

Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

**Die Neuroblastomzelllinien Neuro2A und LAN5 als
Neuronenmodellversuch am Beispiel der Darstellung von
Lipoproteinrezeptoren**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Peer Anders
aus Hamburg

Hamburg, 2004

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Koreferent:

1	ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG.....	1
2	EINLEITUNG.....	2
2.1	DAS NEURON	2
2.1.1	<i>Geschichtliches.....</i>	2
2.1.2	<i>Anatomischer Aufbau</i>	2
2.2	LIPOPROTEINREZEPTOREN.....	4
2.2.1	<i>Der LDL-Rezeptor.....</i>	6
2.2.2	<i>Das LDL-receptor-related protein (LRP).....</i>	7
2.2.3	<i>Gp330.....</i>	8
2.2.4	<i>Der VLDL-Rezeptor.....</i>	8
2.3	MIKROTUBULI-ASSOZIIERTE PROTEINE (MAPS).....	8
2.3.1	<i>Tau.....</i>	9
2.3.2	<i>MAP2.....</i>	10
2.4	NEUROBLASTOMZELLINIEN	10
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	MATERIAL.....	12
3.1.1	<i>Zellkultur</i>	<i>12</i>
3.1.1.1	<i>Zellkulturmedien</i>	<i>12</i>
3.1.1.2	<i>Zellanhaftung und -differenzierung</i>	<i>13</i>
3.1.2	<i>Analyse der Zellproteine.....</i>	<i>14</i>
3.1.2.1	<i>Isolierung und Bestimmung der Zellproteine.....</i>	<i>14</i>
3.1.2.2	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	<i>14</i>
3.1.2.3	<i>Westernblotting und Immundetektion.....</i>	<i>16</i>
3.1.3	<i>Immunfluoreszenz.....</i>	<i>17</i>
3.2	METHODEN	18
3.2.1	<i>Zellkultur</i>	<i>18</i>
3.2.1.1	<i>Neuro2A (Mausneuroblastomzelllinie).....</i>	<i>18</i>
3.2.1.1.1	<i>Beschichtungsversuche.....</i>	<i>19</i>
3.2.1.1.2	<i>Differenzierungsversuche</i>	<i>19</i>
3.2.1.2	<i>LAN 5 (humane Neuroblastomzelllinie).....</i>	<i>20</i>
3.2.1.3	<i>Cortexneurone</i>	<i>20</i>
3.2.1.3.1	<i>Vorbereitung der Kulturflächen.....</i>	<i>20</i>
3.2.1.3.2	<i>Präparation und Zellkultur</i>	<i>20</i>
3.2.2	<i>Analyse der Zellproteine.....</i>	<i>21</i>
3.2.2.1	<i>Isolierung und Bestimmung der Zellproteine.....</i>	<i>21</i>
3.2.2.2	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	<i>22</i>

3.2.2.3	Elektroblotting und Immundetektion	22
3.2.3	Immunfluoreszenz.....	23
4	ERGEBNISSE	25
4.1	NEURO2A, LAN5 UND CORTEXNEURONE IN DER ZELLKULTUR	25
4.1.1	<i>Neuro2A</i>	25
4.1.2	<i>LAN5</i>	27
4.1.3	<i>Neuronen (Maus - Cortex)</i>	28
4.2	EXPRESSION VON LIPOPROTEINREZEPTOREN IN NEURO2A, LAN5 UND CORTEXNEURONEN	30
4.2.1	<i>LDL-Rezeptor (Abb.11)</i>	30
4.2.2	<i>'LDL receptor-related protein' (LRP, Abb.12)</i>	31
4.2.3	<i>gp330 (Abb.13)</i>	32
4.2.4	<i>VLDL-Rezeptor (Abb.14)</i>	33
4.3	DARSTELLUNG UND LOKALISATION DER LIPOPROTEINREZEPTOREN IN DER IMMUNFLUORESCENZ	34
4.3.1	<i>LDL-Rezeptor</i>	34
4.3.2	<i>LDL receptor-related-Protein (LRP)</i>	36
4.3.3	<i>Gp 330</i>	38
4.3.4	<i>MAP2 und Tau</i>	39
5	DISKUSSION	41
5.1	DIFFERENZIERUNG DER NEUROBLASTOMZELLINIEN	41
5.2	MAUSNEURONE (CORTEX) IN DER ZELLKULTUR	43
5.3	NEURO2A UND LAN5 ALS NEURONENMODELL ?	44
6	ZUSAMMENFASSUNG	47
7	LITERATURVERZEICHNIS	49
8	DANKSAGUNG	55
9	LEBENS LAUF	56
10	ERKLÄRUNG	57

1 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Ziel der Arbeit war es, zur Aufklärung des Lipoproteinstoffwechsels im ZNS beizutragen. Dazu sollten Neuroblastomzellen so präpariert werden, daß man sie anstelle von Neuronen für Versuche nutzen kann. Die Versuche gliederten sich in drei Abschnitte:

1. Die Etablierung von optimalen Zellkulturbedingungen für die Neuroblastomzelllinien Neuro2A und LAN5 sowie für murine Cortexzellen;
2. Charakterisierung der Lipoproteinrezeptoren in diesen drei Zellkulturen im Westernblot;
3. Lokalisierung der Lipoproteinrezeptoren in den oben genannten Zellen in der Immunfluoreszenz.

Im ersten Teil wurde versucht, optimale Zellkulturbedingungen für die Neuroblastomzelllinien Neuro2A und LAN5 sowie für murine Cortexzellen herauszufinden. Die Zelladhäsion und –morphologie von Neuro2A sollten durch Beschichtungsversuche mit Poly-L-Lysin, Poly-D-Lysin, Kollagen, Fibrinogen, oder Gelatine verbessert werden. Differenzierungsversuche sollten mit 1mM Dibutyryl-cyclo-AMP sowie mit 20 µM Retinsäure und Variation der Serumkonzentration durchgeführt werden. Bei LAN5 sollte der Schwerpunkt auf der Optimierung der Zellzahl für die folgenden Versuche liegen. Auch in der Cortexzellkultur sollte die optimale Zellzahl eruiert werden. Der Schwerpunkt sollte hier jedoch auf dem Erreichen einer möglichst langen Überlebenszeit der Zellen durch Optimierung der Gewinnung der Cortexneurone und Variation des Kulturmediums liegen. Im zweiten Teil sollten in den Zellkulturen die Lipoproteinrezeptoren – LDL-Rezeptor, LRP, gp330 und VLDL-Rezeptor – mit Hilfe von Westernblotting untersucht werden. Der dritte Teil sollte analog zum zweiten Teil die oben genannten Lipoproteinrezeptoren mittels indirekter Immunfluoreszenz auf den Zellen lokalisieren. Anhand der in allen drei Teilen erbrachten Erkenntnisse galt es zu beurteilen, ob und wie man Neuroblastomzellen anstelle von Neuronen nutzen kann.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Neuron

2.1.1 Geschichtliches

Bis in das 18. Jahrhundert gab man dem Nervengewebe die Funktion, als protoplasmatisches Netzwerk die von Gehirn und Rückenmark produzierte Flüssigkeit an die Körperoberfläche zu transportieren. Diese "Retikulumtheorie" wurde durch die Erfindung des Mikroskops widerlegt. Ende des 19. Jh. stellte Camillo GOLGI Nervenzellen per Silberfärbung dar, wovon RAMÓN y CAJAL Zeichnungen anfertigte. Der Grundstein für die Neuron doctrine (BULLOCK, 1959) war gelegt, wonach das Nervensystem aus Signaleinheiten besteht, die untereinander durch Synapsen (benannt von Charles SHERRINGTON, ca. 1879) verbunden sind.

2.1.2 Anatomischer Aufbau

Das Nervengewebe besitzt die Aufgabe, weit voneinander entfernt liegende Körperteile zu koordinierter Tätigkeit zu verbinden. Diese Verbindungen werden durch plasmatische Ausläufer der Zellen, Nervenfasern genannt, hergestellt. Perikaryon (Zelleib) und Nervenfasern bilden zusammen das Neuron (WALDEYER, 1891).

Eine Nervenzelle unterteilt sich in vier morphologisch definierte Regionen:

- Das Perikaryon, der ausgedehnte Teil der neuronalen Nervenzelle, der unmittelbar den Kern umgibt und von dem die Dendriten und Axone abzweigen. Es beinhaltet u.a. das Endoplasmatisches Retikulum, den Golgi-Apparat, die wichtige Stationen in der Protein- bzw. Lipidentstehung sind. Sein Durchmesser reicht von ca. $6\mu\text{m}$ bis über $100\mu\text{m}$ (LEONHARDT, 1990)
- Dendriten, meist komplex verzweigte Fortsätze, über die die Nervenzelle Eingangssignale von anderen Neuronen erhält.
- Ein Axon, auch Neurit genannt, ein bis zu einem Meter langer dünner Fortsatz, den die Nervenzelle zur Aussendung von Erregungen benutzt. Von einem Axon können mehrere Kollateralen ausgehen, dessen Endigungen ein gemeinsames Endbäumchen, das Telodendron, bilden.
- Ein präsynaptisches Ende, an dem die Übertragung eines Signals durch Ausschüttung von Transmittern (z.B. Acetylcholin, Glutamin, GABA) erfolgt.

Während der Zellmigration der Neuronen innerhalb des embryonalen Hirngewebes beginnt die Nervenzelle bereits, ein Axon zu bilden. Dieses Axon wächst in der Differenzierungsphase aus und verbindet schließlich die Nervenzelle mit ihrem Zielorgan. Die Aufgabe der Navigation übernehmen axonale Wachstumskegel ("growth cone"), gerade im Gehirn können Fehlverbindungen fatale Funktionsstörungen zur Folge haben. Diese "growth cones" strecken immer wieder breite, membranöse Flächen, die Lamellipodien, mit dünnen stachelartigen Auswüchsen, den Filopodien, aus und ziehen sie wieder ein. Einige Filopodien bleiben an einem Substrat haften und können den Wachstumskegel dann in ihre Richtung ziehen (KATER UND REHDER, 1995; GOMEZ und LETOURNEAU, 1994; DAVENPORT et al., 1993). Durch eine lokale Veränderung des in diesem Filopodium befindlichen Zytoskeletts werden die Mikrotubuli und somit ein weiterer gewachsener Teil des Axons stabilisiert. Analog zum axonalen Wachstum findet das Dendritenwachstum statt, es bilden sich oft stark verzweigte Dendritenbäumchen, an denen sich viele Kontaktmöglichkeiten für Synapsen anderer Nervenzellen bieten.

Die Weiterleitung eines Signals innerhalb des Nervensystems erfolgt auf zwei Arten, sowohl durch elektrische Impulse (Leitung eines Signals innerhalb einer Zelle), als auch auf chemischem Wege durch den Transport von spezifischen Proteinen und anderen Makromolekülen an der Synapse (Leitung eines Signals von einer Zelle zur nächsten). An einer erregenden Synapse depolarisiert der Transmitter, der von der präsynaptischen Endigung freigesetzt wird, die postsynaptische Zelle und treibt das Membranpotential auf die Schwelle zu. Bei chemischen Synapsen setzt die präsynaptische Endigung als Antwort auf die Depolarisation einen chemischen Stoff, den Transmitter, frei. Die beiden Nervenzellmembranen sind dort, wo die chemische Synapse liegt, verdickt und weiter voneinander entfernt als an anderer Stelle. In der Nähe der präsynaptischen Membran sind Vesikel angesammelt, die Transmitter enthalten. Diese binden an spezialisierte Chemorezeptor-Moleküle in der postsynaptischen Membran. Nach dem Inhalt der Transmittervesikel kann man spezifische Synapsen unterscheiden:

1. cholinerge Synapsen mit der Transmittersubstanz Acetylcholin,
2. catecholaminerge Synapsen, Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin beinhaltend,
3. serotoninerge Synapsen,
4. GABA-erge oder glycinerge Synapsen,
5. peptiderge Synapsen, bei denen Polypeptide (z.B. Endorphine) als Transmittersubstanz wirken (FORSSMANN, HEYM 1982).

Nervenzellen unterscheiden sich im wesentlichen nicht von den übrigen Zellen des menschlichen Körpers, sie besitzen einen Zellkern, Zellorganellen wie Mitochondrien, den Golgi-Apparat, Lysosomen oder das endoplasmatische Retikulum ebenso wie das Zytoskelett, bestehend aus Neurofilamenten, den Mikrotubuli und Mikrofilamenten. Das Zytoskelett ist für die Form des Neurons und für den Transport vieler Substanzen und Organellen innerhalb des Neurons verantwortlich, einen Bruchteil dieser Substanzen stellen die mikrotubuli-assoziierten Proteine dar, auf die später noch eingegangen wird.

Über den Stoffwechsel der einzelnen Nervenzelle ist bislang noch wenig bekannt, schon Camillo GOLGI (1903) schloß eine eventuelle Beteiligung der die Nervenzelle umgebenden Gliazellen nicht aus. Astrozyten und Oligodendrozyten bilden die Hauptmitglieder der Familie der Gliazellen, die den Neuronen zahlenmäßig überlegen ist. Nur wegen der ihnen helfenden Neuroglia können Nervenzellen ihr ausdifferenziertes Stadium erreichen, Gliazellen dienen dem Stofftransport, dem Ionentransport und der Markscheidenbildung, um hier nur einige ihrer Funktionen zu nennen, die en gros den Funktionen des Bindegewebes entsprechen. Die Glia ist ebenfalls bei Degenerations- und Regenerationsvorgängen von Nervenfasern beteiligt. Sie ist ebenso Hauptquelle für Tumoren des ZNS.

2.2 Lipoproteinrezeptoren

Lipoproteine sind ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Fettstoffwechsels; ohne sie wäre es nicht möglich Fette wie z.B. das wasserunlösliche Cholesterin und Triglyzeride im Blut zu binden und somit zu transportieren und letztendlich für den menschlichen Körper verwertbar zu machen. Durch Ultrazentrifugation lassen sich die Lipoproteine in verschiedene Typen auftrennen, hierbei sind die wichtigsten Lipoproteine das LDL und das HDL. Das LDL stellt durch seinen hohen Cholesteringehalt ein hohes Gesundheitsrisiko für das Herz-Kreislaufsystem dar, das HDL hingegen trägt entscheidend zum Cholesterinabbau in der Leber bei.

Damit der menschliche Körper die sich im Blut befindlichen Fette verwerten kann, müssen diese in die Zellen gelangen, in denen sie dann in Fettsäuren gespalten werden. In die Zellen gelangen die Fette mithilfe sogenannter Apolipoproteine. Apolipoproteine sind „Eiweißkomponenten als Unterfraktionen der Lipoproteine“ (Roche Lexikon Medizin), die sich an die Lipoproteinrezeptoren binden. Wichtige Apolipoproteine im Fettstoffwechsel sind die Apolipoproteine B₁₀₀, -A-I und -E. Die Apolipoproteine

übernehmen diverse Funktionen, letzteres spielt z.B. eine wichtige Rolle in der Alzheimer-Forschung (Übersicht über die Eigenschaften der Apolipoproteine im Plasma: siehe KOCH, 2000, Tabelle 2, Seite 5).

Während das Apolipoprotein den Bindungspartner der Lipoproteine darstellt, befindet sich analog dazu auf der Zellmembran ebenfalls ein Protein, das die bindende Rolle übernimmt. Diese Membranproteine nennt man Lipoproteinrezeptoren (GOLDSTEIN et al., 1986; GRIFFIN & PACKARD, 1994; HUSSAIN et al., 1999).

Die bekanntesten Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie sind:

- der LDL-Rezeptor (GOLDSTEIN & BROWN, 1979),
- das LDL-Rezeptor-Related-Protein (LRP: HERZ et al., 1988),
- das gp 330/Megalin (RAYCHOWDHURY et al., 1989; SAITO et al., 1994)
- der VLDL-Rezeptor (TAKAHASHI et al., 1992).

Um die Lipoproteinrezeptorfamilie zu komplettieren, seien noch der ApoE-Rezeptor 2 (ApoER2) sowie LR 11 zu erwähnen. Der ApoE-Rezeptor 2 wird hauptsächlich im Gehirn synthetisiert, ihm kommt (wie dem VLDL-Rezeptor) eine Bedeutung bei der Entwicklung des Kleinhirns und des cerebralen Kortex zu (TROMMSDORFF et al., 1999). LR 11 wird ebenfalls überwiegend im Gehirn synthetisiert (YAMAZAKI et al., 1996), die Funktion dieses Rezeptors ist noch unbekannt, die Verwandtschaft zu den anderen fünf Rezeptoren ist eher entfernt.

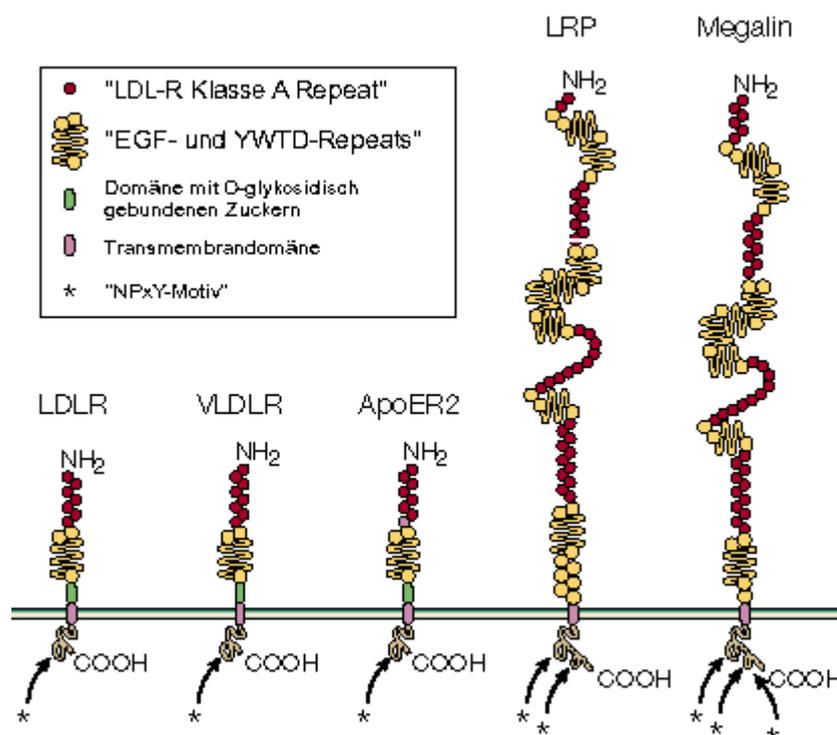


Abbildung 1:

Die strukturelle Organisation der LDL-Rezeptor-Familie.

Modifiziert nach [Herz und Beffert, 2000]

2.2.1 Der LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor ist ein Membran-Glykoprotein mit 839 Aminosäuren, dessen Präkursor mit 120 kD Molekulargewicht (TOLLESHAUG, GOLDSTEIN, SCHNEIDER, BROWN, 1982; CUMMINGS et al., 1983) im rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert wird. Der eigentliche Rezeptor mit 160 kD Molekulargewicht entsteht im Golgi-Apparat (BROWN, ANDERSON, GOLDSTEIN, 1983). Die Aufgabe des LDL-Rezeptors besteht in der Regulation der zellulären Cholesterinhomöostase (GOLDSTEIN, BROWN, 1986) und des Plasmacholesterinspiegels (BROWN, GOLDSTEIN, 1976), Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen tragen entscheidend zur familiären Hypercholesterinämie bei (Hobbs et al., 1992).

Das Molekül ist wie seine Geschwister der LDL-Rezeptorfamilie aus fünf Domänen aufgebaut:

1. Die liganden-bindende Domäne (292 Aminosäuren), wegen Sequenzhomologie in Komplementfaktoren auch complement-type-Domäne genannt (HOBBS, RUSSEL, BROWN, GOLDSTEIN, 1990), Ort der Bindung von LDL mit Hilfe von Apoprotein B100 bzw. Apoprotein E (GOLDSTEIN, BROWN, 1986). 40 cysteinreiche AS-Reste werden siebenmal wiederholt, wovon einige über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Am Ende jeder Wiederholungssequenz befinden sich mehrere negativ geladene AS-Reste, die nach außen ragen und komplementär zu den positiv geladenen Resten von ApoB100 und ApoE sind. Die Ligand-Rezeptorbindung kommt wahrscheinlich durch ionische Wechselwirkung zwischen den positiven und den negativen AS-Resten zustande (GOLDSTEIN et al., 1983).
2. Die EGF-Typ-Domäne (ca. 400 AS), zu 35% dem Präkursor des "epidermal-growth-factor" (EGF) homolog (SÜDHOF, RUSSEL, GOLDSTEIN, BROWN, SANCHEZ-PESCADOR, BELL, 1985). Sie beinhaltet drei aus cysteinreichen Motiven bestehende "EGF-repeats", die durch "Spacer" mit der Aminosäuresequenz Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD) voneinander getrennt werden. Die EGF-Typ-Domäne ist wahrscheinlich für das Abdissoziieren des Liganden vom Rezeptor im Endosom verantwortlich (Davis et al., 1987).
3. Die O-Glycosyl-Domäne (58 AS), unterteilt in bis zu 18 an Serin oder Threonin gebundene Kohlenhydratketten (YAMAMOTO, T.C. et al. 1984), die über Hydroxylgruppen kovalent mit Zuckerresten verbunden sind ("O-linked sugar domain").

4. Die Transmembrandomäne, bestehend aus 22 AS und
5. Der cytoplasmatische Anteil (50 AS), der mit Hilfe der Aminosäuresequenz Asp-Pro-Val-Tyr (NPXY) eine bedeutende Rolle bei der Bildung von „coated-pits“ spielt (CHEN et al., 1990) und für die Internalisierung der LDL-Partikel verantwortlich ist.

„Coated-pits“ sind eingedellte Membranregionen mit einer Lebensdauer von etwa drei bis fünf Minuten, in denen in der Regel die Ligandenbindung an den LDL-Rezeptor stattfindet, sie machen etwa zwei Prozent der Zelloberfläche aus (GOLDSTEIN, BROWN, 1977) und stellen den Beginn der Endozytose von LDL-Partikeln dar.

2.2.2 Das LDL-receptor-related protein (LRP)

Das LRP ist ein 600 Kd schweres, aus 4526 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein. Als Bildungsorte wurden bisher Hepatozyten (HERZ et al., 1988), Fibroblasten (MOESTRUP et al., 1992), Neuronalzellen des Gehirns (WOLF et al., 1992) und die Synzytiotrophoblasten der Plazenta (JENSEN et al., 1988) nachgewiesen. Durch proteolytische Spaltung im Golgi-Apparat (HERZ et al., 1990) entstehen zwei Fragmente: Eine kleine, 85 Kd schwere Untereinheit, die die Transmembrandomäne enthält und die größere, 515 Kd schwere Untereinheit nicht-kovalent an die Zellmembran bindet. 1989 charakterisierten BEISIEGEL et al. das LRP als ApoE-bindenden Rezeptor, 1990 bewiesen KRISTENSEN et al. und STRICKLAND et al. gleiche Identität des LRP mit dem Rezeptor für aktiviertes alpha2-Makroglobulin, als welcher LRP in der Literatur oft alternativ bezeichnet wird. Weitere wichtige Liganden des LRP sind unter mehreren anderen die Lipoproteinlipase (BEISIEGEL et al., 1991)(CHAPPELL et al., 1992), t-PA („tissue-type plasminogen activator“) (BU et al., 1992), die Hepatische Lipase (BEISIEGEL et al., 1994)(KOUNNAS et al., 1995), Lactoferrin (WILLNOW et al., 1992), Pseudomonas Exotoxin A (KOUNNAS et al., 1992) und das Receptor-associated Protein (STRICKLAND et al., 1991)(WILLIAMS et al., 1992). Die große Breite an verschiedenen Liganden erklärt die Teilnahme des Proteins an mehreren physiologischen Prozessen, im Lipoproteinstoffwechsel ist es wichtig für die Aufnahme von ApoE-haltigen Chylomikronen-Remnants in die Leber (ROHLMANN et al., 1998). Weiterhin nimmt es u.a. an Prozessen wie der Protease-Inhibition, der Koagulation, Gewebereparatur, –wiederaufbau und der embryonalen Entwicklung teil, sogar in der HIV-induzierten Neuropathologie scheint es eine Rolle zu spielen (LIU et al., 2000).

2.2.3 Gp330

Ursprünglich als Haupt-Antigen für die Heymann-Nephritis identifiziert (KERJASCHKI und FARQUHAR, 1983; KERJASCHKI et al., 1992), wurde gp330 (ursprünglich vermutete Masse 330 Kd (KERJASCHKI und FARQUHAR, 1982)) nach vollständiger Klonierung als 516 Kd großes und aus 4660 Aminosäuren bestehendes Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie erkannt (SAITO, 1994). Es wurde bisher in Epithelzellen der Niere, auf Alveolarepithelzellen Typ II der Lunge, Zellen der Thyroidea, Parathyroidea, der Epididymis, in Endometriumzellen des Uterus, plazentaren Trophoblasten, Ependymzellen der Hirnventrikel, in epithelialen Strukturen des Auges und in Dottersackzellen nachgewiesen (ZHENG et al., 1994), jedoch nicht in der Leber (CHATELET et al., 1986). Einem dem des LRP sehr ähnlichen Ligandenspektrum (KOUNNAS et al., 1992; WILLNOW et al., 1992; MEDH et al., 1996) stehen große Unterschiede bezüglich der Expression beider Rezeptoren gegenüber (LUNDGREN et al., 1997), die sich beispielsweise in unterschiedlicher subzellulärer und renaler Lokalisation äußert (MOESTRUP et al., 1994; ZHENG et al., 1994).

2.2.4 Der VLDL-Rezeptor

Der VLDL-Rezeptor ist dem LDL-Rezeptor in Struktur und Sequenz sehr ähnlich, er besitzt eine zusätzliche Domäne zur Bindung der Liganden, also eine achte Wiederholung der cysteinreichen, aus 40 Aminosäuren bestehenden Sequenz, dennoch ist der Rezeptor mit 118 Kd etwas kleiner als der LDL-Rezeptor (Takahashi et al., 1992; Sakai et al., 1994). Ein hoher speziesübergreifender Konservierungsgrad von teilweise über 95% (Kaninchen- und humaner Rezeptor (Sakai et al., 1994)) läßt auf eine wichtige Rolle des VLDL-Rezeptors im Säugetierorganismus und bei Vögeln schließen. Der VLDLR kommt überwiegend in Herz, Muskel und Fettgewebe vor, aber auch im Gehirn wurde VLDLR-mRNS nachgewiesen (GAFVELS et al., 1993).

2.3 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)

Mikrotubuli-assoziierte Proteine sind Proteine, die spezifisch an Mikrotubuli binden (MURPHY und BORISY, 1975), mit diesen bei Zentrifugation in der Wärme Sedimente bilden und bei folgender Depolymerisation der Mikrotubuli in Kälte wieder in Lösung gehen. Der Gruppe der Motorproteine, die Kinesine und die Dyneine beinhaltend, steht die Gruppe der strukturellen MAPs gegenüber. Die strukturellen MAPs wurden ursprünglich

nach ihrem Molekulargewicht in "high"- (200 kD und mehr) und "low-molecular-weight"-Proteine (50-70 kD) eingeteilt (DENTLER et al., 1974; MURPHY und BORISY, 1975). Nach Reihenfolge der Entdeckung der MAPs mit hohem Molekulargewicht entstanden deren Bezeichnungen MAP1a, MAP1b, MAP2 und MAP4, das weiter unten vorgestellte Tau-Protein zählt zu den niedermolekularen MAPs (WEINGARTEN et al. 1975; CLEVELAND et al. 1977a,b). Diese Proteine bilden eine Untergruppe innerhalb der strukturellen MAPs, die Sequenz ihrer cDNA ist stark homolog (GOEDERT et al., 1991), es finden drei oder vier Repeats von je 31 oder 32 Aminosäuren statt (LEE et al., 1988; LEWIS et al., 1988; AIZAWA et al., 1989; CHAPIN und BULINSKI, 1991; WEST et al., 1991).

2.3.1 Tau

Das überwiegend in Axonen von Nervenzellen lokalisierte Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau spielt wegen seiner Bindung an Mikrotubuli eine große Rolle im Organelltransport. Tau wurde 1975 von WEINGARTEN im Schweinhirn entdeckt, 1977 folgte die Isolation und biochemische Charakterisierung durch CLEVELAND(1977). Es zeigten sich im SDS-Gel vier bis sieben Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 50-70 Kd, welches auf Heterogenität des Proteins schließen läßt, die sich beim Menschen in bislang sieben bekannten Isoformen äußert (LEE et al., 1988; GOEDERT et al., 1988 und 1989; HIMMLER, 1989). Sechs dieser Isoformen, entstanden durch alternatives Spleißen eines einzigen Gens auf Chromosom 17 (NEVE et al., 1986; ANDREADIS et al., 1992), werden ausschließlich im Gehirn exprimiert, eine siebte Form mit einem Molekulargewicht von 115 Kd ("big tau") wurde 1991 im peripheren Nervengewebe beschrieben (GEORGIEFF et al., 1991; COUCHIE et al., 1992; GOEDERT et al., 1992; BOYNE et al., 1995). Seine Hydrophilie verdankt das Protein seinem hohen Aminosäuregehalt (25%), in zirkular Dichroismus-Messungen zeigt Tau einen außerordentlich geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen (CLEVELAND et al., 1977b); FTIR- und Röntgendiffraktionsuntersuchungen bestätigten dies (SCHWEERS et al., 1994). Dadurch ließe sich eventuell die Hitzelabilität des Tau-Proteins und das Abweichen des aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Molekulargewichtes von 36-46 Kd und dem in der SDS-PAGE gefundenen Molekulargewicht von 50-70 Kd erklären.

Wie die übrigen strukturellen mikrotubuli-assoziierten Proteine beteiligt sich Tau neben seiner Mikrotubuli-stabilisierenden Funktion an der Ausbildung des Axons. Einsatz Tau-spezifischer "Antisense"-RNA führte zu Unterbindung der Bildung der Axone (CACERES und KOSIK, 1990), Übertragung des Tau-Gens auf Insekten-Ovar-Zellen (Sf9) induzierte

Bildung von axon-ähnlichen Fortsätzen, die sogar ein zentrales Bündel paralleler Mikrotubuli enthielten (KNOPS et al., 1991; BAAS et al., 1991). Ebenso wird eine Vermittlerrolle zwischen der Plasmazellmembran und den axonalen Mikrotubuli diskutiert (BRANDT et al., 1995). Tau-Proteine kommen hauptsächlich im Axon der reifen Nervenzelle von Säugern vor, in geringeren Mengen im neuronalen Zellkern (BRADY et al., 1995; GREENWOOD und JOHNSON, 1995), in Gliazellen (LOPRESTI et al., 1995; PROBST et al., 1993; COUCHIE et al., 1988) und in Muskelzellen (MURAKAMI et al., 1995; LÜBKE et al., 1994).

2.3.2 MAP2

Das mikrotubuli-assoziierte Protein MAP2 gehört zur Gruppe der "high-molecular-weight"-Proteine und ist hauptsächlich in Dendriten lokalisiert (KOSIK und CACERES, 1991). Es existiert in mehreren Isoformen, die sich teilweise in ihrer Funktion unterscheiden. Die Isoformen MAP2a und MAP2b besitzen ein relatives Molekulargewicht von ca. 270 kD, gemäß der Aminosäuresequenz liegt es bei ca. 200 kD (LEWIS et al., 1988; KINDLER et al., 1990), MAP2c ist ein kleineres Molekül mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 70 kD (GARNER et al., 1988), ein dem MAP2c ähnlich großes MAP2d wurde in Gliazellen nachgewiesen (Doll et al., 1993). MAP2a und MAP2b wurden in Dendriten und in Perikaryen von Neuronen detektiert und fehlen in Axonen (HUBER und MATUS, 1984; BINDER et al., 1986), MAP2c tritt besonders in Axonen von embryonalen Neuronen auf (RIEDERER und MATUS, 1985). Durch Expression in epithelialen Zellen bzw. in Fibroblasten konnte der Einfluß des MAP2 auf die Mikrotubuli studiert werden, da MAP2 in diesen Zellen natürlicherweise nicht vorkommt. Eine weitere Aufgabe von MAP2 ist die Erhaltung der Dendriten (SHARMA et al., 1994), aber auch die neuronale Morphogenese wird durch MAP2 beeinflusst (CACERES und KOSIK, 1990; CACERES et al., 1992; LECLERC et al., 1996).

2.4 Neuroblastomzelllinien

Aufgrund ihres ausdifferenzierten Zustandes fehlt Neuronen die Fähigkeit der Proliferation. Man müßte für mehrere Versuche an diesen Zellen immer wieder neue Zellen züchten, welches mit hohem Aufwand und nicht zuletzt auch mit hohen Kosten verbunden wäre. Eine ökonomische Alternative bietet die Arbeit mit einer Zelllinie. Es handelt sich hierbei um meist tumorös entartete Zellen, deren größtes Charakteristikum

eine meist sehr hohe Zellteilungsrate ist. Neuroblastomazellen sind schon seit vielen Jahren als Neuronenmodelle etabliert und werden in diversen Versuchen eingesetzt (AUGUSTI-TOCCO und SATO, 1969; SCHUBERT et al., 1969; HAMPRECHT, 1979). Neben den klonalen Zelllinien, die häufig durch die Kultivierung von Zellen aus spontan auftretenden oder beispielsweise durch Chemikalien induzierten Tumoren entstehen, gibt es die Möglichkeit, auf primäre Zellkulturen zurückzugreifen. Primäre Zellkulturen entstammen normalem Gewebe und unterliegen einem natürlichen Alterungsprozeß. Während Kulturen klonaler Zelllinien ein einheitliches Zellmaterial bieten, gibt es in primären Zellkulturen oft "Verunreinigungen", womit jedoch nicht zwingend unphysiologische Verhältnisse gemeint sind. Am Beispiel der Neuronenkultur wären damit andersartige Zellen wie Gliazellen gemeint. Für die Ausbildung einer reinen Zellkultur böte sich also eher eine klonale Zelllinie an, dabei handelte es sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit um Mausneuroblastomzellen Neuro2A von R.J. KLEBE und F.H. RUDDLE (J.Cell.Biol. 43:69A, 1969), die aus einem spontanen Tumor einer Stamm A Albinomaus gewonnen und als C1300 bezeichnet wurden, sowie um eine humane Neuroblastomzelllinie LAN5 (Seeger et al. 1982), die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Mandelkow aus dem ZMNH in Hamburg zur Verfügung gestellt wurde.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Materialien von der Firma Merck in p.A. Qualität verwendet.

Geräteliste

Brutschrank (Heraeus); Mikroskop (Olympus); Zentrifugen: Hettich Universal (Zellkultur), Hettich Rotant RP (Kühlzentrifuge u.a. für Spitzröhrchen), Biofuge Heraeus (für Eppendorftubes), Laborfuge Heraeus Christ (für Centricons), Ultrazentrifuge OTD65B mit Rotor SW TH 641 (Sorvall), Ultrazentrifuge L7-55 mit Rotor SW 41 (Beckmann); Spektralphotometer 150-20(Hitachi); Elektrophoresekammer (Desaga); Blotting Kammer (BioRad); Eppendorfzentrifuge

3.1.1 Zellkultur

Verwendete Zelllinien

- N2A (Mausneuroblastomzelllinie): ATCC Nummer CCL-131
- LAN 5 (humane Neuroblastomzelllinie) aus dem ZMNH, Hamburg
- Cortexneurone (aus cerebri von Mäuseföten) aus dem UKE, Hamburg

3.1.1.1 Zellkulturmedien

N2A

- Minimum Essential Medium (MEM), (GIBCO)
 - 0 oder 2 oder 10 % Fötale-Kälber-Serum (FCS), (GIBCO)
 - 1 % Glutamin
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (GIBCO)
 - 0 oder 2 oder 10 % Fötale-Kälber-Serum (FCS), (GIBCO)

LAN 5

- RPMI (GIBCO)

Cortexneurone

- Platingmedium für Neuronen:
 - MEM (GIBCO)
 - 0,6 % Glucose
 - 10 % Pferdeserum (GIBCO)
- Wachstumsmedium für Neuronen:
 - MEM
 - 0,6 % Glucose
 - 0,1 % Transferrin, human (SIGMA)

- 0,1 % Insulin, Rind (SIGMA)
- 0,1 % Progesteron (SIGMA)
- 0,1 % Putrescin (SIGMA)
- 0,1 % Selendioxid (SIGMA)
- 1 % Natrium-Pyruvat (SIGMA)
- 1% HEPES (GIBCO)
- Zellkulturmaterialien aus Kunststoff (Nunc)
- Coverslips für Immunfluoreszenzversuche (Assistent)
- PBS (phosphate buffer saline):
 - 2,7 mM KCl
 - 1,5 mM KH_2PO_4
 - 137 mM NaCl
 - 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH=7,4
- Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO):
 - 0,05 % Trypsin
 - 0,53 mM EDTA
- 10x Trypanblaulösung (GIBCO)
- Einfriermedium:
 - 10 % DMSO (SIGMA)
 - 90 % FCS (GIBCO)
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)
 - 5,36 mM KCl
 - 0,44 mM KH_2PO_4
 - 137 mM NaCl
 - 0,34 mM Na_2HPO_4
 - 10 mM HEPES
 - 0,1 % Glukose, pH=7,3

3.1.1.2 Zellanhaftung und -differenzierung

- All-trans-Retinsäure
- N6, 2'- O – Dibutyryl adenosine 3': 5'- Cyclic Monophosphate (DB-cAMP) (SIGMA)
- Poly-L-Lysin (SIGMA)
- Poly-D-Lysin
- Gelatine

- Kollagen
- Fibronectin (Boehringer)

3.1.2 Analyse der Zellproteine

3.1.2.1 Isolierung und Bestimmung der Zellproteine

- PBS / Glycerol (30 %)
- Cell Lysis Buffer (CLB):
 - 50 mM Tris-HCl (Roth)
 - 2 mM CaCl₂
 - 80 mM NaCl
 - 1% Triton X-100, pH 8,0
- Proteinase Inhibitor Stocklösung (PIC):
 - 1 mM Pepstatin A (Calbiochem)
 - 10 mM Chymostatin (Calbiochem)
 - 10 mM Leupeptin (Calbiochem)
 - 10 mM Antipain (Calbiochem)
- Albuminstandard (Pierce): 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/ml in 0,1 N NaOH
- Lösung A:
 - 2 % Na₂CO₃
 - 0,02 % Kaliumnatriumtartrat
 - 0,1 N NaOH
- Lösung B:
 - 0,5 % CuSO₄ • 5 H₂O
 - 5 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)
 - in H₂O dest.
- Lösung C:
 - 1:50 Verdünnung von Lösung B in Lösung A
- Folin-Cicoalteus Phenolreagenz

3.1.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

- Trenngel aus je 10 ml:
 - *Unterer Acrylamidlösung (6% x 4 = 24 g):*
 - 24 g Acrylamid (M=71,08; Roth)
 - 0,4 g Bisacrylamid (M=154,2; SERVA)

- ad 100 ml Aqua dest.
- *Untergelpuffer:*
 - 1,7 M Tris-HCl (Roth); pH=9,18 mit 18%iger HCl
 - ad 100 ml Aqua dest.
- *Temedlösung:*
 - 0,6 ml Tetramethylethyldiamin (TEMED, SERVA)
 - ad 100 ml Aqua dest.
- *AP-Lösung:*
 - 200 mg Ammoniumpersulfat
 - ad 100 ml Aqua dest.
- Sammelgel aus:
 - *5 ml oberer Acrylamidlösung*
 - 12 g Acrylamid (Roth)
 - 0,8 g Bisacrylamid (SERVA)
 - ad 100 ml Aqua dest.
 - 5 ml Obergelpuffer
 - 0,2 M Tris-HCl (Roth); pH=6,14 mit 1 N H₂SO₄
 - 2 ml AP-Lösung (s.oben)
 - 8 ml Aqua dest.
 - 20 µl unverdünntes TEMED
- Unterer Elektrodenpuffer:
 - 0,42 M Tris-HCl (Roth) mit 18%iger HCl auf pH=9,5
- Oberer Elektrodenpuffer:
 - 0,04 M Borsäure
 - 0,04 M Tris-HCl (Roth)
 - 0,1% SDS (SERVA) mit 18%iger HCl auf pH=8,64
- β-Mercaptoethanol (SERVA)
- Glycerin-Bromphenolblau-Lösung:
 - Spatelspitze Bromphenolblau in Aqua dest. gelöst
 - 87%iges Glycerin mit dieser Lösung auf 80 % verdünnen
- Probenpuffer:
 - 5 % SDS in 50 mM Tris-HCl (Roth)
- Proteinstandard:
(broad molecular weight) (Bio-Rad)

(Rainbow cold protein marker, high range) (Amersham)

- Markerproteine:

hUH 7 – freundlicherweise von Dr.Jörg Heeren, Stoffwechsellabor
Prof.Beisiegel, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

Mäuseleberzellen – freundlicherweise von Dr. Andreas Niemeier,
Stoffwechsellabor Prof.Beisiegel, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

V7 – freundlicherweise von Prof. Hamssen, Schweden

3.1.2.3 Westernblotting und Immundetektion

- Ponceau S Solution (SERVA): 0,2 % in 3 % Trichloressigsäure (SERVA)

- Nitrocellulose Porengröße 0,45 µm (Schleicher und Schuell)

- Blottingpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % Methanol

- BSA Rinderserumalbumin Fraktion V (SERVA)

- Blockingpuffer

5 % BSA (SERVA) in Puffer A

- Puffer A:

20 mM Tris-HCl (Roth)

154 mM NaCl

0,1 % Tween 20 mit 18%iger HCl auf pH=7,4

- Puffer B:

0,25 % Natriumdesoxycholat

0,1 % SDS (SERVA)

in Puffer A mit 18%iger HCl auf pH=7,4

- 1. Antikörper:

αMAP 2, α GFAP (beide SIGMA)

αLDLR, αLRP, αgp 330:

polyklonal aus Kaninchen; J. Herz, Department of Molecular Genetics and
Internal Medicine, University of Texas, Dallas, USA –

LDL-R: Progen (Cat.No. 61049)

LRP 8G1: Progen (Cat. No. 61065)

α VLDLR: polyklonal aus Kaninchen, D. Strickland, American Red Cross, Rockville, Maryland, USA

- 2. Antikörper:

GAR-PO: g α rb-HRP (goat-anti-rabbit horse-reddish-peroxidase (Dianova) von Jackson-Immuno-research)

GAM-PO: g α m-HRP (goat-anti-mouse horse-reddish-peroxidase (Dianova) von Jackson-Immuno-research)

RASH-PO: rb α sh-HRP (rabbit-anti-sheep horse-reddish-peroxidase (Dianova) von Jackson-Immuno-research)

- Entwicklerlösung:

30 mg 4-Chlor-1-Naphthol (SIGMA)

in 10 ml Methanol gelöst

ad 50 ml PBS, pH=7,4

- Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

3.1.3 Immunfluoreszenz

- Zellmaterialien siehe Zellkultur

- Fixierungen:

Methanol

8 % Paraformaldehyd (SIGMA) + 2 fach PBS (4 % Paraformaldehyd)

DMEM + 20 mM HEPES-Puffer-Lösung (beide GIBCO)

- Glycin-Puffer-Lösung:

0,5 % Glycin

in PBS

(bei PFA-fixierten Zellen zusätzlich 0,1 % Saponin (SIGMA))

- Blockpuffer-Lösung:

0,2 % BSA (SERVA)

10 % Pferdeserum (GIBCO)

in Glycin-Puffer

- Carrier-Lösung:

0,2 % BSA (SERVA)

1 % Pferdeserum (GIBCO)

in Glycin-Puffer

- Antikörper:

α MAP 2, α GFAP, α LDLR, α LRP, α gp 330, α VLDLR:

Herkunft: sofern nicht anders vermerkt siehe 1. Antikörper „Westernblotting und Immundetektion“

Ebenso wurden benutzt:

α MAP 2 (SIGMA (Cat.No. M4403)),

α Tau (DAKO (Cat.No. A 0024)), beide freundlicherweise vom ZMNH, Hamburg zur Verfügung gestellt.

- 2. Antikörper:

donkey- α -mouse-Cy 2 (ZMNH), donkey- α -mouse-Texas Red, goat- α -mouse DTAF

donkey- α -rabbit-Cy 3, goat- α -rabbit-Cy 3, donkey- α -rabbit DTAF, donkey- α -rabbit Cy 2

- Waschlösungen:

Nach dem 1. Antikörper Glycin-Puffer,
nach dem 2. Antikörper PBS

- Kernfärbung:

5 μ l DAPI (Bisbenzimid) (Hoechst) in Schale mit PBS

- Mounting:

6 μ l Moviol (Calbiochem) pro Coverslip

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Da die Zellkultur die Grundlage aller folgenden Arbeitsschritte darstellt, soll sie als erste Methode beschrieben werden.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer speziellen Werkbank („Hood“) durchgeführt.

3.2.1.1 Neuro2A (Mausneuroblastomzelllinie)

Die Zellen wurden aus einem in flüssigen Stickstoff eingefrorenen Stock entnommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Das Einfriermedium mit den darin suspendierten Zellen wurde in ein 15 ml Spitzröhrchen mit 10 ml Medium überführt und bei 600xg 4 Min. zentrifugiert. Das durch diesen Vorgang entstandene Zellpellet wurde erneut mit 2 ml Medium resuspendiert und in eine 225 ml Zellkulturflasche zu bereits sich darin

befindlichen 8 ml Medium pipettiert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz (ca. 8 – 10 Mio. Zellen/Flasche) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Um die Zellen weiter in Kultur zu halten, bzw. um sie für weitere Versuche nutzen zu können, mußten sie passagiert, d.h. durch Behandlung mit Trypsin vom Boden der Flasche gelöst und mit neuem Medium in einen oder mehrere neue Behälter überführt werden. Dazu wurde das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen und 3 bis 5 Minuten 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung ausgesetzt, welches zum vollständigen Ablösen der Zellen vom Flaschenboden führte. Zur Inhibierung des Trypsins wurden mit der Zellsuspension weitere 6 ml Medium in ein Spitzröhrchen gegeben, und dieses dann wie beschrieben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 bis 6 ml Medium aufgenommen und gelöst. Aus dieser Suspension wurden 20 µl mit 20µl Trypanblaulösung vermischt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

Die benötigte Menge an Zellen wurde je nach Bedarf mit Medium aufgefüllt und in neue Kulturflaschen, auf 80 cm² Schalen oder auf Coverslips ausgesetzt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.1.1.1 Beschichtungsversuche

Um das Verhalten der N2A auf verschiedenen beschichteten Nährböden zu testen, wurden kleine Zellkulturflaschen mit folgenden Stoffen beschichtet:

- Kollagen: 0,1 – 0,05 % w/v in Aqua dest.
- Fibronectin: 0,05 – 0,01 mg/ml in Aqua dest.

Beide Beschichtungen wurden so aufgetragen, daß die Flüssigkeit den Boden bedeckte, dann bei 37 °C über Nacht getrocknet und vor Benutzung einmal mit PBS gewaschen.

- Poly-L-Lysin: 0,1 mg/ml in Aqua dest.
- Poly-D-Lysin: 0,1 mg/ml in Aqua dest.
- Gelatine: 10 mg/ml in Aqua dest.

Es wurde jeweils 1 ml/cm² aufgetragen, die Flaschen 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, dann vor Benutzung die Gelatine-Beschichtungen einmal, die Poly-L-Lysin sowie die Poly-D-Lysin-Beschichtungen dreimal mit PBS gewaschen.

3.2.1.1.2 Differenzierungsversuche

Um Bedingungen zu schaffen, unter denen die N2A konstant Ausläufer bildeten, welches für die folgenden Versuche essentiell war, mußte dem Nährmedium ein Stoff beigefügt werden, der die Differenzierung der Zellen anregen würde. Es wurden folgende Zusatzstoffe eingesetzt:

- All-trans-Retinsäure: 5, 10 und 20 μ Molar
- DB-cAMP: 1 mMolar

3.2.1.2 LAN 5 (humane Neuroblastomzelllinie)

Mit Ausnahme der Methode zum Ablösen der Zellen vom Zellboden wurde mit dieser Zelllinie auf die gleiche Weise wie in 2.2.1.1. beschrieben verfahren.

Zum Ablösen der Zellen wurde hier kein Trypsin benötigt, sie wurden durch Zugabe von PBS in Suspension gebracht.

3.2.1.3 Cortexneurone

3.2.1.3.1 Vorbereitung der Kulturflächen

Für die Immunfluoreszenzversuche wurden die Zellen auf kleine Glasscheiben (Coverslips) ausgesetzt. Damit die Neuronen sich auf dieses Glas anhaften konnten, wurden die Coverslips mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet. Dies geschah über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Coverslips dreimal mit Wasser gewaschen.

3.2.1.3.2 Präparation und Zellkultur

Die Embryonen wurden einer kurz zuvor getöteten Maus mit Hilfe autoklavierten Werkzeugs entnommen und in eine mit HBSS gefüllte Schale gelegt. Unter einer semisterilen Abzugshaube wurde jeweils ein Embryo aus seinem Dottersack genommen, auf eine neue Schale gelegt und enthauptet. Unter einem Stereoskop wurde mit Hilfe zweier Pinzetten erst die Kopfhaut und daraufhin die Schädeldecke entfernt. Das nun freigelegte Gehirn wurde mit einem kleinen Spatel in eine mit HBSS gefüllte Schale gelegt. Diese Vorgänge wiederholten sich für jedes weitere Gehirn, in der Regel zwischen vier- und sechsmal.

Die im HBSS schwimmenden Gehirne wurden als nächstes in zwei Hälften geteilt und vom Cerebellum befreit. Nachdem die Hirnhäute von den Großhirnhälften entfernt worden waren, wurden letztere in eine neue Schale mit HBSS gelegt, mit einer sterilen Rasierklinge zerkleinert und unter eine sterile Abzugshaube (Hood) gebracht. Dort wurden sie durch Auf- und Abziehen mit einer kleinen Pipette weiterhin zerkleinert. Die kleinen Stücke wurden mit dem HBSS in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, welches nach Absinken der Stücke mit einer Pasteurpipette entfernt und verworfen wurde. Pro Gehirn wurden nun 1,5 ml Trypsin + HBSS im Verhältnis 1:10 in das Falcon-Röhrchen gegeben und dieses für 15 Minuten in das Wasserbad (37°C) gestellt.

Nach dieser Zeit wurde das Trypsin mit einer Pasteurpipette abgesogen und das Pellet dreimal mit jeweils 5 ml HBSS für jeweils maximal 5 Minuten gewaschen. Da die Zellen während des Trypsinierens verklumpten, mußten sie trituliert werden, d.h. sie wurden mit einer an der Spitze abgerundeten Pasteurpipette mehrere Male auf- und abgezogen. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Spitzröhrchen gegeben. Das Tritulieren wiederholte sich zweimal bzw. bis die Zellen keine Klumpen mehr bildeten. Aus dem Spitzröhrchen wurden 20 µl entnommen, mit Trypanblau 1:4 verdünnt und unter dem Mikroskop gezählt. Die benötigte Zellzahl wurde mit jeweils 0,5 ml Plating-Medium in eine 24-well-Platte gegeben, in der sich bereits die Coverslips und 0,5 ml Plating-Medium (37°C) pro well befanden.

Nach ca. 4 Stunden wurde das Plating-Medium abgenommen und Wachstumsmedium hinzugegeben, das nicht mehr ausgetauscht wurde.

3.2.2 Analyse der Zellproteine

3.2.2.1 Isolierung und Bestimmung der Zellproteine

Die Zellen wurden auf Petrischalen ausgesetzt. Für das Ablösen der Zellen vom Schalenboden konnte Trypsin nicht benutzt werden, da dieses ihre Oberflächenstruktur und somit deren Proteine zerstört hätte. Daher wurde der Zellrasen nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS in 1 ml PBS / Glycerol (30 %) mit einem Plastikschaaber abgekratzt.

Die N2A wurden 48 Stunden bzw. bei Differenzierung 72 Stunden nach Aussetzen abgekratzt.

Da die LAN 5 bereits durch PBS vom Zellboden gelöst werden, wurde in diesem Fall PBS ++ zum Waschen benutzt, das Calcium und Magnesium als Zusatz enthielt.

Die Neuronen wurden wie die N2A behandelt, das Abkratzen erfolgte 72 Stunden nach Aussetzen.

Die Zellsuspension wurde dann in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 3000 U/min. (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 200 – 800 µl CLB / PIC (1:100) aufgenommen und 30 Minuten zum Solubilisieren auf Eis stehengelassen. Nach weiterem Zentrifugieren (20 Minuten, 4 °C, 13000 U/min.) wurde der Überstand abgenommen und dessen Proteinkonzentration modifiziert nach der Methode von Lowry bestimmt [Lowry et al. 1951]. Die Modifikation bestand darin, die Bestimmung in Anwesenheit von 0,1 % SDS durchzuführen. Es wurde eine Proteineichgerade im Bereich 2 bis 0,0625 mg/ml erstellt. Je 20 µl der Lösung bzw. Proben wurden mit je 80 µl 0,1 N NaOH und direkt anschließend mit 1 ml Lösung C

versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µl 1:2 verdünntem Folin-Reagenz wurde weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Extinktion des proportional zur Proteinkonzentration entstandenen blauen Farbstoffes bei 760 nm photometrisch gemessen und aus den erhaltenen Eichgeraden die Proteinkonzentration der Proben erschlossen.

3.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Zellproteine nach ihrer Größe wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Neville benutzt (Neville, 1971). Die Dicke der Gele betrug 1,5 mm, es wurden Kämme mit 24 Taschen (200 µl) verwendet. Die Proben wurden in einem definierten Volumen Probenpuffer aufgenommen und anschließend mit 25 %iger SDS-Lösung (Endkonzentration 1 %) und Bromphenolpuffer (Endkonz. 10 %) versetzt. Den zur Bestimmung des Molekulargewichtes eingesetzten Proteinstandards wurde zur Reduzierung zusätzlich β -Mercaptoethanol (Endkonz. 10 %) hinzugefügt. Vor dem Auftragen wurden alle Proben bei 95 °C für 5 Minuten gekocht und abgekühlt. Die Auftrennung erfolgte 10 Minuten bei 20 mA, anschließend ca. 2 Stunden bei 40 mA oder länger, bis die bromphenolblaugefärbte Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

3.2.2.3 Elektroblothing und Immundetektion

Nach der Auftrennung im SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Membran transferiert. Dazu wurde ein Naßblot mit Kühlung verwendet. Die Übertragung erfolgte über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran, bei einer konstanten Stromstärke von 220 mA und einer Temperatur von 4 °C.

Am nächsten Tag wurde die Nitrocellulosemembran in Ponceaulösung geschwenkt und mit Aqua dest. entfärbt. Die rote Färbung der Streifen gab Aufschluß über die tatsächlich aufgetragene Proteinmenge und ermöglichte es, den Marker von den übrigen Streifen abzutrennen.

Die für die Immundetektion relevanten Nitrocellulosestreifen wurden nun in Puffer A vollständig entfärbt und ca. 1 Stunde in Blockingpuffer geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zum Waschen wurden die Streifen 1 Minute in Puffer A, zweimal 10 Minuten in Puffer B und wiederum 1 Minute in Puffer A geschwenkt. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper dauerte ca. 1,5 Stunden, danach wurde der obige Waschvorgang wiederholt.

Die Detektion erfolgte durch Zugabe von 100 µl H₂O₂ zu der frisch angesetzten Entwicklerlösung. Sobald eine farbliche Reaktion zu erkennen war, wurde der betreffende

Streifen in Leitungswasser gelegt, um die Peroxidase-Reaktion zu stoppen. Abschließend wurden die Streifen getrocknet und photographiert.

3.2.3 Immunfluoreszenz

Für eine erfolgreiche Durchführung der Immunfluoreszenzversuche war es notwendig, die Zellen abzutöten, gleichzeitig mußte verhindert werden, daß sie sich leicht von ihrem Nährboden, in diesem Falle ein Coverslip, abtrennten. Daher wurden die Zellen fixiert.

- Paraformaldehydfixierung (warm):

Nach zweimaligem Waschen mit DMEM-HEPES (37 °C) und einmaligem Waschen mit PBS (37 °C) wurde je ein Coverslip mit 1 ml 4 % Paraformaldehyd für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach konnten die Zellen direkt weiterverarbeitet werden.

- Methanolfixierung (kalt):

Die Coverslips wurden nach einmaligem Waschen in DMEM-HEPES (37 °C) für 5 Minuten in eine bereits vorgekühlte Schale mit Methanol (-20 °C) in ein Eisfach gestellt. Danach wurde der Ständer mit den Coverslips je einmal 1 Minute, 3 Minuten und 5 Minuten in eiskaltem PBS gewaschen. Zur Lagerung wurden die Coverslips schließlich in eine 24-well-Platte mit je 2 ml PBS pro well überführt und in den Kühlschrank gestellt oder direkt weiterverarbeitet.

Da Paraformaldehyd störenden Einfluß auf die Immunfluoreszenz haben kann, wurden die Coverslips zunächst 5 mal 5 Minuten in PBS gewaschen, um sicherzustellen, daß die Zellen frei von Paraformaldehyd sind. Dieser Vorgang war bei den Methanol-fixierten Zellen nicht notwendig.

Als nächstes wurden je 40 µl Blocklösung auf einen Coverslip pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 30 – 60 Minuten). Nach dieser Zeit wurde die Blocklösung mit einem Stück Filterpapier abgesogen und der 1. Antikörper in 30 µl Carrierlösung aufgetragen. Diese Inkubation dauerte ca. 60 – 90 Minuten und erfolgte bei 37 °C. Zum Waschen wurden die Coverslips in einer Schale mit Glycin-Puffer kurz geschwenkt und dreimal 5 Minuten lang in Glycin-Puffer gewaschen.

Mit dem 2. Antikörper wurde wie mit dem 1. Antikörper verfahren, in der Regel war die Inkubationszeit etwas kürzer. Danach wurden die Coverslips zunächst in PBS geschwenkt, dann 5 Minuten in einer Schale mit PBS gewaschen und für 60 – 90 Sekunden in eine neue Schale mit PBS + 5 µl Bisbenzimid zur Kernfärbung gestellt. Es folgte dreimaliges Waschen in je einer Schale mit PBS (5 Minuten). Mit Hilfe von zuvor im Wasserbad (37 °C) aufgetautem Moviol wurden die Coverslips nun auf Objektträger befestigt. Diesen

Vorgang nennt man Mounting. Die Objektträger mit den Coverslips wurden schließlich bei 4 °C über Nacht getrocknet und konnten am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

4 ERGEBNISSE

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche lassen sich in drei Abschnitte einteilen: Zum ersten in Versuche in der Zellkultur, zum zweiten in die Darstellung ihrer Lipoproteinrezeptoren im Westernblot-Verfahren sowie zum dritten in der Immunfluoreszenz.

Um Proteine bzw. Rezeptoren in den Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz nachweisen zu können, mußten zunächst die Wachstumsbedingungen so optimiert werden, daß die Zellen einen konstanten Phänotyp aufwiesen. Diese Zellen sollten morphologisch so weit wie möglich die Eigenschaften der kultivierten Neuronen haben, d.h. Neuro2A bzw. LAN5 sollten dendriten- bzw. axonähnliche Ausläufer bilden. Nur derartig differenziert würde ein Vergleich dieser drei Zellarten hinsichtlich ihrer Expression von Rezeptoren möglich sein.

4.1 Neuro2A, LAN5 und Cortexneurone in der Zellkultur

4.1.1 Neuro2A

Die Neuro2A wurden nach dem Auftauen mit einer Zellzahl von 20000 – 25000 / cm² ausgesetzt und 48 h in DMEM + 10% Fötalem Kälberserum (FCS) (siehe Material und Methoden) kultiviert. Subkonfluenz stellte sich meist nach 4 – 5 Tagen ein. Das Medium wurde in der Regel alle zwei Tage gewechselt. Bei Kultivierung mit DMEM + 10 % FCS boten die Neuro2A ein kugeliges Bild, es entstanden durch Zellteilungen sehr bald Zellgruppen, Ausläufer jedoch bildeten die Neuro2A nur vereinzelt, diese waren dann sehr

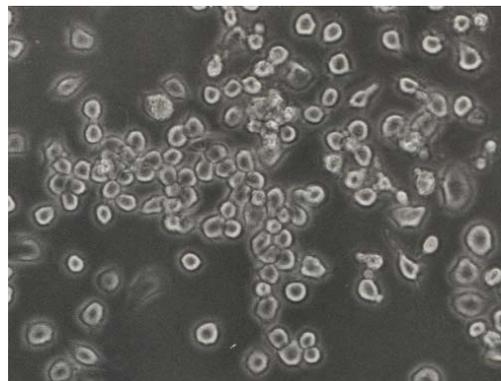


Abbildung 2
Neuro2A in der Zellkultur

Neuro2A wurden in DMEM + 10% FCS kultiviert und 72 h nach Aussetzen fotografiert.
Vergrößerung 1:200.

dünn und kurz (Abbildung 2). Versuche, durch Beschichtung des Kulturbodens zu erreichen, daß die Zellen besser anhafteten und dadurch eventuell ihre kugelige Form zu einer flacheren, länglicheren änderten, waren nicht erfolgreich. Weder die Beschichtung mit Poly-L-Lysin, Poly-D-Lysin noch Kollagen, Fibrinogen oder Gelatine hatten Effekt auf die Zelladhäsion und –morphologie. Es ist jedoch beschrieben, dass eine Differenzierung

von Neuroblastomzellen durch Retinsäure sowie durch Veränderung der FCS-Konzentration erreicht werden kann (TAKATSUKA et al., 1996). In einem parallel laufenden Versuch wurde daher 20 μ M Retinsäure entweder in 10% FCS hinzugegeben, oder 2% FCS als Kulturmedium verwendet. Bei beiden Experimenten stellte sich kein verändertes Bild gegenüber der Ausgangssituation (Abb.2) ein (Abb.3, Abb.4).

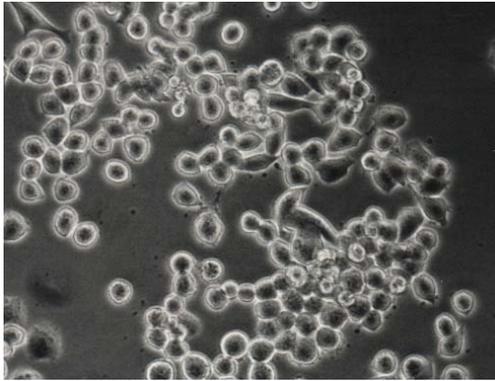


Abb.3: Neuro2A in der Zellkultur

Neuro2A wurden in DMEM + 10% FCS + 20 μ M Retinsäure kultiviert und 72 h nach Aussetzen fotografiert. Vergrößerung 1:200.

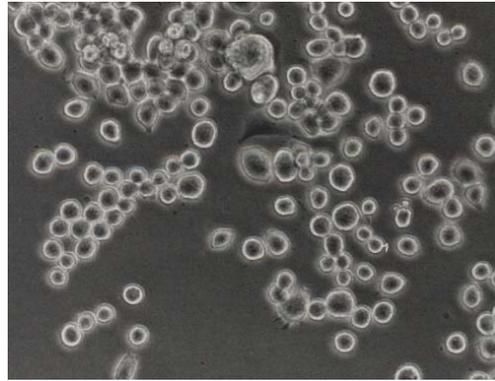


Abb.4: Neuro2A in der Zellkultur

Neuro2A wurden in DMEM + 2 % FCS kultiviert und 72 h nach Aussetzen fotografiert. Vergrößerung 1:200.

Erste Differenzierungen (im Sinne der morphologischen Veränderung) zeigten sich bei Kultivierung der Zellen in DMEM ohne FCS-Zusatz. Nach ca. 48 h begannen sie, an mehreren Stellen dünne, fragil wirkende neuritenähnliche Ausläufer zu bilden, die Zellen schienen sich teilweise untereinander zu „vernetzen“ (Abb.5), jedoch starben sie meist früher als die Zellen in FCS-haltigem Kulturmedium. Nach etwa fünf Tagen oder teilweise schon früher waren die Kulturen nicht mehr verwendbar.

Als erfolglos stellte sich der Versuch der Differenzierung der Neuro2A durch Zugabe von 1mM DB-cAMP (Petroni et al., 1996) heraus. Die Zellen bildeten zwar stabilere Ausläufer als bei Kultivierung ohne FCS, jedoch fanden sich in der Kultur auch sehr kleine, störende



Abb.5: Neuro2A in der Zellkultur

Neuro2A wurden in DMEM ohne FCS-Zusatz kultiviert und fünf Tage nach Aussetzen fotografiert. Vergrößerung 1:400.

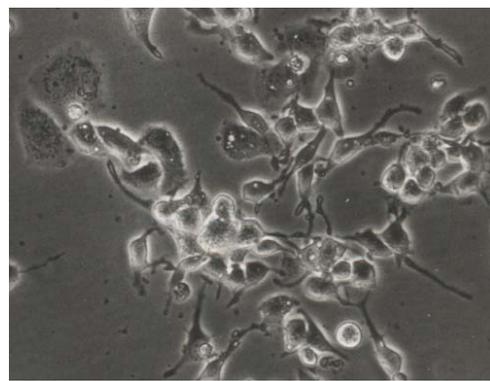


Abb.6: Neuro2A in der Zellkultur

Neuro2A wurden in DMEM + 10% FCS + 1 mM DB-cAMP kultiviert und 72 h nach Aussetzen fotografiert. Im Bild links oben ist eine der erwähnten Zellen mit lipidtropfen-ähnlichen Vesikeln zu erkennen. Vergrößerung 1:200.

Partikel (Abb.6). Auffällig war zusätzlich ein vermehrtes Auftreten von morphologisch veränderten und vergrößerten Zellen, die lipidtropfen-ähnliche Vesikel enthielten.

Während also weder bei Kultivierung der Zellen mit 2 % FCS noch mit 20 μ M Retinsäure sichtbare Veränderungen festgestellt werden konnten, ergab sich bei Kombination der beiden Bedingungen nach etwa drei Tagen folgendes Bild (Abb.7):

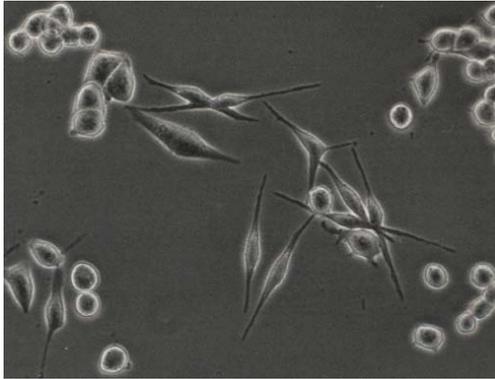


Abb.7: Neuro2A in der Zellkultur

Neuro2A wurden in DMEM + 2 % FCS + 20 μ M Retinsäure kultiviert und 72 h nach Aussetzen fotografiert.
Das hier dargestellte Zellbild mit bipolaren Ausläufern entsprach nicht dem Bild der gesamten Kultur, es waren überwiegend kugelig aussehende Zellen wie unten rechts zu sehen. Vergrößerung 1:200.

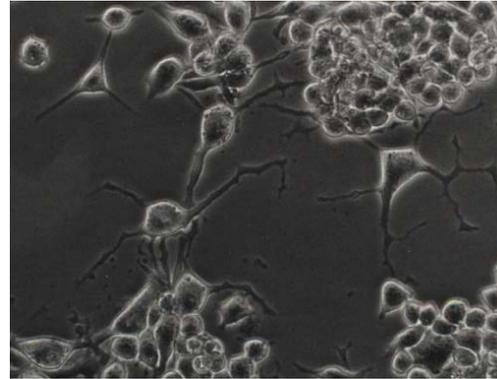


Abb.8: Neuro2A in der Zellkultur

Neuro2A wurden in DMEM + 2 % FCS + 20 μ M Retinsäure kultiviert und fünf Tage nach Aussetzen fotografiert.
Rechts oben und links sind Zellhaufen zu erkennen, deren Anteil an der Gesamtkultur größer war als der der Zellen mit Ausläufern. Vergrößerung 1:200.

Es bildeten sich Gruppen mit mehreren Zellen mit deutlich sichtbaren Ausläufern, das Soma dieser Zellen bekam eine länglichere und breitere Form (Abb.7, 8). Zwei Tage später schien es, als hätten sich die kugeligen Zellen weiter vermehrt (Abb.8, rechts oben: Bildung von Zellhaufen), die differenzierenden Zellen (Abb.7 Mitte) nicht. Der Anteil der differenzierenden zu nicht differenzierten Zellen betrug konstant etwa 1:3.

Diese Art der Differenzierung bewährte sich auf mehreren Kulturflächen, in großen und mittleren Kulturflaschen sowie auf Zellkulturschalen und auf Glasplättchen für die Immunfluoreszenz („Coverslips“), so daß die Zellen in dem in Abb.7 gezeigten Zustand für weitere Versuche genutzt werden konnten.

4.1.2 LAN5

Die LAN5 wurden nach dem Auftauen mit einer Zellzahl von 4000 – 25000 / cm^2 ausgesetzt und in RPMI + 10% FCS kultiviert. Alle Zellen überlebten und konnten weiterverwendet werden, lediglich die Dauer bis zur Subkonfluenz variierte. Bei Aussetzen von 25000 Zellen pro cm^2 mußten sie nach 48 Stunden in neue Kulturbehälter aufgeteilt werden, bei Aussetzen von 8000 Zellen pro cm^2 - diese Zellzahl eignete sich

besonders gut für kleine Kulturschalen mit „Coverslips“ - konnten die Zellen nach vier bis sechs Tagen für Immunfluoreszenzversuche genutzt werden. Die LAN5 zeigten unabhängig von ihrer initialen Zellzahl ein einheitliches Bild, sie bildeten kurze Zeit nach Aussetzen bipolare, teilweise tripolare, stabile neuritenähnliche Ausläufer bei länglicher Zellform. Die Zellen vermehrten sich rege und vernetzten sich während jeder Passage untereinander (Abb.9).

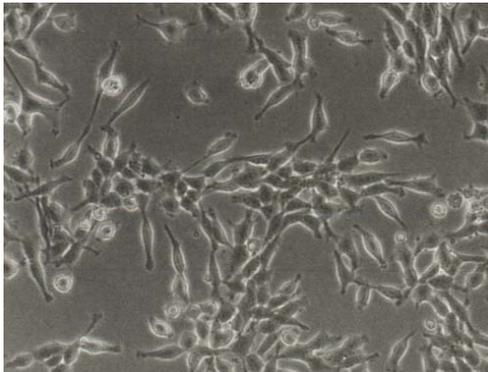


Abb. 9: LAN5 in der Zellkultur

LAN5 wurden in RPMI + 10 % FCS kultiviert und 72 h nach Aussetzen fotografiert. Vergrößerung 1:200. Die bi- und tripolaren Ausläufer sind deutlich zu erkennen. In diesem Differenzierungsgrad wurden die Zellen im Westernblotting verarbeitet (siehe 3.2.)

4.1.3 Neuronen (Maus - Cortex)

Neuronen haben aufgrund ihres hohen Differenzierungsgrades die Fähigkeit der Zellteilung verloren. Im Gegensatz zu den beiden anderen Zellreihen war in diesem Fall also der Ansatz, eine einzige Generation so lange wie möglich am Leben zu erhalten.

Die für diese Arbeit verwendeten Neuronen, bei denen es sich um eine Primärkultur von Cortexzellen aus Mäuseembryonen handelte, wurden nach Wechsel des "Plating"-Mediums in einem serumfreien Wachstumsmedium kultiviert (Bestandteile siehe 2.1.1.1.), die Behälter mit den Zellen wurden lediglich zur Beobachtung dem Brutschrank entnommen sowie terminal zur Fixierung bzw. Weiterverwendung. Die Lebensdauer der Neuronen schwankte zwischen fünf und zehn Tagen.

Ein Versuch mit mehreren Medien ergab keine Verlängerung der Lebensdauer für die Neuronen sowohl in HAMAO, in aufgetautem, altem Wachstumsmedium, als auch in neuem, Ovalbumin enthaltendem Wachstumsmedium. Ein weiterer Glutaminzusatz brachte das gleiche Ergebnis. Da die Zellen in Wachstumsmedium OHNE Ovalbumin im Gegensatz zu den Zellen in o.g. Medien nicht abstarben, wurde dieses Medium für die folgenden Nährkulturen genutzt.

Die ausgesetzten Zellen setzten sich schon nach wenigen Stunden auf den beschichteten Schalenboden ab, beginnend nach ein bis zwei Tagen bildeten sie zahlreiche Neuriten, die sich zu einem dichten Netzwerk zusammenschlossen. In Abb.10 sind Zellen in

Primärkultur an Tag 5 dargestellt, die mit dem sogenannten „Life and Dead“-Kit angefärbt worden waren. Dabei dringt Calcein in lebende Zellen ein, wird dort umgesetzt zu einem grün fluoreszierenden Farbstoff, der in lebenden Zellen von der intakten Membran zurückgehalten wird. In toten Zellen findet die Reaktion nicht statt, hier kann durch die beschädigte Zellmembran der DNA-Farbstoff Ethidiumbromid eindringen und in die DNA interkalieren, was zu einer roten Fluoreszenz führt. Die Zahl der lebenden Zellen (Abb.10, grün gefärbt) überwog bei weitem (tote Zellen rot gefärbt). Das Zellbild bestand nicht nur aus Neuronen, auch Gliazellen, wahrscheinlich ependymale Zellen (KOCH, 2000), waren vorhanden (Abb.10, weißer Pfeil), mit einem Mengenanteil von teilweise 10-20 %. In dem auf der Abbildung gezeigten ausreichend differenzierten Zustand wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzversuche fixiert bzw. für die Proteinauftrennung vom Zellkulturboden abgekratzt und weiterverarbeitet.

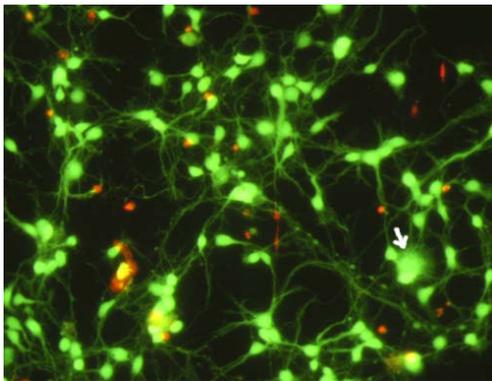


Abb. 10: Cortexneurone in der Zellkultur

Murine Cortexneurone wurden in Wachstumsmedium (Bestandteile siehe 2.1.1.1.) ohne Ovalbumin kultiviert und 72 h nach Aussetzen fotografiert. Lebende Zellen wurden mit Calcein (Verd. 1:2000) grün, tote Zellen mit Ethidiumbromid D1 (Verd. 1:500) rot gefärbt. Vergrößerung 1:200. Mit weißem Pfeil gekennzeichnet ist eine Gliazelle zu sehen.

4.2 Expression von Lipoproteinrezeptoren in Neuro2A, LAN5 und Cortexneuronen

Um einen qualitativen Nachweis des LDL-Rezeptors, des LRP, gp330 und des VLDL-Rezeptors bei den drei in der Zellkultur vorbereiteten Zellarten zu erreichen, wurden die Proteine der Zellen in einer SDS-PAGE aufgetrennt (nach 2.2.3.), wodurch nach entsprechender Antikörperinkubation der jeweilige Rezeptor auf Nitrocellulosepapier dargestellt werden konnte. Alle Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf ein sechszehntiges Polyacrylamidgel aufgetragen und auf ein Nitrocellulosepapier mit 0,1 µm Porengröße übertragen.

4.2.1 LDL-Rezeptor (Abb.11)

Als Positivkontrolle konnte der LDL-Rezeptor bei HUH7, einer humanen Leberzelllinie, eindeutig bei ca. 130 kD nachgewiesen werden. HUH7 wurden freundlicherweise von Dr. Jörg Heeren zur Verfügung gestellt. Die Bande von Neuro2A lag etwas niedriger als die von LAN5 und HUH7, bei ca. 116 kD. Die Ursache hierfür könnte in einer geringeren Glykosilierung oder einer Trunkierung des LDL-Rezeptors von N2A liegen, die möglicherweise während der Transformationsprozesse der Mausneuroblastomzellen stattfand.

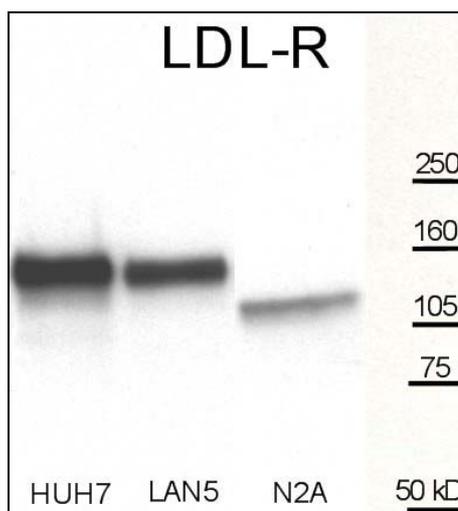


Abb. 11: Expression des LDL-Rezeptors (1:50)

Die Proteine der Zelllinien Neuro2A, HUH7 und LAN5 (jeweils 100µg) wurden wie in 2.2.3. beschrieben in einer 6%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Detektion des LDL-Rezeptors erfolgte anschließend im hier dargestellten Westernblot mittels ECL. Es zeigt sich eine etwas niedrigere Bande bei N2A als bei den beiden anderen Zelllysaten. Ursache hierfür könnte eine Mutation des LDL-Rezeptors sein, eventuell durch Veränderungen während der Transformation.

4.2.2 'LDL receptor-related protein' (LRP, Abb.12)

LRP, bestehend aus zwei Untereinheiten (515 kD und 85 kD), konnte bei HUH7 als Positivkontrolle bei ca. 515 kD detektiert werden. Dieses Molekulargewicht fand bei LAN5 Bestätigung, jedoch nicht bei Neuro2A. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der von uns benutzte Antikörper lediglich das humane Protein erkennt. Weiterhin reagiert er lediglich mit der 515 kD schweren Kette, daher entsteht kein Signal bei 85 kD.

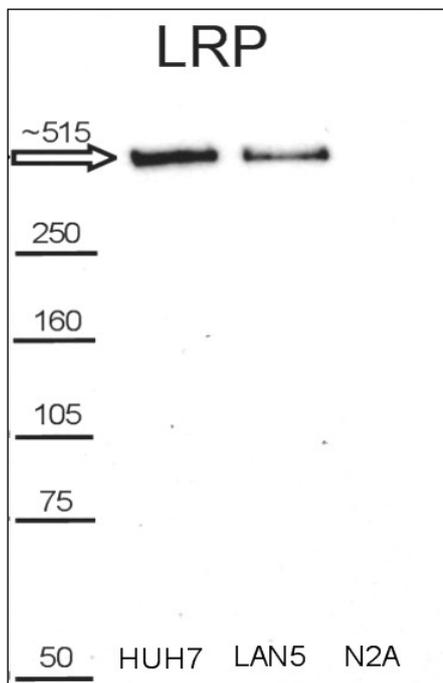


Abb.12: Expression von LRP (1:200)

Die Proteine der Zellen LAN5, von HUH7 und von Neuro2A (jeweils 100 µg) wurden wie in 2.2.3. beschrieben in einer 6%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von LRP erfolgte anschließend im hier dargestellten Westernblot mittels ECL. Es zeigt sich bei ca. 515 kD eine Bande sowohl bei LAN5 als auch bei HUH7. Das LRP von N2A wird nicht erkannt. Dies liegt am ehesten an dem benutzten Antikörper.

4.2.3 gp330 (Abb.13)

Im Gegensatz zum LRP besteht gp 330, ein weiteres Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie, nur aus einer Einheit mit einem Gewicht von 516 kD. Bei LAN 5 konnte eine Bande bei ca. 330kD detektiert werden, bei der sich gp 330 im Westernblot zeigt. HUH 7 besitzen keine gp 330. Auch bei Neuro2A liess sich kein Niederschlag in diesem kD-Bereich feststellen. Aufgrund der hohen Verunreinigung des Blots muss man mutmaßen, dass der benutzte Antikörper sich nicht optimal für diesen Blotting-Versuch eignet.

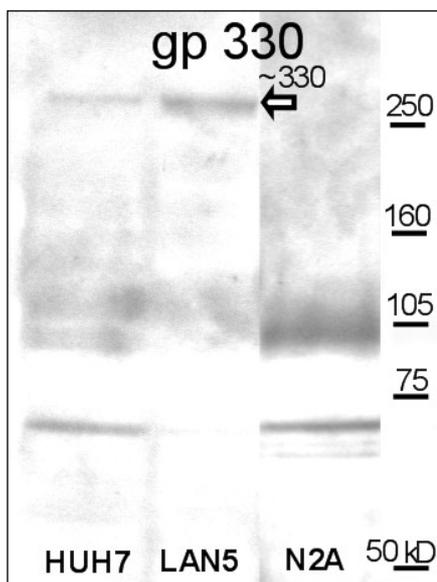


Abb.13: Expression von gp330(1:1000)

Die Proteine der Cortezellen, von LAN5, Neuro2A und von HUH7 (jeweils 100 µg) wurden wie in 2.2.3. beschrieben in einer 6%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von gp 330 erfolgte anschließend im hier dargestellten Westernblot mittels ECL. Auffallend sind die vielen verschiedenen Präzipitationen. Während bei LAN5 ein Niederschlag in Höhe von etwa 330 kD festzustellen ist (weisser Pfeil), fehlt dieser bei N2A.

4.2.4 VLDL-Rezeptor (Abb.14)

Der VLDL-Rezeptor, mit 118 kD fast gleich schwer wie der LDL-Rezeptor, konnte in V7, einer CHO-Zelllinie, die diesen Rezeptor überexprimiert, erfolgreich nachgewiesen werden. Neuro2A und LAN5 zeigen ebenfalls eine schwache Bande in diesem Bereich. Wie in Abb. 14a deutlich wird stellte sich der VLDL-Rezeptor bei ca. 118 kD dar. Im ersten Bild (Abb. 14) sieht man eine nur geringe Präzipitation der Zellproteine, im zweiten Bild (Abb. 14a) ist die Bandbreite der Proteinaufrennung sehr groß, welches dafür spricht, dass der Antikörper nicht optimal erkannt wird.

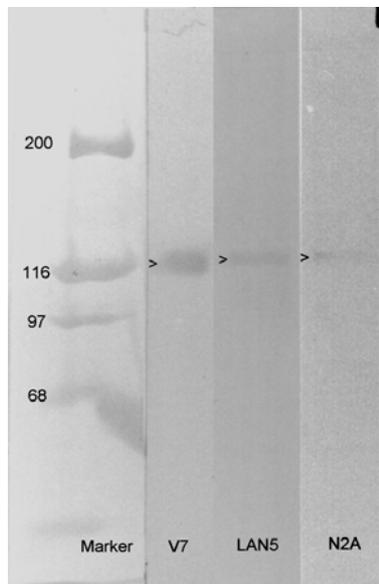


Abb.14: Expression des VLDL-Rezeptors

Die Proteine von LAN5 und Neuro2A (jeweils 100 µg) wurden wie in 2.2.3. beschrieben in einer 6%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des VLDL-Rezeptors erfolgte anschließend im hier dargestellten Westernblot.

Rechts neben einem Markerprotein befindet sich die Bande von V7, ein Markerprotein für den VLDL-Rezeptor.

Das Lysat von V7 lag bereits fertig präpariert vor.

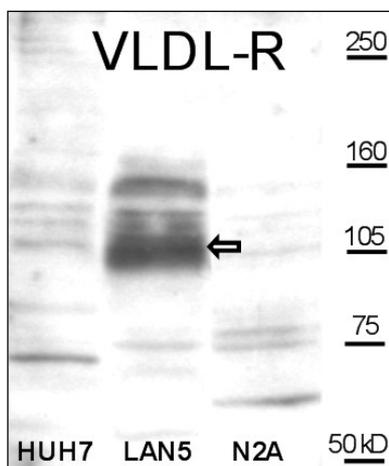


Abb.14a: Expression des VLDL-Rezeptors, zweiter Versuch (1:500)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte wie zu Abb. 14 beschrieben, Detektion mittels ECL. Mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet ist die Bande bei ca. 118 kD bei LAN 5, bei der es sich höchstwahrscheinlich um den VLDL-Rezeptor handelt. In sehr schwacher Form ist diese Bande auch bei Neuro2A und hUH 7 zu erkennen.

4.3 Darstellung und Lokalisation der Lipoproteinrezeptoren in der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist ein Verfahren zur optischen Darstellung von Zellen und ihren Rezeptoren mit Hilfe von spezifischen Erstantikörpern und ihrer anschließenden Detektion durch Fluoreszenz-markierte Zweitantikörper. Nach den im Westernblot erhaltenen qualitativen Informationen über die Lipoproteinrezeptoren folgt in der Immunfluoreszenz ihre individuelle Darstellung in Cortexneuronen, Neuro2A und LAN5.

Die Versuche wurden wie in 2.2.2. beschrieben durchgeführt, die Herkunft der benutzten Antikörper ist Kapitel 2.1.2. bzw. 2.1.3.3. zu entnehmen.

4.3.1 LDL-Rezeptor

Die Darstellung der Rezeptoren auf den Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz erwies sich als sehr schwierig. Trotz äusserst vorsichtiger Handhabung konnten nur selten differenzierte Neuro2A-Zellen auf den Coverslips fixiert werden. So konnte der LDL-Rezeptor nur auf kugelig undifferenzierten Zellen detektiert werden (Abb.15). Dabei

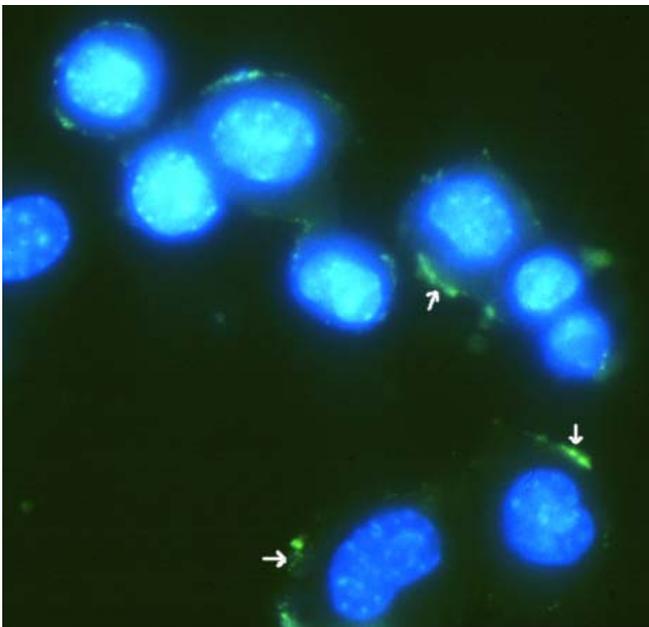


Abb.15: LDL-Rezeptor auf Neuro2A (IIF)

Die dargestellten Zellen Neuro2A wurden nach 48 h in DMEM und danach weitere 72 h in DMEM + 2 % FCS + 20 μ M Retinsäure kultiviert. Fixierung erfolgte in 4%-Paraformaldehyd.

Die LDL-Rezeptoren wurden durch indirekte Immunfluoreszenz grün angefärbt. Auffallend sind die unregelmäßig membranständige Verteilung der LDL-Rezeptoren (weiße Pfeile) und die großen Zellkerne der Neuro2A mit vielen Nucleoli, die hier blau angefärbt sind.

Aufnahme in 630facher Vergrößerung.

zeigte sich, daß der Zellkern so groß war, daß er das gesamte Cytoplasma auszufüllen schien, was für die Darstellung cytoplasmatisch lokalisierter Proteine sehr nachteilig ist.

Bei der Betrachtung der LAN5 (Abb.16) in der Immunfluoreszenz fiel zunächst die äusserst ungewöhnliche Form des Zellkernes auf, eine Hörnchen-ähnliche Form mit eindeutigen Einbuchtungen. Außerdem sind keine Nucleoli zu erkennen, was besonders

auffällig ist im Vergleich mit den Neuro2A, die viele Nukleoli zu haben scheinen (Abb.15).

Erstaunlicherweise ergab sich hier ein völlig anderes Bild als bei Neuro2A. Es konnte keine membranständige Fluoreszenz detektiert werden, stattdessen befindet sich das Signal hier perinukleär, es scheint stets in der Einbuchtung des Zellkernes konzentriert zu sein. Im übrigen Cytoplasma, das in Abb.16 nicht zu erkennen ist, zeigte sich keine Färbung von LDL-Rezeptoren.

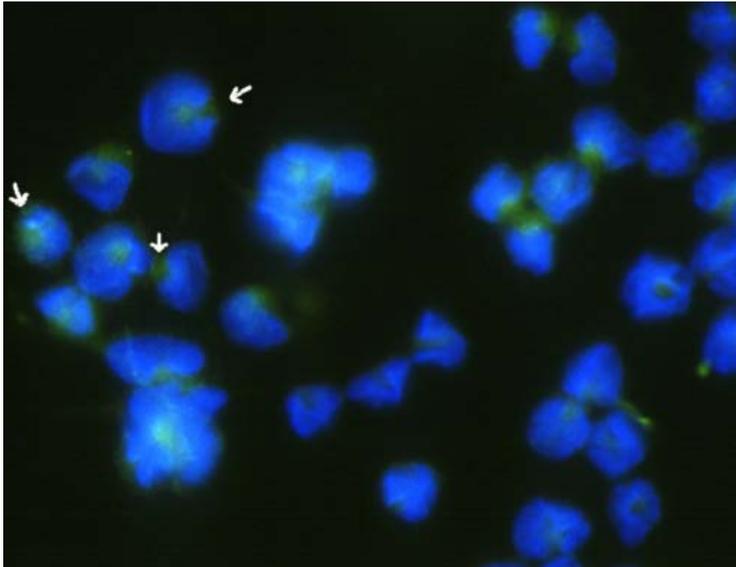


Abb.16: LDL-Rezeptor auf LANS5 (IIF)

Die dargestellten LANS5 wurden fünf Tage in RPMI + 10 % FCS kultiviert und in Methanol fixiert. Die LDL-Rezeptoren wurden durch indirekte Immunfluoreszenz grün angefärbt. Die weißen Pfeile kennzeichnen die bevorzugte perinukleäre Lokalisation der Rezeptoren. Auffallend sind die großen, gelappten Kerne, die hier blau angefärbt sind. Aufnahme in 630facher Vergrößerung.

Da in der Cortexzellkultur sowohl Neuronen als auch nicht-neuronale Zellen vorhanden waren, die LDL-Rezeptoren allerdings nur auf neuronalen Zellen dargestellt werden sollten, mußten die Zellen voneinander unterschieden werden. Dies erfolgte mit einer zusätzlichen Markierung der Neuronen mit einem Dendritenmarker, MAP2, der in Abb.17 die Dendriten der Neuronen grün färbt.

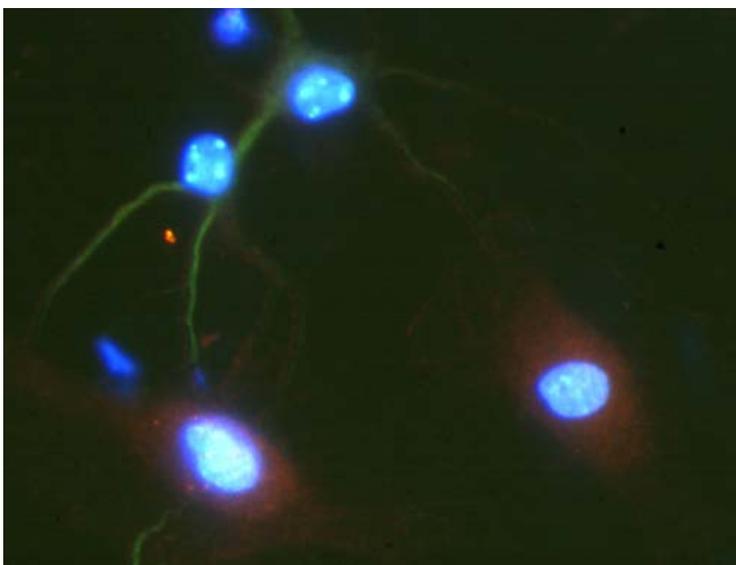


Abb.17: LDL-Rezeptor (rot) und MAP2 (grün) auf Cortexzellen (IIF)

Die dargestellten Zellen entstammen dem Cortex von Mäuseembryonen, sie wurden zunächst vier Stunden in Platingmedium und anschließend zehn Tage in Wachstumsmedium (2.1.1.1.) kultiviert und in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die roten Anfärbungen stellen die LDL-Rezeptoren dar, oben links im Bild sind zwei Neurone zu sehen, deren Ausläufer sowohl mit dem Dendritenmarker MAP2 (grün) als auch mit dem LDL-Rezeptor (rot, schwer zu erkennen) angefärbt sind. Aufnahme in 630facher Vergrößerung.

Der LDL-Rezeptor konnte auf Cortezellen schwach ausgeprägt, aber dennoch in mehreren Bereichen lokalisiert detektiert werden. Auch wenn auf Abb.17 schwer erkennbar, so ließ er sich doch sowohl perinukleär in MAP2-negativen, nicht-neuronalen Zellen nachweisen, als auch – durch das starke Grün des MAP2-Antikörpers überdeckt – in den Neuriten der Neurone.

4.3.2 LDL receptor-related-Protein (LRP)

Das LDL receptor-related Protein konnte in differenzierten Neuro2A nachgewiesen werden (Abb.18). Es zeigte sich, daß dieser Rezeptor im Gegensatz zum LDL-Rezeptor

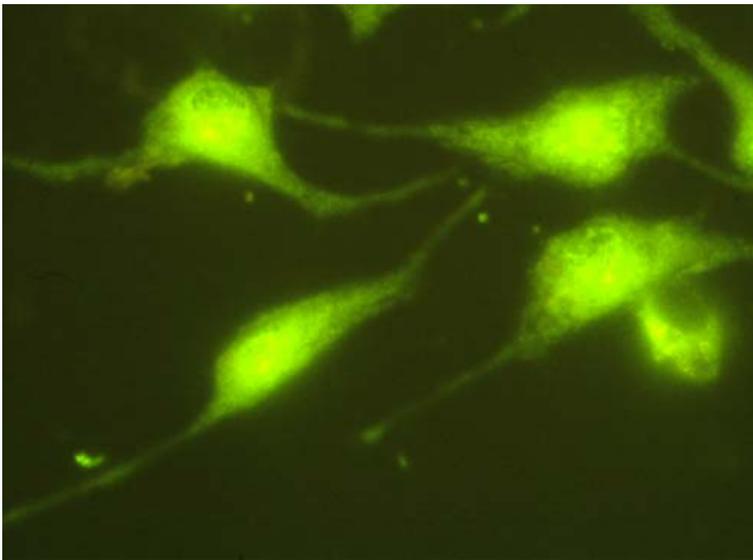


Abb.18: LRP auf Neuro2A (IIF)

Die dargestellten Zellen Neuro2A wurden nach 48 h in DMEM und danach weitere 72 h in DMEM + 2 % FCS + 20 μ M Retinsäure kultiviert. Fixierung erfolgte in Methanol.

Die LRP wurden durch indirekte Immunfluoreszenz grün angefärbt. Das Bild zeigt intensivere Grünfärbung der perinukleären Bereiche sowie im Cytoplasma, die Ausläufer sind jedoch ebenfalls angefärbt. Aufnahme in 630facher Vergrößerung.

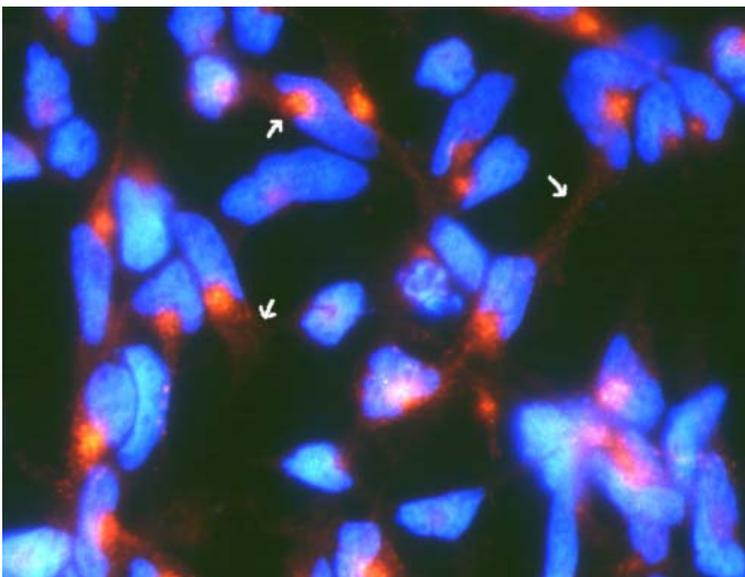


Abb.19: LRP auf LAN5 (IIF)

Die dargestellten LAN5 wurden fünf Tage in RPMI + 10 % FCS kultiviert und in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die LRP wurden durch indirekte Immunfluoreszenz rot angefärbt. Der obere Pfeil kennzeichnet eine perinukleäre Lokalisation des LRP, der untere und der rechte Pfeil eine in die Ausläufer ausstrahlende Lokalisation. Aufnahme in 630facher Vergrößerung.

hauptsächlich im Cytoplasma sowohl perinukleär als auch in den Neuriten lokalisiert ist.

Bei den LAN5 zeigte das LRP eine Lokalisation sowohl direkt um den Zellkern als auch ausstrahlend in die Ausläufer (weiße Pfeile in Abb. 19). Auffällig sind ein punktiertes

Muster sowie die deutliche Akkumulation der LRP in der Einbuchtung des hörnchenförmig gelappten Kernes, ähnlich der Lokalisation des LDL-Rezeptors (Abb.16). Wie schon bei Neuro2A und LAN5 zeigte sich bei den Cortexneuronen ebenfalls eine sowohl cytoplasmatische als auch perinukleäre Lokalisation der LRP (Abb.20). Kolokalisation von MAP2 und LRP auf Neuriten musste aufgrund seines insgesamt seltenen Auftretens eher bezweifelt werden, dagegen ließ jedoch die Doppelfärbung im Soma einiger Neurone eher eine Kolokalisation vermuten, wobei nicht klar ist, ob es sich hierbei um Rezeptoren einer oder um eine Überprojektion zweier Zellen handelt, evtl. eines Neurons und einer nicht-neuronalen Zelle.

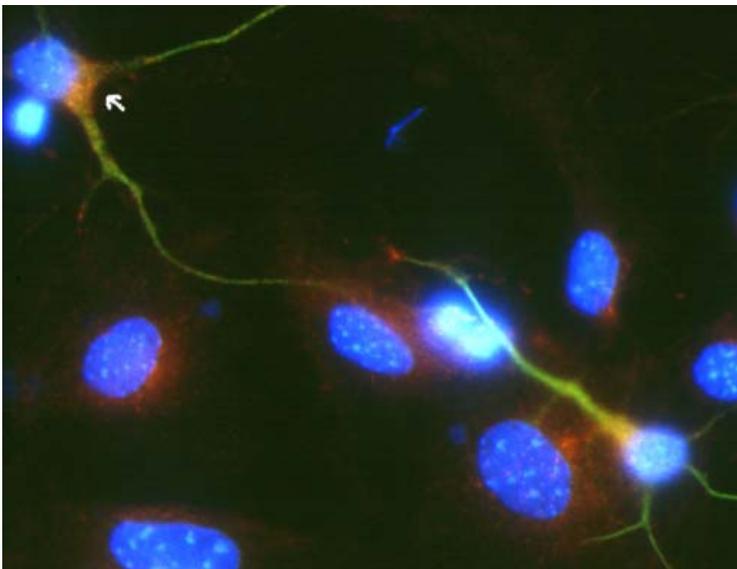


Abb.20: LRP (rot) und MAP2 (grün) auf Cortezellen (IIF)

Die dargestellten Zellen entstammen dem Cortex von Mäuseembryonen, sie wurden zunächst vier Stunden in Platingmedium und anschließend zehn Tage in Wachstumsmedium (2.1.1.1.) kultiviert und in 4 % Paraformaldehyd fixiert.

Links mit Pfeil gekennzeichnet befindet sich ein zweifarbiges Bereich, der auf eine Kolokalisation von MAP2 (grün) und LRP (rot) vermuten läßt. Ungeklärt ist die Zellzugehörigkeit dieser beiden Färbungen. Auch in den Neuriten gibt es teilweise Doppelfärbungen. Aufnahme in 630facher Vergrößerung.

4.3.3 Gp 330

Gp 330 konnte erwartungsgemäß weder bei Neuro2A noch bei LAN5 detektiert werden, da dieser Rezeptor nicht auf neuronalen Zellen vorkommt, sondern nur auf ependymalen Zellen. In der Cortexkultur (Abb.21) konnte so eine Unterscheidung zwischen MAP2-positiven Neuronen und gp330-negativen nicht-neuronalen Zellen getroffen werden. Das punktierte Muster von gp330 deutet auf eine intrazelluläre Lokalisation in Endosomen hin.

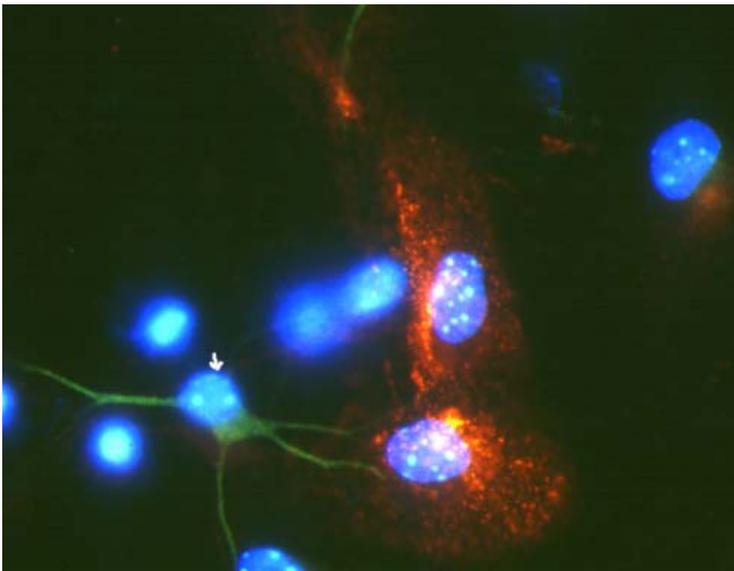


Abb.21: Gp330 (rot) und MAP2 (grün) auf Cortexzellen (IIF)

Die dargestellten Zellen entstammen dem Cortex von Mäuseembryonen, sie wurden zunächst vier Stunden in Platingmedium und anschließend zehn Tage in Wachstumsmedium (2.1.1.1.) kultiviert und in 4 % Paraformaldehyd fixiert.

Das Neuron ist mit einem weißem Pfeil gekennzeichnet.

Aufnahme in 630facher Vergrößerung.

4.3.4 MAP2 und Tau

Da sich bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode der primären Cortexzellkultur nicht Neurone, sondern auch Astrozyten und andere, nicht-neuronale Zellen in der Kultur befanden, sollten zunächst die Neurone mittels bestimmter Marker dargestellt werden. In dieser Arbeit wurden für die Markierung von Dendriten MAP2 und für die Markierung von Axonen Tau verwendet, Antikörper gegen Mikrotubuli-assoziierte Proteine, die ausschließlich neuronal exprimiert werden. In der Immunfluoreszenz zeigte sich starke Färbung von MAP2 (grün, Abb.22) sowie eine schwächere Färbung von Tau (rot, Abb.22).

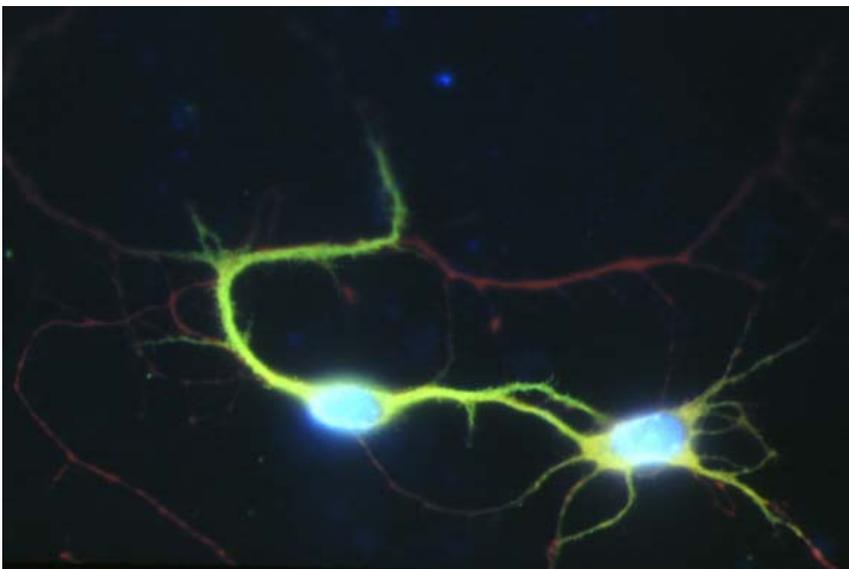


Abb.22: MAP2 (grün) und Tau (rot) auf Cortexzellen

Die grüne Färbung ist gleichmäßig über die Ausläufer verteilt, jedoch nicht über alle. Die Axone sind durch den Tau-Antikörper rot gefärbt, teilweise jedoch überlagern sich die Färbungen. Aufnahme in 630facher Vergrößerung.

Obwohl Tau als ausschließlich axonal beschrieben ist, ist eine gelbe Färbung der meisten Neuriten und des Somas zu erkennen, was auf eine Kolokalisation der beiden Proteine hindeutet. Diese Färbung ist sehr wahrscheinlich durch eine Kreuzreaktion des Tau-Antikörpers mit anderen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen zustande gekommen. Diese Möglichkeit wurde vom Hersteller des Antikörpers angegeben. MAP2 ist ausschließlich dendritisch lokalisiert. Bei dem roten Ausläufer handelt es sich vermutlich um das Axon, welcher offenbar parallel zu den Dendriten verläuft.

Auch Neuro2A und LAN 5 wurden in der Immunfluoreszenz mit Tau bzw. MAP 2 markiert.

Dabei zeigte sich auf Neuro2A der Dendritenmarker MAP 2 eher unspezifisch im gesamten Zytoplast, wobei eine leichte Mehranreicherung in der „Mündung“ zum Ausläufer der Zelle erkennbar ist. Ähnliches kann man bei Tau feststellen, hier scheint der Rezeptor in kleineren Gruppen angeordnet, vor allem an der Mündung zum Ausläufer und weniger im Zytoplast (Abb. 23, nächste Seite).

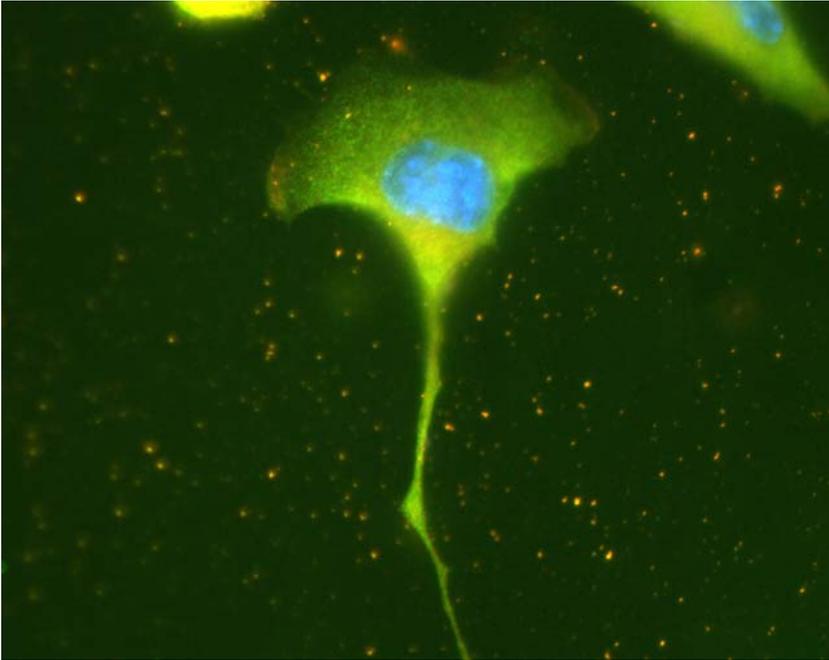


Abb.23: MAP2 (grün) und Tau (rot) auf Neuro2A

Die Präparation und Fixation der Zellen erfolgte wie zu den obigen Abbildungen beschrieben. Grün gefärbt ist MAP2 zu erkennen. Die Verteilung ist insgesamt eher unspezifisch mit geringer Betonung perinukleär, in der Ausläufermündung und im Ausläufer selbst. Der rot gefärbte Tau-Antikörper findet sich hauptsächlich in der Ausläufermündung. Aufnahme in 630facher Vergrößerung.

Auf den LAN 5 zeigt Tau ebenfalls angedeutet eine Grüppchenbildung, ebenso ist eine bevorzugte Lokalisation zu erkennen, in der man ein beginnendes Axon vermuten könnte. Die Verteilung der MAP 2 ist von deutlich ungerichteter Qualität im Zytosol, jedoch findet er sich ebenfalls perinukleär sowie in den bei diesen Zellen lediglich angedeuteten Ausläufermündungen (Abb. 24).

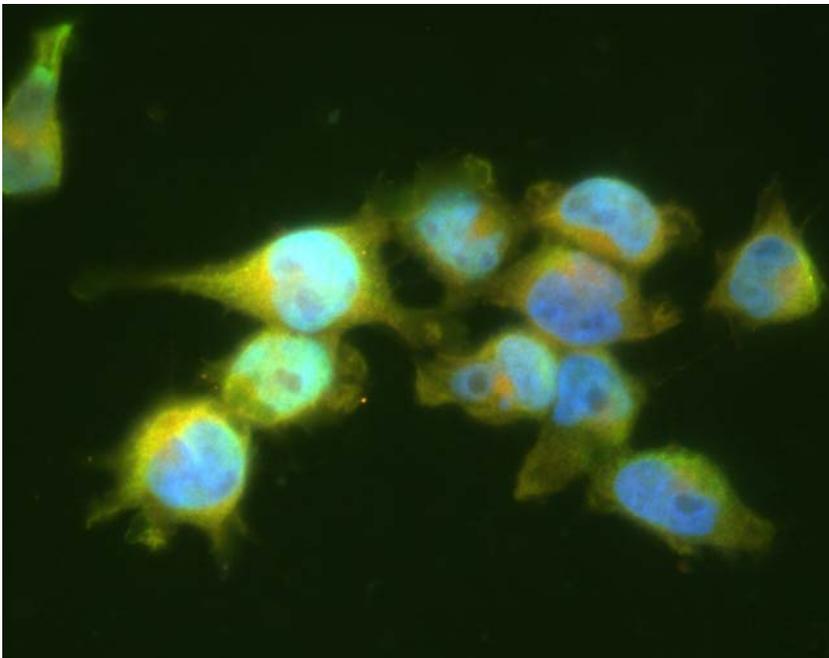


Abb. 24: MAP2 (grün) und Tau (rot) auf LAN 5

Die Präparation und Fixation der Zellen erfolgte wie zu den obigen Abbildungen beschrieben. MAP2 ist grün gefärbt zu erkennen. Wie in Abb.22 ist auch hier die Verteilung unspezifisch mit Betonung auf den perinukleären Bereich und eine angedeutete Ausläufermündung. Der Tau-Antikörper zeigt sich rot gefärbt vor allem im perinukleären Bereich und in der Ausläufermündung

5 DISKUSSION

5.1 Differenzierung der Neuroblastomzelllinien

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Neuroblastomzelllinien Neuro2A (Maus-) und LAN5 (Human-) in der Kultur so zu behandeln, daß sie einen phänotypisch den Neuronen ähnlichen Zustand erreichten. Dieses war zugleich Voraussetzung für die darauffolgenden Immunfluoreszenzversuche mit den drei Zellarten.

Bei der LAN5-Zelllinie trat die Differenzierung ohne weitere Zusätze bereits in serumhaltigem Medium (RPMI + 10% FCS) ein, REDDY et al. beschrieben bereits 1991 diese Zelllinie, ihr neuronähnliches Verhalten in o.g. Milieu und wiesen darüberhinaus sogar Nervenwachstumsfaktoren („nerve growth factors“) nach, welches die morphologische Nähe der LAN5 zu den Neuronen unterstreicht. Die Ausdifferenzierung der Neuro2A gestaltete sich zunächst als schwierig, denn weder die in 3.1.1. erwähnten Beschichtungsversuche brachten ein hinsichtlich der Ausdifferenzierung förderliches flaches Erscheinungsbild der Zellen, noch führten Versuche in der Variation der Serumkonzentration zu einer Bildung von Ausläufern. Die Ausläufer, die unter Weglassen des Serums entstanden, waren zu dünn und brüchig, um sie in der Immunfluoreszenz deutlich darstellen zu können, obwohl sie länger waren als die der letztendlich benutzten Differenzierungsform. Es ist zu vermuten, daß eine Inkubation der Zellen in einem Nährmedium, in dem kein Serum enthalten ist, dazu führt, daß die Zellen, statt sich zu vermehren, beginnen auszudifferenzieren. Diesen Umstand nutzten DE STROOPER et al. 1992, die von ihnen kultivierten Neuro2A bildeten nach 24 h in serumfreiem Medium Neuriten. In den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit starben die Zellen in einem Medium ohne Serumzusatz früher als im ursprünglich benutzten Medium (DMEM + 10% FCS). TAKATSUKA et al. bewiesen 1996 bei mehreren Zelllinien, die größtenteils normalem Epithel und Epithelialtumoren entstammten, daß Zusatz von all-trans-Retinsäure einen hemmenden Effekt auf die Proliferation und einen fördernden Effekt auf die Differenzierung vieler dieser Zellen hatte. Sie räumten jedoch ein, daß Retinsäure nicht in jedem Milieu effektiv sei, tatsächlich starben die Neuro2A in den Versuchen zur vorliegenden Arbeit in serumfreiem Medium kurz nach Zugabe der Retinsäure (analog zu Versuchen von DE STROOPER et al. (1992)), obwohl TAKATSUKA et al. ihre Versuche in serumfreiem Medium durchgeführt hatten. Ganz ohne Serum scheinen die Neuro2A nicht überleben zu können, zuviel Serum aber hemmt die Zellen hinsichtlich der

Differenzierung. Daher wurde die Konzentration des Serums von 10 % auf 2 % gesenkt, wonach die Zellen nach Gabe von Retinsäure Ausläufer bildeten.

Petroni et al. (1996) berichteten von einer erfolgreichen Differenzierung bei NG108-15, einer neuronalen Zelllinie, mit 1mM Dibutyryl Cyclo-AMP. Diese Differenzierung trat bei Neuro2A nur bedingt ein. Die Zellen bildeten zwar Ausläufer, die Zellkultur machte jedoch insgesamt morphologisch einen sehr inhomogenen Eindruck. Die Erkenntnis von FISCHER et al. (1985), daß Neuro2A (dort NB2a bezeichnet) nach Behandlung mit DB-cAMP lange bipolare und monopolare Prozesse bildeten, wurde bestätigt, auf Abb.6 sind nur bi- oder monopolare Prozesse zu erkennen. Bei den außerordentlich großen Zellen, die in dieser Kultur auftreten (3.1.1., Abb.6), handelt es sich wahrscheinlich um gliaähnliche Zellen, welches ebenfalls darauf hindeutet, daß die Differenzierung nur in einem nicht zufriedenstellenden Grad stattgefunden hat. Darüberhinaus zeigen einige Zellen mit Ausläufern mitotische Aktivität, die erstrebte Enddifferenzierung ist also eingetreten. Die entstandene „Verunreinigung“ in Form von kleinen runden Partikeln läßt auf einen insgesamt „gestreßten“ Zustand der Zellen schließen.

Ein differenzierter Zustand wurde bei Neuro2A in Anlehnung an die Differenzierungsversuche von RIBONI et al. (1995) mit der kombinierten Gabe von 20µm Retinsäure und 2% FCS zu DMEM erreicht. Diese Serumkonzentration bewirkte bei einigen Zellen die Bildung von Ausläufern, bei anderen Zellen wiederum konnte man mitotische Aktivität feststellen (3.1.1., Abb.7, 8). Damit war ein Zustand gewährleistet, in dem sich differenzierende Zellen auftraten, die über mehrere Tage in der Zellkultur lebten. Ob es sich bei diesen Zellen um enddifferenzierte Zellen handelte, kann man nicht mit Gewißheit sagen, sie verharrten jedoch nach anfänglichem Wachstum der Ausläufer tagelang in diesem Zustand, und die von EBNETH et al. (1998) als differenziert bezeichneten Neuro2A sehen den in dieser Arbeit dargestellten Zellen sehr ähnlich. EBNETH et al. erreichten die Differenzierung durch zweitägige Zugabe von 1µM Retinsäure in MEM + 0,1% FCS nach vorheriger Kultivierung in MEM + 10% FCS, welches zeigt, daß die in meinen Versuchen erarbeitete Möglichkeit, Differenzierung bei Neuro2A zu erreichen, nicht die einzige ist, aber aufgrund ihrer nach mehrfacher Durchführung verifizierten Ergebnisse eine ernstzunehmende. Desweiteren zeigen andere Studien, daß nicht nur mit Retinsäure und der Variation der Serumkonzentration Differenzierung bei Neuro2A erreicht werden kann, sondern auch durch Transfektion mit anschließender Überexpression des BM88 Antigens (MAMALAKI et al., 1995; GOMEZ et al., 1998), wobei die Differenzierung in Präsenz von Retinsäure bzw. Sucrose

(MAMALAKI et al., 1995) sogar beschleunigt wurde. Transfektion von GD3-Synthase cDNA in Neuro2A führt ebenso zur Differenzierung (KOJIMA et al., 1994; LIU et al., 1997) wie die Expression und Sekretion von ApolipoproteinE3 und E4 in Mausneuroblastomzellen (BELLOSTA et al., 1995). TSUJI et al. (1988b) erreichten Differenzierung bei Neuro2A durch Gabe von sowohl Sialyl-Bestandteilen, 8-Bromo cAMP, als auch GQ1b, ein Gangliosid. Dieses wiederum wurde als Promotor von Neuritenbildung in zwei Human-Neuroblastomzelllinien nachgewiesen (TSUJI et al., 1988a.; NAKAJIMA et al., 1986).

5.2 Mausneurone (Cortex) in der Zellkultur

Im Gegensatz zu den Mausneuroblastomzellen Neuro2A differenzierten die dem Cortex von Mäuseembryonen entstammenden Neurone, ohne einen Zusatz zu benötigen. Man muß davon ausgehen, daß die Empfindlichkeit (z.B. bezüglich Milieuveränderungen, Schwankungen wichtiger Parameter wie des CO₂-Gehaltes oder der Zusammensetzung des Mediums, Wechsel des Mediums) einer Zelle mit ihrem Differenzierungsgrad zunimmt, dementsprechend galt es, ein für die Neuronen geeignetes Medium zu finden, das sie so lange am Leben erhält, bis sie ihre Enddifferenzierung erreicht haben. Diese Voraussetzungen kann das in 2.1.1.1. beschriebene Wachstumsmedium erfüllen. Um Adhäsion der Zellen zu gewährleisten, wurden die Kulturböden zuvor mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet, LINDL und BAUER (1994) beschrieben diese Vorgehensweise bereits, die internationale Anerkennung gefunden hat (GOSLIN und BANKER, Seite 64; SERPINSKAYA et al., 1999; LEDESMA et al., 1998; CID-ARREGUI et al., 1995). Mehrfacher Wechsel des Wachstumsmediums hätte eine erhöhte Proliferationsrate nicht neuronaler Zellen zur Folge, desweiteren benötigten die Astrozyten gleichbleibendes Milieu, um die notwendigen Bedingungen für die Neuronen zu schaffen. Daher wurde das Medium nicht gewechselt. Dies bewährte sich bereits bei YAVIN und YAVIN (1980) und BARTLETT und BANKER (1984). Zusätzlich wurde nachgewiesen, daß Hippocampusneurone nach komplettem Mediumersatz degenerieren (GOSLIN und BANKER, Seite 63; ROSENBERG und DICHTER, 1989). Hippocampus- und Cortexneurone zeigen gleiches Verhalten in der Zellkultur und erfordern eine sehr ähnliche Behandlung (KOSIK und FINCH, 1987; LOWENSTEIN et al., 1994).

5.3 Neuro2A und LAN5 als Neuronenmodell ?

Die beiden Zelllinien Neuro2A und LAN5 wurden wie in 3.1.1. und 3.1.2. beschrieben in einen differenzierten Zustand gebracht, um eine mit den Neuronen annähernd gemeinsame phänotypische Basis zu schaffen, auf die die weiteren Versuche des qualitativen Nachweises von Rezeptoren sowie ihrer bildlichen Darstellung aufbauen konnten. Ein derartig direkter Vergleich zwischen diesen drei Zelltypen ist neuartig.

Als qualitativer Nachweis wurde der Western-Blot gewählt, die detektierten Rezeptoren sind Lipoproteinrezeptoren. Zu ihrer Lokalisation und Visualisierung diente die indirekte Immunfluoreszenz. Die Ergebnisse sind in 3.2. und 3.3. dargestellt.

Der LDL-Rezeptor konnte bei Neuro2A und LAN 5 sowie bei HUH7 detektiert werden, wobei die im Westernblot erhaltenen Banden bei allen drei Zelltypen etwas niedriger lagen als bei HUH7, eine Leberzelllinie, die bekannt für eine besonders hohe LDL-Rezeptor-Expression ist. ANTOHE et al. (1999) stellten den LDL-Rezeptor auf Endothelzellen dar, er lag hier wie bei HUH7 und LAN 5 bei 130 kD. Eine mögliche Ursache für die niedrigere Banden der Neuro2A wäre eine posttranslationale Modifikation des LDL-Rezeptors in den Neuroblastomzellen, die auch in Neuronen stattfindet (DEHOUCK et al., 1997), eventuell durch Veränderung der Rezeptoren durch Glykosylierung. Die Immunfluoreszenz unterstreicht die im Westernblot erhaltenen Ergebnisse, sowohl Neuro2A als auch LAN5 besitzen LDL-Rezeptoren, ihre Präsenz in Neuronen ist umstritten, sie wurden bislang in peripheren Nerven und in Schwanzzellen sowie in Astrozyten nachgewiesen (BOYLES et al., 1989; PITAS et al, 1987). Es bestehen Unterschiede zwischen der Lokalisation der LDL-Rezeptoren auf LAN5, Neuro2A und der Cortezzellkultur. Die Darstellung der Rezeptoren in Neuriten bzw. deren morphologischem Äquivalent – wie in der Cortezzellkultur (Abb.17)– gelang weder auf LAN5 noch auf Neuro2A. Sogar unter den beiden Neuroblastomzelllinien gab es Unterschiede, LDL-Rezeptoren scheinen auf Neuro2A eher membrannah (Abb.15), auf LAN5 jedoch perinukleär lokalisiert (Abb.16), allerdings ist es möglich, daß die Rezeptoren in den auf Abb.15 gezeigten noch ungenügend differenzierten Neuro2A bei Ausbildung von Ausläufern in diese mit hineinwandern. Es fanden sich jedoch im Rahmen des Versuchsspektrums sehr wenige Rezeptoren auf differenzierten Neuro2A.

Ein anderes Ergebnis ergab die Detektion von LRP. Während in LAN5 LRP bei 515 kD nachgewiesen werden konnte, war dies bei Neuro2A nicht möglich. Dennoch besitzen Neuro2A LRP, dies zeigen die Immunfluoreszenzergebnisse. Da der im Westernblot benutzte Antikörper gegen das humane Epitop von LRP gerichtet ist, kommt zu einer

positiven Reaktion bei LAN 5, bei den Mausneuroblastomzellen Neuro2A bleibt die Reaktion jedoch aus. BU et al. detektierten 1994 LRP im Rattenhirn bei ca. 515 kD, die 85 kD-Domäne (HERZ et al., 1990) wurde nicht dargestellt. Während für eine erfolgreiche Western-Blot-Detektion von LRP in den Neuronen der Zellbestand nicht ausreichte, gelang BROWN et al. (1997) im Northern-Blot die Expression von 15-kb LRP mRNA. In der Immunfluoreszenz ist LRP in allen Kompartimenten auf Neuro2A vorhanden, auch neuriten-ähnliche Bereiche wurden angefärbt (Abb.18), gleiches gilt für die Fluoreszenz auf LAN5 (Abb.19). Die Anfärbung von LRP auf Neuronen ist ebenfalls sowohl im Soma als auch in den Ausläufern zu erkennen. Während also der LDL-Rezeptor nicht vollständige Übereinstimmung in der Expression zeigt, scheint dies für LRP hingegen zu gelten.

Gp330, in der Literatur auch Megalin genannt, wurde bislang in Neuronen nicht nachgewiesen. Der Westernblot (Abb.13) zeigt in HUH7 und in LAN5 ein positives Ergebnis, nicht in Neuro2A. Für den Nachweis von gp330 im Westernblot in Neuronen war nicht genügend Zellmaterial vorhanden. Die Immunfluoreszenz brachte Aufschluß über das Vorhandensein und die Lokalisation von gp330 in der Cortexzellkultur, ausschließlich auf nicht-neuronalen Zellen gab es ein Signal des Antikörpers. Dieses Ergebnis wird von ZLOKOVIC et al. (1994) bestätigt, die in Ependymzellen der Hirnventrikel sowie im Endothel von Hirnkapillaren gp330 fanden, jedoch nicht in Astrozyten oder Neuronen. Das positive Ergebnis in LAN5 überrascht einerseits, auf der anderen Seite ist es jedoch auch Ausdruck dafür, dass es sich hierbei um entartete Zellen handelt, deren ungerichtete Differenzierung auch zu Bildung von gp330 führen kann. Neuro2A wiederum besitzen bzw. exprimieren kein gp330, negative Ergebnisse in Immunfluoreszenz und Westernblot bestätigen dies.

Der VLDL-Rezeptor konnte in der Immunfluoreszenz bei keiner der drei benutzten Zelllinien lokalisiert werden, auch in der Cortexzellkultur nicht. Der Grund hierfür ist weniger in einem Fehlen der Rezeptoren zu suchen als vermutlich eher in mangelnder Qualität des benutzten Antikörpers, denn die Präsenz von VLDL-Rezeptoren in Neuronen wurde bereits beschrieben (CHRISTIE et al., 1996), das Fehlen von VLDL-Rezeptoren in Astrozyten, Oligodendroglia und ependymalen Zellen ebenfalls (PAGE et al., 1998; TROMMSDORFF et al., 1999). Im Westernblot lässt sich der VLDL-Rezeptor lediglich in den LAN5 überzeugend nachweisen. Dieses spricht ebenfalls dafür, dass der benutzte Antikörper nicht für Versuche mit diesen Zellen geeignet zu sein scheint.

Am Beispiel der vier Lipoproteinrezeptoren – dem LDL-Rezeptor, LRP, gp330 und dem VLDL-Rezeptor – sollte die Frage erörtert werden, ob die mitosefähigen Zelllinien LAN5 und Neuro2A sich eignen, anstelle von Neuronen für Versuche genutzt zu werden. Die Zellkulturversuche (3.1.) zeigen, daß es durchaus möglich ist, die phänotypische Differenzierung von Neuroblastomzellen hervorzurufen, für die Detektion von Rezeptoren allerdings scheint dies nicht notwendig, denn auch in undifferenzierten Neuro2A wurden Lipoproteinrezeptoren detektiert (Abb.15). Die Westernblot-Versuche (3.2.) unterstreichen die Ähnlichkeit der beiden Zelllinien, sie helfen aber nicht bei der Beantwortung der Frage nach dem Neuronenmodell, der Proteingehalt der Cortexzellenlysate war für einen Vergleich zu gering. Die Immunfluoreszenz hingegen deutet an, daß es zwischen den beiden Neuroblastomzelllinien zwar tatsächlich Gemeinsamkeiten (LRP-Lokalisation), aber auch Unterschiede gibt, beispielsweise in der Beschaffenheit ihrer Zellkerne, oder in der Lokalisation des LDL-Rezeptors, auf Neuro2A deutlich membranständig, auf LAN5 perinukleär. Ein Vergleich dieser Zelllinien mit der Cortexzellkultur kann nicht zu einem eindeutigen Ergebnis führen, zu unterschiedlich waren die morphologischen Voraussetzungen, unter denen die Zellen in der Immunfluoreszenz verwendet wurden. Auf den Neuroblastomzelllinien war zwar die Lokalisation der Rezeptoren auf den Zellen möglich, auf Axonen oder Dendriten, wie es für einen Vergleich mit Neuronen wichtig gewesen wäre, jedoch nicht, MAP2 und Tau waren auf beiden Zelllinien zwar detektierbar, jedoch ist es auch möglich, dass hier eine Interaktion mit p24 stattfindet, einem Transmembranprotein, das eine hydrophile Region besitzt, die homolog zu Bindungsstellen von MAP2 und Tau zu sein scheint. Sogar ein erhöhtes Vorkommen von p24 mRNA wurde in mit Retinsäure differenzierten Neuro2A festgestellt (KADOTA et al., 1997).

Einen Vorteil bietet die Zelllinie dennoch: Im Gegensatz zur Cortexzellkultur, in der sich mehrere Zelltypen befinden, gibt es in der Zelllinie nur einen einzigen Zelltypen. Hinzu kommt, daß Neuroblastomzelllinien in der Zellkultur reproduzierbar sind, und die Möglichkeit der Ausdifferenzierung ist gegeben. Daher könnte man die Neuroblastomzelllinien gut für funktionelle Versuche verwenden, z.B. für metabolische Assays. Für Versuche, bei denen es auf die Morphologie der Zelle ankommt, jedoch nicht.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Lipoproteinstoffwechsel im ZNS ist bislang weitgehend ungeklärt. Die Detektion von Lipoproteinrezeptoren in Neuronen gelang bisher selten. Dennoch kommt der Aufklärung des Fettstoffwechsels im Zentralnervensystem eine große Bedeutung zu, eventuell haben Störungen im Lipoproteinmetabolismus Einfluß auf die Entstehung schwerer Krankheiten, wie zum Beispiel der Alzheimer Demenz.

Die vorliegende Arbeit teilte sich in drei Abschnitte – Die Etablierung konstanter Zellkulturbedingungen für Neuro2A, LAN5 und murine Cortexzellen, die Darstellung der in diesen Zellen befindlichen Lipoproteinrezeptoren im Westernblot, und als dritten Abschnitt die visuelle Darstellung der Rezeptoren in der indirekten Immunfluoreszenz.

Im ersten Teil wurden konstante Zellkulturbedingungen für die Differenzierung von Neuro2A etabliert. Optimales Gleichgewicht zwischen Wachstum und Differenzierung der Zellkultur wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium + 2 % fötalem Kälberserum + 20µM Retinsäure erreicht. LAN5 wuchsen und differenzierten sich in RPMI. Für die murinen Cortexzellen wurde neben der Zellkultur zusätzlich die Präparation der Zellen optimiert. Die chronologische Kombination zweier Medien auf der Basis von Minimum Essential Medium, jedoch mit verschiedenen Zusätzen, brachte optimales Wachstum bei der Cortexzellkultur. Im Westernblot wurden anschließend Lipoproteinrezeptoren – der LDL-Rezeptor, LRP, gp330 und der VLDL-Rezeptor detektiert, wobei wegen zu geringen Proteingehaltes in der Cortexzellkultur diese Zellen nicht geeignet waren. In LAN5 gelang der Nachweis aller vier Rezeptoren, in Neuro2A lediglich der Nachweis des LDL-Rezeptors, welches am ehesten daran lag, dass Antikörper benutzt wurden, die hauptsächlich gegen humane Epitope der Rezeptoren gerichtet waren. Der dritte Teil konzentrierte sich auf die visuelle Darstellung der oben genannten Lipoproteinrezeptoren. LDL-Rezeptor und LRP wurden auf allen drei Zelltypen nachgewiesen, die LDL-Rezeptoren wiesen unterschiedliche Lokalisation in den drei Zelltypen auf. LRP zeigte gleiche Lokalisation auf allen drei Zelltypen. Gp330 wurde nur in den Cortexzellen erfolgreich dargestellt, und dort lediglich auf nicht-neuronalen Zellen. Die Neuronen wurden mit Hilfe des Dendritenmarkers MAP2 von nicht-neuronalen Zellen unterschieden, Axone wurden mit dem mikrotubuli-assoziierten Antikörper Tau sichtbar gemacht. Auch LAN 5 und Neuro2A liessen sich mit MAP2 und Tau anfärben.

Die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse führten zu dem Schluss, daß Neuroblastomzelllinien zwar durchaus Neuronenkulturen ersetzen können, jedoch nicht in

allen Bereichen. Morphologisch ist nicht genügend Ähnlichkeit vorhanden, die funktionellen Gemeinsamkeiten reichen jedoch aus, um Neuroblastomzelllinien in Tests in diesem Bereich anstelle von Neuronen einsetzen zu können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aizawa H, Kawasaki H, Murofushi H, Kotani S, Sakai H (1989) A common amino acid sequence in 190 kDa microtubule-associated protein and tau for the promotion of microtubule assembly. *J Biol Chem* 264:5885-5890
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human-tau gene. *Biochemistry* 31:10626-10633
- Antohe F, Poznansky MJ, Simionescu M (1999) Low density lipoprotein binding induces asymmetric redistribution of the low density lipoprotein receptors in endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 78:401-415
- Augusti-Tocco G, Sato G (1969) Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:311-315
- Baas PW, Pienkowski TP, Kosik KS (1991) Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J Cell Biol* 115:1333-1344
- Bartlett WP, Hanker GA (1984) Electron microscopic studies of axonal and dendritic development by hippocampal neurons in culture. I. cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4:1944-1953
- Beisiegel U, Krapp A, Weber W, Olivecrona G (1994) The role of alpha2-m-receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism. *Ann NY Acad Sci* 737:53-69
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8342-8346
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341:162-164
- Bellosta S, Nathan BP, Orth M, Dong L-M, Mahley RW, Pitas RE (1995) Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J Biol Chem* 270:27063-27071
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1986) Differential localization of MAP2 and tau in mammalian neurons in situ. *Ann NY Acad Sci* 466:145-166
- Boyne LJ, Tessler A, Murray M, Fischer I (1995) Distribution of big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *J Comp Neurol* 358:279-293
- Brady RM, Zinkowski RP, Binder LI (1995) Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol of aging* 16:271-278
- Brandt R, Leger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131:1327-1340
- Brown MD, Banker GA, Hussaini IM, Gonias SL, Vandenberg SR (1997) Low density lipoprotein receptor-related protein is expressed early and becomes restricted to a somatodendritic domain during neuronal differentiation in culture. *Brain Res* 747:313-317
- Brown MS, Anderson RGW, Goldstein JL (1983) Recycling receptors the round trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* 32:663-667
- Brown MS, Goldstein JL (1976) Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 192:150-154
- Bu G, Williams S, Strickland DK, Schwartz AL (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor is a hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7427-7431
- Bu G, Maksymovitch EA, Nerbonne JM, Schwartz AL (1994) Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J Biol Chem* 269:18521-18528
- Bullock TH (1959) Neuron doctrine and electrophysiology. *Science* 129:997-1002
- Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461-463

- Caceres A, Mautino J, Kosik KS (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9:607-618
- Chapin SJ, Bulinski JC (1991) Non-neuronal 210x103 Mr microtubule-associated protein MAP4 contains a domain homologous to the microtubule-binding domains of neuronal MAP2 and tau. *J Cell Sci* 98:27-36
- Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Iverius PH, Williams SE, Strickland DK (1992) The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor binds and mediates catabolism of bovine milk lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 267:25764-25767
- Chatelet F, Brianti E, Ronco P, Roland J, Verroust P (1986) Ultrastructural localization by monoclonal antibodies of brush border antigens expressed by glomeruli. Extrarenal distribution. *A J Path* 122:500-511
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of low density receptor. *J Biol Chem* 265:3116-3123
- Cid-Arregui A, Parton RG, Simons K, Dotti CG (1995) Nocodazole-dependent transport, and brefeldin A-sensitive processing and sorting, of newly synthesized membrane proteins in cultured neurons. *J Neuroscience* 15:4259-4269
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116:227-247
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977b) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116:207-225
- Couchie D, Charriere-Bertrand C, Nunez J (1988) Expression of the messenger RNA for tau proteins during brain development and in cultured neurons and astroglial cells. *J Neurochem* 50:1894-1899
- Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RKH, Shelanski ML, Nunez J (1992) Primary structure of high-molecular-weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4378-4381
- Cummings RD, Kornfeld S, Schneider WJ, Hebgood KK, Tolleshaug H, Brown MS, Goldstein JL (1983) Biosynthesis of the N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 258:15261
- Davenport RW, Dou P, Rehder V, Kater SB (1993) A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature* 361:721-724
- Davis CG, Goldstein JL, Südhof TC, Anderson R, Russell DW, Brown MS (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 326:760-765
- Doll T, Meichsner M, Riederer BM, Honegger P, Matus A (1993) An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J Cell Sci* 106:633-639
- Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E-M, Mandelkow E (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum implications for alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143:777-794
- Forssmann WG, Heym C (1982) *Neuroanatomie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Garner CC, Brugg B, Matus A (1988) A 70-kilodalton microtubule-associated protein (MAP2c), related to MAP2. *J Neurochem* 50:609-615
- Georgieff IS, Liem RKH, Mellado W, Nunez J, Shelanski ML (1991) High-molecular-weight tau - preferential localization in the peripheral nervous system. *J Cell Science* 100:55-60
- Goedert M, Crowther RA, Garner CC (1991) Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends in Neurosci* 14:193-199
- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1992) Cloning of big tau-microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1983-1987
- Goldstein JL, Basu SK, Brown MS (1983) Receptor-mediated uptake of LDL in cultured cells. *Methods Enzymol* 98:241-(246)
- Goldstein JL, Brown MS (1977) Atherosclerosis: The Low-Density Lipoprotein Receptor Hypothesis. *Metabolism* 26:1257-1275
- Goldstein JL, Brown MS (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47

- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:333-337
- Golgi C (1903) *Opera Omnia*, Vols.I,II. U.Hoepli, Milan
- Gomez TM, Letourneau PC (1994) Filopodia initiate choices made by sensory neuron growth cones at laminin/fibronectin borders in vitro. *J Neurosci* 14:5959-5972
- Goslin K, Banker G (1991) *Culturing Nerve Cells*. MIT Press, Cambridge, MA, 453 pps.
- Greenwood JA, Johnson GVW (1995) Localization and situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp Cell Res* 220:332-337
- Griffin BA and Packard CJ (1994) Metabolism of VLDL and LDL subclasses. *Curr Opin Lipidol* 5:200-206
- Hamprecht B (1979) Neuronenmodelle. *Angew Chem* 88(7):211-223
- Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS (1990) Proteolytic processing of the 600 kD low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-golgi compartment. *Embo J* 9:1796-1776
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Mykeblot O, Gauspohl H, Stanley KK (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500 kDa liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J* 7:4119-4127
- Herz J, Beffert U (2000) Apolipoprotein E Receptors: Linking Brain Development and Alzheimer's Disease. *Nature Reviews Neuroscience* 1:51-58
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1:445-466
- Hobbs HH, Russel DW, Brown MS, Goldstein JL (1990) The LDL receptor locus and familial hypercholesterolemia mutational analysis of a membrane protein. *Ann Rev Genet* 24:133
- Huber G, Matus A (1984) Differences in the cellular distribution of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. *J Neurosci* 4:151-160
- Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A (1999) The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr* 19:141-172
- Jensen PH, Moestrup SK, Sottrup-Jensen L, Petersen CM, Gliemann J (1988) Receptors for alpha2-macroglobulin- and pregnancy zone protein-proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast. *Placenta* 9:463-477
- Kadota Y, Niiya A, Masaki R, Yamamoto A, Araki M, Taketani S (1997) A newly identified membrane protein localized exclusively in intracellular organelles of neurons. *Mol Brain Res* 46:265-273
- Kater SB, Rehder V (1995) The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr Opin Neurobiol* 5:68-74
- Kerjaschki D, Farquhar MG (1982) The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:5557-5562
- Kerjaschki D, Farquhar MG (1983) Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (gp330) in glomerular epithelial cells of normal lewis rats. *J Exp Med* 157:667-686
- Kerjaschki D, Ullrich R, Diem K, Pietromonaco S, Orlando RA, Farquhar MG (1992) Identification of a pathogenetic epitope involved in initiation of Heymann nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11179-11183
- Kindler S, Schwanke B, Schulz B, Garner CC (1990) Complete cDNA sequence encoding rat high and low molecular weight MAP2. *Nucleic Acids Res* 18:2822
- Knops J, Kosik KS, Lee G, Pardee JD, Cohen-Gould L, McConlogue L (1991) Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol* 114:725-733
- Koch S (2000) Charakterisierung der Lipoproteine in humanem Liquor cerebrospinalis und Analyse der Lipoprotein-Rezeptoren in murinen neuronalen Primärkulturen. *Biochem. Dissertation, Universitätsklinikum Hamburg*
- Kojima N, Kurosawa N, Nishi T, Hanai N, Tsuji S (1994) Induction of cholinergic differentiation with neurite sprouting by *de novo* biosynthesis and expression of GD3 and b-series gangliosides in Neuro2A-cells. *J Biol Chem* 269:30451-30456

- Kosik KS, Caceres A (1991) Tau protein and the establishment of an axonal morphology. *J Cell Sci Suppl* 15:69-74
- Kosik KS, Finch EA (1987) MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J Neurosci* 7:3142-3153
- Kounnas MZ, Chappell DA, Wong H, Argraves WS, Strickland DK (1995) The cellular internalization and degradation of hepatic lipase is mediated by low density lipoprotein receptor-related protein and requires cell surface proteoglycans. *J Biol Chem* 270:9307-9312
- Kounnas MZ, Morris RE, Thompson MR, Fitzgerald DJ, Strickland DK, Saelinger CB (1992) The α_2 -macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem* 267:12420-12423
- Kristensen T, Moestrup SK, Gliemann J, Bendtsen L, Sand O, Sottrup-Jensen L (1990) Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha₂-macroglobulin receptor. *FEBS Lett* 276:151-155
- Leclerc N, Baas PW, Garner CC, Kosik KS (1996) Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct patterns of process outgrowth. *Mol Biol of the Cell* 7:443-455
- Ledesma MD, Simons K, Dotti CG (1998) Neuronal polarity essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3966-3971
- Lee G, Cowan M, Kirschner M (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239:285-288
- Leonhardt H (1990) Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, Band 3 aus Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, Seite 238
- Lewis SA, Wang D, Cowan NJ (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 242:936-939
- Lindl T, Bauer J (1994) Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag Stuttgart-Jena-New York, 3. Auflage
- Liu H, Kojima N, Kurosawa N, Tsuji S (1997) Regulated expression system for GD3 synthase cDNA and induction of differentiation in Neuro2A cells. *Glycobiol* 7:1067-1076
- Liu Y, Jones M, Hingtgen CM, Bu G, Larabee N, Tanzi RE, Moir RD, Nath A, He JJ (2000) Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density-lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med* 2000 Dec.6(12):1380-7
- Lopresti P, Szuchet S, Pappasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI (1995) Functional implications for the microtubule-associated protein tau - localization in oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10369-10373
- Lowenstein PR, Morrison EE, Bain D, Hodge P, Preston CM, Clissold PM, Stow ND, McKee TA, Castro MG (1994) Use of recombinant vectors derived from herpes simplex virus 1 mutant tsK for short-term expression of transgenes encoding cytoplasmic and membrane anchored proteins in postmitotic polarized cortical neurons and glial cells *in vitro*. *Neuroscience* 60:1059-1077
- Lübke U, Six J, Villanova M, Boons J, Vandermeeren M, Ceuterick C, Cras P, Martin JJ (1994) Microtubule-associated protein tau epitopes are present in fiber lesions in diverse muscle disorders. *Am J Pathol* 145:175-188
- Moestrup SK, Christensen EI, Nielsen S, Jorgensen KE, Bjorn SE, Roigaard H, Gliemann J (1994) Binding and endocytosis of proteins mediated by epithelial gp330. *Ann New York Acad Sci* 737:124-133
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G (1992) Distribution of the alpha₂-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related in human tissues. *Cell Tissue Res* 269:375-382
- Murakami N, Ishiguro K, Ihara Y, Nonaka I, Sugita H, Imahori K (1995) Tau protein immunoreactivity in muscle fibers with rimmed vacuoles differs from that in regenerating muscle fibers. *Acta Neuropathol* 90:467-471
- Murphy DB, Borisy GG (1975) Association of high molecular weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2696-2700
- Nakajima J, Tsuji S, Nagai Y (1986) Bioactive gangliosides: analysis of functional structure of tetrasialo-ganglioside GQ1b which promotes neurite outgrowth. *Biochem Biophys Acta* 876:65-71

- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein-2. *Mol Brain Res* 1:271-280
- Novak S, Hiesberger T, Schneider WJ, Nimpf J (1996) A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J Biol Chem* 271:11732-11736
- Petroni A, Blasevich M, Papini N, La Spada P, Galli C (1996) Changes in arachidonic acid levels and formation and in lipid synthesis in the human neuroblastoma SK-N-BE during retinoic acid-induced differentiation. *J Neurochem* 67:549-556
- Probst A, Luginbühl M, Langui D, Ulrich J, Landwehrmeyer B (1993) Pathology of the striatum in progressive supranuclear palsy: Abnormal tau proteins in astrocytes and cholinergic interneurons. *Neurodegeneration* 2:183-193
- Ramón y Cajal S (1990) New ideas on the structure of the nervous system in man and vertebrates (English translation of *Les nouvelles idées sur la structure des centres nerveux chez l'homme et chez les Vertébrés* by N.Swanson and L.W.Swanson). MIT Press, Cambridge
- Raychowdhury R, Niles J, McCluskey RT, Smith JA (1989) Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL-receptor. *Science* 244:1163-1165
- Riboni L, Prinetti A, Brassi R, Caminiti A, Tettamanti G (1995) A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma Neuro2A cell differentiation. *J Biol Chem* 270:26868-26875
- Riederer B, Matus A (1985) Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6006-6009
- Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J (1998) Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest* 101:689-695
- Rosenberg PA, Dichter MA (1989) Extracellular cAMP accumulation and degradation in rat cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci* 9:2654-2663
- Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayashi Y, Yamamoto T (1994) Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene *J Biol Chem* 269:2173-2182
- Schubert D, Humphreys S, Baroni C, Cohn M (1969) In-vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:316-323
- Serpinskaya AS, Feng G, Sanes JR, Craig AM (1999) Synapse formation by hippocampal neurons from agrin-deficient mice. *Dev Biol* 205:65-78
- Sharma N, Kress Y, Shafit-Zagardo B (1994) Antisense MAP2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neuritic elongation in pre-existing neurites of rat-cortical neurons. *Cell Motil Cytoskeleton* 27:234-247
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Battey F, Behre E, McTigue K, Battey JF, Argraves WS (1991) Primary structure of alpha2-macroglobulin receptor-associated protein. *J Biol Chem* 266:13364-13369
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS (1990) Sequence identity between the alpha2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 265:17401-17404
- Südhof TC, Russel DW, Goldstein JL, Brown MS, Sanchez-Pescador R, Bell GI (1985) Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF-precursor. *Science* 228: 893
- Takahashi S, Kawarabayashi Y, Nakai T, Sakai T, Yamamoto T (1992) Rabbit very low density receptor: low density lipoprotein receptor-related protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9252-9256
- Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T (1995) Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 270:15747-15754
- Takatsuka J, Takahashi N, De Luca LM (1996) Retinoic acid metabolism and inhibition of cell proliferation: An unexpected liaison. *Cancer Res* 56: 675-678

- Tolleshaug H, Goldstein JL, Schneider WJ, Brown MS (1982) Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell* 30:715
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J (1999) Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97:689-701
- Tsuji S, Yamashita T, Nagai Y (1988a) A novel, carbohydrate signal-mediated cell surface protein phosphorylation: ganglioside GQ1b stimulates ecto-protein kinase activity on the cell surface of a human neuroblastoma cell line, GOTO. *J Biochem* 104:498-503
- Tsuji S, Yamashita T, Tanaka M, Nagai Y (1988b) Synthetic sialyl compounds as well as natural gangliosides induce neuritogenesis in a mouse neuroblastoma cell line (Neuro2A). *J Neurochem* 50:414-423
- Waldeyer HWG (1891) Über einige Forschungen im Gebiete der Anatomie des Centralnervensystems. *Dtsch Med Wochenschr* 17:1213-1218, 1244-1246, 1267-1269, 1287-1289, 1331-1332, 1352-1356
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:1858-1862
- West RR, Tenbarger KM, Olmsted JB (1991) A model for microtubule-associated protein 4 structure. Domains defined by comparisons of human, mouse, and bovine sequences. *J Biol Chem* 266:21886-21896
- Williams SE, Ashcom JD, Argraves WS, Strickland DK (1992) A novel mechanism for controlling the activity of alpha2-macroglobulin receptor/ low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 267:9035-9040
- Willnow TE, Goldstein JL, Orth K, Brown MS, Herz J (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem* 267:26172-26180
- Wolf BB, Lopes MBS, Van den Berg SR, Gonias SL (1992) Characterization and immunohistochemical localization of alpha2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. *Am J Pathol* 141:37-42
- Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russel DW (1984) The human LDL receptor: A cystein-rich protein with multiple Alu-sequences in its mRNA. *Cell* 39:27
- Yamamoto T, Takahashi S, Sakai J, Kawarabayasi Y (1993) The VLDLr: a second lipoprotein receptor that may mediate uptake of fatty acids into muscle and fat cells. *Trends Cardiovasc Med* 3:144-148
- Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y (1996) Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem* 271:24761-24768
- Yavin Z, Yavin E (1980) Survival and maturation of cerebral neurons on poly-l-lysine surfaces in the absence of serum. *Dev Biol* 75:454-459
- Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, Strickland DK, Brown D, Andres G, McCluskey RT (1994) Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha2-MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem* 42:531-542

8 DANKSAGUNG

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere Frau Prof. Beisiegel für ihre Geduld und ihre stete Bereitschaft zum unkomplizierten Gespräch, meinen Eltern für ihr Vertrauen, meiner Freundin Kerstin für ihre immer wieder aufmunternden Worte, Frau Christine Runge für ihre stets freundschaftliche Art und Hilfsbereitschaft, Herrn Lars Rellin für die unterhaltsame Beihilfe in den letzten Westernblots, Frau Stefanie Koch, ohne die ich das Ganze nie geschafft hätte, meinen Freunden, die alle auf ihre Art zum Erfolg beitrugen, Jacqueline, Masha, Svea, Kai, und last but not least allen MitarbeiterInnen des Stoffwechsellabors Prof. Beisiegel, die ich nicht nur beruflich sondern auch persönlich schätzen lernen durfte

Peer Anders

9 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Peer Anders
Geburtsdatum	14 02 1971
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

1976 – 1981	Grundschule Bargfeld-Stegen, Schleswig-Holstein
1981 – 1983	Kreisgymnasium Bargteheide, Schleswig-Holstein
1983 – 1987	Neues Gymnasium Eckhorst, Bargteheide
1987 – 1988	Kreisgymnasium Bargteheide
1988 – 1989	High School Solon, Ohio, USA als Austausch-Schüler
1989 – 1991	Kreisgymnasium Bargteheide
10/1991 – 11/2000	Studium der Humanmedizin am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf
8/1995	ärztliche Vorprüfung (Note 3)
08/1996	1 Staatsexamen (Note 4)
03/1999	2 Staatsexamen (Note 3)
11/2000	3 Staatsexamen (Note 3)
10/1999 – 12/1999	PJ Dermatologie AK St Georg Hamburg
12/1999 – 02/2000	PJ Dermatologie Beth Israel Medical Center des Albert Einstein College of Medicine in New York City, USA
02/2000 – 06/2000	PJ Innere Medizin Universitätskrankenhaus HH-Eppendorf
06/2000 – 10/2000	PJ Chirurgie Port of Spain General Hospital in Port of Spain, Trinidad

Ausgeübte Tätigkeiten

1993 – 2000	Arbeit als studentische Aushilfskraft im Heinrich-Sengelmann Krankenhaus (Psychiatrie) der Alsterdorfer Anstalten in Bargfeld-Stegen, Schleswig-Holstein
seit 02/2001	Arbeit als Arzt im Praktikum und als Assistenzarzt in der Inneren Medizin im Allgemeinen Krankenhaus HH-Barmbek, Hamburg

10 ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe

Peer Anders