

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-P. Hartung

Identifizierung neuroprotektiver Liganden im Modell der oxidativen Glutamattoxizität

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mai-Ly Tran Tien

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Axel Methner

Zweitgutachter: PD Dr. med. Philipp Albrecht

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Extracellular cyclic GMP and its derivatives GMP and guanosine protect from oxidative glutamate toxicity.

Albrecht P, Henke N, Tien ML, Issberner A, Bouchachia I, Maher P, Lewerenz J, Methner A.,

Neurochem Int. 2013 Apr;62(5):610-9. doi: 10.1016/j.neuint.2013.01.019

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungen

2 Einleitung und theoretische Grundlagen

2.1 Oxidativer Stress

2.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und der Schutz vor oxidativem Stress

2.1.2 Oxidativer Stress und neurologische Erkrankungen

2.1.3 Oxidative Glutamattoxizität als Modell für neuronalen Zelltod in Abhängigkeit von oxidativem Stress

2.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

2.2.1 Struktur von GPCRs

2.2.2 Aktivierung der Signalwege von GPCRs

2.2.3 Regulation und Modulation der GPCR-Signalkaskade

2.2.4 Opioidrezeptoren

2.2.5 GPCRs als Ziel für Medikamente

2.2.6 GPCRs und ihre Rolle bei glutamatinduziertem Zelltod

2.3 Die untersuchten Liganden

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

3.1.2 Nährmedium für die Zelllinie HT22

3.1.3 Puffer und Lösungen

3.1.4 Zelllinie HT22

3.1.5 Geräte

3.1.6 Programme

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Erhaltung

3.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

3.2.2 Modell der Glutamattoxizität

3.2.2.1 Glutamattoxizitätstest

3.2.2.2 Liganden

3.2.2.3 Zytotoxizitätstest

3.2.2.4 GSH-Messung mittels Monochlorobiman

3.2.2.5 Enzymatische GSH-Messung

3.3 Statistische Analyse

4 Ergebnisse

4.1 Glutamatinduzierter Zelltod an HT22-Zellen

4.1 Screening aller Liganden im Glutamattoxizitätstest

4.2 Einige Liganden verstärkten die oxidative Glutamattoxizität

4.3 Liganden mit zellproliferativen Effekten

4.4 Hemorphin und cGMP schützten signifikant vor oxidativer Glutamattoxizität

5 Diskussion

6 Literatur

7 Danksagung

8 Eidesstaatliche Versicherung

1 Abkürzungen

°C	Grad Celcius
7-TM	Siebentransmembranrezeptoren
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
Aβ	Amyloid β
ATP	Adenosintriphosphat
BAM22	<i>Bovine adrenal medulla 22</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
dest.	Destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEP	<i>EDTA-extractable protein</i>
FMLF	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Gramm
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GAL	Galanin
GDP	Guanosindiphosphat
GHRP-6	<i>Growth hormone releasing hexapeptide</i>
Glc	Glucose
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
GRP	Gastrin Releasing Peptid
GSH	γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO·	Hydroxylradikal
IGF-I	<i>insulin-like growth factor I</i>
IP ₃	Inositoltriphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
Leu	Leucin
LHRH	lutinisierendes Hormon Releasing-Hormon
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
m	Meter
M	Mol
MCB	Monochlorobiman
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MIF	<i>melanocyte-stimulating hormone release-inhibiting factor</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NPF	Neuropeptid F
O ₂ ^{·-}	Superoxidanionradikal
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt(en)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PKA	Proteinkinase A
PLD	Phospholipase D
RGS	Regulationsprotein G-gekoppelter Rezeptoren
Rho	Ras homologue
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SRE	Serum-Antwort-Element
SRIF	<i>somatotropin release-inhibiting factor</i>
Tab.	Tabelle
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon

u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glc-NAc	Uridine diphosphate N-acetylglucosamine
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
X _c ⁻	Cystin/Glutamat-Antiporter
z.B.	zum Beispiel

2 Einleitung und theoretische Grundlagen

2.1 Oxidativer Stress

2.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und der Schutz vor oxidativem Stress

Oxidativer Stress führt zu einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und deren Verstoffwechslung. Zu der Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies zählt man Superoxid-Anionenradikale ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($HO\cdot$), die bei der Reduktion von Sauerstoff, z.B. als Nebenprodukte der Komplexe I und III der mitochondrialen Atmungskette entstehen (Turrens and Boveris, 1980), oder durch weitere metabolische Zellaktivitäten, Zytokine, Umwelteinflüsse, UV-Strahlung oder Medikamente. Bei Akkumulation von ROS entsteht Schädigung u.a. von Proteinen, DNS und die Zerstörung von Zellmembranen durch Angriff auf ihre ungesättigten Fettsäuren (Übersichtsarbeit von Finkel & Holbrook, 2000).

Es gibt mehrere enzymatische und nichtenzymatische antioxidative Schutzmechanismen, um die Gefahr der Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies zu verhindern. Hervorzuheben ist die Rolle des Tripeptids Glutathion (GSH), das nichtenzymatisch Produkte wie Superoxid-Anionenradikale und Hydroxylradikale reduziert (Übersichtsarbeit von Schulz et al., 2000). Als Tripeptid (Glutamat, Cystein, Glycin) ist GSH das kleinste zelluläre Antioxidans in der Abwehr gegen oxidativen Stress. Das limitierende Substrat der GSH-Synthese ist die Aminosäure Cystein, die entweder aus dem Cystathionin-Stoffwechsel (Finkelstein, 2000) oder durch intrazelluläre Reduktion von Cystin (Griffith, 1999) synthetisiert wird. Cystin wird von extrazellulär durch den System X_c^- genannten Cystin/Glutamat-Antiporter in den Intrazellulärraum transportiert (Murphy et al., 1989).

Die protektiven Signalwege, die durch chronischen oxidativen Stress ausgelöst werden, können zum Zellüberleben, aber auch zur Einleitung von Apoptose, also programmiertem Zelltod, führen (Martindale and Holbrook, 2002).

2.1.2 Oxidativer Stress und neurologische Erkrankungen

Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener neurologischer Erkrankungen wie der Alzheimer'schen Demenz, dem Morbus Parkinson, dem Morbus Huntington, der Epilepsie und dem ischämischen Schlaganfall (Wiedau-Pazos et al., 1996; Costello und Delanty, 2004; Browne und Beal, 2006; Steiner et al., 2006; Ilieva et al., 2007; Wong und Crack, 2008). Das Gehirn ist empfindlich für oxidative Prozesse (Behl, 1999). Es benötigt hohe Energieressourcen, die es durch vermehrte ATP-Synthese in der mitochondrialen

Atmungskette gewinnt, was gleichzeitig mit einer erhöhten Produktion von ROS einhergeht. Auch ist die Menge der ungesättigten Fettsäuren im zentralen Nervensystem hoch, die Angriffspunkte für Sauerstoffradikale darstellen.

Man geht davon aus, dass oft auch eine exzessive Glutamatausschüttung an neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt ist, welche zu massivem Kalziumeinstrom und als Folge zum Zelltod führen kann (Choi, 1987). Dieser Mechanismus der exzessiven neuronalen Glutamatausschüttung mit konsekutivem Zelltod wird auch als Exzitotoxizität bezeichnet (Bruno et al., 1995). Glutamat ist ein wichtiger zentraler Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Übersichtsarbeit von Fonnum, 1984) und ist an vielen verschiedenen Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Neben Exzitotoxizität können erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen neurotoxische Effekte bedingen, indem der Konzentrationsgradient zum Intrazellulärraum eine Blockade des Cystin/Glutamat-Antiporters System X_c^- zur Folge hat, was in Folge zu einem Erliegen der Glutathion-Synthese führt.

2.1.3 Oxidative Glutamattoxizität als Modell für neuronalen Zelltod in Abhängigkeit von oxidativem Stress

Als in-vitro Modell für endogenen oxidativen Stress eignet sich das Modell der oxidativen Glutamattoxizität an der gut untersuchten hippokampalen HT22-Zelllinie der Maus. Da diese Zellen keine ionotropen Glutamatrezeptoren exprimieren, kommt es nicht zu Exzitotoxizität. Oxidativer Stress wird hier durch die Zugabe von Glutamat in das Zellkultur-Medium induziert (Davis & Maher, 1994). Dabei resultiert die Glutamattoxizität aus der hohen extrazellulären Glutamatkonzentration, welche durch den transmembranären Konzentrationsgradienten den Cystin/Glutamat-Antiporter X_c^- blockiert und somit zu einer Erniedrigung der intrazellulären Cystinkonzentration führt (Lewerenz et al., 2003). Der Mangel an intrazellulärem Cystin führt zu einer verminderten Produktion von Glutathion, sodass die Verstoffwechslung von reaktiven Sauerstoffspezies nicht mehr gewährleistet ist. Es akkumulieren reaktive Sauerstoffspezies und führen schließlich zum Zelltod (Tan et al., 1998).

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits in vorherigen Arbeiten dieses in-vitro Modell für endogenen oxidativen Stress verwendet (Lewerenz et al., 2003; Sahin et al., 2006; Dittmer et al., 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Sammlung 54 verschiedener endogener, putativer extrazellulärer Liganden von Rezeptoren auf ihre Wirkung im Modell der oxidativen Glutamattoxizität untersucht werden, um so neuroprotektive oder neurotoxische Substanzen zu identifizieren.

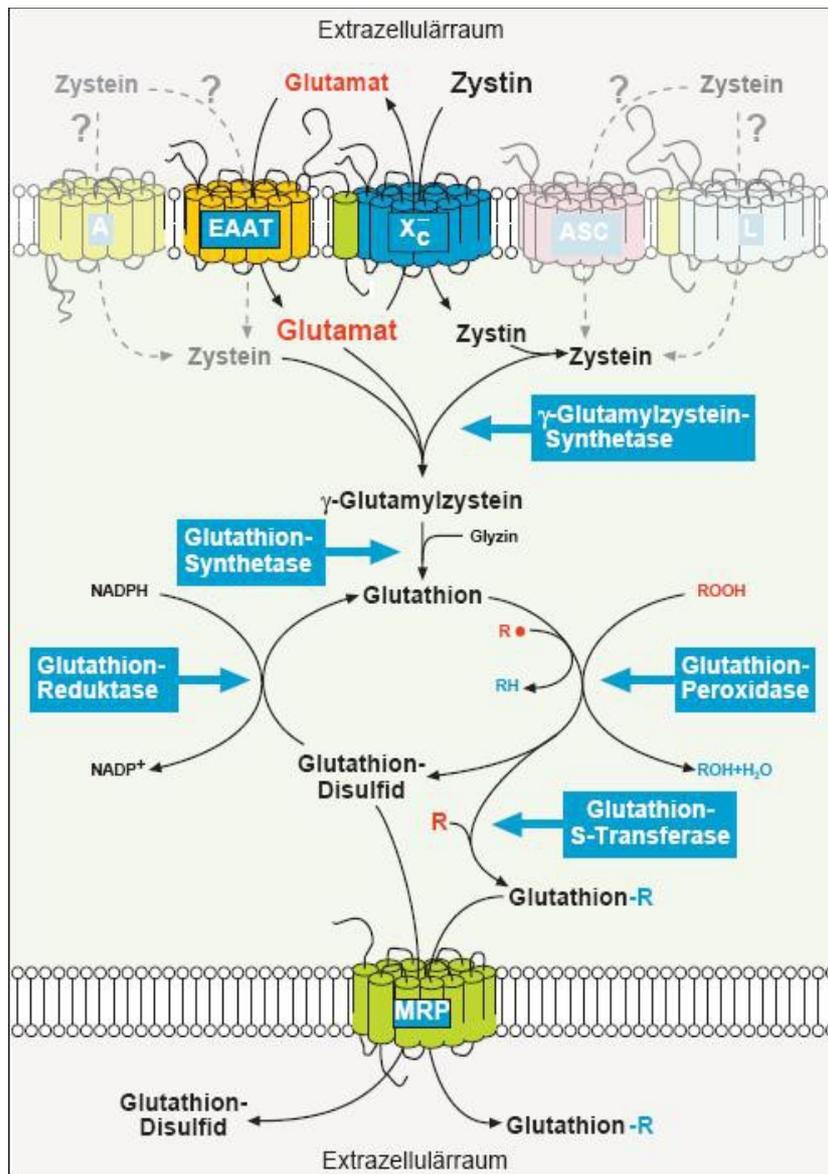


Abb. 1: Glutathionsynthese und die Darstellung des Cystin/Glutamat-Antiporter X_c⁻ sowie seine Funktion in Abhängigkeit von Glutamat. Über den Cystin/Glutamat-Antiporter X_c⁻ wird Zystin im Austausch von Glutamat in den Intrazellulärraum aufgenommen und steht der Glutathionsynthese zur Verfügung, wodurch dann Peroxide und freie Radikale abgebaut werden können (Lewerenz & Methner, 2006).

2.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) gehören mit über 1000 verschiedenen Subtypen zu einer der größten Familien membranständiger Oberflächenrezeptoren und machen einen Anteil von 2% aller humanen Proteine aus (Übersichtsarbeit von Howard et al., 2001). Der Großteil der derzeit verwendeten Medikamente modifizieren die Signalwege von GPCRs (Drews, 2000). Daher kommt GPCRs bei der Suche nach neuroprotektiven Substanzen eine wichtige Rolle zu. Entdeckt wurden GPCRs in den 1980er Jahren, als in Untersuchungen der visuellen Signalübertragung in der Retina und der hormonellen Signalübertragung in anderen Geweben Analogien festgestellt wurden (Lefkowitz, 2000). Man identifizierte in beiden Prozessen einen membranständigen Rezeptor, ein G-Protein und ein Effektorprotein. Die Röntgenstrukturanalyse des retinalen Sehpigments Rhodopsin ermöglichte eine Darstellung der molekularen Struktur von GPCRs. Dabei erkannte man eine Polypeptidkette, die die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran siebenfach durchspannte (Palczewski et al., 2000). Die meisten dieser Siebentransmembranrezeptoren (7-TM) werden als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bezeichnet, da sie ein Guaninnukleotid-regulierendes Protein aktivieren. Die Aktivierung der Signalwege über GPCRs kann durch extrazelluläre Moleküle (Übersichtsarbeit von Bockaert & Pin, 1999) ausgelöst werden. Dies ist ein grundlegender Mechanismus vieler physiologischer Prozesse, wie der Neurotransmission und des Metabolismus, der Sekretion und des Zellwachstums.

2.2.1 Struktur von GPCRs

Wie oben dargelegt, gehören die GPCRs zur Familie der Siebentransmembranrezeptoren (7-TM). Sie bestehen aus 7 hydrophoben, die Zellmembran durchspannenden Untereinheiten, sogenannten α -Helices. Diese 7 α -Helices sind miteinander durch drei extra- und drei intrazellulären Schleifen miteinander verbunden, wobei die N-terminale Sequenz extrazellulär und die C-terminale Sequenz intrazellulär liegt (Übersichtsarbeit von Howard et al., 2001). Dabei besitzen die GPCRs eine extrazelluläre oder transmembranöse Bindungsstelle für Liganden, während das G-Protein intrazellulär am Rezeptor gebunden ist. Die meisten der 7-TM-Rezeptoren lassen sich in drei Hauptklassen (A, B und C) einteilen (Übersichtsarbeit von Gether, 2000). Zur Rezeptorfamilie A gehören Rhodopsin, Rhodopsin-verwandte Rezeptoren und auch β -Adrenorezeptoren. Diese bilden die größte Untergruppe und zeichnen sich strukturell durch bis zu 20 konservierte Aminosäuren (AS) und eine Palmitoylierungsgruppe am C-Terminus aus. Durch diesen strukturellen Aufbau wird die Ausbildung einer zusätzlichen, vierten intrazellulären Schleife ermöglicht, die sogenannte Helix 8, die durch ihre Palmitoylierungsgruppe in der Zytoplasmamembran verankert ist (Übersichtsarbeit von Qanbar & Bouvier, 2003). Zu der Rezeptorfamilie B gehören die Glucagonrezeptor-ähnlichen

Rezeptoren, die sich durch konservierte AS sowie einen langen N-Terminus (>100 AS) mit sechs konservierten AS und einen kurzen C-Terminus ohne Palmitoylierungsgruppe auszeichnen. Schließlich ist für die Rezeptorfamilie C, zu der metabotrope Neurotransmitter wie zum Beispiel GABA-Rezeptoren gehören, ein sehr langer N-Terminus (500-600 AS) mit bis zu 20 konservierten AS und einen C-Terminus ohne Palmitoylierungsgruppe charakteristisch.

2.2.2 Aktivierung der Signalwege von GPCRs

Die Aktivierung der Signalwege von GPCRs können durch extrazelluläre Moleküle wie Aminosäuren, Peptide, Lipide, Kalzium und Photonen (Übersichtsarbeit von Bockaert & Pin, 1999) ausgelöst werden. Die extrazelluläre Bindung von Liganden kann zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führen (Farrens et al., 1996). Diese Konformationsänderung bewirkt, dass neben der Bindung eines heterotrimeren G-Proteins weitere Adaptermoleküle interagieren können, die an der Signalweiterleitung und eventuellen Internalisierung des Rezeptors beteiligt sind. Rodbell und Kollegen entdeckten schon in den 1970er Jahren das G-Protein, welches im inaktiven Zustand aus der α -, β - und γ -Untereinheit und einem gebundenen Guanosindiphosphat (GDP) besteht (Rodbell et al., 1971). Bei Aktivierung des Rezeptors tritt das G-Protein mit GDP in Wechselwirkung und es kommt zu einem Austausch von dem an der Untereinheit gebundenen GDP zu GTP. Dieser Austausch wird durch den Guaninnukleotid-Austauschfaktor Rho (RhoGEF) induziert und bewirkt den aktiven Zustand des G-Proteins (Übersichtsarbeit von Bourne et al., 1991). In diesem aktivierten Zustand des G-Proteins dissoziieren die α -Untereinheit mit GTP und der β/γ -Dimerkomplex auseinander und führen unabhängig voneinander zur Regulierung von membrangebundenen Zielproteinen, welche Enzyme (Adenylatzyklase, Phospholipase C, cGMP-Phosphodiesterase) oder Ionenkanäle sein können. Die unterschiedlichen Signalkaskaden sind von der Spezifität der α -Untereinheit des G-Proteins abhängig. Es existieren 16 verschiedene α -Untereinheiten, die wiederum in vier Unterfamilien von G-Proteinen, G_{α_s} , G_{α_i} , G_{α_q} und $G_{\alpha_{12/13}}$ unterteilt werden (Hamm, 2001). Je nach α -Untereinheit werden Zell- bzw. Membranproteine aktiviert oder deaktiviert. Eine Aktivierung der α -Untereinheit von G_{α_s} -Proteinen führt beispielsweise zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, die den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) produziert, der weiter die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Rodbell et al., 1971). Die aktivierte PKA phosphoryliert Serin/Threoninreste von Zielproteinen. Im Gegensatz dazu führt eine Aktivierung von G_{α_i} -Proteinen zu einer Inhibierung der Adenylatzyklase und somit in Folge auch zu einer verminderten Bildung von cAMP. Wird bei einer Signalübertragung das G_{α_q} -Protein aktiviert, werden die sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) über die Aktivierung der Phospholipase C produziert. IP_3 bewirkt die Öffnung von Kalziumkanälen, während DAG die Phospholipase C aktiviert. Bei einer Aktivierung der $G_{\alpha_{12/13}}$ -Proteinen werden sowohl die

Phospholipase D (PLD) und Thyrosinkinasen, als auch RhoGEF und mehrere Rho-Proteine aktiviert (Übersichtsarbeit von Liebmann, 2004). Abhängig von Aktivierung oder Inhibierung der Zielproteine durch die verschiedenen G-Proteine können also die Konzentrationen von sekundären Botenstoffen oder Liganden reguliert werden, was wiederum den Metabolismus der Zelle verändern kann (Übersichtsarbeit von Howard et al., 2001).

2.2.3 Regulation und Modulation der GPCR-Signalkaskade

Zur Regulation zellulärer Erregbarkeit, z.B. in Abhängigkeit von extrazellulären Signalen, stehen den GPCRs verschiedene Mechanismen wie die Desensibilisierung, die Internalisierung, der lysosomale Abbau und viele mehr zur Verfügung (Klaase et al., 2008). Durch die Aktivierung der GPCRs durch extrazelluläre Liganden kann eine Desensibilisierung eintreten. Das bedeutet, dass der Rezeptor nach mehrmaliger repetitiver Stimulation durch den Liganden einen Verlust der erneuten Aktivierbarkeit erfährt, indem seine Reizschwelle überschritten wurde. Darauf folgt eine Internalisierung des Rezeptors. Diese Desensibilisierung kann durch einen Rückkopplungsmechanismus ausgelöst werden, indem die verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) oder cAMP-abhängige Kinasen den Rezeptor selbst phosphorylieren, durch den sie zuvor aktiviert wurden (Übersichtsarbeit von Hausdorff et al., 1990). Durch die Phosphorylierung des Rezeptors im Rahmen der Desensibilisierung kann gleichzeitig die Bindung mit einem G-Protein verhindert werden und auch die Interaktion anderer Proteine gefördert werden.

Eine weitere wichtige Rolle in der Signalweiterleitung spielen sogenannte Regulationsproteine von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (RGS, „Regulators of G-protein Signaling“). Diese Regulationsproteine zeichnen sich durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität gegenüber aktiven $G\alpha$ -Untereinheiten aus, besonders gegenüber $G\alpha_i$ - und $G\alpha_q$ -Proteinen. Diese RGSs können den inaktiven Zustand der Rezeptoren beschleunigen, wodurch keine weitere Signaltransduktion ausgelöst werden kann (Gilman et al., 1987). Als ein wichtiger Vertreter der RGSs ist das RGS16 zu nennen. RGS16 inhibiert die $G\alpha_{13}$ -vermittelte Signalweiterleitung und damit die Serum-Antwort-Element- (SRE, „Serum Response Element“) vermittelte Transkription (Johnson et al., 2003). Ohne solche Regulationsmechanismen könnte die Zelle nicht auf stets neue extrazelluläre Signale reagieren. Dies würde schließlich zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Ein solches unkontrolliertes Zellwachstum könnte letztendlich zur Entstehung von Tumorzellen führen.

2.2.4 Opioidrezeptoren

Auch Opioidrezeptoren gehören zu der Rezeptorfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Opioide wirken v.a. analgetisch, sedierend und euphorisierend. Es gibt sowohl endogene Opioide als auch exogene Narkoanalgetika, die an Opioidrezeptoren binden. Zu den körpereigenen Liganden gehören z.B. Endorphin, Enkephalin und Dynorphin.

Es gibt verschiedene G-Protein gekoppelte Opioidrezeptoren. Die bekanntesten sind die μ -, κ - und δ -Rezeptoren. Allen drei Rezeptorgruppen gemeinsam ist die Aktivierung eines G_{α_i} -Proteins, welches somit zur Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt (Übersichtsarbeit von Kelly, 2013).

2.2.5 GPCRs als Ziel für Medikamente

GPCRs sind in vielen Zellprozessen wie z.B. Zellwachstum, Zellproliferation, Neurotransmission, Metabolismus, Sekretion und vielen weiteren Abläufen beteiligt. So können Defekte und Störungen in der Signalkaskade zur Ausbildung von Tumoren und anderen Krankheiten führen. Daher sind GPCRs wichtige Regulations- und Angriffspunkte für Medikamente. Etwa 50% der auf dem Markt verschreibungspflichtigen Medikamente wirken auf verschiedenen Ebenen der GPCRs (Übersichtsarbeit von Howard et al., 2001). Die meisten dieser Medikamente sind inverse Agonisten (Übersichtsarbeit von Wilson et al., 1998). Als Beispiel für diese inversen Agonisten sind der Histamin-Rezeptorantagonist Fexofenadine (Telfast (R)) und die Serotonin-Rezeptoragonisten Sumatriptan (Imigran (R)) oder Ergotamin zur Vasokonstriktion zu nennen (Übersichtsarbeit von Jacoby et al., 2006).

Anhand von bioinformatischen Analysen und der Sequenz des menschlichen Genoms konnten bis zu 500 Waisen-GPCRs (Orphan-GPCRs) entdeckt werden. Unbekannt in diesem Zusammenhang sind die Liganden der jeweiligen Waisen-GPCRs (Übersichtsarbeit von Shaaban & Benton, 2001; Übersichtsarbeit von Menzaghi et al., 2002). Somit besteht ein hohes Aufklärungspotenzial zur Identifizierung von Liganden und deren Funktion, was wissenschaftlich weitere Einblicke in die physiologische Rolle dieser Rezeptoren und das Design pharmakologisch aktiver Agonisten, Antagonisten oder inverser Agonisten erlaubt (Joost & Methner, 2002).

Aus diesem Grund spielen GPCRs in der pharmazeutischen Forschung eine zentrale Rolle. Ziel der Aufklärung zellulärer Mechanismen, beteiligter Rezeptoren und Liganden ist die Identifizierung neuer Zielstrukturen und Angriffspunkte zur medikamentösen Therapieentwicklung. Die Identifizierung neuer Zielstrukturen sollen Angriffspunkte für pharmakologische Ansätze („drug targets“) unterschiedlicher Krankheiten sein.

2.2.6 GPCRs und ihre Rolle bei oxidativer Glutamatoxizität

Zwei wichtige Beispiele zeigen die Bedeutung von GPCRs bei oxidativer Glutamatoxizität. Zur Familie der GPCRs gehören die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR). Zur Zeit sind acht mGluR bekannt und werden in Abhängigkeit ihrer Struktur und ihren pharmakologischen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt. Die Rezeptoren der Gruppe I sind G_{α_q} -gekoppelte Rezeptoren und aktivieren somit die Phospholipase C. Gruppe II und III hemmen die Aktivierung der Adenylatzyklase durch Kopplung an G_{α_i} -Proteine.

In vergangenen Studien zeigte sich u.a. durch die Aktivierung der Proteinkinase C eine Inhibition glutamatinduzierter Zytotoxizität (Davis und Maher, 1994). Sagara und Schubert zeigten 1998 in ihrer Arbeit die protektive Wirkung von metabotropen Glutamatrezeptoragonisten an mGluR I im Modell der HT22-Zellen.

Außerdem zeigte die Stimulation von Dopamin D4-Rezeptoren durch Blockierung des intrazellulären Kalziumeinstroms durch Regulation von intrazellulärem cGMP eine zellprotektive Wirkung (Ishige et al., 2001). Sie zeigten zu welchem Zeitpunkt der oxidativen Glutamatoxizität Dopaminagonisten neuroprotektiv wirken. Die Aktivierung von D4-Rezeptoren bewirkte eine Erniedrigung der intrazellulären cGMP-Konzentration, sodass schlussgefolgert wurde, dass dies der entscheidende Mechanismus für die Zellprotektion vor Glutamat ist. Durch eine Erniedrigung der intrazellulären cGMP-Konzentration werden weniger cGMP-abhängige Kalziumkanäle geöffnet und der intrazelluläre Kalziumeinstrom sinkt, der zum Zelltod führen würde.

2003 erarbeitete die Arbeitsgruppe von Lewerenz et al., dass die Aktivierung von G_{α_s} -Proteine HT22-Zellen vor oxidativer Glutamatoxizität schützt. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Cholera toxin G_{α_s} -Proteine aktiviert und somit die Synthese der Adenylatzyklase fördert, was eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und eine Aktivierung der Proteinkinase A zur Folge hat. In Zellen, die mit Cholera toxin behandelt wurden, wurde eine erhöhte Konzentration von intrazellulärem Glutathion gemessen.

Eine zentrale Rolle der GPCRs zum Schutz vor oxidativen Stress zeigte die Wirkung von Bcl-2, einem Protoonkogen (Sahin et al., 2006). Auch die Überexpression von Bcl-2 bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Glutathionkonzentration.

2.3 Die untersuchten Liganden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Peptide und kleine Moleküle untersucht, bei denen eine Wirkung als extrazelluläre Liganden bereits bekannt war oder möglich erschien. Diese Liganden waren ein Geschenk von Prof. Chica Schaller (Institut für Entwicklungs-Neurobiologie der Universität Hamburg), die mit Hilfe dieser Ligandenbibliothek verschiedene GPCRs deorphanisieren wollte. Die untersuchten Liganden unterscheiden sich in verschiedenen Aspekten. Um die Gesamtzahl der Liganden übersichtlich zu gestalten, werden diese in funktional gemeinsame Gruppen eingeteilt.

Der Großteil der Substanzen sind bekannte extrazelluläre Liganden, die über G-Proteingekoppelte Rezeptoren verschiedene Signalkaskaden primär auslösen. Zu den Liganden, die das G_{α_s} -Protein und somit die Adenylatzyklase aktivieren, gehören: Amylin, Forskolin, Lysophosphatidsäure (LPA), Lysophosphatidylcholin (LPC), Progesteron, Relaxin und Secretin. Einige dieser Substanzen können zusätzlich auch über andere G-Proteine, je nach ihren Rezeptoren, Signalwege aktivieren. Apelin, Chemerin, Galanin (GAL), Galanin 1-16 (Gal 1-16), HOE14B, Kallidin, LPA, Neuropeptid Y (NPY), Neuropeptid F (NPF), Relaxin, Somatostatin, Somatotropin release-inhibiting Factor (SRIF), Uridindiphosphat-Glucose (UDP-Glc) und Uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-Glc-NAc) senken die Konzentration von cAMP durch die Inhibierung der Adenylatzyklase über das G_{α_i} -Protein. Der Großteil der untersuchten Liganden erhöhen die Aktivität der Phospholipase C über das G_{α_q} -Protein: Amyloid β ($A\beta$), Amylin, Chemerin, EDTA-extractable-Protein (EEP), Endothelin, N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLF), GAL, GAL 1-16, Gastrin Tetrapeptid, *Growth hormone releasing hexapeptide* (GHRP-6), Gastrin Releasing Peptid (GRP), HOE14B, Kallidin, luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon (LHRH), LHRH 1-5, LHRH II, LPA, LPC, Motilin, Neurokinin A, Neuromedin B, Neuromedin U, Prokinetin, Relaxin, Gastron, Substanz K, Substanz P, Thyreotropin Releasing Hormon (TRH), Uridindiphosphat (UDP) und Urotensin. Außerdem untersuchten wir auch bekannte intrazelluläre *second messenger*, die wir in der vorliegenden Arbeit jedoch als extrazelluläre Substanzen einsetzten. Hierzu zählen zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Beide Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionen nach Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren, welche cAMP- bzw. cGMP-abhängige Proteinkinasen aktivieren.

Schließlich zählen die Liganden β -Endorphin, Endomorphin, Leu-Enkephalin, Tyr-MIF-I, Morphiceptin und Substanz P zu der Gruppe der Opiode. Diese Substanzen koppeln an μ -, κ - und δ -Rezeptoren, die als Opiodrezeptoren bekannt sind (Waldhoer et al., 2004). Diese Opioid-Rezeptoren gehören ebenfalls zu der Gruppe der GPCRs.

Insulin-like growth factor I (IGF-1), *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) und Nocistatin können nicht zu den o.g. Gruppierungen gezählt werden. Der Rezeptor von IGF-1 ist ein transmembranärer Tyrosinkinaserzeptor. Tyrosinkinaserzeptoren können nach Bindung ihrer Liganden Moleküle phosphorylieren, indem sie eine Phosphatgruppe von ATP abspalten

(LeRoith et al., 1995; Hanks et al., 1988). PAMP wirkt über Waisen-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Creagh & O'Neill, 2006). Der Rezeptor von Nocistatin, u.a. ein Derivat des Präpronociceptinproteins neben Nociceptin und NocII, konnte bislang noch nicht identifiziert werden (Johnson & Connor, 2007).

Die folgende Tabelle fasst alle in dieser Arbeit untersuchten Liganden, ihre im Glutamatoxizitätstest verwendeten Konzentrationen und, soweit bekannt, ihre primären Signaltransduktionen zusammen.

Ligand	Primäre Signaltransduktion	Konzentrationen im Glutamatoxizitätstest
A β	Ga _q (Le et al., 2001)	1 μ M, 1nM
Amylin	Ga _s , Ga _q (Morfis et al., 2998)	10 nM, 1nM
Apelin	Ga _i (Lee et al., 2001)	1 μ M, 10 nM
BAM22	Opiodrezeptoren μ δ κ (Breit et al., 2006)	1 μ M, 10 nM
β -Endorphin	Opiodrezeptor μ (Li, 1976)	100 nM, 10 nM
cAMP	second messenger	1 μ M, 100 nM
cGMP	second messenger	0,1 mM, 10 μ M
Chemerin	Ga _q , Ga _i (Wittamer et al., 2003)	1 μ M, 100 nM
Dynorphin	Opiodrezeptor μ (Merg et al., 2006)	10 nM, 100 nM
EEP	Ga _q (Kobayashi et al., 1990)	1 μ M, 100 nM
Endomorphin	Opiodrezeptor μ (Zadina et al., 1999)	1 μ M, 100 nM
Endothelin	Ga _q (Mizoqushi et al., 2000)	1 μ M, 100 nM
FMLF	Ga _q (Zhang et al., 2003)	100 nM, 10 nM
Forskolin	Ga _s (Insel et al., 2003)	1 μ M, 100 nM
GAL	Ga _i , Ga _q (Kelli et al., 1998)	1 μ M, 100 nM
GAL1-16	Ga _i , Ga _q (Kelli et al., 1998)	1 μ M, 1 nM
Gastrin Tetrapeptid	Ga _q (Nagata et al., 1996)	1 μ M, 10 nM
Gastrin	Ga _q (Nagata et al., 1996)	1 μ M, 100 nM
GHRP-6	Ga _q (Yan et al., 2004)	1 μ M, 1 nM
GRP	Ga _q (Benya et al., 1995)	1 μ M, 100 nM
Hemorphin	Opiodrezeptoren μ δ (Lee et al., 2003)	1 μ M, 0,1 μ M
HOE140	Ga _i , Ga _q (Liebmann et al., 1993)	1 μ M, 100 nM
IGF-1	Tyrosinkinaserzeptor (LeRoith et al., 1995)	1 μ M, 100 nM

Kallidin	Ga _i , Ga _q (Boels, 2003)	1 μM, 100 nM
Leu-Enkephalin	Opiodrezeptoren μ δ (Rapaka, 1986)	1 μM
LHRH	Ga _q (Naor et al., 2000)	1 μM
LHRH1-5	Ga _q (Naor et al., 2000)	1 μM, 100 nM
LHRHII	Ga _q (Naor et al., 2000)	1 μM, 100 nM
LPA	Ga _s , Ga _i , Ga _q (Hla et al., 2001)	10 μM, 1 μM
LPC	Ga _s , Ga _q (Flavahan, 1993)	1 μM, 100 nM
MIF-1	Opiodrezeptor μ (Gergen et al., 1996)	10 μM, 1 μM
Morphiceptin	Opiodrezeptor μ (Chang, 1982)	1 μM, 100 nM
Motilin	Ga _q (Depoortere, 2001)	100 nM, 10 nM
Neurokinin A	Ga _q (Winter, 2005)	1 μM, 100 nM
Neuromedin B	Ga _q (Benya et al., 1995)	1 μM, 100 nM
Neuromedin U	Ga _q (Brighton, 2004)	1 μM, 100 nM
Neuropeptid Y	Ga _i (Michel et al., 1998)	1 μM, 100 nM
Nocistatin	unbekannter Rezeptor (Johnson & Connor, 2007)	1 μM, 100 nM
NPF	Ga _i (Reale et al., 2004)	100 nM, 10 nM
PAMP	Waisen-GPCR (Nicaise, 2009)	100 nM, 0,1 pM
Progesteron	Ga _s (Gadkar-Sabke, 2005)	1 μM, 100 nM
Prokinetin	Ga _q (Lin et al., 2002)	100 nM, 10 nM
Relaxin	Ga _s , Ga _i , Ga _q (Bathgate et al., 2006)	100 nM, 10 nM
Secreton	Ga _s (Dong & Miller, 2002)	100 nM, 10 nM
Somatostatin	Ga _i (Hoyer et al., 1995)	1 μM, 0,1 nM
SRIF	Ga _i (Yamada et al., 1993)	1 μM, 100 nM
Substanz K	Ga _q (Norma et al., 1990)	1 μM, 100 nM
Substanz P	Ga _q (Gerard et al., 1991)	1 μM, 100 nM
TRH	Ga _q (Gershengorn, 1993)	100 nM, 10 nM
UDP	Ga _q (Abbracchio et al., 2006)	1 μM, 1 nM
UDP-Glc	Ga _i (Abbracchio et al., 2003)	100 μM, 10 μM
UDP-Glc-NAc	Ga _i (Abbracchio et al., 2003)	1 μM, 1 nM
Urotensin	Ga _q (Douglas et al., 2004)	100 nM, 10 nM

Tab. 1: Alle untersuchten Liganden im Glutamatoxizitätstest, ihre eingesetzten Konzentrationen und ihre nach Rezeptorbindung ausgelösten G-Proteine (soweit bekannt).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders im Text angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Fluka Chemie GmbH (Buchs) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

3.1.2 Nährmedium für die Zelllinie HT22

Für die Zelllinie HT22 wurde das Zellkulturmedium DMEM *High Glucose* (PAA, Paschin, Austria), versetzt mit 5% fetalem Kalbserum (Hyclone, Vienna, Austria) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Karlsruhe), verwendet.

3.1.3 Puffer und Lösungen

MTT-Solubilisierungspuffer, pH 4

Dimethylformamid	20%
Natriumdodecylsulfat (SDS)	20%
Essigsäure	10%
Aqua dest.	

PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung), pH 7,4

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
Aqua dest.	

3.1.4 Zelllinie HT22

Die Experimente zur oxidativen Glutamattoxizität wurden an der neuronalen, hippokampalen Zelllinie HT22 der Maus durchgeführt. Diese Zellen repräsentieren einen modifizierten Subklon

der murinen, hippokampalen Zelllinie HT4 mit erhöhter selektiver Sensitivität gegenüber Glutamat und wurden der Arbeitsgruppe durch Dave Schubert zur Verfügung gestellt (Morimoto und Koshland, 1990; Maher und Davis, 1996).

3.1.5 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
FluoroGenios Pro	Tecan, Männedorf
Heracell 150 Inkubator	Kendro, Schwerte
Herasafe Sterilbank	Kendro, Schwerte
IX81-Fluoreszenz Mikroskop	Olympus, Hamburg
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Grobwaage	Kern EW
Wasserbad	Memmert, Schwabach

3.1.6 Programme

Microsoft Office
GraphPad Prism 5
Magellan Software (Proprietäre Software des Luminometers von Tecan)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Erhaltung

Die Erhaltung der murinen, hippokampalen Zelllinie HT22 erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden mit Nährmedium in 10 cm Platten kultiviert. Abhängig von Wachstumsgeschwindigkeit und Zelldichte wurden sie nach 2 bis 4 Tagen passagiert. Bei einer 70 bis 80%-igen Konfluenz erfolgte das Waschen mit PBS. Zur Ablösung der Zellen diente 0,5% Trypsin (Gibco) mit 0,2% EDTA (Gibco). Anschließend wurde Trypsin mit einer Menge von mindestens dem 10-fachem an Nährmedium (inkl. 5% Serum) inaktiviert. Nach Inaktivierung wurden die Zellen von der Kulturplatte gespült, in frischem Nährmedium auf Zellplatten aufgenommen und je nach gewünschter Zellzahl zur weiteren Kultur ausplattiert.

3.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl nach Ablösung von den Zellplatten erfolgte mittels Neubauer Zählkammer. Durch die Zugabe von Trypanblau wurde die farbliche Differenzierung metabolisch aktiver von toten Zellen ermöglicht. Erkennlich wurden die nicht mehr lebenden Zellen durch die farbliche Markierung, da diese den Farbstoff Trypanblau annehmen. Zu diesem Zweck erfolgte eine 1:4 Verdünnung mit Trypanblau, wovon 10 µl in die Neubauer Zählkammer gegeben wurden. Bei 10-facher mikroskopischer Vergrößerung wurden die ungefärbten, metabolisch aktiven Zellen gezählt und die Zellkonzentration mit Hilfe folgender Formel ermittelt:

$c = \text{Anzahl gezählter Zellen pro Zählkammerquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor (1:4)} \times 10^4$
Zellen/ml

3.2.2 Modell der Glutamattoxizität

3.2.2.1 Glutamattoxizitätstest

Nach Ablösung der Zellen von den 10 cm Kulturplatten wurden 5000 Zellen pro 96-Well, entsprechend 50×10^3 Zellen/ml und 100 µl pro Well, in 96-Well-Platten ausgesät und 24h im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Glutamat (2,5 mM, 5 mM) für 24h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen in

Nährmedium. Unter Exposition mit Glutamat wurden die Zellen erneut für 24h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser 24h Glutamat-Inkubation wurde die Zellvitalität mit Hilfe des MTT-Assays im Zytotoxizitätstest (s.u.) ausgewertet und mit Kontrollzellen verglichen.

3.2.2.2 Liganden

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der verschiedenen biochemischen Substanzen gegenüber der oxidativen Glutamattoxizität wurden die HT22-Zellen bei Aussaat in 96-Well Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden für 24h im Brutschrank inkubiert. Daraufhin erfolgte der Glutamattoxizitätstest (s.u.). Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit einem Liganden, jedoch mit der gleichen Konzentration von Glutamat und Vehikel (Lösungsmittel der Liganden) inkubiert wurden.

3.2.2.3 Zytotoxizitätstest

Zur Auswertung der Zellvitalität nach Glutamataexposition diente der MTT-Assay, bei dem in metabolisch aktiven Zellen durch intrazelluläre Reduktion mittels Reduktionsäquivalenten das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) (MTT, Sigma) zu schwarzem Formazan reduziert wird. Somit ist die Menge des gebildeten Formazans linear proportional zur Anzahl vitaler (metabolisch aktiver) Zellen (Übersichtsarbeit von Berridge & Tan, 1993).

Jedem Well einer Zellkulturplatte wurden 25 µl MTT mit einer Konzentration von 5 mg/ml hinzugefügt und für 2h im Brutschrank inkubiert während die Reduktionsreaktion stattfand. Um die Reaktion abzustoppen, wurden die Zellen mit jeweils 100 µl pro Well eines Solubilisierungspuffers (20% SDS, 20% Essigsäure, 10% DMF) lysiert. Daraufhin wurden die Zellkulturplatten 24h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend durch ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (FluoroGenios, Tecan) ausgewertet. Die Absorption (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen (OD562) und die prozentuale Zellvitalität wie folgt berechnet:

Sowohl die mit den Liganden behandelten Zellen (Probe) [OD562] als auch die unbehandelten Kontrollzellen (Zellkontrolle) [OD562] wurden durch Subtraktion der Hintergrundkontrolle [OD562] korrigiert.

Das prozentuale Überleben wurde wie folgt normalisiert:

0% wurde definiert als $Y = 0,0$ für alle Daten.

100% wurde definiert als der größte Wert aller Daten.

Die Zellkontrolle aus der [OD562] wurde von unbehandelten HT22S-Zellen mit Medium und die

Hintergrundkontrolle aus der [OD562] von zellfreiem Medium gebildet.

3.2.2.4 GSH-Messung mittels Monochlorobiman

Die Wirkung einzelner Liganden auf die intrazelluläre GSH-Konzentration wurde mittels Monochlorobiman (MCB) bestimmt. Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf die Bindung des Monochlorobimans an reduziertes, intrazelluläres Glutathion, katalysiert durch das Enzym Glutathion-S-Transferase. Dieses Produkt konnte fluoreszenzmikroskopisch bei 550 nm Wellenlänge mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen werden.

Neben der fluoreszenzmikroskopischen Messung von GSH wurde die GSH-Messung mittels Monochlorobiman auch über die Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Die Zellen wurden mit MCB gefärbt und die Emission der Zellen bei 485 nm mit einer Anregungswellenlänge von 393 nm gemessen.

3.2.2.5 Enzymatische GSH-Messung

Die enzymatische GSH-Messung wurde nach dem Prinzip von Tietze, modifiziert von Griffith (Griffith, 1980; Tietze 1969) gemessen. Dabei wurden die mit Liganden und Glutamat inkubierten Zellen mit 1,5 %-iger Sulfosalicylsäure lysiert und Triethanolamin neutralisiert. Der Zelllösung wurden dann 0,3 mMol Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und 6 mMol 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DNTB) zugefügt. Nach Zugabe von 50 Einheiten GSH-Reduktase wurde die Zellabsorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

3.3 Statistische Analyse

Die Versuche wurden in Dreifachansätzen durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism 5 (GraphPad). Es wurde bei Baseline und den unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen der Mittelwert und sein Standardfehler ermittelt (\pm SEM, Standard Error of the Mean). Die statistische Signifikanz zwischen den Proben und der Vehikelkontrolle wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) ermittelt (für den oxidativen Glutamatoxizitätsassay two-way ANOVA mit Bonferroni post hoc test, für die GSH-Messungen one way ANOVA mit Dunnett's Post-Hoc-Test). Als signifikant gilt ein p-Wert $< 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Glutamat induziert konzentrationsabhängigen Zelltod von HT22-Zellen

Zunächst wurde das Überleben von HT22-Zellen nach Glutamatexposition untersucht. Hier zeigte sich ein dosisabhängiges Zellüberleben. Bei einer Konzentration von 2,5 mM Glutamat zeigte sich eine Zellvitalität von ca. 10%, 5 mM Glutamat führten zum fast vollständigen Zelltod.

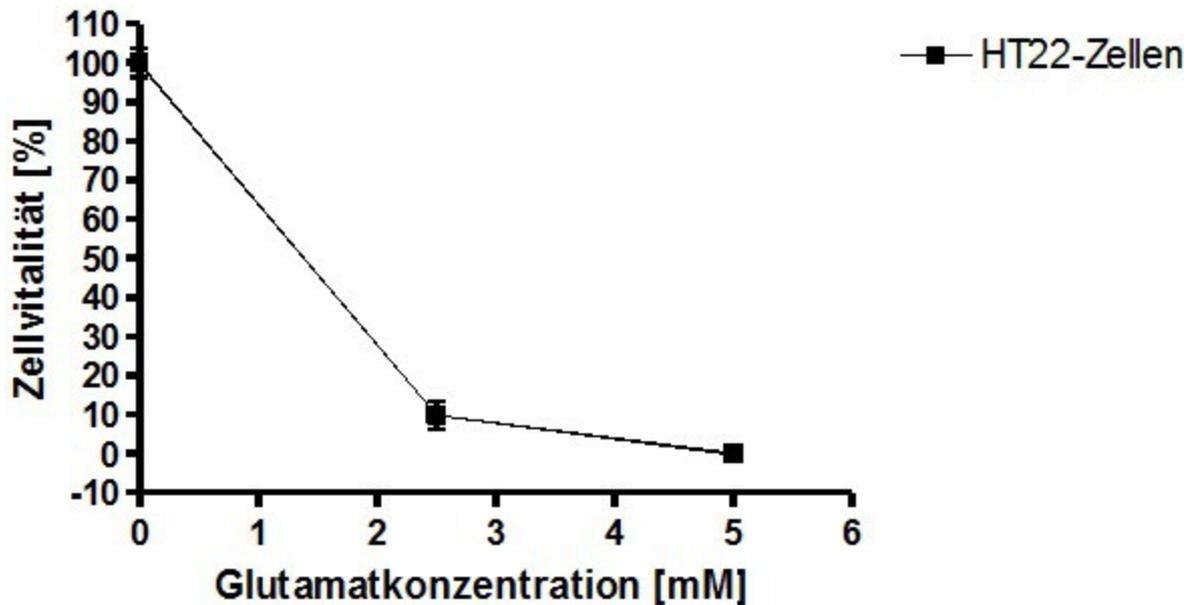


Abb. 2: Glutamatoxizitätstest an unbehandelten HT22-Zellen. 5000 Zellen wurden pro 96-Well-Platten ausgesät und für 24h inkubiert, danach erfolgte die 24h Inkubation mit 2,5 mM und 5 mM Glutamat, Kontrollzellen wurden nicht mit Glutamat exponiert. Es erfolgte die Auszählung der überlebten Zellen mittels MTT-Assay. Hier wird die prozentuale Zellvitalität von HT22-Zellen in Abhängigkeit der Glutamatkonzentration nach 24h dargestellt. Aus mindestens drei Wiederholungen des Glutamatoxizitätstest wurde der Mittelwert und sein Standardfehler ermittelt

4.2 Screening aller Liganden im Glutamatoxizitätstest

Im Modell der oxidativen Glutamatoxizität an der hippokampalen, murinen Zelllinie HT22 wurden 54 biogene, endogene, putativ extrazellulär wirksame Substanzen auf ihre Wirkung auf HT22-Zellen gegenüber Glutamat untersucht. Gemessen wurde die prozentuale Veränderung des Zellüberlebens mit und ohne Liganden im Glutamatoxizitätstest, d.h. ob sich das Zellüberleben im Vergleich zu den Kontrollzellen durch Inkubation mit den einzelnen Liganden erhöhte, erniedrigte oder ob keine signifikante Veränderung des Zell-Überlebens eintrat. Hier wurde eine arbiträre Schwelle von 15% eingeführt. So ließen sich die Liganden drei Gruppen zuordnen. Zum einen gab es die Gruppe der Liganden, die keinen Effekt auf die Zellvitalität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zeigten bzw. durch das Zell-Überleben weder um 15% erhöht noch erniedrigt wurde. Zum anderen gab es die Gruppe der Liganden, die das Zell-Überleben um mindestens 15% erniedrigten und somit eine erhöhte Glutamatoxizität bedingten. Schließlich fokussierten wir uns auf die dritte Gruppe von Liganden, die zu einem um mehr als 15% erhöhtem Zell-Überleben im Vergleich zu Kontrollzellen und somit zu einem neuroprotektiven Effekt führten.

Die Zelldichte der HT22 Zellen in ihren Zellkulturplatten hat einen wesentlichen Einfluss auf die oxidative Glutamatoxizität. Je höher die Zelldichte, umso resistenter sind die Zellen gegen Glutamat. Umgekehrt verstärkte sich die Glutamatoxizitätswirkung, wenn die Zelldichte zu gering war. Daher schlossen wir fünf Substanzen, bei denen wir eine zellproliferative Wirkung während der Präinkubationsphase beobachteten (>10% gegenüber unbehandelten Kontrollzellen) von der Analyse aus, da die Zellvitalität im Glutamatoxizitätstest mit Kontrollzellen nicht sinnvoll verglichen werden konnte. Dies waren Forskolin, Neuropeptid Y, IGF-1, Dynorphin und Endothelin. Diese fünf Liganden erhöhten das Zellwachstum im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ohne Inkubation mit Glutamat bis zu ca. 50%, sodass diesen Liganden zellproliferative Effekte zugeschrieben werden können (s. Tabelle 2).

Die Ergebnisse des Screenings aller Liganden sind in der nachfolgenden Tabelle und Abbildung aufgeführt.

Name	Differenz zu Kontrollzellen in %					
	Ligandenkonzentration 1 (hoch)			Ligandenkonzentration 2 (niedrig)		
	0 mM Glu	2,5 mM Glu	5 mM Glu	0 mM Glu	2,5 mM Glu	5 mM Glu
Erhöhung der Zellvitalität						
BAM22 (1 μ M, 10 nM)	-0.7	9.0 (\pm 1.9)	-2,8 (\pm 0,5)	0.8	0.2 (\pm 1.9)	1.7 (\pm 0.6)
β -Endorphin (100 nM, 10 nM)	0.5	11.1(\pm 0.6)	11.0 (\pm 1.7)	1.0	10.8 (\pm 1.1)	9.2 (\pm 1.9)
cGMP (0.1 mM, 10 μM)	1.0	30.3 (\pm1.5)*	9.5 (\pm1.8)	0.1	17.6 (\pm2.2)	4.1 (\pm1.8)
Chemerin (1 μ M, 100 nM)	1.1	5.3 (\pm 0.4)	0.2 (\pm 0.2)	0.5	0.6 (\pm 0.4)	-1.3 (\pm 0.5)
EEP (1 μ M, 100 nM)	-0.2	7.9 (\pm 0.8)	5.9 (\pm 0,0)	0.4	6,1 (\pm 1,4)	5,1 (\pm 0,7)
Endomorphin (1 μ M, 100 nM)	1.9	12.2 (\pm 1.3)	1.5 (\pm 1.4)	-0.7	2.5 (\pm 0.7)	-1.0 (\pm 1.0)
Hemorphin (1 μM, 0,1 μM)	0.5	19.1 (\pm0.2)*	6.3 (\pm1.0)	0.1	12.8 (\pm0.4)	2.1 (\pm0.9)
Motilin (100 nM, 10 nM)	0.2	8.0 (\pm 1.5)	0.1 (\pm 0.5)	0.9	4.0 (\pm 1.0)	-1.7 (\pm 0.4)
NeurokA (1 μ M, 100 nM)	-0.2	6.2 (\pm 0.0)	0.2 (\pm 0.1)	-1.9	1.9 (\pm 0.5)	-2.7 (\pm 0.7)

Relaxin (100 nM, 10 nM)	-0.3	7.1 (± 0.2)	1.5 (± 1.3)	-0.4	3.6 (± 2.0)	-2.7 (± 0.8)
Urotensin (100 nM, 10 nM)	-0.4	8.5 (± 0.3)	0.9 (± 1.3)	0.3	3.4 (± 1.5)	0.2 (± 1.7)
Erniedrigung der Zellvitalität						
Amylin (10 nM, 1 nM)	0.7	-16.1 (± 0.3)	-3.1 (± 0.7)	2.1	-6.9 (± 0.4)	-1.3 (± 0.1)
GAL (1 μ M, 100 nM)	1.4	-13.9 (± 1.1)	-3.0 (± 0.3)	0.0	-6.2 (± 1.4)	-2.5 (± 0.4)
GRP (1 μ M, 100 nM)	-0.3	-16.2 (± 1.9)	-17 (± 1.7)	-0.1	-12.4 (± 1.0)	-9.8 (± 1.8)
Kallidin (1 μ M, 100 nM)	-1.5	-5.7 (± 1.4)	-5.4 (± 0.9)	1.7	0.4 (± 1.1)	0.56 (± 0.6)
LHRH II (1 μ M, 100 nM)	0.3	-13.3 (± 1.6)	-17.5 (± 0.7)	1.1	-2.0 (± 0.1)	-12.9 (± 0.4)
LPA (10 μ M, 1 μ M)	-1.8	-7.6 (± 1.1)	-8.1 (± 0.7)	1.8	-4.6 (± 2.6)	2.8 (± 0.5)
LPC (1 μ M, 100 nM)	-0.6	-5.1 (± 1.6)	-0.2 (± 0.2)	0.1	0.7 (± 1.5)	0.5 (± 0.9)
NeuromedinU (1 μ M, 100 nM)	2.5	-4.0 (± 0.4)	-8.6 (± 0.4)	-1.2	-2.3 (± 1.4)	-8.2 (± 1.3)
Prokinetin (100 nM, 10 nM)	-0.6	2.06(± 0.5)	-12.4 (± 0.1)	-1.4	-0.3 (± 2.9)	-13.9 (± 1.9)
Kein Effekt						
Amyloid β (1 μ M, 1 nM)	2.4	3.0 (± 2.4)	1.0 (± 1.2)	1.1	0.1 (± 3.7)	-0.6 (± 4.1)
Apelin (1 μ M, 10 nM)	-1.8	0.5 (± 0.3)	-2.5 (± 0.3)	-2.3	-1.9 (± 1.5)	-2.6 (± 0.9)
cAMP (1 μ M, 100 nM)	-0.3	1.4 (± 3.6)	-2.1(± 0.5)	-2.8	-3.5 (± 0.2)	-4.5 (± 2.9)
Leu-Enkephalin (1 μ M, 100 nM)	2.0	4.6 (± 3.2)	-2.9 (± 0.6)	2.8	2.5 (± 2.8)	-4.3 (± 1.0)
FMLF (100 nM, 10 nM)	1.7	4.8 (± 4.7)	-1.9 (± 1.4)	0.2	6.2 (± 2.9)	-2.9 (± 0.5)
GAL1-16 (1 μ M, 1 nM)	2.7	3.1 (± 3.1)	0.5(± 1.5)	-0.1	2.8 (± 0.8)	0.6 (± 0.2)
GastrinTetrapeptid (1 μ M, 10 nM)	2.1	1.6 (± 3.7)	-2.8 (± 0.3)	-0.3	-1.3 (± 0.3)	-2.8 (± 0.9)
GHRP-6 (1 μ M, 1 nM)	-0.9	3.02(± 2.3)	-1.5 (± 1.2)	2.3	-3.8 (± 0.8)	-2.9 (± 0.1)
HOE140 (1 μ M, 100 nM)	2.9	6.8 (± 3.5)	-3.1 (± 1.0)	-0.5	0.3 (± 2.9)	0.1(± 0.5)
Leu-Enkephalin (1 μ M)	-2.4	6.6 (± 3.7)	-1.3 (± 3.2)	4.0	1.9 (± 5.0)	-12.4 (± 2.2)
LHRH (1 μ M)	-1.4	-0.1 (± 3.1)	-6 (± 0.8)	0.2	-2.3 (± 1.8)	-6.6 (± 0.6)
LHRH1-5 (1 μ M, 100 nM)	-1.4	-0.3 (± 0.4)	-0.3 (± 0.1)	0	0.0 (± 0.5)	-0.2 (± 0.4)
MIF-1 (10 μ M, 1 μ M)	-2.1	7.3 (± 1.1)	0.3 (± 1.8)	-1.1	-2.3 (± 1.6)	-0.8 \pm (0.8)
Morphiceptin (1 μ M, 100nM)	-0.2	-1.1 (± 1.6)	-2 (± 1.5)	1.9	0.2 (± 2.8)	-2.4 (± 2.3)
Neuromedin B (1 μ M, 100 nM)	-0.2	4.6 (± 0.7)	-4.8 (± 1.8)	-1.0	-1.1 (± 2.5)	-5.5 (± 1.4)
Nocistatin (1 μ M, 100 nM)	-2.1	-0.1 (± 2.3)	-0.02 (± 0.3)	-1.6	-0.1 (± 1.6)	0.0 (± 1.8)
NPF (100 nM, 10 nM)	-1.4	4.6 (± 1.2)	-3.9 (± 1.3)	-3.7	1.9 (± 0.1)	-4.3 (± 0.7)
PAMP (100 nM, 0,1 pM)	-1.5	3.5 (± 1.8)	-7.3 (± 1.6)	-0.4	-0.5 \pm (0.6)	-2.6 (± 0.3)
Progesteron (1 μ M, 100 nM)	0.9	4.2 (± 1.7)	-1 (± 1.1)	1.6	0.1 (± 0.4)	-2.7 (± 1.1)
Gastrin (1 μ M, 100 nM)	1.1	0.2 (1.4)	-0.7 (± 0.9)	-1.0	-2.5 (± 1.7)	-1.2 (± 0.6)
Secreton (100 nM, 10 nM)	-0.4	-0.1 (± 0.7)	-0.1 (± 0.4)	-0.4	-0.5 (± 0.0)	-0.7 (± 0.2)
Somatostatin (1 μ M, 0.1 nM)	0.37	0.28(± 0.4)	-1.61(± 0.23)	-0.01	1.2 (± 1.0)	-1.0 (± 1.2)
SRIF (1 μ M, 100 nM)	-1.79	-2.32(± 1.27)	-2.85(± 0.66)	-2.97	-1.2 (± 0.8)	-2.8 (± 0.8)
Substance K (1 μ M, 100 nM)	-1.03	-1.13(± 1.18)	-0.06(± 1.52)	2.81	0 (± 1.3)	-1.8 (± 0.3)
Substance P (1 μ M, 100 nM)	1.97	0.42(± 1.62)	-1.91(± 0.29)	0.13	0.0 (1.2)	-0.8 (± 0.6)
TRH (100 nM, 10 nM)	-1.54	3.73(± 1.63)	2.29(± 2.24)	1.06	1.2 (0.3)	-1.2 (± 0.7)
UDP (1 μ M, 1 nM)	-1.04	-0.32(± 0.6)	-0.5(± 0.96)	-1.16	-0.2 (± 1.7)	-0.5 (± 1.1)
UDP-Glc (100 μ M, 10 μ M)	1.94	-0.39(± 0.85)	-0.79(± 0.58)	0.59	-1.2 (± 0.4)	-1.3 (± 0.3)
UDP-Glc-Nac (1 μ M, 1 nM)	0.47	-0.54(± 0.63)	-0.84(± 0.64)	-0.74	-1.38(± 0.59)	-1.51(± 0.13)
Zellproliferativer Effekt						
Dynorphin (10 nM, 100 nM)	14.45	77,46 (± 3.42)	-46.15 (± 2.3)	13.26	66.67 (± 2.98)	-216.6 (± 1.98)017
Endothelin (1 μ M, 100 nM)	14.13	29.37 (± 0.57)	-12.05 (± 2.2)	9.2	12.54	-35.68
NPY (1 μ M, 100 nM)	11.7	8.8 (± 0.44)	99.11	11.44	15.87	90.91 (± 1.35)

			(±4.31)		(±0.12)	
Forskolin (1 µM, 100 nM)	36.42	33.77 (±0.1)	-108.62 (±1.53)	49.34	54.52 (±0.02)	93.67 ±0.3
IGF-I (1 µM, 100 nM)	12.86	-28.41(±0.01)	41.38 (±0.01)	13.59	22.60 (±0.01)	34.62 ±0.01

Tab. 2: Effekte der Liganden auf Glutamatoxizität und Proliferation. 5000 Zellen wurden pro 96-Well-Platten ausgesät und für 24h inkubiert, danach erfolgte die 24h Inkubation mit einem Liganden und zwei unterschiedlicher Konzentrationen sowie 2,5 mM und 5 mM Glutamat, Kontrollzellen wurden nicht mit Glutamat exponiert. Es erfolgte die Auszählung der überlebten Zellen mittels MTT-Assay. In der Tabelle aufgezeigt ist die Differenz der prozentualen Zellvitalität von ligandenexponierten HT22-Zellen und Kontrollzellen. Ligandenexponierte Zellen, die mehr als 5% Zellüberleben bei 2,5 mM Glutamat gegenüber Kontrollzellen zeigten, wurden zunächst zur Gruppe „Erhöhung der Zellvitalität“ zusammengefasst. „Erniedrigung der Zellvitalität“ sind Liganden, die die Zellvitalität um mehr als 2% erniedrigten. Zu der Gruppe der zellproliferativen Liganden werden die zusammengefasst, bei denen sich die Zelldichte um mehr als 10% vor Glutamatexposition erhöhte. Aus mindestens drei Wiederholungen des Glutamatoxizitätstest wurde der Mittelwert und sein Standardfehler ermittelt

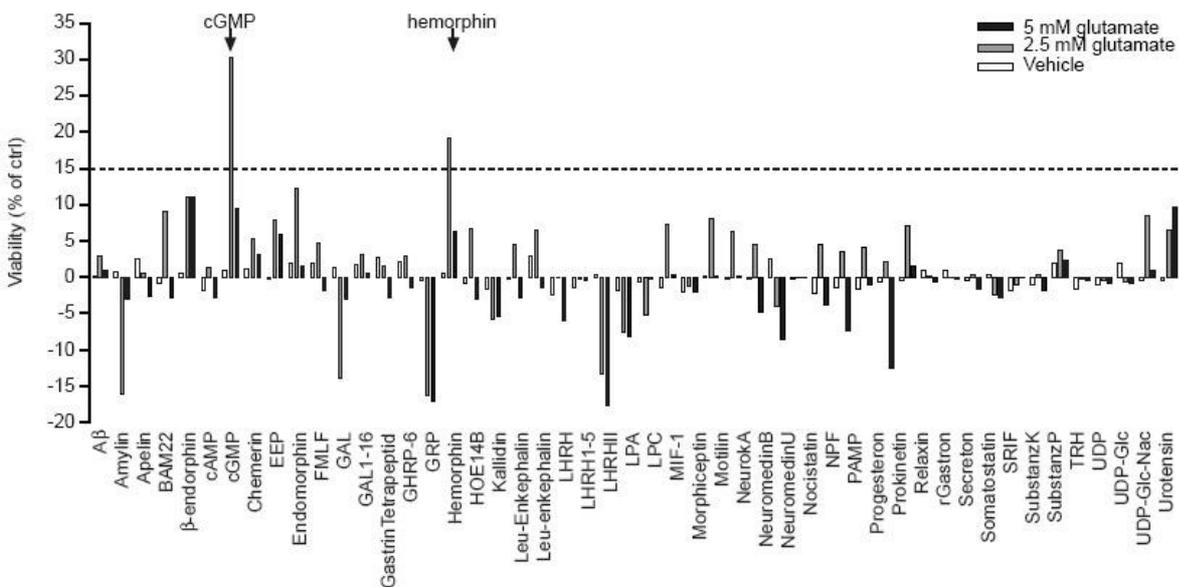


Abb. 3: Graphische Zusammenfassung aller Liganden im Glutamatoxizitätstest (Ergebnisse aus Tabelle 2). Das prozentuale Zellüberleben gegenüber Kontrollzellen wird gezeigt. Eine Erhöhung von mehr als 15% gegenüber unbehandelten Kontrollzellen wurde als neuroprotektiver Effekt gedeutet.

4.3 Einige Liganden verstärkten die oxidative Glutamattoxizität

Wir konnten bei einigen Liganden eine Zunahme der oxidativen Glutamattoxizität beobachten: Amylin, GAL, GRP, Kallidin, LHRH II, LPA, LPC, Neuromedin U und Prokinetin. Nach der Inkubation mit diesen Liganden erniedrigten sie die Zellvitalität im Glutamattoxizitätstest um 2% bis 15% im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Tab. 2).

4.4 Hemorphin und cGMP schützten signifikant vor oxidativer Glutamatoxizität

Aus der Gruppe der Liganden, die im Screening die Zellvitalität um mehr als 15% gesteigert haben, zeigten nach wiederholten Versuchen lediglich Hemorphin und cGMP einen reproduzierbar signifikanten Schutz gegenüber Glutamat ($p < 0.05$, two way ANOVA mit Bonferroni post hoc test). Daher wurde bei diesen beiden Liganden eine Dosiswirkungskurve erstellt.

Hemorphin, ein endogenes Fragment der Hämoglobin- β -Kette und extrazelluläres cGMP, ein Second Messenger in Signaltransduktionen, zeigten ein 19%- bzw. 30%-iges höheres Zellüberleben bei einer Glutamatkonzentration von 2,5 mM gegenüber Kontrollzellen, die nicht mit Liganden inkubiert wurden.

Extrazellulär eingesetztes cGMP zeigte den besten Schutz vor Glutamatoxizität, sodass wir in weiterführenden Versuchen den Wirkmechanismus von cGMP näher untersuchten. Wir untersuchten die Konzentrationsabhängigkeit im Glutamatoxizitätstest mit 100 μ M bis 1 nM cGMP.

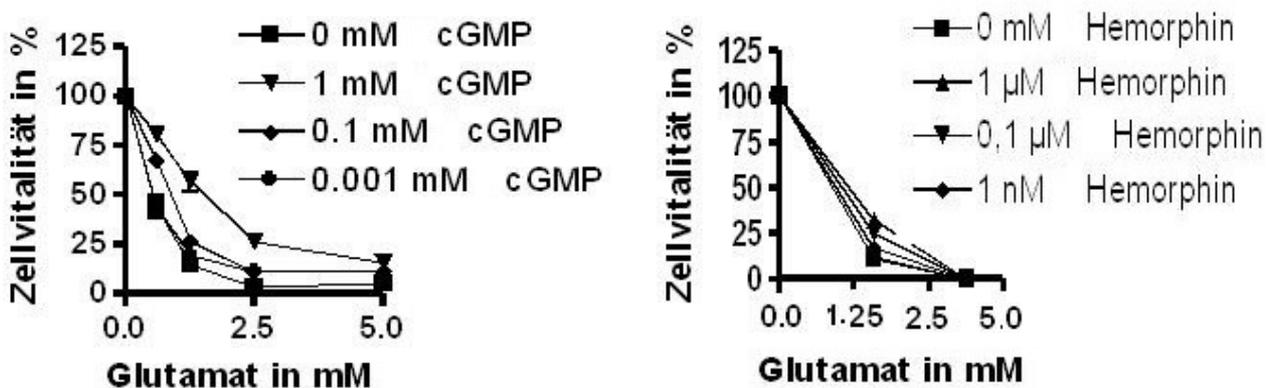


Abb. 4: Dosisabhängige Wirkung von cGMP und Hemorphin gegenüber Glutamat

Veranschaulicht wird die dosisabhängige Wirkung von extrazellulärem cGMP und Hemorphin in verschiedenen Konzentrationen im Glutamatoxizitätstest. 5000 Zellen wurden pro 96-Well-Platten ausgesät und für 24h inkubiert, danach erfolgte die 24h Inkubation mit den unterschiedlichen Konzentrationen von cGMP und Hemorphin und verschiedenen Glutamatkonzentrationen, Kontrollzellen wurden nicht mit den Liganden inkubiert. Es erfolgte die Auszählung der überlebten Zellen mittels MTT-Assay. Die prozentuale Zellvitalität erhöht sich bei höheren Konzentrationen sowohl von extrazellulärem cGMP als auch von Hemorphin. Aus mindestens drei Wiederholungen des Glutamatoxizitätstest wurde der Mittelwert und sein Standardfehler ermittelt

In weiteren Untersuchungen konnte in unserer Arbeitsgruppe der protektive Wirkmechanismus von cGMP weiter aufgeklärt werden. Nicht nur extrazelluläres cGMP schützt vor oxidativen Zelltod, sogar seine Abbauprodukte GMP und Guanosin zeigten einen signifikant höheren

Schutz gegenüber Glutamat. Guanosin erhöht zum einen die Aktivität des X_c^- -Systems, welches Cystin von extrazellulär durch den Cystin/Glutamat-Antiporter in den Intrazellulärraum transportiert und somit die GSH-Synthese fördert, und inhibiert zum anderen auch den toxischen Kalziumeinstrom in die Zelle (Albrecht et al., 2013).

Die folgende Abbildung 5 zeigt, in verschiedenen Messungen von intrazellulärem GSH (mittels MCB und enzymatisch), dass Zellen, die mit extrazellulärem cGMP inkubiert wurden, eine Erhöhung von GSH fördern.

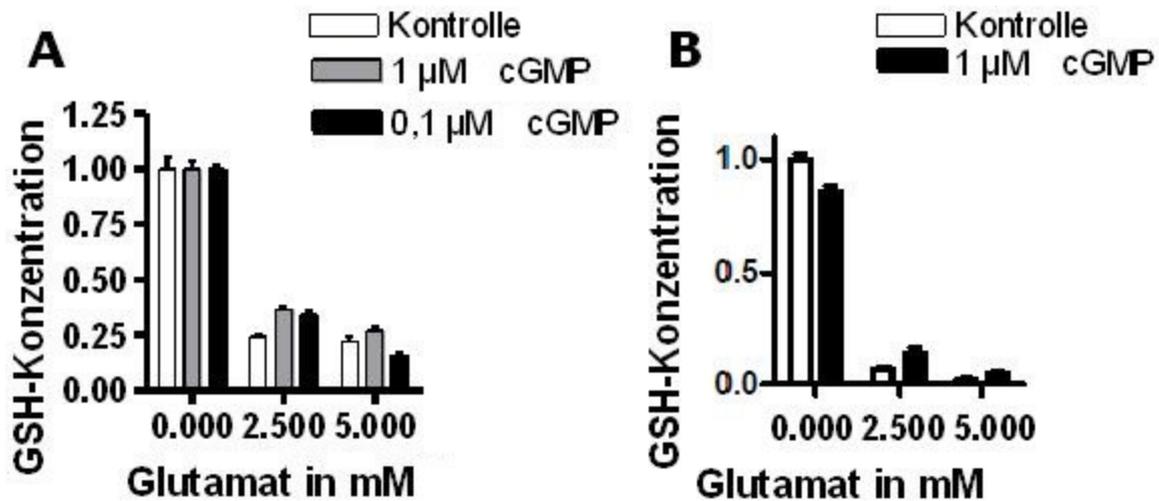


Abb. 5: A) Messung der intrazellulären GSH-Konzentration von cGMP-inkubierten Zellen gegenüber der Kontrolle mittels MCB (A) und enzymatischem GSH-Assay (B) im Glutamattoxizitätstest. In beiden Untersuchungen wird eine Erhöhung der intrazellulären GSH-Konzentrationen nach Inkubation mit extrazellulärem cGMP gegenüber Kontrollzellen gemessen.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir eine große Anzahl von putativen extrazellulären Liganden. Aus dieser Sammlung identifizierten wir nur zwei Substanzen mit signifikanten neuroprotektiven Effekten, und zwar Hemorphin und cGMP. Substanzen, die entweder die Zelltoxizität von Glutamat erhöhten oder zu einer erhöhten Zellproliferation von HT22-Zellen führten, wurden nicht näher untersucht. Wir konzentrierten uns bei den weiterführenden Untersuchungen auf cGMP, weil es im Screening am stärksten protektiv wirkte. Für Hemorphin wurden bereits in früheren Arbeiten neuroprotektive Effekte beschrieben (Yamamoto et al., 1997; Liang et al., 2001). 1997 beschrieb die Arbeitsgruppe von Yamamoto, dass Spinorphin, ein Derivat von Hemorphin gewonnen aus dem Hypothalamus und Rückenmark von Rindern, durch die Senkung der $O_2^{\cdot-}$ -Produktion antioxidativ wirkt (Yamamoto et al., 1997). Zusätzlich wird beschrieben, dass Spinorphin als Rezeptorantagonist Kalziueinstrom, Chemotaxis, Exozytose und die Bildung von ROS in Entzündungszellen inhibiert (Liang et al., 2001) und somit antiinflammatorisch wirken kann.

Das Screening der Liganden wurde in der vorliegenden Arbeit im Modell der oxidativen Glutamattoxizität nur an der murinen Zelllinie HT22 untersucht. Bei unseren gemeinsamen weiterführenden Untersuchungen wurden die Versuche auch an Primärkulturen reproduziert (Albrecht et al., 2013). Das Zellmodell der HT22-Zelllinie ist ein gut repräsentatives und vor allem gut reproduzierbares in-vitro Modell zur Untersuchung von neuronalem Zelltod durch oxidativen Stress. Im Gegensatz zu Zellmodellen des exogenen oxidativen Stress wie der H_2O_2 -Toxizität kommt es bei der oxidativen Glutamattoxizität durch GSH-Depletion zur Akkumulation endogener reaktiver Sauerstoffspezies die in den Zellen selbst entstehen. Die experimentellen Ergebnisse zu neuroprotektiven Substanzen an HT22-Zellen konnten sowohl in Primärkulturen (Albrecht et al., 2012; Lewerenz et al., 2009; van Leyen et al., 2008) als auch im Tierversuch bei Krankheiten wie Schlaganfällen, Morbus Alzheimer (Lipskiet al., 2007; Maher et al., 2007) und Multipler Sklerose (Melzer et al., 2008) reproduziert und untersucht werden. Es gibt bereits viele Erkenntnisse und Forschungsergebnisse über die verschiedenen Effekte und Funktionen von intrazellulärem cGMP, das vor allem als sogenannter *second messenger* in verschiedenen Zellen eine wichtige Rolle spielt. *Second messenger* aktivieren nach Bindung eines Liganden an GPCRs verschiedene Signalwege und Proteinkinasen und sind somit wichtige Proteine für die Aktivierung oder Inaktivierung dieser Signalkaskaden. Es wurden verschiedene Wirkungen von cGMP in Zusammenhang mit oxidativem Zelltod beschrieben. Dabei sind die zellulären Effekte von cGMP vor allem abhängig von den verwendeten Zellkulturmodellen. Während intrazelluläres cGMP als zelltoxisch (Li et al., 1997) beschrieben wurde, wurden extrazellulärem cGMP protektive Effekte zugeschrieben (Montoliu, 1999, Choi, 2007).

Li und Kollegen erklärten die toxische intrazelluläre Wirkung durch einen von intrazellulärem

cGMP ausgelösten toxischen Kalziumeinstrom (Li et al., 1997). Im Rahmen der oxidativen Glutamattoxizität kommt es zu einer Induktion der Synthese von intrazellulärem cGMP, welches dann den zum Zelltod führenden finalen toxischen Kalziumeinstrom auslöst (McConkey & Orrenius, 1994). Somit beeinflusst intrazelluläres cGMP den Einstrom von Kalzium.

Dagegen zeigte die Arbeitsgruppe von Montoliu et al. im Jahre 1999 im Glutamattoxizitätstest an Primärkulturen zerebellärer Neurone, dass extrazelluläres cGMP neuroprotektiv und dass 8-Br-cGMP, ein zellpermeables Analogon von cGMP, zelltoxisch wirken. In dieser Arbeit zeigte cGMP bereits bei nanomolaren Konzentrationen stärkere protektive Wirkungen als in unserer Arbeit. Interessanterweise zeigte die Arbeitsgruppe, dass der unselektive Phosphodiesteraseinhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) und der selektive Phosphodiesterase-5 Inhibitor Zaprinast zellprotektive Wirkungen aufwiesen, während in den der vorliegenden Promotionsarbeit folgenden Untersuchungen eine toxische Wirkung von Zaprinast auf HT22-Zellen nachgewiesen wurde (Albrecht et al. 2013). Phosphodiesteraseinhibitoren hemmen den Abbau von cGMP und führen somit zu einer intrazellulären Erhöhung, was wiederum zelltoxisch wirken kann (Li et al. 1997). Der zellprotektive Effekt in der Arbeit von Montoliu et al. lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass cGMP nach extrazellulär transportiert wird, es somit also zu einer extrazellulären Erhöhung von cGMP bei konstanter intrazellulärer Konzentration kommt.

In einer rezent veröffentlichten Arbeit konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass HT22-Zellen durch die Blockade des Kalziumeinstroms mit CoCl_2 oder in kalziumfreiem Zellmedium nicht sterben (Henke et al. 2013). Das endoplasmatische Retikulum ist der Hauptspeicher von intrazellulärem Kalzium. Ist dieser Kalziumspeicher durch verschiedene Signaltransduktionen erniedrigt, muss Kalzium aus dem Extrazellulärraum in die Zelle transportiert werden. Dies bezeichnet man als *Store operated Calcium Entry* welcher durch den plasmagebundenen Kalziumkanal ORAI1 gewährleistet wird. ORAI1 ist für den finalen toxischen Kalziumeinstrom im Rahmen der Glutamattoxizität verantwortlich (Henke et al., 2013). Eine Möglichkeit der Zellprotektion durch cGMP ist der Einfluss auf den Kalziumeinstrom, z.B. durch Inhibition des ORAI1-Kanals und somit auch Inhibition der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Letztendlich ist der Wirkmechanismus von cGMP bei oxidativen Zelltod komplex und noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Studienergebnisse verdeutlichen, dass während der oxidativen Glutamattoxizität die Konzentration von intrazellulärem cGMP steigt (Li et al., 1997). Dieses cGMP wird jedoch abhängig von den verwendeten Zellen nach extrazellulär transportiert (Sager, 2004) oder nach Zelltod in den Extrazellulärraum freigesetzt und kann somit benachbarte Zellen schützen.

In der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass extrazelluläres cGMP dosisabhängig vor oxidativer Glutamattoxizität schützt und somit vermutlich das Zellüberleben unter pathophysiologischen Bedingungen, die mit oxidativem Stress einhergehen, erhöht. Diese Erkenntnis ist für Zellverbände wichtig, da während verschiedenen pathophysiologischen Zuständen wie oxidativem Stress intrazelluläres cGMP freigesetzt werden und somit

Nachbarzellen vor weiteren Schäden schützen kann. Somit könnten der Transport von cGMP in den Extrazellulärraum oder die Erhöhung der cGMP-Produktion mögliche pharmakologische Ansatzpunkte für eine antioxidative Therapie sein. Es fand sich kein Sättigungseffekt bei den von uns eingesetzten hohen Konzentrationen von cGMP, was gegen eine rezeptorvermittelte Wirkung spricht.

Im Anschluss an die der vorliegenden Promotionsarbeit zugrundeliegenden Arbeiten fand die Arbeitsgruppe in weiterführenden Versuchen heraus, dass nicht nur cGMP, sondern vielmehr auch seine Abbauprodukte Guanosinmonophosphat (GMP) und Guanosin vor oxidativer Glutamattoxizität schützen und dies sogar deutlich stärker als cGMP selbst. Somit ist anzunehmen, dass die zellprotektive Wirkung von cGMP möglicherweise seinen Metaboliten zuzuschreiben ist. cGMP entsteht durch die Guanylatzyklase aus GTP und wird durch die Phosphodiesterase zu GMP abgebaut (Francis et al., 2011). GMP wird entweder zu GTP phosphoryliert oder zu Guanosin abgebaut (Saute et al., 2006). Bei Inkubation von HT22-Zellen mit 5 mM Glutamat zeigte Guanosin einen deutlich stärkeren positiven Effekt als cGMP und GMP. Guanosin fördert die Aktivität des X_c^- -Systems durch Überexpression der Untereinheit xCT, am ehesten durch die vermehrte Transkription auf mRNA-Ebene, welches zu Erhöhung von GSH führt und somit zellprotektiv wirkt. Außerdem inhibiert Guanosin zusätzlich auch den toxischen späten intrazellulären cGMP-abhängigen Kalziumeinstrom in die Zelle vermutlich durch Blockade des bereits beschriebenen Kalziumkanals ORAI1.

Um die Wirkung von extrazellulärem cGMP gegenüber der Glutamattoxizität zu untersuchen, wurde in dieser vorliegenden Arbeit die GSH-Messung nach Inkubation mit cGMP gemessen. Die enzymatische GSH-Messung zeigte die am besten reproduzierbaren Ergebnisse.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die neuroprotektive Wirkung von cGMP im Wesentlichen durch sein Abbauprodukt Guanosin bedingt ist, welches die Aktivität des Glutamat-Cystin-Antiporters System X_c^- steigert und den toxischen Calcium-Einstrom am Ende der oxidativen Glutamattoxizität hemmt.

Wir konnten in der vorliegenden Promotionsarbeit somit durch das Screening von verschiedenen Liganden, ohne ihre genauen Wirkmechanismen im Voraus zu kennen, zwei potentielle neuroprotektive Substanzen, cGMP und Hemorphin, herausfiltern und weiterführende Untersuchungen anschließen.

6 Literatur

Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G. **Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family.** Trends Pharmacol Sci. 2003 Feb;24(2):52-5.

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. **International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy.** Pharmacol Rev. 2006 Sep;58(3):281-341.

Albrecht P, Henke N, Tien ML, Issberner A, Bouchachia I, Maher P, Lewerenz J, Methner A. **Extracellular cyclic GMP and its derivatives GMP and guanosine protect from oxidative glutamate toxicity.** Neurochem Int. 2013 Apr;62(5):610-9. doi: 10.1016/j.neuint.2013.01.019. Epub 2013 Jan 26.

Albrecht P, Lewerenz J, Dittmer S, Noack R, Maher P, Methner A. **Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system xc⁻ as a neuroprotective drug target.** CNS Neurol Disord Drug Targets. 2010 Jul;9(3):373-82.

Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Louden CS, Foley JJ, Sauermech CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA. **Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14.** Nature. 1999 Sep 16;401(6750):282-6.

Bathgate RA, Ivell R, Sanborn BM, Sherwood OD, Summers RJ. **International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides.** Pharmacol Rev. 2006 Mar;58(1):7-31.

Behl C. **Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches.** Prog Neurobiol. 1999 Feb;57(3):301-23.

Benya RV, Kusui T, Pradhan TK, Battey JF, Jensen RT. **Expression and characterization of cloned human bombesin receptors.** Mol Pharmacol. 1995 Jan;47(1):10-20.

Bockaert J, Marin P, Dumuis A, Fagni L. **The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks.** FEBS Lett. 2003 Jul 3;546(1):65-72. Review

Boels K, Schaller HC. **Identification and characterisation of GPR100 as a novel human G-protein-coupled bradykinin receptor.** Br J Pharmacol. 2003 Nov;140(5):932-8. Epub 2003 Oct 6.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. **The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism.** Nature 1999 349:117-127. Review

Breit A, Gagnidze K, Devi LA, Lagacé M, Bouvier M. **Simultaneous activation of the delta opioid receptor (deltaOR)/sensory neuron-specific receptor-4 (SNSR-4) heterooligomer by the mixed bivalent agonist bovine adrenal medulla peptide 22 activates SNSR-4 but inhibits deltaOR signaling.** Mol Pharmacol. 2006 Aug;70(2):686-96. Epub 2006 May 8.

Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB. **Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles.** *Pharmacol Rev.* 2004 Jun;56(2):231-48.

Browne SE, Beal MF. **Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis.** *Antioxid Redox Signal.* 2006 Nov-Dec;8(11-12):2061-73.

Bruno V, Battaglia G, Copani A, Giffard RG, Raciti G, Raffaele R, Shinozaki H, Nicoletti F. **Activation of class II or III metabotropic glutamate receptors protects cultured cortical neurons against excitotoxic degeneration.** *Eur J Neurosci.* 1995 Sep 1;7(9):1906-13.

Chang KJ, Cuatrecasas P, Wei ET, Chang JK. **Analgesic activity of intracerebroventricular administration of morphiceptin and beta-casomorphins: correlation with the morphine (micro) receptor binding affinity.** *Life Sci.* 1982 May 3;30(18):1547-51.

Chavkin C, Goldstein A. **Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure--activity relationships.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Oct;78(10):6543-7.

Choi DW. **Ionic dependence of glutamate neurotoxicity.** *J Neurosci.* 1987 Feb;7(2):369-79.

Choi JH, Kim DH, Yun IJ, Chang JH, Chun BG, Choi SH. **Zaprinast inhibits hydrogen peroxide-induced lysosomal destabilization and cell death in astrocytes.** *Eur J Pharmacol.* 2007 Oct 1;571(2-3):106-15. Epub 2007 Jul 4.

Costello DJ, Delanty N. **Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy?** *Expert Rev Neurother.* 2004 May;4(3):541-53.

Creagh EM, O'Neill LA. **TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity.** *Trends Immunol.* 2006 Aug;27(8):352-7. Epub 2006 Jun 27.

Dal-Cim T, Martins WC, Santos AR, Tasca CI. **Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake.** *Neuroscience.* 2011 Jun 2;183:212-20. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.022. Epub 2011 Mar 22.

Davenport AP. **International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature.** *Pharmacol Rev.* 2002 Jun;54(2):219-26.

Davis JB, Maher P. **Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line.** *Brain Res.* 1994 Jul 25;652(1):169-73.

Depoortere I. **Motilin and motilin receptors: characterization and functional significance.** *Verh K Acad Geneesk Belg.* 2001;63(6):511-29.

Di Iorio P, Ballerini P, Traversa U, Nicoletti F, D'Alimonte I, Kleywegt S, Werstiuk ES, Rathbone MP, Caciagli F, Ciccarelli R. **The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes.** *Glia.* 2004 May;46(4):356-68.

Dittmer S, Sahin M, Pantlen A, Saxena A, Toutzaris D, Pina AL, Geerts A, Golz S, Methner A. **The constitutively active orphan G-protein-coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment epithelium-derived growth factor.** *J Biol Chem.* 2008 Mar 14;283(11):7074-81. Epub 2008 Jan 7.

- Dong M, Miller LJ. **Molecular pharmacology of the secretin receptor.** Receptors Channels. 2002;8(3-4):189-200.
- Douglas SA, Dhanak D, Johns DG. **From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function.** Trends Pharmacol Sci. 2004 Feb;25(2):76-85.
- Draws I. I. **Drug discovery today – and tomorrow.** Drug discovery today. 2000 Jan;5(1):2-4.
- Dringen R. **Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration.** Eur J Biochem. 2000 Aug;267(16):4903.
- Erchegyi J, Kastin AJ, Zadina JE. **Isolation of a novel tetrapeptide with opiate and antiopiate activity from human brain cortex: Tyr-Pro-Trp-Gly-NH₂ (Tyr-W-MIF-1).** Peptides. 1992 Jul-Aug;13(4):623-31.
- Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG. **Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin.** Science. 1996 Nov 1;274(5288):768-70.
- Finkel T, Holbrook NJ. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** Nature. 2000 Nov 9;408(6809):239-47. Review
- Finkelstein JD. **Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals.** Semin Thromb Hemost. 2000;26(3):219-25.
- Flavahan NA. **Lysophosphatidylcholine modifies G protein-dependent signaling in porcine endothelial cells.** Am J Physiol. 1993 Mar;264(3 Pt 2):H722-7.
- Fonnum F. **Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain.** J Neurochem. 1984 Jan;42(1):1-11. Review
- Francis SH, Blount MA, Corbin JD. **Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions.** Physiol Rev. 2011 Apr;91(2):651-90. doi: 10.1152/physrev.00030.2010.
- Gadkar-Sable S1, Shah C, Rosario G, Sachdeva G, Puri C. **Progesterone receptors: various forms and functions in reproductive tissues.** Front Biosci. 2005 Sep 1;10:2118-30.
- Gerard NP, Eddy RL Jr, Shows TB, Gerard C. **The human neurokinin A (substance K) receptor. Molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues.** J Biol Chem. 1990 Nov 25;265(33):20455-62.
- Gerard NP, Garraway LA, Eddy RL Jr, Shows TB, Iijima H, Paquet JL, Gerard C. **Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones.** Biochemistry. 1991 Nov 5;30(44):10640-6.
- Gergen KA, Zadina JE, Paul D. **Analgesic effects of Tyr-W-MIF-1: a mixed mu₂-opioid receptor agonist/mu₁-opioid receptor antagonist.** Eur J Pharmacol. 1996 Nov 28;316(1):33-8.
- Gershengorn MC. **Thyrotropin-releasing hormone receptor: cloning and regulation of its expression.** Recent Prog Horm Res. 1993;48:341-63.
- Gether U. **Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors.** Endocr Rev. 2000 Feb;21(1):90-113. Review
- Gilman AG. **G proteins: transducers of receptor-generated signals.** Annu Rev Biochem.

1987;56:615-49. Review

Grabowska AM, Watson SA. **Role of gastrin peptides in carcinogenesis.** Cancer Lett. 2007 Nov 8;257(1):1-15. Epub 2007 Aug 14.

Griffith OW. **Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis.** Free Radic Biol Med. 1999 Nov;27(9-10):922-35.

Halls ML, van der Westhuizen ET, Bathgate RA, Summers RJ. **Relaxin family peptide receptors--former orphans reunite with their parent ligands to activate multiple signalling pathways.** Br J Pharmacol. 2007 Mar;150(6):677-91. Epub 2007 Feb 12.

Hamm HE. **How activated receptors couple to G proteins.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 24;98(9):4819-21.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. **The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.** Science. 1988 Jul 1;241(4861):42-52.

Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. **Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function.** FASEB J. 1990 Aug;4(11):2881-9. Review

Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Sexton PM. **Amylin receptors: molecular composition and pharmacology.** Biochem Soc Trans. 2004 Nov;32(Pt 5):865-7.

Henke N, Albrecht P, Bouchachia I, Ryazantseva M, Knoll K, Lewerenz J, Kaznacheyeva E, Maher P, Methner A. **The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress.** Cell Death Dis. 2013 Jan 24;4:e470. doi: 10.1038/cddis.2012.216.

Henke N, Albrecht P, Pfeiffer A, Toutzaris D, Zanger K, Methner A. **Stromal interaction molecule 1 (STIM1) is involved in the regulation of mitochondrial shape and bioenergetics and plays a role in oxidative stress.** J Biol Chem. 2012 Dec 7;287(50):42042-52. doi: 10.1074/jbc.M112.417212. Epub 2012 Oct 17.

Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ. **Lysophospholipids--receptor revelations.** Science. 2001 Nov 30;294(5548):1875-8.

Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH, Patchett AA. **Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery.** Trends Pharmacol Sci. 2001 Mar;22(3):132-40. Review

Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, et al. **Classification and nomenclature of somatostatin receptors.** Trends Pharmacol Sci. 1995 Mar;16(3):86-8.

Ilieva EV, Ayala V, Jové M, Dalfo E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otín M. **Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.** Brain. 2007 Dec;130(Pt 12):3111-23. Epub 2007 Aug 23.

Insel PA, Ostrom RS. **Forskolin as a Tool for Examining Adenylyl Cyclase Expression, Regulation, and G Protein Signaling.** Cellular and Molecular Neurobiology June 2003, Volume 23, Issue 3, pp 305-314.

Ishige K, Chen Q, Sagara Y, Schubert D. **The activation of dopamine D4 receptors inhibits oxidative stress-induced nerve cell death.** J Neurosci. 2001 Aug 15;21(16):6069-76.

- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*. 2006 Aug;1(8):761-82.
- Johnson EE, M Connor M. **Towards a Receptor for Nocistatin?** *Br J Pharmacol*. 2007 October; 152(4): 415–416.
- Johnson EN, Seasholtz TM, Waheed AA, Kreutz B, Suzuki N, Kozasa T, Jones TL, Brown JH, Druey KM. **RGS16 inhibits signalling through the G alpha 13-Rho axis.** *Nat Cell Biol*. 2003 Dec;5(12):1095-103. Epub 2003 Nov 23.
- Joost P, Methner A. **Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands.** *Genome Biol*. 2002 Oct 17;3(11):RESEARCH0063. Epub 2002 Oct 17.
- Kelly E. **Efficacy and ligand bias at the μ -opioid receptor.** *Br J Pharmacol*. 2013 Aug;169(7):1430-46. doi: 10.1111/bph.12222.
- Klaasse EC, Ijzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW. **Internalization and desensitization of adenosine receptors.** *Purinergic Signal*. 2008 Mar;4(1):21-37. Epub 2007 Nov 13.
- Kobayashi R, Nakayama R, Ohta A, Sakai F, Sakuragi S, Tashima Y. **Identification of the 32 kDa components of bovine lens EDTA-extractable protein as endonexins I and II.** *Biochem J*. 1990 March 1; 266(2): 505–511.
- Koneru A, Satyanarayana S, Rizwan S. **Endogenous Opioids: Their Physiological Role and Receptors.** *Global Journal of Pharmacology*, 3 (3): 149-153, 2009
- Lang R, Gundlach AL, Kofler B. **The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease.** *Pharmacol Ther*. 2007 Aug;115(2):177-207. Epub 2007 May 31.
- Law PY, Loh HH. **Regulation of opioid receptor activities.** *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 May;289(2):607-24.
- Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W, Dunlop NM, Gao JL, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. **Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1.** *J Neurosci*. 2001 Jan 15;21(2):RC123.
- Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W, Dunlop NM, Gao JL, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. **Laboratory of Molecular Immunoregulation.** *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* [2001, 21(2):RC123]
- Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF. **Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor.** *J Neurochem*. 2000 Jan;74(1):34-41.
- Lee J, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FA, Brennan M, Lew RA, Albiston AL, Chai SY. **Structure-activity study of LVV-hemorphin-7: angiotensin AT4 receptor ligand and inhibitor of insulin-regulated aminopeptidase.** *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Apr;305(1):205-11.
- Lefkowitz RJ. **The superfamily of heptahelical receptors.** *Nat Cell Biol*. 2000 Jul;2(7):E133-6.
- Lei T, Buchfelder M, Fahlbusch R, Adams EF. **Growth hormone releasing peptide (GHRP-6) stimulates phosphatidylinositol (PI) turnover in human pituitary somatotroph cells.** *J*

Mol Endocrinol. 1995 Feb;14(1):135-8.

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. **Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor.** Endocr Rev. 1995 Apr;16(2):143-63.

Lewerenz J, Albrecht P, Tien ML, Henke N, Karumbayaram S, Kornblum HI, Wiedau-Pazos M, Schubert D, Maher P, Methner A. **Induction of Nrf2 and xCT are involved in the action of the neuroprotective antibiotic ceftriaxone in vitro.** J Neurochem. 2009 Oct;111(2):332-43. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06347.x. Epub 2009 Aug 18.

Lewerenz J, Letz J, Methner A. **Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress.** J Neurochem. 2003 Oct;87(2):522-31.

Li C, Chung D. **Isolation and structure of an untrikontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands.** PNAS 73 (4): 1145-1148. 1976.

Li Y, Maher P, Schubert D. **A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion.** Neuron. 1997 Aug;19(2):453-63.

Li Y, Maher P, Schubert D. **Requirement for cGMP in nerve cell death caused by glutathione depletion.** J Cell Biol. 1997 Dec 1;139(5):1317-24.

Liang TS, Gao JL, Fatemi O, Lavigne M, Leto TL, Murphy PM. **The endogenous opioid spinorphin blocks fMet-Leu-Phe-induced neutrophil chemotaxis by acting as a specific antagonist at the N-formylpeptide receptor subtype FPR.** J Immunol. 2001 Dec 1;167(11):6609-14.

Liebmann C. **G protein-coupled receptors and their signaling pathways: classical therapeutical targets susceptible to novel therapeutic concepts.** Curr Pharm Des. 2004;10(16):1937-58. Review

Liebmann C, Nawrath S, Ludwig B, Paegelow I. **Pharmacological and molecular actions of the bradykinin B2 receptor antagonist, Hoe 140, in the rat uterus.** Eur J Pharmacol. 1993 Apr 28;235(2-3):183-8.

Liebmann C, Schrader U, Brantl V. **Opioid receptor affinities of the blood-derived tetrapeptides hemorphin and cytochrophin.** Eur J Pharmacol. 1989 Aug 3;166(3):523-6.

Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. **Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor.** J Biol Chem. 2002 May 31;277(22):19276-80. Epub 2002 Mar 8.

Lin P, Ye RD. **The lysophospholipid receptor G2A activates a specific combination of G proteins and promotes apoptosis.** J Biol Chem. 2003 Apr 18;278(16):14379-86. Epub 2003 Feb 13.

Maggi CA. **The mammalian tachykinin receptors.** Gen Pharmacol. 1995 Sep;26(5):911-44.

Maher P, Davis JB. **The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity.** J Neurosci. 1996 Oct 15;16(20):6394-401.

Martindale JL, Holbrook NJ. **Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival.** J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.

Menzaghi F, Behan DP, Chalmers DT. **Constitutively activated G protein-coupled receptors: a novel approach to CNS drug discovery.** Curr Drug Targets CNS Neurol

Disord. 2002 Feb;1(1):105-21. Review

Merg F, Filliol D, Usynin I, Bazov I, Bark N, Hurd YL, Yakovleva T, Kieffer BL, Bakalkin G. **Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the kappa-opioid receptor.** J. Neurochem. 97 (1): 292–301. April 2006.

Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH. **Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism.** Biochim Biophys Acta. 2007 Apr;1768(4):923-40. Epub 2006 Oct 4.

Michel MC1, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T. **XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors.** Pharmacol Rev. 1998 Mar;50(1):143-50.

Migeotte I, Communi D, Parmentier M. **Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses.** Cytokine Growth Factor Rev. 2006 Dec;17(6):501-19. Epub 2006 Nov 2.

Millar RP. **GnRHs and GnRH receptors.** Anim Reprod Sci. 2005 Aug;88(1-2):5-28.

Mizoguchi H, Narita M, Wu H, Narita M, Suzuki T, Nagase H, Tseng LF. **Differential involvement of mu(1)-opioid receptors in endomorphin- and beta-endorphin-induced G-protein activation in the mouse pons/medulla.** Neuroscience. 2000;100(4):835-9.

Mollereau C, Mazarguil H, Marcus D, Quelven I, Kotani M, Lannoy V, Dumont Y, Quirion R, Detheux M, Parmentier M, Zajac JM. **Pharmacological characterization of human NPFF(1) and NPFF(2) receptors expressed in CHO cells by using NPY Y(1) receptor antagonists.** Eur J Pharmacol. 2002 Sep 20;451(3):245-56.

Montoliu C, Llansola M, Kosenko E, Corbalán R, Felipe V. **Role of cyclic GMP in glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons.** Neuropharmacology. 1999 Dec;38(12):1883-91.

Morfis M1, Tilakaratne N, Furness SG, Christopoulos G, Werry TD, Christopoulos A, Sexton PM. **Receptor activity-modifying proteins differentially modulate the G protein-coupling efficiency of amylin receptors.** Endocrinology. 2008 Nov;149(11):5423-31. doi: 10.1210/en.2007-1735. Epub 2008 Jul 3.

Morimoto BH, Koshland DE Jr. **Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 May;87(9):3518-21.

Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. **Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress.** Neuron. 1989 Jun;2(6):1547-58.

Nagata A, Ito M, Iwata N, Kuno J, Takano H, Minowa O, Chihara K, Matsui T, Noda T. **G protein-coupled cholecystinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 15;93(21):11825-30.

Nakamizo T, Kawamata J, Yoshida K, Kawai Y, Kanki R, Sawada H, Kihara T, Yamashita H, Shibasaki H, Akaike A, Shimohama S. **Phosphodiesterase inhibitors are neuroprotective to cultured spinal motor neurons.** J Neurosci Res. 2003 Feb 15;71(4):485-95.

Naor Z, Benard O, Seger R. **Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled**

receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. Trends Endocrinol Metab. 2000 Apr;11(3):91-9.

Nicaise V, Roux M, Zipfel C. **Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm.** Plant Physiol. 2009 Aug;150(4):1638-47. doi: 10.1104/pp.109.139709. Epub 2009 Jun 26.

Noble F, Roques BP. **CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology.** Prog Neurobiol. 1999 Jul;58(4):349-79.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. **Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor.** Science. 2000 Aug 4;289(5480):739-45.

Qanbar R, Bouvier M. **Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function.** Pharmacol Ther. 2003 Jan;97(1):1-33. Review

Reale V, Chatwin HM, Evans PD. **The activation of G-protein gated inwardly rectifying K⁺ channels by a cloned Drosophila melanogaster neuropeptide F-like receptor.** Eur J Neurosci. 2004 Feb;19(3):570-6.

Ricupero DA, Romero JR, Rishikof DC, Goldstein RH. **Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA.** J Biol Chem. 2000 Apr 28;275(17):12475-80.

Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL. **Characteristics of glucagon action on the hepatic adenylate cyclase system.** Biochem J. 1971 Dec;125(3):58P-59P.

Sagara Y, Schubert D. **The activation of metabotropic glutamate receptors protects nerve cells from oxidative stress.** J Neurosci. 1998 Sep 1;18(17):6662-71.

Sager G. **Cyclic GMP transporters.** Neurochem Int. 2004 Nov;45(6):865-73.

Sahin M, Saxena A, Joost P, Lewerenz J, Methner A. **Induction of Bcl-2 by functional regulation of G-protein coupled receptors protects from oxidative glutamate toxicity by increasing glutathione.** Free Radic Res. 2006 Nov;40(11):1113-23.

Sasai Y, Nakanishi S. **Molecular characterization of rat substance K receptor and its mRNAs.** Biochem Biophys Res Commun. 1989 Dec 15;165(2):695-702.

Saute JA, da Silveira LE, Soares FA, Martini LH, Souza DO, Ganzella M. **Amnesic effect of GMP depends on its conversion to guanosine.** Neurobiol Learn Mem. 2006 May;85(3):206-12. Epub 2005 Dec 1.

Schroeder C, Breit A, Böning H, Dedio J, Gera L, Stewart J, Müller-Esterl W. **Changes in amino-terminal portion of human B2 receptor selectively increase efficacy of synthetic ligand HOE 140 but not of cognate ligand bradykinin.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Jun;284(6):H1924-32. Epub 2003 Feb 6.

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. **Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration.** Eur J Biochem. 2000 Aug;267(16):4904-11. Review

Shaaban S, Benton B. **Orphan G protein-coupled receptors: from DNA to drug targets.** Curr Opin Drug Discov Devel. 2001 Sep;4(5):535-47. Review

Smith KE, Walker MW, Artymyshyn R, Bard J, Borowsky B, Tamm JA, Yao WJ, Vaysse PJJ, Branchek TA, Gerald C, Jones KA. **Cloned Human and Rat Galanin GALR3 Receptors.** September 4, 1998 The Journal of Biological Chemistry, 273, 23321-23326.

- Snyder SH. **The opiate receptor and morphine-like peptides in the brain.** Am J Psychiatry. 1978 Jun;135(6):645-52.
- Steiner J, Haughey N, Li W, Venkatesan A, Anderson C, Reid R, Malpica T, Pocernich C, Butterfield DA, Nath A. **Oxidative stress and therapeutic approaches in HIV dementia.** Antioxid Redox Signal. 2006 Nov-Dec;8(11-12):2089-100.
- Sun J, Ramnath RD, Tamizhselvi R, Bhatia M. **Neurokinin A engages neurokinin-1 receptor to induce NF-kappaB-dependent gene expression in murine macrophages: implications of ERK1/2 and PI 3-kinase/Akt pathways.** Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Sep;295(3):C679-91. doi: 10.1152/ajpcell.00042.2008. Epub 2008 Jul 2.
- Sun Y, Lu X, Gershengorn MC. **Thyrotropin-releasing hormone receptors -- similarities and differences.** J Mol Endocrinol. 2003 Apr;30(2):87-97.
- Tan S, Wood M, Maher P. **Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells.** J Neurochem. 1998 Jul;71(1):95-105.
- Tarozzi A, Merlicco A, Morroni F, Bolondi C, Di Iorio P, Ciccarelli R, Romano S, Giuliani P, Hrelia P. **Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers.** J Biol Regul Homeost Agents. 2010 Jul-Sep;24(3):297-306.
- Thauerer B, zur Nedden S, Baier-Bitterlich G. **Vital role of protein kinase C-related kinase in the formation and stability of neurites during hypoxia.** J Neurochem. 2010 Apr;113(2):432-46. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06624.x. Epub 2010 Jan 28.
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. **Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells.** Endocrinology. 2005 Feb;146(2):624-32. Epub 2004 Nov 11.
- Traish AM, Moreland RB, Gallant C, Huang YH, Goldstein I. **G-protein-coupled receptor agonists augment adenylyl cyclase activity induced by forskolin in human corpus cavernosum smooth muscle cells.** Recept Signal Transduct. 1997;7(2):121-32.
- Turrens JF, Boveris A. **Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.** Biochem J. 1980 Nov 1;191(2):421-7.
- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. Annu Rev Biochem. 2004;73:953-90.
- Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine JS, Bredesen DE. **Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis.** Science. 1996 Jan 26;271(5248):515-8.
- Wilson S, Bergsma DJ, Chambers JK, Muir AI, Fantom KG, Ellis C, Murdock PR, Herrity NC, Stadel JM. **Orphan G-protein-coupled receptors: the next generation of drug targets?** Br J Pharmacol. 1998 Dec;125(7):1387-92.
- Winter MK, McCarson KE. **G-protein activation by neurokinin-1 receptors is dynamically regulated during persistent nociception.** J Pharmacol Exp Ther. 2005 Oct;315(1):214-21. Epub 2005 Jun 28.
- Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D. **Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids.** J Exp Med. 2003 Oct 6;198(7):977-85.

- Wong CH, Crack PJ. **Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury.** *Curr Med Chem.* 2008;15(1):1-14.
- Xapelli S, Agasse F, Ferreira R, Silva AP, Malva JO. **Neuropeptide Y as an endogenous antiepileptic, neuroprotective and pro-neurogenic peptide.** *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2006 Nov;1(3):315-24.
- Yamada M, Monden T, Konaka S, Mori M. **Assignment of human thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor gene to chromosome 8.** *Somat Cell Mol Genet.* 1993 Nov;19(6):577-80.
- Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S. **Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase.** *Mol Endocrinol.* 1992 Dec;6(12):2136-42.
- Yamamoto Y, Kanazawa T, Shimamura M, Ueki M, Hazato T. **Inhibitory effects of spinorphin, a novel endogenous regulator, on chemotaxis, O₂- generation, and exocytosis by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)-stimulated neutrophils.** *Biochem Pharmacol.* 1997 Sep 15;54(6):695-701.
- Yan M, Hernandez M, Xu R, Chen C. **Effect of GHRH and GHRP-2 treatment in vitro on GH secretion and levels of GH, pituitary transcription factor-1, GHRH-receptor, GH-secretagogue-receptor and somatostatin receptor mRNAs in ovine pituitary cells.** *Eur J Endocrinol.* 2004 Feb;150(2):235-42.
- Yanguo Hong, Peifang Dai, Jianping Jiang, Xueai Zeng. **Dual effects of intrathecal BAM22 on nociceptive responses in acute and persistent pain—potential function of a novel receptor.** *Br J Pharmacol.* 2004 February; 141(3): 423–430.
- Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X. **Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density.** *Ann N Y Acad Sci.* 1999;897:136-44.
- Zhang Y, Syed R, Uygur C, Pallos D, Gorry MC, Firatli E, Cortelli JR, VanDyke TE, Hart PS, Feingold E, Hart TC. **Evaluation of human leukocyte N-formylpeptide receptor (FPR1) SNPs in aggressive periodontitis patients.** *Genes Immun* 4 (1): 22–9. Feb 2003.

7 Danksagung

Danke

Axel Methner & Philipp Albrecht

8 Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

27.01.2017

Mai-Ly Tran Tien