck/Darmstadt
 Roche Biochemicals/
 Mannheim
 Roche Biochemicals/
 Mannheim
 Pharmacia/Freiburg
 Life Technologies/Karlsruhe
 Merck/Darmstadt
 Roche Biochemicals/
 Mannheim
 Roth/Karlsruhe
 Macherey-Nagel/Düren
 Amersham/Freiburg
 Qiagen/Hilden

Proteinase K	Roche Biochemicals/ Mannheim
QiaexII®-Kit	Qiagen/Hilden
RNeasy Total RNA Kit	Qiagen/Hilden
RNase Inhibitor	Roche Biochemicals/ Mannheim
Rotiphorese® Sequenziergel-Lösungen	Roth/Karlsruhe

Restriktionsendonukleasen sowie DNA/RNA-modifizierende Enzyme und die entsprechenden Puffer stammten von den Firmen Roche Biochemicals/Mannheim, Pharmacia/Freiburg, Life Technologies/Karlsruhe und MBI-Fermentas/St.Leon-Roth.

1.1.3 Proteinbiochemische Arbeiten

Substanz:

Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
 Ammoniumperoxodisulfat (APS)
 Aprotinin
 BCA-Proteinkonzentrationsbestimmungs-Kit
 Benzamidin
 BSA
 Chromatographiepapier (Whatman 3MM)
 Coomassie Brilliant Blau R250
 DIG-Glycan-Detection-Kit

 Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP)
 Dithiothreitol (DTT)
 β-Glycerophosphat
 HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure)
 Immobilon PVDF-Membran
 Isopropyl-β-D-thiogalctopyranosid (IPTG)
 N-Laurylsarcosin
 Leupeptin
 Magermilchpulver
 β-Mercaptoethanol
 Natriumdodecylsulfat (SDS)
 Natriumorthovanadate

Bezugsquelle:

Roth/Karlsruhe
 Sigma/Deisenhofen
 Sigma/Deisenhofen
 Pierce/Bruchsal
 Sigma/Deisenhofen
 Serva/Heidelberg
 Whatman/England
 Merck/Darmstadt
 Roche Biochemicals/
 Mannheim
 Sigma/Deisenhofen
 Sigma/Deisenhofen
 Sigma/Deisenhofen
 Sigma/Deisenhofen
 Millipore/Eschborn
 Roth/Karlsruhe
 Fluka/Neu-Ulm
 Sigma/Deisenhofen
 Nestle/Frankfurt
 Sigma/Deisenhofen
 Merck/Darmstadt
 Sigma/Deisenhofen

Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma/Deisenhofen
Protease-Inhibitor Cocktail Complete™	Roche Biochemicals/ Mannheim
Protein A-Sepharose	Pharmacia/Freiburg
Protein-Molekulargewichts-Standards	
• LMW ("low molecular weight") Calibration Kit	Pharmacia/Freiburg
• "Prestained High Range" SDS-PAGE Standard	BioRad/München
• "Prestained Low Range" SDS-PAGE Standard	BioRad/München
Saccharose	Roth/Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen-diamin (TEMED)	Sigma/Deisenhofen
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Sigma/Deisenhofen
Triton X-100	Merck/Darmstadt

Alle anderen, nicht explizit aufgeführten Substanzen, einschließlich Salzen, Säuren, Basen und organischen Lösungsmitteln, besaßen p.a. Qualität und wurden von den Firmen Baker/Holland, Fluka/Neu-Ulm, Merck/Darmstadt, Roth/Karlsruhe, Serva/Heidelberg und Sigma/Deisenhofen bezogen.

1.2 Standardpuffer und Kulturmedien

Name	Zusammensetzung
LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g Caseinhydrolysat (Peptone 140), 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l bidest. Wasser; pH 7,4 mit NaOH einstellen; für Platten 15 g Agar pro l Medium zusetzen; autoklavieren
10 x MOPS (3-Morpholino-propansulfonsäure)	250 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA; pH 7,0 mit NaOH einstellen; Lagerung bei 4°C
10 x PBS ("phosphate buffered saline")	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; ergibt pH 7,4
20 x SSC ("saline sodium citrate")	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat; pH 7,0 mit NaOH einstellen
10 x TBE (Tris, Borsäure, EDTA)	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 9 mM EDTA; ergibt pH 8,4

1.3 Radioaktive Materialien

[³²P]-H₃PO₄, γ-[³²P]-ATP und α-[³²P]-dCTP stammten von der Firma ICN (Eschwege). γ-[³²P]-ATP wurde mit einer spezifischen Aktivität von 4000 Ci/mmol und α-[³²P]-dCTP mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol eingesetzt. [9,10-³H]-Palmitinsäure wurde von der Firma Hartmann Analytic/Braunschweig bezogen und wurde mit einer spezifischen Aktivität von 50 Ci/mmol verwendet.

1.4 Antikörper und Seren

Folgende hier in alphabetischer Reihenfolge aufgeführten Primär- und Sekundär-Antikörper wurden für Western-Blot Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Einige Antikörper wurden uns freundlicherweise von Prof. R. Jahn (Göttingen) sowie von Dr. G. Poirier (Kanada) zur Verfügung gestellt.

1.4.1 Primärantikörper für Western-Blot Analysen

Antikörper gegen	Spezies	Subtyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Bcl-2 (mAK)	Maus	IgG ₁	1:250	Transduction Laboratories/Kentucky
Calmodulin (mAK)	Maus	IgG ₁	1:1000	Upstate Biotechnology/New York
Clathrin (mAK)	Maus	IgG ₁	1:1500	R. Jahn/Göttingen
Cytochrom c (mAK)	Maus	IgG _{2b}	1:500	PharMingen/San Diego
DIG-POD	Schaf	Fab-Fragmente	1:5000	Roche Biochemicals/Mannheim
GAP-43 (pAS)	Kaninchen		1:4000	ESDAR <i>et al.</i> , 1999a
MARCKS (pAS)	Kaninchen		1:3000	OEHRLIN <i>et al.</i> , 1998
PARP (mAK)	Maus	IgG ₁	1:10000	G. Poirier/Kanada
Retinoblastoma Protein (mAK)	Maus	IgG ₁	1:500	PharMingen/San Diego

1.4.2 Primärantikörper für Immunfluoreszenzanalysen

Antikörper gegen	Spezies	Subtyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Agglutinin FITC-markiert	Weizen- keimling		1:50	BioTrend/Köln
EX-1 (mAk)	Ratte	IgM	1:2	MÜLLER-HUSMANN <i>et al.</i> , 1994 (Universität Mainz, Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Prof. A. Maelicke)
GAP-43 (pAS)	Kaninchen		1:300	ESDAR <i>et al.</i> , 1999a
GFAP (mAk)	Maus	IgG ₁	1:10	Roche Biochemicals/Mannheim
MAP2a/b (mAk)	Maus	IgG ₁	1:200	Roche Biochemicals/Mannheim
Thy1.2 (mAk)	Ratte	IgG2b	1:20	PharMingen/San Diego

1.4.3 Sekundärantikörper

Antikörper gegen	gekoppelt mit	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen	POD	Ziege	1:2000	Dako/Hamburg
Kaninchen	FITC	Schwein	1:50	Dako/Hamburg
Kaninchen	Cy3	Ziege	1:600	Dianova/Hamburg
Kaninchen	AMCA	Ziege	1:100	Dianova/Hamburg
Maus	POD	Kaninchen	1:2000	Dako/Hamburg
Maus	FITC	Ziege	1:50	Dako/Hamburg
Maus	Cy3	Ziege	1:500	Dianova/Hamburg
Maus	Texas Rot	Ziege	1:200	Medac/Hamburg
Ratte	FITC	Kaninchen	1:100	Dako/Hamburg
Ratte	Cy3	Ziege	1:300	Dianova/Hamburg

1.5 Primer und Desoxyribonukleotide

PCR-Primer und Oligonukleotide wurden entweder von Herrn Dr. Martin Rentrop (Universität Mainz, Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Prof. A. Maelicke) synthetisiert oder von den Firmen GenTech/Mainz und MWG-Biotech/Ebersburg bezogen. Zur Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

Oligo Name	Verwendung	Sequenz
GAP-43 TH100	Primer Extension	5'-CAC CAG GGC AGT TAG CAG CAA CTG-3'
GAP-43 TH102	Primer Extension	5'-GGT GGT ATC TTC CCC TGC CTT CTT CC-3'
MARCKS (BROOKS <i>et al.</i> , 1991)	Primer Extension	5'-GGT GGA AAA GTC GAG CAC AAA AAA GGA GGC C-3'
GAP-43 sense	Klonierung	5'-AAG AGA ATT CCA TGC TGT GCT GTA TGA GA-3'
GAP-43 antisense		5'-TTC TTC TAG ATC AGG CAT GTT CTT GGT C-3'
GAP-43 CE	Sequenzierung	5'-TGC AGC CTT ATG AGC CTT AT-3'
pcDNA3 (1033–1054) (SCHÄFER, 1997)	Sequenzierung	5'-CTA GAA GGC ACA GTC GAG GCT G-3'
NF68 sense	PCR	5'-AAG CAG CTG CAG GAG CTA GAG-3'
NF68 antisense		5'-ACC TGC GAG CTC TGA GAG TA-3'
Thy1.2 sense	PCR	5'-ATG AAC CCA GCC ATC AGC GTC GC-3'
Thy1.2 antisense		5'-TGT TTC TCC TTG GGC CCA ACC AGT-3'
GFAP sense	PCR	5'-CTA GTT ACA CTT GGC TCT GA-3'
GFAP antisense		5'-AGT ACT GCT CTG AAG GTT AG-3'
GAPDH sense	PCR	5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG-3'
GAPDH antisense		5'-GGT CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG-3'

1.6 Bakterienstamm

Klonierungen wurden in dem *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene/Heidelberg) durchgeführt.

Bakteriengenotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [F[']proAB, *lacI*^qZΔM15, Tn10(Tet^r)]

1.7 Vektoren

1.7.1 pcDNA3-Bcl-2

Im eukaryontische Expressionsvektor pcDNA3-bcl-2, der uns freundlicherweise von Herrn Dr. J. Boise (Universität Lleida, Spanien) zur Verfügung gestellt wurde, steht die Transkription der *bcl-2* cDNA unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Der pcDNA3 Vektor enthält stromabwärts des Polylinkers die Polyadenylierungssequenz des "bovine growth hormone" -Gens (BGH) und ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion stabiler Transfektanten.

1.7.2 pcDNA3-SV40-Bcl-2

Um ein Expressionskonstrukt zu erhalten, bei dem die Expression von Bcl-2 unter der Kontrolle des SV40-Promoters steht, wurde die bcl-2 cDNA in den pcDNA3-SV40 Vektor kloniert. In diesem Vektor wurde der CMV-Promoter durch den SV40-Promoter des Vektors pSBC-1 ersetzt (BAUER *et al.*, 1997).

1.7.3 pcDNA3-SV40-GAP-43

Für die ektopische Expression von GAP-43 in Säugertierzellen wurde die Ratten pF1.1-cDNA (ROSENTHAL *et al.*, 1987), die wir freundlicherweise von Prof. A. Routtenberg (Northwestern University, Illinois, USA) erhalten haben, in den modifizierten pcDNA3-SV40-Vektor kloniert.

1.8 Zelllinien

1.8.1 PCC7-Mz1

Bei der Embryokarzinomzelllinie PCC7-Mz1 handelt es sich um einen Subklon der PCC7-AzaR1-Zellen (Klon 1009). Die PCC7-AzaR1-Zellen sind ein Subklon der PCC7-S-Zellen, welche aus einem spontanen testikulären Tumor des rekombinanten Inzuchtmäusestammes 129xC57B1/6J hervorgegangen sind (PFEIFFER *et al.*, 1981; PAULIN *et al.*, 1982; LANG *et al.*, 1989).

1.8.2 PCC7-MzN

Die PCC7-MzN Zellklone besitzen ein eingeschränktes Differenzierungspotential. Sie können nach Induktion mit RA nur noch in neuronale Zellderivate differenzieren. Der MzN1-Klon wurde von Frau Dr. E. Lang durch Subklonierung der PCC7-Mz1 Zellen etabliert (LANG *et al.*, 1989). Der mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) stabil transfizierte Klon MzN-GFP wurde von Frau Dr. R. Jostock aus PCC7-Mz1-Zellen selektioniert (JOSTOCK *et al.*, 1998).

1.8.3 Swiss 3T3-Fibroblasten

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um nicht-tumorgene Mauseellen, die in Kultur konfluente Einzellschichten ausbilden. Sind die Wachstumsfaktoren des Mediums verbraucht, kommt es zur Zellzyklusarretierung in der G₀-Phase. Die Kontaktinhibition verhindert ein Überwachsen der Zellen (TODARO & GREEN, 1963).

1.8.4 COS-1 Zellen

Diese adulte Fibroblasten-Nierenzelllinie wurde aus der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) isoliert. Sie ist mit dem SV40-Virus transformiert und zeichnet sich durch ihre effiziente Transfizierbarkeit aus (GLUZMAN, 1981; ATCC-Nr. CRL-1650).

2. Zellbiologische Methoden

2.1 Kultivierung der Zelllinie PCC7-Mz1 und ihrer Varianten

- Medium: DMEM mit 12,5% FCS (Charge 148, Roche Biochemicals/Mannheim)
- Antibiotikum: 500 mg/ml G418 (Geneticin) in PBS

Die Kultivierung der PCC7-Mz1-Zellen sowie der in dieser Arbeit erzeugten stabilen Mz1-Klone erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank (10% CO₂) bei 37°C. Die adhären wachsenden Zellen wurden in DMEM mit 12,5% FCS in Kulturflaschen kultiviert. Die aufgrund ihrer Geneticin-Resistenz selektionierten Mz-Bcl-2 bzw. Mz-GAP-43 Klone wurden unter 300 µg/ml G418 gehalten. Die Zellen wurden alle 48 bis 72 Stunden vom Kulturgefäß abgespült, in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau-Lösung ausgezählt und in frisches Medium überführt. Die eingesetzte Zelldichte war dabei von der Kultivierungsdauer und von der Zelllinie abhängig (Tab. 1).

Zelllinie	48 Stunden-Kultur (Zellen/cm ²)	72 Stunden-Kultur (Zellen/cm ²)
Mz1	1 x 10 ⁴	0,5 x 10 ⁴
MzN	1,5 x 10 ⁴	0,75 x 10 ⁴
Mz-Bcl-2	1,2 x 10 ⁴	0,6 x 10 ⁴
Mz-GAP-43	1 x 10 ⁴	0,5 x 10 ⁴

Tab. 1: Aussäen der PCC7-Mz1-Zellen und ihrer Varianten für Dauerkulturen ("stocks")

Für alle Experimente wurden nur Zellen der Passagen 10 bis 30 nach dem Auftauen verwendet.

2.2 Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen und ihrer Varianten

- RA-Lösung: 10 µl RA-Stammlösung (1 mg/ml in DMSO, bei -80°C gelagert)
+ 190 µl DMSO
+ 1,8 ml bidest.H₂O
5 µg/ml RA (= 15,4 µM)
sterilfiltrieren, bei 4°C aufbewahren und maximal 1 Tag verwenden
- dbcAMP: 100 mM in bidest. H₂O; sterilfiltrieren, bei -20°C gelagert
- Laminin: 100 µg/ml in sterilem PBS, bei -20°C gelagert

Die Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen wurde durch Zugabe des chemischen Morphogens RA (*all-trans* Retinsäure) induziert (PAULIN *et al.*, 1982). Die für die Differenzierung eingesetzte Zellzahl war von der Wachstumsfläche sowie von der Zelllinie abhängig (Tab. 2).

Zelllinie	Wachstumsfläche		
	Plastik (Zellen/cm ²)	Glas (Zellen/cm ²)	Laminin (Zellen/cm ²)
Mz1	1,75 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴
MzN	2 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴
Mz-Bcl-2	2 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	
Mz-GAP-43	2 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴

Tab. 2: Aussäen der PCC7-Mz1-Zellen und ihrer Varianten für Experimente

24 h nach dem Ausplattieren wurde dem Medium RA-Lösung in einer Endkonzentration von 0,1 µM zugesetzt. Der Zeitpunkt der RA-Zugabe wird als Differenzierungstag 0 (d0) definiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Das frische, mit 12,5% FCS versetzte Medium enthielt RA in einer Endkonzentration von 0,1 µM sowie dbcAMP in einer Endkonzentration von 1 mM. Der Zeitpunkt des Mediumwechsels kennzeichnet den Differenzierungstag 1 (d1). Die Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen wurde in 6 cm-Petrischalen in 5 ml Medium, in 10 cm-Petrischalen in 10 ml Medium oder in 15 cm-Petrischalen in 30 ml Medium bzw. auf sterilisierten Deckgläsern in 24 Loch-Platten in 1,5 ml Medium pro Loch durchgeführt. Für einige Experimente wurden die Deckgläser mit 4 µg Laminin / ml PBS beschichtet und für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Deckgläser zweimal mit sterilem PBS gewaschen.

Die Zellen wurden auf Petrischalen bis zum Tag 12 (d12) und auf Deckgläsern bis zum Tag 18 (d18) in einem CO₂-Begasungsbrutschrank (10% CO₂) bei 37°C kultiviert.

2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

- Einfriermedium: DMEM/12,5%FCS mit 10% DMSO

Die einzufrierenden Zellen wurden vom Kulturgefäß ab gespült und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Jeweils 1 x 10⁶ Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 1000 Upm in der Labofuge GL pelletiert, anschließend auf Eis in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in eine Einfrierampulle überführt. Die Zellen wurden in einer Styroporbox für 2 Tage auf -80°C abgekühlt und danach in einem Tank mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen der in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Zellen erfolgte zügig unter vorsichtigem Schütteln bei 37°C im Wasserbad. Durch tropfenweise Zugabe von ca. 5 ml Kulturmedium wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO ausverdünnt. Nach Abzentrifugation der Zellen für 10 min. bei 1000 Upm in der Labofuge GL wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in einem Kulturgefäß ausgesät.

2.4 Fixierung von PCC7-Mz1-Zellen

- 4% PFA: 8% PFA : 8% Saccharose (1:1)

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die auf Deckgläsern gewachsenen Zellen an vorgegebenen Differenzierungstagen steril aus dem Medium entnommen und für 20 min. in 4% PFA bei RT fixiert. Anschließend wurden die Deckgläser in PBS überführt und in mit Parafilm abgedichteten 24 Loch-Platten bei 4°C gelagert. Wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-GFAP-Antikörper durchgeführt, wurden die Zellen vor der Zugabe des Antikörpers für 7 min. mit Ethanol/Essigsäure (95:5) bei -20°C fixiert.

2.5 Immunfluoreszenzanalyse von PCC7-Mz1-Zellen

- Permeabilisierungspuffer: 0,1% Triton X-100 in PBS
- Verdünnungspuffer: 10% FCS, 0,02% NaN₃ in PBS
- Eindeckmittel: 1 mg/ml *p*-Phenylendiamin in PBS, 70% Glycerin,
pH 8,5 (gelagert bei -20°C)

Die auf Deckgläsern fixierten und in PBS aufbewahrten Zellen wurden zunächst zweimal 5 min. in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde jedes Deckglas mit 50 µl Permeabilisierungspuffer überschichtet und für 20 min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Primäantikörper in der unter II 1.4.2 angegebenen Konzentration in Verdünnungspuffer angesetzt, und jedes Deckglas wurde für 1 h mit 50 µl Antikörperlösung in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch drei Waschschriffe von je 5 min. mit PBS entfernt. Der mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundäantikörper wurde dann in der unter II 1.4.3 aufgeführten Konzentration in Verdünnungspuffer angesetzt und vor der Verwendung für 15 min. mit 6000 Upm in eine Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Dadurch sollten möglicherweise gebildete Antikörper-Komplexe abgetrennt werden. Um den konjugierten Farbstoff vor dem Ausbleichen zu schützen, wurde in abgedunkelten

Reaktionsgefäßen gearbeitet. Die Deckgläser wurden mit je 50 µl der Sekundärantikörperlösung für 1 h in einer feuchten Kammer lichtgeschützt inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschriffe á 5 min. in PBS, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Bei Doppelimmunfluoreszenzfärbungen erfolgten die Antikörper-Inkubationen nacheinander. Zunächst wurde der erste Primär- und der entsprechende Sekundärantikörper und danach der zweite Primär- und der entsprechende Sekundärantikörper eingesetzt. Zum Eindecken der Zellen wurde pro Deckglas ein Tropfen des Eindeckmittels auf einen Objektträger aufgetragen, und das Deckglas wurde mit der zellbeschichteten Seite auf den Objektträger gelegt. Überschüssiges Eindeckmittel sowie noch vorhandener Puffer wurden mit einem Tuch entfernt. Anschließend wurden die Ränder der Deckgläser mit Nagellack abgedichtet, um ein Austrocknen des Präparats zu verhindern. Die Objektträger wurden vor Licht geschützt bei -20°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte am Zeiss-Axiophot-Mikroskop und wurde photographisch festgehalten.

2.6 DNA-Synthese Assay

Der Nachweis proliferierender PCC7-Mz1-Zellen wurde durch Zugabe von Bromdesoxyuridin (BrdU) in das Kulturmedium vorgenommen. Bromdesoxyuridin ist ein Basenalogon von Thymidin und wird während der DNA-Replikation sich teilender Zellen in die DNA eingebaut. Über einen anti-BrdU-Antikörper sowie einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper können proliferierende Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden.

- Bromdesoxyuridin: 1 mM in bidest. H₂O

In das Kulturmedium der auf Deckgläsern gewachsenen Zellen wurde 5 bis 15 h vor der Fixierung Bromdesoxyuridin in einer Endkonzentration von 10 µM gegeben. Nach der Fixierung mit 4% PFA (II 2.4) wurden die Zellen gewaschen und permeabilisiert (II 2.5). Um das eingebaute BrdU für den anti-BrdU-Antikörper zugänglich zu machen, wurde die DNA denaturiert, indem jedes Deckglas für 15 min. mit 50 µl 3 M HCl überschichtet wurde. Nach drei 5-minütigen Waschschriffen mit PBS wurde das unter II 2.5 angegebene Protokoll für Immunfluoreszenzanalysen unter Verwendung des primären anti-BrdU-Antikörpers sowie eines FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte direkt nach der Immunfluoreszenzfärbung am Zeiss-Axiophot-Mikroskop, indem pro Bedingung etwa 350-400 Zellen ausgezählt wurden.

2.7 Aufbringen von PCC7-Mz1-Zellen auf Adhäsionsobjektträger

Zur statistischen Auswertung der Expression von Markerproteinen mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurden die PCC7-Mz1-Zellen auf Reaktionsfelder von Adhäsionsobjektträgern (BioRad/München) aufgebracht. Hierdurch lagen die Zellen vereinzelt vor, so daß nach der Immunfärbung unter dem Mikroskop der Anteil der mit dem Antikörper reagierenden Zellen ausgezählt werden konnte.

- Adhäsionsobjektträger: enthält 12 Reaktionsfelder
mit einem Durchmesser von je 5 mm

Die Adhäsionsobjektträger wurden vor der Verwendung zweimal je 10 min. in bidest. H₂O und abschließend für 10 min. in PBS gespült. Dabei ist darauf zu achten, daß die einzelnen Reaktionsfelder nicht austrocknen.

Die PCC7-Mz1-Zellen wurden auf Deckgläsern in 24 Loch-Platten differenziert. Zur Beladung eines Objektträgers wurden Zellen aus zwei Löchern einer 24 Loch-Platte verwendet. Diese wurden an den entsprechenden Differenzierungstagen zunächst zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 500 µl PBS vorsichtig durch Resuspendieren vom Deckglas abgelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 12000 Upm wurde das Zellpellet in 250 µl PBS aufgenommen. Pro Reaktionsfeld wurden je 20 µl der Zellsuspension (ca. 3000 Zellen) aufgetragen und für 20 min. bei RT inkubiert. Nachdem die Zellen sedimentiert waren, wurde die Zelldichte sowie die Intaktheit der Zellen mikroskopisch überprüft. Dann wurden die Zellen, wie unter II 2.4 beschrieben, mit 4% PFA fixiert und anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung (II 2.5) unterzogen.

2.8 Transiente Transfektion

Transiente Transfektionen erfolgten nach der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode (GRAHAM & VAN DER EB, 1973; CHEN & OKAYAMA, 1987), bei der es zur Bildung unlöslicher Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitate kommt, welche von den Zellen endocytotisch aufgenommen werden können. COS-1 Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor pcDNA3-SV40-GAP-43 transfiziert, um die Funktionalität des hergestellten DNA-Konstrukts zu überprüfen.

- 2 x BBS: 50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 6,95
- 1 ml Transfektionsansatz: 5 bzw. 10 µg DNA in 1 x BBS und 125 mM CaCl₂

COS-1 Zellen wurden in DMEM/12,5% FCS in 10 cm-Schalen kultiviert und bei einer Dichte von etwa 70% Konfluenz zur Transfektion verwendet. Der Transfektionsansatz wurde direkt vor der Verwendung hergestellt. Alle verwendeten Lösungen waren sterilfiltriert. 1 ml Transfektionsansatz wurde tropfenweise zum Kulturmedium hinzugegeben. Nach etwa 16 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um überschüssiges Präzipitat zu entfernen. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet, die Proteine extrahiert und für Western-Blot Analysen verwendet (II 4.1).

2.9 Stabile Transfektion von PCC7-Mz1-Zellen

Die Generation stabiler PCC7-Mz1-Klone wurde mittels Lipofektion durchgeführt. Die kationischen Lipide des Transfektionsreagenz Escort™ bilden in wässriger Lösung unilamellare Vesikel (Lipsosmen). Diese kondensieren durch ionische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen DNA und bilden stabile Komplexe. Diese Partikel können unspezifisch auf der Zelloberfläche adhären und mit der Zellmembran fusionieren, wodurch die DNA in das Cytoplasma der Zellen gelangt.

- Transfektionsreagenz: Escort™ (Sigma/Deisenhofen)
N-[1(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-chlorid (DOTAP) / Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) 1:1 (w/w) in 20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,2
- DNA:
 - pcDNA3-bcl-2
 - pcDNA3-SV40-bcl-2
 - pcDNA3-SV40-GAP-43
 - pcDNA3-SV40
- Antibiotikum: 500 mg/ml G418 (Geneticin) in PBS

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf Laminin-beschichteten 3,5 cm-Kulturschalen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 ausplattiert. Für die Transfektionslösung wurde pro Ansatz 5 μg DNA, 5 μl Escort™ in 78 μl DMEM eingesetzt und nach vorsichtigem Mischen für 15 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 μl DMEM/12,5%FCS zur Transfektionslösung wurde diese nach Entfernung des alten Mediums auf die Zellen gegeben. Nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde die Transfektionslösung abgenommen und durch frisches DMEM/12,5% FCS ersetzt. Zur Selektion stabiler transfizierter Zellen wurde 48 Stunden nach Abnahme der Transfektionslösung das Neomycin-Derivat G418 in einer Endkonzentration von 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugesetzt. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt, um die aufgrund fehlender Antibiotika-Resistenz

abgestorbenen, nicht transfizierten Zellen zu entfernen. Zwei Wochen nach Beginn der G418-Behandlung waren alle nicht transfizierten Zellen abgestorben, und nur die Neomycin-resistenten Klone konnten sich weiter teilen. Diese stabil transfizierten Zellen wurden von der Wachstumsfläche abgelöst und zur Generation von Einzelklonen einer limitierten Verdünnung unterzogen (DAVIES, 1994). Dazu wurden 50 oder 100 Zellen pro 96 Loch-Mikrotiterplatte ausgesät. Einzelklone wurden nach 10 bis 12 Tagen auf 24 Loch-Platten und 2 bis 3 Tage später auf 25 cm²-Kulturflaschen umgesetzt. Der Nachweis der erfolgreichen ektopischen Expression erfolgte mittels Western-Blot und Immunfluoreszenzanalysen.

2.10 WST-1 Test

Zur Analyse der Vitalität von Zellen wurde der WST-1 Test verwendet. WST-1 ist ein Tetrazoliumsalz, welches durch das Succinat-Reduktase-System, das zur Atmungskette der Mitochondrien gehört und nur in lebenden Zellen aktiv ist, zu Formazan reduziert wird. Die gebildete Formazan-Menge kann photometrisch bestimmt werden und direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver, lebender Zellen korreliert werden.

Die Zellen wurden in einer 96 Loch-Mikrotiterplatte mit einer Dichte von 5000 Zellen pro Loch in 100 µl Medium ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen mit den zu testenden Substanzen, deren Einfluß auf die Zell-Vitalität untersucht werden sollte, behandelt. Pro Bedingung wurden 8 oder 16 Löcher eingesetzt. Als Referenz dienten je 4 Löcher pro Ansatz, die nur Medium enthielten. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation wurde pro Loch WST-1 in einer Verdünnung von 1:10 zugesetzt und für 2 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit wurde das WST-1-Reagenz in Abhängigkeit von der Zellvitalität zu Formazan umgesetzt. Das gebildete Formazan besitzt ein Absorptionsmaximum im violetten Bereich des sichtbaren Lichts, so daß die quantitative Auswertung über eine spektrophotometrische Messung der Absorption bei 405 nm in einem Immunoreader durchgeführt werden konnte. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden mit Hilfe des Microsoft Programms Excel 7.0 ausgewertet. Die durchschnittlichen Referenzwerte der Ansätze ohne Zellen wurden von den korrespondierenden Werten mit Zellen abgezogen, und die Mittelwerte sowie Standardabweichungen der einzelnen Ansätze wurden berechnet. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Experimente drei- bis achtmal wiederholt.

2.11 Durchflußcytometrie

Da die PCC7-Mz1-Zellkulturen und die in dieser Arbeit erzeugten Varianten nicht im Zellzyklus synchronisiert sind, sollte der Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklus-Phasen bestimmt

werden. Dazu wurde die DNA mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid markiert, so daß die Fluoreszenzintensität als Maß für den im Zellkern vorliegenden DNA-Gehalt dient. Zellen in der G1/G0-Phase besitzen einen diploiden Chromosomensatz, während Zellen der G2- und M-Phase einen doppelt diploiden Chromosomensatz enthalten. Die Bestimmung des DNA-Gehalts wurde mit einem FACScan-Gerät (Becton Dickinson/Heidelberg), mit dem die Fluoreszenzintensität (Kanal FL2: 585 nm) auf Einzelzellniveau ermittelt wird, durchgeführt.

- Lysispuffer: 0,5% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS
- Propidiumiodid: 5 mg/ml in PBS

Pro Messung wurden $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Diese wurden zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und mit 10 ml Lysispuffer gemischt. Durch 10-minütige Zentrifugation in der Labofuge GL bei 1000 Upm wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden erneut in 10 ml Lysispuffer aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min. bei 1000 Upm in der Labofuge GL wurde das Pellet mit 100 µl 50 µg/ml Propidiumiodid versetzt und für 15 min. im Dunkeln inkubiert. Vor der Messung im FACScan Gerät wurde der Ansatz mit 400 µl PBS verdünnt und in ein FACS-Meßröhrchen (Falcon 2052) überführt. Die Messung sowie die Auswertung erfolgte mit dem Programm FACScan 2.1, wobei jeweils 10000 Ereignisse gemessen wurden. Für die Versuche wurden die in Tabelle 3 angegebenen Geräteeinstellungen gewählt.

Kanal	Datenmodus	Detektor	Verstärker	Schwellenwert
FSC	linear	E00	1.17	50
SSC	linear	380	1.00	50
FL2	linear	400	1.00	100

Tab. 3: Einstellungen des FACScan-Geräts zur Zellzyklusanalyse nach Propidiumiodid-Färbung

2.12 *In vivo* Markierung von PCC7-Mz1-Zellen mit Orthophosphat

Zur Analyse des Phosphorylierungszustandes des GAP-43 Proteins in intakten PCC7-Mz1-Zellen wurden diese mit [32 P]-H₃PO₄ metabolisch markiert.

- Medium: phosphatfreies DMEM mit 12,5% dialysiertem FCS

PCC7-Mz1-Zellen wurden in einer Dichte von $1,75 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche auf 10 cm-Schalen ausplattiert und an den entsprechenden Differenzierungstagen zweimal mit phosphatfreiem DMEM gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 h mit $100 \mu\text{Ci/ml}$ [^{32}P]- H_3PO_4 in phosphatfreiem DMEM inkubiert. Zur Aktivierung von PKC wurden die Zellen für 10 min. mit 200 nM PDB behandelt, bevor die Proteine, wie unter II 4.2 beschrieben, geerntet und hitzestabile Extrakte hergestellt wurden. Phosphoryliertes GAP-43 wurde immunpräzipitiert (II 4.6) und nach Auftrennung durch SDS-PAGE (II 4.1.1) mittels Exposition eines Röntgenfilms dargestellt.

2.13 *In vivo* Markierung von PCC7-Mz1-Zellen mit Palmitinsäure

Um den Palmylierungsstatus des GAP-43 Proteins in PCC7-Mz1-Zellen sowie in den daraus erzeugten Klonen zu untersuchen, wurden die Zellen mit [$9,10\text{-}^3\text{H}$]-Palmitinsäure metabolisch markiert.

Die Zellen wurden auf 10 cm-Schalen ausplattiert und an den entsprechenden Differenzierungstagen zweimal mit DMEM/1% FCS gewaschen, bevor sie für 4 Stunden mit $0,5 \text{ mCi/ml}$ [$9,10\text{-}^3\text{H}$]-Palmitinsäure in DMEM/1% FCS inkubiert wurden. Anschließend wurden, wie unter II 4.2 beschrieben, die Proteine extrahiert und palmyliertes GAP-43 konnte nach Immunpräzipitation (II 4.6) und SDS-PAGE (II 4.1.1) durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert werden.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1 DNA-Klonierung

3.1.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

- 3 x Probenpuffer: 20% Ficoll 400, 0,075% Bromphenolblau, 0,075% Xylencyanol
in 3 x TBE
- Agarosegele: 0,5 bis 0,75 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer mit 0,08 µg/ml
Ethidiumbromid
- Laufpuffer: 1 x TBE mit 0,08 µg/ml Ethidiumbromid

Alle gelelektrophoretischen DNA-Analysen wurden mittels horizontaler Gelelektrophorese in 1 bis 1,5-%-igen Agarosegelen durchgeführt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Sowohl der Laufpuffer als auch die Agarosegele enthielten 0,08 µg Ethidiumbromid pro ml TBE-Puffer. Pro Geltasche wurden zwischen 50 ng und 1 µg DNA aufgetragen, wobei die DNA-Probe zuvor mit 3 x Probenpuffer versetzt wurde. Die Elektrophorese erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 200 V, und die aufgetrennte DNA wurde unter UV-Licht (254 nm) visualisiert und fotografiert.

Als Längenstandard für lineare, doppelsträngige DNA wurden 15 µl einer Mischung von je 100 ng *Styl* restringierter λ-DNA und *AluI* restringierter pBR322-DNA parallel zu den DNA-Proben aufgetrennt. Die sichtbaren Restriktionsfragmente des Standards hatten folgende Längen:

λ-DNA *Styl* geschnitten: 19329*, 7743, 6223, 4254*, 3472, 2690, 1882, 1489, 925, 421 bp

pBR322 *AluI* geschnitten: 908, 659/656, 521, 403, 281, 257, 226 bp

Die mit * markierten Restriktionsfragmente können nur separiert werden, wenn die DNA vor dem Auftrag für 10 min. bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt wurde.

3.1.2 Restriktionsspaltung von DNA

Die endonukleolytische Spaltung von DNA mit bakteriellen Restriktionsenzymen wurde unter den vom Hersteller angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen durchgeführt, wobei der entsprechende 10 x Restriktionspuffer des Herstellers verwendet wurde. Ein Restriktionsansatz enthielt in 10 µl 100 bis 500 ng DNA, 1 µl 10 x Restriktionspuffer sowie durchschnittlich 2 U Enzym und wurde für 1 h bei der empfohlenen Temperatur inkubiert. Die Vollständigkeit des DNA-Verdaus wurde durch analytische Agarosegelelektrophorese überprüft.

Für eine präparative Restriktion von 1 bis 20 µg DNA wurden die benötigten Enzymeinheiten nach der folgenden Formel berechnet:

$$U(\text{Enzym}) = X \text{ mg DNA} \times \frac{\text{Anzahl der Schnittstellen im Plasmid} \times \text{MG von I}}{\text{Anzahl der Schnittstellen in I} \times \text{MG des Plasmids}}$$

3.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QiaexII®-Kit (Qiagen/Hilden) verwendet. Das Prinzip dieser DNA-Isolation beruht darauf, daß die Agarose in Lösung gebracht wird, und Nukleinsäuren quantitativ und selektiv unter Hochsalz-Bedingungen an die Qiaex®-Silica-Gelpartikel binden. Die Elution der DNA erfolgt mit einer Lösung geringer Salzkonzentration.

Zur Isolierung des gewünschten DNA-Fragments wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten, wobei möglichst wenig Agarose mitgeführt werden sollte. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde gewogen, mit 3 Volumen Puffer QX1 des QiaexII®-Kits versetzt und bei 50°C inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst war (ca. 5 min.). Dem Ansatz wurden 10 µl Qiaex®-Silica-Gelpartikel zugefügt, auf dem Vortex gemischt und für 10 min. unter gelegentlichem Schütteln bei 50°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min. bei 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde das Pellet mit 500 µl Puffer QX1 versetzt und durch kräftiges Mischen gewaschen. Das durch eine weitere Zentrifugation für 1 min. bei 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge erhaltene Pellet wurde noch zweimal mit je 500 µl PE Puffer des QiaexII®-Kits gewaschen und anschließend für 10 bis 15 min. bei RT getrocknet. Zur Extraktion der DNA von den Qiaex®-Silica-Gelpartikeln wurden diese mit 15 µl bidest. H₂O versetzt, auf dem Vortex gemischt und für 10 min. bei 50°C inkubiert. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der die DNA enthaltende Überstand vorsichtig abgenommen. Die Effizienz der DNA-Isolation wurde durch einen zweiten Extraktionsschritt mit 15 µl bidest. H₂O erhöht. Die Ausbeute der DNA-Isolation wurde auf einem Agarosegel überprüft und betrug zwischen 50 bis 80% der eingesetzten DNA-Menge.

3.1.4 Dephosphorylierung von Vektoren

Wurde zur Klonierung von Fremd-DNA in einen Vektor nur eine Restriktionsschnittstelle verwendet, wurde der Vektor nach der Linearisierung dephosphoryliert, um seine Rezirkularisierung bei der Ligationsreaktion zu verhindern (Autoligation).

- 10 x Puffer: 1 mM EDTA, 0,5 M Tris/HCl, pH 8,5
- Alkalische Phosphatase: 1 U/µl in 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, 50% Glycerin (v/v), 25 mM Tris/HCl, pH 7,6

Die Abspaltung des 5'-Phosphatrestes an den DNA-Enden von etwa 5 µg Vektor-DNA erfolgte mit 2 U alkalischer Phosphatase bei 37°C in einem Volumen von 65 µl für 2 h (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Reaktion wurde gestoppt, indem der gesamte Restriktionsansatz direkt auf ein Agarosegel aufgetragen wurde, aus dem dann das Vektor-DNA-Fragment isoliert wurde (II 3.1.3).

3.1.5 Ligation von DNA

- 5 x Ligase-Puffer: 25% (w/v) PEG 6000, 0,5 mM ATP, 50 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 50 mM Tris/HCl, pH 7,0
- T4-DNA-Ligase: 1 U/µl in 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 60 mM KCl, 50% (v/v) Glycerol, 20 mM Tris/HCl, pH7,5

Die Ligation von geschnittenen und aus Agarosegelen extrahierten DNA-Fragmenten in die entsprechenden restringierten und gereinigten Vektoren erfolgte in einem Gesamtvolumen von 15 µl. Pro Ligationsansatz wurden 2 bis 3 pmol/ml Vektor-DNA und 4 bis 6 pmol/ml Insert-DNA in 1 x Ligase-Puffer sowie 1 U T4-DNA-Ligase eingesetzt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Ligation erfolgte ü.N. bei 18°C. Als Kontrolle wurde die Vektor-DNA allein mit Ligase inkubiert (Autoligation).

3.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue wurden nach der Methode von HANAHAN (1983) hergestellt. Durch die Behandlung mit zweiwertigen Ionen (Ca²⁺, Rb²⁺, Mn²⁺) werden die Bakterien aufnahmefähig (kompetent) für DNA gemacht.

- TFB I-Puffer: 30 mM Na-Acetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerol, pH 5,8
- TFB II-Puffer: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% (v/v) Glycerol, pH 7,0

Von einer einzelnen Bakterienkolonie wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und ü.N. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 in 200 ml LB-Medium verdünnt und auf dem Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₅₉₅ von 0,45 bis 0,55 wachsen. Eine OD₅₉₅ entspricht etwa 8 x 10⁸ Bakterien/ml. Die Bakterienkultur wurde auf Eis abgekühlt, in autoklavierte SS34-Röhrchen gefüllt und bei 4000 Upm in einem auf 4°C vorgekühlten SS34-Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Danach wurde das Bakterienpellet vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen in 15 ml eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde

10 min. auf Eis inkubiert und anschließend bei 3000 Upm für 10 min. im SS34-Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde vorsichtig in 4 ml TFB II-Puffer aufgenommen. Je 200 µl dieser Bakterienlösung wurden auf Trockeneis in sterile Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

3.3 Transformation kompetenter Bakterien

Die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende Plasmid-DNA (bis maximal 100 ng) wurde mit 200 µl kompetenter Bakterienlösung gemischt, für 20 min. auf Eis gestellt und dabei gelegentlich aufgewirbelt. Es folgte ein Hitzeschock für 90 sek. bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf Eis abgekühlt, mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Bakterienlösung wurde unter selektionierenden Bedingungen auf LB-Ampicillin-Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen, da die verwendeten Vektoren ein Ampicillin-Resistenzgen enthalten. Nach etwa zwölfstündiger Inkubation bei 37°C wurden Einzelkolonien sichtbar. Die Platten mit den transformierten Bakterien wurden mit Parafilm abgedichtet und bei 4°C gelagert.

3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

3.4.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen Charakterisierung von Plasmiden wurden diese über alkalische Lyse der Bakterien präpariert (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Hierzu wurden einzelne Bakterienkolonien von den selektionierenden LB-Platten mit sterilen gelben Spitzen in 3 ml LB-Ampicillin-Medium angeimpft und ü.N. bei 37°C im Schüttler kultiviert.

- Lösung 1: 50 mM Glucose, 50 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
- Lösung 2: 1% SDS, 0,2 M NaOH (frisch angesetzt)
- Lösung 3: 3 M Na-Acetat, pH 4,8
- Lithium-Chlorid-Lösung: 5 M LiCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

Je 1,5 ml der ü.N. gewachsenen Bakteriensuspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 30 sek. bei 8000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Bakterienpellet wurde in 150 µl Lösung 1 resuspendiert und für 5 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Lösung 2 zugegeben, um die Bakterien zu lysieren. Durch Zugabe von 230 µl Lösung 3 wurde der Ansatz neutralisiert. Die bakterielle

DNA und Proteine wurden denaturiert und ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung blieb. Das Bakterienlysat, das einen flockigen Niederschlag bildete, wurde für 10 min. auf Eis gestellt und anschließend für 10 min. bei 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und die Nukleinsäuren wurden mit einem Volumen (etwa 700 µl) Isopropanol präzipitiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min. bei 140000 Upm. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in 250 µl bidest. H₂O aufgenommen. Zur Fällung der RNA wurden 250 µl Lithium-Chlorid-Lösung zugegeben und 10 min. auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min. bei 14000 Upm wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß, in dem 1 ml Ethanol abs. vorgelegt worden war, überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der Ansatz 1-2 min. bei RT inkubiert und dann für 5 min. bei 14000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 bis 50 µl bidest. H₂O aufgenommen. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei 4°C gelagert.

3.4.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA, die für Transfektionen benötigt wurden, wurde eine Maxipräparation aus 500 ml Bakterienkultur durchgeführt. Dazu wurde der Nucleobond® AX Kit (Macherey-Nagel/Düren), dessen Prinzip auf einer modifizierten alkalischen Lyse mit anschließender Anionenaustauschchromatographie beruht, verwendet.

- S1-Puffer: 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
- S2-Puffer: 200 mM NaOH, 1% SDS
- S3-Puffer: 2,8 M KAc, pH 5,1
- N2-Puffer: 100 mM Tris, 15% Ethanol, 900 mM KCl, mit H₃PO₄ auf pH 6,3 eingestellt
- N3-Puffer: 100 mM Tris, 15% Ethanol, 1150 mM KCl, mit H₃PO₄ auf pH 6,3 eingestellt
- N5-Puffer: 100 mM Tris, 15% Ethanol, 1000 mM KCl, mit H₃PO₄ auf pH 8,5 eingestellt
- Nucleobond® AX
500-Säule: maximale Bindungskapazität beträgt 500 µg Plasmid-DNA

Von den mit dem zu präparierenden Plasmid transformierten Bakterien, die auf selektionierenden LB-Platten gewachsen waren, wurden Einzelkolonien gepickt und in 5 ml LB-Ampicillin-Medium angeimpft. Diese Vorkulturen wurden tagsüber bei 37°C auf dem Schüttler wachsen gelassen und dann in 500 ml LB-Ampicillin-Medium verdünnt. Diese Wachstumskultur wurde ü.N. auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde für 10 min. mit 6000

Upm bei 4°C im GSA-Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Bakterienpellet wurde in 12 ml S1-Puffer vorsichtig auf Eis resuspendiert. Anschließend wurden 12 ml S2-Puffer zugegeben, gemischt und für 5 min. bei RT inkubiert. Es wurden 12 ml S3-Puffer zugesetzt, und der Ansatz wurde zu einer homogenen Suspension gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat für 40 min. mit 12000 Upm bei 4°C im SS34-Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde eine Nucleobond® AX 500-Säule mit 5 ml N2-Puffer equilibriert. Der Überstand des abzentrifugierten Bakterienlysats wurde dann durch eine Mullbinde auf die Säule appliziert, wobei der Durchfluß verwahrt wurde. Dann wurde zweimal mit je 12 ml N3-Puffer gewaschen, und die gebundene Plasmid-DNA wurde mit 6 ml N5-Puffer von der Säule eluiert. Anschließend wurde die Säule noch einmal mit 5 ml N2-Puffer equilibriert, der Durchfluß nach der ersten Applikation wurde erneut auf die Säule aufgetragen, und die Waschschriffe sowie Elution erfolgten wie oben beschrieben. Zur Fällung der erhaltenen Plasmid-DNA wurden 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und für 5 min. bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 8500 Upm für 30 min. bei 4°C im AS 4.13 Rotor der Centrikon-Kühlzentrifuge. Das Pellet wurde mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen, 5 bis 10 min. bei RT getrocknet und in 400 µl bidest H₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, wobei die bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser gemessene Absorption aufgrund der aromatischen Ringe der DNA-Basen nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden kann. 1 OD₂₆₀ entspricht etwa 40 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Qualität der DNA wurde durch Restriktion und analytische Gelelektrophorese überprüft.

3.5 Northern-Blot Analyse

3.5.1 Präparation von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde der "RNeasy Total RNA Kit" (Qiagen/Hilden) eingesetzt. Das Prinzip dieser RNA-Präparations-Technik besteht darin, daß die RNA nach der Lyse der Zellen unter stark denaturierenden Bedingungen in ein Milieu ohne RNase-Aktivität gebracht wird, um dann auf eine Silica-Membran appliziert zu werden. In einem Hoch-Salz-Puffer-System bindet RNA spezifisch an diese Membran, während alle anderen Komponenten durch mehrere Waschschriffe entfernt werden. Die Elution der reinen RNA erfolgt mit RNase-freiem Wasser. Die maximale Bindekapazität der Membran beträgt 100 µg RNA.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden jeweils Zellen von drei 10 cm-Schalen, die mit der unter II 2.2 angegebenen Zelldichte ausplattiert worden waren, eingesetzt. Das Kulturmedium wurde entfernt, und die adhärennten Zellen wurden zweimal mit je 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen jeder Schale wurden mit 600 µl Lysispuffer RLT, dem 10 µl/ml β-Mercaptoethanol frisch zugesetzt worden waren, versetzt und mit einem Gummispattel abgelöst.

Zur Homogenisierung der Zellen und zum Scheren der genomischen DNA wurde das Lysat viermal mit einer sterilen Spritze durch eine Kanüle aufgezogen. Anschließend wurden zu jeder Schale 600 µl 70% Ethanol gegeben und mit dem Lysat gemischt. Dann wurden jeweils 600 µl auf die Membran appliziert und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 15 sek. bei 10000 Upm zentrifugiert. Bei diesem Schritt bindet die RNA spezifisch an die Membran. Der Durchfluß wurde verworfen. Nachdem das gesamte Lysat auf die Membran gegeben worden war, folgte ein Waschschrift mit 700 µl RW1-Waschpuffer. Nach 15 sek. Zentrifugation bei 10000 Upm wurde der Durchfluß erneut verworfen, und die Membran wurde in ein neues, steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Die Membran wurde dann mit 500 µl RPE-Waschpuffer wie oben behandelt, bevor in einem letzten Waschschrift weitere 500 µl RPE-Waschpuffer appliziert wurden. Die Zentrifugationsdauer betrug jetzt 2 min. bei 140000 Upm, wodurch die Membran vollständig von dem im RPE-Waschpuffer enthaltenen Ethanol befreit werden sollte. Die Membran wurde wiederum in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, und die RNA wurde zweimal mit 25 µl DEPC-H₂O eluiert, wobei jeweils 1 min. bei 10000 Upm zentrifugiert wurde. Die Konzentrationsbestimmung der präparierten RNA erfolgte photometrisch. Aufgrund des Absorptionsmaximums der aromatischen Ringe der Basen in der RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm kann die gegen Wasser gemessene Absorption nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz zur Bestimmung der RNA-Konzentration herangezogen werden. 1 OD₂₆₀ entspricht einer RNA-Konzentration von ca. 30 µg/ml.

3.5.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

- 1,2%-iges Formaldehyd-Agarosegel: 0,6 g Agarose, 36 ml bidest. H₂O, 5 ml
10 x MOPS, 9 ml 37% Formaldehyd
- Probenpuffer: 1 x MOPS, 50% Formamid, 1,8 M Formaldehyd,
3,5% Ficoll 400, 0,025% Bromphenolblau

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1,2%-igen Agarosegelen, denen Formaldehyd als stark denaturierendes Agens zur Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA zugesetzt wurde. Zur Herstellung des RNA-Gels wurde zunächst die Agarose in Wasser gelöst, aufgeköcht und auf ca. 60°C abgekühlt, bevor MOPS und Formaldehyd direkt vor dem Gießen hinzugegeben wurden. Die RNA-Proben wurden mit etwa 2/3 Volumen Probenpuffer versetzt, für 15 min. bei 56°C inkubiert und dann 5 min. auf Eis abgekühlt. Zu jeder Probe wurde 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) gegeben, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurde.

Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern bei 100 V mit 1 x MOPS als Laufpuffer für ca. 3 h. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

3.5.3 Northern-Blot Transfer

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA aus dem Gel mittels Diffusion auf eine Nylon-Membran transferiert.

Eine Glasplatte wurde über eine mit dem Transferpuffer 10 x SSC gefüllte Schale gelegt. Darüber wurden zwei Lagen mit Transferpuffer befeuchtetes 3MM-Papier so gelegt, daß ihre Enden in die Pufferkammer eintauchten. Das in 10 x SSC befeuchtete RNA-Gel wurde mit der Unterseite nach oben auf die 3MM-Papiere plaziert. Die der Größe des Gels entsprechend zugeschnittene Nylon-Membran (Hybond N/Amersham) wurde in 10 x SSC angefeuchtet und auf das Gel aufgelegt. Zwei weitere Lagen 3MM-Papier folgten auf die Membran. Abschließend wurden mehrere Lagen saugfähiger Papiertücher aufgelegt. Der Aufbau wurde beschwert, um die Diffusion des Puffers durch das Gel und die Membran in die Papiertücher zu erleichtern. Durch die entstehenden Kapillarkräfte wurden die RNA-Moleküle aus dem Gel auf die Membran übertragen. Um das Gel herum wurde zusätzlich Frischhaltefolie ausgelegt, um den direkten Kontakt zwischen den unteren Lagen 3MM-Papier und den Papiertüchern zu verhindern. Der Transfer erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran in 0,2 x SSC, 0,2% SDS gewaschen und für 2 h bei 80°C gebacken, um die RNA auf der Membran zu immobilisieren. Die Positionen der 28S und 18S rRNAs wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und konnten als Größenstandard auf der Membranrückseite markiert werden.

3.5.4 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

Die radioaktive Markierung von DNA-Proben erfolgte nach der "Random Primed Oligolabeling"-Methode, bei der sich in ihrer Sequenz zufällig zusammengesetzte Oligonukleotide an komplementäre einzelsträngige DNA anlagern und in Anwesenheit eines dNTP-Mixes sowie eines α -[³²P]-dNTP's vom Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I verlängert werden. Für diese Reaktion wurden die "Ready-to-go DNA Labeling beads" (Pharmacia Biotech/Freiburg) unter Zugabe von α -[³²P]-dCTP verwendet.

- "Ready-to-go DNA labeling beads": Bei RT stabile Komponenten: Puffer, dATP, dGTP, dTTP, FPLCpure®, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (7-12 units), zufällig zusammengesetzte Oligonukleotide (9-mere)
- TE 100: 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8
- Säulenmaterial: 1 g Sephadex-G75 in 15 ml TE 100, 3 h quellen lassen und anschließend entgasen
- Stop-Puffer: 0,2 M EDTA, 5% Glycerin, 1% Dextranblau

Die "DNA labeling beads" eines Ansatzes wurden zunächst in 20 µl bidest. H₂O gelöst und für 5 bis 60 min. auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden 50 ng der zu markierenden DNA-Probe in 25 µl bidest. H₂O für 3 min. bei 95°C denaturiert. Nachdem die DNA für 2 min. auf Eis abgekühlt war, wurde sie mit den gelösten Reaktions-Kügelchen vereinigt und mit 5 µCi α-[³²P]-dCTP (3000Ci/mmol) versetzt. Die Markierungsreaktion erfolgte für 30 min. bei 37°C. Die Abtrennung der freien, nicht eingebauten radioaktiv-markierten Nukleotide von der markierten Probe erfolgte nach dem Prinzip der Gelfiltrationschromatographie. Dazu wurde eine Pasteurpipette mit Watte verschlossen, mit Sephadex G75 gefüllt und mit TE 100 equilibriert. Nach Ablauf der Markierungsreaktion wurden 15 µl Stop-Puffer zugesetzt, um die Aktivität der DNA-Polymerase zu stoppen. Der gesamte Ansatz wurde auf die Säule appliziert und in 200 µl Schritten mit TE 100 eluiert. Die radioaktiv markierte Probe wanderte mit der Blaufont des Stop-Puffers in der Säule. Die Markierungseffizienz konnte durch Messung der Cerenkov-Strahlung von 1 µl jedes Eluats im Radioaktivitätsmeßgerät bestimmt werden. Bevor die DNA-Probe für die Detektion eines Northern-Blots eingesetzt werden konnte, wurde sie für 5 min. aufgekocht und auf Eis abgekühlt, um die DNA für die Hybridisierung einzelsträngig zu erhalten.

3.5.5 Hybridisierung von Northern-Blot-Membranen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

- Hybridisierungspuffer: 50% Formamid, 5 x Denhardt's-Lösung, 6 x SSC, 0,5% SDS
- 100 x Denhardt's-Lösung: 20 g/l BSA, 20 g/l Ficoll 70, 20 g/ Polyvinylpyrrolidon
- Waschpuffer 1: 2 x SSC, 0,2% SDS
- Waschpuffer 2: 0,2 x SSC, 0,2% SDS

Zunächst wurde die Membran, auf der die transferierte RNA immobilisiert worden war, mit bidest. H₂O befeuchtet. Es folgte die Vorhybridisierung mit 10 ml Hybridisierungspuffer, dem 250 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA frisch zugesetzt wurde, wodurch unspezifische Bindungsstellen für DNA auf der Membran abgesättigt wurden. Die Vorhybridisierung wurde für mindestens 4 h bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurde die radioaktiv markierte, denaturierte DNA-Probe in 10 ml frisch angesetzten Hybridisierungspuffer, dem erneut 250 µg/ml Heringssperma-DNA zugesetzt worden war, gegeben und ü.N. mit der Membran bei 42°C inkubiert. Nach der Entfernung der radioaktiven Probe wurde die Membran dreimal für 15 min. mit Waschpuffer 1 bei 42°C und danach dreimal für 15 min. bei 60°C mit Waschpuffer 2 gewaschen. Der Nachweis gebundener DNA-Sonde erfolgte durch Autoradiographie eines Röntgenfilms.

3.6 Primer Extension Analysen

Primer Extension Analysen wurden durchgeführt, um die 5'-Enden spezifischer mRNAs zu identifizieren. Zunächst wurde aus Gesamt-RNA poly-(A)⁺-RNA gewonnen, die dann mit einem radioaktiv markierten Primer, der komplementär zum nicht-kodogenen Bereich der zu analysierenden mRNA ist, einer Reversen Transkriptase-Reaktion unterzogen wurde. Die Länge der synthetisierten cDNA wurde auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel bestimmt und entspricht der Distanz zwischen dem 5'-Ende der untersuchten mRNA sowie der Lage des eingesetzten Primers.

3.6.1 Isolierung von poly-(A)⁺-RNA

Für die Anreicherung von poly-(A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA wurde der OligotexTM mRNA Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Diese Methode beruht auf der spezifischen Hybridisierung der poly-(A)⁺-Enden der mRNAs an dT₃₀-Oligonukleotide, die kovalent an Oligotex-Partikel gebunden sind. Die Elution der mRNA erfolgt durch Alkali- oder Hitzebehandlung, wodurch die Wasserstoffbrücken zwischen den Thymin- und Adenin-Nukleotiden aufgelöst werden.

- Oligotex-Suspension: 10% (w/v) in 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,1% NaN₃, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 2 x Bindungs-Puffer: 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% SDS, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
- Wasch-Puffer OW2: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
- Elutions-Puffer: 5 mM Tris/HCl, pH 7,5

Für eine Mini-Präparation von poly-(A)⁺-RNA wurden etwa 250 µg Gesamt-RNA, die, wie unter II 3.5.1 beschrieben, isoliert wurde, eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 250 µl eingestellt und mit dem gleichen Volumen 2 x Bindungs-Puffer versetzt. Dann wurden 15 µl der auf 37°C vorgewärmten Oligotex-Suspension zugegeben und für 3 min. bei 65°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Anschließend folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, während der die poly-(A)⁺-Enden der mRNAs an die Oligotex-Partikel hybridisieren. Nach einer Zentrifugation für 2 min. mit 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verwahrt, um die Effizienz der mRNA-Bindung zu überprüfen. Das Pellet wurde in 400 µl Wasch-Puffer OW2 resuspendiert und auf eine Membran überführt. Durch jeweils 30-sekündige Zentrifugation wurden drei Waschschrte mit je 400 µl Waschluffer OW2 durchgeführt. Anschließend folgte die Elution der poly-(A)⁺-RNA mit zweimal 50 µl Elutions-Puffer, der auf 70°C vorgewärmt worden war.

Durch Messung der OD₂₆₀ wurde die Konzentration der poly-(A)⁺-RNA bestimmt. Es konnten etwa 7 µg poly-(A)⁺-RNA isoliert werden, was fast 3% der eingesetzten Gesamt-RNA

entspricht. Die Ausbeute liegt damit im zu erwartenden Bereich, da der Anteil von poly-(A)⁺-RNA an Gesamt-RNA ungefähr 2-4% beträgt.

3.6.2 Radioaktive Markierung der Primer

Die verwendeten Primer wurden am 5'-Ende durch eine Polynukleotid-Kinase (PNK)- Reaktion markiert.

- Primer: 20 pmol/μl in bidest. H₂O
- 5 x PNK-Puffer: 50 mM MgCl₂, 25 mM DTT, 0,5 mM Spermidine, 0,5 mM EDTA, 250 mM Tris/HCl, pH 7,6
- Polynukleotid-Kinase T4: 15 U/μl in 25 mM KCl, 2 mM DTT, 0,1 μM ATP, 50% (v/v) Glycerol, 20 mM Tris/HCl, pH 7,2

In einem Gesamtvolumen von 50 μl wurden jeweils 20 pmol des zu markierenden Primers mit 1 x PNK-Puffer, 15 U Polynukleotid-Kinase T4 sowie 15 μCi γ-[³²P]-ATP für 1h bei 37°C inkubiert. Die Polynukleotid-Kinase wurde dann für 2 min. bei 95°C thermisch deaktiviert. Anschließend wurden 2 pmol Primer mit 2 μg der zu analysierenden poly-(A)⁺-RNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaOAc, pH 4,8 sowie 5 Volumen 100% Ethanol ü.N. gefällt, und das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen. Die Effizienz der Markierung wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung überprüft.

3.6.3 Hybridisierung und Primer Extension Reaktion

- Hybridisierungspuffer: 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 80% Formamid, 40 mM PIPES, pH 4,6
- Reverse Transkriptase-Puffer: 6 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 50 mM Tris/HCl, pH 8,2
- dNTP-Mix: 25 mM dGTP, 25 mM dCTP, 25 mM dATP, 25 mM dTTP
- AMV-Reverse Transkriptase: 20 U/μl in 2 mM DTT, 0,2% Triton X-100, 50% (v/v) Glycerol, 200 mM K₂HPO₄, pH 7,2

Das nach der Fällung erhaltene Pellet wurde in 10 μl Hybridisierungspuffer gelöst und für 2 min. bei 95°C erhitzt. Es folgte eine Inkubation für 3 h bei 55°C, während der sich der Primer an seine komplementäre Sequenz auf der mRNA anlagerte. Für die anschließende Primer Extension Reaktion wurden 40 μl des Reverse Transkriptase-Puffers, 1 mM dNTP-Mix sowie 20 U AMV-Reverse Transkriptase zugesetzt und für 1 h bei 45°C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaOAc, pH 4,8 sowie 5 Volumen 100%

Ethanol ü.N. gefällt. Nachdem das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen worden war, wurde es in 5 µl bidest. H₂O aufgenommen.

3.6.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

- PAA-Gel (6%): 24 ml Rotiphorese® Sequenziergel Konzentrat
(23,75% Acrylamid, 1,25% Methylenbisacrylamid, 50% Harnstoff)
66 ml Rotiphorese® Sequenziergel Verdünner
(50% Harnstoff)
10 ml Rotiphorese® Sequenziergel Pufferkonzentrat
(50% Harnstoff, 20 mM EDTA, 1 M Tris/Borat, pH8,3)
800 µl 10% APS
4 µl 99% TEMED
- Stop-Puffer: 0,3% Xylencyanol, 0,3% Bromphenolblau, 91,5% Formamid,
10 mM EDTA, pH 7,5

Die Produkte der Primer Extension Reaktion wurden mit Hilfe einer vertikalen Polyacrylamidgelelektrophorese mit 0,4 mm Abstandshaltern aufgetrennt (Sequi-Gen® GT Nukleinsäure Elektrophoresekammer). Dazu wurden die Reaktionsansätze mit dem gleichen Volumen Stop-Puffer versetzt und für 10 min. bei 80°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in 1 x TBE Puffer für 2,5 bis 4 h bei 50 Watt durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 5 min. in 10% Essigsäure / 10% Ethanol fixiert, auf 3MM-Papier gezogen und im Geltrockner für 1h bei 75°C unter Vakuum getrocknet. Der Nachweis der Primer Extension Produkte erfolgte durch Autoradiographie.

3.7 Qualitative Analyse von Apoptose

3.7.1 DNA-Extraktion

- Lysispuffer: 20 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 5 mM Tris/HCl, pH 8,0
- Proteinase K: 10 mg/ml in bidest. H₂O
- RNase A: 10 mg/ml in bidest. H₂O (muß vor Gebrauch zur Denaturierung von DNasen aufgeköcht werden)

Zur qualitativen Analyse des DNA-Leitermusters wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^4 pro cm² Wachstumsfläche auf 6 cm-Schalen ausgesät. Nach Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen wurde der die abgelösten Zellen enthaltende Mediumüberstand abgenommen und in 12 ml Weißkappen-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch eine

Zentrifugation bei 4°C für 10 min. im Ausschwing-Rotor AS 4.7 (Centrikon T24) pelletiert. Das Medium wurde entfernt, und das Zellpellet wurde sofort in 20 µl Lysispuffer aufgenommen und mit 10 µg Proteinase K versetzt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 50°C. Anschließend wurde das Lysat für 1 h mit 10 µg RNase A bei 50°C inkubiert. Danach wurden die Proben für 10 min. auf 70°C erhitzt, um die Enzyme zu denaturieren. Die Lysate konnten bei 4°C aufbewahrt werden.

3.7.2 Gelelektrophorese zur Analyse von DNA-Leitermustern

- Probenpuffer: 10 mM EDTA, 1% LM-Agarose, 0,25% Bromphenolblau, 40% Saccharose, pH 8,0
- 1,4-%iges Agarosegel: 0,98 g Agarose in 70 ml 1 x TBE mit 0,08 µg/ml Ethidiumbromid
- Laufpuffer: 1 x TBE mit 0,08 µg/ml Ethidiumbromid

Zur gelelektrophoretischen Analyse der DNA-Proben wurden 1,4%-ige Agarosegele sowie Kämme mit 1 cm breiten Taschen verwendet, um ein Auftragungsvolumen von maximal 75 µl pro Tasche zu erreichen. Der Probenpuffer wurde jeweils frisch hergestellt. Dazu wurden 10 mg LM-Agarose in 430 µl bidest. H₂O sowie 400 mg Saccharose in 400 µl bidest. H₂O unter Kochen gelöst und sofort in einen auf 56°C temperierten Heizblock gestellt. 10 mM EDTA und 0,25% Bromphenolblau wurden hinzugefügt. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden ebenfalls auf 56°C vorgewärmt, anschließend mit je 15 µl Probenpuffer versetzt und sofort vollständig auf das Agarosegel aufgetragen. Nach dem Erstarren der LM-Agarose in den Proben wurde eine horizontale Elektrophorese zur Auftrennung der DNA bei 150 V durchgeführt. Das DNA-Leitermuster im Gel wurde unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und photographiert. Als Längenstandard wurde parallel der unter II 3.1.1 beschriebene DNA-Marker aufgetrennt.

3.8 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

3.8.1 Herstellung von cDNA

- pd(N)₆ ("random primer"): 1 µg DNA/µl in bidest. H₂O
- 5 x Reverse Transkriptase-Puffer: 375 mM KCl, 15 mM MgSO₄, 250 mM Tris/HCl, pH 8,3
- DTT: 0,1 M in bidest. H₂O
- RNase-Inhibitor: 20 U/µl in 20 mM Hepes/KOH, 50 mM KCl, 5 mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, pH 7,6
- dNTP-Mix: 25 mM dGTP, 25 mM dCTP, 25 mM dATP, 25 mM dTTP
- Superscript-Reverse Transkriptase: 200 U/µl

Zur Synthese des cDNA-Erstrangs wurde Gesamt-RNA, die, wie unter II 3.5.1 beschrieben, präpariert wurde, in einer Reversen Transkriptase-Reaktion eingesetzt. Pro Reaktion wurden 5 µg RNA in 10 µl bidest. H₂O verdünnt, mit je 2 µg pd(N)₆ (zufällig zusammengesetzten Hexanukleotiden) versetzt, für 2 min. bei 85°C erhitzt und anschließend für 5 min. auf Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die Erststrang-Synthese wurde in 30 µl Gesamtvolumen mit 1 x Reverse Transkriptase-Puffer, 10 mM DTT, 20 U RNase-Inhibitor, 0,5 mM dNTP-Mix und 200 U Superscript-Reverse Transkriptase für 2 h bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurde für 15 min. bei 70°C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu denaturieren. Die synthetisierte cDNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 sowie 3 Volumen 100% Ethanol ü.N. gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 20 µl bidest. H₂O aufgenommen.

3.8.2 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation von cDNA-Sequenzen zelltypspezifischer Markermoleküle verwendet. Dadurch konnte die Marker-Expression zu bestimmten Differenzierungszeitpunkten auf mRNA-Ebene untersucht werden. Die analysierten Marker sind in Tabelle 4 aufgelistet, wobei die Sequenzen der Desoxyoligonukleotid-Primer unter II 1.1.5 beschrieben sind.

Marker	Zelltyp	Strang	Gensequenz (bp)	Amplifikat (bp)
NF68	Neurone	sense	1509 - 1530	246
		antisense	3128 - 3148	
Thy1.2	Fibroblasten	sense	2602 - 2625	513
		antisense	4059 - 4083	
GFAP	Astroglia Zellen	sense	9365 - 9383	552
		antisense	9900 - 9917	
GAPDH	ubiquitär	sense	280 - 300	760
		antisense	1020 - 1040	

Tab. 4: Primer-Paare zur Amplifikation zelltypspezifischer Markermoleküle

Die Lage der Primer-Paare wurde außer bei GAPDH so gewählt, daß auf der zu amplifizierenden Gensequenz mindestens ein Intron lag, so daß mögliche Verunreinigungen der cDNA durch genomische DNA zu entsprechend größeren Amplifikaten führen.

- 10 x PCR-Puffer: 500 mM KCl, 200 mM Tris/HCl, pH 8,4
- Primer: 10 pmol/µl in bidest. H₂O
- dNTP-Mix: 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dATP, 25 mM dTTP
- Taq DNA-Polymerase: 5 U/µl in 20 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,1 M KCl, 0,5% Nonidet®P40, 0,5% Tween®20, 50% (v/v) Glycerol, pH 8

Die PCR-Reaktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Als Matrizen-DNA diente je 1 µl der entsprechenden cDNA. Diese wurde mit 36,5 µl bidest. H₂O verdünnt und auf Eis mit 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂ sowie jeweils 25 pmol sense- und antisense-Primer versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min. bei 94°C inkubiert, bevor 0,5 mM dNTP-Mix sowie 2,5 U Taq DNA-Polymerase zugesetzt wurden. Durch diesen sogenannten Heißstart wurde sichergestellt, daß Sekundärstrukturen der cDNA aufgelöst wurden. Die anschließende Amplifikation erfolgte im 'Gene Amp PCR System 2400' Thermocycler, wobei folgendes Programm gewählt wurde.

30 sec. 94 °C	Denaturierung
30 sec. *	Anlagerung
30 sec. 72°C	Synthese

* Die verwendete Anlagerungs-Temperatur ("Annealing Temperature") war vom G/C-Gehalt des jeweiligen Primer-Paars und die Zyklen-Zahl war von dem zu amplifizierenden Gen abhängig. Die für die analysierten Gene eingesetzten Parameter sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Primer	Anlagerungs-Temperatur	Zyklen-Zahl
NF68	55°C	30
Thy1.2	60°C	30
GFAP	55°C	39
GAPDH	60°C	30

Tab. 5: PCR-Bedingungen für die verwendeten Primer-Paare

Im Anschluß an die Amplifikation wurde der Ansatz für 7 min. bei 72°C gehalten, bevor er auf 4°C abgekühlt wurde.

Die PCR-Produkte wurden dann gelelektrophoretisch in 1%-igen Agarosegelen aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

4. Proteinbiochemische Methoden

4.1 Western-Blot Analyse

4.1.1 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch denaturierende SDS-PAGE werden Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt, da die Eigenladung der Proteine durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt wird. Das angewendete diskontinuierliche Puffersystem ermöglicht eine Konzentrierung der Proteine im Sammelgel, während im Trenngel die eigentliche Auftrennung erfolgt. Für die Vorbereitung der Proben, die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese wurde die Methode von LAEMMLI (1970) angewandt.

- 4 x Trenngelpuffer: 0,4% SDS, 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- 4 x Sammelgelpuffer: 0,4% SDS, 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
- Acrylamidlösung: 29,2% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylen-bis-acrylamid
- 5 x Elektrodenpuffer: 960 mM Glycin, 0,5% SDS, 125 mM Tris/HCl, pH 8,3
- 2 x reduzierender Probenpuffer: 4% SDS, 1,5 M β -Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8
- 2 x nicht-reduzierender Probenpuffer: 4% SDS, 20% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8

Es wurden zwei verschiedene PAGE-Systeme verwendet. Für sogenannte "Minigele" wurden zwei gereinigte Glasplatten (7,5 x 15 cm) durch Teflon-Abstandshalter getrennt zusammengeklammert. Für dünne Gele mit einem Probenauftrag von bis zu 20 μ l wurden 0,5 mm Abstandshalter benutzt, während 1,5 mm Abstandshalter bei einem Probenauftrag von bis zu 60 μ l eingesetzt wurden. Um ein noch größeres Auftragungsvolumen von bis zu 160 μ l zu ermöglichen, wurde das PAGE-System Hoefer SE 600 (Pharmacia/Freiburg) verwendet. Hier wurden Glasplatten der Größe 16 x 18 cm sowie 1,5 mm Abstandshalter benutzt. Die Trenngellösung wurde bei Minigelen bis 2,5 cm bzw. bei Hoefer-Gelen bis 3,5 cm unterhalb des Ausschnitts der Glasplatte eingefüllt und mit Ethanol überschichtet, um eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Außerdem wurde dadurch verhindert, daß der Luftsauerstoff an der Grenzfläche zwischen Gel und Luft Radikale abfängt, wodurch das Gel ungleichmäßig auspolymerisieren würde. Die Konzentration an Acrylamid wurde nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine ausgewählt. Gele mit 15%, 12,5%, 10% und 7,5% Acrylamid wurden verwendet (Tab. 6). Nachdem das Trenngel nach etwa 25 min. auspolymerisiert war, wurde der Ethanol entfernt und die Grenzschicht über dem Trenngel mit Wasser gewaschen. Das 4%-ige Sammelgel wurde gegossen, und sofort wurde ein Teflon-Kamm mit 21

Probentaschen für Minigele bzw. 15 Probentaschen für Hoefer SE 600-Gele eingesetzt. Nach der Auspolymerisierung des Sammelgels (etwa 30 min.) wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, und die Kammern wurden mit 1 x Elektrodenpuffer gefüllt. Der Kamm wurde aus dem Gel entfernt und die Probentaschen mit 1 x Elektrodenpuffer ausgespült. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit dem gleichen Volumen 2 x Probenpuffer versetzt und für 10 min. bei 95°C denaturiert. Nicht-reduzierender Probenpuffer wurde zur Analyse der "Cross-linking"-Experimente (II 4.8) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung von Minigelen erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für ca. 90 min., während die Hoefer SE 600-Gele mit einer konstanten Spannung von 65 V ü.N. aufgetrennt wurden.

Stammlösungen	Sammelgel	Trenngel			
	4%	7,5%	10%	12,5%	15%
Acrylamidlösung (30%)	0,5 ml	1,5 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml
4 x Sammelgelpuffer	0,94 ml	-	-	-	-
4 x Trenngelpuffer	-	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
bidest. H ₂ O	2,31 ml	3 ml	2,5 ml	2 ml	1,5 ml
APS (10%)	60 µl	48 µl	48 µl	48 µl	48 µl
TEMED (99%)	1,5 µl	4,8 µl	4,8 µl	4,8 µl	4,8 µl

Tab. 6: Zusammensetzung des 4%-igen Sammelgels und der verschiedenen Trenngele

Die angegebenen Volumina beziehen sich auf ein Minigel mit 0,5 mm Abstandshaltern. Bei der Verwendung von 1,5 mm Abstandshaltern muß jeweils die 2-fache und für Hoefer SE 600-Gele jeweils die 5-fache Menge eingesetzt werden.

Die Gele wurden nach der Proteinauftrennung entweder mit Coomassie Blau gefärbt oder für einen Protein-Transfer auf eine Membran eingesetzt.

Parallel mit den Proben wurde einer der folgenden Proteinstandardmarker aufgetragen, um das relative Molekulargewicht detektierter Proteinbanden genauer zu bestimmen. Ein Standard mit vorgefärbten Markerproteinen wurde verwendet, wenn das Gel auf eine Membran transferiert wurde, da dadurch die Proteinstandards direkt auf der Membran sichtbar waren.

• LMW ("low molecular weight") Standard	molekulare Masse (kDa)
Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)	94
Albumin (Rinderserum)	67
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	43
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	30
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	20
α-Lactalbumin (Kuhmilch)	14

• vorgefärbter "High Range" SDS-PAGE-Standard	molekulare Masse (kDa)
Myosin (Kaninchenmuskel)	201
β -Galactosidase (<i>E. coli</i>)	117
Albumin (Rinderserum)	82
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	47
• vorgefärbter "Low Range" SDS-PAGE-Standard	molekulare Masse (kDa)
Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)	102
Albumin (Rinderserum)	78
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	50
Carboanhydrase (Rindererythrocyten)	35
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	28
Lysozym (Hühnereiweiß)	20

4.1.2 Protein-Transfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen

- Bjerrum-Schäffer-Nielsen Transferpuffer: 39 mM Glycin, 20% Methanol, 1,3 mM SDS, 48 mM Tris/HCl, pH 9,2

Der Protein-Transfer von der SDS-PAGE auf Immobilon Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen erfolgte nach dem Prinzip des "Semi-Dry-Blottings". Zur Vorbereitung wurden 12 3MM-Papiere und die PVDF-Membran in der Größe des zu transferierenden Gels zugeschnitten. Die Membran mußte aufgrund ihrer starken Hydrophobizität zunächst in Methanol benetzt werden. Danach wurde der überschüssige Methanol kurz in bidest. H₂O abgewaschen, und die Membran wurde für ca. 10 min. in Transferpuffer equilibriert. Die 3MM-Papiere und das Polyacrylamidgel wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt.

Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf die Kathodenseite der Semi-Dry-Blot-Apparatur wurden 6 3MM-Papiere gelegt. Auf den Papierstapel wurde das Gel ausgerichtet, und die Membran wurde auf das Gel aufgelegt. Auf die Membran wurden wiederum 6 3MM-Papiere plaziert. Bei der Anordnung der einzelnen Lagen wurde auf eine genaue und luftblasenfreie Ausrichtung geachtet, um den Aufbau eines homogenen elektrischen Feldes zu gewährleisten. Durch das Rollen mit einer Glaspipette wurden zudem möglicherweise vorhandene Luftblasen sowie überschüssiger Transferpuffer entfernt. Bevor die Anode als Deckel auf den Blot-Aufbau aufgelegt wurde, wurden beide Elektroden mit Transferpuffer befeuchtet. Der Protein-Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,7 mA pro cm² Gel für 120 min. Nach dem Transfer wurde die Membran in PBS gewaschen, um eventuell vorhandene Gelreste zu entfernen.

4.1.3 Immunfärbung der Protein-Membran und "enhanced" Chemilumineszenz (ECL)-Nachweis

- Blockierungslösung: PBS, 0,1% Triton X-100, 5% LFMP
- Antikörperverdünnungslösung: PBS, 0,1% Triton X-100, 1% LFMP
- Waschlösung 1: PBS, 0,1% Triton X-100, 1% LFMP
- Waschlösung 2: PBS, 0,1% Triton X-100
- Luminol-Lösung: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM *p*-Coumarsiure, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5
- H₂O₂-Lösung: 5,4 mM H₂O₂, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

Nach dem Protein-Transfer auf die Immobilon PVDF-Membran wurden freie Bindestellen der Membran durch eine mindestens einstündige Inkubation in Blockierungslösung bei RT unter Schütteln abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte ü.N. bei 4°C auf einem Schütteltisch. Der erste Antikörper wurde in der unter II 1.4.1 angegebenen Verdünnung in der Antikörperverdünnungslösung eingesetzt. Am nächsten Morgen wurde die Membran mindestens fünfmal 10 min. in der Waschlösung 1 bei RT gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Der speziesspezifische, POD-gekoppelte Zweitantikörper wurde ebenfalls in der unter II 1.4.3 beschriebenen Verdünnung in der Antikörperverdünnungslösung verwendet. Darauf folgten wiederum mindestens fünf Waschschrirte á 10 min. in der Waschlösung 2, um unspezifisch gebundene Antikörper und das LFMP zu entfernen. Für die ECL-Detektion wurden 10 ml der Luminol-Lösung und 10 ml der H₂O₂-Lösung gemischt, und die Membran wurde für eine Minute darin inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt, und ein Röntgenfilm wurde abhängig von der Signalstärke für 1 bis 30 min. im Dunkeln exponiert und entwickelt.

4.1.4 Coomassie Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen und PVDF-Membranen

- Färbelösung: 0,1% Coomassie Blau (R250), 10% Essigsäure, 50% technischer Ethanol
- Entfärbelösung: 7,5% Essigsäure, 25% technischer Ethanol

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden 30 min. in der Färbelösung inkubiert. Danach wurden sie kurz gewässert und anschließend für 1 bis 2 h entfärbt, wobei die Entfärbelösung mehrmals gewechselt wurde. Die Gele wurden auf dem Geltrockner bei 65°C unter Anlegung eines Vakuums für 1 bis 1,5 h getrocknet. Die Nachweisgrenze der Coomassie Blau-Färbung liegt bei ca. 30 ng Protein pro Bande.

PVDF-Membranen konnten nach der Immundetektion ebenfalls mit Coomassie Blau gefärbt werden, wodurch die Effizienz des Protein-Transfers sowie der Einsatz gleicher Proteinmengen überprüft werden konnte. Dazu wurde die Membran für 15 min. mit Färbelösung inkubiert, kurz gewässert und ca. 30 min. mit Entfärbelösung behandelt. Nach dem Trocknen an der Luft wurden die Proteinbanden deutlich sichtbar.

4.2 Protein-Extraktion aus Säuger-Zellen

Zur Präparation von Detergenz-löslichem Gesamtzellextrakt aus PCC7-Mz1-, Swiss 3T3- und COS-1-Zellen wurde eine nach HARLOW & LANE (1988) modifizierte Methode angewendet (OEHRLEIN *et al.*, 1998; ESDAR *et al.*, 1999a).

- Lysispuffer: 0,2 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,5 mM DTT, 20 mM Hepes, pH 7,5
- Phosphatase-Inhibitoren: 20 mM β -Glycerophosphat in bidest. H₂O
0,1 mM Natriumorthovanadat in 0,55% HCl, pH 10
- Protease-Inhibitoren: 100 μ g/ml Leupeptin in bidest. H₂O
100 μ g/ml Aprotinin in bidest. H₂O
10 mM Benzamidin in bidest. H₂O
2 mM PMSF in Methanol

Zur Protein-Extraktion wurden PCC7-Mz1-Zellen sowie die davon abgeleiteten Klone verwendet, die auf 10 cm-Schalen in der unter II 2.2 angegebenen Dichte ausplattiert worden waren. Swiss 3T3-Zellen wurden ebenfalls auf 10 cm-Schalen ausgesät und befanden sich im wachsenden oder im zellzyklusarretierten Zustand. Der Mediumüberstand wurde entfernt, und die adhärennten Zellen wurden zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Pro Schale wurden 200 μ l des Lysispuffers, dem die Protease- und Phosphatase-Inhibitoren sowie das oxidationsschützende Agens DTT frisch zugesetzt worden waren, zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Gummispatel abgelöst, und das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min. bei 14000 Upm und 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge, wodurch die Zelltrümmer pelletiert wurden und sich die löslichen Proteine im Überstand befanden. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Zur Gewinnung hitzestabiler Extrakte wurde der Überstand für 5 min. bei 95°C inkubiert, wodurch nicht-hitzestabile Proteine denaturiert wurden, während hitzestabile Proteine im Überstand blieben. Diese wurden durch Zentrifugation für 5 min. mit 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abgetrennt und bis zur Verwendung ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

Um aus den apoptotischen PCC7-Mz1-Zellen des Überstands Proteine zu extrahieren, wurde der Mediumüberstand einer 10 cm-Schale abgenommen und in einem graduierten 15 ml-Röhrchen bei 1000 Upm für 10 min. in der Labofuge GL zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, und das Zellpellet wurde in 100 µl Lysispuffer, dem die Protease- und Phosphatase-Inhibitoren sowie das oxidationsschützende Agens DTT frisch zugesetzt worden waren, resuspendiert. Durch Vortexen wurden die Zellen vollständig aufgebrochen. Das Lysat wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min. bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3 Fraktionierung von Zellextrakten in Cytoplasma- und Membran-Fraktion

- Puffer C: 0.2 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 20 mM Hepes, pH 7,5
- Puffer M: 0.2 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,5 mM DTT, 20 mM Hepes, pH 7,5
- Phosphatase-Inhibitoren: 20 mM β-Glycerophosphat in bidest. H₂O
0,1 mM Natriumorthovanadat in 0,55% HCl, pH 10
- Protease-Inhibitoren: 100 µg/ml Leupeptin in bidest. H₂O
100 µg/ml Aprotinin in bidest. H₂O
10 mM Benzamidin in bidest. H₂O
2 mM PMSF in Methanol

Für die subzelluläre Fraktionierung von Proteinen wurden die Zellen, wie unter II 2.2 beschrieben, angesetzt und zu den angegebenen Differenzierungszeitpunkten verwendet. Der Mediumüberstand wurde entfernt, und die adhärennten Zellen wurden zweimal mit je 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Pro Schale wurden 200 µl des Puffers C, dem die Protease- und Phosphatase-Inhibitoren sowie das oxidationsschützende Agens DTT frisch zugesetzt worden waren, auf die Zellen appliziert. Die Zellen wurden mit einem Gummispatel abgelöst, und das Lysat wurde durch 30-faches Auf- und Abbewegen eines 'S'-Pestilles in einem "Douncer" homogenisiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellhomogenate 30 min. mit 14000 Upm bei 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die cytoplasmatischen Proteine enthaltenden Überstände wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, und das Zellpellet wurde in 100 µl Puffer M, inklusive Protease- und Phosphatase-Inhibitoren sowie DTT, resuspendiert. Während einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Ansätze zwei- bis dreimal auf einem Vortex gemischt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 30 min. mit 14000 Upm bei 4°C, wonach sich die Detergenz-löslichen Membranproteine im Überstand

befanden. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.4 Fraktionierung von Zellextrakten in S100- und Mitochondrien-Fraktion

Zum Nachweis der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol wurden Zellextrakte in eine cytoplasmatische S100 ("supernatant of 100000 x g")-Fraktion und eine mitochondriale Fraktion aufgetrennt. Dazu wurde ein modifiziertes Protokoll nach Li verwendet (Li *et al.*, 1997a).

- Puffer A: 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 50 mM Sucrose, 0,1 mM PMSF, 0,5 M DTT, 20 mM HEPES, pH 7,5

Für ein Experiment wurden Zellen einer 15 cm- Schale, die mit den unter II 2.2 angegebenen Dichten ausgesät worden waren, eingesetzt und für 24 h mit RA behandelt. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 200 μl Puffer A wurden die Zellen mit einem Gummispatel von der Schale abgelöst, und das Lysat wurde durch 100-maliges Auf- und Abbewegen eines 'S'-Pestilles in einem "Douncer" homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat für 10 min. bei 4°C mit $750 \times g$ in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (2700 Upm) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, und das Pellet wurde in 200 μl Puffer A resuspendiert und erneut für 10 min. bei 4°C mit $750 \times g$ zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden vereinigt und für 15 min. bei 4°C mit $10000 \times g$ in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (9700 Upm) zentrifugiert. Das die Mitochondrien enthaltende Pellet wurde in 100 μl reduzierendem Probenpuffer (II 4.1.1) aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Der Überstand wurde erneut für 30 min. bei 4°C mit $100000 \times g$ im TLA100.2 Rotor der Ultrazentrifuge TL100 zentrifugiert, wodurch im Überstand die S100-Fraktion erhalten wurde. Dieser wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinmenge in den präparierten Extrakten zu quantifizieren, wurde der "BCA-Detection-Assay" (Pierce/Bruchsal) verwendet. Das Prinzip dieser Proteinbestimmung besteht darin, daß die zweiwertigen Kupferionen aus der Substratlösung durch Reaktion mit den Aminogruppen der Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Das "BCA detection

reagent" reagiert mit den einwertigen Kupferionen zu einem lilafarbenen Komplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden kann. Die gemessene Extinktion ist proportional zur vorhandenen Proteinmenge.

- Substratlösung A: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Natriumtartrat und 'BCA detection reagent' in 0,1 M NaOH
- Substratlösung B: 4% CuSO_4 mit 5 H_2O

Vor jeder Proteinbestimmung wurde die Substratlösung frisch hergestellt, indem Substratlösung A und Substratlösung B im Verhältnis 50:1 gemischt wurden.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 10 μl des Zellextrakts mit 200 μl der Substratlösung im Loch einer 96 Loch-Mikrotiterplatte gemischt. Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Leerwert wurden 10 μl des Lysispuffers in 200 μl der Substratlösung eingesetzt. Eine BSA-Standardreihe diente zur genauen Quantifizierung der Proteinmengen. Je 10 μl von BSA-Proben mit den Konzentrationen 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,05 mg/ml wurden ebenfalls als Doppelbestimmungen in je 200 μl Substratlösung verdünnt. Die Proben wurden für 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion des entstandenen Farbkomplexes bei 540 nm im Immunoreader gemessen. Die ermittelten Werte dienten als Maß für die absolute Proteinkonzentration.

4.6 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation wurde "*in vivo*" [^{32}P] phosphoryliertes (II 2.12) sowie "*in vivo*" mit [^3H]-Palmitinsäure (II 2.13) markiertes GAP-43 aus Gesamtzellextrakten angereichert und anschließend durch Autoradiographie nachgewiesen. Außerdem wurde GAP-43 nach der Markierung von Glykoproteinen aus Gesamtzellextrakten immunpräzipitiert (II 4.7).

- Waschpuffer: 1% Triton X-100 in PBS
- Protein A-Sepharose: 50% in PBS (w/v)

Es wurden jeweils 200 bis 500 μg der entsprechenden Gesamtzellextrakte mit Waschpuffer auf ein Gesamtvolumen von 500 μl eingestellt und für 1 h bei 4°C mit 50 μl Protein A-Sepharose auf einem Überkopf-Roller inkubiert, um unspezifisch an Protein A-Sepharose bindende Proteine aus dem Zellysate zu entfernen. Anschließend wurden die Proben für 1 min. bei 14000 Upm und 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ü.N. mit anti-GAP-43-Antiserum in der Verdünnung 1:50

auf einem Überkopf-Roller bei 4°C gedreht. Am nächsten Morgen wurden die entstandenen Immunkomplexe mit 50 µl Protein A-Sepharose versetzt und für 2 h auf einem Überkopf-Roller bei 4°C inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden fünfmal mit jeweils 1 ml eiskaltem Waschpuffer bei 4°C gewaschen und anschließend in 50 µl 2 x reduzierendem Probenpuffer (II 4.1.1) aufgenommen und für 10 min. bei 95°C aufgeköcht. Nach der Auftrennung der Immunpräzipitate im SDS-Polyacrylamidgel (II 4.1.1) wurde das Gel getrocknet und immunpräzipitiertes GAP-43 wurde durch Exposition eines Röntgenfilms nachgewiesen. Wurde [³H]-Palmitinsäure markiertes GAP-43 analysiert, mußte das Gel vor der Autoradiographie einer Fluorographie unterzogen werden, wodurch die energiearme Tritiumstrahlung in Photonen umgewandelt wurde. Zu diesem Zweck wurde das Gel für 30 min. lichtgeschützt in 1 M wässriger Natriumsalicylat-Lösung inkubiert und vor dem Trocknen ausreichend gewässert.

4.7 Nachweis von Glykoproteinen

Zur Detektion von posttranslational glykosilierten Proteinen wurde der "DIG-Glycan-Detection-Kit" der Firma Roche Biochemicals (Mannheim) verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, benachbarte Alkoholgruppen der Zuckerseitenketten durch milde Oxidation in Aldehydgruppen umzuwandeln. In einer anschließenden Reaktion wird ein Hydrazid, an das über einen Spacer das Steroid-Hapten Digoxigenin (DIG) gekoppelt ist, kovalent an die oxidierten Zuckerreste gebunden. Durch einen anti-DIG-Antikörper können DIG-markierte Glykoproteine in einer Western-Blot Analyse nachgewiesen werden. Diese Methode wurde eingesetzt, um Glykoproteine aus Gesamtzellextrakten zu markieren und in einer anschließenden Immunpräzipitation von GAP-43 eine mögliche Glykosilierung des Proteins zu untersuchen.

- Natriummetaperjodat: 3,3 mg/ml in bidest. H₂O
- Natriumdisulfid: 3,75 mg/ml in bidest. H₂O
- DIG-3-O-succinyl-ε-aminocaprinsäurehydrazid
- Transferrin: 1 mg/ml in bidest. H₂O
- Creatinase: 1 mg/ml in bidest. H₂O (rekombinant aus *E. coli*)

Für ein Experiment wurden etwa 300 µg Protein aus Gesamtzellextrakt von PCC7-Mz1-Zellen bzw. von den Mz-GAP-43 Klonen mit dem gleichen Volumen 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,5 versetzt. Zur milden Oxidation der Alkoholgruppen der Zuckerseitenketten wurde dann jeweils 1/10 Volumen Natriummetaperjodat-Lösung zugegeben und für 20 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz für 5 min. mit 1/2

Volumen Natriumdisulfid-Lösung behandelt, um das Natriumperjodat zu neutralisieren. Es folgte die Markierung der oxidierten Zuckerreste durch Zugabe von 1/10 Volumen DIG-3-0-succinyl- ϵ -aminocaprinsäurehydrazid. Die primäre Amin-Gruppe der Hydrazidverbindung reagiert mit der Carbonylgruppe des Aldehydrests zu einer kovalenten verbundenen Schiffsbasis (Imin), wodurch das Hapten DIG kovalent an die Glykoproteine gebunden ist. Die Gesamtzellextrakte wurden anschließend für die Immunpräzipitation des GAP-43 Proteins eingesetzt. Als Positiv- und Negativ-Kontrolle wurden parallel 1 μ g des Glykoproteins Transferrin bzw. 10 μ g nicht-glykosilierte Creatinase markiert.

4.8 "*in vivo* Cross-linking" Assay

Mittels eines "Cross-linking" Assays lassen sich Interaktionen zwischen Proteinen in intakten Zellen nachweisen. Durch die Inkubation der Zellen mit einem membranpermeablen Quervernetzer ("Cross-linking Reagenz") werden interagierende Proteine kovalent verbunden, und entstehende Komplexe können durch Western-Blot Analysen detektiert werden. Für die hier durchgeführten Experimente wurde als Cross-linking Reagenz das homobifunktionale Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP) verwendet, welches interagierende Proteine über seine zwei reaktiven Estergruppen durch Amidbindungen kovalent verbindet. DSP ist aufgrund seiner lipophilen Struktur membrangängig und durch β -Mercaptoethanol spaltbar, wodurch DSP-verbundene Proteine wieder voneinander getrennt werden.

- Cross-linking Reagenz: 25 mM DSP in DMSO

Für Cross-linking Experimente wurden PCC7-Mz1 Zellen sowie die davon abgeleiteten Klone mit der unter II 2.2 angegebenen Dichte auf 15 cm-Schalen ausgesät und zu den entsprechenden Differenzierungszeitpunkten verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml 1 mM DSP in PBS für 15 min. bei RT inkubiert. Kontroll-Ansätze wurden mit der entsprechenden DMSO-Konzentration (4%) behandelt. Anschließend wurden die Zellen einmal vorsichtig mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, bevor eine Zellfraktionierung in Cytoplasma- und Membran-Proteine, wie unter II 4.3 beschrieben, durchgeführt wurde. Es durfte jedoch kein DTT in den Lysispuffern verwendet werden, da DTT durch seine Eigenschaft als Reduktionsmittel die über DSP verbundenen Proteinkomplexe aufspaltet. Die erhaltenen Extrakte wurden durch Western-Blot Analysen untersucht, wobei Proteinkomplexe unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch entsprechende Primärantikörper nachgewiesen wurden. Durch die Verwendung von reduzierendem Probenpuffer konnten die Proteine des Komplexes dissoziiert werden.

4.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gel)

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine aufgrund von zwei Eigenschaften getrennt. In der ersten Dimension wird eine isoelektrische Fokussierung vorgenommen, bei der sich die Proteine entsprechend ihres pI-Wertes entlang eines pH-Gradienten anordnen. In der zweiten Dimension werden die isoelektrisch fokussierten Proteine einer SDS-PAGE unterzogen, so daß eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgt. Durch die Kombination der isoelektrischen Fokussierung mit einer anschließenden Molekulargewichtsauftrennung lassen sich hochauflösende Trennungen eines komplexen Proteingemisches erzielen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zweidimensionale Gelelektrophoresen angewandt, um die transgene Expression von GAP-43 in den stabil transfizierten Mz-GAP-43 Klonen zu charakterisieren. Diese Experimente wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. M. Winklhofer (Universität Mainz, Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Prof. A. Maelicke) durchgeführt.

4.9.1 Vorbereitung der Zellextrakte

- Solubilisierungspuffer 1: 0,3% SDS, 200 mM DTT, 22 mM Tris/Base, 28 mM Tris/HCl, (SB 1) pH 8
- Solubilisierungspuffer 2: 50 mM MgCl₂, 1 mg/ml DNase I, 0,25 mg/ml RNase A, 24 mM Tris/Base, 476 mM Tris/HCl, pH 7,2 (SB 2)
- Solubilisierungspuffer 3: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS, 1% Triton X-100, 1% DTT, 20 mM Tris/Base, 5 mM Pefabloc, 0,8% Pharmalyte (SB 3)
- Protease-Inhibitor Cocktail: 330 µg/ml Papain, 200 µg/ml Pankreasextrakt, (Complete™) 2 µg/ml Chymotrypsin, 5 ng/ml Thermolysin, 20 µg/ml Trypsin
- Bromphenolblaulösung: 0,05% in PBS

Für ein 2D-Gel wurden Zellen von zwei 15 cm-Schalen, die mit den unter II 2.2 angegebenen Dichten ausgesät waren, eingesetzt. Diese wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mit einem Gummispatel von der Schale abgelöst. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1000 Upm in der Labofuge GL wurde der Überstand abgenommen, und das Zellpellet wurde bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden dann in 200 µl SB 1-Puffer, der mit 10 µl des Protease-Inhibitor Cocktails versetzt wurde, aufgenommen. Anschließend wurden 25 µl SB 2-Puffer zugegeben, und der Ansatz wurde mit einer Kanüle homogenisiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min. mit 14000 Upm bei 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde das Pellet erneut wie oben beschrieben homogenisiert und zentrifugiert. Durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Aceton (p.a.) wurde der Überstand für 30 min. auf Eis gefällt und dann für 10 min. mit 14000 Upm bei 4°C abzentrifugiert. Das Proteinpellet wurde mit Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde es in 300 µl SB 3-Puffer aufgenommen und für 15 min. bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Es folgte eine 15-

minütige Behandlung im Ultraschallbad. Dann wurden 10 µl Bromphenolblau-Lösung zugegeben, und der Ansatz wurde für 2 min. bei 14000 Upm zentrifugiert. Die Probe war damit für die isoelektrische Fokussierung vorbereitet.

4.9.2 Isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE

- IPG-Streifen: Immobilon pH Gradient pH 3 bis 10 nicht linear
- Equilibrierungspuffer : 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 1% SDS, 50 mM Tris/HCl, pH 6,8

Ein tiefgefrorener IPG (Immobilon pH Gradient)-Streifen wurde zum Quellen der Gelmatrix ü.N. bei RT in 300 µl Probe eingelegt. Der gequollene IPG-Streifen wurde dann mit der angegebenen Spannung der isoelektrischen Fokussierung unterzogen:

30 min.	150 V
30 min.	300 V
60 min.	600 V
60 min.	2000 V
120 min.	3500 V

Anschließend konnte der IPG-Streifen bei -80°C aufbewahrt werden.

Zur Vorbereitung der zweiten Dimension - der SDS-PAGE - wurde der IPG-Streifen zunächst für 20 min. in Equilibrierungspuffer, dem 10 mg DTT pro ml frisch zugegeben wurde, und anschließend für weitere 20 min. in Equilibrierungspuffer, der frisch mit 45 mg Iodacetamid pro ml versetzt wurde, inkubiert. Der IPG-Streifen konnte dann durch Zugabe von 0,5% Agarose zum Elektrodenpuffer am oberen Rand des 10%-igen SDS-Gels befestigt werden. Die SDS-Gelelektrophorese wurde dann in einer Hoefer SE 600 Apparatur, wie unter II 4.1.1 beschrieben, durchgeführt. Bei einer konstanten Temperatur von 11°C wurde zunächst für 30 min. eine Spannung von 100 V angelegt, wonach das Gel für ungefähr 4 h bei 350 V lief.

III Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die durch Retinsäure (RA) induzierte neurale Differenzierung sowie die damit assoziierte Apoptose in einem *in vitro* Modell für neurale Entwicklung – den PCC7-Mz1-Zellen - analysiert werden. Zum Verständnis der zellulären Mechanismen, die den in PCC7-Mz1-Zellen parallel stattfindenden Prozessen der neuronalen Differenzierung und Apoptose zugrunde liegen, wurde der Einfluß zweier Schlüsselmoleküle auf diese beiden Ereignisse untersucht. So wurde die Rolle des neuronenspezifischen Proteinkinase C Substrats GAP-43 bei frühen neuronalen Differenzierungsvorgängen und Zellstammbaumentscheidungen der PCC7-Mz1-Zellen untersucht. Um die Bedeutung der Apoptose für die neurale Entwicklung der PCC7-Mz1-Zellen zu charakterisieren, wurde der Einfluß des Bcl-2 Proteins auf die RA-induzierte Determinierung, Differenzierung und Apoptose analysiert.

1. Rolle von GAP-43 bei der neuronalen Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen

1.1 Expression von GAP-43 während der RA-induzierten Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen

1.1.1 Expression auf mRNA-Ebene

Um die Expression der GAP-43 mRNA in den PCC7-Mz1-Zellen zu analysieren, wurde Gesamt-RNA aus Stammzellen (d0) sowie aus Zellen, die für verschieden lange Zeiten mit RA behandelt worden waren, isoliert. Pro Zeitpunkt wurden 5 µg der RNA elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer 561 bp langen, radioaktiv markierten GAP-43 cDNA Probe, die über die Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Eco*RI aus dem pF1.1 Plasmid (ROSENTHAL *et al.*, 1987) ausgeschnitten wurde und Bereiche der kodierenden und der 3'-nicht-translatierten Region enthielt, hybridisiert. Es konnten zwei spezifische GAP-43 mRNAs identifiziert werden (Abb. 3 A). Während das längere, etwa 1,6 kb große Transkript bereits schwach in Stammzellen nachweisbar war, wurde die Expression der kürzeren GAP-43 mRNA von etwa 1,4 kb 6 h nach Zugabe von RA induziert. Die Level beider mRNAs nahmen bis zum Differenzierungszeitpunkt d2 zu und blieben während des weiteren Differenzierungsverlaufs konstant hoch.

1.1.2 Die beiden GAP-43 mRNAs werden durch zwei verschiedene Promotoren generiert

Durch andere Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß in der Ratte zwei unterschiedliche Promoter-Regionen im 5'-nicht-translatierten Bereich des GAP-43 Gens vorliegen (GRABCZYK *et al.*, 1990; STARR *et al.*, 1994). Der Promoter P1 befindet sich zwischen den Nukleotiden -750 und -407, während der Promoter P2 innerhalb von 233 Nukleotiden vom Translationsstart entfernt liegt (EGGEN *et al.*, 1994).

Um zu demonstrieren, daß die Expression zwei unterschiedlich langer GAP-43 mRNAs in den PCC7-Mz1-Zellen ebenfalls auf die Aktivität verschiedener Promotoren und nicht auf differentielles Spleißen z.B. des 5'-nicht-translatierten Bereichs zurückzuführen war, wurden Primer Extension Analysen durchgeführt. Mit Hilfe des Oligo 5.0 Programms (National Biosciences Inc., USA) wurden die zwei GAP-43 spezifischen Primer TH100 und TH102 (II 1.5), die komplementär zum nicht-kodogenen 5'-Bereich der GAP-43 mRNA waren (Abb. 3 B), konzipiert. Nach radioaktiver Markierung der Primer wurden sie mit poly-(A)⁺-RNA aus undifferenzierten (d0) und differenzierten (d2) PCC7-Mz1-Zellen hybridisiert. Als Negativ-Kontrolle wurde poly-(A)⁺-RNA aus ruhenden Swiss-3T3 Fibroblasten, welche kein GAP-43 exprimieren, eingesetzt. Durch eine anschließende Reverse Transkriptase Reaktion konnten die Längen der GAP-43 mRNAs definiert werden. Da die Sequenz des Primers TH100 im Bereich von -173 bis -196 stromaufwärts des Startcodons lag, konnte dieser Primer nur an Transkripte des Promoters P1 binden. Der Primer TH102 war dagegen komplementär zur Region am Translationsstart (-1 bis -26), so daß dieser an Transkripte beider Promotoren hybridisieren konnte. Die Primer Extension Reaktion mit dem Primer TH100 ergab sowohl in undifferenzierten (Spur 2) als auch in differenzierten (Spur 3) PCC7-Mz1-Zellen ein Hauptprodukt von etwa 210 Nukleotiden (Abb. 3 B). Daraus ließ sich eine Gesamtlänge des 5'-nicht-translatierten Bereichs von ungefähr 380 Nukleotiden ableiten, was mit dem in der Ratte identifizierten Startpunkt des P1 Promoters (EGGEN *et al.*, 1994) übereinstimmt. Mit der poly-(A)⁺-RNA aus Swiss-3T3 Fibroblasten wurde kein Produkt erhalten (Spur 1). Die Verwendung des Primer TH102 ergab zwei Hauptprodukte mit einer Länge von etwa 140 sowie 143 Nukleotiden. Die Expression dieser Banden war in differenzierten Zellen (Spur 3) deutlich stärker als in Stammzellen (Spur 2) und trat in Fibroblasten gar nicht auf (Spur 1). Die Länge der gefundenen Produkte von etwa 140 Nukleotiden entsprach dem durch den P2 Promoter in der Ratte transkribierten 5'-nicht-translatierten Bereich von etwa 159 Nukleotiden (EGGEN *et al.*, 1994). Als Kontrolle für den Einsatz gleicher Mengen sowie für die Integrität der verwendeten poly-(A)⁺-RNA wurde die Primer Extension Reaktion mit einem Primer für das ubiquitär exprimierte MARCKS durchgeführt. Das sowohl in undifferenzierten und differenzierten PCC7-Mz1-Zellen als auch in Swiss-3T3 Fibroblasten erhaltene Produkt von etwa 158 bp steht in guter Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Daten (BROOKS *et al.*, 1991). Durch die Primer Extension Analysen konnte somit gezeigt werden, daß die zwei in PCC7-Mz1-Zellen identifizierten GAP-43 mRNAs einen unterschiedlich langen 5'-nicht-translatierten Bereich aufweisen und von den Promotoren P1 und P2 abstammen.

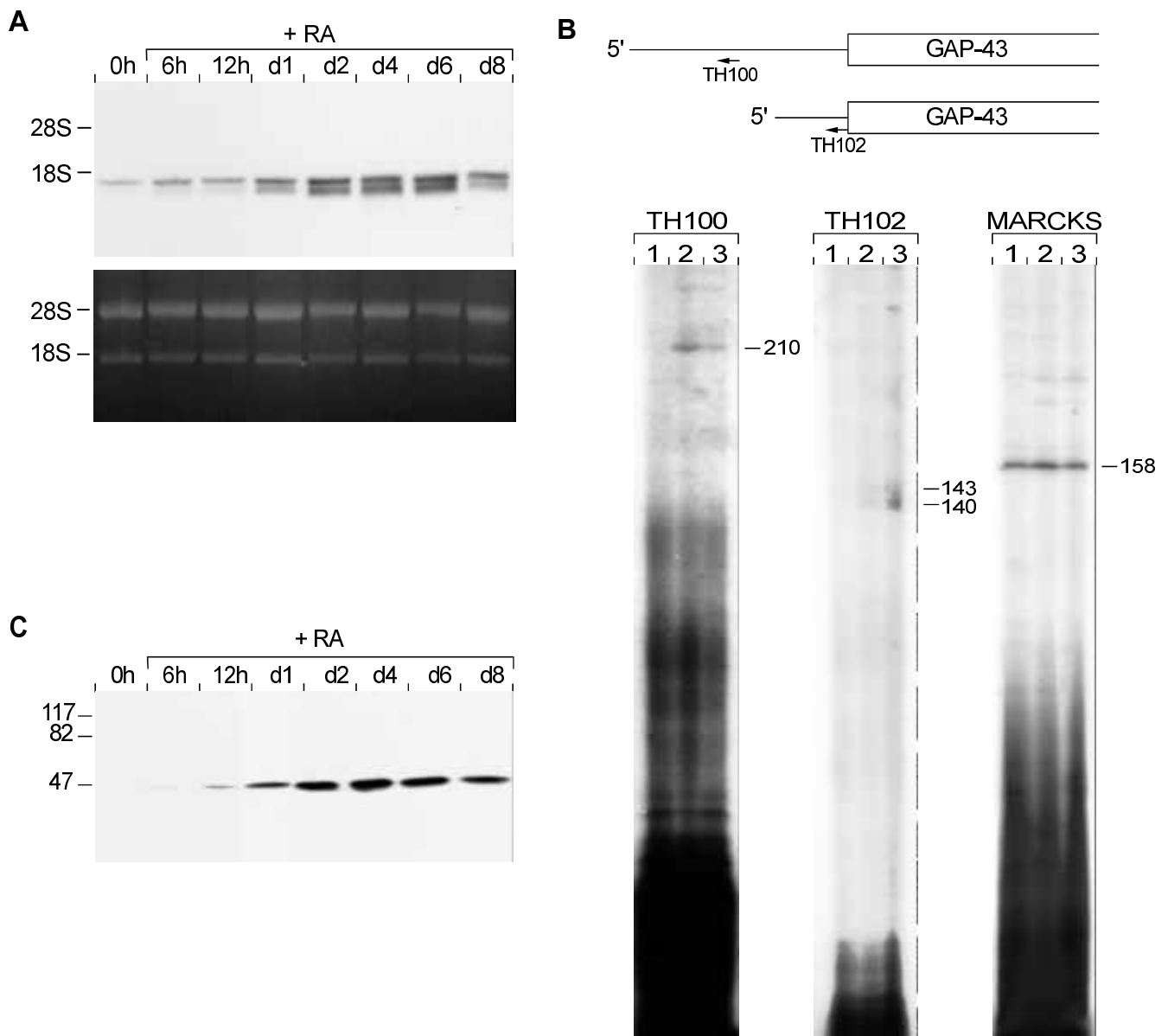


Abb. 3: Expression von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen

A Northern-Blot Analyse

Aus PCC7-Mz1-Stammzellen (0 h) sowie aus Zellen der Differenzierungszeitpunkte 6 h, 12 h, d1, d2, d4, d6 und d8 nach Behandlung mit RA wurde Gesamt-RNA isoliert. Je 5 µg wurden auf einem 1,2%-igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Hybond N-Membran transferiert und mit einer [³²P]-markierten GAP-43 Sonde hybridisiert. Die Autoradiographie erfolgte für 48 h mit Verstärkerfolie bei -80°C auf einem Kodak X-OMAT AR Film. Es konnten zwei GAP-43 Transkripte detektiert werden. Zum Nachweis gleicher aufgetragener RNA-Mengen sind im unteren Teil die Ethidiumbromid gefärbten ribosomalen RNAs (18S und 28S) des entsprechenden Gels gezeigt.

B Primer Extension Analyse

Die verwendeten DNA-Oligonukleotid Primer sind komplementär zum 5'-nicht-translatierten Bereich der GAP-43 mRNA (Schema). Nachdem die Primer an ihrem 5'-Ende durch die Polynukleotid-Kinase T4 mit γ-[³²P]-ATP markiert worden waren, wurden sie mit je 2 µg poly-(A)⁺-RNA von ruhenden Swiss-3T3 Fibroblasten (Spur 1), undifferenzierten (d0) (Spur 2) und differenzierten (d2) (Spur 3) PCC7-Mz1-Zellen hybridisiert. Zur Kontrolle der Menge und Integrität der RNA wurde ein Primer, der die ubiquitär exprimierte MARCKS mRNA erkennt, eingesetzt. Die cDNA-Produkte der Reversen Transkriptase Reaktion wurden auf einem denaturierenden 6%-igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Positionen und Längen der Extensions Produkte sind jeweils auf der rechten Seite dargestellt. Als Größenstandard wurde mit *Hpa*II geschnittene pBluescriptSK- sowie mit *Hinf*I geschnittene pBR322-DNA, die durch eine Auffüllreaktion mit α-[³²P]-dATP markiert wurde, verwendet.

C Western-Blot Analyse

Aus PCC7-Mz1-Stammzellen sowie aus Zellen der angegebenen Zeitpunkte nach Induktion der Differenzierung wurden Detergenz-lösliche Gesamtzellextrakte hergestellt. Je 5 µg Gesamtprotein wurden durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem affinitätsgereinigten GAP-43 Antiserum detektiert. Der Nachweis erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 1 min. Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben. Die Expression von GAP-43 wurde in den PCC7-Mz1-Zellen nach Behandlung mit RA hochreguliert.

1.1.3 Expression auf Protein-Ebene

Zur Analyse der GAP-43 Expression auf Protein-Ebene wurde ein polyklonales Antiserum, das gegen rekombinantes GST-GAP-43 Fusionsprotein gerichtet war, erzeugt und unter Verwendung eines zweiten rekombinanten His-GAP-43 Fusionsproteins affinitätsgereinigt. In Western-Blot Analysen konnte gezeigt werden, daß dieses Antiserum eine spezifische GAP-43 Bande von 43 kDa detektiert (MÄRZ, *et al.*, 1997; HERGET *et al.*, 1998; ESDAR *et al.*, 1999a). Eine vollständige Kompetition dieser Bande konnte durch Präinkubation des Antiserums mit GAP-43 Fusionsprotein erreicht werden (ESDAR, 1996).

Um die Expression des GAP-43 Proteins während der RA-induzierten Differenzierung in PCC7-Mz1-Zellen zu untersuchen, wurden Detergenz-lösliche Gesamtzellextrakte von Stammzellen sowie von Zellen, die für 6 h, 12 h, 1, 2, 4, 6 und 8 Tage mit RA inkubiert worden waren, hergestellt. Die Western-Blot Analyse der extrahierten Proteine mit dem affinitätsgereinigten GAP-43 Antiserum zeigte, daß das GAP-43 Protein in Stammzellen kaum nachweisbar war, während seine Expression innerhalb von 12 h nach Zugabe von RA hochreguliert wurde. Bis zum Differenzierungstag d2 stieg die GAP-43 Expression weiter, danach blieb die Menge an GAP-43 konstant, bevor an d8 eine leichte Abnahme festzustellen war (Abb. 3 C).

In PCC7-Mz1-Zellen konnte also eine Induktion der Expression von GAP-43 nach Behandlung mit RA sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene gezeigt werden (ESDAR *et al.*, 1999a).

1.1.4 Zelluläre Lokalisation von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen

Um die zelltypspezifische Verteilung sowie die subzelluläre Lokalisation des GAP-43 Proteins während der RA-induzierten Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Wie nach den Ergebnissen der Western-Blot Analyse (Abb. 3 C) zu erwarten war, konnte in Stammzellen kein GAP-43 nachgewiesen werden (Abb. 4 a). 24 h nach Behandlung mit RA (d1) war jedoch ein Großteil der morphologisch noch unveränderten Zellen GAP-43 positiv. Das Protein ließ sich zu diesem Differenzierungszeitpunkt präferentiell an der Innenseite der Cytoplasmamembran sowie an Strukturen in der Nähe des Zellkerns detektieren (Abb. 4 c). Durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit einem Golgi-Komplex spezifischen Marker - dem Weizenkeimagglutinin - konnten diese Strukturen als Golgi-Apparat identifiziert und somit eine Assoziation von GAP-43 am Golgi-Komplex nachgewiesen werden (Abb. 4 e, f). Am Differenzierungstag d3 begann sich das neuronale Netzwerk der PCC7-Mz1-Zellen auszubilden, und die GAP-43 Expression weitete sich in die neuronalen Ausläufer aus (Abb. 4 g). Die ab d4 entstandenen Zellen flacher Morphologie besaßen kein GAP-43, was die neuronenspezifische Expression von GAP-43 belegte (Abb. 4 i). Ab d6 waren die Zellkörper der Neurone kaum noch GAP-43 positiv, während die Neurite sowie deren Wachstumskegel eine starke GAP-43 Expression aufwiesen (Abb. 4 l, n). Neurone der PCC7-Mz1-Zellen entwickeln in

der zweiten Differenzierungswoche Polarität, so daß zwischen axonalen und dendritischen Ausläufern differenziert werden kann (BERGER *et al.*, 1997). Durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit dem somatodendritenspezifischen Markerprotein MAP2a/b konnten MAP2a/b positive und GAP-43 negative dickere Ausläufer von MAP2a/b negativen und GAP-43 positiven dünneren Ausläufern unterschieden werden (Abb. 4 p). Somit konnte eine axonspezifische GAP-43 Expression in polaren Neuronen des PCC7-Mz1-Zellmodells demonstriert werden.

Legende zu Abb. 4: Zelluläre Lokalisation von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen

PCC7-Mz1-Stammzellen sowie Zellen verschiedener Differenzierungszeitpunkte wurden auf Deckgläsern fixiert, und eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-GAP-43-Antiserum wurde durchgeführt. Gebundener GAP-43 Antikörper wurde durch einen Cy3-markierten Zweitantikörper (rote Fluoreszenz) (a, c, e, g, i, l, n) bzw. einen FITC-markierten Zweitantikörper (grüne Fluoreszenz) (p) nachgewiesen. In (f) wurde FITC-konjugiertes Weizenkeimagglutinin (grüne Fluoreszenz) zur Detektion des Golgi-Komplexes eingesetzt, und in (p) wurde ein anti-MAP2a/b-Antikörper mit einem Texas Rot-markierten Zweitantikörper (rote Fluoreszenz) zum Nachweis von dendritischen Ausläufern verwendet. Die Fluoreszenzaufnahmen (a, c, e, f, g, i, l, n, p) sowie die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen (b, d, h, k, o, q) sind dargestellt. Die Balkenlänge beträgt 15,6 µm.

- a, b: d0 GAP-43 war nicht nachweisbar.
- c, d: d1 GAP-43 wurde in allen Zellen präferentiell an der Cytoplasmamembran (Pfeile) exprimiert.
- e, f: d1 GAP-43 war am Golgi-Apparat lokalisiert (Pfeile).
- g, h: d3 GAP-43 wurde in den Zellkörpern und in den neuronalen Ausläufern detektiert.
- i, k: d4 GAP-43 war nur in Neuronen nicht aber in Zellen mit flacher Morphologie (Pfeile) exprimiert.
- l, m: d6 Die GAP-43 Expression weitete sich von den Zellkörpern (Pfeile) in die Ausläufer aus.
- n, o: d8 Neuronale Wachstumskegel waren GAP-43 positiv.
- p, q: d12 GAP-43 war nur noch in axonalen Ausläufern (A) exprimiert, während Dendrite (D) durch MAP2a/b Expression identifiziert wurden.

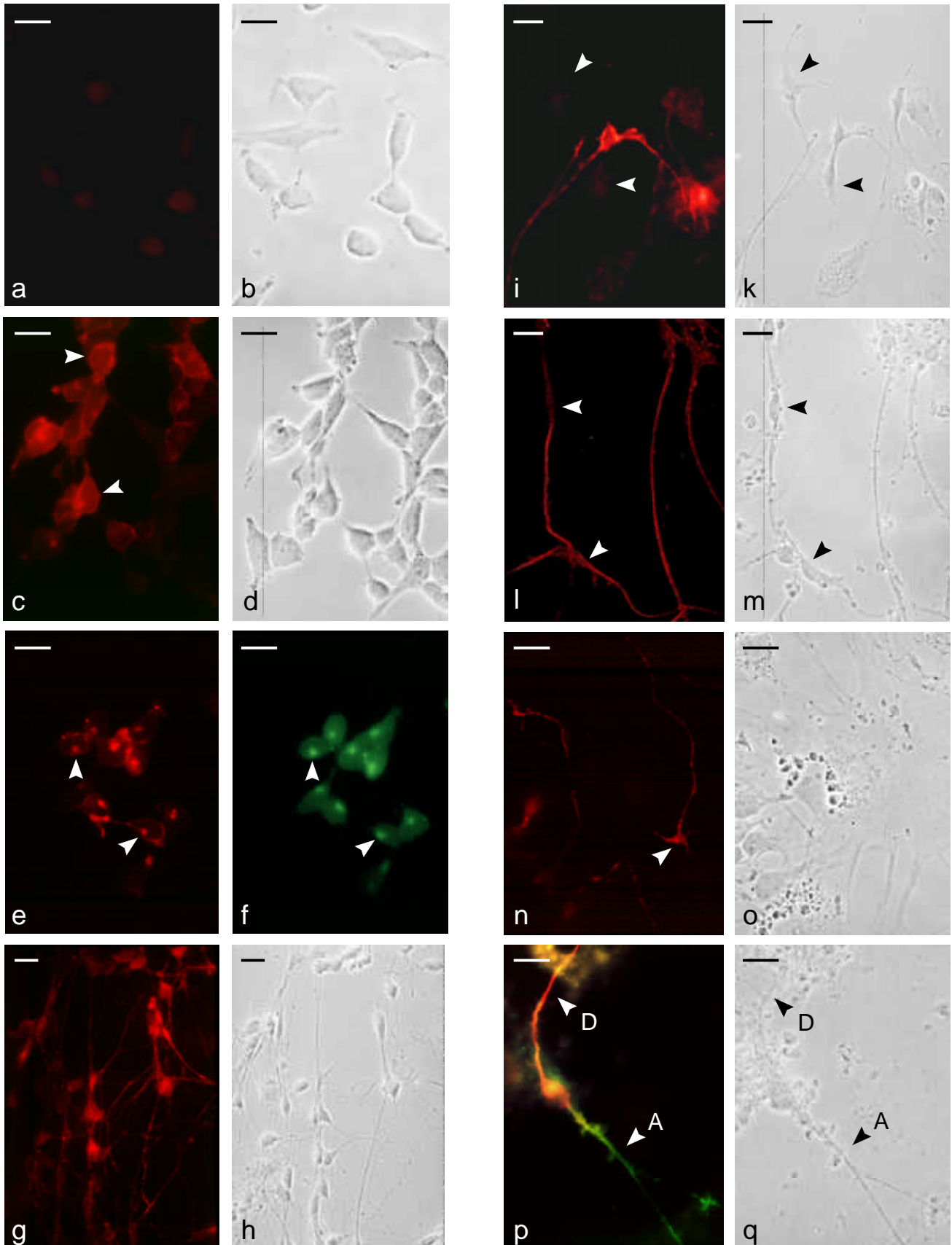


Abb. 4: Zelluläre Lokalisation von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen

1.1.5 Expression von GAP-43 in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen

Durch die Northern- und Western-Blot Analysen konnte gezeigt werden, daß die Expression von GAP-43 bereits wenige Stunden nach Zugabe von RA in den PCC7-Mz1-Zellen induziert wurde (Abb. 22). Um zu analysieren, ob GAP-43 nur in postmitotischen Zellen oder auch in noch proliferierenden Zellen exprimiert wurde, wurde die mitotische Aktivität der Zellen mittels DNA-Synthese Assays bestimmt. Hierzu wurden PCC7-Mz1-Stammzellen sowie Zellen, die für 14, 28 und 60 h mit RA behandelt worden waren, für 10 h mit dem Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) inkubiert und anschließend fixiert. Der Einbau von BrdU in die DNA während der S-Phase proliferierender Zellen ermöglichte den Nachweis der Zellen, die noch nicht im Zellzyklus arretiert waren. Durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen konnte so die Expression von GAP-43 mit der mitotischen Aktivität der Zellen verglichen werden (Abb. 5 A). Die Anteile GAP-43 und BrdU positiver Zellen wurden durch mikroskopische Auszählung von rund 300 Zellen an jedem untersuchten Zeitpunkt quantifiziert und graphisch dargestellt (Abb. 5 B). An d0 und d1 wiesen alle Zellen Teilungsaktivität auf. Während in Stammzellen jedoch keine Expression von GAP-43 nachweisbar war, waren ungefähr 77% der Zellen an d1 sowohl GAP-43 positiv als auch noch proliferativ. Die Gesamtzahl an GAP-43 exprimierenden Zellen blieb an den Differenzierungstagen d2 und d3 konstant, doch der Anteil an Zellen, die GAP-43 positiv und noch mitotisch aktiv waren, nahm ab. So waren an d3 nur noch 15% der Zellen GAP-43 und BrdU positiv. Es konnte somit gezeigt werden, daß GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen zunächst von noch proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wurde, bevor die Zellen nach Induktion der GAP-43 Expression postmitotisch wurden. Diese Ergebnisse konnten durch Analysen von pränatalen Ratten-Gehirnen verifiziert werden. Im Neuroepithel der Gehirne vom Fetaltag 13 und 15 wurden ebenfalls mitotisch aktive Zellen im Hinter- und Vorderhirnbereich, die bereits GAP-43 exprimierten, nachgewiesen (ESDAR *et al.*, 1999a).

1.1.6 GAP-43 als PKC-Substrat in neuronalen Vorläuferzellen

Die durch die Immunfluoreszenzanalysen erhaltenen Ergebnisse zeigten, daß die GAP-43 Expression in PCC7-Mz1-Zellen sowohl zelltypspezifisch als auch subzellulär während des Differenzierungsverlaufs streng reguliert war. Durch die DNA-Synthese Experimente konnte zudem demonstriert werden, daß das Protein bereits sehr früh während der neuronalen Differenzierung in noch proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wurde. Aufgrund dieses kontrollierten Expressionsmusters von GAP-43 während der neuronalen Entwicklung kann man eine wichtige Funktion des Proteins für die neuronalen Determinierungs- und Differenzierungsprozesse der PCC7-Mz1-Zellen vermuten. Um zu untersuchen, ob GAP-43 an diesen frühen Differenzierungszeitpunkten bereits funktionell war, wurde eine mögliche Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) untersucht.

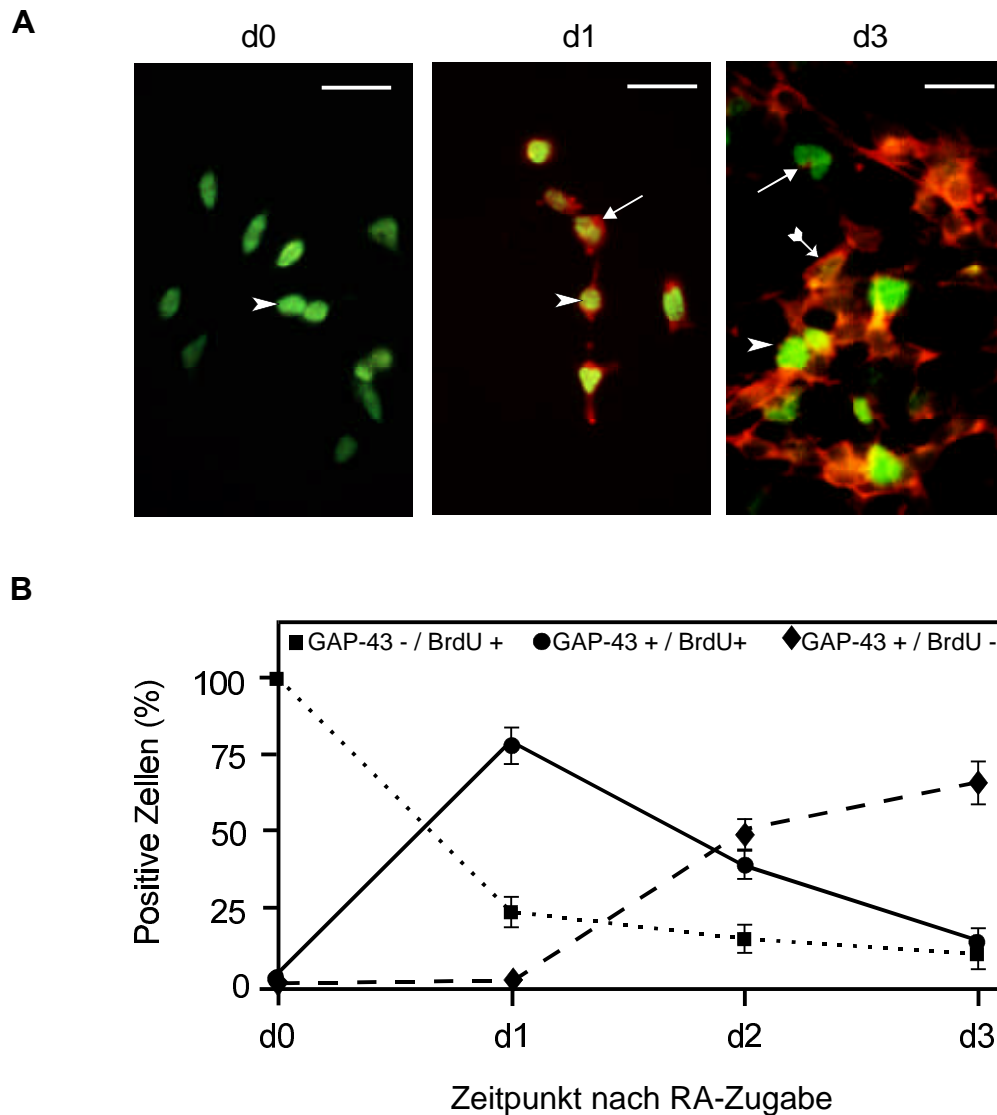


Abb. 5: Expression von GAP-43 in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen

A PCC7-Mz1 Stammzellen sowie Zellen, die für 14, 28 und 60 h mit RA behandelt worden waren, wurden für 10 h mit 10 μ M BrdU inkubiert und anschließend fixiert. Die Inkorporation von BrdU in die DNA sich teilender Zellen (grün) sowie die Expression von GAP-43 (rot) wurde durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. Während alle Stammzellen (d0) proliferierten, exprimierten sie kein GAP-43. 24 h nach RA-Behandlung (d1) waren fast alle Zellen GAP-43 und BrdU positiv. Die Pfeile weisen auf die GAP-43 positive Cytoplasmamembran (rot), und die Pfeilköpfe zeigen auf die durch BrdU-Einbau markierte genomische DNA (grün). An d3 ließen sich sowohl noch proliferierende GAP-43 positive Zellen nachweisen (Pfeilkopf), als auch GAP-43 positive Zellen, die keine BrdU-Inkorporation aufwiesen (taillierter Pfeil) und GAP-43 negative Zellen, die noch proliferativ waren (Pfeil). Die Balkenlänge beträgt 15,6 μ m.

B Die Anteile BrdU und GAP-43 positiver Zellen wurden durch Auszählung von rund 300 Zellen pro Zeitpunkt quantifiziert, und der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Während die proliferierenden Stammzellen (d0) keine GAP-43 Expression aufwiesen, waren 77% der GAP-43 positiven Zellen an d1 bzw 37% der GAP-43 positiven Zellen an d2 noch proliferativ. An d3 nahm die mitotische Aktivität GAP-43 exprimierender Zellen ab, da sich nur noch in 20% der GAP-43 positiven Zellen ein Einbau von BrdU nachweisen ließ.

Hierzu wurden die PCC7-Mz1-Zellen an d0 sowie an verschiedenen Differenzierungsstagen metabolisch mit [32 P]-Orthophosphat markiert und zur Aktivierung von PKC mit 200 nM Phorbol-12,13-dibutyrat (Phorbol-ester, PDB) stimuliert. GAP-43 wurde durch Immunpräzipitation isoliert, und nach Auftrennung mittels SDS-PAGE konnte sein Phosphorylierungsstatus durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Die PKC vermittelte Phosphorylierung von GAP-43 war in Stammzellen (d0) und 24 h nach Zugabe von RA (d1) unabhängig von der PKC Aktivierung durch Phorbol-ester relativ gering (Abb. 6 A). Ab d2 ließ sich nach Stimulierung von PKC jedoch eine deutliche Zunahme an phosphoryliertem GAP-43 nachweisen. Die Behandlung mit Phorbol-ester führte zu einem etwa drei- (d2) bis sechsfachen (d8) Anstieg der Phosphorylierung von GAP-43. Als Kontrolle wurde die PKC vermittelte Phosphorylierung des ubiquitären Substrats MARCKS untersucht. MARCKS wird bereits in PCC7-Mz1 Stammzellen und auch während des gesamten Differenzierungsverlaufs konstant exprimiert (OEHRLEIN-KARPI, 1998). Die Abbildung 6 B zeigt, daß MARCKS schon an d0 nach Aktivierung von PKC phosphoryliert wurde, und daß die Zunahme an phosphoryliertem MARCKS nach Phorbol-ester-Stimulation an frühen Differenzierungszeitpunkten größer war als an späteren Zeitpunkten.

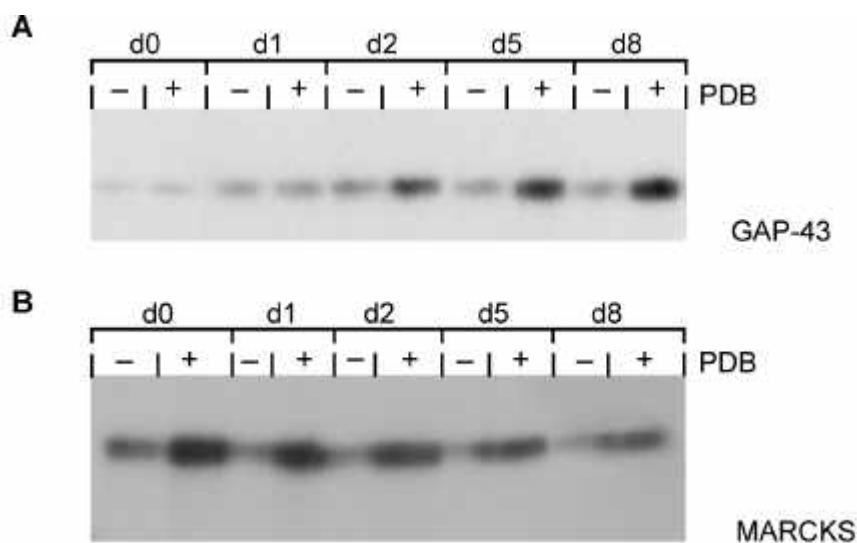


Abb. 6: In vivo Phosphorylierung der PKC Substrate GAP-43 und MARCKS in PCC7-Mz1-Zellen
PCC7-Mz1-Stammzellen sowie Zellen der Differenzierungszeitpunkte d1, d2, d5 und d8 wurden für 5 h mit 100 μ Ci/ml [32 P]-Orthophosphat in phosphatfreiem DMEM inkubiert. Nach Behandlung mit 200 nM PDB für 10 min. wurden hitzestabile Gesamtzell-extrakte hergestellt und für Immunpräzipitationen mit dem anti-GAP-43-Antiserum bzw. einem anti-MARCKS-Antiserum eingesetzt. Die Immunpräzipitate wurden durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, und der Phosphorylierungsstatus von GAP-43 (A) bzw. MARCKS (B) wurde durch Exposition eines Kodak X-OMAT AR Films mit Verstärkerfolie für 24 h bei -80° C nachgewiesen. In PCC7-Mz1-Stammzellen ließ sich aufgrund der geringen GAP-43 Expression nur basale Phosphorylierung nachweisen, während an den Differenzierungsstagen d2 bis d8 die Stimulierung von PKC zu einer starken Phosphorylierung von GAP-43 führte (A). Das in PCC7-Mz1-Zellen ubiquitär exprimierte MARCKS wurde nach PKC-Aktivierung an allen Differenzierungszeitpunkten phosphoryliert (B).

1.2 Herstellung stabil transfizierter Mz-GAP-43 Klone

Durch die Analyse der Expression von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen konnte gezeigt werden, daß das Protein sehr früh nach Induktion der neuralen Differenzierung mit RA hochreguliert wurde und eine streng definierte subzelluläre Lokalisation aufwies. Zudem war GAP-43 bereits in neuronalen Vorläuferzellen als Substrat für PKC funktionell. Ob GAP-43 einen Einfluß auf den neuralen Differenzierungsprozeß der PCC7-Mz1-Zellen besitzt, sollte durch die Analyse von Klonen, die eine stabile Überexpression von GAP-43 besaßen, untersucht werden.

1.2.1 Klonierung des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3-SV40-GAP-43

Das pF1.1 Plasmid (ROSENTHAL *et al.*, 1987), das die Ratten cDNA von GAP-43 im pGEM3-Z Vektor enthält, wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. A. Routtenberg (Northwestern University, Illinois, USA) zur Verfügung gestellt. Mittels PCR konnte unter Verwendung spezifischer Primer, die komplementär zum Translationsstart und Translationsstop der GAP-43 cDNA waren (II 1.5), die kodierende Region der GAP-43 cDNA aus dem pF1.1 Plasmid amplifiziert werden. Da die gewählten Primer Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* (5´Primer) und *XbaI* (3´Primer) enthielten, konnte die amplifizierte GAP-43 cDNA über *EcoRI* und *XbaI* Schnittstellen in den Polylinker des pcDNA3-SV40-Expressionsvektors, der uns freundlicherweise von Frau Dr. U.-M. Bauer zur Verfügung gestellt wurde, kloniert (Abb. 7). Bei diesem modifizierten pcDNA3-Vektor wurde der CMV-Promoter durch den SV40-Promoter, welcher aus dem pSBC-1 Vektor stammt, ersetzt (BAUER, 1997). Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Restriktionsanalysen überprüft. Da durch die Klonierungsstrategie die *XbaI* Restriktionsstelle in eine *dam*-Methylierungsstelle (CTAG) umgewandelt wurde, konnte das methylierungssensitive Enzym *XbaI* diese Schnittstelle nicht mehr erkennen. Jedoch konnte das GAP-43 cDNA Insert mit den Enzymen *EcoRI* sowie *Apal*, das eine Restriktionsstelle stromabwärts von *XbaI* besitzt, aus dem pcDNA3-SV40-Vektor ausgeschnitten werden. Desweiteren konnte die Klonierung durch Verwendung des Restriktionsenzym *PstI*, welches eine interne Schnittstelle in der GAP-43 cDNA erkennt, kontrolliert werden. Zusätzlich wurde das GAP-43 cDNA Insert vollständig sequenziert, um auszuschließen, daß durch die PCR mögliche Punktmutationen eingefügt wurden. Für die Sequenzierung wurde der Primer pcDNA3 (Abb. 7) eingesetzt, der stromabwärts des pcDNA3 Polylinkers an die Nukleotide 1033 – 1054 bindet (SCHÄFER, 1997). Die ermittelte Sequenz wies im Vergleich zur bekannten Sequenz (ROSENTHAL *et al.*, 1987) keine Unterschiede auf. Außerdem wurde die stromaufwärts der GAP-43 cDNA liegende SV40-Promoter Region sequenziert. Hierzu wurde der Primer GAP-43 CE (Abb. 7) verwendet, der an die GAP-43 Sequenz hybridisiert. Datenbankvergleiche zeigten eine vollständige Übereinstimmung der erhaltenen Sequenz des SV40-Introns sowie des SV40-Promoters mit bereits publizierten Sequenzen (KATO *et al.*, 1994).

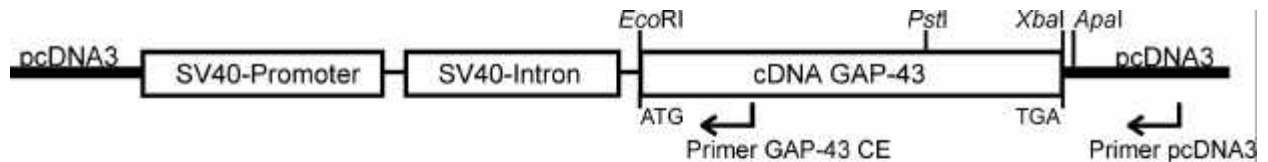


Abb. 7: Struktur des pcDNA3-SV40-GAP-43 Vektors

Mittels PCR wurde die Ratten cDNA von GAP-43 aus dem pF1.1-Plasmid (ROSENTHAL *et al.*, 1987) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XbaI* in die Polylinker-Region des pcDNA3-SV40-Vektors kloniert. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen modifizierten pcDNA3-Vektor, bei dem der CMV-Promoter durch den SV40-Promoter ersetzt wurde. Da die Schnittstelle von *XbaI* durch die Klonierungsstrategie in eine *dam*-Methylierungsstelle umgewandelt wurde, konnte das methylierungssensitive Restriktionsenzym diese Sequenz nicht mehr erkennen. Daher wurde die erfolgreiche Klonierung überprüft, indem die GAP-43 cDNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *Apal* ausgeschnitten wurde. Zusätzlich wurde die Klonierung durch die Verwendung des Restriktionsenzym *PstI*, das eine interne Schnittstelle in der GAP-43 Sequenz erkennt, kontrolliert.

Um auszuschließen, daß durch die PCR-Amplifikation Mutationen eingefügt wurden, wurde die inserierte GAP-43 cDNA unter Verwendung des Primers pcDNA3 (SCHÄFER, 1997; II 1.5) sequenziert. Desweiteren wurde das SV40-Intron sowie der SV40-Promoter sequenziert, wofür der Primer GAP-43 CE (II 1.5) eingesetzt wurde. Die erhaltenen Sequenzen stimmten vollständig mit den publizierten Sequenzen überein.

1.2.2 Transiente Transfektion von GAP-43 in COS-1 Zellen

Um die Funktionalität des klonierten pcDNA3-SV40-GAP-43 Expressionsvektors zu überprüfen, wurde eine transiente Transfektion in einem heterologen Zellsystem durchgeführt. Dazu wurden COS-1 Zellen verwendet, da sich diese Zellen einfach und mit hohen Effizienzen transfizieren lassen (MELLON, 1981). Die Transfektion erfolgte nach der Calciumphosphat-Methode (GRAHAM & VAN DER EB, 1973; CHEN & OKAYAMA, 1987), wobei zwei unterschiedliche DNA-Mengen (5 und 10 µg) eingesetzt wurden. Etwa 48 h nach der Transfektion wurden Detergenz-lösliche Gesamtzellextrakte hergestellt, und die GAP-43 Expression wurde mittels Western-Blot Analysen überprüft (Abb. 8). In transfizierten Zellen wurde mit dem GAP-43 Antiserum ein Signal erhalten, das sich auf der gleichen Höhe wie die Bande in den als Kontrolle analysierten PCC7-Mz1-Zellen (d1) befand. GAP-43 konnte somit ektopisch in COS-1 Zellen exprimiert werden. Interessanterweise wurde in den COS-1 Zellen eine Doppelbande des transfizierten GAP-43 detektiert, wobei die untere Bande die gleiche Größe wie das Protein in PCC7-Mz1-Zellen aufwies, während die obere Bande eine etwa 4 bis 5 kDa höhere molekulare Masse besaß. Die Intensität der GAP-43 Expression war abhängig von der für die Transfektion eingesetzten DNA-Menge. COS-1 Zellen, die mit dem leeren pcDNA3-SV40-Vektor transfiziert wurden, enthielten kein GAP-43.

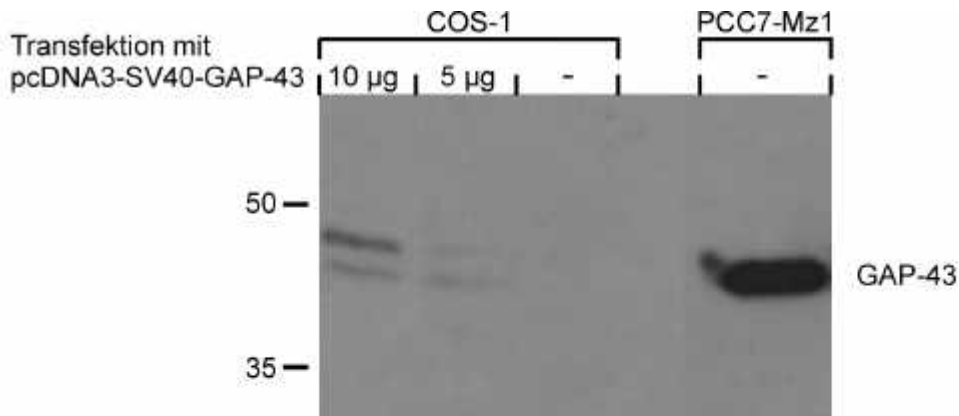


Abb. 8: Transiente Transfektion des Expressionsvektors pcDNA3-SV40-GAP-43 in COS-1 Zellen

COS-1 Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Methode mit 5 bzw. 10 µg DNA des Expressionsvektors pcDNA3-SV40-GAP-43 (Abb. 7) transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Gesamtzell-extrakte hergestellt. Je 30 µg des extrahierten Proteins wurden durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und GAP-43 Protein wurde detektiert. Der Nachweis gebundenen GAP-43-Antikörpers erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 10 min. Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben. Als Kontrolle sind nicht-transfizierte COS-1 Zellen sowie PCC7-Mz1-Zellen (d1, 10 µg Protein) dargestellt.

Die ektopische Expression des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3-SV40-GAP-43 in COS-1 Zellen führte zur Entstehung einer GAP-43 Doppelbande.

1.2.3 Stabile Transfektion von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen

Zur Herstellung stabiler PCC7-Mz1-Zelllinien, die eine GAP-43 Überexpression aufwiesen, wurde die Transfektion von auf Laminin gewachsenen PCC7-Mz1-Zellen, wie unter II 2.9 beschrieben, durch Lipofektion mit Escort™ durchgeführt. Zur Selektion stabil transfizierter Zellen wurde das Antibiotikum G418 zugesetzt, und stabile Einzelklone wurden durch eine limitierte Verdünnung in 96 Loch-Mikrotiterplatten erzeugt (DAVIES, 1994). Von ursprünglich 26 erhaltenen Klonen konnten 15 auf ihre GAP-43 Überexpression getestet werden, während die übrigen 11 Klone bei der Kultivierung abstarben. In Abbildung 9 A ist exemplarisch eine Western-Blot Analyse mit dem GAP-43-Antiserum von Stammzellen von 11 der isolierten Klone dargestellt. Aufgrund der kaum nachweisbaren GAP-43 Expression in PCC7-Mz1-Stammzellen (III 1.1.3) wurde eine Überexposition des Western-Blots verwendet, um die Intensität der GAP-43 Expression in den Klonen mit der in PCC7-Mz1-Zellen vergleichen und densitometrisch quantifizieren zu können. Der Auftrag gleicher Proteinmengen wurde durch die Anfärbung der Membran mit Coomassie-Blau Lösung demonstriert (Abb. 9 B). Innerhalb der einzelnen Klone ließen sich deutliche Unterschiede in der Menge an GAP-43 nachweisen, wobei in einigen Klonen (A3, B9, G3) eine GAP-43 Doppelbande, die auch in den COS-1 Zellen detektiert wurde (Abb. 8), auftrat. Durch Präabsorption des GAP-43 Antiserums mit GAP-43 konnte die GAP-43 Spezifität beider Banden belegt werden (Daten nicht gezeigt). In 6 der 15 getesteten Klone war

die GAP-43 Überexpression im Vergleich zu den PCC7-Mz1-Zellen mindestens um den Faktor 2 höher, so daß diese Klone als positiv bewertet wurden. Die Effizienz der Transfektion betrug damit etwa 23%. Im folgenden werden die erhaltenen Klone als "Mz-GAP-43" Klone bezeichnet. Zur Unterscheidung der einzelnen Klone werden sie nach dem jeweiligen Loch der 96 Loch-Mikrotiterplatte, in dem sie gewachsen sind, benannt.

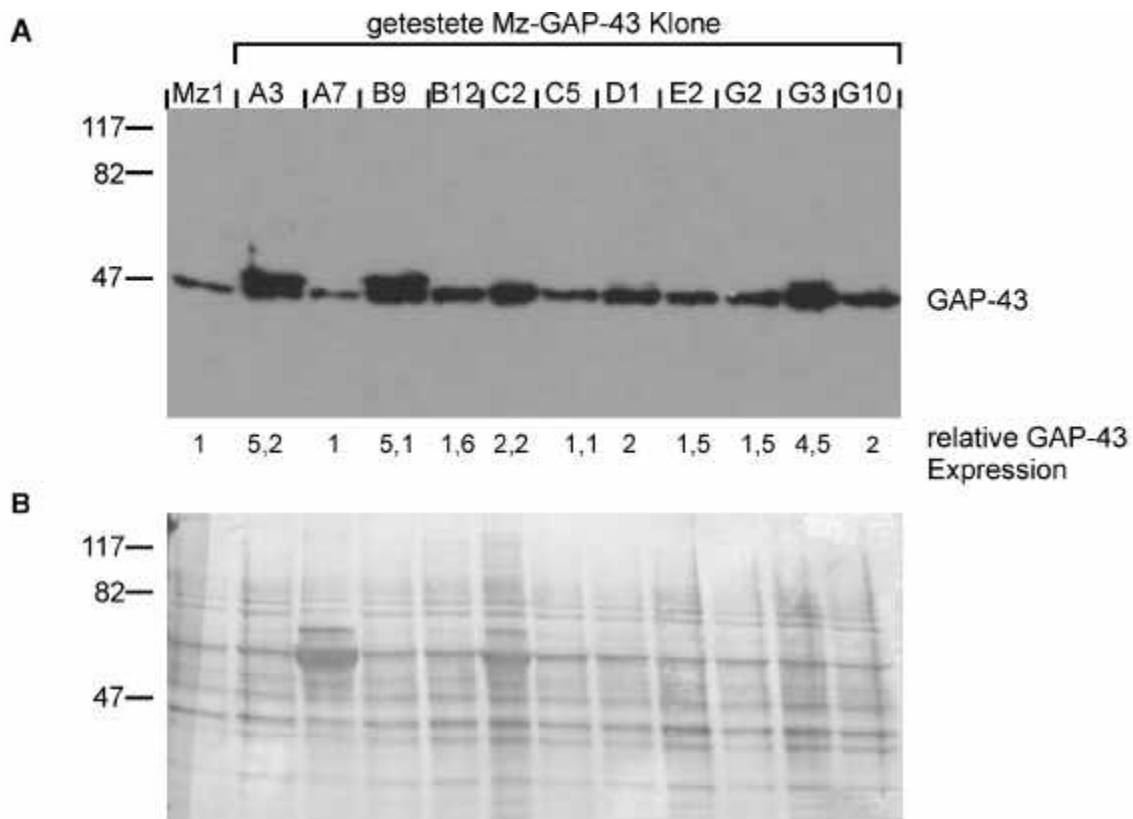


Abb. 9: GAP-43 Expression in Stammzellen der isolierten Mz-GAP-43 Klone

A Je 5 µg Protein des Gesamtzellextrakts aus Stammzellen von PCC7-Mz1-Zellen sowie von 11 der generierten Mz-GAP-43 Klone wurden durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-GAP-43-Antiserum detektiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion und anschließende Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 5 min. Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben. Die GAP-43 Expression wurde densitometrisch quantifiziert und ist unter den entsprechenden Spuren im Vergleich zu den parentalen Mz1-Zellen (=1) angegeben.

B Nach der Immundetektion wurde die PVDF-Membran mit Coomassie-Blau gefärbt, um den Auftrag gleicher Proteinmengen zu demonstrieren.

1.2.4 Expression von GAP-43 in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9

Die weiteren Experimente wurden mit den beiden Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 durchgeführt, da diese beiden Klone die stärkste GAP-43 Überexpression aufwiesen. Stammzellen dieser zwei Klone enthielten etwa 6 bis 7-fach mehr GAP-43 als PCC7-Mz1-Zellen (Abb. 10 A). In beiden Klonen wurde in der Western-Blot Analyse die bereits beschriebene GAP-43

Doppelbande detektiert. Die Immunfluoreszenzanalyse von Stammzellen der Klone A3 und B9 zeigte, daß das GAP-43 Protein sowohl an der Cytoplasmamembran als auch im Cytoplasma der Zellen lokalisiert war (Abb. 10 B). Zusätzlich waren die Pseudopodien deutlich angefärbt. In PCC7-Mz1-Stammzellen war dagegen kein GAP-43 nachweisbar.

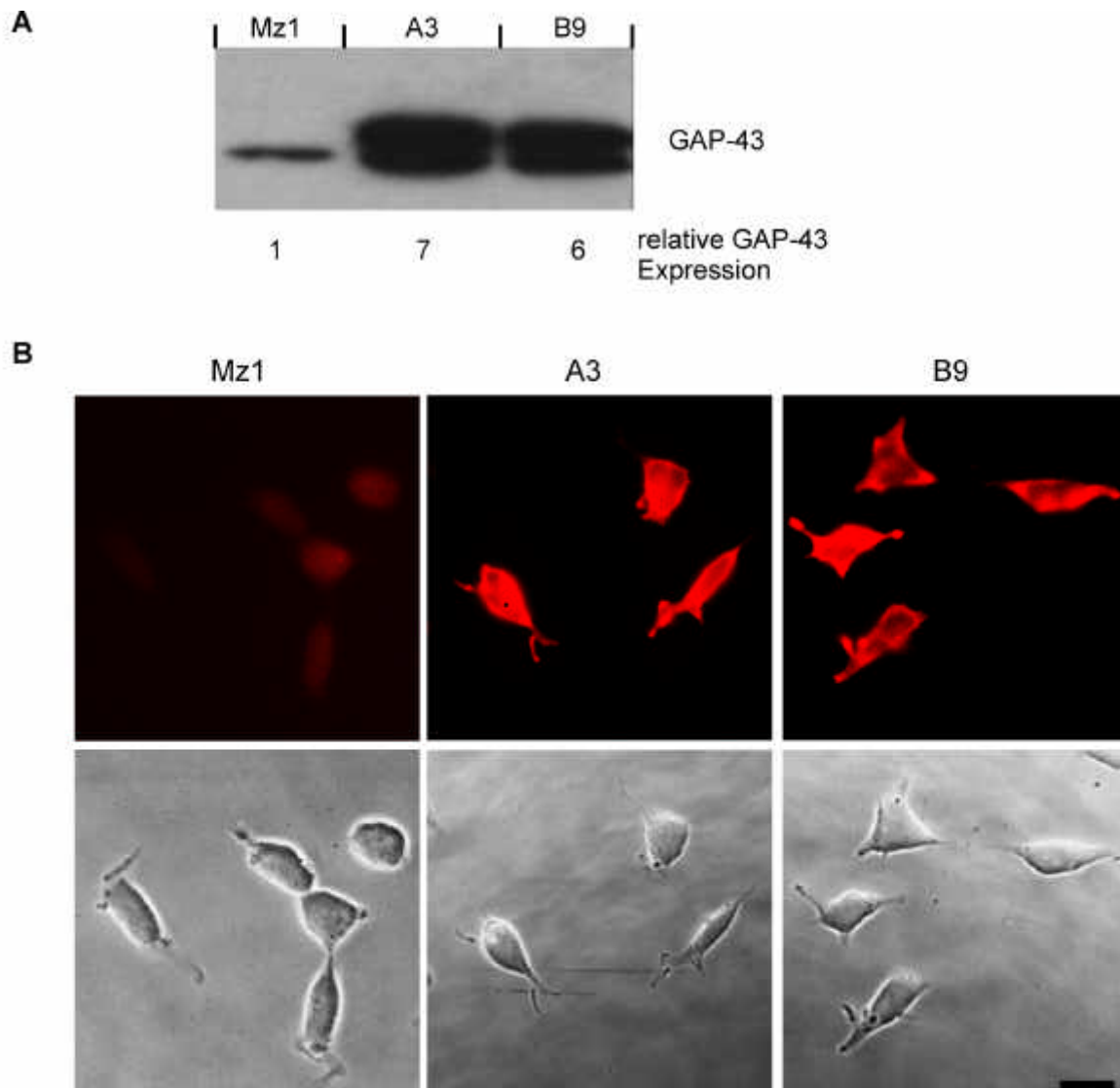


Abb. 10: Überexpression von GAP-43 in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9

A Je 5 µg Protein des Gesamtzell-extrakts von Stammzellen der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 sowie von PCC7-Mz1-Zellen wurden durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-GAP-43-Antiserum detektiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 5 min. Die Intensität der GAP-43 Expression wurde densitometrisch quantifiziert und in Relation zur Expression in PCC7-Mz1-Zellen gesetzt.

B Stammzellen von PCC7-Mz1 sowie von den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 wurden auf Deckgläsern ausgesät und fixiert. Die Expression von GAP-43 wurde mit dem anti-GAP-43-Antiserum sowie mit einem Cy3-markierten anti-Kaninchen Antikörper nachgewiesen. Die Fluoreszenzaufnahmen sind in der oberen Reihe und die dazugehörigen Phasenkontrastaufnahmen in der unteren Reihe dargestellt. Die Balkenlänge beträgt 15,6 µm.

Das überexprimierte GAP-43 Protein war in den Klonen A3 und B9 hauptsächlich an der Cytoplasmamembran, aber auch im Cytoplasma sowie in den Pseudopodien lokalisiert. In PCC7-Mz1-Zellen ließ sich kein GAP-43 nachweisen.

Um zu überprüfen, ob die GAP-43 Überexpression in den Mz-GAP-43 Klonen auch während der RA-induzierten Differenzierung stabil war, wurden Western-Blot Analysen von Detergenzlöslichen Gesamtzellextrakten der Zeitpunkte d0, d1 und d3 durchgeführt (Abb. 11). Die Intensität der GAP-43 Expression wurde densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von PCC7-Mz1-Stammzellen bezogen. Während die GAP-43 Expression in den PCC7-Mz1-Zellen nach Behandlung mit RA etwa um den Faktor 7 anstieg, war die Menge von GAP-43 in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 über den gesamten Differenzierungsverlaufs mehr als 7-fach höher als in PCC7-Mz1-Stammzellen. Die Expression der oberen Bande des GAP-43 Proteins nahm jedoch an d3 in beiden Klonen deutlich ab.

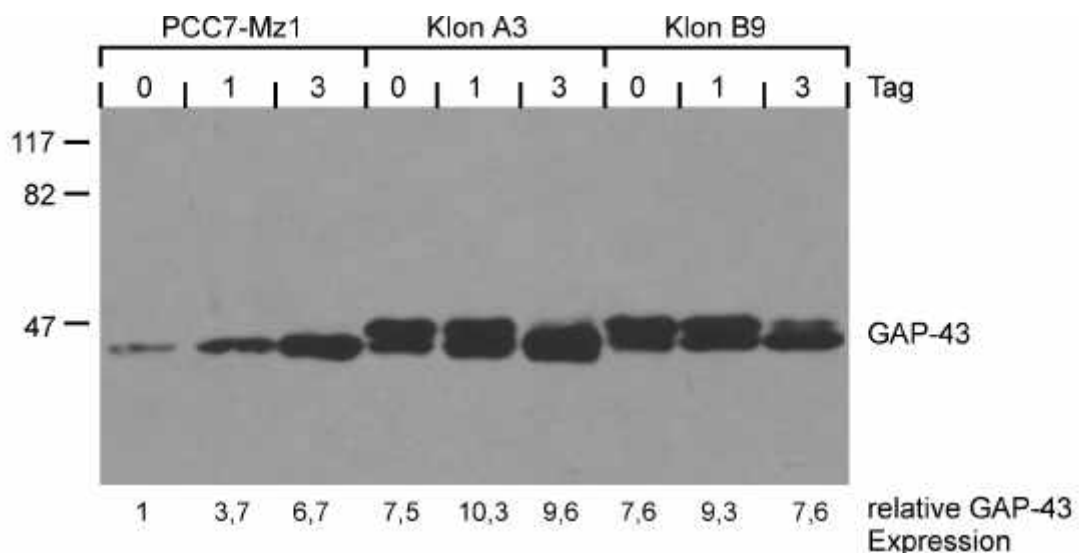


Abb. 11: Expression von GAP-43 während der RA-induzierten Differenzierung

Von PCC7-Mz1-Zellen und von den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 wurden je 5 µg Protein aus Gesamtzellextrakten von Stammzellen sowie von Zellen, die für 1 bzw. 3 Tage mit RA behandelt worden waren, durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-GAP-43-Antiserum detektiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 2 min. Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben. Durch Densitometrie konnten die Intensitäten der GAP-43 Expression quantifiziert werden.

Während die Expression von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen am Differenzierungstag d3 etwa um den Faktor 7 anstieg, enthielten Zellen der Mz-GAP-43 Klone zu allen Zeitpunkten eine mehr als 7-fach höhere Menge an GAP-43 als PCC7-Mz1-Stammzellen.

1. 3 Biochemische Charakterisierung von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen und in Mz-GAP-43 Klonen

Die Funktionalität des überexprimierten GAP-43 sollte in den stabilen Mz-GAP-43 Klonen nachgewiesen werden. Dazu wurden in einer Reihe von Experimenten die biochemischen Eigenschaften von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen sowie in den davon abgeleiteten Mz-GAP-43 Klonen analysiert.

1.3.1 Subzelluläre Lokalisation von GAP-43

Zunächst sollte die intrazelluläre Verteilung von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen sowie in den Mz-GAP-43 Klonen untersucht werden. Aufgrund der starken GAP-43 Überexpression konnten durch Immunfluoreszenzanalysen keine quantitativen Aussagen über die Lokalisation des Proteins in der Zelle getroffen werden (Abb. 10). Daher wurden subzelluläre Fraktionierungen von Gesamtzellextrakten in eine Cytoplasma- sowie eine Membran-Fraktion durchgeführt. Mittels Western-Blot Analysen sowie densitometrischer Quantifizierung der Proteinbanden konnte der GAP-43 Gehalt in diesen beiden Kompartimenten bestimmt werden. Die Verteilung von GAP-43 wurde sowohl in Stammzellen als auch in Zellen vom Differenzierungszeitpunkt d3 der PCC7-Mz1-Zellen und des Mz-GAP-43 Klon A3 analysiert (Abb. 12).

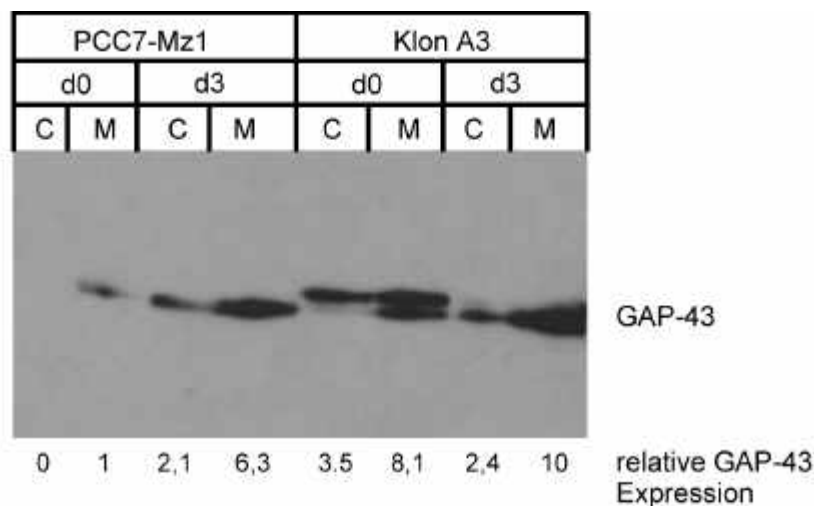


Abb. 12: Subzelluläre Lokalisation von GAP-43

Von PCC7-Mz1 und vom Mz-GAP-43 Klon A3 wurden Stammzellen sowie Zellen vom Differenzierungstag d3 einer subzellulären Fraktionierung in eine Cytoplasma (C)- sowie eine Membran (M)-Fraktion unterzogen (II 4.3). 5 µg Protein jeder Fraktion wurden durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, und GAP-43 wurde detektiert. Der Nachweis gebundenen Antikörpers erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 1 min. Die Intensitäten der GAP-43 Expression wurden densitometrisch quantifiziert.

Sowohl in PCC7-Mz1-Zellen als auch im Mz-GAP-43 Klon A3 lag der Hauptteil des GAP-43 Proteins in der Membran-Fraktion vor.

Wie bereits beschrieben wurde (III 1.1.3), war die GAP-43 Expression in PCC7-Mz1-Stammzellen sehr gering. Es konnte nur eine schwache Bande in der Membran-Fraktion detektiert werden. An d3 hatte die Menge an GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen deutlich zugenommen, und etwa 75% des Proteins lagen in der Membran-Fraktion vor. Dieses Ergebnis bestätigt die Immunfluoreszenzanalysen (Abb. 4 c), die ebenfalls eine membranständige Lokalisation von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen aufgezeigt haben. Eine leicht abweichende Verteilung des GAP-43 Proteins ergab sich aus den Untersuchungen der Mz-GAP-43 Klone. Die Stammzellen des Klons A3 wiesen sowohl in der Cytoplasma- als auch in der Membran-Fraktion eine starke GAP-43 Expression auf. Auffällig ist hier, daß in der Cytoplasma-Fraktion fast nur die obere Bande des GAP-43 Proteins vorlag, während in der Membran-Fraktion beide GAP-43 Banden gleich stark auftraten. Am Differenzierungstag d3 befanden sich über 80% des Proteins in der Membran-Fraktion, wobei die Expression der oberen Bande in beiden Fraktionen deutlich abnahm. Der Mz-GAP-43 Klon B9 wies die gleiche Verteilung von GAP-43 wie die Zellen des Klons A3 auf (Daten nicht gezeigt).

1.3.2 GAP-43 wird nach PKC-Phosphorylierung nicht transloziert

Durch die Bestimmung der intrazellulären Verteilung von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen und in den Mz-GAP-43 Klonen konnte demonstriert werden, daß der Hauptteil des Proteins an zellulären Membranen lokalisiert war. Ferner zeigten die "*in vivo* Phosphorylierungsexperimente", daß GAP-43 schon sehr früh während der neuralen Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen ein Substrat für PKC darstellt (III 1.1.6). Daher sollte im folgenden untersucht werden, ob GAP-43 nach Phosphorylierung durch PKC von der Membran in das Cytosol transloziert wird. Eine solche phosphorylierungsabhängige Translokation konnte bereits für das ubiquitäre PKC-Substrat MARCKS in PCC7-Mz1-Zellen nachgewiesen werden (OEHRLEIN-KARPI, 1998).

PCC7-Mz1-Zellen und Zellen der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9, die für 24 h mit RA behandelt worden waren (d1), wurden für 20 min. zur Aktivierung von PKC mit 200 nM Phorbol-12,13-dibutyrat (Phorbolester, PDB) stimuliert und anschließend einer subzellulären Fraktionierung unterzogen. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die intrazelluläre Lokalisation von GAP-43 wurde durch Western-Blot Analysen ermittelt (Abb. 13). In PCC7-Mz1-Zellen lag sowohl mit als auch ohne Phorbolester-Stimulierung der Hauptanteil des Proteins in der Membran-Fraktion vor. In den beiden Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 enthielten die Cytoplasma- und die Membran-Fraktion etwa gleichviel GAP-43, doch ließ sich auch hier keine Translokation des Proteins nach PKC-Phosphorylierung detektieren. Eine Änderung der intrazellulären Lokalisation von GAP-43 nach Aktivierung von PKC war weder für das endogene noch für das ektopisch überexprimierte Protein nachweisbar. Um die Aktivierung von PKC zu überprüfen, wurde parallel die intrazelluläre Verteilung von MARCKS bestimmt. Nach Stimulierung von PKC durch

Phorbol ester wurde MARCKS sowohl in den PCC7-Mz1-Zellen als auch in den Mz-GAP-43 Klonen von der Membran in das Cytosol transloziert.

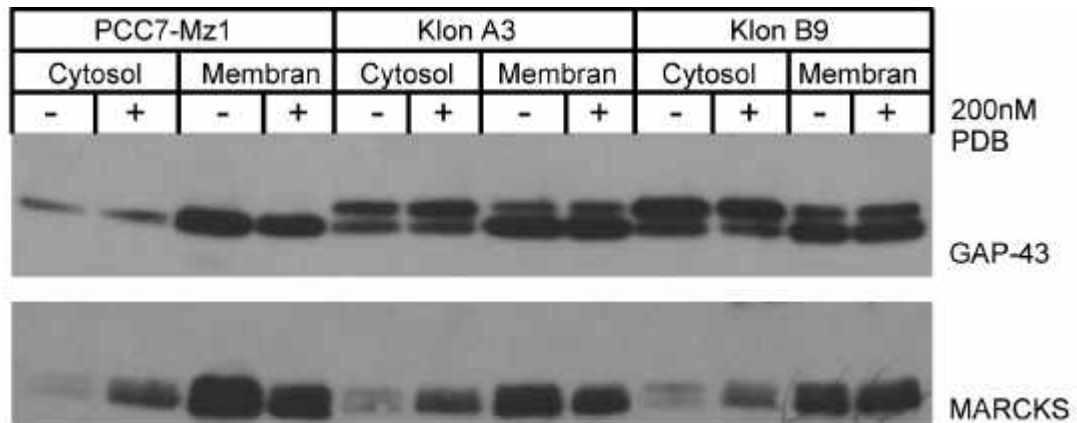


Abb. 13: GAP-43 wird nach Aktivierung von PKC nicht transloziert

Von PCC7-Mz1-Kulturen sowie von den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 wurden Zellen vom Differenzierungszeitpunkt d1 für 20 min. zur Aktivierung von PKC mit 200 nM PDB behandelt (+). Kontrollzellen blieben unbehandelt (-). Anschließend wurden die Zellextrakte, wie unter II 4.3 beschrieben, in eine Cytoplasma- und eine Membran-Fraktion getrennt. Je 5 µg Protein jeder Fraktion wurden durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-GAP-43-Antiserum bzw. einem anti-MARCKS-Antiserum detektiert. Der Nachweis erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 1 min.

Während MARCKS in den drei untersuchten Zelllinien nach Aktivierung von PKC in das Cytoplasma transloziert wurde, ließ sich weder in PCC7-Mz1-Zellen noch in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 eine Veränderung der Lokalisation von GAP-43 nachweisen.

1.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese des GAP-43 Proteins

Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese läßt sich parallel zum relativen Molekulargewicht auch der isoelektrische Punkt (pI-Wert) eines Proteins bestimmen. Dabei wird das zu analysierende Protein zunächst in der ersten Dimension gemäß seines pI-Wertes aufgetrennt, woran sich in der zweiten Dimension eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht anschließt. Zur weiteren Charakterisierung des endogenen und des ektopisch überexprimierten GAP-43 von PCC7-Mz1-Zellen sowie von den Mz-GAP-43 Klonen wurden Gesamtzellextrakte von Kulturen, die für 24 h mit RA behandelt worden waren (d1), einer zweidimensionalen Gelelektrophorese unterzogen. Der Nachweis des GAP-43 Proteins erfolgte durch Western-Blot Analysen. Diese Experimente wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. M. Winklhofer (Universität Mainz, Institut für Physiologische Chemie, Arbeitskreis Prof. A. Maelicke) durchgeführt. In PCC7-Mz1-Zellen konnte ein spezifisches GAP-43 Signal detektiert werden (Abb. 14). Dieser Spot wies eine molekulare Masse von ungefähr 43 kDa sowie einen pI-Wert von etwa 4,5 auf. Diese Werte lagen in guter Übereinstimmung mit beschriebenen Daten (COGGINS *et al.*, 1993).

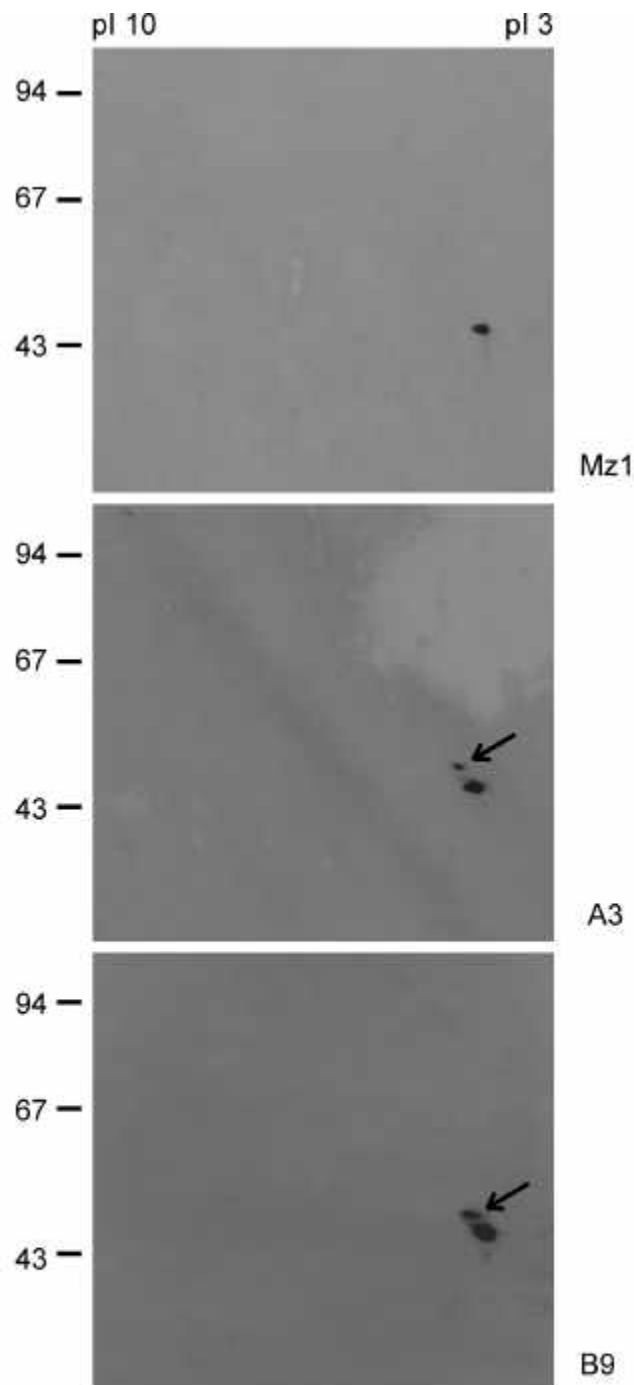


Abb. 14: Zweidimensionale Auftrennung von GAP-43

Von PCC7-Mz1-Zellen sowie von Zellen der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9, die für 24 h mit RA behandelt worden waren (d1), wurden etwa 800 µg Zellextrakt einer isoelektrischen Fokussierung im pI-Bereich zwischen 3 und 10 unterzogen. In der zweiten Dimension folgte eine Trennung der Proteine durch eine 10%-ige SDS-PAGE, Transfer auf eine PVDF-Membran und die Detektion mit dem anti-GAP-43-Antiserum. Der Nachweis wurde über eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 2 min. durchgeführt. Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben.

Während in PCC7-Mz1-Zellen ein Spot mit einem pI von etwa 4,5 sowie einer molekularen Masse von etwa 43 kDa nachgewiesen wurde, trat in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 ein zusätzlicher Spot mit einem basischeren pI sowie einer um 4 bis 5 kDa höheren molekularen Masse auf (Pfeil).

In den Zellextrakten der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 wurde dieser Spot ebenfalls nachgewiesen. Zusätzlich trat hier ein zweites, spezifisches Signal mit einer um 4 bis 5 kDa höheren molekularen Masse sowie einem etwas basischeren pI-Wert auf (Pfeile in Abb. 14). Dieser zweite Spot entsprach der in den eindimensionalen Western-Blot Analysen detektierten oberen GAP-43 Bande.

1.3.4 GAP-43 ist palmyliert

GAP-43 ist in den PCC7-Mz1-Zellen sowie in den Mz-GAP-43 Klonen größtenteils an zellulären Membranen lokalisiert (Abb. 12). Für die Assoziation des Proteins an die Innenseite der Cytoplasmamembran scheint die posttranslationale Palmylierung der zwei N-terminalen Cysteinreste in den Positionen 3 und 4 (SKENE & VIRAG, 1989) verantwortlich zu sein (ZUBER *et al.*, 1989a). Um zu analysieren, ob GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen und in den davon abgeleiteten überexprimierenden Klonen ebenfalls palmyliert vorliegt, wurden die Zellen am Differenzierungstag d1 metabolisch mit radioaktiver [³H]-Palmitinsäure markiert. Nach Extraktion der Zellen konnte palmyliertes GAP-43 Protein durch Immunpräzipitation angereichert und durch anschließende Autoradiographie nachgewiesen werden. Eine große Zahl von Proteinen aus PCC7-Mz1-Zellen und aus den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 wurden durch die metabolische Palmylierung markiert (Abb. 15, Spuren 1-3). Nach Immunpräzipitation von GAP-43 wurde in allen Zellen ein spezifisches Signal mit einer molekularen Masse von etwa 43 kDa detektiert (Spuren 4-6). Durch eine parallele Western-Blot Analyse konnte dieses Signal als GAP-43 identifiziert werden (Spuren 9-11). In den zwei Mz-GAP-43 Klonen waren beide auftretenden GAP-43 Formen palmyliert. Zum Nachweis der Spezifität der Palmylierung wurden die mit radioaktiver Palmitinsäure markierten Zellextrakte mit 1 M Hydroxylamin-Lösung (NH₂OH) inkubiert. Hydroxylamin spaltet die Thioesterbindung zwischen dem Cysteinrest und der Palmitinsäure, so daß diese freigesetzt wird. Nach Behandlung mit Hydroxylamin konnten durch Autoradiographie im Gesamtzellextrakt des Mz-GAP-43 Klons A3 keine markierten Proteine und kein immunpräzipitiertes GAP-43 mehr nachgewiesen werden (Spuren 7 und 8).

Die erhaltenen Ergebnisse demonstrieren, daß sowohl das endogene GAP-43 Protein in PCC7-Mz1-Zellen als auch beide Formen von GAP-43 in den Mz-GAP-43 Klonen palmyliert vorliegen, womit ein weiterer Nachweis der Funktionalität des ektopisch exprimierten Proteins erhalten werden konnte.

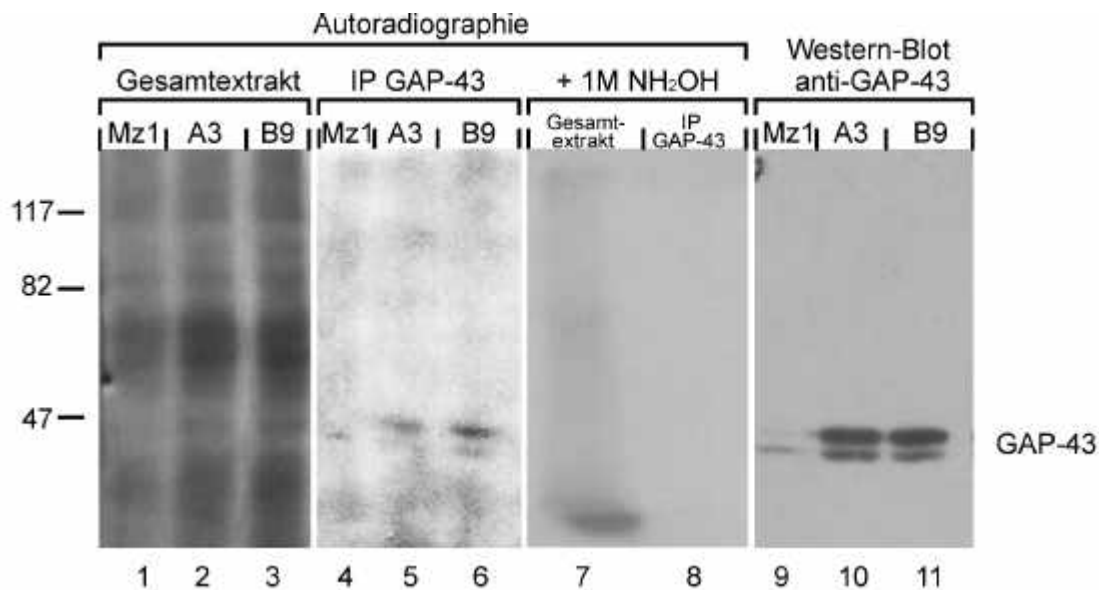


Abb. 15: Palmytylierung von GAP-43

Von PCC7-Mz1-Zellen und von den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 wurde je eine 10 cm-Schale mit Zellen, die für 24 h mit RA behandelt worden waren (d1), für 4 h mit 0,5 mCi/ml [9, 10-³H]-Palmitinsäure metabolisch markiert. Zur Überprüfung der Markierung wurden je 15 µg Protein direkt durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt (Spuren 1-3). Aus den restlichen Zellextrakten (je etwa 300 µg Protein) wurde GAP-43 mit dem anti-GAP-43-Antiserum immunpräzipitiert (IP) und dann elektrophoretisch aufgetrennt (Spuren 4-6). Zum Nachweis der Spezifität der Palmytylierung wurde der Zellextrakt von Mz-GAP-43 A3 für 1 h mit 1 M Hydroxylamin-Lösung (1 M NH₂OH) inkubiert, wodurch die Palmitinsäure abgespalten wurde, und direkt (Spur 7) oder nach der Immunpräzipitation von GAP-43 (Spur 8) elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Trocknen wurde das SDS-Gel für 30 min. mit 1 M Natriumsalicylat-Lösung fluorographiert. Die Exposition mit einem Kodak X-OMAT AR Film mit Verstärkerfolie erfolgte für 3 Wochen. Durch die direkte Western-Blot Analyse mit dem anti-GAP-43-Antiserum von je 5 µg Protein aus Gesamtzellextrakt konnte die Position der GAP-43 Bande gezeigt werden (Spuren 9-11). Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben.

Sowohl das endogene GAP-43 aus PCC7-Mz1-Zellen als auch beide Formen des GAP-43 Proteins aus den Mz-GAP-43 Klonen lagen palmytyliert vor.

1.3.5 GAP-43 wird nicht glykosiliert

Eine Vielzahl der zellulären Proteine werden posttranslational im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat glykosiliert. Diese Modifikationen sind u.a. für die intrazelluläre Sortierung eines Proteins verantwortlich. Außerdem wird durch Glykosilierungen die Wasserlöslichkeit sowie die Stabilität von Proteinen erhöht. Da über eine mögliche Glykosilierung von GAP-43 noch keine Ergebnisse beschrieben worden sind, sollte untersucht werden, ob GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen als Glykoprotein vorliegt. Für diese Experimente wurde der "DIG-Glycan-Detection-Kit" (Roche Biochemicals/Mannheim) verwendet. Durch diese Methode werden alle Glykoproteine aus Zellextrakten mit dem Hapten DIG (Digoxygenin) markiert, indem die Zuckerseitenketten der Proteine nach milder Oxidation kovalent mit einem DIG-gekoppelten Hydrazid verbunden werden. Der Nachweis von Glykoproteinen erfolgt dann durch einen anti-DIG-Antikörper. Um eine mögliche Glykosilierung von GAP-43 nachzuweisen, wurden Glykoproteine aus Gesamtzellextrakten (d1) von PCC7-Mz1-Zellen sowie von dem Mz-GAP-43

Klon A3 mittels der oben beschriebenen Technik markiert. Nach Immunpräzipitation von GAP-43 konnte möglicherweise glykosiliertes GAP-43 durch eine Western-Blot Analyse mit einem anti-DIG-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 16). In den Spuren 1 und 2 sind die vom Hersteller mitgelieferten Kontrollen aufgeführt. Der Nachweis der Glykosilierung des Glykoproteins Transferrin sowie der nicht-glykosilierten Creatinase erfolgte parallel zur Untersuchung der Zellextrakte. Während in der Positiv-Kontrolle die Glykosilierung von Transferrin gezeigt wurde (Spur 1), ergab die Markierung der nicht-glykosilierten Creatinase kein Signal mit dem anti-DIG-Antikörper (Spur 2). In Spur 3 ist exemplarisch die Detektion von DIG-markierten Glykoproteinen aus Gesamtzellextrakt des Mz-GAP-43 Klons A3 dargestellt. Die Immunpräzipitation von GAP-43 aus diesen Gesamtzellextrakten zeigte jedoch weder in PCC7-Mz1-Zellen noch im Mz-GAP-43 Klon A3 ein Signal mit einer molekularen Masse von ungefähr 43 kDa (Spuren 4 und 5). Bei den höhermolekularen Banden mit den Größen von etwa 55 und 60 kDa scheint es sich um Proteine zu handeln, die unspezifisch von dem anti-GAP-43-Antiserum gebunden wurden, da diese Signale bei der Immunpräzipitation ohne Antikörper nicht auftraten (Spur 6). Zur Kontrolle der Immunpräzipitation sowie zur Identifizierung der Lage der GAP-43 Bande wurden sowohl die Immunpräzipitate als auch Gesamtzellextrakte mit dem anti-GAP-43 Antikörper detektiert. Die Immunpräzipitation ohne Antikörper ergab auch in der Western-Blot Analyse kein Signal (Spur 8), während sich GAP-43 in den Immunpräzipitaten der PCC7-Mz1-Zellen sowie des Klons A3 nachweisen ließ (Spuren 9 und 10). Die in den Mz-GAP-43 Klonen vorliegende höhermolekulare Form von GAP-43 lief in der SDS-PAGE auf der gleichen Höhe wie die schwere Kette des für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers und wurde daher in der Western-Blot Analyse sowohl in PCC7-Mz1-Zellen als auch im Klon A3 detektiert. Dies konnte dadurch demonstriert werden, daß eine Immunpräzipitation ohne Zellextrakt durchgeführt wurde (Spur 7). Die schwere Immunglobulinkette von etwa 50 kDa lag auf der gleichen Höhe wie die obere GAP-43 Bande aus Gesamtzellextrakten des Mz-GAP-43 Klons A3 (Spur 11), während in PCC7-Mz1-Zellen nur die endogene GAP-43 Form auftrat (Spur 12).

Diese Experimente zeigen, daß weder endogenes GAP-43 Protein noch ektopisch überexprimiertes GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen glykosiliert wird.

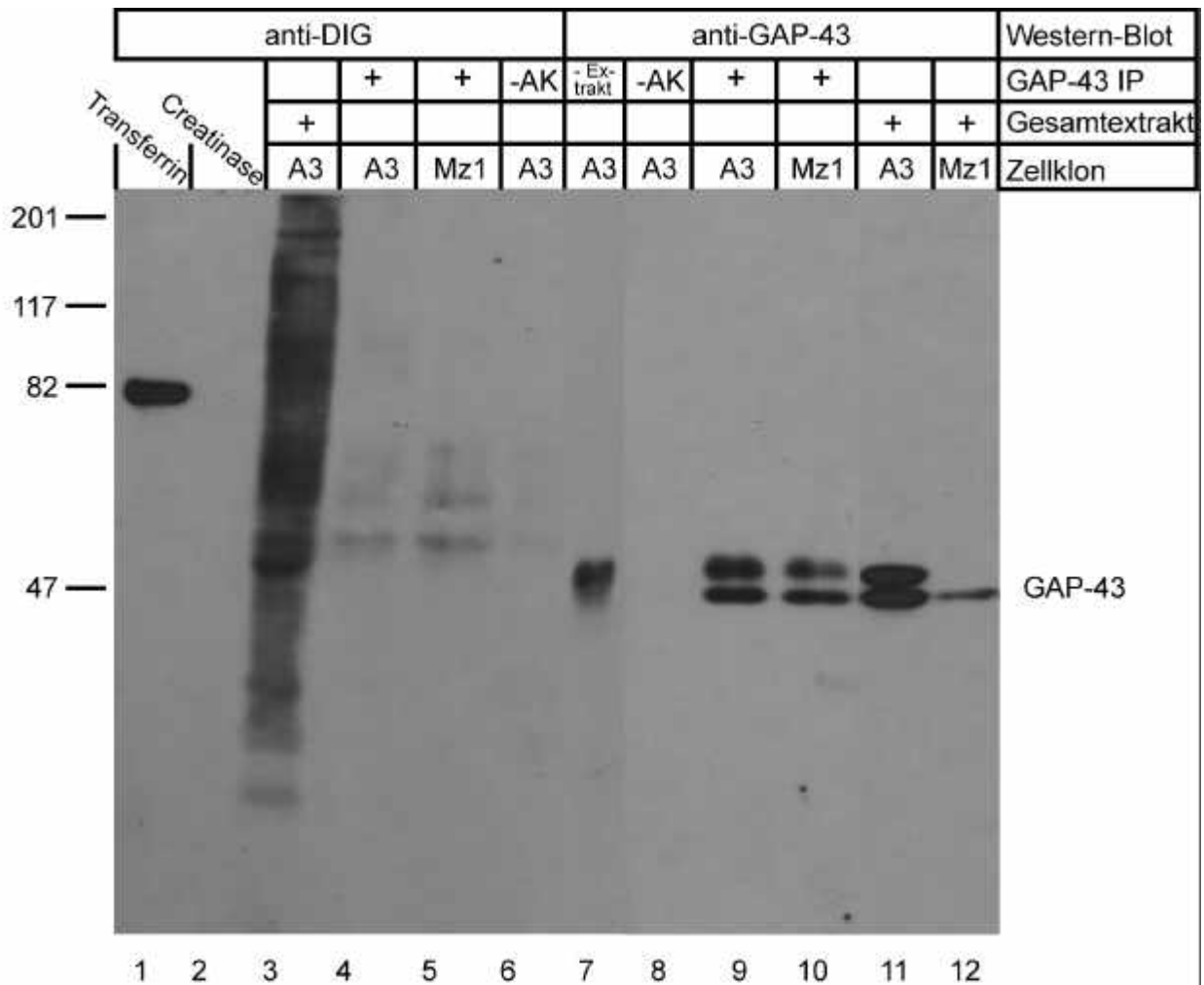


Abb. 16: GAP-43 ist kein Glykoprotein

Der Nachweis posttranslationaler Glykosilierungen von Proteinen erfolgte mittels des "DIG-Glycan-Detection-Kit" (Roche Biochemicals, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers (II 4.7). Von etwa 300 µg Gesamtzellextrakt von PCC7-Mz1-Zellen und von Zellen des Mz-GAP-43 Klon A3, die für 24 h mit RA behandelt worden waren (d1), wurden die Glykoproteine nach milder Oxidation der Alkoholgruppen der Zuckerseitenketten mit dem Hapten DIG markiert. GAP-43 wurde durch Immunpräzipitation (IP) mit dem anti-GAP-43-Antiserum angereichert. Eine anschließende Western-Blot Analyse mit einem anti-DIG-Antikörper zeigte kein spezifisches GAP-43 Signal (Spuren 4 und 5). Im Gesamtzellextrakt ließen sich dagegen viele Glykoproteine detektieren (Spur 3). Die im Kit enthaltene Positiv-Kontrolle Transferrin wies ein deutliches Signal auf (Spur 1), während die Negativ-Kontrolle Creatinase nicht von dem anti-DIG-Antikörper erkannt wurde (Spur 2). Zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurden die Präzipitate im Western-Blot mit dem anti-GAP-43-Antiserum analysiert. Immunpräzipitiertes GAP-43 war sowohl in PCC7-Mz1-Zellen (Spur 10) als auch im Mz-GAP-43 Klon A3 (Spur 9) nachweisbar, während die Immunpräzipitation ohne Antikörper (Spur 8) kein Signal ergab. Die schwere Kette (50 kDa) des für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers lief im SDS-Gel (10%) auf der gleichen Höhe wie die in den Mz-GAP-43 Klonen auftretende obere Bande (Spur 7). Desweiteren wurden die Zellextrakte nach der Markierungsreaktion direkt im Western-Blot mit dem anti-GAP-43-Antiserum detektiert (Spuren 11 und 12).

Glykosiliertes GAP-43 war weder in PCC7-Mz1-Zellen noch in den Mz-GAP-43 Klonen nachweisbar.

Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung des endogenen GAP-43 aus PCC7-Mz1-Zellen sowie des ektopisch exprimierten GAP-43 der Mz-GAP-43 Klone zeigten, daß beide Proteine die gleichen Eigenschaften aufwiesen, wodurch die Funktionalität des überexprimierten GAP-43 Proteins nachgewiesen wurde. Bezüglich der untersuchten Kriterien konnten keine Unterschiede zwischen den beiden GAP-43 Formen, die nach der Transfektion auftraten, festgestellt werden. Da beide Proteine von derselben cDNA abstammen, scheinen beide GAP-43 Formen funktionell zu sein.

1.4 GAP-43 interagiert mit Calmodulin

Zur weiteren Aufklärung von GAP-43 vermittelten Signaltransduktionswegen sollten mit GAP-43 interagierende Proteine identifiziert werden. Da bereits beschrieben wurde, daß GAP-43 Calmodulin *in vitro* binden kann (CIMLER *et al.*, 1985), sollte diese Interaktion auch *in vivo* gezeigt werden. Aufgrund der relativ schwachen Affinität zwischen GAP-43 und Calmodulin (ALEXANDER *et al.*, 1987) wurde ein Quervernetzer ("Cross-linking Reagenz") zum Nachweis einer Bindung zwischen GAP-43 und Calmodulin in PCC7-Mz1-Zellen eingesetzt. Durch die Behandlung von intakten Zellen mit dem homobifunktionalen Cross-linking Reagenz DSP (Dithiobis(succinimidylpropionat)), das aufgrund seiner lipophilen Struktur membrangängig ist, werden interagierende Proteine in der Zelle kovalent verbunden. Diese Proteinkomplexe können in Western-Blot Analysen unter nicht-reduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden.

PCC7-Mz1-Zellen des Differenzierungstages d2 wurden, wie unter II 4.8 beschrieben, mit DSP inkubiert, und anschließend wurde eine Fraktionierung der Zellen in eine Cytoplasma- und eine Membran-Fraktion durchgeführt. Abbildung 17 zeigt eine Western-Blot Analyse der extrahierten Proteine der Membran-Fraktion. Mit dem anti-GAP-43-Antiserum ließ sich in den Spuren 1-4 das native GAP-43 Protein mit einer molekularen Masse von etwa 43 kDa detektieren (Pfeil). Zusätzlich trat in der Spur 3 eine Bande mit einer Masse von etwa 70 kDa auf (Pfeilkopf). Es handelte sich hierbei um einen Komplex aus GAP-43 und Calmodulin, da mit einem anti-Calmodulin-Antikörper neben dem nativen Calmodulin Protein von etwa 17 kDa (Pfeil) eine Bande der gleichen Größe detektiert wurde (Spur 7), und da die addierten molekularen Massen von GAP-43 (43 kDa) und Calmodulin (17 kDa) in guter Übereinstimmung mit der gefundenen Größe von etwa 70 kDa lagen. Durch die Behandlung der Zellextrakte mit dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol wurden die Proteine des Komplexes dissoziiert und konnten weder mit dem anti-GAP-43-Antiserum (Spur 1) noch mit dem anti-Calmodulin-Antikörper (Spur 8) nachgewiesen werden. Dieser Komplex trat ebenfalls nicht auf, wenn die Zellen nur mit dem DSP-Lösungsmittel DMSO inkubiert wurden (Spuren 4 und 7). In den mit dem Cross-linking

Reagenz DSP behandelten Zellextrakt wurden von dem anti-Calmodulin-Antikörper neben dem nativen Calmodulin sowie dem Calmodulin-GAP-43 Komplex zwei weitere Banden mit den molekularen Massen von etwa 50 und 80 kDa nachgewiesen (Spuren 5 und 6). Dabei handelte es sich um weitere Calmodulin-Komplexe, da diese Banden in den Ansätzen, die nur mit dem Lösungsmittel DMSO (Spur 7) oder mit dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (Spur 8) inkubiert wurden, nicht auftraten. In der Cytoplasma-Fraktion konnten keine GAP-43-Calmodulin Komplexe nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

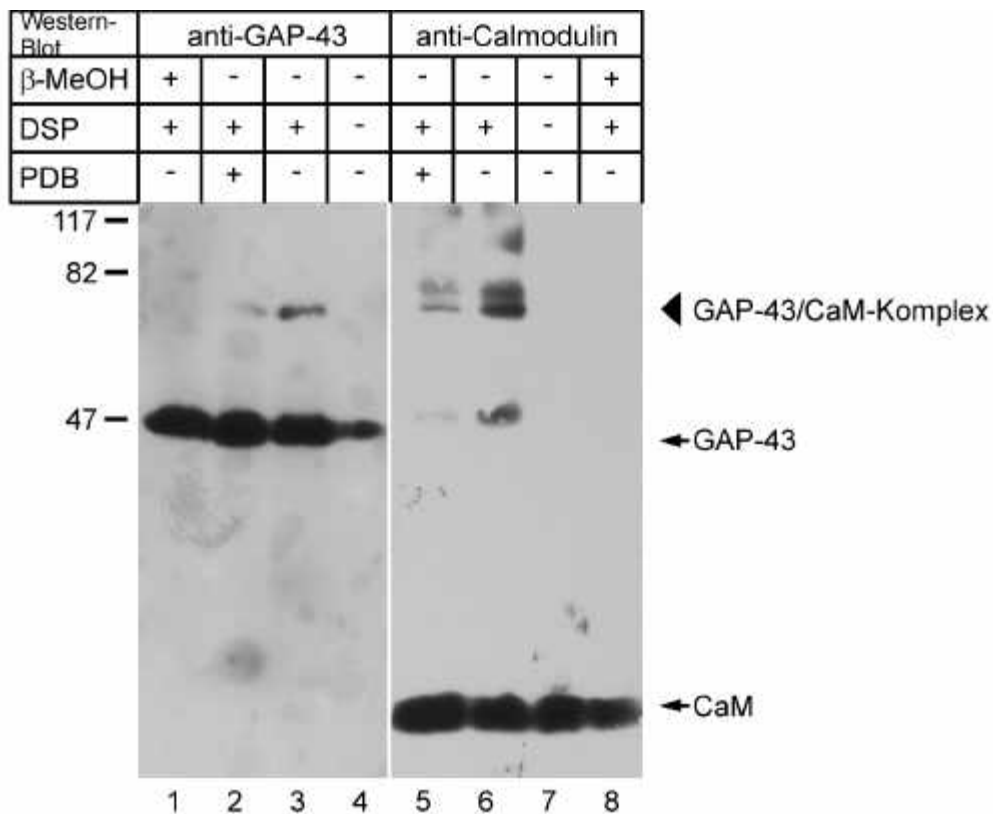


Abb. 17: Interaktion zwischen GAP-43 und Calmodulin in PCC7-Mz1-Zellen

Pro Ansatz wurde eine 10 cm-Schale PCC7-Mz1-Zellen vom Differenzierungstag d2 für 20 min. mit 200 nM PDB (PDB +) oder mit Puffer (PDB -) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 min. bei RT mit 1 mM des Cross-linking Reagenz DSP (DSP +) oder mit der entsprechenden Konzentration des Lösungsmittels DMSO (DSP -) inkubiert. Von den Zellen wurde dann eine Cytoplasma- und eine Membran-Fraktion hergestellt, und die Proteine der Membran-Fraktion wurden durch eine 12,5%-ige SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden (β -MeOH -) oder unter reduzierenden (β -MeOH +) Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte eine Western-Blot Analyse mit dem anti-GAP-43-Antiserum (Spuren 1-4) und einem anti-Calmodulin-Antikörper (Spuren 5-8). Zum Nachweis gebundener Antikörper wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt. Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben.

Natives GAP-43 (Spuren 1-4) sowie natives Calmodulin (Spuren 5-8) sind durch Pfeile markiert. Nach Behandlung mit DSP trat sowohl mit dem anti-GAP-43-Antiserum (Spur 3) als auch mit dem anti-Calmodulin-Antikörper (Spur 6) unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein identischer Komplex von etwa 70 kDa auf (Pfeilkopf). Dieser GAP-43/Calmodulin-Komplex nahm nach Phosphorylierung von GAP-43 durch PKC ab (Spuren 2 und 5).

Durch *in vitro*-Analysen konnte bereits gezeigt werden, daß die Affinität von GAP-43 für Calmodulin nach Phosphorylierung durch PKC stark reduziert wird (CHAPMAN *et al.*, 1991). Um zu demonstrieren, daß diese Regulation auch in intakten Zellen vorlag, wurden die PCC7-Mz1-Zellen vor der Behandlung mit dem Cross-linking Reagenz für 20 min. mit 200 nM PDB zur Aktivierung von PKC inkubiert. Die Phosphorylierung von GAP-43 durch PKC führte zu einer deutlichen Abnahme des 70 kDa großen GAP-43-Calmodulin Komplexes (Spuren 2 und 5), wodurch gezeigt werden konnte, daß die Bindung zwischen GAP-43 und Calmodulin durch PKC moduliert wurde. Zusätzlich waren auch die zwei weiteren Calmodulin-Komplexe von 50 und 80 kDa sensitiv gegenüber der PKC-Phosphorylierung, da die Intensitäten dieser Banden ebenfalls deutlich abnahmen (Spur 5).

Um zu untersuchen, ob das ektopisch exprimierte GAP-43 Protein bereits in Stammzellen Interaktionen mit Calmodulin eingeht und damit funktionell ist, wurden weitere Cross-linking Experimente mit den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 durchgeführt. Stammzellen der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 sowie von PCC7-Mz1-Zellen wurden mit dem Cross-linking Reagenz DSP behandelt und anschließend in eine Cytoplasma- und eine Membran-Fraktion aufgetrennt. In Abbildung 18 ist eine Western-Blot Analyse von den Proteinen der Membran-Fraktion mit dem anti-GAP-43-Antiserum sowie dem anti-Calmodulin-Antikörper dargestellt. Natives GAP-43 (43 kDa) (Pfeil) ließ sich in den Extrakten der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 (Spuren 3-6 und 15-18) als Doppelbande detektieren, während in PCC7-Mz1-Stammzellen – wie bereits beschrieben (III 1.1.3) - GAP-43 kaum nachweisbar war (Spuren 1, 2, 13, 14). Der Calmodulin-Antikörper erkannte in allen Extrakten natives, etwa 17 kDa großes Calmodulin (Spuren 7-12 und 19-24) (Pfeil). In den mit DSP inkubierten Extrakten der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 wurde sowohl mit dem anti-GAP-43-Antiserum (Spuren 3 und 5) als auch mit dem anti-Calmodulin-Antikörper (Spuren 9 und 11) eine Bande mit einer molekularen Masse von etwa 70 kDa detektiert. Hierbei handelte es sich um einen Komplex zwischen GAP-43 und Calmodulin, da diese Bande weder in den Ansätzen, die nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurden (Spuren 4, 6, 10, 12), noch in den Ansätzen, die mit dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol inkubiert wurden (Spuren 15-18 und 21-24), auftrat (siehe auch Abb. 17). In Stammzellen der PCC7-Mz1 Kultur war aufgrund der geringen GAP-43 Expression kein GAP-43 Komplex nachweisbar (Spur 1). Dagegen konnten sowohl in PCC7-Mz1-Zellen (Spur 7) als auch in den Mz-GAP-43 Klonen (Spuren 9 und 11) weitere Calmodulin-Komplexe mit molekularen Massen von etwa 50, 60 und 80 kDa detektiert werden.

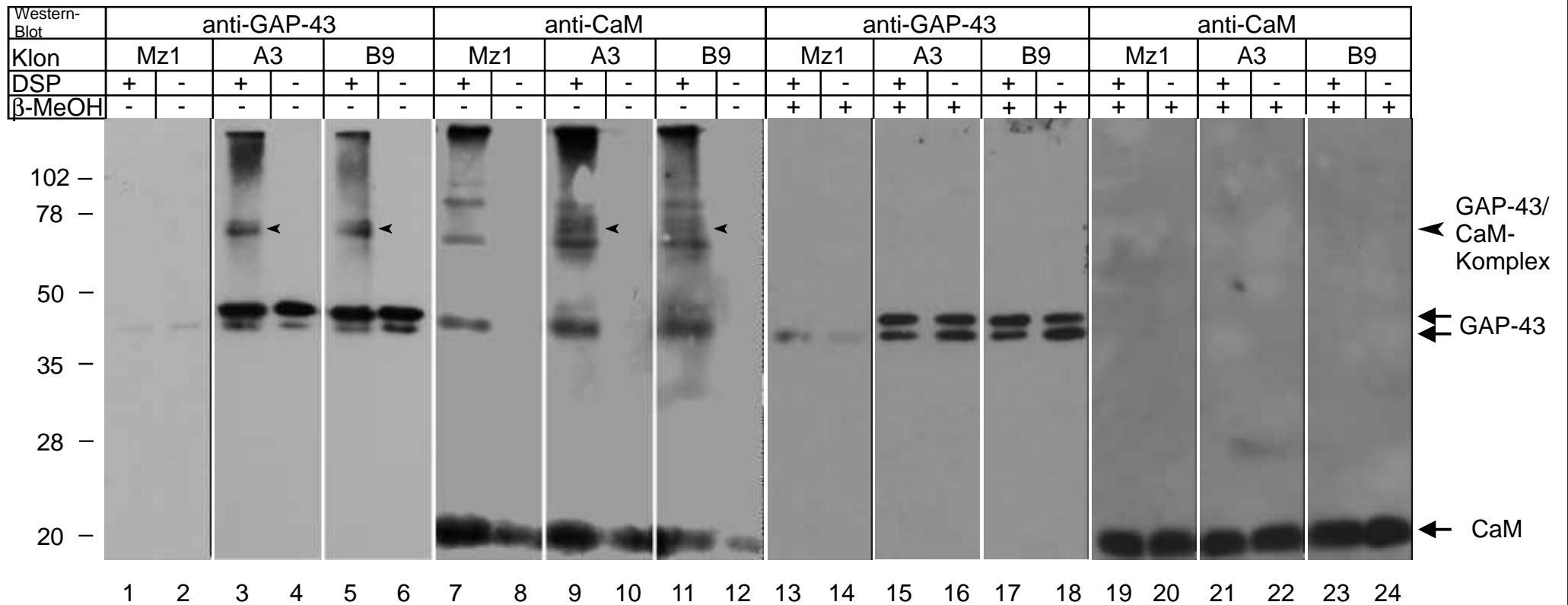


Abb. 18: Interaktion zwischen GAP-43 und Calmodulin in der Membran-Fraktion von Stammzellen der Mz-GAP-43 Klone

Stammzellen von PCC7-Mz1 sowie von den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 wurden für 15 min. bei RT mit 1 mM DSP (DSP +) oder mit der entsprechenden Konzentration des Lösungsmittels DMSO (DSP -) behandelt. Die extrahierten Proteine der Membran-Fraktion wurden unter nicht-reduzierenden (β -MeOH -) oder unter reduzierenden Bedingungen (β -MeOH +) durch eine 12,5%-ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es folgte eine Western-Blot Analyse mit dem anti-GAP-43-Antiserum sowie einem anti-Calmodulin-Antikörper. Gebundener Antikörper wurde durch eine Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Die relativen Molekulargewichte des Proteinstandards sind angegeben.

Die Pfeile markieren natives GAP-43 (43 kDa) (Spuren 1-6 und 13-18), das in den Mz-GAP-43 Klonen als Doppelbande auftrat, sowie natives Calmodulin (17 kDa) (Spuren 7-12 und 19-24). In den mit DSP behandelten Extrakten der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 wurde sowohl mit dem anti-GAP-43-Antiserum (Spuren 3 und 4) als auch mit dem anti-Calmodulin-Antikörper (Spuren 9 und 11) unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein Komplex von etwa 70 kDa detektiert (Pfeilkopf). Dieser GAP-43/Calmodulin-Komplex war nach Zugabe des Reduktionsmittels β -MeOH aufgelöst und konnte nicht in PCC7-Mz1-Zellen nachgewiesen werden.

β -MeOH: β -Mercaptoethanol DSP: Dithiobis(succinimidylpropionat) CaM: Calmodulin

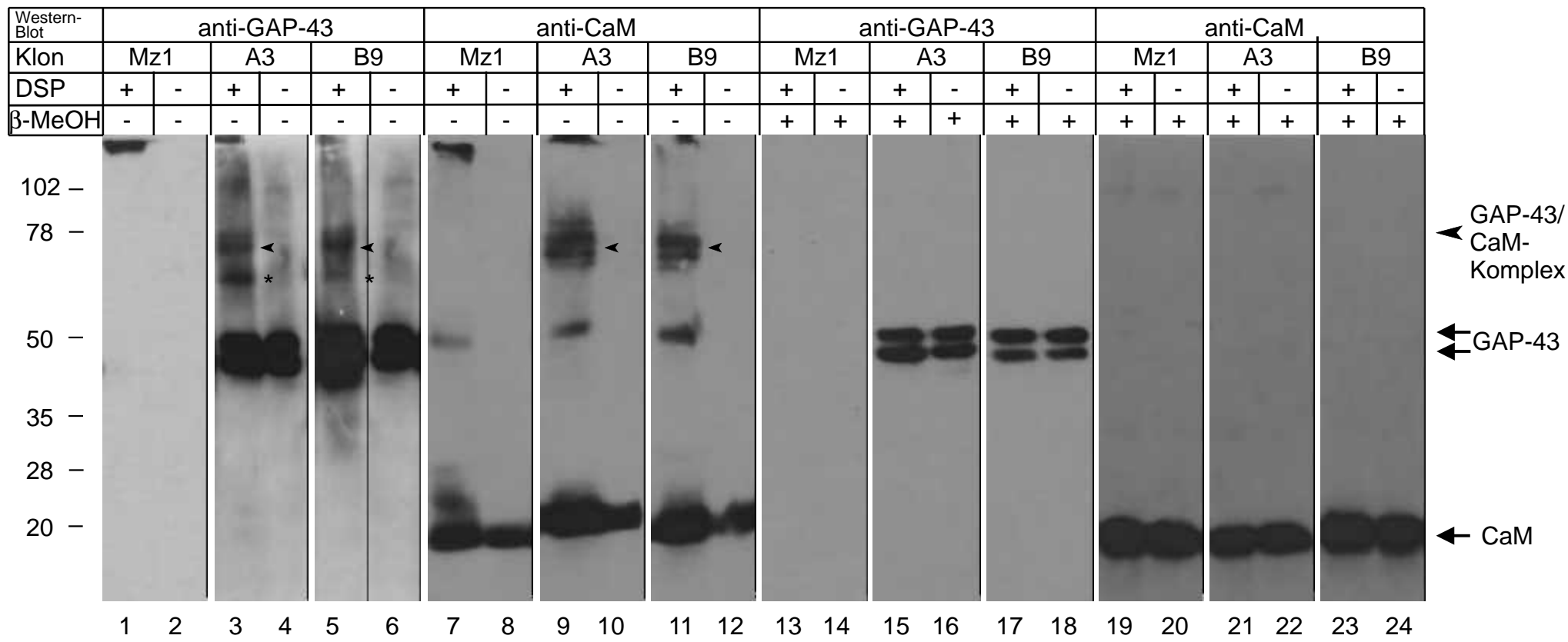


Abb. 19: Interaktion zwischen GAP-43 und Calmodulin in der Cytoplasma-Fraktion von Stammzellen der Mz-GAP-43 Klone
 Stammzellen von PCC7-Mz1 sowie von den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 wurden für 15 min. bei RT mit 1 mM DSP (DSP +) oder mit der entsprechenden Konzentration des Lösungsmittels DMSO (DSP -) behandelt. Die extrahierten Proteine der Cytoplasma-Fraktion wurden unter nicht-reduzierenden (β-MeOH -) oder unter reduzierenden Bedingungen (β-MeOH +) durch eine 12,5%-ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es folgte eine Western-Blot Analyse mit dem anti-GAP-43-Antiserum sowie einem anti-Calmodulin-Antikörper. Gebundener Antikörper wurde durch eine Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Die relativen Molekulargewichte des Proteinstandards sind angegeben.
 Die Pfeile markieren natives GAP-43 (43 kDa) (Spuren 1-6 und 13-18), das in den Mz-GAP-43 Klonen als Doppelbande auftrat, sowie natives Calmodulin (17 kDa) (Spuren 7-12 und 19-24). In den mit DSP behandelten Extrakten der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 wurde sowohl mit dem anti-GAP-43-Antiserum (Spuren 3 und 4) als auch mit dem anti-Calmodulin-Antikörper (Spuren 9 und 11) unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein Komplex von etwa 70 kDa detektiert (Pfeilkopf; siehe auch Abb. 18). Dieser GAP-43/Calmodulin-Komplex war nach Zugabe des Reduktionsmittels β-MeOH aufgelöst und konnte nicht in PCC7-Mz1-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich trat in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 ein weiterer, etwa 60 kDa großer Komplex von GAP-43 mit einem unbekanntem Protein auf (*).
 β-MeOH: β-Mercaptoethanol DSP: Dithiobis(succinimidylpropionat) CaM: Calmodulin

Auch in den Zellextrakten der Cytoplasma-Fraktion trat in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 ein Komplex zwischen GAP-43 und Calmodulin auf (Abb. 19). Dieser Komplex mit der molekularen Masse von etwa 70 kDa wurde nach Behandlung mit dem Cross-linking Reagenz DSP in den Spuren 3 und 5 mit dem anti-GAP-43-Antiserum und in den Spuren 9 und 11 mit dem anti-Calmodulin-Antikörper nachgewiesen (Pfeilkopf). Sowohl die Inkubation der Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO (Spuren 4, 6, 10, 12) als auch die Behandlung der Extrakte mit dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (Spuren 15-18 und 21-24) führte zur Auflösung des Komplexes. Natives GAP-43 (43 kDa) (Pfeil) war wiederum nur in den Mz-GAP-43 Klonen (Spuren 3-6 und 15-18) nicht aber in den PCC7-Mz1-Zellen (Spuren 1, 2, 13, 14) nachweisbar, wohingegen natives Calmodulin (17 kDa) (Pfeil) in allen Extrakten vorlag (Spuren 7-12 und 19-24). In den mit DSP behandelten Ansätzen der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 wurde mit dem anti-GAP-43-Antiserum unter nicht-reduzierenden Bedingungen neben dem GAP-43-Calmodulin Komplex ein weiterer Komplex zwischen GAP-43 und einem unbekanntem Protein identifiziert (*) (Spuren 3 und 5). Dieser Komplex besaß eine molekulare Masse von etwa 60 kDa und trat ebenfalls nicht in PCC7-Mz1-Zellen (Spur 1) auf. Auch mit dem Calmodulin-Antikörper konnten in PCC7-Mz1-Zellen und in Zellen der Mz-GAP-43 Klone weitere Komplexe mit einer Größe von etwa 50 sowie 80 kDa nachgewiesen werden.

Durch diese Experimente konnte somit gezeigt werden, daß ektopisch exprimiertes GAP-43 bereits in Stammzellen mit Calmodulin interagiert und dadurch Calmodulin-abhängige Signalwege beeinflussen kann. Zusätzlich bindet GAP-43 im Cytoplasma an ein weiteres, nicht-identifiziertes Protein.

1.5 Einfluß von GAP-43 auf die neurale Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen

1.5.1 Differenzierungspotential der Mz-GAP-43 Klone

Der Einfluß der Überexpression des GAP-43 Proteins in Stammzellen auf die durch RA induzierte neurale Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen wurde durch die Analyse des Differenzierungspotentials der erzeugten Mz-GAP-43 Klone bestimmt. Die Zellen der 6 isolierten Mz-GAP-43 Klone wurden auf Deckgläsern ausgesät und durch Zugabe von RA differenziert. Das während des Zeitverlaufs entstehende Differenzierungsbild der einzelnen Klone wurde mikroskopisch analysiert und mit dem der PCC7-Mz1-Zellen verglichen. Die Phänotypen der lebenden, unfixierten Kulturen wurden anhand der in der Einleitung beschriebenen morphologischen Merkmale den drei Subtypen der PCC7-Mz1-Zellen zugeordnet (I 3.1). Von den 6 erzeugten Klonen wiesen 4 das Differenzierungsbild eines N-Subtyps auf (Mz-GAP-43 B9, D1, F1, G3). Aus den Stammzellen dieser Klone entwickelten sich nach Zugabe von RA fast ausschließlich neuronale Zellen, die sich bereits ab d3 in einem über lange Ausläufer verbundenen Netzwerk organisierten. Bei der mikroskopischen Analyse der

Kulturen war auffällig, daß die Neurone trotz des Mangels an Zellen flacher Morphologie teilweise bis zum Differenzierungstag d8 überlebten. Die beiden anderen Mz-GAP-43 Klone (Mz-GAP-43 A3, G10) wurden als O-Phänotyp identifiziert. In diesen Kulturen entwickelten sich ebenfalls hauptsächlich Neurone, die von wenigen Zellen flacher Morphologie umgeben waren. Das entstandene neuronale Netzwerk dieser Klone war bis zum Differenzierungstag d8 stabil, wobei der Anteil flacher Derivate an der Gesamtkultur unter 10% betrug. Die Zuordnung der Mz-GAP-43 Klone zu den verschiedenen Subtypen wurde durch drei unabhängige Differenzierungen von Zellen unterschiedlicher Passagen reproduziert, wodurch gezeigt werden konnte, daß das Differenzierungspotential der Klone stabil war. In Abbildung 20 sind charakteristische Bilder von Stammzellen sowie von Zellen der Differenzierungszeitpunkte d3 und d6 der PCC7-Mz1-Zellen und der beiden Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 gegenübergestellt. Bei diesen Aufnahmen handelt es sich um vital photographierte Zellen. Während sich die Stammzellen der drei Kulturen (Mz1, A3, B9) morphologisch ähnlich waren, unterschied sich am Differenzierungstag d3 das Differenzierungsbild der PCC7-Mz1-Zellen bereits deutlich von dem der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9. In der PCC7-Mz1 Kultur wurden neben Neuronen (Pfeile) schon einige Zellen mit flacher Morphologie (Pfeilköpfe) identifiziert. Die Kulturen der Klone A3 und B9 enthielten dagegen nur neuronale Zellen (Pfeile), die über ihre Ausläufer miteinander verbunden waren. Noch deutlicher wurde dieser Unterschied im Differenzierungsverhalten an d6. In der PCC7-Mz1-Kultur lagen Neurone (Pfeile) auf einem konfluenten Rasen flacher Zellerivate. Die Neurone der Mz-GAP-43 Klone haben sich hauptsächlich in neuronalen Aggregaten, aus denen einzelne Neurite abgingen, zusammengelagert. Es traten jedoch auch vereinzelt liegende Neurone auf (Pfeile). Zudem konnten keine Derivate flacher Morphologie identifiziert werden. Diese morphologische Untersuchung des Differenzierungsverhaltens der Mz-GAP-43 Klone im Vergleich zu den PCC7-Mz1-Zellen lieferte demnach erste Hinweise auf eine mögliche Etablierung des neuronalen Phänotyps durch die Überexpression des GAP-43 Proteins. Um diese Aussage zu verifizieren, und um auszuschließen, daß die bevorzugte Entwicklung neuronaler Phänotypen durch klonale Selektion bedingt war, wurde die Verteilung der auftretenden Subklone der Mz-GAP-43 Klone mit den Phänotypen, die nach einer Subklonierung von PCC7-Mz1-Zellen entstanden, verglichen. Für diese sogenannte "mock" Transfektion wurden PCC7-Mz1-Zellen mit dem pcDNA3-SV40-Vektor ohne kodierendes Insert transfiziert. Die Transfektionsprozedur sowie die anschließende Subklonierung zur Erzeugung stabiler Einzelklone wurde genau wie mit dem pcDNA3-SV40-GAP-43 Vektor durchgeführt. Es wurden 21 Mz1-mock Klone erzeugt, deren Differenzierungspotential mikroskopisch beurteilt wurde. Nach 3 unabhängigen Differenzierungen wurden 13 Klone als P-Phänotyp identifiziert, während 3 Klone als N-Subtyp und 1 Klon als O-Subtyp charakterisiert wurden. 4 Klone konnten nicht differenziert werden, da

die Zellen dieser Kulturen innerhalb weniger Tage nach Behandlung mit RA vollständig abstarben.

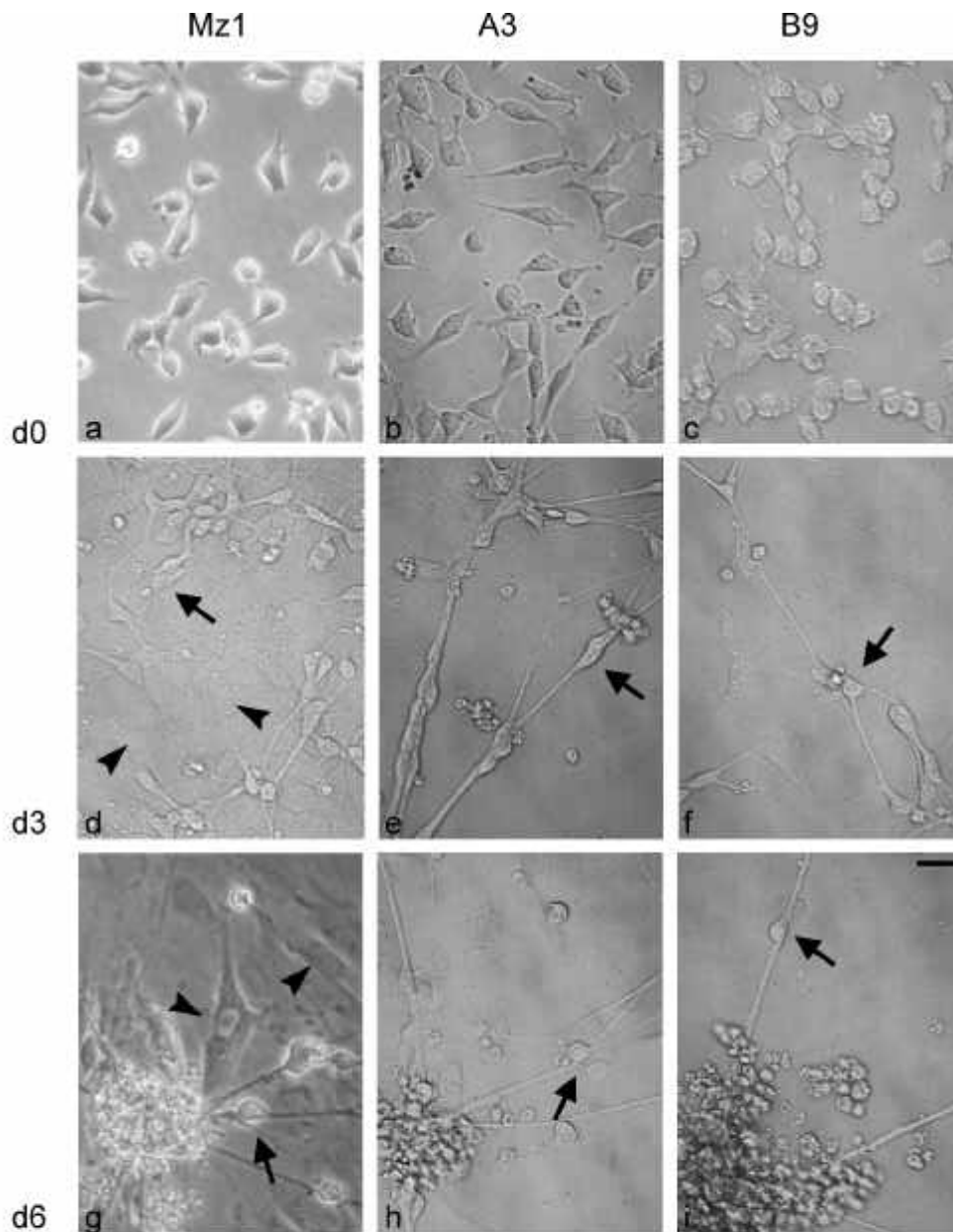


Abb. 20: Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen und Mz-GAP-43 Klonen

PCC7-Mz1-Zellen (a, d, g) sowie Zellen der Mz-GAP-43 Klone A3 (b, e, h) und B9 (c, f, i) wurden auf Deckgläsern mit den unter II 2.2 angegebenen Dichten ausgesät und mit RA differenziert. Die Kulturen wurden vital an d0 (a, b, c), an d3 (d, e, f) und an d6 (g, h, i) photographiert. Die Balkenlänge entspricht 62 μm . Die Pfeile weisen auf Neurone, während die Pfeilköpfe Zellen mit flacher Morphologie detektieren.

In den Kulturen der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 konnten keine Zellen flacher Morphologie identifiziert werden.

In Tabelle 7 ist die Verteilung der verschiedenen Subtypen in den Mz1-mock Klonen und in den Mz-GAP-43 Klonen dargestellt. Es wird deutlich, daß der P-Phänotyp nach der Subklonierung von PCC7-Mz1-Zellen der dominierende Subtyp war, während durch die Überexpression von GAP-43 ausschließlich die beiden neuronalen N- und O-Phänotypen entstanden, und kein Mz-GAP-43 Klon in den multipotenten P-Phänotyp differenzierte. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, daß GAP-43 in die Entstehung und Stabilisierung des neuronalen Phänotyps von PCC7-Mz1-Zellen involviert ist.

	P-Subtyp (Klone)	O-Subtyp (Klone)	N-Subtyp (Klone)	keine Differenzierung (Klone)
Mz-GAP-43 (n=6)	-	2	4	-
Mz-mock (n=21)	13	1	3	4

Tab. 7: Differenzierungspotential der Mz-GAP-43 sowie der Mz-mock Klone

1.5.2 Expression von Markermolekülen in Mz-GAP-43 Klonen

Zum weiteren Nachweis eines Einflusses von GAP-43 auf die neuronale Determinierung der PCC7-Mz1-Stammzellen wurde die Expression verschiedener Markermoleküle in den Mz-GAP-43 Klonen im Vergleich zu PCC7-Mz1-Zellen untersucht.

Die Expression des neuronalen Markers NF68, des Fibroblasten Markers Thy1.2 sowie des astroglialen Markers GFAP ("glial fibrillary acidic protein") wurde auf Transkript-Ebene analysiert. Dazu wurden Reverse Transkriptase-PCR Reaktionen mit Gesamt-RNA aus Stammzellen sowie aus Zellen der Differenzierungszeitpunkte d1 und d3 von PCC7-Mz1-Zellen und von den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 durchgeführt (Abb. 21). Die Expression des NF68-Transkripts war in allen drei Zelllinien gleich. Während sich in Stammzellen sowie in Zellen vom Differenzierungszeitpunkt d1 die NF68-mRNA kaum nachweisen ließ, wurde ihre Expression an d3 stark induziert. Deutliche Unterschiede im Expressionsmuster ergaben sich dagegen bei der Analyse von Thy1.2 und GFAP. Diese Marker für Fibroblasten bzw. Astroglia-Zellen konnten nur in PCC7-Mz1-Zellen detektiert werden. Das Transkript von Thy1.2 wurde nur in Zellen des Differenzierungszeitpunktes d3 gefunden, während die GFAP-mRNA sowohl in Stammzellen als auch in Zellen vom d1 und d3 nachgewiesen wurde. Zur Kontrolle gleicher Mengen eingesetzter RNA sowie zum Nachweis der Integrität der RNA wurden Reverse Transkriptase-PCR Reaktionen mit Primern für das ubiquitär exprimierte Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt. Die GAPDH-mRNA konnte in allen Ansätzen amplifiziert werden.

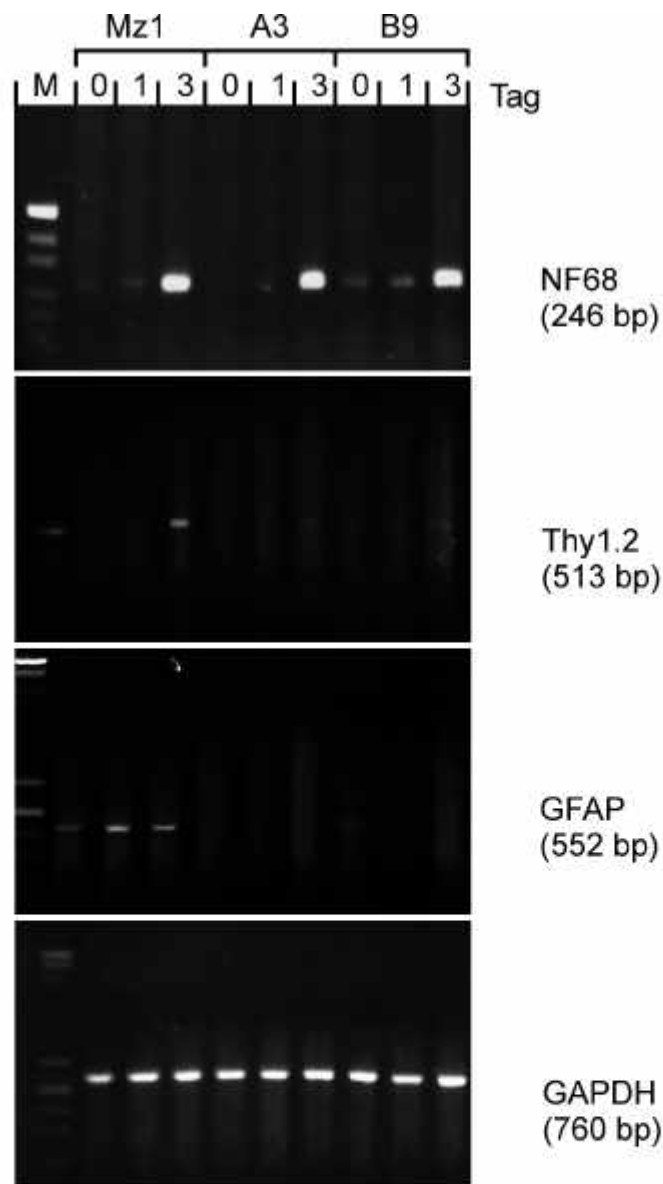


Abb. 21: Expression von Markermolekülen in PCC7-Mz1-Zellen und Mz-GAP-43 Klonen

Von PCC7-Mz1-Zellen sowie von den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 wurde von Stammzellen sowie von Zellen der Differenzierungszeitpunkte d1 und d3 Gesamt-RNA isoliert (II 3.5.1), und anschließend für Reverse Transkriptase Reaktionen (II 3.8.1) eingesetzt. Mit der erhaltenen cDNA wurden PCR-Analysen mit spezifischen Primern für den neuronalen Marker NF68, den Fibroblasten-Marker Thy1.2, den Marker für Astroglia-Zellen GFAP sowie für das ubiquitär exprimierte GAPDH-Gen durchgeführt. Die gewählten PCR-Bedingungen sind unter II 3.8.2 beschrieben. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf 1%-igen Agarosegelen aufgetrennt und unter UV-Licht nach Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Größen der PCR-Produkte entsprechen den von der Sequenz abgeleiteten Längen der einzelnen Gene.

In den Mz-GAP-43 Klonen konnten keine Transkripte für die Marker von Fibroblasten und Astroglia-Zellen nachgewiesen werden.

M: DNA-Längenstandard (II 3.1.1)

Es konnte somit gezeigt werden, daß die Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 im Gegensatz zu PCC7-Mz1-Zellen auf Transkript-Ebene keine Markermoleküle für Fibroblasten und Astroglia-Zellen exprimieren.

1.5.3 Reifung der Neurone der Mz-GAP-43 Klone

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob der Reifungsprozeß von Neuronen in Mz-GAP-43 Kulturen im Vergleich zu dem von PCC7-Mz1-Zellen durch die Überexpression des GAP-43 Proteins beschleunigt war. Analysen der Expression des neuronalen Clathrins, das ein Markerprotein für spätere neuronale Differenzierungsstadien der PCC7-Mz1-Zellen darstellt (OEHRLEIN-KARPI, 1998), konnten demonstrieren, daß das Protein während des RA-induzierten Differenzierungsverlaufs in den Mz-GAP-43 Klonen nicht früher als in PCC7-Mz1-Zellen auftrat (Abb. 22). Die Western-Blot Analysen zeigten, daß in allen drei Zelllinien an d0 und d1 keine Clathrin-Expression detektierbar war, während die Expression an d2 induziert wurde und an d3 weiter zunahm.

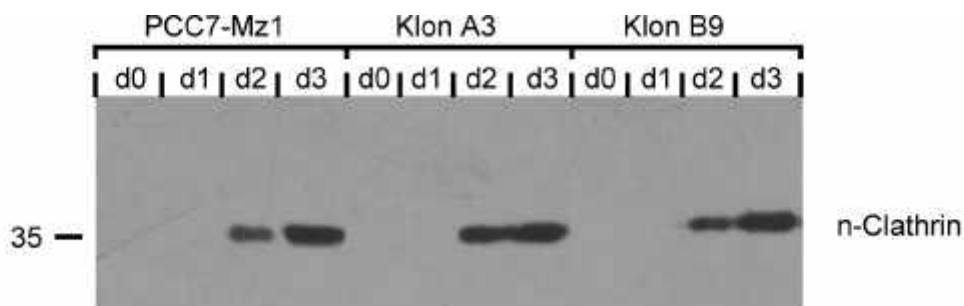


Abb. 22: Expression von neuronalem Clathrin in PCC7-Mz1-Zellen und Mz-GAP-43 Klonen

Von PCC7-Mz1-Zellen und von den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 wurden von Stammzellen sowie von Zellen der Differenzierungszeitpunkte d1, d2 und d3 Gesamtzell-extrakte hergestellt. Je 15 µg des extrahierten Proteins wurden durch eine 12,5%-ige SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem Antikörper gegen die leichte Kette des neuronalen Clathrins (n-Clathrin) inkubiert. Der Nachweis gebundenen Antikörpers erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 10 min.

Die Expression von neuronalem Clathrin wurde in allen drei Zelllinien an d2 induziert.

Als eine weitere Eigenschaft reifer Neurone wurde die Ausprägung von neuronaler Polarität untersucht. Polare Neurone sind in PCC7-Mz1-Zellen ab der zweiten Differenzierungswoche nachweisbar (BERGER *et al.*, 1997). Axonale Ausläufer können durch die Expression spezifischer Markerproteine wie Synaptophysin (BERGER *et al.*, 1997) und GAP-43 (ESDAR *et al.*, 1999a) von Dendriten, die für MAP2a/b positiv sind, unterschieden werden. Vor der Entwicklung von Polarität können die Markerproteine in allen Neuriten nachgewiesen werden. Durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen des axonspezifischen GAP-43 Proteins sowie des

somatodendritenspezifischen MAP2a/b Proteins wurde gezeigt, daß die Neurite der PCC7-Mz1-Zellen am Differenzierungstag d6 wie erwartet noch keine Polarität ausgebildet haben (Abb. 23 a, b). Beide Proteine konnten in beiden Ausläufern des Neurons nachgewiesen werden. Die Neurone der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 wiesen an d6 ebenfalls noch keine polare Verteilung der untersuchten Markerproteine GAP-43 und MAP2a/b auf, da jeweils beide Neurite für beide Markerproteine positiv waren (Abb. 23 d, e, g, h). Die Untersuchung von neuronaler Polarität in Mz-GAP-43 Klonen an späteren Differenzierungszeitpunkten konnte nicht durchgeführt werden, da sich die Neurone aufgrund des Fehlens der flachen Zellerivate zwischen Differenzierungstag d6 und d8 von der Wachstumsfläche ablösten. Die gezeigten Phasenkontrastaufnahmen verdeutlichen, daß in den Kulturen der Mz-GAP-43 Klone im Gegensatz zur PCC7-Mz1-Kultur keine Zellen flacher Morphologie auftraten (Abb. 23 c, f, i).

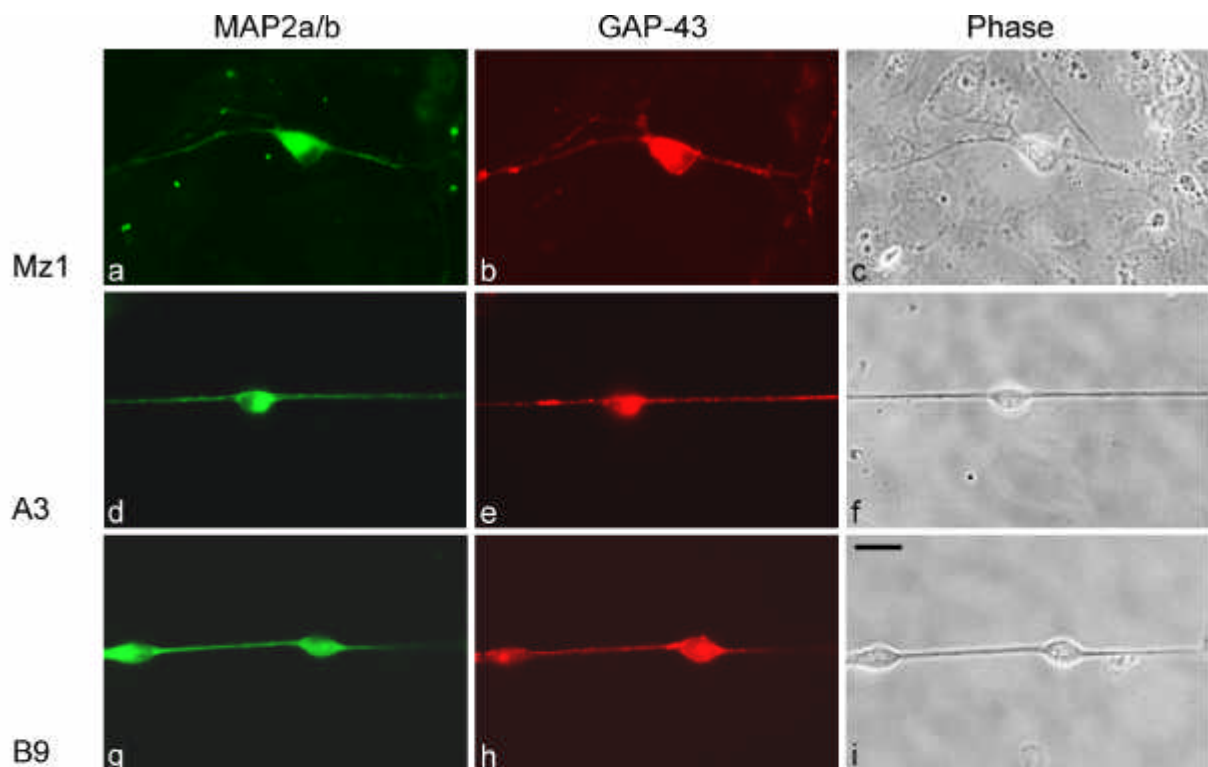


Abb. 23: Die Ausprägung von neuronaler Polarität ist in Mz-GAP-43 Klonen im Vergleich zu PCC7-Mz1-Zellen nicht beschleunigt

PCC7-Mz1-Zellen (a, b, c) sowie Zellen der Mz-GAP-43 Klone A3 (d, e, f) und B9 (g, h, i) wurden auf mit Laminin beschichteten Deckgläsern ausgesät, mit RA differenziert und am Differenzierungstag d6 fixiert. Es wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit dem dendritenspezifischen Markerprotein MAP2a/b (a, d, g) sowie dem axonspezifischen Markerprotein GAP-43 (b, e, h) durchgeführt. MAP2a/b wurde mit einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper (grüne Fluoreszenz) und GAP-43 wurde mit einem Cy3-markierten Zweitantikörper (rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen (c, f, i) sind jeweils rechts dargestellt. Die Balkenlänge entspricht 15,6 µm.

Die Neurone der Mz-GAP-43 Klone wiesen wie die der PCC7-Mz1-Zellen an d6 noch keine polare Verteilung der Markerproteine MAP2a/b und GAP-43 auf.

Die Überexpression von GAP-43 führte demnach nicht zu einer Beschleunigung des neuronalen Differenzierungsprozesses, da charakteristische Merkmale reifer Neurone wie die Expression von neuronalem Clathrin sowie die Ausprägung von Polarität in Mz-GAP-43 Klonen nicht früher als in PCC7-Mz1-Zellen auftraten.

1.5.4 Expression des Transkriptionsfaktors NCNF in den Mz-GAP-43 Klonen

Arbeiten von Herrn Dr. S. Schneider-Hirsch sowie Frau Dr. U.-M. Bauer zeigten, daß die Expression des Transkriptionsfaktors NCNF ("neuronal cell nuclear factor") in PCC7-Mz1-Zellen innerhalb von 6 h nach Behandlung mit RA induziert wird (SCHNEIDER-HIRSCH, 1996). NCNF wird ausschließlich in Neuronen exprimiert, was auf eine mögliche Funktion für neuronale Differenzierungsprozesse der PCC7-Mz1-Zellen hinweist (BAUER *et al.*, 1997). Um zu analysieren, ob NCNF möglicherweise in die Determinierung des neuronalen Phänotyps der Mz-GAP-43 Klone involviert ist, wurde die Expression dieses Transkriptionsfaktors in den PCC7-Mz1-Zellen sowie in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 auf Transkript-Ebene untersucht. Northern-Blot Analysen wurden mit einer 1,6 kb langen NCNF-Sonde, die über *HindIII* aus dem pBS-NCNF-Vektor (BAUER *et al.*, 1997) ausgeschnitten wurde, von Gesamt-RNA aus Stammzellen sowie aus Zellen der Differenzierungszeitpunkte d1 und d3 durchgeführt (Abb. 24). Während die 7,5 kb große mRNA von NCNF in den Stammzellen aller drei Zelllinien nicht nachweisbar war, wurde ihre Expression 24 h nach Behandlung mit RA induziert. Zusätzlich ließ sich in den Mz-GAP-43 Klonen A3 und B9 an allen drei untersuchten Zeitpunkten ein kürzeres NCNF-Transkript von etwa 2,3 kb detektieren, das in PCC7-Mz1-Zellen nicht auftrat. Die Expression dieser kleineren NCNF mRNA wurde bisher nur in Testis-Gewebe gefunden, wo sie durch differentielles Spleißen des 3'-nicht-translatierten Bereichs entstehen soll (BAUER *et al.*, 1998). Die besonders starke Expression der kürzeren NCNF mRNA in den Stammzellen (d0) der Mz-GAP-43 Klone läßt eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Etablierung des neuronalen Phänotyps vermuten.

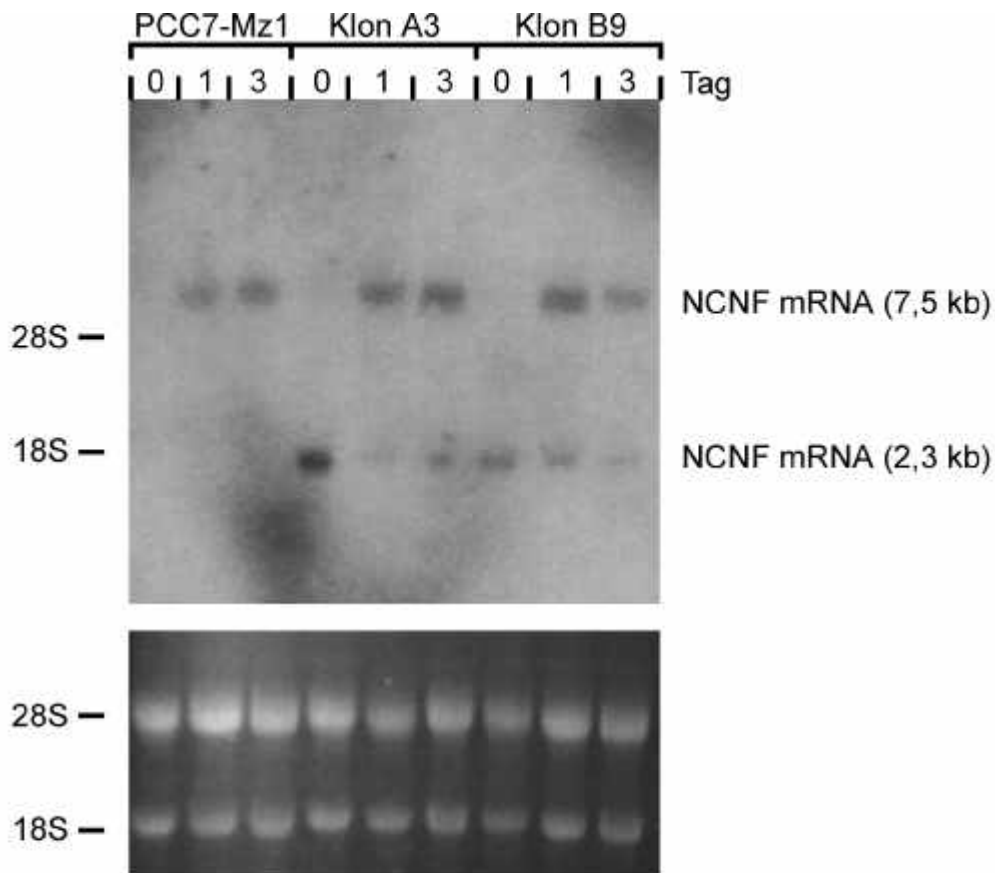


Abb. 24: Expression von NCNF in PCC7-Mz1-Zellen und in den Mz-GAP-43 Klonen

Von PCC7-Mz1-Zellen und von Zellen der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 wurde aus Stammzellen sowie aus Zellen der Differenzierungszeitpunkte d1 und d3 Gesamt-RNA isoliert. Je 5 µg wurden auf einem 1,2%-igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Hybond N-Membran transferiert und mit einer [³²P]-markierten NCNF-Sonde hybridisiert. Die Autoradiographie erfolgte für 3 Tage mit Verstärkerfolie bei -80°C auf einem Kodak X-OMAT AR Film.

Während in PCC7-Mz1-Zellen nur die 7,5 kb große mRNA von NCNF auftrat, konnte in den Mz-GAP-43 Klonen sowohl die 7,5 kb große mRNA als auch die 2,3 kb große mRNA von NCNF nachgewiesen werden.

Zum Nachweis gleicher RNA-Mengen sind im unteren Teil der Abbildung die mit Ethidiumbromid angefärbten ribosomalen RNAs (28S und 18S) des entsprechenden Gels gezeigt.

1.5.5 Mz-GAP-43 Klone werden durch Laminin nicht in den P-Phänotyp revertiert

Wie bereits beschrieben, konnten durch Subklonierungen der PCC7-Mz1-Zellen sogenannte MzN-Klone isoliert werden, die ausschließlich in neuronale Derivate differenzieren (LANG *et al.*, 1989). Da die MzN-Zellen nach Differenzierung auf Laminin-beschichteten Wachstumsflächen jedoch neben neuronalen auch gliale und fibroblastoide Phänotypen produzieren, scheinen sie nicht vollständig auf ein neuronales Zellschicksal festgelegt worden zu sein. Die MzN-Zellen sind daher vermutlich nur stärker für den neuronalen Differenzierungsweg determiniert als die parentalen PCC7-Mz1-Zellen. Durch die Arbeiten von Frau Dr. R. Jostock konnte zudem gezeigt werden, daß MzN-Klone nur bis zum Differenzierungstag d2 in den P-Phänotyp

revertiert werden können (JOSTOCK *et al.*, 1998). Es sollte daher untersucht werden, ob die in dieser Arbeit etablierten Mz-GAP-43 Klone, die ebenfalls ausschließlich in neuronale Derivate differenzieren, durch Wachstum auf Laminin in P-Phänotypen revertiert werden können. Dazu wurden Zellen der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 auf Laminin-beschichteten Deckgläsern ausgesät und mit RA differenziert. Parallel wurden PCC7-Mz1-Zellen sowie Zellen des MzN-GFP Klons, der durch Subklonierung aus den PCC7-Mz1-Zellen hervorgegangen ist und stabil mit Reporter-gen GFP transfiziert ist (JOSTOCK *et al.*, 1998), eingesetzt. Die Zellen wurden am Differenzierungstag d6 fixiert und durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurde untersucht, ob Laminin einen Einfluß auf die entstehenden Zelltypen besitzt. Zur Identifizierung neuronaler Zellen wurde die Expression des neuronenspezifischen GAP-43 analysiert, während Thy1.2 als Marker für Fibroblasten und GFAP ("glial fibrillary acidic protein") als Marker für Astroglia-Zellen diente. Die PCC7-Mz1-Kultur enthielt sowohl GAP-43 positive Neurone als auch Fibroblasten, die durch das Thy1.2 Antigen angefärbt wurden (Abb. 25 a) und Astroglia-Zellen, die durch die GFAP-Expression identifiziert wurden (Abb. 25 b). Das Differenzierungsbild der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 wies dagegen nur Zellen neuronaler Morphologie, die durch die Expression von GAP-43 gekennzeichnet waren, auf (Abb. 25 c-f). Es konnten keine Zellen, die positiv für die Markerproteine der Fibroblasten und Astroglia-Zellen waren, nachgewiesen werden. Laminin scheint demnach in den Mz-GAP-43 Klonen keinen Einfluß auf das Differenzierungspotential auszuüben. Im Gegensatz dazu wurde der MzN-GFP Klon durch die Differenzierung auf Laminin-beschichteten Wachstumsflächen in den P-Phänotyp revertiert. Am Differenzierungstag d6 wurden neben den GAP-43 exprimierenden Neuronen auch Thy1.2 positive Fibroblasten (Abb. 25 g) und GFAP positive Astroglia-Zellen (Abb. 25 h) nachgewiesen. Die Ergebnisse dieses Experiments weisen darauf hin, daß die PCC7-Mz1-Zellen durch die Überexpression von GAP-43 weiter auf das neuronale Zellschicksal vorgeprägt worden sind als MzN-Klone, die durch Subklonierung aus PCC7-Mz1-Zellen hervorgegangen sind. Dieses Ergebnis konnte dadurch verifiziert werden, daß die Mz-GAP-43 Kulturen auch nach Behandlung mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF-2 keine Fibroblasten und Astroglia-Zellen aufwiesen (Daten nicht gezeigt), während das Differenzierungspotential der MzN-Klone durch FGF-2 in den P-Phänotyp revertiert werden kann (JOSTOCK *et al.*, 1998).

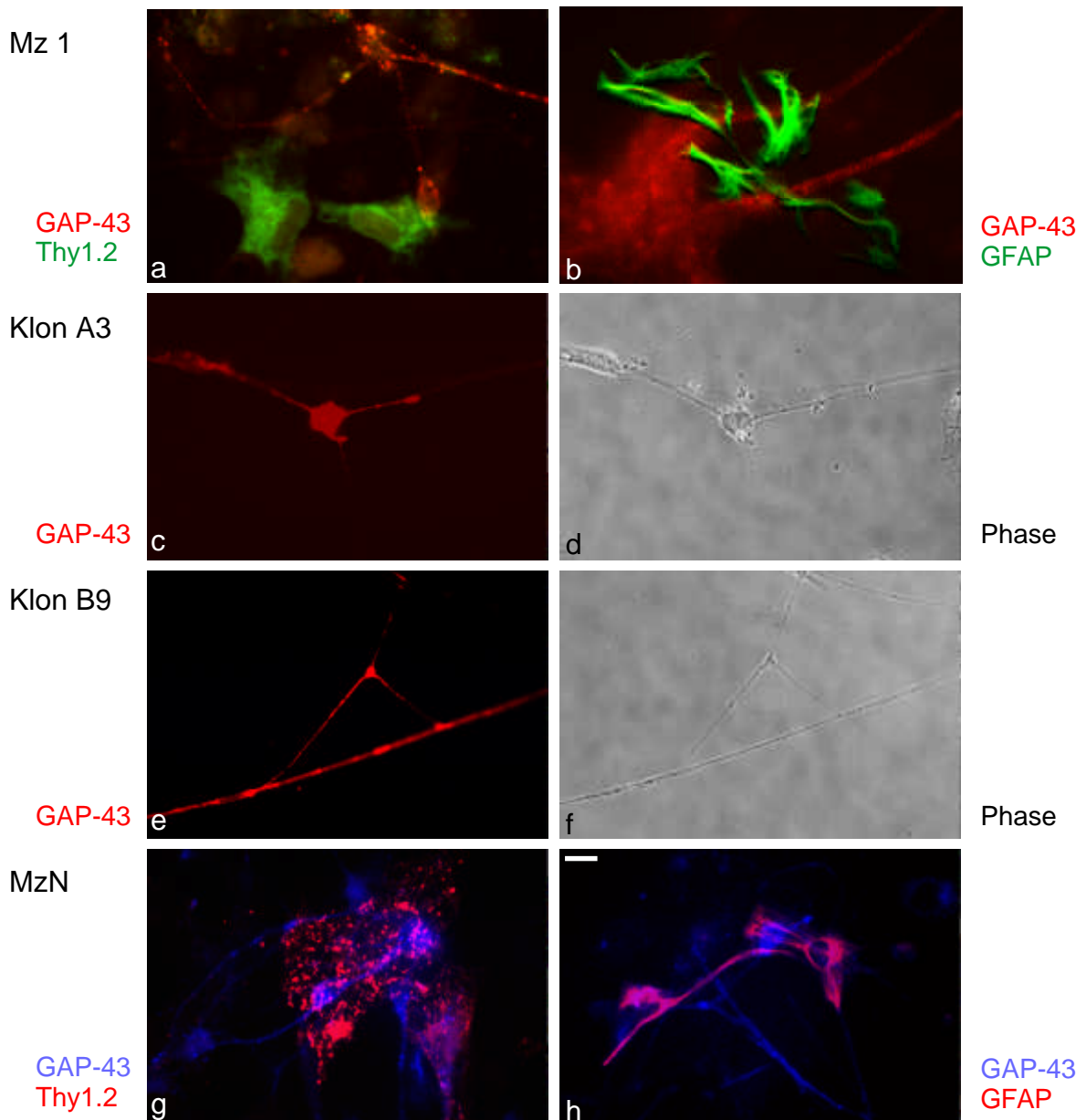


Abb. 25: Einfluß von Laminin auf die neurale Differenzierung

PCC7-Mz1-Zellen (a, b), Zellen der Mz-GAP-43 Klone A3 (c, d) und B9 (e, f) sowie Zellen des MzN-GFP Klons (g, h) wurden auf mit Laminin-beschichteten Deckgläsern ausgesät, mit RA differenziert und am Differenzierungstag d6 fixiert. Es wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit dem neuronenspezifischen Markerprotein GAP-43 sowie dem Fibroblasten-Marker Thy1.2 bzw. dem Markerprotein für Astroglia-Zellen GFAP durchgeführt. Die Balkenlänge entspricht 15,6 µm.

a:	anti-GAP-43	anti-Kaninchen-Cy3	rote Fluoreszenz
	anti-Thy1.2	anti-Ratte-FITC	grüne Fluoreszenz
b:	anti-GAP-43	anti-Kaninchen-Cy3	rote Fluoreszenz
	anti-GFAP	anti-Maus-FITC	grüne Fluoreszenz
c:	anti-GAP-43	anti-Kaninchen-Cy3	rote Fluoreszenz
d:	Phase		
e:	anti-GAP-43	anti-Kaninchen-Cy3	rote Fluoreszenz
f:	Phase		
g:	anti-GAP-43	anti-Kaninchen-AMCA	blaue Fluoreszenz
	anti-Thy1.2	anti-Ratte-Cy3	rote Fluoreszenz
h:	anti-GAP-43	anti-Kaninchen-AMCA	blaue Fluoreszenz
	anti-GFAP	anti-Maus-Cy3	rote Fluoreszenz

In den Kulturen der auf Laminin differenzierten Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 konnten keine Fibroblasten und Astroglia-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen diese Zelltypen in PCC7-Mz1-Zellen und im MzN-GFP Klon identifiziert wurden.

2. Einfluß von Bcl-2 auf die RA-induzierte Differenzierung und Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen

2.1 Expression von Bcl-2 in PCC7-Mz1-Zellen

Da aus dem Expressionsmuster eines Proteins Rückschlüsse auf seine mögliche Funktion gezogen werden können, wurde zunächst die Expression von Bcl-2 während des Differenzierungsprozesses der PCC7-Mz1-Zellen analysiert. Durch Northern-Blot Analysen konnte bereits gezeigt werden, daß die *bcl-2* mRNA während des Differenzierungsverlaufs in den PCC7-Mz1-Zellen hochreguliert wird (SPECHT, 1996). Dieses Ergebnis wurde durch Western-Blot Analysen auf Protein-Ebene verifiziert (Abb. 26). In Detergenz-löslichen Gesamtzellextrakten aus proliferierenden Stammzellen sowie aus Zellen 1, 4, 8 und 12 Tage nach Behandlung mit RA wurde mit einem anti-Bcl-2-Antikörper eine Bande mit einer molekularen Masse von etwa 28 kDa detektiert. Das gefundene Molekulargewicht befindet sich in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Werten (HOCKENBERRY *et al.*, 1990). Während in PCC7-Mz1-Stammzellen sowie 24 h nach RA-Behandlung (d1) eine schwache Bcl-2 Expression nachweisbar war, nahm die Menge an Bcl-2 in den differenzierten Zellen ab d4 zu.

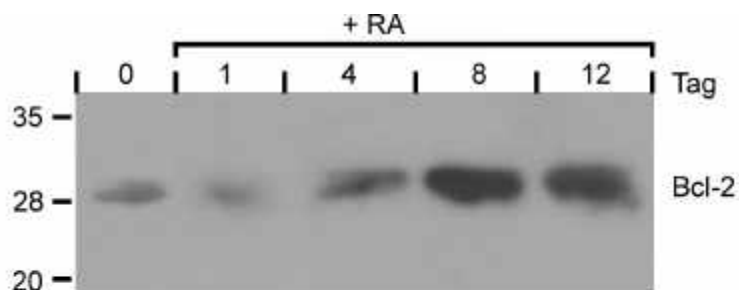


Abb. 26: Expression von Bcl-2 während der RA-induzierten Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen

Je 15 µg Protein aus Gesamtzellextrakten von PCC7-Mz1-Stammzellen (d0) sowie von Zellen, die für 1, 4, 8 und 12 Tage mit RA behandelt worden waren, wurden durch eine 15%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, und Bcl-2 wurde mit einem Antikörper detektiert. Der Nachweis gebundenen Antikörpers erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 5 min. Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben.

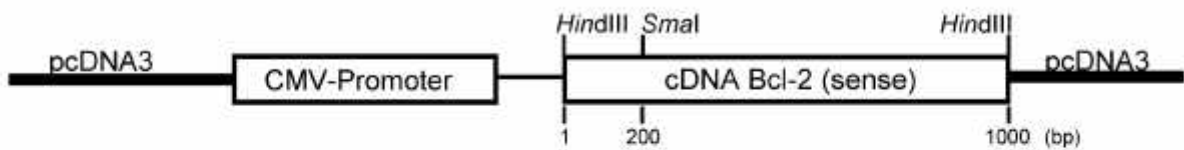
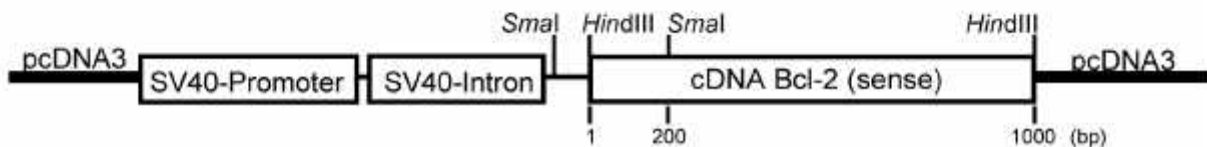
Die Expression von Bcl-2 nahm während des Differenzierungsverlaufs von PCC7-Mz1-Zellen zu.

2.2 Herstellung und Charakterisierung stabil transfizierter Mz-Bcl-2 Klone

Nachdem gezeigt werden konnte, daß das Bcl-2 Protein in den PCC7-Mz1-Zellen exprimiert wird, sollte seine Funktion in diesen Zellen untersucht werden. Zur Charakterisierung der Funktion eines Proteins in der Zellkultur gibt es zwei experimentelle Ansätze: Man kann die endogene Proteinexpression entweder erniedrigen (z.B. durch antisense-Techniken) oder aber erhöhen. Aufgrund der geringen Bcl-2 Expression in den Stammzellen wurde die Methode der Überexpression mittels Transfektion eines eukaryontischen Expressionsvektors gewählt. Aus früheren Arbeiten unserer Abteilung war bereits bekannt, daß transiente Transfektionen von PCC7-Mz1-Zellen auch nach optimierten Bedingungen nur zu sehr geringen Effizienzen von etwa 1 - 10% transfizierter Zellen führen (JOSTOCK, 1997; BAUER, 1997; OEHRLEIN-KARPI, 1998). Es sollten daher stabil transfizierte Mz-Bcl-2 Klone erzeugt werden, um für zellbiologische sowie biochemische Analysen genetisch identische Kulturen in ausreichender Menge und in reproduzierbarer Qualität zu erhalten.

2.2.1 Klonierung des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3-SV40-Bcl-2

Von Herrn Dr. J. Boise (Universität Lleida, Spanien) haben wir freundlicherweise den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3-Bcl-2 erhalten. Die humane bcl-2 cDNA wurde über die Schnittstelle *HindIII* in diesen Vektor kloniert und steht unter der Kontrolle des CMV-Promoters (Abb. 27 A). Da durch frühere Arbeiten gezeigt werden konnte, daß der CMV-Promoter in PCC7-Mz1-Zellen gegenüber dem SV40-Promoter nur zu geringen Expressionen führt (JOSTOCK, 1997), wurde die bcl-2 cDNA aus dem Ursprungsvektor ausgeschnitten und über die *HindIII* Schnittstelle in den pcDNA3-SV40-Vektor kloniert (Abb. 27 B). Der Aufbau des pcDNA3-SV40-Expressionsvektors wurde bereits dargestellt (III 1.2.1). Da bei der gewählten Klonierungsstrategie über eine Schnittstelle die bcl-2 cDNA sowohl in sense- als auch in antisense-Orientierung in den Vektor eingefügt werden konnte, mußten die erhaltenen Klone durch asymmetrische Restriktionsanalyse charakterisiert werden. Durch Restriktion mit dem Enzym *SmaI*, das eine Schnittstelle im bcl-2 Insert erkennt, konnte die Orientierung bestimmt werden (Abb. 27 B). Etwa 70% der getesteten Klone hatten die bcl-2 cDNA in sense-Richtung inseriert, während in den restlichen 30% die antisense-Orientierung vorlag.

A pcDNA3-Bcl-2**B pcDNA3-SV40-Bcl-2****Abb. 27: Struktur des pcDNA3-Bcl-2 Vektors und des pcDNA3-SV40-Bcl-2 Vektors****A pcDNA3-Bcl-2 Vektor**

Im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3-Bcl-2, den wir freundlicherweise von Herrn Dr. J. Boise (Universität Lleida, Spanien) erhalten haben, wurde die etwa 1000 bp große *bcl-2* cDNA über die *Hind*III Restriktionsschnittstelle in den pcDNA3-Vektor inkloniert. Die Transkription von *Bcl-2* wird durch die Aktivität des CMV-Promoters kontrolliert.

B pcDNA3-SV40-Bcl-2 Vektor

Die *bcl-2* cDNA wurde mittels des Restriktionsenzym *Hind*III aus dem pcDNA3-Bcl-2 Vektor ausgeschnitten und über die gleiche Restriktionsschnittstelle in den pcDNA3-SV40 Vektor inkloniert. Bei diesem Vektor ist der CMV-Promoter durch den SV40-Promoter ersetzt worden. Die Orientierung des *bcl-2* Inserts konnte unter Verwendung des Enzyms *Sma*I, das eine Schnittstelle in der *bcl-2* cDNA erkennt, bestimmt werden.

2.2.2 Stabile Transfektion von Bcl-2 in PCC7-Mz1-Zellen

Da in dieser Arbeit apoptotische Prozesse untersucht werden sollten, mußten die Transfektionsbedingungen möglichst schonend und stressfrei für die Zellen sein, um eine durch die Transfektionsprozedur bedingte Selektion der Zellen zu vermeiden. Daher wurde die Transfektion von auf Laminin gewachsenen PCC7-Mz1-Zellen durch Lipofektion mit Escort™ durchgeführt (II 2.9; III 1.2.3). Es wurde sowohl der pcDNA3-Bcl-2 (CMV-Promoter) als auch der pcDNA3-SV40-Bcl-2-Vektor (SV40-Promoter) verwendet. Um auf stabil transfizierte Zellen zu selektionieren, wurde das Antibiotikum G418 zugesetzt, und stabile Einzelklone wurden durch eine limitierte Verdünnung in 96 Loch-Mikrotiterplatten isoliert (DAVIES, 1994). Von einer 96 Loch-Mikrotiterplatte konnten etwa 30 Klone gewonnen werden. Der Nachweis der Überexpression von *Bcl-2* erfolgte durch Westen-Blot Analysen (Abb. 28 A). Die *Bcl-2* Expression in Stammzellen der erhaltenen Klone wurde mit der Expression in PCC7-Mz1-Stammzellen verglichen, wodurch sich deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke

erkennen ließen. Durch densitometrische Quantifizierung der Intensität der Bcl-2 Bande konnte eine Aussage über die Höhe der Bcl-2 Expression getroffen werden. Klone, die eine mehr als zweifache Expression von Bcl-2 im Vergleich zu nicht-transfizierten PCC7-Mz1-Zellen aufwiesen, wurden als positiv bewertet. Neben dem Western-Blot ist die nach der Immundetektion mit Coomassie-Blau gefärbte Membran gezeigt, um zu demonstrieren, daß vergleichbare Mengen an Gesamtprotein aufgetragen wurden (Abb. 28 B).

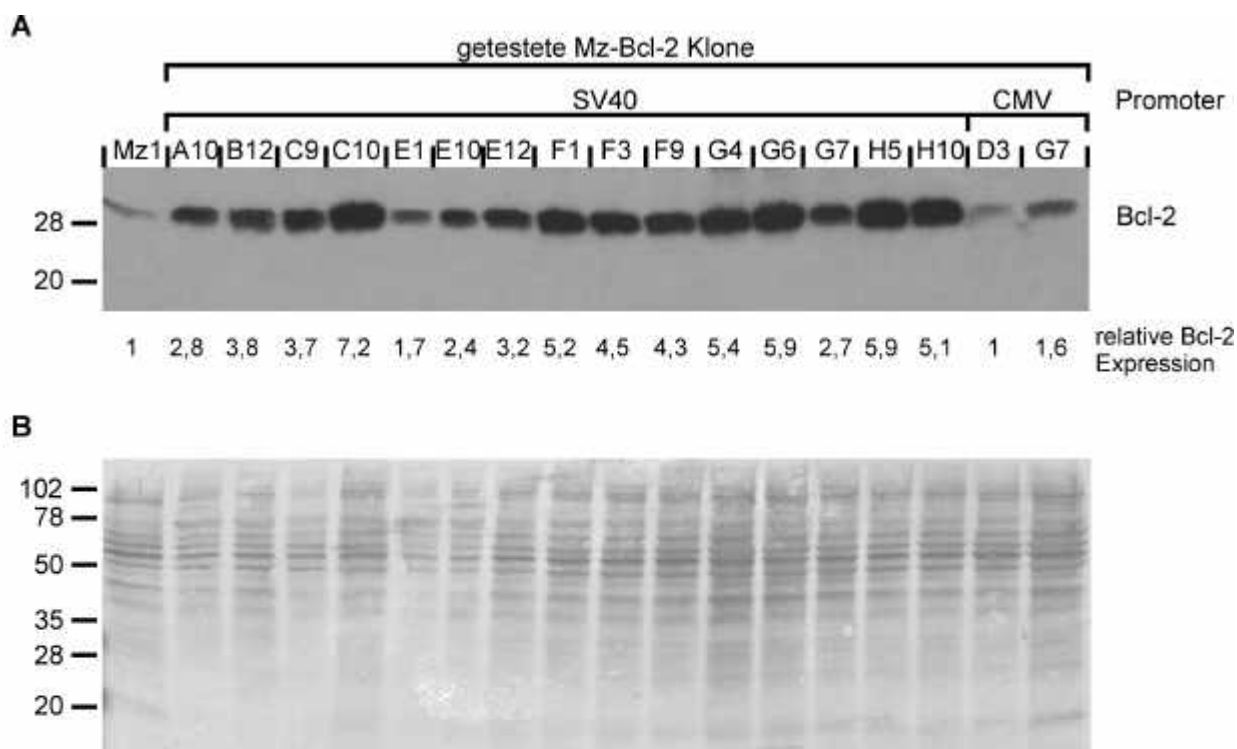


Abb. 5: Bcl-2 Expression in Stammzellen der isolierten Mz-Bcl-2 Klone

A Je 15 µg Protein aus Gesamtzellextrakten von PCC7-Mz1-Stammzellen sowie von 17 der generierten Mz-Bcl-2 Klone wurden, wie unter II 4.1 beschrieben, durch eine 15%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem anti-Bcl-2-Antikörper detektiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion und anschließende Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 10 min. Die relativen Molekulargewichte des Proteinstandards sind angegeben. Die Bcl-2 Banden wurden densitometrisch quantifiziert, und die relativen Mengen sind unter den entsprechenden Spuren im Vergleich zu den parentalen PCC7-Mz1-Zellen (=1) angegeben.

B Nach der Substratreaktion wurde die PVDF-Membran mit Coomassie-Blau gefärbt, um den Auftrag gleicher Proteinmengen zu demonstrieren.

Insgesamt wurden 82 Klone, bei denen die Bcl-2 Expression durch den CMV-Promoter kontrolliert wurde, erhalten. Von diesen 82 Klonen konnten 46 auf ihre Überexpression getestet werden, wohingegen die anderen 36 Klone während der Kultivierung abstarben. 6 der 46 analysierten Klone wiesen eine deutliche Bcl-2 Überexpression im Western-Blot auf. Bezogen

auf die Gesamtzahl getesteter Klone betrug der Anteil positiver Klone 7%. Durch die Transfektion mit dem pcDNA3-SV40-Bcl-2 Vektor wurden 27 Klone erzeugt. Von diesen konnten 21 Klone getestet werden, und 15 Klone zeigten eine Bcl-2 Überexpression. Der Anteil positiver Klone lag mit 71% um den Faktor 10 höher als bei der Transfektion des pcDNA3-Bcl-2 Vektors, was ein weiterer Hinweis darauf ist, daß in den PCC7-Mz1-Zellen der SV40-Promoter aktiver ist als der CMV-Promoter (Tab. 8).

Transfizierter Vektor	Erhaltene Klone	Getestete Klone	Positive Klone	Anteil über-exprimierender Klone
pcDNA3-Bcl-2	82	46	6	7%
pcDNA3-SV40-Bcl-2	27	21	15	71%

Tab. 8: Etablierung der stabilen Mz-Bcl-2 Klone

Die erhaltenen Klone werden im folgenden als "Mz-Bcl-2" Klone bezeichnet. Zur Identifizierung der einzelnen Zelllinien wird das jeweilige Loch der 96-Loch-Mikrotiterplatte, in dem der entsprechende Klon gewachsen war, angegeben.

2.2.3 Expression von Bcl-2 in differenzierenden Zellen

Bei der Etablierung der Mz-Bcl-2 Klone wurde die Überexpression von Bcl-2 nur in den Stammzellen untersucht. Durch weitere Western-Blot Analysen sollte nachgewiesen werden, daß die Überexpression auch während des RA-induzierten Differenzierungsverlaufs aufrechterhalten wird. Exemplarisch wurden dazu aus vier Klonen Gesamtzellextrakte von Stammzellen und von Zellen der Differenzierungszeitpunkte d1, d3, d6 und d10 mit dem anti-Bcl-2-Antikörper analysiert. Vom Klon F3 konnte die Bcl-2 Expression nur bis zum Zeitpunkt d3 untersucht werden, da es sich bei diesem Klon um einen sogenannten N-Klon handelte, der aufgrund fehlender Fibroblasten und Astroglia-Zellen nur bis d3 kultivierbar war (siehe I 3.1 sowie LANG *et al.*, 1989). Bei den Klonen B12, F3 und H5 wurde die Bcl-2 Expression durch den SV40-Promoter kontrolliert, während der Klon D2 den CMV-Promoter enthielt. Die Intensitäten der im Western-Blot detektierten Banden wurden densitometrisch bestimmt und in Korrelation mit der Bcl-2 Expression in PCC7-Mz1-Zellen gesetzt. Bei allen analysierten Klonen blieb die Bcl-2 Überexpression während des neuralen Differenzierungsprozesses bestehen, wobei die Klone im Vergleich zu PCC7-Mz1-Zellen eine 5 bis 8-fach höhere Bcl-2 Expression aufwiesen (Abb. 29).

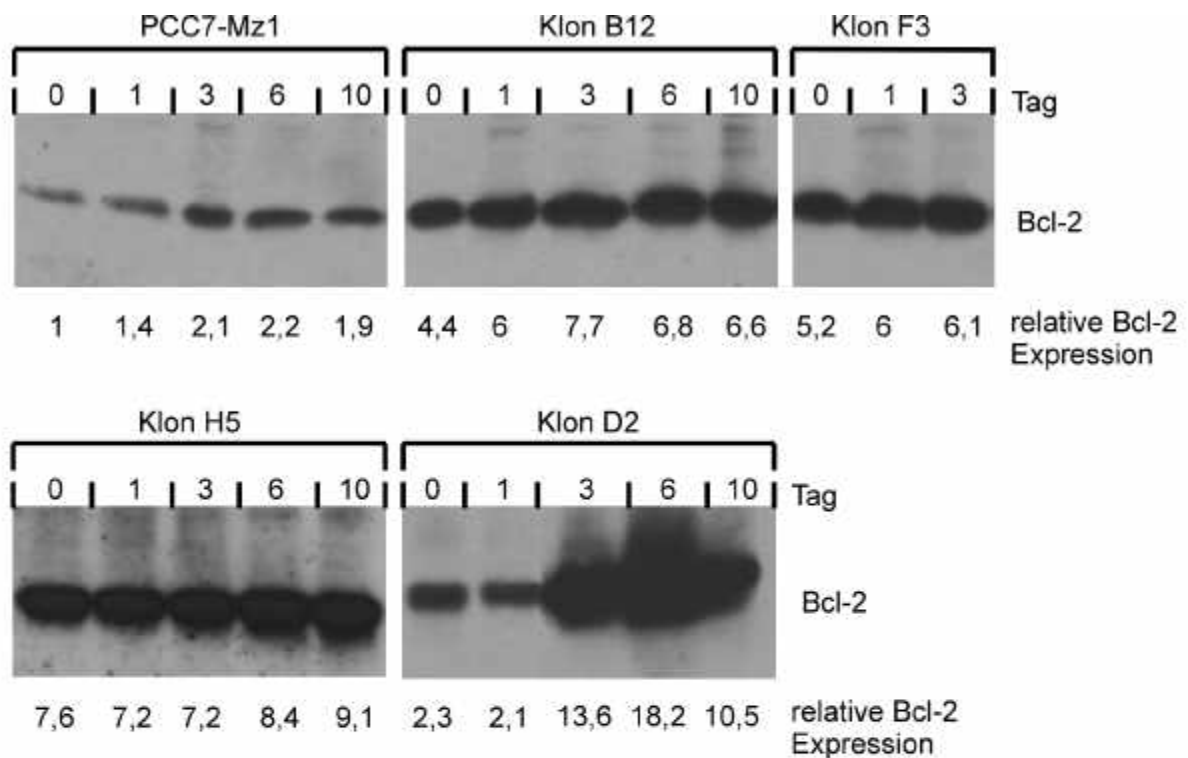


Abb. 29: Bcl-2 Expression in differenzierenden Mz-Bcl-2 Zellen

Aus PCC7-Mz1-Zellen sowie aus vier Mz-Bcl-2 Klonen wurden je 15 µg Gesamtprotein von Stammzellen und von Zellen 1, 3, 6 und 10 Tage nach Differenzierungsinduktion durch eine 15%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, und Bcl-2 wurde mit einem Antikörper nachgewiesen. Nach der Chemilumineszenz-Reaktion wurde ein Fuji Medical X-Ray Film für 10 min. exponiert. Die durch Densitometrie ermittelten Intensitäten der Bcl-2 Banden sind unter der jeweiligen Spur in Relation zur Bcl-2 Expression von PCC7-Mz1-Stammzellen angegeben.

Die Bcl-2 Expression der Mz-Bcl Klone B12, F3 und H5 war durch den SV40-Promoter reguliert, während sie bei dem Klon D2 durch den CMV-Promoter kontrolliert wurde.

Die Überexpression von Bcl-2 blieb in allen Klonen während des Differenzierungsverlaufs erhalten und war ungefähr 5 bis 8-mal höher als die endogene Bcl-2 Menge von PCC7-Mz1-Zellen.

2.2.4 Vergleich zwischen CMV- und SV40-Promoter kontrollierter Bcl-2 Expression

Bei der Charakterisierung der Mz-Bcl-2 Klone wurde deutlich, daß die Bcl-2 Expression in Stammzellen von Klonen, bei denen die Bcl-2 Expression durch den SV40-Promoter kontrolliert wurde, höher war als in Klonen, bei denen Bcl-2 durch den CMV-Promoter reguliert wurde. Densitometrische Quantifizierungen von Western-Blot Analysen zeigten, daß die Expression von Bcl-2 in Stammzellen von Klonen mit SV40-Promoter zwischen 5 bis 8-fach stärker als in Mz1-Zellen war, während in CMV-kontrollierten Klonen die Expression nur etwa um den Faktor 3 erhöht war (Abb. 30 A). Betrachtet man dagegen die Bcl-2 Expressionsrate ab Differenzierungstag d3, also zwei Tage nach Mediumwechsel, so nahm die Expression in Klonen mit CMV-Promoter stark zu (siehe Klon D2 in Abb. 29). Diese erhöhte Bcl-2 Expression war auf die Zugabe von 1 mM dbcAMP beim Mediumwechsel an d1 zurückzuführen, da durch die Behandlung des CMV-kontrollierten Klons Mz-Bcl-2 D2 mit der gleichen Konzentration

dbcAMP alleine, d.h. ohne RA, ebenfalls eine etwa 7-fache Zunahme von Bcl-2 nachgewiesen werden konnte (Abb. 30 B). Dieser Effekt trat dagegen in den PCC7-Mz1-Zellen und in Klonen mit SV40-Promoter nicht auf. Der sekundäre Botenstoff cAMP scheint demnach in PCC7-Zellen eine verstärkte Aktivierung des CMV-Promoters zu bewirken, wie auch schon von NEUMANN *et al.* (1995) beschrieben wurde.

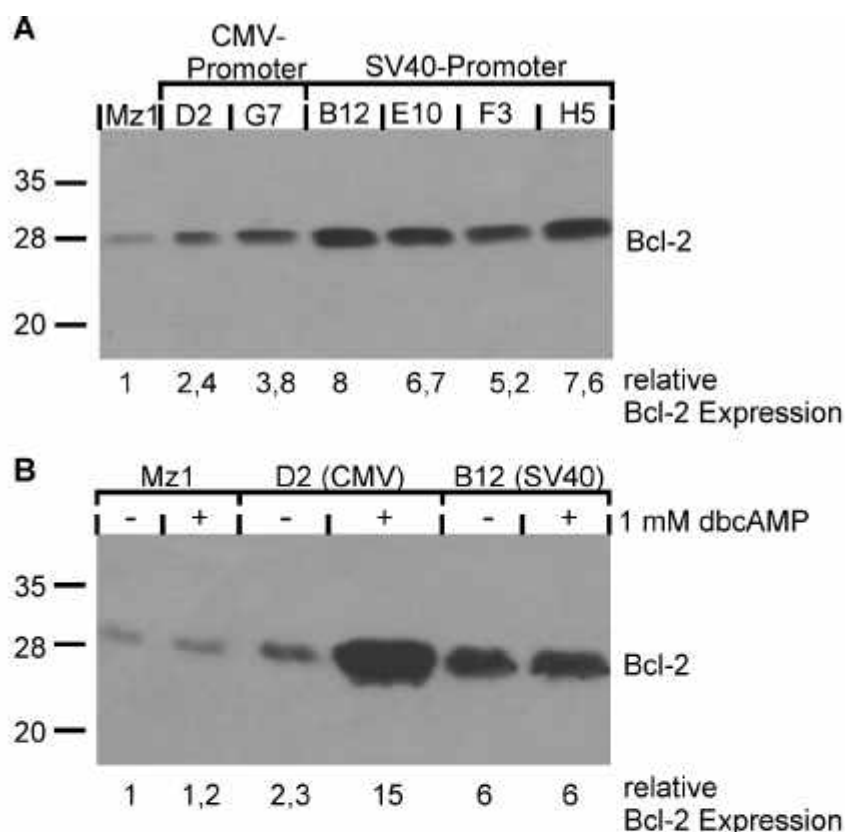


Abb. 30: Vergleich der SV40- und CMV-Promoter kontrollierten Bcl-2 Expression

A Je 15 µg Gesamtprotein aus Stammzellen von PCC7-Mz1, von den Klonen Mz-Bcl-2 D2 und G7, bei denen die Bcl-2 Expression durch den CMV-Promoter reguliert wurde, sowie von den Klonen Mz-Bcl-2 B12, E10, F3 und H5, die stabil mit dem Vektor pcDNA3-SV40-Bcl-2 transfiziert waren, wurden durch eine 15%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, und Bcl-2 wurde detektiert. Der Nachweis erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 10 min. Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben. Die Intensitäten der Bcl-2 Banden wurden densitometrisch ermittelt und sind unter der jeweiligen Spur aufgeführt. In Stammzellen war die Bcl-2 Überexpression in Klonen mit SV40-Promoter deutlich höher als in Klonen mit CMV-Promoter.

B Stammzellen von PCC7-Mz1 sowie von den Mz-Bcl-2 Klonen D2 (mit CMV-Promoter) und B12 (mit SV40-Promoter) wurden für 24 h mit 1 mM dbcAMP behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Zum Nachweis der Bcl-2 Expression wurde eine Western-Blot Analyse wie unter A beschrieben durchgeführt.

Die Zugabe von dbcAMP führte zu einer deutlichen Erhöhung der Bcl-2 Expression im Klon D2, der den CMV-Promoter besitzt, während in PCC7-Mz1-Zellen sowie im Klon B12 mit SV40-Promoter kein Einfluß von dbcAMP auf die Bcl-2 Expression festzustellen war.

2.3 Regulation des apoptotischen Programms durch Bcl-2

Wie in der Einleitung (I 3.) dargestellt, führt die Behandlung von PCC7-Mz1-Stammzellen mit RA parallel zur Induktion von neuronalen Determinierungs- und Differenzierungsprozessen zu einem apoptotischen Zellsterben eines definierten Anteils der Kultur (HERGET *et al.*, 1998). Da die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 in verschiedenen Zellsystemen und nach unterschiedlichen Apoptose-Stimuli bekannt ist, wurde untersucht, ob Bcl-2 auch in die RA-induzierte Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen regulierend involviert ist.

2.3.1 Bcl-2 reduziert die RA-induzierte Apoptose

Um das Ausmaß der durch RA-Behandlung ausgelösten Apoptose in PCC7-Mz1-Zellen zu ermitteln, wurde der WST-1 Test angewendet (II 2.10). Dieser Test bestimmt die Zellvitalität und beruht auf der Messung der Aktivität der mitochondrialen Succinat-Reduktase in lebenden Zellen. Die Behandlung von Stammzellen mit RA führte nach 24 h zu einer Reduktion der Vitalität um etwa 25% (HERGET *et al.*, 1998). Inkubierte man dagegen Stammzellen der Mz-Bcl-2 Klone für 24 h mit RA, so war das Ausmaß der durch RA induzierten Apoptose signifikant verringert (Abb. 31). Während die Vitalität der PCC7-Mz1-Zellen 24 h nach Zugabe von RA auf etwa 75% reduziert war, lag die Vitalität der 8 untersuchten Mz-Bcl-2 Klone deutlich höher. Die Daten zeigen jedoch, daß der Apoptose-inhibierende Effekt von Bcl-2 dosisabhängig war. Bei den Klonen, die aufgrund des stärkeren SV40-Promoters mehr Bcl-2 exprimierten, nahm die Vitalität nach Behandlung mit RA um durchschnittlich weniger als 10% ab. Dahingegen sank die Vitalität der Klone, bei denen die Bcl-2 Transkription durch den CMV-Promoter reguliert wurde, und die daher weniger Bcl-2 exprimierten, auf etwa 80%.

Neben der durch die Bcl-2 Überexpression verringerten Vitalitätsabnahme der Zellen nach Behandlung mit RA wurde ein weiteres biochemisches Merkmal von Apoptose untersucht. Der kontrollierte Abbau der Kern-DNA in Fragmente von ca. 200 bp und Multimeren davon stellt eine gut charakterisierte Eigenschaft des apoptotischen Zelltods dar. Eine Auftrennung der DNA aus apoptotischen Zellen führte zu einem definierten Leiternmuster im Agarosegel. Analyierte man die apoptotischen PCC7-Mz1-Zellen, die sich 24 h nach Zugabe von RA von der Kulturschale abgelöst haben, so ließ sich ein ausgeprägtes DNA-Leiternmuster im Agarosegel nachweisen, während in unbehandelten Kontrollansätzen und in lebenden adhären Zellen nur die hochmolekulare genomische DNA vorlag (HERGET *et al.*, 1998). Aus den drei Mz-Bcl-2 Klonen B12, F3 und D2 sowie aus PCC7-Mz1-Zellen wurde die DNA aus den Zellen des Überstands nach 24-stündiger Inkubation mit RA isoliert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen analysiert. Ein deutliches DNA-Leiternmuster ließ sich nur in RA-behandelten PCC7-Mz1-Zellen erkennen. Die Analyse von RA-behandelten Zellen der Mz-Bcl-2 Klone wies dagegen kein oder nur ein sehr schwaches DNA-Leiternmuster auf (Abb. 32). Es konnte somit gezeigt werden, daß die Überexpression von Bcl-2

eine Inhibition der DNA-Fragmentierung und damit der Apoptose bewirkt. Die Expression von Bcl-2 scheint auch spontan auftretendes Zellsterben der PCC7-Mz1-Zellen zu unterdrücken, da der Anteil an genomischer DNA in den nicht-behandelten Kontrollansätzen in den PCC7-Mz1-Zellen im Vergleich zu den Mz-Bcl-2 Klonen deutlich größer war.

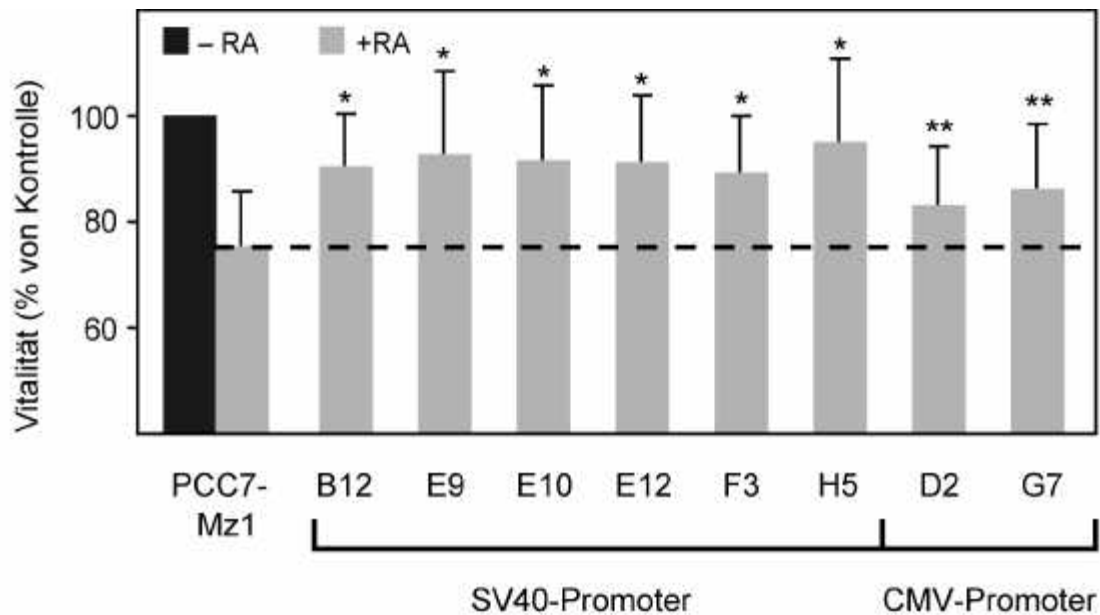


Abb. 31: Bcl-2 reduziert die durch RA induzierte Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen

Von PCC7-Mz1 sowie von 6 Mz-Bcl-2 Klonen mit SV40-Promoter und von 2 Mz-Bcl-2 Klonen mit CMV-Promoter wurden je 5000 Zellen pro Loch einer 96 Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h mit 0,1 μ M RA behandelt. Einen Tag später wurden die Zellen mit WST-1 Reagenz für 2 h inkubiert, und die Absorption bei 405 nm wurde im Immunoreader gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit RA inkubiert worden waren. Pro Bedingung wurde der Mittelwert aus je 8 Löchern gebildet, und bei den unbehandelten Kontrollansätzen wurde die Vitalität gleich 100% gesetzt. Das hier gezeigte Ergebnis stellt den Mittelwert aus 8 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils 8 Meßwerten dar. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch Anwendung des "student's t-test" überprüft. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,2$ im Vergleich zu PCC7-Mz1-Zellen.

Während in PCC7-Mz1-Zellen die Vitalität nach RA-Behandlung auf etwa 75% abnahm, lag die Vitalitätsrate der Mz-Bcl-2 Klone mit SV40-Promoter bei durchschnittlich 90% und die der Klone mit CMV-Promoter bei etwa 83%.

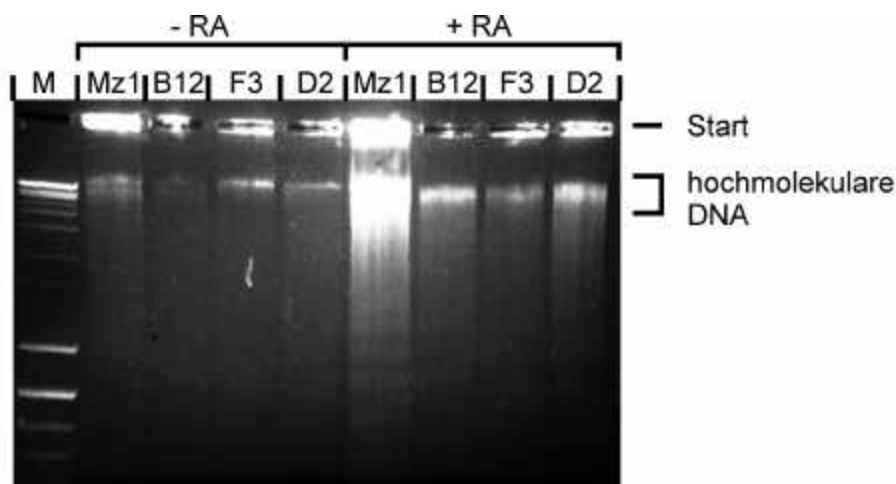


Abb. 32: Bcl-2 inhibiert die RA-induzierte DNA-Fragmentierung

PCC7-Mz1-Zellen sowie Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12, F3 und D2 wurden 24 h nach Ausplattieren für weitere 24 h mit 0,1 μ M RA inkubiert. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Aus den abgelösten Zellen des Überstands wurde die genomische DNA isoliert, auf einem 1,4%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

In RA-behandelten PCC7-Mz1-Zellen ließ sich ein deutliches DNA-Leitermuster erkennen, während die Mz-Bcl-2 Klone keine DNA-Fragmentierung aufwiesen.

M: DNA-Längenstandard (II 3.1.1)

2.3.2 Bcl-2 senkt die Caspase-Aktivität

Die Exekutionsphase der Apoptose beinhaltet die Aktivierung von Mitgliedern der Caspase-Multigenfamilie. Caspasen spalten proteolytisch spezifische Substrate, wodurch der Ablauf des Apoptose-Programms kontrolliert wird. Ein gut charakterisiertes Caspase-Substrat ist das an der DNA-Reparatur beteiligte Enzym PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase). Die Spaltung des 120 kDa-Proteins PARP in ein N-terminales Fragment von 85 kDa und in ein C-terminales Fragment von 25 kDa stellt daher ein weiteres Kriterium zur biochemischen Charakterisierung von Apoptose dar. Während man durch Western-Blot Analysen in lebenden adhärennten PCC7-Mz1-Zellen das vollständige PARP detektieren konnte, so fand man in Zellextrakten aus den nach RA-Behandlung abgelösten apoptotischen Zellen nur das N-terminale Fragment (HERGET *et al.*, 1998). Die Analyse des Expressionsmusters von PARP in den Mz-Bcl-2 Klonen B12, E10, F3, H5 und D2 zeigte, daß in den adhärennten Zellen wie bei den PCC7-Mz1-Zellen nur das ungeschnittene Gesamtprotein vorlag. In den nach RA-Zugabe abgelösten Zellen trat ebenfalls vollständiges PARP-Protein und nur zu einem geringen Anteil gespaltenes PARP auf, während in den PCC7-Mz1-Zellen nur das gesplante PARP detektiert wurde (Abb. 33). Bcl-2 scheint also die durch RA induzierte Caspase-Aktivität in den PCC7-Mz1-Zellen zu inhibieren.

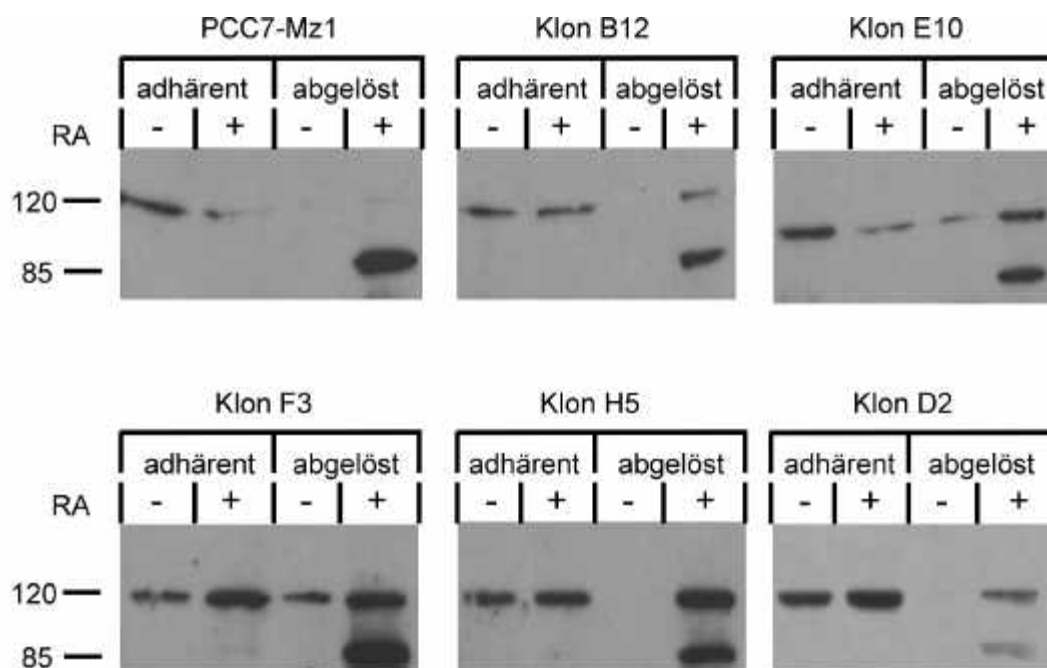


Abb. 33: Bcl-2 reduziert die Caspase-Aktivität in PCC7-Mz1-Zellen

PCC7-Mz1-Zellen sowie Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12, E10, F3, H5 und D2 wurden einen Tag nach dem Aussäen für 24 h mit 0,1 μM RA inkubiert (+RA). Kontrollansätze blieben unbehandelt (-RA). Von den adhärennten sowie von den abgelösten Zellen des Kulturüberstands wurden Proteine extrahiert. Je 10 μg Protein der adhärennten Zellen sowie jeweils gleiche Volumina der Extrakte der abgelösten Zellen wurden durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, und PARP wurde mit einem Antikörper detektiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion und anschließende Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 5 min.

In allen Extrakten der adhärennten Zellen war nur das vollständige PARP-Protein (120 kDa) detektierbar. In den mit RA behandelten, abgelösten PCC7-Mz1-Zellen konnte man dagegen nur gespaltenes PARP (85 kDa) nachweisen, während in den Mz-Bcl-2 Klonen auch ungeschnittenes PARP auftrat. Die Caspase-Aktivität scheint demnach durch die Bcl-2 Überexpression vermindert zu sein.

2.3.3 Bcl-2 blockiert die RA-induzierte Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien

Während des Apoptoseprozesses wird in vielen Zellen nach verschiedenen apoptotischen Stimuli die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Transmembranraum der Mitochondrien in das Cytosol induziert, wodurch es zur Bildung eines Komplexes - dem sogenannten Apoptosom - aus Cytochrom c, Apaf-1 und der Pro-Caspase 9 und der Aktivierung der Apoptosekaskade kommt. Bcl-2 kann sowohl die Freisetzung von Cytochrom c als auch die Bildung des Apoptosoms inhibieren.

Ob Cytochrom c auch in PCC7-Mz1-Zellen nach Zugabe von RA in das Cytosol transloziert wird, wurde durch Western-Blot Analysen von Proteinen der mitochondrialen Fraktion sowie einer cytosolischen S100 ("supernatant of 100000 x g")- Fraktion untersucht (Abb. 34). In PCC7-Mz1-Zellen konnte Cytochrom c sowohl in den mitochondrialen Fraktionen als auch in der S100-Fraktion, die nach 24-stündiger Behandlung mit RA isoliert wurde, detektiert werden. Unbehandelte PCC7-Mz1-Zellen wiesen in der S100-Fraktion kein Cytochrom c auf. Dagegen

war Cytochrom c in den Mz-Bcl-2 Klonen B12, F3 und H5 nach RA-Inkubation nur in der Mitochondrien-Fraktion und nicht in der cytosolischen Fraktion nachweisbar. Das durch RA induzierte Apoptose-Signal führt demnach in PCC7-Mz1-Zellen zur Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol, was durch die Überexpression von Bcl-2 inhibiert wird.

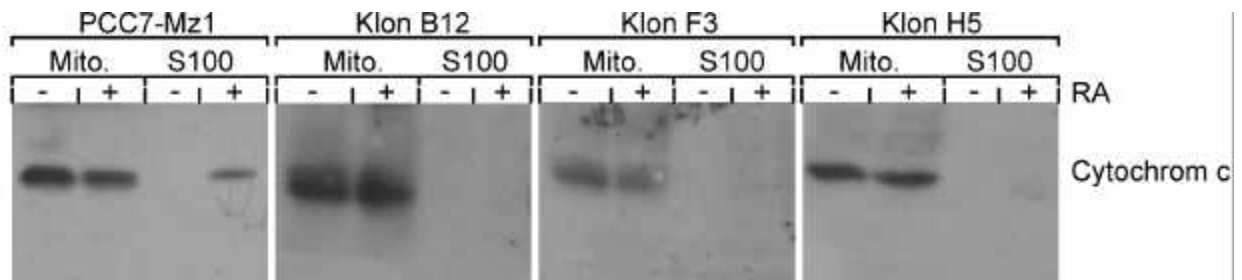


Abb. 34: Bcl-2 inhibiert die RA-induzierte Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien

Je eine 15 cm-Schale wurde mit PCC7-Mz1-Zellen sowie mit Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12, F3 und H5 mit den unter II 2.2 angegebenen Dichten ausplattiert und für 24 h mit 0,1 μM RA behandelt (+RA). Kontrollzellen blieben unbehandelt (-RA). Die Zellen wurden lysiert und die Extrakte wurden, wie unter II 4.4 beschrieben, in eine mitochondriale Fraktion (Mito.) und eine cytoplasmatische S100 ("supernatant of 100000 $\times g$ ")-Fraktion aufgetrennt. Jeweils gleiche Volumina der mitochondrialen Fraktion bzw. je 20 μg Protein der S100-Fraktion wurden durch eine 15%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, und Cytochrom c wurde mit einem Antikörper detektiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 10 min. Cytochrom c konnte in allen Zelllinien in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden, während nur in PCC7-Mz1-Zellen nach Zugabe von RA eine Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol detektiert wurde.

2.3.4 Bcl-2 inhibiert den Ceramid-induzierten Zelltod

Bei Ceramiden handelt es sich um Sphingolipide, die als sekundäre Botenstoffe in verschiedenen Zellsystemen an Differenzierungs- und Apoptoseprozessen beteiligt sind. In PCC7-Mz1-Zellen besitzen Ceramide keinen nachweislichen Einfluß auf die neurale Differenzierung, sie sind jedoch in die Signalweiterleitung der RA-induzierten Apoptose involviert (ESDAR *et al.*, 1999b). Um zu untersuchen, ob Bcl-2 in den RA- und Ceramid-vermittelten Apoptoseprozeß der PCC7-Mz1-Zellen eingreift, wurde die Vitalität der Mz-Bcl-2 Klone nach Behandlung mit membranpermeablen, synthetischen Ceramiden im WST-1 Test gemessen. Die Dosis-Wirkungskurve zeigt, daß 24 h nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von C₆-Ceramid (5, 10, 15, und 20 μM) die Abnahme der Vitalität in den Mz-Bcl-2 Klonen deutlich geringer war als in den PCC7-Mz1-Zellen (Abb. 35 A). Während der EC₅₀-Wert des C₆-Ceramids, der ein Maß für die halbmaximale Effekorkonzentration ist, in den PCC7-Mz1-Zellen bei 10 μM lag, wiesen die analysierten Mz-Bcl-2 Klone einen deutlich höheren EC₅₀-Wert zwischen 14 und 20 μM auf. Bcl-2 scheint demnach die Ceramid-induzierte Apoptose zu inhibieren.

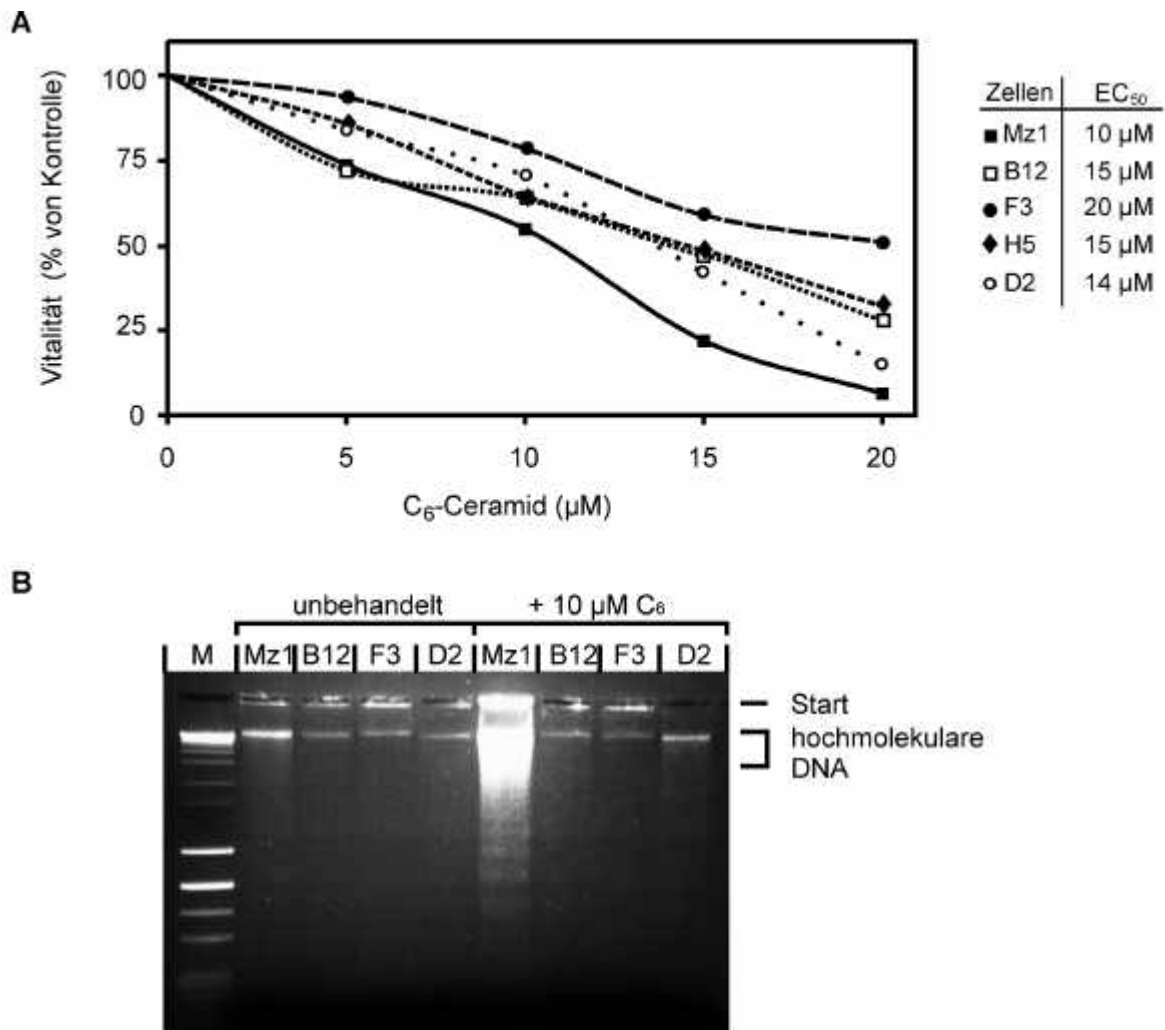


Abb. 35: Bcl-2 inhibiert die Ceramid-induzierte Apoptose in PCC7-Mz1-Zellen

A Um den Effekt von synthetischem C₆-Ceramid auf die Vitalität der Mz-Bcl-2 Klone zu untersuchen, wurden von den Klonen B12, F3, H5 und D2 je 5000 Zellen pro Loch einer 96 Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und einen Tag später mit steigenden Konzentrationen C₆-Ceramid inkubiert. Kontrollansätze blieben unbehandelt. Nach 24 h wurde die Vitalität der Zellen durch den WST-1 Test ermittelt. Pro Bedingung wurde der Mittelwert aus 8 Löchern gebildet, und die Vitalität der unbehandelten Kontrollansätze wurde gleich 100% gesetzt. Das Ergebnis zeigt den Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die aus der Dosis-Wirkungskurve bestimmten EC₅₀-Werte für C₆-Ceramid lagen bei den Mz-Bcl-2 Klonen deutlich höher als bei PCC7-Mz1-Zellen (Tabelle rechts).

B PCC7-Mz1-Zellen sowie Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12, F3 und D2 wurden einen Tag nach dem Aussäen für 24 h mit 10 µM C₆-Ceramid inkubiert, während Kontrollansätze unbehandelt blieben. Aus den abgelösten Zellen des Kulturüberstands wurde die genomische DNA isoliert, auf einem 1,4%-igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

In PCC7-Mz1-Zellen war ein deutliches DNA-Leitermuster zu erkennen, während die genomische DNA der Mz-Bcl-2 Klone keine DNA-Fragmentierung aufwies.

M: DNA-Längenstandard (II 3.1.1)

Zur Verifizierung dieses protektiven Bcl-2 Effekts wurde das DNA-Leitermuster der Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µM C₆-Ceramid untersucht (Abb. 35 B). In PCC7-Mz1-Zellen trat ein deutliches DNA-Leitermuster nach Inkubation mit C₆-Ceramid auf. Die Mz-Bcl-2 Klone

zeigten dagegen kein oder nur ein sehr schwaches DNA-Leitermuster. Die Ergebnisse dieser Experimente weisen darauf hin, daß Bcl-2 seinen antiapoptotischen Effekt in der RA-induzierten Signalkaskade unterhalb des sekundären Botenstoffs Ceramid ausübt.

2.3.5 Bcl-2 vermittelt Schutz gegen verschiedene apoptotische Stimuli

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Bcl-2 einen protektiven Effekt für die RA-induzierte Apoptose in PCC7-Mz1-Zellen besitzt, und daß das Protein in der Signalkette unterhalb des Ceramid-Signals wirkt, wurde untersucht, ob Bcl-2 die Zellen auch gegen weitere apoptotische Stimuli schützen kann. Anhand des WST-1 Tests wurde der Einfluß von vier unterschiedlichen Behandlungen, deren Zelltod-induzierende Wirkungen gut beschrieben sind, und die jeweils verschiedene zelluläre Angriffspunkte besitzen, auf die Vitalität der PCC7-Mz1-Zellen und der Mz-Bcl-2 Klone B12 und F3 analysiert (Abb. 36).

(1) Durch millimolare Konzentrationen an Glutamat werden oxidative Zellschädigungen, die nicht über Glutamat-Rezeptoren vermittelt werden, ausgelöst. Wurden Stammzellen der verschiedenen Zelllinien für 24 h mit 10 mM Glutamat behandelt, nahm die Vitalität der PCC7-Mz1-Zellen auf etwa 20% ab. Die Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12 und F3 wiesen dagegen noch eine Vitalität von über 60% auf. (2) Das aus Streptomyceten isolierte Staurosporin wirkt als unspezifischer Inhibitor von Proteinkinasen und induziert dadurch in vielen Zellsystemen Apoptose. Nach Inkubation der PCC7-Mz1-Zellen für 24 h mit 5 nM Staurosporin starben etwa 20% der Zellen. Einen eindeutigen Schutz gegen Staurosporin zeigte nur der Mz-Bcl-2 Klon F3, dessen Vitalität nicht abnahm. (3) Der Entzug von Serum führt zum Verlust essentieller Überlebensfaktoren, so daß es zur Induktion von Apoptose kommt. 16 h nach Serumentzug starben ungefähr 60% der PCC7-Mz1-Zellen, während 60 bis 80% der Zellen der Mz-Bcl-2 Klone überlebten. (4) Die Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht initiiert aufgrund von Schädigungen der DNA über das Tumorsuppressorgen p53 das "zelluläre Selbstmordprogramm". 24 h nach einer 10-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht nahm die Vitalität der PCC7-Mz1-Kultur auf 10% ab. Die Mz-Bcl-2 Klone wiesen dagegen eine dreifach höhere Vitalitätsrate von etwa 30% auf.

Desweiteren wurde von Frau Nicole Düwelhenke aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt, daß die Zellen der Mz-Bcl-2 Klone auch gegen chemische Hypoxie (0,2 mM Iodessigsäure, 1 mM Cyanid) geschützt sind. 24 h nach einer 25-minütigen chemische Hypoxie wiesen die Mz-Bcl-2 Klone eine durchschnittlich 40% höhere Vitalität auf als die PCC7-Mz1-Zellen (DÜWELHENKE, persönliche Mitteilung). Es konnte somit demonstriert werden, daß Bcl-2 in PCC7-Mz1-Zellen eine protektive Wirkung gegenüber verschiedensten apoptotischen Stimuli vermittelt.

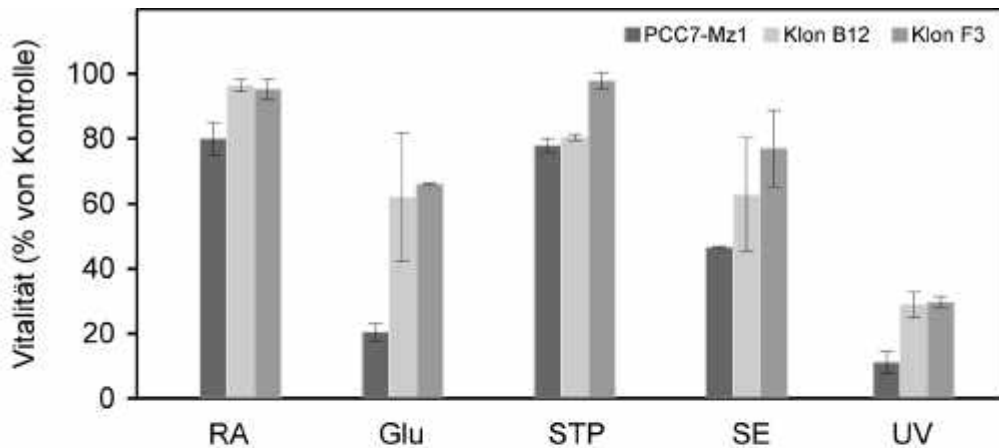


Abb. 36: Bcl-2 schützt PCC7-Mz1-Zellen gegen verschiedene apoptotische Stimuli

Von PCC7-Mz1-Kulturen (■) sowie von den Mz-Bcl-2 Klonen B12 (□) und F3 (▨) wurden je 5000 Zellen pro Loch einer 96 Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und einen Tag später verschiedenen apoptotischen Stimuli ausgesetzt. Die Zellen wurden entweder für 24 h mit 0,1 μ M Retinsäure (RA), mit 10 mM Glutamat (Glu) oder mit 5 nM Staurosporin (STP) inkubiert. Außerdem wurde den Zellen für 16 h das Serum entzogen (SE), und sie wurden für 10 min. mit UV-Licht bestrahlt (UV). Zur Bestimmung der Vitalität wurde der WST-1 Test nach den unterschiedlichen Inkubationszeit bzw. 24 h nach der UV-Bestrahlung durchgeführt. Pro Bedingung wurde der Mittelwert aus 8 Löchern gebildet. Die Vitalität unbehandelter Kontrollzellen wurde gleich 100% gesetzt. Das gezeigte Ergebnis stellt den Mittelwert von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

Im Vergleich zu PCC7-Mz1-Zellen wiesen die beiden getesteten Mz-Bcl-2 Klone eine höhere Vitalität gegenüber den apoptotischen Stimuli auf.

2.4 Bcl-2 reguliert den Zellzyklus der PCC7-Mz1-Zellen

2.4.1 Wachstumskurven der Mz-Bcl-2 Klone

Da die Bcl-2 Überexpression die RA-induzierte Apoptose der PCC7-Mz1-Zellen inhibiert (III 2.3.1), konnte man vermuten, daß die Anzahl der Zellen in den Kulturen der Mz-Bcl-2 Klone nach Behandlung mit RA größer war als in PCC7-Mz1-Kulturen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Wachstumskurven von PCC7-Mz1-Zellen und von den Mz-Bcl-2 Klonen B12, F3 und D2 erstellt, indem die in der Kultur vorliegende Zellzahl an den folgenden Zeitpunkten bestimmt wurde: d-1 (etwa 2 h nach dem Ausplattieren), d0, d1 und d3. Der Zeitpunkt d-1 wurde berücksichtigt, um die durch Auszählung ermittelte ausgesäte Zellzahl zu verifizieren ("seeding efficiency"), wodurch die tatsächliche Zellzahl der Kultur zu Beginn der Differenzierung exakt definiert werden konnte. Die Zellen wurden auf Deckgläsern in 24 Loch-Platten mit den unter II 2.2 angegebenen Dichten ausplattiert und differenziert. An den oben angegebenen Differenzierungszeitpunkten wurden die Zellen vorsichtig vom Deckglas abgelöst, und die Zellzahl wurde durch Färbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Wie die Abbildung 37 demonstriert, ließen sich jedoch keine gravierenden Unterschiede in der Zellzahl zwischen PCC7-Mz1-Kulturen und Mz-Bcl-2 Klonen feststellen. Die

eingesetzte Zellzahl von ungefähr 2×10^4 Zellen/cm² hatte sich nach 24 h (d0) auf 5×10^4 Zellen/cm² mehr als verdoppelt. 24 h nach Behandlung mit RA (d1) wurde eine weitere Verdopplung der Zellzahl auf etwa 11×10^4 Zellen/cm² gemessen. Diese Zellzahl blieb dann bis d3 des Differenzierungsverlaufs ungefähr konstant, was gut mit Daten übereinstimmt, wonach an d3 zwar noch etwa 20% der Zellen proliferativ sind (ESDAR *et al.*, 1999a), aber auch ein vergleichbarer Anteil der Kulturen abstirbt. Durch dieses Experiment konnte also gezeigt werden, daß die Zellzahl im Differenzierungsverlauf der Mz-Bcl-2 Klone gegenüber der PCC7-Mz1-Kultur nicht erhöht ist, obwohl in den Mz-Bcl-2 Klonen durch die Zugabe von RA kaum Apoptose induziert wurde.

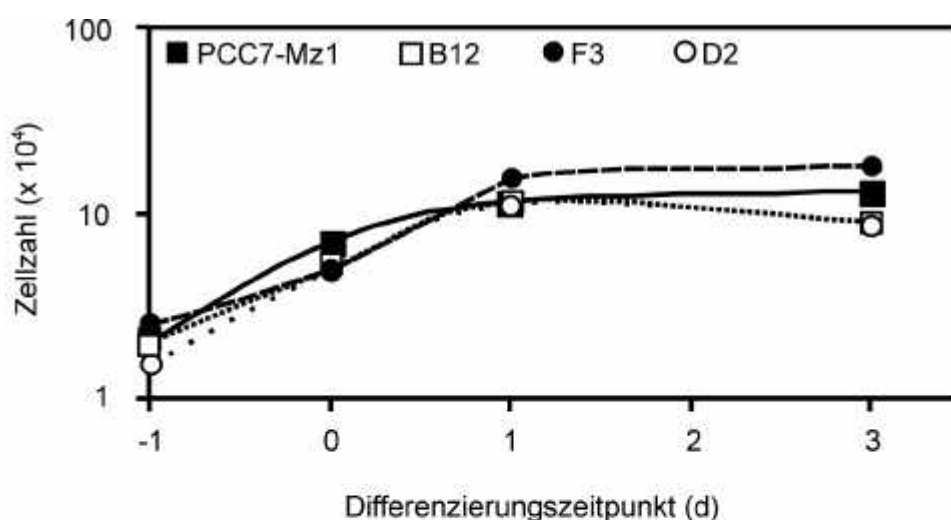


Abb. 37: Wachstumskurven von PCC7-Mz1-Zellen und von Mz-Bcl-2 Klonen

PCC7-Mz1-Zellen sowie Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12, F3 und D2 wurden mit den unter II 2.2 angegebenen Dichten auf Deckgläsern in 24 Loch-Platten ausgesät und mit RA differenziert. 2 h nach dem Ausplattieren (d-1) sowie an d0, d1 und d3 wurde die Zellzahl von jedem Klon nach Färbung mit Trypanblau-Lösung und durch Auszählen mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Anzahl der Zellen war in den Mz-Bcl-2 Klonen sowie in der PCC7-Mz1-Kultur zu allen Zeitpunkten etwa gleich groß.

2.4.2 Generationszeiten von PCC7-Mz1-Zellen und Mz-Bcl-2 Klonen

Eine mögliche Erklärung für den unter III 2.4.1 beschriebenen Effekt, wonach die Mz-Bcl-2 Klone nach RA-Behandlung trotz verminderter Apoptose gegenüber PCC7-Mz1-Zellen keine Unterschiede in der Zellzahl aufweisen, besteht darin, daß der Zellzyklus der Mz-Bcl-2 Klone länger als der der PCC7-Mz1-Zellen dauert. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Generationszeiten von drei Mz-Bcl-2 Klonen sowie von den PCC7-Mz1-Zellen ermittelt. Die Generationszeit einer Kultur beschreibt das Zeitintervall, das für die Verdopplung der Zellzahl benötigt wird. Unter der Annahme, daß sich die Zellen sequentiell symmetrisch teilen, kommt

es zum exponentiellen Wachstum der Kultur, da aus jeder ausgesäten Zelle nach n Generationen 2^n Zellen entstanden sind. Um die Generationszeit einer Kultur zu berechnen, müssen daher folgende Parameter bekannt sein: Die Zahl der ausgesäten Zellen sowie die nach einer definierten Kulturperiode geerntete Anzahl an Zellen. Aus der Zahl eingesetzter und geernteter Zellen lässt sich durch folgende Formel zunächst die Anzahl der Populations-Verdopplungen berechnen:

$$m = 3,32 (\log N_n - \log N_i)$$

m : Anzahl der Populations-Verdopplungen
 N_n : Zahl der geernteten Zellen
 N_i : Zahl der eingesetzten Zellen

Unter Berücksichtigung der Kulturdauer wird die Generationszeit dann durch folgende Formel ausgedrückt:

$$\text{Generationszeit} = \text{Kulturdauer} / \text{Anzahl der Populations-Verdopplungen}$$

In den Tabellen 9 bis 12 sind die oben beschriebenen Parameter sowie die daraus berechneten Generationszeiten von jeweils 20 Passagen der Mz-Bcl-2 Klone B12, F3 und H5 sowie der PCC7-Mz1-Kultur aufgeführt. Daraus ergab sich eine durchschnittliche Generationszeit von rund $18 \pm 4,5$ h für die PCC7-Mz1-Zellen sowie von $25,6 \pm 5,0$ h für den Klon B12, von $23 \pm 5,0$ h für den Klon F3 und von $23,2 \pm 4,9$ h für den Klon H5. Die Mz-Bcl-2 Klone besaßen eine durchschnittlich über 5 h längere Generationszeit als die PCC7-Mz1-Zellen.

PCC7-Mz1

Passage	eingesetzte Zellzahl ($\times 10^4$)	geerntete Zellzahl ($\times 10^4$)	Populationsverdopplung	Kulturdauer (h)	Generationszeit (h)
5	25	180	2,85	48	16,8
6	25	100	2	48	24
7	37,5	480	3,68	72	19,57
8	25	125	2,32	48	20,68
9	30	162	2,43	48	19,74
10	37,5	800	4,4	72	16,3
11	25	135	2,43	48	19,74
12	37,5	900	4,58	72	15,7
13	75	640	3,1	48	15,5
14	25	120	2,26	48	21,2
15	25	147	2,55	48	18,79
16	37,5	660	4,14	72	17,39
17	75	400	2,41	48	19,89
18	75	590	2,97	48	16,13
19	37,5	1080	4,85	72	14,86
20	25	90	1,85	48	26
21	75	650	3,11	48	15,4
22	37,5	410	3,45	72	20,88
23	37,5	1020	4,76	72	15,12
24	25	156	2,64	48	18,18
				<i>Mittelwert</i>	18,6
				<i>Standardabweichung</i>	-4,5

Tab. 9: Generationszeit der PCC7-Mz1-Zellen

Mz-Bcl-2 B12

Passage	eingesetzte Zellzahl ($\times 10^4$)	geerntete Zellzahl ($\times 10^4$)	Populations- verdopplung	Kulturdauer (h)	Generations- zeit (h)
5	56,25	610	3,44	72	20,9
6	30	150	2,3	48	20,87
7	30	138	2,2	48	21,82
8	45	500	3,48	72	20,7
9	90	350	1,96	48	24,49
10	30	105	1,8	48	26,67
11	45	370	3,04	72	23,68
12	90	430	2,16	48	22,22
13	30	75	1,32	48	36,36
14	45	430	3,25	72	22,12
15	30	105	1,81	48	26,57
16	30	90	1,58	48	30,38
17	15	141	3,23	72	22,29
18	90	320	1,83	48	26,24
19	30	99	1,72	48	27,88
20	45	620	3,78	72	19,05
21	90	220	1,29	48	37,25
22	90	370	2,04	48	23,55
23	45	470	3,39	72	21,28
24	30	72	1,26	48	38,02
<i>Mittelwert</i>					25,6
<i>Standardabweichung</i>					-5,0

Tab. 10: Generationszeit des Mz-Bcl-2 Klons B12

Mz-Bcl-2 F3

Passage	eingesetzte Zellzahl ($\times 10^4$)	geerntete Zellzahl ($\times 10^4$)	Populations- verdopplung	Kulturdauer (h)	Generations- zeit (h)
5	90	680	2,9	48	16,55
6	30	155	2,37	48	20,25
7	45	430	3,25	72	22,15
8	30	135	2,17	48	22,12
9	90	300	1,74	48	27,59
10	45	450	3,32	72	21,67
11	30	225	2,91	48	16,49
12	30	105	1,81	48	26,52
13	45	520	3,53	72	20,4
14	30	90	1,58	48	30,38
15	30	162	2,43	48	19,75
16	15	156	3,38	72	21,3
17	90	360	2	48	24
18	90	360	1,43	48	33,57
19	45	930	4,37	72	16,48
20	30	111	1,89	48	25,44
21	30	120	2	48	24
22	45	500	3,47	72	20,74
23	30	90	1,58	48	30,3
24	90	510	2,5	48	19,19
<i>Mittelwert</i>					23,0
<i>Standardabweichung</i>					-5,0

Tab. 11: Generationszeit des Mz-Bcl-2 Klons F3

Mz-Bcl-2 H5					
Passage	eingesetzte Zellzahl (x 10⁴)	geerntete Zellzahl (x10⁴)	Populations- verdopplung	Kulturdauer (h)	Generations- zeit (h)
5	45	220	2,29	72	31,44
6	30	105	1,81	48	26,52
7	45	660	3,87	72	18,6
8	30	96	1,68	48	28,57
9	90	450	2,32	48	20,69
10	45	260	2,53	72	28,46
11	30	135	2,17	48	22,12
12	90	420	2,22	48	21,62
13	45	420	3,22	72	22,36
14	30	81	1,43	48	33,57
15	90	330	1,87	48	25,62
16	45	640	3,83	72	18,81
17	90	550	2,61	48	18,39
18	45	700	3,96	72	18,2
19	30	162	2,43	48	19,7
20	90	280	1,63	48	29,33
21	45	610	3,76	72	19,16
22	30	129	2,1	48	22,82
23	90	570	2,66	48	18,04
24	30	153	2,35	48	20,43
				<i>Mittelwert</i>	23,2
				<i>Standardabweichung</i>	-4,9

Tab. 12: Generationszeit des Mz-Bcl-2 Klons H5

Um auszuschließen, daß die Verlängerung der Generationszeit der Mz-Bcl-2 Klone auf einen durch die Transfektion und Selektion bedingten Effekt beruht, wurden parallel die Generationszeiten von zwei Mz-GAP-43 Klonen (III 1.2) bestimmt. Diese Klone wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Mz-Bcl-2 Klone erzeugt und haben daher die gleiche Transfektionsprozedur durchlaufen (II 2.9). Die Generationszeiten der Mz-GAP-43 Klone A3 und B9 lagen jedoch mit $16,9 \pm 3,0$ h bzw. $17,3 \pm 4,4$ h im gleichen Rahmen wie die für die PCC7-Mz1-Zellen bestimmte Generationszeit von $18,6 \pm 4,5$ h und damit deutlich unter der für die Mz-Bcl-2 Klone ermittelten Generationszeit von über 23 h (Abb. 38). Die Verlängerung der Generationszeit kann daher auf die Überexpression von Bcl-2 zurückgeführt werden.

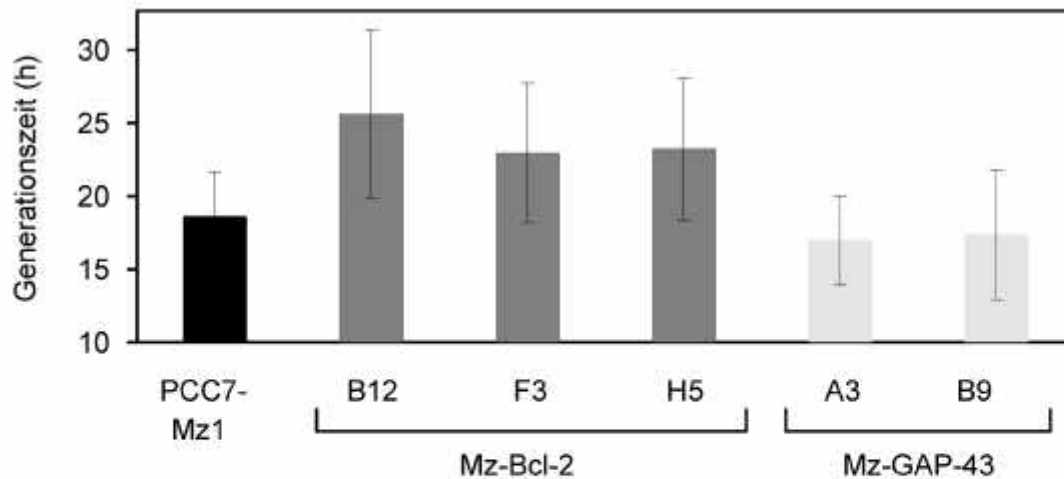


Abb. 38: Mz-Bcl-2 Klone besitzen längere Generationszeiten als PCC7-Mz1-Zellen

Die durchschnittlichen Generationszeiten der PCC7-Mz1-Zellen sowie der drei Mz-Bcl-2 Klone B12, F3 und H5 wurden aus 20 Passagen berechnet (siehe Text).

Die Generationszeiten der Mz-Bcl-2 Klone waren durchschnittlich 5 h höher als die der PCC7-Mz1-Zellen, während die Generationszeiten von zwei Kontroll-Klonen in der gleichen Größenordnung wie die der PCC7-Mz1-Zellen lagen. Die verlängerte Generationszeit der Mz-Bcl-2 Klone scheint demnach auf die Überexpression von Bcl-2 zurückzuführen zu sein.

2.4.3 Bcl-2 beeinflusst die G1/G0-Phase der PCC7-Mz1-Zellen

Die verlängerte Generationszeit der Mz-Bcl-2 Klone läßt sich dadurch erklären, daß ihr Zellzyklus verlangsamt ist, und/oder daß die Zellen früher in die wachstumsarretierte G0-Phase übertreten. Um die Anteile der einzelnen Zellzyklus-Phasen einer nicht-synchronisierten Kultur zu ermitteln, bestimmt man den DNA-Gehalt der einzelnen Zellen durch die Verwendung eines in die DNA interkalierenden Farbstoffes und mißt die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen mittels Durchflußcytometrie. Zellen der G2- und der M-Phase besitzen einen doppelt diploiden Chromosomensatz ($2 \times 2n$), so daß die Fluoreszenzintensität doppelt so hoch ist wie die in Zellen der G1- und G0-Phase, welche nur einen einfach diploiden Chromosomensatz ($1 \times 2n$) besitzen.

In drei Mz-Bcl-2 Klonen wurden die Anteile der einzelnen Zellzyklus-Phasen in Stammzellen (d0) sowie in Zellen, die für 24 h mit RA behandelt wurden (d1), bestimmt und mit der Verteilung in der PCC7-Mz1-Kultur verglichen. Für jeden untersuchten Klon ist das Ergebnis je eines Experiments von d0- sowie von d1-Zellen zur Veranschaulichung graphisch gezeigt (Abb. 39). Die Mittelwerte der Daten, die aus jeweils drei unabhängigen Experimenten mit je 10000 gemessenen Ereignissen erhalten wurden, sind in Tabelle 13 dargestellt.

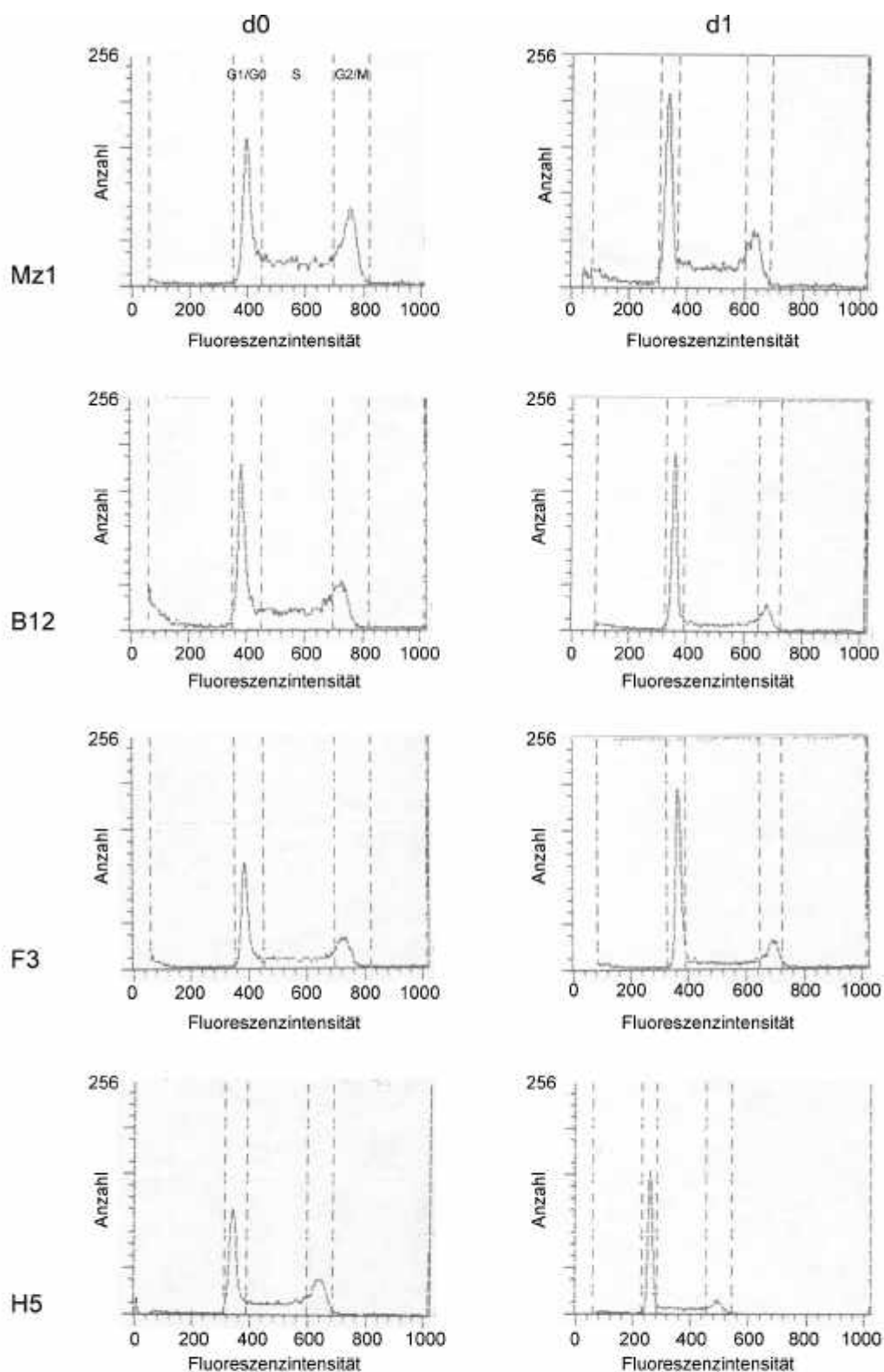


Abb. 39: Zellzyklus-Analyse von PCC7-Mz1-Zellen und Mz-Bcl-2 Klonen

Zur Bestimmung der Anteile der einzelnen Zellzyklus-Phasen in Stammzellen (d0) sowie in Zellen, die für 24 h mit RA behandelt worden waren (d1), wurde der DNA-Gehalt der Zellen mittels Durchflußcytometrie bestimmt. Pro Experiment wurden 0,5 bis 1×10^6 Zellen eingesetzt, und die DNA wurde, wie unter II 2.11 beschrieben, mit Propidiumiodid gefärbt. Es wurden je 10000 Ereignisse gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FACScan.

Im Vergleich zu der PCC7-Mz1-Kultur war der Anteil an Zellen in der G1/G0-Phase bei den Mz-Bcl-2 Klonen sowohl an d0 als auch an d1 größer.

Klon	Zeitpunkt	Zellzyklus-Verteilung		
		G1/G0	S	G2/M
PCC7-Mz1	d0	30,9% ± 4,2	37,3% ± 4,7	31,9% ± 5,8
Mz-Bcl-2 B12	d0	42,39% ± 7,9	37,24% ± 4,2	20,36% ± 3,8
Mz-Bcl-2 F3	d0	40,7% ± 7,6	29,9% ± 2,1	29,45% ± 5,6
Mz-Bcl-2 H5	d0	51,1% ± 5,1	25,3% ± 3,1	23,6% ± 5,1
PCC7-Mz1	d1	38,3% ± 5,1	37% ± 1,2	24,7% ± 3,8
Mz-Bcl-2 B12	d1	53,9% ± 5,2	26,3% ± 3,4	19,8% ± 3,4
Mz-Bcl-2 F3	d1	55,8% ± 6,5	25% ± 2,8	19,2% ± 3,7
Mz-Bcl-2 H5	d1	69,3% ± 7,6	17,9% ± 5,1	12,8% ± 2,5

Tab. 13: Verteilung der Zellen aus PCC7-Mz1-Kulturen und Mz-Bcl-2 Klonen in G1/G0-, S- und G2/M-Phase

In PCC7-Mz1-Stammzellen befanden sich etwa 31% der Kultur in der G1/G0-Phase, während 37,3% in der S-Phase und 31,9% in der G2/M-Phase vorlagen. In den Mz-Bcl-2 Klonen war dagegen der Anteil der Zellen in der G1/G0-Phase mit ungefähr 40-50% deutlich größer. Dieser Unterschied trat noch offensichtlicher in den Kulturen vom Differenzierungszeitpunkt d1 auf. 38,3% der PCC7-Mz1-Zellen befanden sich in der G1/G0-Phase, 37% in der S-Phase und 24,7% in der G2/M-Phase. Demgegenüber lag der Anteil der G1/G0-Phase in den Mz-Bcl-2 Klonen mit 54-70% eindeutig höher. Die Bcl-2 Überexpression führte daher möglicherweise zu einer Verlängerung der G1-Phase in den Stammzellen, indem die zellulären Signale zum Überschreiten des Restriktionspunktes beeinflusst wurden. Zudem scheint sie nach Zugabe von RA ein schnelleres Übertreten der Zellen in die G0-Phase zu bewirken. Durch dieses Ergebnis läßt sich die verlängerte Generationszeit der Mz-Bcl-2 Kulturen begründen.

2.4.4 Die Bcl-2 Überexpression führt zur Aktivierung des Retinoblastoma-Proteins

Das Retinoblastoma-Protein (Rb-Protein) ist das Protein eines Tumorsuppressorgens, das durch seine Bindung an Transkriptionsfaktoren, z.B. an E2F, die Replikation der DNA blockiert und den Fortgang des Zellzyklusses inhibiert. Diese aktive Form des Rb-Proteins ist wenig (hypo-) phosphoryliert und tritt in Zellen der G1/G0-Phase sowie in terminal differenzierten und ruhenden Zellen auf. Nach Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen kommt es jedoch zur Phosphorylierung des Rb-Proteins, welches dann im hyperphosphorylierten Zustand von E2F abdissoziiert, wodurch das Übertreten der Zelle in die S-Phase bewirkt wird. Hyperphosphoryliertes, inaktives Rb-Protein liegt damit hauptsächlich in proliferierenden Zellen vor. Die verschiedenen Phosphorylierungszustände des Rb-Proteins dienen als Monitor für den

Zustand einer Zelle und können durch unterschiedliches Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel voneinander diskriminiert werden. Hyperphosphoryliertes Rb weist ein langsames Laufverhalten als wenig phosphoryliertes Rb auf.

Um zu untersuchen, ob die durch die Bcl-2 Überexpression induzierte Verlängerung des Zellzyklusses einen Effekt auf die Aktivität des Rb-Proteins hat, wurde seine Expression durch Western-Blot Analysen im Zeitverlauf der PCC7-Mz1-Zellen sowie der Mz-Bcl-2 Klone B12, F3 und H5 analysiert. In Abbildung 40 ist der Nachweis von Rb in Gesamtzellextrakten von PCC7-Mz1 und Mz-Bcl-2 H5 in Stammzellen (d0) sowie an den Differenzierungszeitpunkten d1, d3, d6 und d10 sowie von Mz-Bcl-2 B12 und F3 an den Tagen d0, d1 und d3 gezeigt.

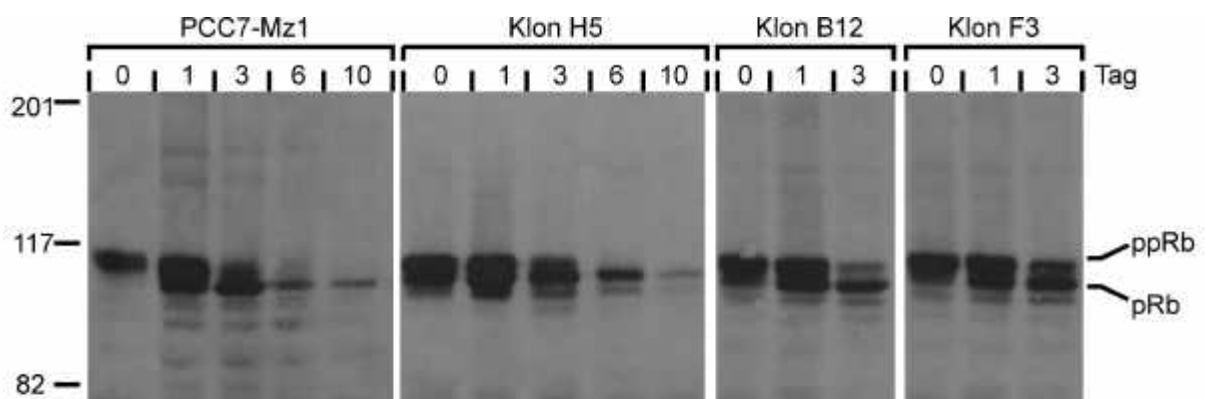


Abb. 40: Expression des Retinoblastoma-Proteins (Rb) in PCC7-Mz1-Zellen und in Mz-Bcl-2 Klonen

Je 50 µg Gesamtprotein extrahiert aus PCC7-Mz1-Zellen sowie aus den Mz-Bcl-2 Klonen B12, F3 und H5 von den Differenzierungszeitpunkten d0, d1, d3, d6 und d10 (Mz1 und H5) bzw. d0, d1 und d3 (B12 und F3) wurden durch eine 7,5%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem anti-Rb-Antikörper detektiert. Der Antikörper erkennt sowohl die wenig phosphorylierte Form von Rb (pRb) als auch hyperphosphoryliertes Rb (ppRb), das in der SDS-PAGE langsamer läuft. Der Nachweis des Antikörpers erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 5 min. Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind angegeben.

Während in PCC7-Mz1-Stammzellen (d0) nur die hyperphosphorylierte Form von Rb erkennbar war, wurde in den Mz-Bcl-2 Klonen an d0 bereits hypophosphoryliertes, und damit aktives Rb exprimiert. Im Verlauf der Differenzierung nahm zunächst der Anteil an wenig phosphoryliertem Rb in allen Kulturen zu (d0 - d3). Anschließend wurde die Gesamtmenge an exprimiertem Rb herunterreguliert (ab d3).

In PCC7-Mz1 Stammzellen war Rb nur im hyperphosphorylierten Zustand (ppRb) und damit in der inaktiven Form zu detektieren. In den Stammzellen der untersuchten Mz-Bcl-2 Klone wurde dagegen bereits die weniger phosphorylierte, aktive Form von Rb exprimiert. An d1 fand man auch in PCC7-Mz1-Zellen einen geringen Anteil des Rb-Proteins im hypophosphorylierten Zustand. Die Menge an wenig phosphoryliertem, aktivem Rb war jedoch in den Mz-Bcl-2 Klonen deutlich größer. Im weiteren Lauf der Differenzierung nahm die hypophosphorylierte Form in allen Klonen zu, und an d10 wurde kein hyperphosphoryliertes Rb mehr detektiert. Zudem verringerte sich Gesamtmenge an exprimiertem Rb während der Differenzierung der

Zellen. Neben dem hyper- (ppRb) und hypo- (pRb) phosphorylierten Rb-Protein wurden weitere, schwächere Banden nachgewiesen, die möglicherweise von einer unspezifischen Bindung des Primärantikörpers stammen.

Die Überexpression von Bcl-2 scheint demnach eine frühe Aktivierung des Rb-Proteins bereits in Stammzellen zu bewirken, und damit den Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase zu verzögern. Dieses Ergebnis könnte die verlängerte Generationszeit der Mz-Bcl-2 Klone sowie den erhöhten Anteil von Zellen in der G1/G0-Phase erklären.

2.5 Einfluß von Bcl-2 auf die neurale Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen

2.5.1 Differenzierungspotential der Mz-Bcl-2 Klone

Um den Effekt von Bcl-2 auf die neurale Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst das Differenzierungspotential der erzeugten Klone nach Induktion mit RA bestimmt. Die 21 isolierten Mz-Bcl-2 Klone wurden, wie unter II 2.2 beschrieben, auf Deckgläsern in 24 Loch-Platten ausgesät und mit RA differenziert. Das sich während des Zeitverlaufs entwickelnde Differenzierungsbild wurde mikroskopisch in den unfixierten, lebenden Kulturen analysiert. Anhand morphologischer Kriterien wurden die entstehenden Phänotypen den in der Einleitung beschriebenen Subtypen der PCC7-Mz1-Zellen zugeordnet (I 3.1). Es konnten 12 Klone mit dem Differenzierungspotential des P-Subtyps identifiziert werden (Mz-Bcl-2-SV40 A10, B12, C9, C10, E10, F1, H5, H10; Mz-Bcl-2-CMV D2, D6, E10, G8). Diese Klone wiesen das gleiche Differenzierungsbild wie die parentalen PCC7-Mz1-Zellen auf. Bereits an d3 traten Zellen flacher Morphologie auf, die sich durch ihre fibroblastoide Form deutlich von den kleineren, ovalen neuronalen Zellen unterschieden. An d6 hatte sich ein konfluenter Rasen aus Zellen flacher Morphologie ausgebildet, auf dem die Neurone, die über ihre Neurite miteinander verbunden waren, lagen. Das Differenzierungspotential des N-Subtyps besaßen 6 der Mz-Bcl-2 Klone (Mz-Bcl-2-SV40 E9, E12, F3, F9, G6; Mz-Bcl-2-CMV F1). Die Zellen dieser Klone differenzierten fast ausschließlich in neuronale Zellen, die sich schon an d3 zu Aggregaten zusammenlagerten und über lange Ausläufer miteinander verbunden waren. Mit weniger als 1% entstanden Derivate flacher Morphologie nur sehr vereinzelt. Aufgrund der Abwesenheit der flachen Zellen lösten sich die Neurone etwa ab d4 von dem Deckglas ab. Das Differenzierungsbild von 2 Mz-Bcl-2 Klonen wies eine Zwischenstellung zwischen dem P- und dem N-Subtyp auf (Mz-Bcl-2-SV40 G4; Mz-Bcl-2-CMV G7). Diese Klone wurden daher dem O-Subtyp zugeordnet. In diesen Kulturen entwickelten sich hauptsächlich neuronale Zellen, und der Anteil von Derivaten flacher Morphologie an der Gesamtkultur lag an d6 ungefähr zwischen 1 bis 10%. Diese Kulturen starben zwischen d4 und d6 ab, da den Neuronen die durch die Zellen flacher Morphologie vermittelte Stabilität fehlte. Ein Mz-Bcl-2 Klon (Mz-Bcl-2-SV40 G7)

konnte nicht differenziert werden, da die Zellen innerhalb weniger Tage nach Behandlung mit RA abstarben. Das Differenzierungspotential der Mz-Bcl-2 Klone blieb während der Kultivierung stabil, da die Zuordnung der einzelnen Klone zu den verschiedenen Subtypen durch drei unabhängige Differenzierungen von Zellen unterschiedlicher Passagen reproduziert werden konnte.

Um eine Aussage über die Bedeutung der Verteilung der auftretenden Phänotypen treffen zu können, mußten zum Vergleich aus den PCC7-Mz1-Zellen stabile Klone, die mit dem Expressionsvektor ohne kodierendes Insert für Bcl-2 transfiziert wurden, hergestellt werden. Die Isolierung dieser mit dem leeren pcDNA3-SV40-Vektor transfizierten stabilen Mz1-mock Klone wurde bereits beschrieben (III 1.5.1). Es wurden 21 stabile Mz-mock Klone erhalten. Alle Klone wurden dreimal auf Deckgläsern in 24 Loch-Platten ausgesät und mit RA differenziert. Ihr Differenzierungspotential wurde mikroskopisch an den Zeitpunkten d3 und d6 analysiert, und die einzelnen Klone wurden anhand der oben beschriebenen morphologischen Kriterien den drei Subtypen zugeordnet. 13 Klone erwiesen sich als P-Subklone, während 3 in den N-Phänotyp und einer in den O-Phänotyp differenzierten. Die Zellen von 4 Klone konnten nicht differenziert werden, da sie nach Zugabe von RA abstarben.

Wie in Tabelle 14 zusammenfassend dargestellt ist, war die Verteilung der verschiedenen Subtypen in den Mz-Bcl-2 Klonen ähnlich der Verteilung, die durch die mock Transfektion der PCC7-Mz1-Zellen bestimmt wurde. Aufgrund der zu geringen Probenzahl konnten keine statistischen Aussagen getroffen werden, so daß für eine Rangfolge nur die relativen Häufigkeiten der einzelnen Subtypen berücksichtigt wurden. Sowohl die Mz-Bcl-2 Klone als auch die Mz-mock Klone entwickelten hauptsächlich Klone des P-Phänotyps gefolgt von N- und O-Subklonen. Die Überexpression von Bcl-2 schien somit keine gravierende Auswirkung auf das Differenzierungspotential der Zellen auszuüben. Die Experimente zeigten jedoch, daß Bcl-2 überexprimierende Stammzellen in der Lage sind, in die drei verschiedenen Zelltypen (Neurone, Fibroblasten und Astroglia-Zellen), die sich auch aus den parentalen PCC7-Mz1-Zellen entwickeln, zu differenzieren. Eine spontane, vom RA-Signal unabhängige Differenzierung wurde durch die Überexpression von Bcl-2 nicht ermöglicht.

	P-Subtyp (Klone)	O-Subtyp (Klone)	N-Subtyp (Klone)	keine Differenzierung (Klone)
Mz-Bcl-2 (n=21)	12	2	6	1
Mz-mock (n=21)	13	1	3	4

Tab. 14: Differenzierungspotential der Mz-Bcl-2 sowie der Mz-mock Klone

2.5.2 Expression neuronaler Markerproteine in Mz-Bcl-2 Klonen

Um zu untersuchen, ob Bcl-2 einen Einfluß auf die Entstehung der reifen, differenzierten Zelltypen besitzt, wurde die Expression von zwei neuronalen Markermolekülen in den Mz-Bcl-2 Klonen während des RA-induzierten Differenzierungsverlaufs analysiert. Als ein Markerprotein für frühe neuronale Differenzierungsprozesse diente das neuronenspezifische PKC-Substrat GAP-43, dessen Expression innerhalb von 24 h nach Zugabe von RA in PCC7-Mz1-Zellen hochreguliert wird (ESDAR *et al.*, 1999a). Die leichte Kette des neuronalen Clathrins (n-Clathrin) wurde als Marker für spätere neuronale Differenzierungsstadien gewählt, da n-Clathrin in PCC7-Mz1-Zellen erst ab dem Differenzierungstag d2 exprimiert wird (OEHRLEIN-KARPI, 1998). Durch Western-Blot Analysen von Gesamtprotein, das aus Stammzellen sowie aus Zellen der Differenzierungszeitpunkte d1, d3 und d6 extrahiert wurde, wurde untersucht, ob sich durch die Bcl-2 Überexpression Unterschiede im Expressionsmuster der Markermoleküle GAP-43 und n-Clathrin zwischen den PCC7-Mz1-Zellen und den Mz-Bcl-2 Klonen ergaben. Die Expression von GAP-43 und n-Clathrin in PCC7-Mz1-Zellen wurde mit der Expression in den drei Mz-Bcl-2 Klonen B12, H5 und D2, die das Differenzierungspotential des P-Subtyps besaßen, verglichen. Die Expression von GAP-43 wurde in PCC7-Mz1-Zellen 24 h nach Zugabe von RA (d1) deutlich hochreguliert und blieb dann auf einem konstant hohen Expressionsniveau (Abb. 41). Der Mz-Bcl-2 Klon D2, bei dem aufgrund des schwächeren CMV-Promoters nur eine geringe Bcl-2 Überexpression vorlag (III 2.2.4), zeigte das gleiche Expressionsmuster wie die PCC7-Mz1-Zellen. Die Mz-Bcl-2 Klone B12 und H5, die infolge des stärkeren SV40-Promoters eine größere Menge an Bcl-2 enthielten (III 2.2.4), wiesen dagegen nur eine transiente Hochregulation von GAP-43 an d1 auf. Ab d3 nahm die Expression von GAP-43 wieder deutlich ab. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Analyse des neuronalen Clathrins erhalten. In PCC7-Mz1-Zellen und im Mz-Bcl-2 Klon D2 konnte ab d3 eine starke n-Clathrin Expression detektiert werden, die auch an d6 auf einem hohen Level blieb, während die Mz-Bcl-2 Klone B12 und H5 nur eine transiente Hochregulation des Proteins an d3 aufwiesen. Die Expression neuronaler Markerproteine war in den Mz-Bcl-2 Klonen B12 und H5, die bereits in Stammzellen eine starke Überexpression von Bcl-2 besaßen, gegenüber PCC7-Mz1-Zellen sowie dem Mz-Bcl-2 Klon D2 deutlich verringert. Diese Untersuchungen lieferten einen ersten Hinweis darauf, daß sich während der Differenzierung der Mz-Bcl-2 Klone im Vergleich zu PCC7-Mz1-Zellen weniger neuronale Derivate entwickelten.

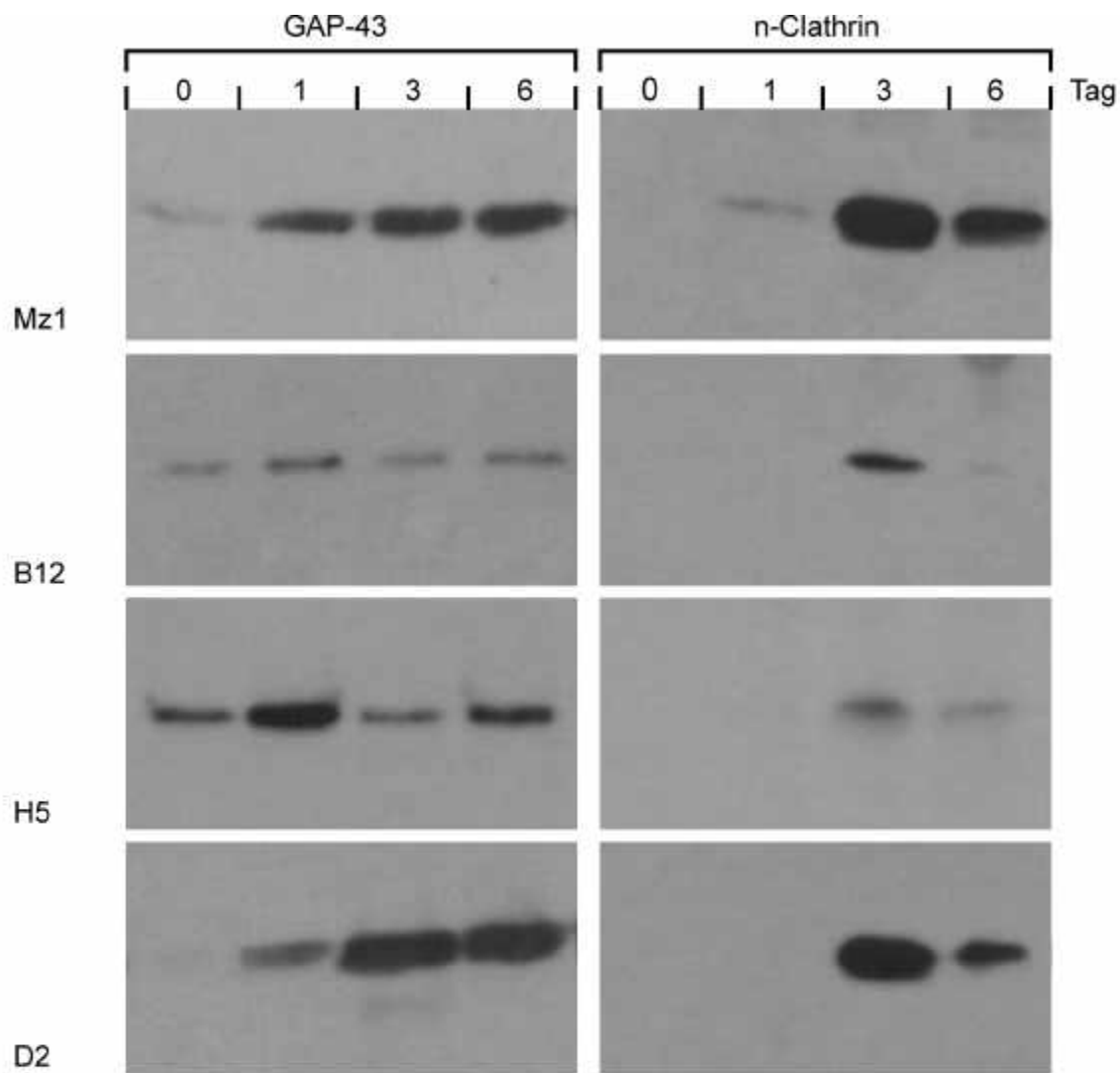


Abb. 41: Expression neuronaler Markerproteine in PCC7-Mz1-Zellen und Mz-Bcl-2 Klonen

Von PCC7-Mz1-Zellen und von Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12, H5 und D2 wurden Gesamtzelextrakte an d0, d1, d3 und d6 hergestellt. Je 5 µg des extrahierten Gesamtproteins wurden durch eine 10%-ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem anti-GAP-43-Antiserum detektiert (linke Hälfte). Je 15 µg Gesamtprotein wurden durch eine 12,5%-ige SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem Antikörper gegen die leichte Kette des neuronalen Clathrins inkubiert (rechte Hälfte). Der Nachweis erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Exposition eines Fuji Medical X-Ray Films für 1 min. (GAP-43) bzw. 15 min. (n-Clathrin). Der Auftrag gleicher Proteinmengen wurde durch Anfärbung der PVDF-Membran mit Coomassie-Blau verifiziert (nicht gezeigt).

In PCC7-Mz1-Zellen wurde die Expression von GAP-43 ab d1 und die Expression von n-Clathrin ab d3 hochreguliert. In den Mz-Bcl-2 Klonen B12 und H5 wurden beide Proteine nur transient höher exprimiert, während der Mz-Bcl-2 Klon D2 ein vergleichbares Expressionsmuster wie die PCC7-Mz1-Zellen aufwies.

Durch Bestimmung des Anteils von Neuronen in der Gesamtkultur von Mz-Bcl-2 Klonen und PCC7-Mz1-Zellen konnte diese Vermutung bestätigt werden. Dazu wurden Zellen der Differenzierungszeitpunkte d3 und d6 auf Adhäsionsobjektträger vereinzelt aufgebracht, und

durch Immunfluoreszenzfärbungen der beiden neuronalen Markerproteine GAP-43 und Ex-1 (MÜLLER-HUSMANN *et al.*, 1994) wurde der jeweilige Anteil der neuronalen Zellerivate ermittelt (Abb. 42).

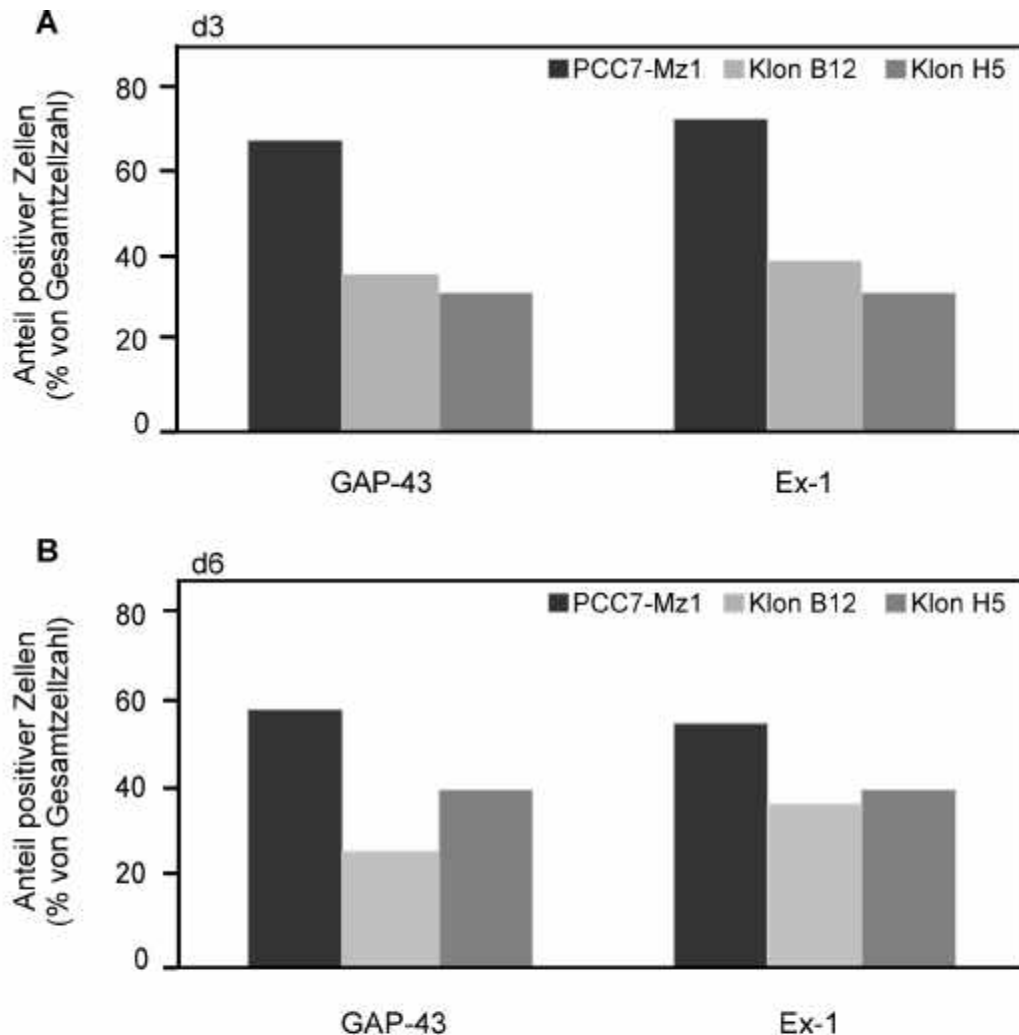


Abb. 42: Anteil neuronaler Zellerivate in PCC7-Mz1-Zellen und in Mz-Bcl-2 Klonen

PCC7-Mz1-Zellen und Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12 und H5 wurden auf Deckgläsern differenziert und an d3 (A) sowie d6 (B) auf Adhäsionsobjektträger einzeln aufgetragen. Durch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-GAP-43-Antiserum und einem anti-Kaninchen-FITC-Antikörper bzw. dem Ex-1 Antikörper und einem anti-Ratte-FITC-Antikörper wurden die neuronalen Zellerivate identifiziert. Der Anteil GAP-43 bzw. Ex-1 positiver Zellen wurde durch Auszählen von ungefähr 300 Zellen pro Ansatz bestimmt. Das Ergebnis konnte durch drei unabhängige Versuche bestätigt werden.

Die Mz-Bcl-2 Klone B12 und H5 wiesen im Vergleich zu PCC7-Mz1-Zellen an d3 und an d6 einen geringeren Anteil neuronaler Zellerivate auf.

In der Kultur der PCC7-Mz1-Zellen exprimierten an d3, wenn bereits unreife Neuronen vorliegen, etwa 70% der Zellen die neuronalen Markerproteine GAP-43 und Ex-1. Dagegen

wiesen nur ungefähr 30% der Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12 und H5 diese beiden Proteine auf. Da sich die Gesamtzahl der Zellen flacher Morphologie während des Differenzierungsverlaufs aufgrund ihrer Teilungsaktivität erhöhte, nahm der relative Anteil der Neurone in der Kultur der PCC7-Mz1-Zellen am Differenzierungstag d6 auf ungefähr 60% ab. In den Mz-Bcl-2 Kulturen lag der Anteil an neuronalen Zellen, die durch die Expression von GAP-43 und Ex-1 identifiziert wurden, mit etwa 30% deutlich niedriger. Diese Daten zeigen, daß während der RA-induzierten neuronalen Differenzierung in Klonen mit einer starken Überexpression von Bcl-2 im Vergleich zu PCC7-Mz1-Zellen ein geringerer Anteil an neuronalen Derivaten gebildet wird.

2.5.3 Morphologie der Neurone der Mz-Bcl-2 Klone

Der Einfluß, den die Überexpression von Bcl-2 auf die Zellmorphologie der differenzierten Zellen sowie das Differenzierungsbild ausübte, wurde anhand morphologischer Charakterisierungen untersucht. PCC7-Mz1-Zellen sowie Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12 und H5, die beide das Differenzierungspotential des P-Typs aufwiesen, wurden mit RA differenziert, und das entstehende Differenzierungsbild wurde mikroskopisch anhand der lebenden Kulturen ausgewertet. Abbildung 20 zeigt typische, vital photographierte Aufnahmen der einzelnen Kulturen an den Differenzierungstagen d0, d3, d6 und d10. Während sich die Differenzierungsbilder an d0 und an d3 sehr ähnlich waren (Abb. 43 a-f), wurden ab d6 deutliche Unterschiede zwischen den PCC7-Mz1-Zellen und den Mz-Bcl-2 Klonen erkennbar. Etwa ab d6 lagerte sich der Hauptteil der Neurone der PCC7-Mz1-Kultur zu sogenannten neuronalen Aggregaten, die aus ungefähr 20 bis 50 Neuronen bestanden, zusammen (Abb. 43 g, k). Abgestorbene Zellen setzten sich auf diesen neuronalen Anhäufungen ab. Die einzelnen neuronalen Aggregate waren jeweils über mehrere neuronale Ausläufer, die sich teilweise strangartig verknüpften, miteinander verbunden. Vereinzelt liegende Neurone traten in den PCC7-Mz1-Kulturen nur noch zu einem geringen Anteil auf. Dahingegen bildeten die Neurone der Mz-Bcl-2 Klone keine neuronalen Aggregate. Die Neurone lagen vereinzelt auf den Zellen flacher Morphologie, wobei sich maximal 2 bis 3 Neurone nebeneinander befanden (Abb. 43 h, i, l, m). Die einzelnen Neurone kommunizierten über stark verzweigte Neurite, die in ihrer Morphologie mit den Ausläufern von neuronalen Primärkulturen vergleichbar waren.

Diese morphologischen Unterschiede wurden durch Immunfluoreszenzanalysen von Zellen des Differenzierungstages d8 verifiziert. Mit einem Antiserum gegen das neuronale Markerprotein GAP-43 wurden spezifisch die Neurone der Kulturen angefärbt (Abb. 44). Während in PCC7-Mz1-Zellen ein neuronales Aggregat, vom dem die Ausläufer sternförmig ausgingen, detektiert wurde (Abb. 44 a), lagen die Neurone der Mz-Bcl-2 Klone B12 und H5 vereinzelt auf dem konfluenten Rasen flacher Zellen und waren über stark verzweigte Neurite miteinander verbunden (Abb. 44 c, e).

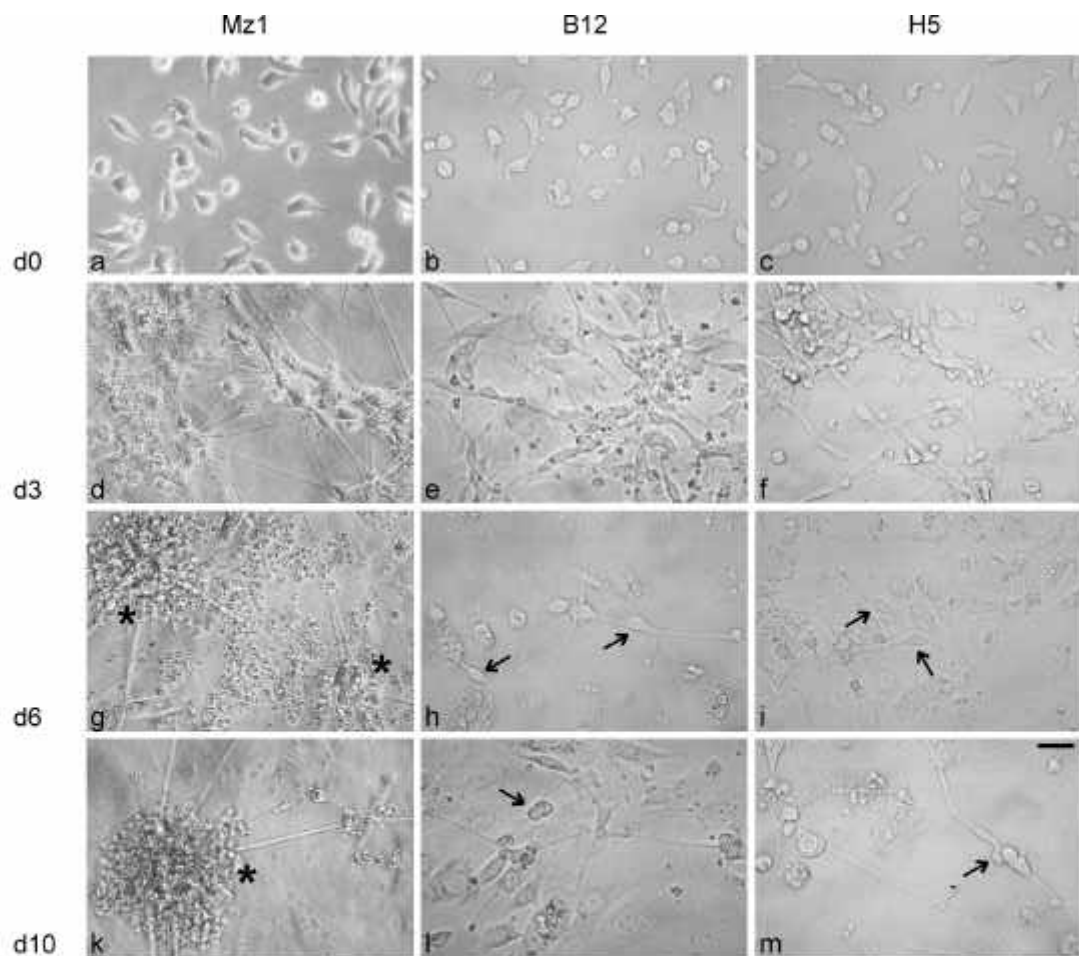


Abb. 43: Morphologie der differenzierenden PCC7-Mz1-Zellen und Mz-Bcl-2 Klone

PCC7-Mz1-Zellen (a, d, g, k) sowie Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12 (b, e, h, l) und H5 (c, f, i, m) wurden auf Deckgläsern ausgesät, mit RA differenziert und an d0 (a, b, c), d3 (d, e, f), d6 (g, h, i) und d10 (k, l, m) vital fotografiert. Die Balkenlänge entspricht 62 μm .

Die dargestellten Bilder zeigen die typischen Differenzierungsbilder. An d0 und d3 ließen sich noch keine morphologischen Unterschiede zwischen PCC7-Mz1-Zellen und den Mz-Bcl-2 Klone erkennen. Etwa ab d6 lagerten sich die Neurone der PCC7-Mz1-Zellen jedoch zu sogenannten neuronalen Aggregaten (*), die über die neuronalen Ausläufer verbunden sind, zusammen. Dahingegen lagen die Neurone der Mz-Bcl-2 Klone (Pfeile) vereinzelt auf den Zellen flacher Morphologie und kommunizierten über stark verzweigte Neurite miteinander.

Bei der mikroskopischen Analyse von lebenden Kulturen sehr später Differenzierungszeitpunkte – etwa ab d12 – erschienen die Neurone der Mz-Bcl-2 Klone im Vergleich zu den Neuronen der PCC7-Mz1-Kultur besser erhalten und gesünder. PCC7-Mz1-Neurone wiesen zu diesen Zeitpunkten oftmals geschädigte Zellmembranen und eingezogene Neurite auf. Dahingegen sahen die Bcl-2 überexprimierenden Neurone größer, schöner und unbeschädigter aus.

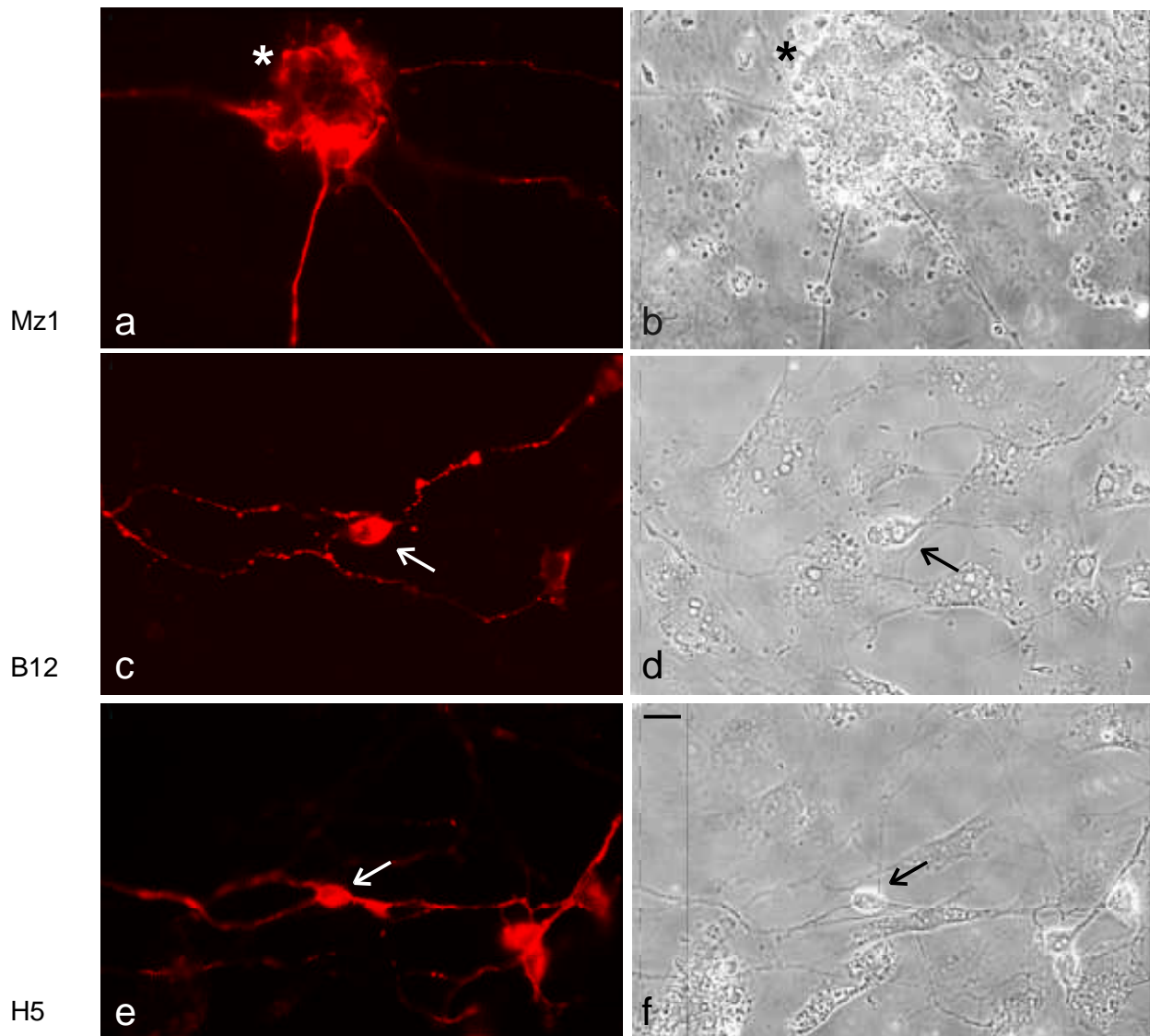


Abb. 44: Vergleich des Differenzierungsbildes von PCC7-Mz1-Zellen und Mz-Bcl-2 Kulturen

PCC7-Mz1-Zellen (a, b) und Zellen der Mz-Bcl-2 Klone B12 (c, d) und H5 (e, f) wurden auf Deckgläsern ausgesät, mit RA differenziert und an d8 fixiert. Durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antiserum gegen das neuronenspezifische GAP-43 Protein sowie einem anti-Kaninchen-Cy3-Antikörper wurden die Neurone nachgewiesen (a, c, e). Die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen sind in b, d und f dargestellt. Die Balkenlänge entspricht 15,6 μm .

Während es bei den PCC7-Mz1-Zellen etwa ab dem Differenzierungstag d6 zur Zusammenlagerung der Neurone in sogenannten neuronalen Aggregaten (*) kam, lagen die Neurone der Mz-Bcl-2 Klone vereinzelt (Pfeile) auf den Zellen flacher Morphologie und waren über stark verzweigte Ausläufer miteinander verbunden.

IV Diskussion

Die Untersuchung von neuraler Entwicklung ist aufgrund der Komplexität des Säugergehirns *in vivo* kaum möglich, so daß über die molekularen Vorgänge, die für die Entstehung der verschiedenen neuronalen Phänotypen aus pluripotenten Stammzellen verantwortlich sind, bisher nur wenig bekannt ist. In dieser Arbeit wurde daher die PCC7-Mz1-Zelllinie als *in vitro* Modell zur Analyse neuraler Determinierungs- und Differenzierungsprozesse verwendet. Nach Behandlung mit dem Morphogen *all-trans* Retinsäure (RA) differenzieren PCC7-Mz1-Stammzellen in ein stabiles Muster aus Neuronen, Fibroblasten und Astroglia-Zellen, während parallel ein reproduzierbarer Anteil der Kultur apoptotisch stirbt. Dadurch ist es möglich, Differenzierungs- und Apoptoseereignisse, die auch im natürlichen Gewebe parallel ablaufen, gleichzeitig zu analysieren. Zum Verständnis der molekularen Mechanismen, die die neurale Differenzierung und Apoptose der PCC7-Mz1-Zellen regulieren, wurde die Funktion zweier Schlüsselmoleküle dieser Prozesse – GAP-43 und Bcl-2 – charakterisiert. Ausgehend von der parentalen PCC7-Mz1-Zelllinie wurden Klone etabliert, die eine stabile Überexpression des GAP-43 bzw. des Bcl-2 Proteins aufwiesen, so daß genetisch identische Kulturen in genügenden Mengen für biochemische und zellbiologische Analysen zur Verfügung standen.

1. Frühe Expression von GAP-43 während der neuralen Entwicklung

Die physiologische Bedeutung von GAP-43 im Nervensystem läßt sich durch verschiedene Indizien belegen: (1) GAP-43 macht etwa 0,5% vom Gesamtproteingehalt des Säugergehirns aus (CIMLER *et al.*, 1985). (2) GAP-43 ist ein Hauptsubstrat für die Proteinkinase C, welche entscheidend in neurale Differenzierung involviert ist (TANAKA & NISHIZUKA, 1994). (3) GAP-43 ist sowohl an Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen (CHAKRAVARTHY *et al.*, 1999) als auch an G_o -Protein gekoppelten (STRITTMATTER *et al.*, 1992) Signaltransduktionswegen beteiligt.

Zur Identifizierung der Funktion während der frühen neuralen Entwicklung wurde in dieser Arbeit die Expression von GAP-43 im PCC7-Mz1-Zellmodell untersucht. Während GAP-43 in Stammzellen kaum nachweisbar war, wurde seine Expression innerhalb von 24 Stunden nach Behandlung mit RA auf mRNA- und auf Protein-Ebene induziert. Promoteranalysen konnten zeigen, daß die Transkription des GAP-43 Gens durch zwei verschiedene Promotoren reguliert wurde. Am Promoter P1 fand bereits in Stammzellen basale Transkription statt, wohingegen der stromabwärts gelegene Promoter P2 erst nach Induktion der neuralen Differenzierung durch RA aktiviert wurde. Dieser Promoter scheint daher für die neuronenspezifische Expression von GAP-43 verantwortlich zu sein. Möglicherweise kommt es zu einer direkten Aktivierung des Promoters P2 durch die Retinsäure-Rezeptorsubtypen $RAR\alpha2$ oder $RAR\beta2$, die in PCC7-Mz1-Zellen innerhalb von 3 Stunden nach Zugabe von RA hochreguliert werden (HEIERMANN *et al.*,

1992). Als Antagonist der Retinsäure-Rezeptoren wurde der Transkriptionsfaktor COUP-TF I ("chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I"), der während der neuronalen Entwicklung stark exprimiert wird, beschrieben (COONEY *et al.*, 1993; MANGELSDORF & EVANS, 1995). Da gezeigt werden konnte, daß durch die Überexpression von COUP-TF I in einer Teratokarzinomzelllinie sowohl die neurale Differenzierung als auch die Expression von GAP-43 nach Induktion mit RA verzögert wird (NEUMAN *et al.*, 1995), könnte COUP-TF I in PCC7-Mz1-Zellen die Wirkung von Retinsäure-Rezeptoren antagonisieren und die Transkription des P2-Promoters von GAP-43 in PCC7-Mz1-Stammzellen reprimieren. Innerhalb der bekannten Promoter-Sequenz des GAP-43 Gens konnten bis jetzt weder Bindungsstellen für Retinsäure-Rezeptoren noch für COUP-TF I identifiziert werden. Enhancerelemente dieser Transkriptionsfaktoren liegen jedoch im allgemeinen sehr weit stromaufwärts des Transkriptionsstartes.

24 Stunden nach Behandlung mit RA (d1) exprimierten etwa 75 % der PCC7-Mz1-Zellen GAP-43. Fast alle GAP-43 positiven Zellen waren zu diesem Differenzierungszeitpunkt noch proliferativ. GAP-43 wird also bereits in mitotisch noch aktiven, neuronalen Vorläuferzellen, die durch das RA-Signal für das neuronale Schicksal determiniert wurden, exprimiert, und konnte somit als ein Markerprotein für sehr frühe neuronale Differenzierungsprozesse etabliert werden. Daß etwa 70% der PCC7-Mz1-Stammzellen in neuronale Derivate differenzieren, wurde durch Analysen von spezifischen Markerproteinen gezeigt (LANG *et al.*, 1989; MÜLLER-HUSMANN *et al.*, 1994). Eine während der neuronalen Differenzierung sehr früh induzierte Expression von GAP-43 konnte durch Untersuchungen an fetalen Rattengehirnschnitten verifiziert werden. Die Expression von GAP-43 wurde schon ab Pränataltag 11 und bereits in noch proliferierenden, neuronalen Vorläuferzellen der Ventrikularzone des Neuroepithels nachgewiesen (ESDAR *et al.*, 1999a). Die Induktion der Expression von GAP-43 tritt demnach nicht erst in postmitotischen Neuronen auf und korreliert nicht, wie bisher angenommen (BIFFO *et al.*, 1990; DANI *et al.*, 1991), mit der Entstehung neuronaler Ausläufer. GAP-43 wird somit bereits exprimiert, wenn auf molekularer Ebene noch Determinierungs- und Differenzierungsentscheidungen ablaufen. Daß GAP-43 während der frühen neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen bereits funktionell ist, konnte durch "*in vivo* Phosphorylierungsexperimente" demonstriert werden. GAP-43 stellt schon in unreifen Neuronen (d2-d4) ein physiologisches Substrat für PKC dar. Als Kandidat für die Phosphorylierung von GAP-43 während der frühen neuronalen Entwicklung wird die PKC-Isoform η postuliert, da diese Isoform ebenso wie GAP-43 an d1 und d2 am Golgi-Apparat lokalisiert ist (ESDAR *et al.*, 1999a).

2. GAP-43 fördert die Ausprägung des neuronalen Phänotyps von PCC7-Mz1-Zellen

Da GAP-43 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits sehr früh während der neuronalen Entwicklung exprimiert wird und in diesen frühen Entwicklungsstadien auch schon als physiologisches Substrat für PKC funktionell ist, konnte postuliert werden, daß das Protein in die Regulation neuronaler Zellstammbaumentscheidungen involviert ist. Um diese Hypothese experimentell zu belegen, wurden von den PCC7-Mz1-Zellen Klone etabliert, die GAP-43 stabil überexprimierten. Die Analyse und Charakterisierung dieser Klone lieferte mehrere Hinweise darauf, daß GAP-43 tatsächlich an der Etablierung sowie Stabilisierung des neuronalen Phänotyps von PCC7-Mz1-Zellen beteiligt ist: (1) Alle isolierten Mz-GAP-43 Klone besitzen das Differenzierungspotential eines N- oder O-Klons, d.h. die Zellen differenzieren nach Behandlung mit RA fast ausschließlich in neuronale Derivate. (2) In den Mz-GAP-43 Klonen lassen sich weder auf mRNA- noch auf Proteinebene Markermoleküle für nicht-neuronale Derivate nachweisen. (3) Die Mz-GAP-43 Klone exprimieren schon in Stammzellen ein alternativ gespleißtes Transkript des neuronenspezifischen Transkriptionsfaktors NCNF ("neuronal cell nuclear factor"), wohingegen in PCC7-Mz1-Zellen die Expression von NCNF erst ungefähr 6 Stunden nach Zugabe von RA induziert wird (SCHNEIDER-HIRSCH, 1996). Da NCNF vermutlich als reprimierender Kernrezeptor in die Stabilisierung des neuronalen Phänotyps involviert ist (BAUER *et al.*, 1997), ist es denkbar, daß NCNF in den Mz-GAP-43 Klonen die Expression von Genen, die für die Entwicklung der nicht-neuronalen Phänotypen verantwortlich sind, unterdrückt. (4) Während MzN-Klone, die durch einfache Subklonierung aus PCC7-Mz1-Zellen erzeugt wurden, durch die Differenzierung auf Laminin beschichteten Wachstumsflächen in den P-Phänotyp revertiert werden können (LANG *et al.*, 1989; JOSTOCK *et al.*, 1998), bilden die Zellen der Mz-GAP-43 Klone auch auf Laminin fast ausschließlich neuronale Derivate aus. Die Mz-GAP-43 Klone scheinen daher nicht nur N-Klon, sondern stärker für das neuronale Entwicklungsschicksal determiniert zu sein.

Somit konnten mehrere Evidenzen dafür gefunden werden, daß GAP-43 in PCC7-Mz1-Stammzellen neurale Zellstammbaumentscheidungen dahingehend beeinflusst, daß die Ausprägung des neuronalen Zellschicksals gefördert und die des nicht-neuronalen Schicksals unterdrückt wird. Diese bevorzugte Entwicklung der neuronalen Subtypen in den Mz-GAP-43 Klonen ist nicht auf klonale Selektion zurückzuführen, da durch die Subklonierung von PCC7-Mz1-Zellen nach Transfektion mit dem leeren pcDNA3-SV40-Vektor ("mock" Transfektion) hauptsächlich P-Klone entstanden, die wie der PCC7-Mz1-Ursprungsklon in die drei verschiedenen Zelltypen des Neuroektoderms – Neurone, Fibroblasten und Astroglia-Zellen – differenzieren. Auch scheint die Überexpression von GAP-43 in nicht-neuronal determinierten Zellen nicht zu deren Absterben zu führen, was ebenfalls die Isolierung neuronaler Klone zur Folge gehabt hätte. Da jedoch bereits eine ektopische Expression von GAP-43 in nicht-

neuronalen Zellen durchgeführt worden ist (ZUBER *et al.*, 1989b), und da die in den Mz-GAP-43 Klonen des O-Typs vereinzelt auftretenden Zellen flacher Morphologie ebenfalls GAP-43 enthielten, ist eine Expression von GAP-43 im nicht-neuronalen Kontext grundsätzlich möglich. Eine durch die Überexpression von GAP-43 induzierte Beschleunigung des neuronalen Differenzierungsverlaufs der PCC7-Mz1-Zellen trat dagegen nicht auf. Die zeitliche Entstehung charakteristischer Merkmale reifer Neurone, wie die Expression des neuronalen Clathrins sowie die Ausprägung neuronaler Polarität war in den Mz-GAP-43 Klonen im Vergleich zur PCC7-Mz1-Kultur nicht verändert. Die Überexpression von GAP-43 hatte in PCC7-Mz1-Zellen demnach keine Auswirkung auf die Reifung der neuronalen Zelltypen, sondern beeinflusste die neuronalen Zellstammbaumentscheidungen während der frühen neuronalen Entwicklung. Ähnliche Hinweise wurden in einer anderen Studie erhalten, bei der in der embryonalen Karzinomzelllinie P19 durch die Ausschaltung des GAP-43 Gens die Etablierung neuronaler Phänotypen verhindert wurde. Im Vergleich zu Wildtyp P19-Zellen entwickelten sich in den GAP-43-negativen Zellen nach Induktion der Differenzierung signifikant weniger Neurone (MANI *et al.*, 2000).

Daher stellt sich die Frage, wie GAP-43 auf der molekularen Ebene in die neuronalen Determinierungs- und Differenzierungsprozesse eingreift. Durch die Arbeiten von Frau Dr. R. Jostock konnte gezeigt werden, daß das neuronale Zellschicksal in den PCC7-Mz1-Zellen der dominante Entwicklungsweg ("default pathway") ist, wohingegen die Entstehung von nicht-neuronalen Derivaten induziert werden muß. Für die Induktion der nicht-neuronalen Zellen scheint eine sogenannte ZVA (zelltypverschiebende Aktivität) verantwortlich zu sein (JOSTOCK *et al.*, 1998). Die biochemische Natur der ZVA konnte zwar noch nicht identifiziert werden, doch scheint es sich um einen sekretierten oder membranständigen Liganden zu handeln, der an einen spezifischen Rezeptor bindet und dadurch die neuronale Differenzierung unterdrückt. Während der frühen Determinierungsprozesse von PCC7-Mz1-Zellen scheinen einige Vorläuferzellen verstärkt die ZVA und/oder den ZVA-Rezeptor zu exprimieren, so daß diese Zellen den nicht-neuronalen Entwicklungsweg einschlagen. Vorläuferzellen der N-Subklone scheinen nur eine sehr geringe ZVA und/oder ZVA-Rezeptor Expression aufzuweisen, so daß aus diesen Zellen nur neuronale Derivate entstehen. Signale, die über extrazelluläre Matrixproteine wie Laminin oder Fibronectin vermittelt werden, können vermutlich die Affinität der ZVA für ihren Rezeptor verstärken, so daß auf Laminin beschichteten Wachstumsflächen differenzierte N-Klone auch nicht-neuronale Zelltypen bilden können. Eine mögliche Erklärung für den Einfluß von GAP-43 auf die Zellstammbaumentscheidungen der PCC7-Mz1-Zellen könnte nun darin bestehen, daß GAP-43 in die vom ZVA-Rezeptor ausgehende Signalkaskade blockierend eingreift, so daß die Induktion der Zellen flacher Morphologie (Fibroblasten und Astroglia-Zellen) ausbleibt. Dadurch ließe sich auch begründen, wieso die Mz-GAP-43 Klone auf das durch Laminin verstärkte ZVA-Signal nicht mit der Bildung nicht-neuronaler Zellderivate

reagieren. Möglicherweise werden vom ZVA-Rezeptor ausgehende Signale über Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Prozesse vermittelt, die aufgrund der verstärkten GAP-43 Expression inhibiert werden. Durch "Cross-linking Experimente" konnte in dieser Arbeit die Interaktion zwischen GAP-43 und Calmodulin in den Stammzellen der Mz-GAP-43 Klonen nachgewiesen werden, was in den Stammzellen zu einer Depletion von freiem Calmodulin und damit zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Bisher sind ungefähr 30 verschiedene Zielmoleküle von Ca^{2+} /Calmodulin beschrieben worden. So kommt es zu Interaktionen mit Calmodulin-abhängigen Kinasen (I-IV), der Proteinphosphatase Calcineurin, NO-Synthasen, Ca^{2+} -Kanälen, G-Proteinen und Regulatoren des Zellzyklusses (RASMUSSEN & MEANS, 1989; HERGET *et al.*, 1994; VOGEL, 1994). Über welche Signalwege Calmodulin möglicherweise Einfluß auf neuronale Entwicklung ausübt, ist allerdings noch nicht bekannt. Daß Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Signalwege jedoch tatsächlich an neuronalen Differenzierungsprozessen beteiligt sind, wurde durch Arbeiten an PC12-Zellen belegt. Die Abnahme der intrazellulären Calmodulin-Konzentration führte hier zum spontanen Auswachsen von neuronalen Ausläufern (VANBERKUM & GOODMAN, 1995; DAVIDKOVA *et al.*, 1996).

Desweiteren könnte in den Mz-GAP-43 Klonen durch die reprimierenden Effekte des Transkriptionsfaktors NCNF, der in diesen Klonen bereits in den Stammzellen exprimiert wird, die Expression der ZVA und/oder des ZVA-Rezeptors fast vollständig unterdrückt sein. Daß NCNF in Differenzierungsprozesse involviert ist, konnte bisher nur im Testisgewebe nachgewiesen werden, wo der zu NCNF homologe Transkriptionsfaktor GCNF ("germ cell nuclear factor") die Reifung von Spermatozyten durch die Regulation der Protamin-Gene kontrolliert (HUMMELKE *et al.*, 1998).

Um eine endgültige Einordnung von GAP-43 in die molekularen Signalwege, die für die Zellstammbaumentscheidungen verantwortlich sind, treffen zu können, ist es jedoch notwendig, die biochemische Natur der ZVA und ihres Rezeptors zu identifizieren.

Während bisherige Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von GAP-43 vor allem eine modulierende Funktion in schon neuronal differenzierten Zellen auf das Auswachsen und die Wegfindung von neuronalen Ausläufern beschreiben (STRITTMATTER *et al.*, 1995; AIGNER *et al.*, 1995), konnten die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß GAP-43 bereits in pluripotenten Stammzellen entscheidend an frühen neuronalen Determinierungsprozessen und Zellstammbaumentscheidungen beteiligt ist (Abb. 47).

3. Multiple Effekte von Bcl-2 während der frühen neuralen Entwicklung

Bcl-2 wurde vor über zehn Jahren als Onkogen in humanen Lymphomen identifiziert (TSUJIMOTO *et al.*, 1984; BAKHSI *et al.*, 1985). Forschungen innerhalb der letzten Jahre konnten zeigen, daß Bcl-2 in seiner Eigenschaft als antiapoptotisches Protein in verschiedene zelluläre Signalwege involviert ist. So reguliert Bcl-2 durch Interaktionen mit anderen Molekülen, die ebenfalls an der Kontrolle des Zelltods beteiligt sind, das Apoptose-Programm in unterschiedlichen Zelltypen (FARROW & BROWN, 1996; WHITE, 1996). Außerdem kann Bcl-2 sowohl mitogene Signaltransduktionswege durch die Bindung der Kinase Raf-1 (WANG *et al.*, 1996) und der Proteinphosphatase Calcineurin (SHIBASAKI & MCKEON, 1995) als auch die Transkription durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor-bindenden Protein BAG-1 ("Bcl-2-associated anti-death gene-1") (LIU *et al.*, 1998) beeinflussen. In weiteren Untersuchungen konnte eine Kontrolle des Zellzyklusses durch Bcl-2 nachgewiesen werden (BORNER, 1996; GIL-GOMEZ *et al.*, 1998). Aufgrund seiner multifunktionellen Eigenschaften wird Bcl-2 daher auch als "Swiss army knife" bezeichnet (REED, 1997a). Da über die Bedeutung von Bcl-2 während der frühen Phase der neuralen Entwicklung nur wenig bekannt war, wurde der Effekt von Bcl-2 auf die durch RA induzierte neurale Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen analysiert. Der Einfluß einer potentiellen Blockierung der RA-induzierten Apoptose durch die Überexpression von Bcl-2 auf das Differenzierungspotential der Stammzellen sowie auf das entstehende Differenzierungsbild der PCC7-Mz1-Kultur wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

3.1 Bcl-2 inhibiert Apoptose in pluripotenten neuralen Vorläuferzellen

Die Behandlung von pluripotenten PCC7-Mz1-Stammzellen mit RA führt neben der Induktion der neuralen Differenzierung zum Absterben eines definierten Anteils der Kultur. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Zugabe von RA sinkt daher die Vitalität gegenüber unbehandelten Kontrollen auf etwa 75% (HERGET *et al.*, 1998). Alle in dieser Arbeit erzeugten Mz-Bcl-2 Klone wiesen dagegen 24 Stunden nach Inkubation mit RA eine höhere Vitalität als die parentalen PCC7-Mz1-Zellen auf. In den Mz-Bcl-2 Klonen, bei denen die Bcl-2 Expression durch den SV40-Promoter reguliert wurde, war die Überexpression von Bcl-2 im Vergleich zu den PCC7-Mz1-Zellen etwa 7-fach höher, und die durch RA induzierte Abnahme der Vitalität betrug durchschnittlich nur 5%. Dagegen war die Expression von Bcl-2 in den Klonen, bei denen die Transkription durch den CMV-Promoter kontrolliert wurde, gegenüber PCC7-Mz1-Zellen nur etwa 3-fach erhöht, und die Vitalitätsabnahme lag mit 17% deutlich höher als bei den Mz-Bcl-2 Klonen mit SV40-Promoter. Das durch RA induzierte Ausmaß der Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen steht somit in inverser Korrelation zur Menge der Bcl-2 Expression.

Jedoch konnte die RA-induzierte Apoptose auch in den Mz-Bcl-2 Klonen mit starker Bcl-2 Expression nicht vollständig blockiert werden. Möglicherweise ist die Menge an Bcl-2 Protein in den Zellen der Mz-Bcl-2 Kulturen noch nicht ausreichend, um alle proapoptotischen Signale zu inhibieren. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Multigenfamilie wie Bax, Bak und Bad mit Bcl-2 interagieren und dadurch seine protektive Wirkung blockieren können (OLTVAI *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 1995). Auch in PCC7-Mz1-Zellen könnte daher das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2 verwandten Proteinen für das Schicksal einer Zelle verantwortlich sein.

Da nach Behandlung mit RA sowohl die Caspase-Aktivität als auch die Fragmentierung der chromosomalen DNA in den Bcl-2-überexprimierenden Klonen im Vergleich zu den PCC7-Mz1-Zellen verringert war, konnte demonstriert werden, daß Bcl-2 oberhalb der Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen in den apoptotischen Signalweg eingreift (Abb. 45). Dieses Ergebnis liegt in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, in denen gezeigt wurde, daß die Überexpression von Bcl-2 ebenfalls die Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen, die als sogenannte "Effektor-Enzyme" für die Ausführung des apoptotischen Prozesses verantwortlich sind, inhibieren kann (SRINIVASAN *et al.*, 1996; SHIMIZU *et al.*, 1996).

Wie durch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte, führt das durch RA induzierte Apoptose-Programm in den PCC7-Mz1-Zellen zum Anstieg des endogenen Ceramid-Gehalts. Dabei scheint RA durch die Aktivierung der Ceramid-Synthase den *de novo*-Syntheseweg von Ceramiden anzuschalten, so daß es innerhalb von 24 Stunden nach Zugabe von RA zu einem 3 bis 4-fachen Anstieg des intrazellulären Ceramid-Gehalts kommt (OEHRLEIN-KARPI, 1998; ESDAR *et al.*, 1999b). Eine Akkumulation von Ceramiden als Folge der Behandlung mit verschiedenen apoptotischen Agonisten konnte schon in unterschiedlichen Zellsystemen beschrieben werden (BOSE *et al.*, 1995; VERHEJI *et al.*, 1996), und die Bedeutung von Ceramiden als Mediatoren apoptotischer Signalwege wird allgemein anerkannt (HAIMOVITZ-FRIEDMAN *et al.*, 1997; OKAZAKI *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich daher die Frage, wie Bcl-2 in der durch RA induzierten apoptotischen Signalkaskade seine antiapoptotische Wirkung ausübt. Durch die Zugabe von synthetischen, membrangängigen Ceramiden zu den PCC7-Mz1-Zellen kann dosisabhängig Apoptose ausgelöst werden. Die halbmaximale Effektorkonzentration von C₆-Ceramid (EC₅₀-Wert) lag für die Mz-Bcl-2 Klone (17 µM) im Vergleich zu den PCC7-Mz1-Zellen (10 µM) signifikant höher. Außerdem wurde durch die Überexpression von Bcl-2 die durch C₆-Ceramid induzierte Fragmentierung der chromosomalen DNA inhibiert. Bcl-2 wirkt somit in der Apoptose-Signalkaskade der PCC7-Mz1-Zellen unterhalb des Ceramid-Signals, da die Ceramid-induzierte Apoptose durch die Überexpression von Bcl-2 blockiert werden kann (Abb. 45). Vorläufige Ergebnisse weisen darauf hin, daß Bcl-2 nicht in die Regulation der Ceramid-Synthese involviert ist, da der

endogene Ceramid-Gehalt nach Behandlung mit RA in den Mz-Bcl-2 Klonen ebenfalls ansteigt (Daten nicht gezeigt).

Daß Bcl-2 seinen antiapoptotischen Einfluß in der Exekutionsphase des Apoptose-Programms der PCC7-Mz1-Zellen ausübt (Abb. 45), und nicht nur spezifisch gegen die RA-induzierte Apoptose schützt, konnte durch Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Apoptose-Stimuli demonstriert werden. Durch die Überexpression von Bcl-2 waren die Zellen auch gegen den Entzug von Serum, die Behandlung mit Staurosporin und Glutamat sowie die Bestrahlung mit UV-Licht geschützt. Diese verschiedenen apoptotischen Agonisten aktivieren die Apoptose-Kaskade durch unterschiedliche zelluläre Signalwege ("private pathway"), die alle zur Aktivierung der hochkonservierten, in allen Zelltypen gleichen Exekutionsphase ("common pathway") der Apoptose führen.

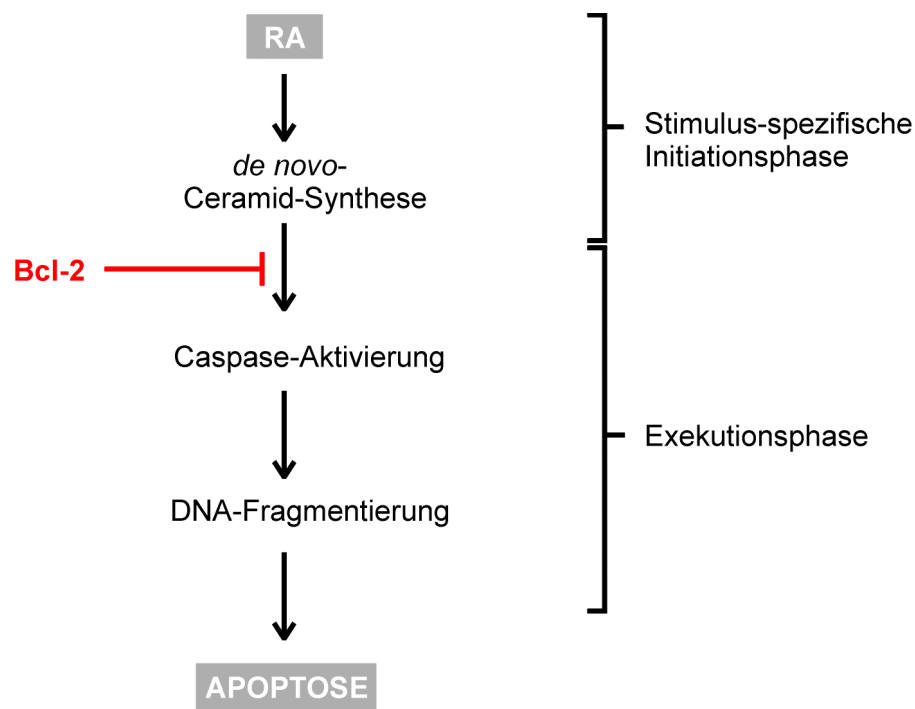


Abb. 45: Das Apoptose-Programm von PCC7-Mz1-Zellen

Durch die Behandlung mit Retinsäure (RA) wird in einem definierten Anteil der PCC7-Mz1-Kultur Apoptose ausgelöst. Während der Stimulus-spezifischen Initiationsphase der Apoptose ("private pathway") kommt es zu einem Anstieg des endogenen Ceramid-Gehalts durch *de novo*-Ceramid-Synthese. Durch die Überexpression von Bcl-2 wird die RA- und die Ceramid-induzierte Apoptose inhibiert. In der Exekutionsphase ("common pathway") der Apoptose-Kaskade liegt Bcl-2 oberhalb der Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen, die durch die Spaltung spezifischer Substrate bzw. durch die Fragmentierung der DNA für die Ausführung des apoptotischen Prozesses verantwortlich sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten somit zeigen, daß Bcl-2 bereits während der frühen neuronalen Differenzierung die durch RA induzierte Apoptose von pluripotenten Stammzellen inhibieren kann. Ein protektiver Effekt von Bcl-2 für die RA-induzierte Apoptose der Embryokarzinomzelllinie P19 war bereits früher beschrieben worden (OKAZAWA *et al.*, 1996). Die RA-induzierte Apoptose findet in den P19-Zellen jedoch bis zu vier Tage vor der Induktion der neuronalen Differenzierung statt. Daher ist es in dieser Zelllinie nicht möglich, einen direkten Zusammenhang zwischen der RA-induzierten neuronalen Differenzierung und damit assoziierten Apoptoseereignissen zu analysieren. In PCC7-Mz1-Zellen werden dagegen Differenzierung und Apoptose nach Zugabe von RA gleichzeitig ausgelöst, so daß beide Prozesse parallel untersucht werden können.

3.2 RA induziert in PCC7-Mz1-Zellen den mitochondrialen Apoptose Signalweg

Arbeiten der letzten Jahre verdeutlichten, daß es zwei grundsätzlich verschiedene Apoptose-Signaltransduktionswege gibt, die durch die Beteiligung unterschiedlicher Moleküle sowie durch verschiedene Kinetiken voneinander abgegrenzt werden können (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998; SCAFFIDI *et al.*, 1998) (Abb. 46). Der Signalweg vom sogenannten Typ I verläuft über die Aktivierung von Mitgliedern der "Todesrezeptor"-Genfamilie, zu der unter anderem der TNF- und der Fas-Rezeptor gehören, und führt zu einer schnellen Stimulierung der Caspase-Kaskade nach Aktivierung der Initiator-Caspase 8 (NAGATA, 1997; ASHKENAZI & DIXIT, 1998). Dieser Signalweg kann im Gegensatz zum Typ II nicht durch Bcl-2 blockiert werden (STRASSER *et al.*, 1995; NEWTON *et al.*, 1998). Der Apoptoseweg vom Typ II wird auch als mitochondrialer Signalweg bezeichnet, da es hier nach Aktivierung des Apoptose-Programms durch verschiedene Stimuli wie z.B. Ceramide, zur Freisetzung von Apoptose-induzierenden Faktoren (AIF) aus den Mitochondrien kommt (GREEN & REED, 1998; MIGNOTTE & VAYSSIERE, 1998). Am besten charakterisiert wurde bisher die Freisetzung von Cytochrom c, das im Cytoplasma einen Komplex ("Apoptosom") mit Apaf-1 ("apoptotic protease activating factor") und der Pro-Caspase 9 bildet und dadurch die Aktivierung der Caspase-Kaskade initiiert (LIU *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997b). Bcl-2 kann dabei sowohl die Freisetzung von Cytochrom c als auch die Bildung des Apoptosoms aus Cytochrom c, Apaf-1 und Pro-Caspase 9 inhibieren (KLUCK *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1997).

Aufgrund folgender Evidenzen kann der durch RA induzierte Apoptoseweg der PCC7-Mz1-Zellen dem mitochondrialen Signalweg zugeordnet werden: (1) Die RA-induzierte Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen führt zum Anstieg des endogenen Gehalts an Ceramiden, die als Aktivatoren des mitochondrialen Signalwegs beschrieben sind. (2) Nach Behandlung der PCC7-Mz1-Zellen mit RA kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol, was durch die Überexpression von Bcl-2 verhindert wird. (3) Die durch RA induzierte Apoptose von

PCC7-Mz1-Zellen wird durch Bcl-2 kontrolliert, da die Überexpression von Bcl-2 Apoptose inhibiert. In dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal ein durch RA induzierter Apoptoseprozeß dem mitochondrialen Signalweg vom Typ II eindeutig zugeordnet werden.

Wie bereits diskutiert wurde, kann die RA-induzierte Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen durch die Überexpression von Bcl-2 nicht vollständig blockiert werden. Es ist daher möglich, daß in PCC7-Mz1-Zellen neben dem mitochondrialen Signalweg auch der Bcl-2-unabhängige Apoptoseweg vom Typ 1 zu einem geringen Teil aktiviert wird. So könnte durch das RA-Signal die Expression des Fas-Liganden induziert werden, wodurch über einen parakrinen Mechanismus Apoptose induziert werden könnte. Eine Regulation der Expression des Fas-Liganden durch RA wurde bereits in einer humanen Myelom-Zelllinie nachgewiesen (OKAMURA *et al.*, 1998).

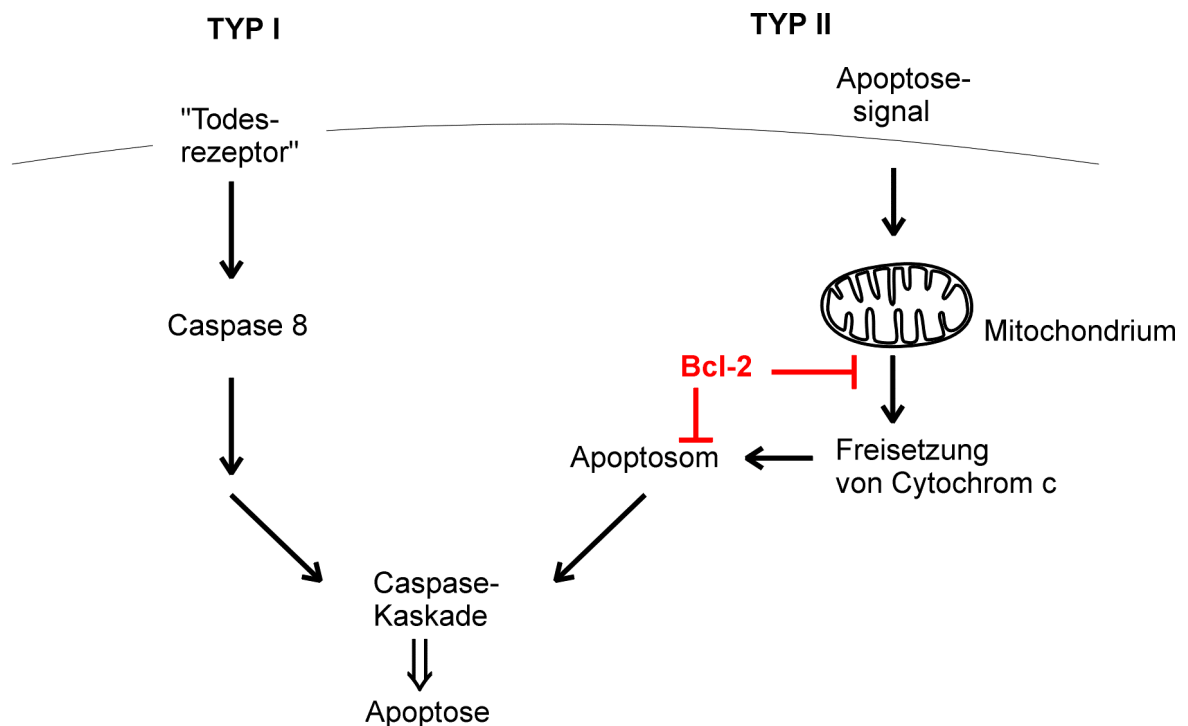


Abb. 46: Die zwei unterschiedlichen Apoptose-Signalwege

Beim Apoptoseweg vom Typ I kommt es durch die Stimulierung sogenannter "Todesrezeptoren" (Fas-, TNF-Rezeptor) zur Aktivierung der Caspase 8, wodurch die Caspase-Kaskade initiiert und die Exekutionsphase der Apoptose ausgelöst wird. Dieser Signalweg kann nicht durch Bcl-2 inhibiert werden. Der Apoptoseweg vom Typ II, der auch als mitochondrialer Signalweg bezeichnet wird, kann durch verschiedene apoptotische Stimuli induziert werden. Durch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien wird das sogenannte Apoptosom gebildet, und die Caspase-Kaskade wird aktiviert. Bcl-2 kann sowohl die Freisetzung von Cytochrom c als auch die Bildung des Apoptosoms blockieren.

Die RA-induzierte Apoptose von PCC7-Mz1-Zellen verläuft über den mitochondrialen Signalweg.

3.3 Bcl-2 verlängert den Zellzyklus neuraler Vorläuferzellen

Anhand von Wachstumskurven sowie durch die Bestimmung der Generationszeiten wurde gezeigt, daß sich die Zellen der Mz-Bcl-2 Klone im Vergleich zu den PCC7-Mz1-Zellen langsamer teilen. Zellzyklusanalysen demonstrierten, daß die Stammzellen der Mz-Bcl-2 Klone im Vergleich zur PCC7-Mz1-Kultur einen höheren Anteil an Zellen in der G1/G0-Phase aufwiesen. Die Zellen der Mz-Bcl-2 Klone befanden sich demnach länger in der G1-Phase, in der sich die Zelle auf die anschließende DNA-Replikation vorbereitet, als die PCC7-Mz1-Zellen. Daß Bcl-2 seine antiapoptotischen Effekte während der G1-Phase ausübt, indem es Kontrollproteine des Zellzyklusses beeinflusst, wurde bereits beschrieben (BORNER, 1996; MAZEL *et al.*, 1996). So konnte in den Stammzellen der Mz-Bcl-2 Klone bereits die hypophosphorylierte, aktive Form des Retinoblastoma (Rb)-Proteins nachgewiesen werden, während in PCC7-Mz1-Stammzellen nur hyperphosphoryliertes, inaktives Rb-Protein vorlag. Das Rb-Protein ist ein entscheidender Regulator des Zellzyklusses während der G1-Phase und kann z.B. durch die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F den Übertritt in die S-Phase inhibieren (WEINBERG, 1995). Möglicherweise verhindert Bcl-2 durch die Stabilisierung von Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen ("Cdk") die Phosphorylierung und damit verbundene Inaktivierung von Rb durch Cdks (GIL-GOMEZ *et al.*, 1998).

Durch die Analysen des Zellzyklusses konnte weiterhin gezeigt werden, daß auch 24 Stunden nach Behandlung mit RA (d1) der Anteil an Zellen in der G1/G0-Phase in den Mz-Bcl-2 Klonen gegenüber der PCC7-Mz1-Kultur deutlich erhöht war. Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, daß die G1-Phase der Zellen der Mz-Bcl-2 Klone, wie es bereits für die Stammzellen beschrieben wurde, verlängert ist. Möglicherweise treten die Zellen der Mz-Bcl-2 Klone nach Induktion der Differenzierung jedoch auch schneller in die G0-Phase ein als die PCC7-Mz1-Zellen. Dieser Effekt konnte bereits für HL-60-Zellen demonstriert werden, wo Bcl-2 überexprimierende Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nach Auslösung der Differenzierung schneller den Zellzyklus verlassen und in die G0-Phase übergehen (VAIRO *et al.*, 1996). PCC7-Mz1-Zellen verlieren durch die Behandlung mit RA ihre Fähigkeit zur Proliferation, jedoch konnte gezeigt werden, daß sich fast alle Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Zugabe von RA noch einmal teilen (ESDAR *et al.*, 1999a). Da die Mz-Bcl-2 Klone im Vergleich zur PCC7-Mz1-Kultur einen größeren Anteil an Zellen in der G1-Phase besitzen, sind prozentual mehr Zellen der Mz-Bcl-2 Klone für das RA-Signal empfänglich. Es ist daher denkbar, daß in den Mz-Bcl-2 Kulturen mehr Zellen direkt in die G0-Phase übertreten, ohne sich noch einmal zu teilen.

3.4 Einfluß von Bcl-2 auf die neurale Differenzierung von PCC7-Mz1-Zellen

3.4.1 Das Differenzierungspotential wird durch Bcl-2 nicht verändert

Nach Behandlung mit RA werden in den PCC7-Mz1-Zellen neurale Determinierungs- und Differenzierungsprozesse induziert, und aus pluripotenten Stammzellen entwickeln sich die verschiedenen Derivate des Neuroektoderms, d.h. Neurone, Fibroblasten und Astroglia-Zellen. Die Analyse des Differenzierungsbildes der isolierten Mz-Bcl-2 Klone zeigte, daß aus Stammzellen, die eine Überexpression von Bcl-2 aufwiesen, nach Zugabe von RA ebenfalls neuronale Phänotypen und Derivate mit flacher Morphologie entstehen konnten. Auch der zeitliche Verlauf der neuralen Differenzierung wurde durch die Überexpression von Bcl-2 weder beschleunigt noch verzögert. Durch Subklonierungen der PCC7-Mz1-Zellen konnten auch solche Klone isoliert werden, die ausschließlich in neuronale Phänotypen differenzieren und daher stärker auf das neuronale Schicksal determiniert sind (LANG *et al.*, 1989; JOSTOCK *et al.*, 1998). Das Verhältnis zwischen den entstandenen P-Klonen sowie den N- und O-Klonen war bei den Mz-Bcl-2 Klonen vergleichbar mit dem Verhältnis, das nach Subklonierung von PCC7-Mz1-Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor ("mock" Transfektion) transfiziert wurden, auftrat. So entwickelten sich überwiegend Klone des P-Phänotyps, die in ihrem Differenzierungsbild den parentalen PCC7-Mz1-Zellen entsprechen, während nur zu einem geringeren Anteil die neuronal vorgeprägten N- und O-Subtypen gebildet wurden. Die Ausprägung von N- und O-Phänotypen ist daher bei den Mz-Bcl-2 Klonen auf klonale Selektionsmechanismen und nicht auf Bcl-2 bedingte Effekte zurückzuführen. Eine Überexpression von Bcl-2 bewirkt somit keine grundlegenden Veränderungen des Differenzierungspotentials, da sich aus den Stammzellen der Mz-Bcl-2 Klone alle Zelltypen, die auch aus PCC7-Mz1-Stammzellen entstehen, entwickeln können. Durch die Überexpression von Bcl-2 wurde auch keine spontane, RA-unabhängige Differenzierung der Zellen ausgelöst. Diese Daten stehen im scheinbaren Widerspruch zu anderen Arbeiten, in denen ein positiver Einfluß des Bcl-2 Proteins auf neuronale Differenzierungsprozesse beschrieben wurde. So wurde für die von einem humanen Neuralleistentumor abstammende Paju-Zelllinie gezeigt, daß die spontane neuronale Differenzierung dieser Zellen durch eine ektopische Expression von Bcl-2 verstärkt wird (ZHANG *et al.*, 1996). Da diese Zellen jedoch in der Lage sind, bereits spontan und ausschließlich in Neurone zu differenzieren, ist ihr Differenzierungspotential im Vergleich zu dem der PCC7-Mz1-Zellen viel weiter eingeschränkt. Zudem wurde diese Zelllinie aus Neuralleistenzellen, die sich bereits sehr früh während der Neurulation von der neuroektodermalen Anlage ablösen, und aus denen sich während der Embryonalentwicklung u.a. das periphere Nervensystem bildet, isoliert. Daher ist es denkbar, daß Bcl-2 auf die Differenzierung dieser Zellen einen anderen Einfluß ausübt als auf neurale Vorläuferzellen des Neuroektoderms, wie sie die PCC7-Mz1-Zellen darstellen.

Auch für PC12-Zellen wurde in zwei Studien beschrieben, daß die Überexpression von Bcl-2 die neuronale Differenzierung der Zellen fördert (SATO *et al.*, 1994; SUZUKI & TSUTOMI, 1998). In beiden Arbeiten konnte eine Bcl-2-abhängige Verstärkung der neuronalen Differenzierung jedoch nur nach Entzug von Serum bzw. nach Behandlung mit dem Neurotoxin Taxol beobachtet werden. Die neuronale Differenzierung der Zellen scheint daher lediglich als ein Nebeneffekt der antiapoptotischen Eigenschaften des Bcl-2 Proteins aufzutreten. Daß Bcl-2 keinen Einfluß auf die neuronale Differenzierung von PC12-Zellen ausübt, wurde auch in einer anderen Studie beschrieben (BATISTATOU *et al.*, 1993). Im Vergleich zu Wildtyp PC12-Zellen war das durch Zugabe von neurotrophen Faktoren induzierte Neuritenwachstum durch die Überexpression von Bcl-2 nicht verändert.

3.4.2 Mz-Bcl-2 Kulturen enthalten weniger Neurone

Die Charakterisierung der differenzierten, reifen Phänotypen zeigte, daß der Anteil an neuronalen Derivaten in Bezug auf die gesamte Kultur bei den Mz-Bcl-2 Klonen an späten Differenzierungszeitpunkten geringer ist als bei den PCC7-Mz1-Zellen. So wiesen die Mz-Bcl-2 Klone im Vergleich zur PCC7-Mz1-Kultur am Differenzierungstag d3 und am d6 weniger Zellen auf, die die neuronalen Marker GAP-43 und Ex-1 exprimierten. Dieses Ergebnis konnte durch Western-Blot Analysen der neuronalen Markerproteine GAP-43 und n-Clathrin verifiziert werden. Beide Proteine wurden in den Mz-Bcl-2 Klonen nach Induktion der Differenzierung nur transient hochreguliert, während in PCC7-Mz1-Zellen die Expression von GAP-43 ab d1 und die Expression von n-Clathrin ab d3 hoch blieb. Interessanterweise konnte die transiente Hochregulation neuronaler Markerproteine nur in den Mz-Bcl-2 Klonen, bei denen bereits in Stammzellen eine durch den SV40-Promoter bedingte sehr hohe Bcl-2 Expression vorlag, nachgewiesen werden. In den Klonen, in denen die Bcl-2 Expression aufgrund des CMV-Promoters erst ab d2 deutlich hochreguliert wurde, lag das gleiche Expressionsmuster wie in den PCC7-Mz1-Zellen vor.

Wie kann man sich nun die durch Bcl-2 vermittelte Reduktion der neuronalen Zellen mechanistisch vorstellen? Die Determinierung der Zellen für ein neuronales oder nicht-neuronales Schicksal findet innerhalb von 24 Stunden nach Behandlung mit RA statt (JOSTOCK *et al.*, 1998). Während dieser Determinierungsphase teilen sich jedoch fast alle PCC7-Mz1-Zellen noch einmal (ESDAR *et al.*, 1999a). Aufgrund der Ergebnisse der Zellzyklusanalysen kann vermutet werden, daß die nach RA-Behandlung neuronal determinierten Zellen der Mz-Bcl-2 Klone früher den Zellzyklus verlassen und in die G0-Phase eintreten als die PCC7-Mz1-Zellen (siehe IV 3.3). Dadurch würde sich der Anteil der neuronal determinierten Zellen der Mz-Bcl-2 Klone im Vergleich zu den neuronal determinierten PCC7-Mz1-Zellen im Durchschnitt einmal weniger teilen, so daß weniger neuronale Zellen in der Mz-Bcl-2 Kultur angelegt werden. Die

nicht-neuronal determinierten Zellen teilen sich unabhängig von der Bcl-2 Expression weiter, da ihre Proliferationsfähigkeit durch das RA-Signal nicht eingeschränkt wird.

Möglicherweise wird das Verhältnis zwischen Neuronen und Zellen flacher Morphologie in den Mz-Bcl-2 Klonen im Vergleich zu den PCC7-Mz1-Zellen auch dadurch verändert, daß die RA-induzierte Apoptose vor allem Zellen eliminiert, die für das nicht-neuronale Schicksal determiniert sind. Da durch die Überexpression von Bcl-2 das Ausmaß der Apoptose deutlich reduziert wird, besitzen die Kulturen der Mz-Bcl-2 Klone einen höheren Anteil an Zellen mit flacher Morphologie als die PCC7-Mz1-Kulturen. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß der neuronale Entwicklungsweg der dominante Entwicklungsweg ("default pathway") der PCC7-Mz1-Zellen ist, so daß Zellen, die nicht für diesen Weg determiniert worden sind, potentiell empfänglicher für das apoptotische Signal sein können. Ein weiteres Indiz für diese Theorie besteht darin, daß die Stammzellen der Mz-GAP-43 Klone nach Behandlung mit RA nur ein geringes Ausmaß an Apoptose aufweisen (Daten nicht gezeigt). Wie in dieser Arbeit dargestellt, scheinen die GAP-43 überexprimierenden Zellen stärker für das neuronale Schicksal determiniert zu sein, so daß sie möglicherweise ebenfalls gegen das apoptotische RA-Signal geschützt sind.

3.4.3 Veränderte Morphologie der Neurone durch Bcl-2

Der Vergleich der Morphologie des Differenzierungsbildes an Zeitpunkten, an denen sich bereits das neuronale Netzwerk auf einem Zellrasen von Fibroblasten und Astroglia-Zellen ausgebildet hat, zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den PCC7-Mz1-Zellen und den Mz-Bcl-2 Klonen. Etwa ab Differenzierungstag d6 lagerten sich die Neurone der PCC7-Mz1-Kulturen in neuronalen Aggregaten zusammen. Diese neuronalen Aggregate waren jeweils über mehrere Neurite miteinander verbunden. Vereinzelt liegende Neurone traten im Vergleich zu den zusammengelagerten Neuronenpopulationen nur zu einem geringeren Anteil auf. Bei den Mz-Bcl-2 Klonen entstanden dagegen keine neuronalen Aggregate. Die Neurone lagen jeweils einzeln auf dem Zellrasen der flachen Zellen und waren über ihre Ausläufer miteinander verbunden. Möglicherweise benötigen die Neurone der PCC7-Mz1-Zellen Signale, die durch direkten Zellkontakt über beispielsweise Adhäsionsmoleküle vermittelt werden, zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion. Neuronale Adhäsionsmolekülen wie z.B. bestimmte Integrine sind für die neuronale Stabilität und das Überleben der Neurone von großer Bedeutung (FRISCH & RUOSLAHTI, 1997). Daß Bcl-2 an der intrazellulären Signalweiterleitung neuronaler Adhäsionsmoleküle beteiligt ist, konnte für das neuronale Adhäsionsmolekül L1 gezeigt werden (CHEN *et al.*, 1999). Die Neurone der Mz-Bcl-2 Klone könnten daher aufgrund der Überexpression von Bcl-2 unabhängiger von direkten, neuronalen Zell-Zell-Interaktionen sein und sind somit als einzeln liegende Zellen stabiler.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle des Bcl-2 Proteins während früher neuraler Determinierungs- und Differenzierungsprozesse beschrieben. Die in pluripotenten PCC7-Mz1-Stammzellen parallel zur neuralen Differenzierung durch RA induzierte Apoptose konnte durch die Überexpression Bcl-2 inhibiert werden (Abb. 47). Das Differenzierungspotential der Stammzellen wurde durch die Überexpression von Bcl-2 nicht unmittelbar beeinflusst. Jedoch war das Verhältnis zwischen Neuronen und Zellen mit flacher Morphologie zugunsten der flachen Derivate verschoben (Abb. 47), da durch die protektiven Effekte von Bcl-2 das RA induzierte Absterben nicht-neuronal determinierter Zellen verhindert wurde.

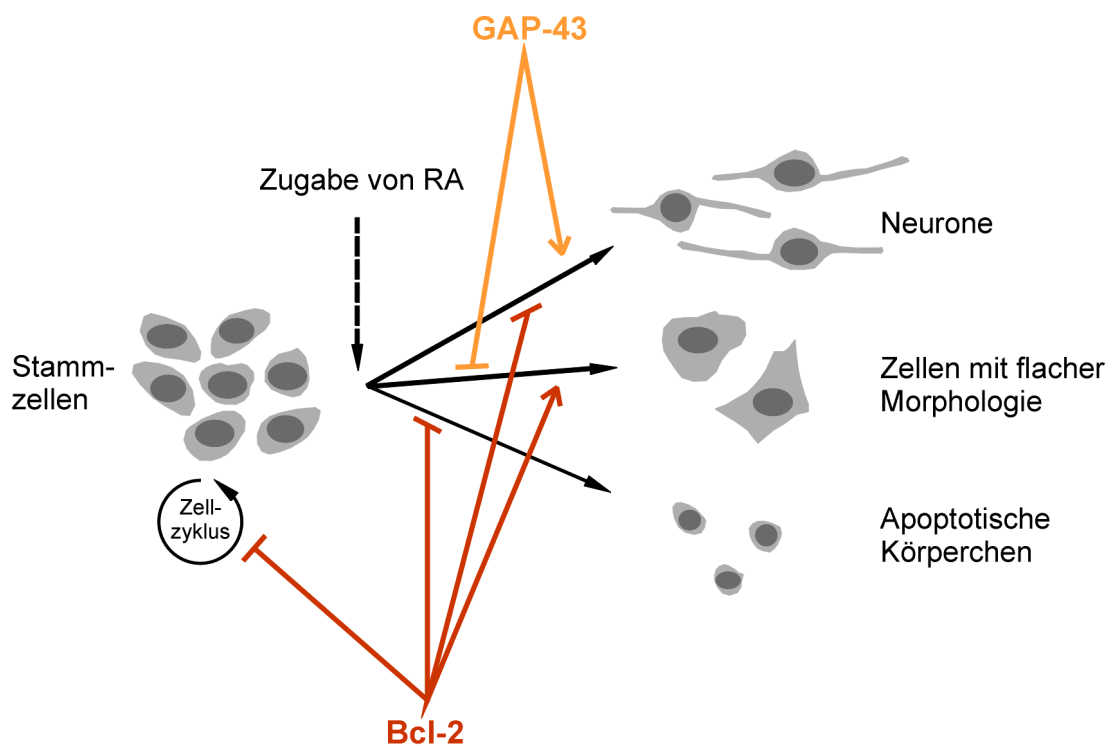


Abb. 47: Einfluß von GAP-43 und Bcl-2 auf die neuronale Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen

Pluripotente Stammzellen der Embryokarzinomzelllinie PCC7-Mz1 differenzieren nach Behandlung mit *all-trans* Retinsäure (RA) in ein stabiles Muster aus Neuronen sowie Zellen mit flacher Morphologie - den Fibroblasten und Astroglia-Zellen. Parallel dazu stirbt innerhalb der ersten 24 h nach Zugabe von RA ein definierter Anteil der Kultur apoptotisch.

Das neuronenspezifische PKC-Substrat GAP-43 beeinflusst das Differenzierungspotential der pluripotenten Stammzellen dahingehend, daß nach Induktion der Differenzierung fast ausschließlich neuronale Phänotypen gebildet werden.

Die Überexpression von Bcl-2 in PCC7-Mz1-Stammzellen inhibiert die RA-induzierte Apoptose und verlängert den Zellzyklus. Desweiteren ist der Anteil an neuronalen Derivaten an späteren Entwicklungsstadien gegenüber PCC7-Mz1-Zellen verringert.

4. Ausblick

Das langfristige Ziel des begonnenen Projektes ist es, die molekularen Vorgänge, die für die neuronalen Determinierungs- und Differenzierungsereignisse der PCC7-Mz1-Zellen verantwortlich sind, aufzuklären. Durch die stabile Überexpression von zwei Schlüsselmolekülen dieser Prozesse konnten neue Hinweise auf die Mechanismen der Musterbildung in PCC7-Mz1-Zellen erhalten werden.

Determinierung und Differenzierung

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zum ersten Mal zeigen, daß das PKC-Substrat GAP-43 an neuronalen Zellstammbaumentscheidungen beteiligt ist. Durch die Etablierung der Mz-GAP-43 Klone wurden geeignete Voraussetzungen geschaffen, um diesen Effekt mechanistisch zu untersuchen. Zur Aufklärung der zellulären Signalwege, über den GAP-43 die Ausprägung des neuronalen Phänotyps der PCC7-Mz1-Zellen beeinflusst, ist es erforderlich, weitere Interaktionspartner von GAP-43 nachzuweisen. Ein wichtiger Kandidat ist hierbei das bis jetzt noch unbekanntes Protein, das in den in dieser Arbeit gezeigten "Cross-linking Experimenten" im Cytoplasma der Mz-GAP-43 Klone einen 60 kDa großen Komplex mit GAP-43 bildet. Um dieses Protein zu isolieren, könnte es durch einen "Pull-down Assay" oder durch Affinitätschromatographie aus Zellextrakten angereichert und anschließend sequenziert oder über massenspektroskopische Methoden identifiziert werden.

Da die Mz-GAP-43 Klone im Gegensatz zu N-Klonen durch externe Faktoren wie Laminin oder FGF-2 nicht in den P-Phänotyp revertiert werden können, kann man vermuten, daß das Differenzierungspotential der Mz-GAP-43 Klone bereits für das neuronale Entwicklungsschicksal restringiert ist. Aufgrund der daher möglicherweise veränderten Genexpression können aus den Mz-GAP-43 Klonen Gene isoliert werden, die für die neuronale Determinierung verantwortlich sind. Die Identifizierung von Genen, die in PCC7-Mz1-Zellen und Mz-GAP-43 Klonen differentiell exprimiert werden, kann durch verschiedene methodische Ansätze erreicht werden. Auf Transkript-Ebene können zum einen sogenannte "DNA-Arrays", die eine schnelle Durchmusterung von mehreren tausend Transkripten erlauben, eingesetzt werden. Zum anderen können mittels eines "Differential Display Screenings" unterschiedlich exprimierte Gene analysiert werden. Anhand von Proteom-Analysen ("Proteomics") ist es möglich, verschieden regulierte Proteine direkt über massenspektroskopische Methoden zu identifizieren.

Desweiteren stellt sich die Frage, welche Bedeutung die PKC-vermittelte Phosphorylierung für den Einfluß von GAP-43 auf neuronale Determinierungsprozesse besitzt. Da das überexprimierte GAP-43 Protein bereits in den Stammzellen sowohl im Cytoplasma als auch an der Membran vorliegt, wird es hier möglicherweise durch colokalisierte PKC-Isoformen phosphoryliert (OEHRLEIN *et al.*, 1998). Um sowohl den grundsätzlichen Phosphorylierungsstatus von GAP-43

in Western-Blot Analysen als auch die subzelluläre Lokalisation von phosphoryliertem GAP-43 nachweisen zu können, müßte ein Antikörper eingesetzt werden, der spezifisch die PKC Phosphorylierungsstelle von GAP-43 (Aminosäure Serin⁴¹) erkennt. Ein solcher Antikörper wird uns durch eine Kooperation mit Frau Prof. K. F. Meiri (New York) zur Verfügung gestellt (MEIRI *et al.*, 1991).

Die Überexpression von Bcl-2 bewirkte – im Gegensatz zur Überexpression des GAP-43 Proteins – keine unmittelbare Veränderung des Differenzierungspotentials der PCC7-Mz1-Stammzellen. Jedoch war der Anteil an Zellen mit flacher Morphologie in den Mz-Bcl-2 Kulturen im Vergleich zur PCC7-Mz1-Kultur erhöht, da der protektive Effekt von Bcl-2 die RA-induzierte Apoptose nicht-neuronal determinierter Zellen inhibierte. Daher könnten aus den Mz-Bcl-2 Klonen Gene isoliert werden, die an Determinierungs- und Differenzierungsprozessen des nicht-neuronalen Zellschicksals beteiligt sind. Zur Identifizierung solcher Gene bieten sich die bereits oben beschriebenen Methoden ("DNA-Array", "Differential Display Screening", "Proteomics") an.

Apoptose

Durch die Etablierung der stabilen Mz-Bcl-2 Klone wurde erstmalig ein gezielter Eingriff in die durch RA induzierten Signalwege, die die Apoptose der PCC7-Mz1-Zellen regulieren, vorgenommen. Die Mz-Bcl-2 Klone bieten nun die Grundlage, um die antiapoptotische Wirkung des Bcl-2 Proteins auf funktioneller Ebene zu analysieren. Ob Bcl-2 seinen protektiven Effekt über parakrine Signale durch die Freisetzung von protektiven Substanzen – wie z.B. neurotrophen Faktoren – bewirkt, kann durch die Kultivierung von PCC7-Mz1-Zellen in konditioniertem Medium der Mz-Bcl-2 Klone gezeigt werden. Die PCC7-Mz1-Zellen müßten dann gegenüber dem apoptotischen RA-Signal geschützt sein. Desweiteren kann anhand von Mischungsexperimenten zwischen PCC7-Mz1-Zellen sowie Zellen der Mz-Bcl-2 Klone untersucht werden, ob der protektive Einfluß von Bcl-2 über sezernierte Faktoren oder möglicherweise sogar über direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt wird. Dazu müßte man einen, z.B. mit dem Reportergen GFP ("green fluorescent protein") stabil markierten Subklon der PCC7-Mz1-Zellen mit Zellen eines Mz-Bcl-2 Klons mischen. Ob die markierten PCC7-Mz1-Zellen in Anwesenheit von Bcl-2 überexprimierenden Zellen gegen das apoptotische RA-Signal geschützt sind, kann anhand von morphologischen Kriterien oder biochemischen Merkmalen nachgewiesen werden. Hierzu kann die Detektion der DNA-Fragmentierung im TUNEL-Assay oder die Analyse des Phosphatidylserin-Flips mittels Annexin V-Färbung angewendet werden.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie Bcl-2 mechanistisch den allgemeinen Schutz gegen Apoptose vermittelt. Hier bietet es sich an, die Bedeutung des Akt/PKB-Kinase vermittelten Signalweges, dem eine wichtige antiapoptotische Funktion zugeschrieben wird (MARTE & DOWNWARD, 1997; FRANKE & CANTLEY, 1997), zu untersuchen. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der Akt/PKB-Kinase sowie durch die Verwendung von Antikörpern, die gegen die

Phosphorylierungsstellen von Substraten der Akt/PKB-Kinase gerichtet sind, kann analysiert werden, ob der Akt/PKB-Kinase abhängige Signalweg in den Mz-Bcl-2 Klonen im Vergleich zu PCC7-Mz1-Zellen möglicherweise stärker aktiviert ist und somit funktionell mit dem Bcl-2 Signalweg gekoppelt ist. Damit könnte eine mögliche Verbindung des mitochondrialen Apoptose Signalwegs vom Typ II mit dem Akt/PKB-Kinase abhängigen Signalweg aufgezeigt werden.

V Zusammenfassung

Die PCC7-Mz1-Zelllinie stellt ein geeignetes Modell dar, um frühe neurale Determinierungs- und Differenzierungsprozesse unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* zu untersuchen. Aus pluripotenten Stammzellen entwickelt sich nach Behandlung mit dem Morphogen Retinsäure (RA) ein stabiles Muster aus Neuronen, Fibroblasten und Astroglia-Zellen. Parallel stirbt ein reproduzierbarer Anteil der Kultur apoptotisch. Zur näheren Aufklärung der molekularen Vorgänge während der neuronalen Entwicklung wurde der Einfluß von zwei Schlüsselmolekülen - dem Proteinkinase C Substrat (PKC) GAP-43 sowie dem antiapoptotischen Bcl-2 Protein - auf die neurale Differenzierung und die damit assoziierten Apoptoseereignisse der PCC7-Mz1-Zellen untersucht. Dazu wurden stabile Zelllinien, die eine Überexpression von GAP-43 bzw. von Bcl-2 aufwiesen, hergestellt.

GAP-43

In PCC7-Mz1-Zellen wurde die Expression von GAP-43 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene innerhalb von 24 Stunden nach Zugabe von RA hochreguliert. GAP-43 war bereits in noch proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen als Substrat für PKC und als Interaktionspartner von Calmodulin funktionell. Die Überexpression von GAP-43 in PCC7-Mz1-Zellen förderte die Ausprägung des neuronalen Phänotyps. Das Differenzierungspotential der Mz-GAP-43 Klone war eingeschränkt, da sich nach Induktion mit RA aus den Stammzellen nur noch Neurone, aber keine Fibroblasten und Astroglia-Zellen mehr entwickelten. Die Determinierung für das neuronale Entwicklungsschicksal war in den Mz-GAP-43 Klonen stärker fortgeschritten als in MzN-Klonen, die durch Subklonierung aus PCC7-Mz1-Zellen generiert wurden, da die GAP-43 überexprimierenden Zellen durch Wachstum auf Laminin nicht in den pluripotenten Phänotyp revertiert werden konnten. Aufgrund der Interaktion zwischen GAP-43 und Calmodulin in Stammzellen der Mz-GAP-43 Klone kann man vermuten, daß die neuronalen Determinierungsprozesse über Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Signalwege verlaufen. Da das Gen für den Transkriptionsfaktor NCNF ("neuronal cell nuclear factor") bereits in Stammzellen der Mz-GAP-43 Klone jedoch nicht in PCC7-Mz1-Stammzellen exprimiert wurde, läßt sich eine Beteiligung von NCNF an den neuronalen Zellstammbaumentscheidungen postulieren.

Bcl-2

Die RA-induzierte Apoptose war in den etablierten Mz-Bcl-2 Klonen im Vergleich zu den parentalen PCC7-Mz1-Zellen fast vollständig inhibiert. Durch die Überexpression von Bcl-2 wurde die Aktivierung von Caspasen sowie die Fragmentierung der chromosomalen DNA blockiert. Die Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, daß in PCC7-Mz1-Zellen durch RA der mitochondriale, Bcl-2-abhängige Apoptoseweg (Typ II) induziert wird, da durch Bcl-2 sowohl die Ceramid-abhängige Apoptose als auch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien inhibiert wurde. Das Differenzierungspotential der pluripotenten Stammzellen

wurde durch die Überexpression von Bcl-2 nicht verändert. Das Verhältnis zwischen Neuronen und Zellen mit flacher Morphologie verschob sich jedoch in den Mz-Bcl-2 Klonen zugunsten der flachen Zellerivate. Das bedeutet, daß durch die RA-induzierte Apoptose nicht-neuronal determinierte Zellen eliminiert werden, die in den Mz-Bcl-2 Kulturen aufgrund des protektiven Bcl-2 Effekts überleben. Die Neurone bildeten in den Bcl-2 überexprimierenden Klonen im Gegensatz zu den PCC7-Mz1-Kulturen keine neuronalen Aggregate, sondern lagen vereinzelt auf dem aus Fibroblasten und Astroglia-Zellen gebildeten Zellrasen.

VI Literaturverzeichnis

- A**be-Dohmae, S., Harada, N., Yamada, K. & Tanaka, R. (1993). bcl-2 gene is highly expressed during neurogenesis in the central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 915-921
- Adams, J.M. & Cory, S. (1998). The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* **281**, 1322-1326
- Aigner, L. & Caroni, P. (1993). Depletion of 43-kD growth-associated protein in primary sensory neurons leads to diminished formation and spreading of growth cones. *J. Cell Biol.* **123**, 417-429
- Aigner, L. & Caroni, P. (1995). Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43 depleted growth cones. *J. Cell Biol.* **128**, 647-660
- Aigner, L., Arber, S., Kapfhammer, J.P., Laux, T., Schneider, C., Botteri, F., Brenner, H.-R. & Caroni, P. (1995). Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell* **83**, 269-278
- Alexander, K.A., Cimler, B.M., Meier, K.E. & Storm, D.R. (1987). Regulation of calmodulin binding to p-57. *J. Biol. Chem.* **262**, 6108-6113
- Alexander, K.A., Wakim, B.T., Doyle, G.S., Walsh, K.A. & Storm, D.R. (1988). Identification and characterization of the calmodulin-binding domain of neuromodulin, a neuronspecific calmodulin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 7544-7549
- Allsopp, T.E., Wyatt, S., Paterson, H.F. & Davies, A.M. (1993). The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* **73**, 295-307
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* **87**, 171
- Apel, E.D., Byford, M.F., Douglas, A., Walsh, K.A. & Storm, D.R. (1990). Identification of the protein kinase C phosphorylation site in neuromodulin. *Biochemistry* **29**, 2330-2335
- Apel, E.D., Litchfield, D.W., Clark, R.H., Krebs, E.G. & Storm, D.R. (1991). Phosphorylation of Neuromodulin (GAP-43) by Casein Kinase II. *J. Biol. Chem.* **266**, 10544-10551
- Arenas, E. & Persson, P. (1994). Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons *in vivo*. *Nature* **367**, 368-370
- Arends, M.J. & Wyllie, A.H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **32**, 223-254
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* **281**, 1305-1308
- B**aetge, E.E. & Hammang, J.P. (1991). Neurite outgrowth in PC12 cells deficient in GAP-43. *Neuron* **6**, 21-30

- Bakhsi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. & Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around J_H on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**, 899-906
- Basi, G.S., Jacobson, R.D., Virag, I., Schilling, J. & Skene, J.H.P. (1987). Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell* **49**, 785-791
- Batistatou, A., Merry, D.E., Korsmeyer, S.J. & Greene, L.A. (1993). Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Neurosci.* **13**, 4422-4428
- Bauer, U.-M. (1997). Funktionelle Charakterisierung des murinen nukleären Rezeptors NCNF (*neuronal cell nuclear factor*). Dissertation
- Bauer, U.-M., Schneider-Hirsch, S., Reinhardt, S., Pauly, T., Maus, A., Wang, F., Heiermann, R., Rentrop, M. & Maelicke, A. (1997). Neuronal cell nuclear factor. *Eur. J. Biochem.* **249**, 826-837
- Bauer, U.-M., Schneider-Hirsch, S., Reinhardt, S., Benavente, R. & Maelicke, A. (1998). The murine nuclear orphan receptor GCNF is expressed in the XY body of primary spermatocytes. *FEBS Letters* **439**, 208-214
- Benfenati, F., Valtorta, F., Rubenstein, J.L., Gorelick, F.S., Greengard, P. & Czernik, A.J. (1992). Synaptic vesicle-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature* **359**, 417-420
- Benowitz, L.I. & Routtenberg, A. (1987). A membrane phosphoprotein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **10**, 527-532
- Benowitz, L.I., Perrone-Bizzozero, N.I. & Finklestein, S.P. (1987). Molecular properties of the growth-associated protein GAP-43 (B-50). *J. Neurochem.* **48**, 1640-1647
- Benowitz, L.I. & Routtenberg, A. (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* **20**, 84-91
- Berger, C., Reinhardt, S., Rentrop, M., Bachmann, M., Weiser, T., Link, E., Wienrich, M., Jahn, R. & Maelicke, A. (1997). De novo acquisition of neuronal polarity in retinoic acid-induced embryonal carcinoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* **74**, 230-245
- Biewenga, J.E., Schrama, L.H. & Gispen, W.H. (1996). Presynaptic phosphoprotein B-50/GAP-43 in neuronal and synaptic plasticity. *Acta Biochim. Pol.* **43**, 327-338
- Biffo, S., Verhaagen, J., Schrama, L.H., Schotman, P., Danho, W. & Margolis, F.L. (1990). B-50/GAP-43 Expression Correlates with Process Outgrowth in the Embryonic Mouse Nervous System. *Eur. J. Neurosci.* **2**, 487-499
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523
- Blaschke, A.J., Staley, K. & Chun, J. (1996). Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* **122**, 1165-1174

- Boise, L.H., Gonzales-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. & Thompson, C.B. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**, 597-608
- Borner, C. (1996). Diminished Cell Proliferation Associated with the Death-protective Activity of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* **271**, 12695-12698
- Bose, R., Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z. & Kolesnick, R.N. (1995). Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **82**, 405-414
- Brooks, S., Herget, T., Erusalimsky, J.D. & Rozengurt, E. (1991). Protein kinase C activation potently down-regulates the expression of its major substrate, 80K, in Swiss 3T3 cells. *EMBO J.* **10**, 2497-2505
- Burek, M.J. & Oppenheim, R.W. (1998). Cellular interactions that regulate programmed cell death in the developing vertebrate nervous system. In: *Cell Death and Disease of the Nervous System*. V. Koliatsos and R. Ratan, eds. Totowa: Humana Press
- C**ampbell, G., Anderson, P.N., Turmaine, N. & Lieberman, A.R. (1991). GAP-43 in the axons of mammalian CNS neurons regenerating into peripheral nerve grafts. *Exp. Brain Res.* **87**, 67-74
- Ceccaldi, P.E., Grohovaz, F., Benfenati, F., Chiergatti, E., Greengard, P. & Valtorta, F. (1995). Dephosphorylated synapsin I anchors synaptic vesicles to actin cytoskeleton: an analysis by videomicroscopy. *J. Cell Biol.* **128**, 905-912
- Chakravarthy, B., Morley, P. & Whitfiel, J. (1999). Ca²⁺-calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *Trends Neurosci.* **22**, 12-16
- Chao, S., Benowitz, L.I., Krainc, D. & Irwin, N. (1996). Use of a two-hybrid system to investigate molecular interactions of GAP-43. *Mol. Brain Res.* **40**, 195-202
- Chapman, E.R., Au, D., Alexander, K.A., Nicolson, T.A. & Storm, D.R. (1991). Characterization of the Calmodulin Binding Domain of Neuromodulin. *J. Biol. Chem.* **266**, 207-213
- Chapman, E.R., Estep, R.P. & Storm, D.R. (1992). Palmitoylation of Neuromodulin (GAP-43) Is Not Required for Phosphorylation by Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* **267**, 25233-25238
- Chen, C. & Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752
- Chen, S., Mantei, N., Dong, L. & Schachner, M. (1999). Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J. Neurobiol.* **38**, 428-439
- Cimler, B.M., Andreasen, T.J., Andreasen, K.I. & Storm, D.R. (1985). P-57 is a neural specific calmodulin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **260**, 10784-10788
- Coggins, P.J., McLean, K.N., Nagy, A. & Zwiers, H. (1993). ADP-Ribosylation of the neuronal phosphoprotein B-50/GAP-43. *J. Neurochem.* **60**, 368-371
- Cohen, G.M., Duke, R.C., Fadok, V.A. & Sellins, K.S. (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 267-293

- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**, 1-16
- Cooney, A.J., Leng, X., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W. & Tsai, M.-J. (1993). Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor-dependent repression of transcription by the vitamine D, thyroid hormone and retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 4152-4160
- D**ani, J.W., Armstrong, D.M. & Benowitz, L.I. (1991). Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. *Neuroscience* **40**, 277-278
- Davidkova, G., Zhang, S.P., Nichols, R.A. & Weiss, B. (1996). Reduced level of calmodulin in PC12 cells induced by stable expression of calmodulin antisense RNA inhibits cell proliferation and induces neurite outgrowth. *Neuroscience* **75**, 1003-1019
- Davies, J.M. (1994). *Basic Cell Culture. A Practical Approach.* Oxford University Press, Oxford, Great Britain
- Dekker, L.V., De Graan, P.N.E., Oestreicher, A.B., Versteeg, D.H.G. & Gispen, W.H. (1989). Inhibition of noradrenaline release by antibodies to B-50 (GAP-43). *Nature* **342**, 74-76
- E**ggen, B.J.L., Nielander, H.B., Rensen-de Leeuw, M.G.A., Schotman, P., Gispen, W.H. & Schrama, L.H. (1994). Identification of two promoter regions in the rat B-50/GAP-43 gene. *Mol. Brain Res.* **23**, 221-234
- Ellis, R.E., Yuan, J. & Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 663-698
- Esdar, C. (1996). Analyse der GAP-43-Expression während der neuronalen Entwicklung *in vivo* und in einem Zellmodell für Neurogenese (PCC7-Mz1). Diplomarbeit
- Esdar, C., Oehrlein, S.A., Reinhardt, S., Maelicke, A. & Herget, T. (1999a). The protein kinase C (PKC) substrate GAP-43 is already expressed in neural precursor cells, colocalizes with PKC η and binds calmodulin. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 503-516
- Esdar, C., Oehrlein, S.A., Schütze, S., Maelicke, A. & Herget, T. (1999b). Role of ceramides in apoptosis during early neural differentiation *in vitro*. Eingereichtes Manuskript
- F**adok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. & Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207-2216
- Farlie, P.G., Dringen, R., Rees, S.M., Kannourakis, G. & Bernard, O. (1995). bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4397-4401
- Farrow, S.N. & Brown, R. (1996). New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr. Opin. Gen. & Develop.* **6**, 45-49
- Fishbein, J.D., Dobrowsky, R.T., Bielawska, A., Garrett, A., & Hannun, Y.A. (1993). Ceramide mediated growth inhibition and CAPP are conserved in *Saccaromyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 9255 -9261

- Franke, T.F. & Cantley, L.C. (1997). A Bad kinase makes good. *Nature* **390**, 116-117
- Frisch, S.M. & Ruoslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 701-706
- G**arcia, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y. & Martinou, J.C. (1992). Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* **258**, 302-304
- Gil-Gomez, G., Berns, A. & Brady, H.J.M. (1998). A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulates Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J.* **17**, 7209-7218
- Gispén, W.H., Nielander, H.B., De Graan, P.N.E., Oestreicher, A.B., Schrama, L.H. & Schotman, P. (1991). Role of the growth-associated protein B-50/GAP-43 in neuronal plasticity. *Mol. Neurobiol.* **5**, 61-85
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182
- Gonzalez-Garcia, M., Garcia, I., Ding, L., O'Shea, S., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Nunez, G. (1995). bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4304-4308
- Goslin, K. & Banker, G. (1990). Rapid changes in the distribution of GAP-43 correlate with the expression of neuronal polarity during normal development and under experimental conditions. *J. Cell Biol.* **110**, 1339-1331
- Goslin, K., Schreyer, D.J., Skene, J.H.P. & Banker, G. (1990). Changes in the distribution of GAP-43 during development of neuronal polarity. *J. Neurosci.* **10**, 588-602
- Grabczyk, E., Zuber, M.X., Federoff, H.J., Ng, S.C., Pack, A. & Fishman, M.C. (1990). Cloning and Characterization of the Rat Gene Encoding GAP-43. *Eur. J. Neurosci.* **2**, 822-827
- Graham, F.L. & van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-465
- Green, D.R. & Reed, J.C. (1998). Mitochondria and Apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312
- Gross, A., McDonnell, J.M. & Korsmeyer, S.J. (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* **13**, 1899-1911
- H**aimovitz-Friedman, A., Kolesnick, R.N. & Fuks, Z. (1997). Ceramide signaling in apoptosis. *British Med. Bul.* **53**, 539-553
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557
- Harlow, E. & Lane, D. (1988). Antibodies - a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, USA
- Haslett, C. (1992). Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in tissue fate of granulocytes. *Clin. Sci.* **83**, 639-648
- He, X. & Rosenfeld, M.G. (1991). Mechanism of complex transcriptional regulation: Implications for brain development. *Neuron* **7** 183-196

- He, Q., Dent, E.W. & Meiri, K.F. (1997). Modulation of Actin Filament Behavior by GAP-43 (Neuromodulin) Is Dependent on the Phosphorylation Status of Serine 41, the Protein Kinase C Site. *J. Neurosci.* **17**, 3515-3524
- Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans* Cell Survival Gene *ced-9* Encodes a Functional Homolog of the Mammalian Proto-Oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**, 665-676
- Hens, J.J.H., de Wit, M., Boomsma, F., Mercken, M., Oestreicher, A.B., Gispen, W.H. & De Graan, P.N.E. (1995). N-Terminal-specific anti-B-50 (GAP-43) antibodies inhibit Ca²⁺-induced noradrenaline release, B-50 phosphorylation and dephosphorylation, and calmodulin binding. *J. Neurochem.* **64**, 1127-1136
- Hens, J.J.H., Ghijsen, W.E.J.M., Weller, U., Spierenburg, H.A., Boosma, F., Oestereicher, A.B., Lopes da Silva, F.H. & De Graan, P.N.E. (1997). Anti-B-50 (GAP-43) antibodies decrease exocytosis of glutamate in permeated synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* **363**, 229-240
- Heiermann, R., Rentrop, M., Lang, E. & Maelicke, A. (1992). Expression of retinoic acid nuclear receptors in the mouse embryonal carcinoma cell line PCC7-Mz1. *FEBS Letters* **312**, 75-79
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E. & Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494-499
- Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**, 665-676
- Herget, T., Broad, S. & Rozengurt, E. (1994). Overexpression of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate in Rat-1 cells increases sensitivity to calmodulin antagonists. *Eur. J. Biochem.* **225**, 549-556
- Herget, T., Specht, H., Esdar, C., Oehrlein, S.A. & Maelicke, A. (1998). Retinoic Acid Induces Apoptosis-Associated Neural Differentiation of a Murine Teratocarcinoma Cell Line. *J. Neurochem.* **70**, 47-58
- Hockenberry, D.M., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. & Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334-336
- Homma, S., Yaginuma, H. & Oppenheim, R.W. (1994). Programmed cell death during the earliest stages of spinal cord development in the chick embryo: a possible means of early phenotypic selection. *J. Comp. Neurol.* **345**, 377-395
- Hummelke, G.C., Meistrich, M.L. & Cooney, A.J. (1998). Mouse protamine genes are candidate targets for the novel orphan receptor, germ nuclear factor. *Mol. Reprod. Dev.* **50**, 396-405
- Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J. & Messing, R.O. (1995). Overexpression of ϵ -protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **270**, 30134-30140
- Jarvis, W.D., Kolesnick, R.N., Fornari, F.A., Traylor, R.S., Gewirtz, D. A. & Grant, S. (1994). Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 73-77

- Jones-Villeneuve, E.M.V., McBurney, M.W., Rogers, K.A. & Kalnins, V.I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell. Biol.* **94**, 253-262
- Jostock, R. (1997). In vitro Untersuchungen zur Zellstammbaumspezifizierung von neuroektodermalen Stammzellen. Dissertation
- Jostock, R., Rentrop, M. & Maelicke, A. (1998). Cell fate specification in an *in vitro* model of neural development. *Eur. J. Cell Biol.* **76**, 63-76
- K**ane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T. & Bredesen, D.E. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decrease generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274-1277
- Kato, S., Sekine, S., Oh, S., Kim, N., Umezawa, Y., Abe, N., Yokoyama-Kobayashi, M. & Aki, T. (1994). Construction of a human full-length cDNA bank. *Gene* **150**, 243-250
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997). The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136
- Koopman, P. & Cotton, G.H. (1987). Pluripotent differentiation of single F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **168**, 567-571
- Kumar, S. (1999). Prodomains – adaptors – oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *TIBS* **24**, 1-4
- L**aemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lang, E., Mazauric-Stüker, M.L. & Maelicke, A. (1989). States of developmental commitment of a mouse embryonal carcinoma cell line differentiating along a neural pathway. *J. Cell Biol.* **109**, 2481-2493
- Lawrence, M.S., Ho, D.Y., Sun, G.H., Steinberg, G.K. & Sapolsky, R.M. (1996). Overexpression of bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci.* **16**, 486-496
- Li, F., Srinivasan, A., Wang, Y., Armstrong, R.C., Tomaselli, K.J. & Fritz, L.C. (1997a). Cell-specific Induction of Apoptosis by Microinjection of Cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **272**, 30299-30305
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. & Wang, X. (1997b). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* **91**, 479-489
- Linden, D.J. & Conner, J.A. (1991). Participation of postsynaptic PKC in cerebellar longterm depression in culture. *Science* **254**, 1656-1659

- Linnick, M.D., Zahos, P., Geschwind, M.D. & Federoff, H.J. (1995). Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **34**, 2002-2009
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. (1996). Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157
- Liu, R., Takayama, S., Zheng, Y., Froesch, B., Chen, G., Zhang, X., Reed, J.C. & Zhang, X. (1998). Interaction of BAG-1 with Retinoic Acid Receptor and Its Inhibition of Retinoic Acid-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 16985-16992
- Lovinger, D.M. & Routtenberg, A. (1988). Synapse-specific protein kinase C activation enhances maintenance of long-term potentiation in rat hippocampus. *J. Physiol. Lond.* **40**, 321-333
- März, P., Herget, T., Lang, E., Otten, G. & Rose-John, S. (1997). Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2765-2773
- Mailhos, C., Howard, M.K. & Latchman, D.S. (1994). A common pathway mediates retinoic acid and PMA-dependent programmed cell death (apoptosis) of neuronal cells. *Brain Res.* **644**, 7-12
- Mah, S.P., Zhong, L.T., Liu, Y., Roghani, A., Edwards, R.H. & Bredesen, D.E. (1993). The protooncogene bcl-2 inhibits apoptosis in PC12 cells. *J. Neurochem.* **60**, 1183-1186
- Mangelsdorf, D.J. & Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850
- Marte, B.M. & Downward, J. (1997). PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *TIBS* **22**, 355-358
- Mani, S., Schaefer, J. & Meiri, K.F. (2000). Targeted disruption of GAP-43 in P19 embryonal carcinoma cells inhibits neuronal differentiation as well as acquisition of the morphological phenotype. *Mol. Brain Res.* in press
- Martinou, J.C., Frankowski, H., Missotten, M., Martinou, I., Potier, L. & Dubois-Dauphin, M. (1994a). Bcl-2 and neuronal selection during development of the nervous system. *J. Physiol.* **88**, 209-211
- Martinou, J.C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J.K., Rodriguez, I., Frankowsky, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S., Pietra, C. & Huarte, J. (1994b). Overexpression of bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischaemia. *Neuron* **13**, 1017-1030
- Masure, H.R., Alexander, K.A., Wakim, B.T. & Storm, D.R. (1986). Physicochemical and hydrodynamic characterization of P-57, a neurospecific calmodulin binding protein. *Biochemistry* **25**, 7553-7560
- Mazel, S., Burtrum, D. & Petrie, H.T. (1996). Regulation of Cell Division Cycle Progression by bcl-2 Expression: A Potential Mechanism for Inhibition of Programmed Cell Death. *J. Exp. Med.* **183**, 2219-2226
- McBurney, M.W., Reuhl, K.R., Ally, A.I., Nasipuri, S., Bell, J.C. & Craig, J. (1988). Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J. Neurosci.* **8**, 1063-1073

- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. & Korsmeyer, S.J. (1989). bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**, 79-88
- McKay, R.D.G. (1989). The origin of cellular diversity in the mammalian central nervous system. *Cell* **58**, 815-821
- Meberg, P.J. & Routtenberg, A. (1991). Selective expression of protein F1/(GAP-43) mRNA in pyramidal but not granule cells of the hippocampus. *Neuroscience* **45**, 721-733
- Meberg, P.J., Barnes, C.A., McNaughton, B.L. & Routtenberg, A. (1993). Protein kinase C and F1/GAP-43 gene expression in hippocampus inversely related to synaptic enhancement lasting 3 days. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 12050-12054
- Meiri, K.F., Bickerstaff, L.E. & Schwob, J.E. (1991). Monoclonal Antibodies Show That Kinase C Phosphorylation of GAP-43 during Axonogenesis Is Both Spatially and Temporally Restricted In Vivo. *J. Cell Biol.* **112**, 991-1005
- Mellon, I. (1981). Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene. *Biochem. Biophys. Acta* **1044**, 1-12
- Merry, D.E., Veis, D.J., Hickey, W.F. & Korsmeyer, S.J. (1994). bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* **120**, 301-311
- Michaelidis, T.M., Sendtner, M., Cooper, J.D., Airaksinen, M.S., Holtmann, B., Meyer, M. & Thoenen, H. (1996). Inactivation of Bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development. *Neuron* **17**, 75-89
- Mignotte, B. & Vayssiere, J.L. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **252**, 1-15
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. & Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**, 1799-1805
- Monaghan, P.I., Robertson, D., Amos, T.A.S., Dyer, M.J.S., Mason, D.Y. & Greaves, M.F. (1992). Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1819-1825
- Moss, D.J., Fernyhough, P., Chapman, K., Baizer, L., Bray, D. & Allsopp, T. (1990). Chicken growth-associated protein GAP-43 is tightly bound to the actin-rich neuronal membrane skeleton. *J. Neurochem.* **54**, 729-736
- Müller-Husmann, G., Reinhard, S., Stähle, M., Lang, E. & Maelicke, A. (1994). EX-1, a surface antigen of mouse neuronal progenitor cells and mature neurons. *Develop. Brain Res.* **83**, 262-277
- N**agata, S. (1997). Apoptosis by Death Factor. *Cell* **88**, 355-365
- Nakayama, K., Nakayama, K.I., Negishi, I., Kuida, K., Sawa, H. & Loh, D.Y. (1994). Targeted disruption of Bcl-2 $\alpha\beta$ in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease and lymphocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3700-3704

- Namgung, U., Matsuyama, S. & Routtenberg, A. (1997). Long-term potentiation activates the GAP-43 promoter: Selective participation of hippocampal mossy cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11675-11680
- Nedivi, E., Basi, G.S., Virag Akey, I. & Skene, J.H.P. (1992). A Neural-Specific GAP-43 Core Promoter Located between Unusual DNA Elements that Interact to Regulate Its Activity. *J. Neurosci.* **12**, 691-704
- Neuman, K., Soosaar, A., Nornes, H.O. & Neuman, T. (1995). Orphan receptor COUP-TF I antagonizes retinoic acid-induced neuronal differentiation. *J. Neurosci. Res.* **41**, 39-48
- Neve, R.L., Finch, E.A., Bird, E.D. & Benowitz, L.I. (1988). Growth-associated protein GAP-43 is expressed selectively in associative regions of the adult human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3638-3642
- Newton, K., Harris, A.W., Bath, M.L., Smith, K.G.C. & Strasser, A. (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* **17**, 706-718
- Nicholson, D.W. (1996). ICE/CED 3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nature Biotechnol.* **14**, 297-301
- Nielander, H.B., Schrama, L.H., Van Rozen, A.J., Kasperaitis, M., Oestreicher, A.B., Gispen, W.H. & Schotman, P. (1990). Mutation of serine 41 in the neuron-specific protein B-50 (GAP-43) prohibits phosphorylation by protein kinase C. *J. Neurochem.* **55**, 1442-1445
- Obeid, L., Linardic, C.M., Karola, L.A. & Hannun, Y.A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-1771
- Oehrlein, S.A., Parker, P.J. & Herget, T. (1996). Phosphorylation of GAP-43 (growth-associated protein of 43 kDa) by conventional, novel and atypical isoforms of the protein kinase C gene family: differences between oligopeptide and polypeptide phosphorylation. *Biochem. J.* **313**, 219-224
- Oehrlein-Karpi, S.A. (1998). RA-induzierte Signaltransduktionsprozesse während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen. Dissertation
- Oehrlein, S.A., Maelicke, A. & Herget, T. (1998). Expression of protein kinase C gene family members is temporally and spatially regulated during neural development *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.* **77**, 323-337
- Okamura, T., Masuda, M., Arai, Y., Ishida, C., Shudou, K. & Mizoguchi, H. (1998). All-trans retinoic acid modulates Fas antigen expression and affects proliferation and apoptosis in combination with anti-Fas monoclonal antibody in the human myeloma cell line, U266B1. *Exp. Hematol.* **26**, 501-506
- Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R.M. & Hannun, Y.A. (1990). Role of ceramide as a lipid mediator of 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **265**, 15823-15831
- Okazaki, T., Kondo, T., Kitano, T. & Tashima, M. (1998). Diversity and Complexity of Ceramide Signaling in Apoptosis. *Cell. Signal.* **10**, 685-692

- Okazawa, H., Shimizu, J., Kamei, M., Imafuku, I., Hamada, H. & Kanazawa, I. (1996). Bcl-2 Inhibits Retinoic Acid-induced Apoptosis during the Neural Differentiation of Embryonal Stem Cells. *J. Cell Biol.* **132**, 955-968
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619
- Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 435-501
- P**aulin, D., Jakob, H., Jakob, F., Weber, K. & Osborn, M. (1982). In *vitro* differentiation of mouse teratocarcinoma cells monitored by intermediate filament expression. *Differentiation* **22**, 90-99
- Pettman, B. & Henderson, C.E. (1998). Neuronal cell death. *Neuron* **20**, 633-647
- Pfeiffer, S.E., Jakob, H., Mikoshiba, K., Buboiss, P., Guenet, J.L., Nicolas, L.-F., Gaillard, J., Chevance, G. & Jakob, F. (1981). Differentiation of a teratocarcinoma line. Preferential development of cholinergic neurons. *J. Cell Biol.* **88**, 57-66
- Pinon, L.G., Middleton, G. & Davies, A.M. (1997). Bcl-2 is required for cranial sensory neuron survival at defined stages of embryonic development. *Development* **124**, 4173-4178
- Pisano, M.R., Hegazy, M.G., Reimann, E.M. & Dokas, L.A. (1988). Phosphorylation of B-50 (GAP-43) from adult rat brain cortex by casein kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 1207-1212
- R**aff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**, 397-399
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Cole, H.S., Ishizaki, Y. & Jacobson, M.D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* **262**, 695-700
- Rasmussen, C.D. & Means, A.R. (1989). Calmodulin is required for cell cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO J.* **8**, 73-82
- Reed, J.C. (1997a). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**, 773-776
- Reed, J.C. (1997b). Cytochrome c: Can't Live with It-Can't Live without It. *Cell* **91**, 559-562
- Riederer, B.M. & Routtenberg, A. (1999). Can GAP-43 interact with brain spectrin? *Mol. Brain Res.* **71**, 345-348
- Rosenthal, A., Chan, S.Y., Henzel, W., Haskell, C., Kuang, W.-J., Chen, E., Wilcox, J.N., Ullrich, A., Goeddel, D.V. & Routtenberg, A. (1987). Primary structure and mRNA localization of protein F1, a growth-related protein kinase C substrate with synaptic plasticity. *EMBO J.* **6**, 3641-3646
- Routtenberg, A. (1985). Protein kinase C activation leading to protein F1 phosphorylation may regulate synaptic plasticity by presynaptic terminal growth. *Behav. Neural. Biol.* **44**, 186-200

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, USA
- Sato, N., Hotta, K., Waguri, S., Nitatori, T., Tohyama, K., Tsujimoto, Y. & Uchiyama, Y. (1994). Neuronal differentiation of PC12 cells as a result of prevention of cell death by bcl-2. *J. Neurobiol.* **25**, 1227-1234
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687
- Schaden, H., Stürmer, C.A.O. & Bähr, M. (1994). GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat. *J. Neurobiol.* **25**, 1570-1578
- Schäfer, F. (1997). Untersuchungen zur Stabilität der MARCKS-mRNA in Swiss 3T3 und PCC7-Mz1-Zellen. Diplomarbeit
- Schneider-Hirsch, S. (1996). Klonierung und Funktionsanalyse von TFneuroE, einem neuen Mitglied der Supergenfamilie nukleärer Rezeptoren. Dissertation
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. & Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**, 439-459
- Sheu, F.S., McCabe, B.J., Horn, G. & Routtenberg, A. (1993). Learning selectively increases protein kinase C substrate phosphorylation in specific regions of the chick brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2705-2709
- Shibasaki, F. & McKeon, F. (1995). Calcineurin functions in Ca²⁺-activated cell death in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **131**, 735-743
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. (1996). Bcl-2 expression prevents activation of ICE protease cascade. *Oncogene* **12**, 2251-2257
- Skene, J.H.P. & Willard, M.B. (1981). Changes in axonally transported proteins during axon regeneration in toad retinal ganglion cells. *J. Cell Biol.* **89**, 86-95
- Skene, J.H.P. & Virag, I. (1989). Posttranscriptional membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. *J. Cell Biol.* **108**, 613-624
- Skene, J.H.P. (1990). GAP-43 as a "calmodulin sponge" and some implications for calcium signaling in axon terminals. *Neurosci. Res. Suppl.* **13**, S112-S125
- Smith, S.C., Reuhl, K.R., Craig, J. & McBurney, M.W. (1987). The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. *J. Cell Physiol.* **131**, 74-84
- Snider, W.D. (1994). Functions fo the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* **77**, 627-638
- Son, H., Madelian, V. & Carpenter, D.O. (1996). The translocation and involvement of protein kinase C in mossy fiber-CA3 long-term potentiation in hippocampus of the rat brain. *Brain Res.* **739**, 282-292
- Specht, H. (1996). Untersuchungen zum apoptotischen Verhalten der embryonalen Karzinomzelllinie PCC7-Mz1. Diplomarbeit

- Srinivasan, A., Foster, L.M., Testa, M.P., Örd, T., Keane, R.W., Bredesen, D.E. & Kayalar, C. (1996). Bcl-2 Expression in Neural Cells Blocks Activation of ICE/CED-3 Family Proteases during Apoptosis. *J. Neurosci.* **16**, 5654-5660
- Starr, R.G., Lu, B. & Federoff, H.J. (1994). Functional characterization of the rat GAP-43 promoter. *Brain Res.* **638**, 211-220
- Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C.S., Krammer, P.H. & Cory, S. (1995). Bcl-2 and FAS/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* **14**, 6136-6147
- Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Kennedy, T.E., Neer, E.J. & Fishman, M.C. (1990). G_o is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* **344**, 836-841
- Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Sudo, Y., Linder, M.E. & Fishman, M.C. (1991). An intracellular guanine nucleotide release protein for G_o. *J. Biol. Chem.* **266**, 22465-22471
- Strittmatter, S.M., Vartanian, T. & Fishman, M.C. (1992). GAP-43 as a Plasticity Protein in Neuronal Form and Repair. *J. Neurobiol.* **23**, 507-520
- Strittmatter, S.M., Cannon, S.C., Ross, E.M., Higashijima, T. & Fishman, M.C. (1993). GAP-43 augments G protein-coupled receptor transduction in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5327-5331
- Strittmatter, S.M., Fankhauser, C., Huang, P.L., Mashimo, H. & Fishman, M.C. (1995). Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell* **80**, 445-452
- Struhl, K. (1991). Mechanism for diversity in gene expression. *Neuron* **7**, 177-181
- Sudo, Y., Valenzuela, D., Beck-Sickinger, A.G., Fishman, M.C. & Strittmatter, S.M. (1992). Palmitoylation alters protein activity: blockade of G_o stimulation by GAP-43. *EMBO J.* **11**, 2095-2102
- Suzuki, A. & Tsutomi, Y. (1998). Bcl-2 accelerates the neuronal differentiation: new evidence approaching to the biofunction of Bcl-2 in the neuronal system. *Brain Res.* **801**, 59-66
- Swartz, K.J., Merritt, A., Bean, B.P. & Lovinger, D.M. (1993). Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca²⁺ channels and synaptic transmission. *Nature* **361**, 165-168
- T**anaka, C. & Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family of neuronal signaling. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 551-567
- Taniguchi, H., Suzuki, M., Manenti, S. & Titani, K. (1994). A mass spectrometric study on the *in vivo* posttranslational modification of GAP-43. *J. Biol. Chem.* **269**, 22481-22484
- Temple, S. & Qian, X. (1996). Vertebrate neural progenitor cells: subtypes and regulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 11-17
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of Disease. *Science* **267**, 1456-1462
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science* **281**, 1312-1316

- Todaro, G.L. & Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established cell lines. *J. Cell Biol.* **17**, 299-313
- Tsujimoto, Y., Finger, L., Yunis, L., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**, 1097-1099
- V**airo, G., Innes, K.M. & Adams, J.M. (1996). Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene* **13**, 1511-1519
- VanBerkum, M.F. & Goodman, C.S. (1995). Targeted disruption of Ca²⁺-calmodulin signaling in Drosophila growth cones leads to stalls in axon extensions and errors in axon guidance. *Neuron* **14**, 43-56
- Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440-442
- Veis, D.J., Sorensen, C.M., Shutter, J.R. & Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys and hypopigmented hair. *Cell* **75**, 229-240
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. & Kolesnick, R.N. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380**, 75-79
- Vogel, H.J. (1994). Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem. Cell Biol.* **111**, 3035-3047
- W**ang, H.G., Rapp, U.R. & Reed, J.C. (1996). Bcl-2 Targets the Protein Kinase Raf-1 to Mitochondria. *Cell* **87**, 629-638
- Weil, M., Jacobson, M.D. & Raff, M. (1997). Is programmed cell death required for neural tube closure? *Curr. Biol.* **7**, 281-284
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330
- White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & Development* **10**, 1-15
- Widmer, F. & Caroni, P. (1993). Phosphorylation-site mutagenesis of the growth-associated protein GAP-43 modulates its effects on cell spreading and morphology. *J. Cell Biol.* **120**, 503-512
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556
- Y**aginuma, H., Tomita, M., Takashita, N., McKay, S.E., Cardwell, C., Yin, Q.W. & Oppenheim, R.W. (1996). A novel type of programmed neuronal cell death in the cervical spinal cord of the chick embryo. *J. Neurosci.* **16**, 3685-3703

- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285-291
- Yang, J., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. & Wang, X. (1997). Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science* **275**, 1129-1132
- Yankner, B.A., Benowitz, L.I., Villa-Komaroff, L. & Neve, R.L. (1990). Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration. *Mol. Brain Res.* **7**, 39-44
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. (1993). The *c. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652
- Z**amponi, G.W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J. & Snutch, T.P. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha I subunit. *Nature* **385**, 442-446
- Zanjani, H.S., Vogel, M.W., Delhaye-Bouchaud, N., Martinou, J.C. & Mariani, J. (1996). Increased cerebellar Purkinje cell numbers in mice overexpressing a human *bcl-2* transgene. *J. Comp. Neurol.* **374**, 332-341
- Zhang, K., Westberg, J.A., Hölttä, E. & Andersson, L.C. (1996). Bcl2 regulates neural differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4504-4508
- Zhong, L.T., Kane, D.J. & Bredesen, D.E. (1993a). Bcl-2 blocks glutamate toxicity in neural cell lines. *Mol. Brain Res.* **19**, 353-355
- Zhong, L.T., Sarafian, T., Kane, D.J., Charles, A.C., Mah, S.P., Edwards, R.H. & Bredesen, D.E. (1993b). *bcl-2* inhibits death of central neural cell induced by multiple agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4533-4537
- Zuber, M.X., Strittmatter, S.M. & Fishman, M.C. (1989a). A membrane-targeting signal in the amino terminus of the neuronal protein GAP-43. *Nature* **341**, 345-348
- Zuber, M.X., Goodman, D.W., Karns, L.R. & Fishman, M.C. (1989b). The neuronal growth-associated protein GAP-43 induces filopodia in non-neuronal cells. *Science* **224**, 1193-1195

Lebenslauf

Name: Esdar
Vorname: Christina
Geburtsdatum: 02.09.1971
Geburtsort: Rahden/Westfalen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Alfred-Mumbächer-Str. 67a
55128 Mainz

1978 – 1982: Besuch der Grundschule Lübbecke
1982 – 1991: Besuch des Wittekindgymnasiums Lübbecke
1991 – 1993: Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität
Münster
1993 – 1995: Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz
1996: Diplomarbeit bei Prof. Dr. A. Maelicke
*"Analyse der GAP-43 Expression während der neuronalen
Entwicklung in vivo und in einem Zellmodell für Neurogenese
(PCC7-Mz1)"*
seit 1997: Anfertigung der vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. A. Maelicke unter
Betreuung von PD Dr. T. Herget.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den