

---

# Funktion der MAPKAP Kinase 2 bei der Neurodegeneration und neuronalen Depolarisation

---

- Untersuchungen in Modellen für Parkinson und Epilepsie -

## *Dissertation*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat

genehmigte Dissertation  
von  
Diplom-Biochemiker

**Tobias Thomas**  
geboren am 01.04.1975 in Bremen

2009

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Gaestel  
Zentrum Biochemie  
Institut für Physiologische Chemie  
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Alves  
Zentrum Biochemie  
Institut für Biophysikalische Chemie  
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 14.08.2009

„Fallen ist keine Schande, aber Liegenbleiben.“  
Sprichwort

„Der Weg zum Ziel ist steinig und schwer. Doch  
mit etwas Geschick kann man aus den Steinen,  
die einem im Weg liegen, eine Brücke bauen.“

Unbekannter Verfasser





## Zusammenfassung

Eine lokale Entzündungsreaktion in der vom Neuronensterben betroffenen Hirnregion ist ein Kennzeichen vieler neurologischer und neurodegenerativer Erkrankungen. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MK2) spielt eine wichtige Rolle bei der Zytokinproduktion und der Apoptose von Zellen. In dieser Arbeit konnte nicht nur der Mechanismus, über den MK2 bei der Neurodegeneration beteiligt ist, aufgedeckt sondern auch eine mögliche neue Funktion von MK2 bei der neuronalen Depolarisation beschrieben werden.

In primären Neuron-Glia-Mischkulturen aus murinem embryonalem Mittelhirn konnte eine MK2-abhängige Produktion der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-6 und KC sowie von Stickstoffmonoxid (NO) nachgewiesen werden. Als Folge einer geringeren Synthese dieser Stoffe wiesen MK2-defiziente Kulturen nach LPS-Stimulation eine geringere Degeneration dopaminerger Neurone auf. Inhibition der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) oder Abfangen des produzierten NO führte zu einer primär NO-vermittelten Apoptose dieser Neurone. Eine MK2-Beteiligung beim neuronalen Zelltod ließ sich durch Behandlung von Neuronenangereicherten Kulturen mit einem NO-Donor nicht nachweisen. *In vivo* konnte in dem MPTP-Mausmodell für die Parkinsonsche Erkrankung sowohl eine reduzierte Neuroinflammation als auch eine geringere Degeneration dopaminerger Mittelhirn-Neurone belegt werden. Nach MPTP Behandlung wiesen MK2<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte craniale Expression an TNF $\alpha$  und iNOS auf. Übereinstimmend zu den *ex vivo* Mischkultur-Experimenten konnte im Mittelhirn von MK2<sup>-/-</sup> Mäusen eine größere Anzahl dopaminerger Neurone nachgewiesen werden.

In dem Kainsäure (KA)-induzierten Tiermodell für Epilepsie konnte eine Beteiligung von MK2 bei der Degeneration von Neuronen im Hippocampus nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass MK2-defiziente Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen zwei Tage nach KA-Injektion eine größere Anzahl an Neuronen in der hippocampalen Pyramidenschicht und im Gyrus dentatus aufwiesen. In *in vitro* Untersuchungen zur Depolarisation von Neuronen wurde sowohl eine MK2-Aktivierung als auch eine Aktivierung der MK2-regulierenden Proteinkinase p38 nachgewiesen. Expressionsstudien zeigten eine Induktion der mRNA- und Proteinsynthese ausschließlich von MK2 innerhalb der p38-MK2-Signalkaskade. Diese Befunde weisen auf eine zentrale Bedeutung von MK2 innerhalb der durch den p38 MAPK-Signalweg vermittelten neuronalen Depolarisation hin.

*Schlagwörter: Neurodegeneration – neuronale Depolarisation - Signaltransduktion*

## Abstract

A local inflammatory response in the brain around dying neurons is a hallmark of several neurological and neurodegenerative diseases. The mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK2) has a well documented role in cytokine-production and apoptosis. In this study, the mechanism by which MK2 participates in neurodegeneration and a possible new function of MK2 in the depolarization of neurons are described.

In primary embryonic neuron-glia-cocultures from midbrain the production of the cytokines TNF $\alpha$ , IL-6 and KC as well as nitric oxide (NO) was found to be MK2-dependent. As a result of a decreased level of these substances in MK2-deficient cultures, dopaminergic neurons were more resistant to LPS-induced degeneration. Inhibition of the inducible form of NO-synthase (iNOS) or incubation with a NO scavenger showed that neuronal apoptosis was mainly NO-mediated. MK2 was not involved in the neuronal cell death, what was demonstrated by an incubation of neuron-enriched cultures with the NO-donor SNP. In the MPTP mouse model for Parkinson's disease the reduced neuroinflammation as well as less degeneration of the dopaminergic neurons in the midbrain could be demonstrated *in vivo*. After MPTP treatment MK2-deficient mice showed a reduced expression of TNF $\alpha$  and iNOS in the brain. Consistent with the *ex vivo* coculture experiments in the midbrain of MK2-deficient mice more dopaminergic neurons survived.

In the kainate-induced animal model for epilepsy MK2 was also involved in the degeneration of neurons in the hippocampus. Two days after kainate injections MK2-deficient mice exhibit a larger number of neurons in the hippocampal pyramidal layer and the gyrus dentatus. After neuronal depolarization *in vitro* the activity of MK2 as well as p38, the upstream kinase of MK2, could be found. Furthermore expression studies revealed a specific induction of MK2 mRNA and protein synthesis within the p38-MK2-signal transduction. These results suggest a central role of MK2 in the p38 pathway-mediated neuronal depolarization.

*Keywords: neurodegeneration – neuronal depolarization – signal transduction*

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>II</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Die Signaltransduktion der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK).....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Der p38 MAPK Signalweg .....	3
1.1.2. Die Proteinkinase MK2.....	7
1.1.2.1. Struktur, Expression und Aktivierung .....	7
1.1.2.2. Substrate und Funktionen .....	9
1.1.2.3. MK2 bei der Pathogenese von Erkrankungen .....	14
<b>1.2. Zellen des Gehirns und ihre Funktionen .....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Neurone.....	15
1.2.2. Makroglia (Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen) .....	16
1.2.3. Mikroglia .....	18
1.2.3.1. Neuroinflammation - Die Entzündungsreaktion im Gehirn.....	19
<b>1.3. Morbus Parkinson .....</b>	<b>21</b>
1.3.1. Krankheitsformen .....	21
1.3.2. Pathophysiologie, Symptomatik und Therapie .....	22
1.3.3. Das MPTP-Tiermodell.....	24
1.3.3.1. Wirkungsweise .....	25
1.3.3.2. Apoptose vs. Neuroinflammation.....	27
<b>1.4. Epilepsie.....</b>	<b>28</b>
1.4.1. Definition .....	28
1.4.2. Neuronale Depolarisation .....	29
1.4.3. Synaptische Übertragung und Exzitotoxizität.....	30
1.4.4. Das Kainsäure-Tiermodell .....	32
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1. Arbeiten mit Tieren .....</b>	<b>34</b>
2.1.1. Tiere.....	34
2.1.2. Tierhaltung.....	35
2.1.3. Verpaarung von Mäusen .....	36
2.1.4. Plug-Test.....	36
2.1.5. Präparation von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen.....	37
2.1.6. Genotypisierung.....	37
2.1.7. Tierversuche.....	39
2.1.7.1. Injektion von MPTP bzw. Kainsäure.....	39
2.1.7.2. Rotarod-Test.....	40
2.1.7.3. Krampfverhalten.....	41
2.1.8. Tötung von Mäusen .....	43
2.1.9. Präparation von Mausembryonen .....	44

<b>2.2. Zellkultur.....</b>	<b>45</b>
2.2.1. Inaktivierung von Serum.....	45
2.2.2. Generierung von ex vivo Kulturen.....	45
2.2.2.1. Neuron-Glia Cokulturen aus embryonalem Mesencephalon.....	45
2.2.2.2. Neuronen angereicherte Kulturen.....	46
2.2.3. Kultivierung von Zelllinien.....	47
2.2.3.1. PC12 Zellen.....	48
2.2.3.2. RAW 262.3 Zellen .....	48
2.2.3.3. Passage von C17.2, MEF und SH-SY5Y Zellen .....	48
2.2.3.4. HEK293-Zellen .....	49
2.2.4. Behandlung von Zellen mit Substanzen.....	49
2.2.4.1. Depolarisation von PC12 Zellen und Behandlung mit Forskolin.....	49
2.2.4.2. Stimulation von Makrophagen und Cokulturen mittels LPS.....	49
2.2.4.3. Induktion von Apoptose (SNP, TNF).....	50
2.2.4.4. Behandlung der Zellen mit Inhibitoren.....	50
2.2.5. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien .....	50
2.2.6. Beschichtung mit Poly-L-Lysin .....	51
2.2.7. WST-1 Assay.....	51
2.2.8. Kristallviolett-Färbung.....	51
2.2.9. Trypanblau-Färbung .....	52
<b>2.3. Proteinbiochemische und immunologische Methoden .....</b>	<b>52</b>
2.3.1. Herstellung von Zelllysaten .....	52
2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	53
2.3.3. Westernblot.....	53
2.3.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	53
2.3.3.2. Proteintransfer und Immundetektion .....	55
2.3.3.3. Membranstripping .....	56
2.3.4. Immunpräzipitation.....	56
2.3.5. Kinase-Assay .....	57
2.3.6. Trocknung von Acrylamid-Gelen im Vakuum .....	58
2.3.7. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	58
2.3.8. Bestimmung der Proteinhalbwertszeit mittels Cycloheximid .....	58
<b>2.4. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>59</b>
2.4.1. Isolierung von RNA.....	59
2.4.2. Konzentrationsbestimmung von RNA .....	59
2.4.3. Agarose-Gelelektrophorese.....	60
2.4.4. Northernblot.....	62
2.4.4.1. Transfer von RNA auf Nylonmembran .....	62
2.4.4.2. Generierung der DNA-Hybridisierungssonde .....	62
2.4.4.3. Hybridisierung und Detektion .....	63
<b>2.5. Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>63</b>
2.5.1. Immunzytochemie.....	63
2.5.2. Immunhistochemie.....	64
2.5.2.1. Perfusion und Herstellung der Gefrierschnitte .....	64
2.5.2.2. Immunhistochemische Färbung.....	65
2.5.3. High-Affinity [3H]Dopamine Uptake Assay .....	65
2.5.4. Nitrite Assay .....	66

<b>3. PUBLIZIERTE ERGEBNISSE .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1. Publikation 1 .....</b>	<b>67</b>
MAPKAP kinase2-deficiency prevents neurons from neuronal cell death by reducing neuroinflammation – relevance in a mouse model of Parkinson’s disease	
<b>3.2. Publikation 2 .....</b>	<b>82</b>
MAP-kinase-activated protein kinase 2 expression and activity is induced after neuronal depolarization	
<b>3.3. Publikation 3 .....</b>	<b>96</b>
Nucleofection is the most efficient nonviral transfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephali with no changes in cell composition or dopaminergic fate	
<b>4. UNPUBLIZIERTE ERGEBNISSE.....</b>	<b>113</b>
<b>4.1. Die Anzahl an Astroglia ist nicht reduziert in LPS-stimulierten Mischkulturen.....</b>	<b>113</b>
<b>4.2. NO wird von Glia, nicht von Neuronen, produziert .....</b>	<b>115</b>
<b>4.3. TNF<math>\alpha</math> löst keinen neuronalen Zelltod aus.....</b>	<b>115</b>
<b>4.4. In TTP-/- Kulturen ist die NO-Produktion erhöht .....</b>	<b>117</b>
<b>4.5. MK2-defiziente Kokulturen produzieren weniger NO nach MPTP-Behandlung.....</b>	<b>118</b>
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>119</b>
<b>5.1. Rolle von MK2 bei neurodegenerativen Erkrankungen .....</b>	<b>119</b>
5.1.1. MK2 ist wichtig für die Neuroinflammation.....	119
5.1.2. MK2 spielt keine Rolle bei der neuronalen Apoptose .....	121
5.1.3. MK2 bei Parkinson .....	122
<b>5.2. Rolle von MK2 bei der neuronalen Depolarisation .....</b>	<b>124</b>
5.2.1. Expression von MK2 nach Depolarisation und erhöhtem intrazellulärem cAMP-Level .....	124
5.2.2. MK2 und die Funktion der Neurone .....	127
5.2.3. MK2 bei Epilepsie .....	129
<b>6. SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>131</b>
<b>7. LITERATUR .....</b>	<b>133</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>150</b>
<b>8.1. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>8.2. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>151</b>
<b>8.3. Danksagungen.....</b>	<b>152</b>
<b>8.4. Publikationsliste.....</b>	<b>153</b>
<b>8.5. Erklärung .....</b>	<b>154</b>
<b>8.6. Lebenslauf .....</b>	<b>155</b>

### Abkürzungsverzeichnis

Die folgende Liste enthält keine Abkürzungen oder Einheiten, die in der Biochemie oder Molekularbiologie allgemein gebräuchlich sind (wie z.B.  $\mu\text{l}$ , min, DNA, mRNA, Guanin, ATP, usw.) oder die zu den SI-Einheiten (Système Internationale d'Unités) zählen.

-/- [ <sup>3</sup> H]	<i>knockout</i> Tritium
ARE	AU-reiche Elemente
CA	Cornu ammonis, Körnerschicht
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
CaMK II	Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	cyclic adenosine monophosphat
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DA	Dopamin
ERK	Extrazellular-Signal regulierte Kinase
Fsk	Forskolin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hsp	Hitzeschockprotein
i.c.v.	intracranial ventrikulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JNK	cJun NH <sub>2</sub> -terminale Kinase
K <sup>+</sup>	Kaliumion
KA	Kainsäure, Kainat
KC	<i>keratinocyte-derived chemokine</i>
KCl	Kaliumchlorid
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monomethyl-L-arginin
LPS	Lipopolysaccharid

<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>MAPKK oder MKK</b>	MAPK Kinase
<b>MAPKKK oder MKKK</b>	MAPK Kinase Kinase
<b>MEF</b>	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
<b>MIP1<math>\alpha</math></b>	Makrophagen inflammatorisches Protein
<b>MNK</b>	<i>MAP kinase interacting kinase</i>
<b>MK2/3</b>	MAPK-aktivierte Proteinkinase 2/3
<b>MPP<sup>+</sup></b>	1-Methyl-4-phenyl-pyridinium
<b>MPTP</b>	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
<b>MSK</b>	Mitogen- und stressaktivierte Proteinkinase
<b>NADPH</b>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
<b>NES</b>	<i>nuclear export signal</i> , Kernexportsignal
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-aspartat
<b>NLS</b>	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NOS</b>	NO-Synthase
<b>PD</b>	<i>Parkinson's disease</i> , Parkinsonsche Erkrankung
<b>PC12</b>	Pheochromocytoma 12
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PTIO</b>	2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxo-3-oxid
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies
<b>s.c.</b>	subcutan
<b>SE</b>	Status epilepticus
<b>SNARE</b>	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
<b>SNP</b>	sodium nitroprusside
<b>SNpc</b>	Substantia nigra pars compacta
<b>SOCS</b>	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
<b>TAO</b>	<i>thousand and one aminoacid</i>
<b>TH</b>	Tyrosinhydroxylase
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>TTP</b>	Tristetraprolin
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>uPA</b>	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
<b>UTR</b>	untranslatierte Region
<b>u.U.</b>	unter Umständen
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VCAM-1</b>	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
<b>WST-1</b>	<i>water-soluble tetrazolium salt-1</i>
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

### 1. Einleitung

#### 1.1. Die Signaltransduktion der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

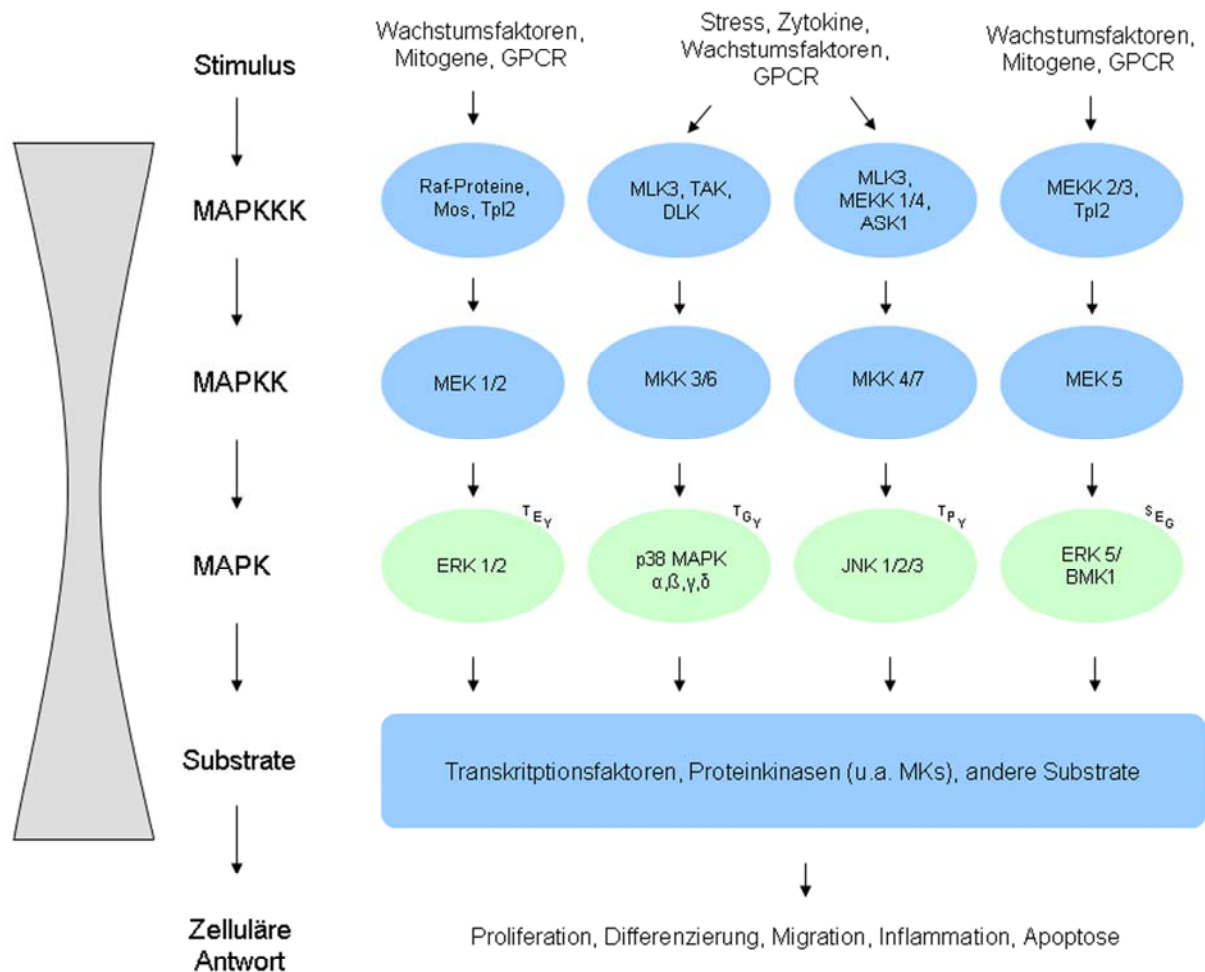
Zellen reagieren auf äußere Reize durch Aktivierung spezifischer intrazellulärer Programme, zu denen auch die Signalkaskaden der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs, Singular: MAPK) zählen. MAPKs sind evolutionär konservierte Protein-Serin/Threonin-Kinasen, die diverse zelluläre Prozesse von der Genexpression, Mitose (Proliferation) und Stoffwechsel bis hin zu Migration, Differenzierung oder dem programmierten Zelltod regulieren. Aktuell wird die Familie der MAPKs in vier Mitglieder unterteilt (siehe Abbildung 1). Zu den klassischen MAPKs zählen die Extrazellulär-Signal regulierten Kinasen (ERKs) 1 und 2 (ERK1/2), die cJun-NH<sub>2</sub>-terminalen Kinasen (JNKs) 1, 2, 3, sowie p38 mit seinen Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  (Kyriakis&Avruch 2001). Ihnen gemeinsam ist ein konserviertes Motiv, an denen sie durch Phosphorylierung an einem Threonin- und Tyrosinrest aktiviert werden (TXY-Motiv). Die Proteinkinase ERK5, auch als Big-MAP kinase (BMK) 1 bezeichnet, unterscheidet sich von den drei klassischen MAPKs in diesem Aktivierungsmotiv (verändert zu SEG-Motiv) und wird deshalb als atypische MAPK bezeichnet. Des Weiteren zählen die Proteinkinasen ERK3 (Boulton *et al.* 1991, Zhu *et al.* 1994), ERK4 (Gonzalez *et al.* 1992), ERK7 (Abe *et al.* 2001) und ERK8 (Abe *et al.* 2002) ebenfalls zu der Familie der MAPKs. Allerdings ist über deren Signalkaskade nichts Genaueres bekannt. Am besten untersucht ist die Gruppe der klassischen MAPKs. Diese können durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden. Im Allgemeinen werden ERK1 und ERK2 bevorzugt durch mitogene Stimuli und Wachstumsfaktoren aktiviert, während die JNKs und p38 hauptsächlich auf zellulären Stress, wie osmotischer Schock, UV-Strahlung oder Zytokine reagieren (Pearson *et al.* 2001).

Jeder der MAPK-Signalwege ist aus einem Modul von drei aufeinander folgenden Proteinkinasen aufgebaut: einer MAPK, einer MAPK-Kinase (MAPKK oder MKK) und einer MKK-Kinase (MAPKKK oder MKKK). Die MKKKs sind Protein-Serin/Threonin-Kinasen und werden durch Phosphorylierung oder Interaktion mit einem kleinen GTP-bindenden Protein der Ras/Rho Superfamilie aktiviert (Dan *et al.* 2001, Kolch 2000). Nach Aktivierung phosphorylieren MKKKs die dualspezifischen MKKs, welche daraufhin MAPKs aktivieren. Eine zweifache Phosphorylierung der MAPKs durch eine MKK ist notwendig für eine Konformationsänderung, welche deren Substratbindung und die enzymatische Aktivität erhöht. Aktivierte MAPK können sowohl in den Zellkern migrieren als auch im Zytosol ihr



Signal weiter leiten. Einmal aktiviert, phosphorylieren MAPKs ihre Substrate an Serin- und Threonin-Resten. Die Substratspezifität der MAPKs wird neben speziellen Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Interaktion mit sogenannten *scaffold*-Proteinen erhöht. Diese *scaffold*-Proteine organisieren spezifische Module durch gleichzeitige Bindung mehrerer Komponenten. Die vielfältigen Funktionen der MAPKs üben diese durch Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten aus, zu denen Phospholipasen, Transkriptionsfaktoren, Zytoskelettproteine oder andere Proteinkinasen zählen. Die MAPK-Signalkaskaden induzieren ebenfalls die Aktivierung und Expression von dual-spezifischen Phosphatasen (DUSP), welche die MAPK dephosphorylieren können (Farooq&Zhou 2004). Über diesen negativen *feedback* werden Intensität und Dauer der MAPK-Signalwege-Aktivierung kontrolliert.

Die Signaltransduktion der MAPKs lässt sich zusammenfassen als eine Reihe von aufeinanderfolgenden Phosphorylierungen durch die ein extrazelluläres Signal bis zum Zellkern weitergeleitet wird. Hierbei findet eine Integration des Signals statt, da mehrere MKKKs eine MKK phosphorylieren können. Die Signalweitergabe von den MKKs zu den MAPKs wiederum ist spezifisch. Da die MAPKs oft Substrate miteinander teilen, sind die Signalwege untereinander verschaltet, so dass ein *crossstalk* der verschiedenen MAPK-Signalwege stattfinden kann. So führt Arsenit als starker Stress-Stimulus z.B. zuerst zur Aktivierung der p38-Signalkaskade und darüber zur ERK1/2 Aktivierung (Ludwig *et al.* 1998). Eine Überexpression von MKK6 und p38 erhöht die ERK1/2-Aktivität, wohingegen eine Blockade von p38 durch dominant negative-Mutanten oder durch einen SB-Inhibitor die ERK1/2-Aktivität herabsetzt.



**Abbildung 1: Überblick über die Signalkaskaden der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs).** Die Signalwege der MAPKs lassen sich als eine Folge von Kinase-Phosphorylierungen beschreiben, bei denen die Signalweitergabe von den MKKs zu den MAPKs spezifisch erfolgt. Dadurch nehmen die MAPKs die zentrale Rolle in diesen Signalkaskaden ein. Unterschiedliche MKKKs können eine MAPKK durch Phosphorylierung aktivieren, die wiederum nur eine bestimmte MAPK ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. Hierdurch kommt es zur Signalintegration (symbolisiert durch graue Figur links). Die MAPKs wiederum besitzen unterschiedliche Substrate, über die sie an fast allen zellulären Prozessen beteiligt sind. Es gibt auch MKKKs (z.B. MLK3), die mehrere MKKs phosphorylieren können, was in einer parallelen Aktivierung unterschiedlicher MAPK-Signalwege resultiert.

## 1.1.1. Der p38 MAPK Signalweg

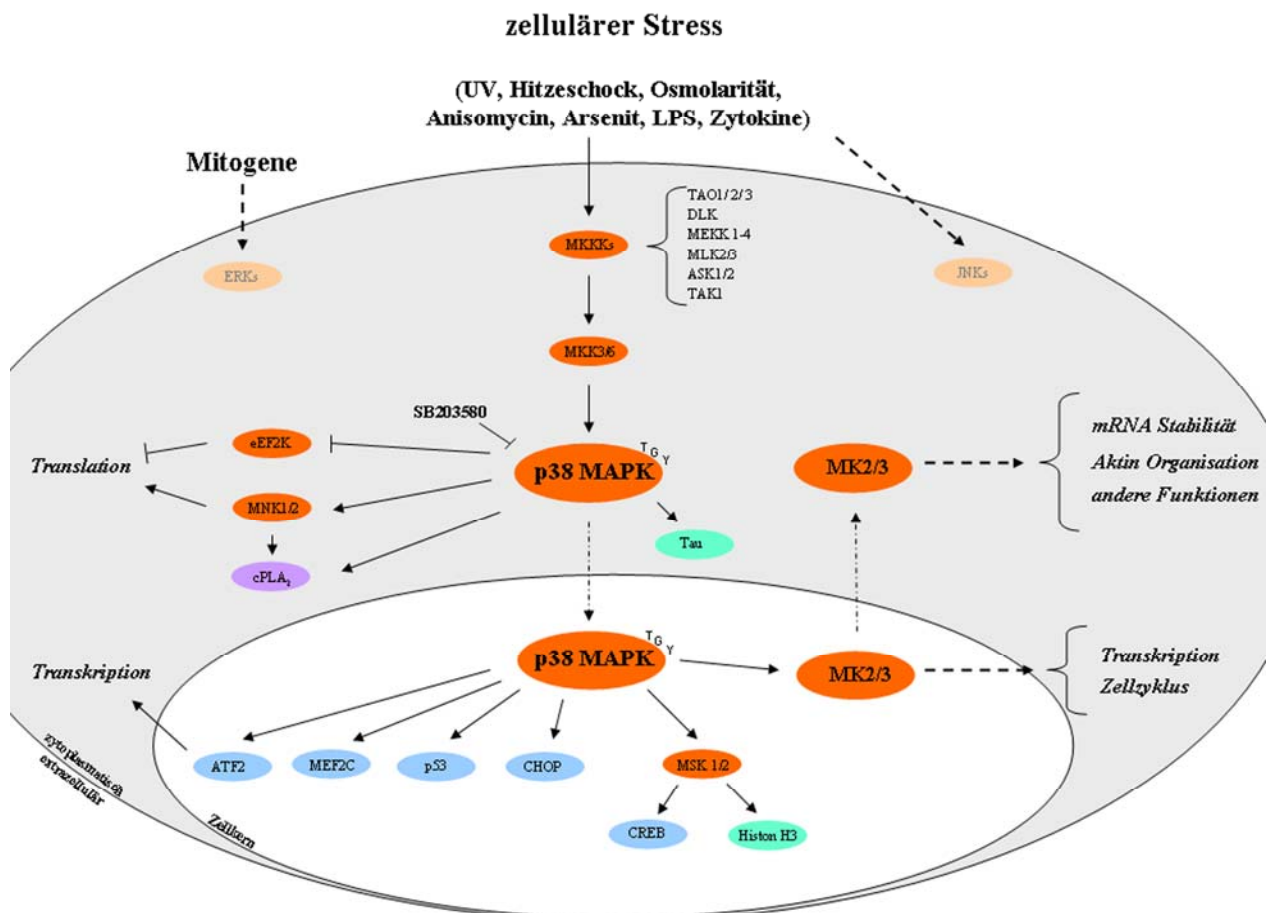
Die Proteinkinase p38 wurde 1994 von Han und Mitarbeitern als ein Enzym mit einer scheinbaren molekularen Masse von 38 kDa beschrieben, das in Säugetierzellen als Antwort auf endotoxische Lipopolysaccharide (LPS) oder Veränderung der extrazellulären Osmolarität über Phosphorylierung aktiviert wird (Han *et al.* 1994). Weitere Untersuchungen von Han *et al.* konnten zeigen, dass p38 das strukturelle und funktionelle Säugetierhomolog zu HOG1 ist, der damals schon bekannten osmo-sensitiven MAPK der Hefe *S. cerevisiae*. Ebenfalls im

Jahre 1994 rückte p38 als interessantes therapeutisches Ziel bei entzündlichen Erkrankungen in den Mittelpunkt, als Lee und Mitarbeiter eine Schlüsselrolle von p38 bei der TNF $\alpha$ -Produktion von LPS-behandelten Makrophagen aufzeigten (Lee *et al.* 1994). In den Folgejahren bis heute wurden die biologischen Funktionen von p38 mit Hilfe von unterschiedlichen Inhibitoren untersucht, von denen die Pyridinyl-Imidazol-Verbindung SB203580, welche zu den sogenannten CSAIDs-Verbindungen (*cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs*) zählt, die bekannteste darstellt. Durch den Einsatz dieser Inhibitoren in Kombination mit transgenen Mäuse, konnte p38 eine funktionelle Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen wie der Regulation des Zellzyklus (Ambrosino&Nebreda 2001), des programmierten Zelltods (Harper&LoGrasso 2001) sowie der Zellentwicklung und Zelldifferenzierung (Rincon *et al.* 2000) zugeordnet werden. Im Immunsystem ist die p38-Signalkaskade u.a. über die Produktion von TNF $\alpha$  in die Regulation der angeborenen Immunantwort involviert. Über die Kontrolle der T-Zell Aktivierung und Differenzierung hat p38 aber auch eine Funktion bei der Regulation der erworbenen (adaptiven) Immunität (Rincon *et al.* 2000). Die wichtige Rolle der MAPK p38 bei der Entzündungsreaktion wurde deutlich, als sich die Gabe von SB-Inhibitoren in Tiermodellen bei inflammatorischen Erkrankungen wie Arthritis oder septischen Schock als heilsam erwies (Lee *et al.* 1999). Auch im Menschen zeigte sich die Gabe von SB-Inhibitoren als therapeutisch wirksam, insofern nach LPS-Behandlung von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) eine reduzierte Produktion an proinflammatorischen Zytokinen, kaum Endothelaktivierung, sowie weniger klinische Symptome wie Kopfschmerzen oder Kältegefühl festzustellen waren (Branger *et al.* 2002, Fijen *et al.* 2002, van den Blink *et al.* 2004).

Aktuell sind für die p38 MAPK die vier Isoformen p38 $\alpha$ /MAPK14, p38 $\beta$ /MAPK11, p38 $\gamma$ /MAPK12 und p38 $\delta$ /MAPK13 beschrieben, die alle durch zellulären Stress aktiviert werden. Die Transkripte von p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  sind ubiquitär in allen Geweben exprimiert, während p38 $\gamma$  stark in Muskelgewebe und p38 $\delta$  vermehrt in Lunge und Niere vorhanden ist (Jiang *et al.* 1997, Wang *et al.* 1997). Ein gemeinsames strukturelles Merkmal der p38 MAPKs ist ein Thr-Gly-Tyr Motiv an den Positionen 180-182 in der aus zwölf Aminosäuren bestehenden Aktivierungsschleife zwischen Domäne VII und VIII des Enzyms. Die Proteinkinasen MKK3 und MKK6 aktivieren p38 mittels Phosphorylierung des Thr- und Tyr-Restes in diesem Motif (Kyriakis&Avruch 2001, Widmann *et al.* 1999). Im Gegensatz zu den MKKs ist eine große Anzahl an unterschiedlichen MKKKs als *upstream* Aktivatoren des p38-Signalweges identifiziert worden. Die am besten charakterisierten MKKKs als Regulatoren

der p38 Signalkaskade sind *TGF $\beta$ -activating kinase (TAK) 1* (Yamaguchi *et al.* 1995), *apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1* (Ichijo *et al.* 1997), sowie die Proteinkinasen MEKK1-4 (Blank *et al.* 1996, Gerwins *et al.* 1997, Lange-Carter *et al.* 1994), *mixed lineage kinase (MLK) 2/3* (Dorow *et al.* 1995) und *dual leucine zipper-bearing kinase (DLK)* (Holzman *et al.* 1994). All diese MKKKs können allerdings auch die anderen MAPK-Signalwege der JNKs und ERKs aktivieren. Die Enzyme TAO 1 und 2 hingegen scheinen relativ spezifische Aktivatoren für den p38-Signalweg zu sein (Chen *et al.* 1999, Hutchison *et al.* 1998). Die Divergenz der meisten MKKKs könnte essenziell für die zelluläre Antwort auf eine Reihe von unterschiedlichen extrazellulären Stimuli sein und spiegelt gleichzeitig die Komplexität bei der Regulation der intrazellulären Signalwege wieder.

Die MAPK p38 besitzt sowohl zytoplasmatische als auch sich im Nukleus befindliche Substrate. Zu den zytoplasmatischen p38-Substraten zählen hauptsächlich Enzyme, wie die cyclische Phospholipase A (cPLA) (Kramer *et al.* 1996), oder andere Kinasen, wie die *MAP kinase-interacting kinase (MNK) 1/2* (Waskiewicz *et al.* 1997) oder die eukaryotische Elongationsfaktor 2 Kinase (eEF2K) (Knebel *et al.* 2001). Aber auch Proteine ohne enzymatische Funktion, wie das Tau Protein, können Substrate von p38 sein (Feijoo *et al.* 2005). Über Phosphorylierung an einem Serin oder Threonin, auf die ein Prolin-Rest folgt (X-Ser/Thr-Pro-X), kann p38 diese Substrate aktivieren bzw. inhibieren. Im Nukleus stellen Transkriptionsfaktoren die größte Gruppe an p38-Substraten. Zu den von p38 phosphorylierten Transkriptionsfaktoren zählen z.B. MEF2C (Han *et al.* 1997), p53, *cyclic AMP response element binding protein (CREB) homologous protein (CHOP)* (Wang&Ron 1996) oder *activating transcription factor (ATF) 2*, eine Komponente des *activator protein (AP)-1* Transkriptionskomplexes (Raingeaud *et al.* 1995). p38 phosphoryliert diese Transkriptionsfaktoren und reguliert somit die Transkription stressrelevanter oder für die Entwicklung bzw. Differenzierung von Zellen benötigter Gene. Neben Transkriptionsfaktoren kann p38 auch sich im Nukleus befindliche Kinasen aktivieren. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe an nukleären p38 Substraten sind die mitogen- und stressaktivierten Proteinkinase (MSK) 1 und 2 (Caivano&Cohen 2000) sowie die Mitogen-aktivierten Proteinkinase-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAPK oder MK) 2 und 3 (McLaughlin *et al.* 1996, Stokoe *et al.* 1992). Jede dieser Kinase besitzt eigene Substrate, sodass p38 hierdurch indirekt an weiteren zellulären Prozessen beteiligt ist (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des p38 MAPK-Signalweges.** Zellulärer Stress, wie bakterielle Endotoxine, Hitzeschock oder inflammatorische Zytokine, führt über eine Aktivierung von MKKKs und den für den p38-Signalweg spezifischen MKK3 und MKK6 zur doppelten Phosphorylierung (T180/Y182) und damit Aktivierung von p38. Nach Aktivierung kann p38 sowohl zytoplasmatische Substrate als auch nach Einwanderung in den Zellkern nukleäre Substrate, zu denen auch MK2 zählt, phosphorylieren. Die MAPK p38 besitzt eine wichtige Rolle an zellulären Prozessen wie Zellzyklus, Transkription, Translation oder Organisation des Zytoskeletts und kann durch die Pyridinyl-imidazolverbindung SB203580 inhibiert werden.

Neben einer möglichen Schlüsselfunktion der p38 MAPK bei Entzündungsprozessen konnte in den letzten Jahren auch eine Funktion von p38 bei verschiedenen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems wie z.B. bei Morbus Alzheimer (Sun *et al.* 2003), Morbus Parkinson (Onyango *et al.* 2005, Wilms *et al.* 2003), Ischämie (Barone *et al.* 2001) oder Epilepsie (Jeon *et al.* 2000) beschrieben werden. So reduziert eine Inhibition der p38 nach intracranialer Injektion von LPS in Mäuse den Verlust an dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra Pars compacta (SNpc) im Mittelhirn (Ruano *et al.* 2006). Dieser reduzierte Untergang an dopaminergen Neuronen war mit einer geringeren Produktion an dem als neurotoxisch bekannten Stickstoffmonoxid (NO) verbunden. Eine direkte Rolle von p38 bei der Transkription der induzierbaren Form der NO-Synthase (iNOS) konnte in Astroglia und Mikroglia bereits demonstriert werden (Bhat *et al.* 2002, Da Silva *et al.* 1997). Zudem scheint

p38 auch bei der neuronalen Apoptose (Choi *et al.* 2004, Ghatan *et al.* 2000) sowie der neuronalen Depolarisation (Enslin *et al.* 1996) eine funktionelle Rolle inne zu haben.

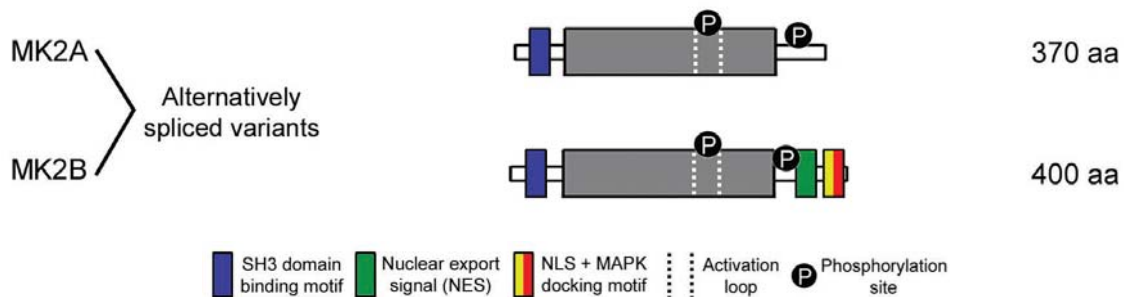
### 1.1.2. Die Proteinkinase MK2

#### 1.1.2.1. Struktur, Expression und Aktivierung

Die Proteinkinase MK2 zählt mit den phylogenetisch verwandten MK3 und MK5 sowie den p90 ribosomalen S6 Kinasen (RSKs) 1-4, den Mitogen- und stressaktivierten Kinasen (MSKs) 1-2 und den MAPK-interagierenden Kinasen (MNKs) 1-2 zu der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-aktivierte Proteinkinasen (MAPKAPKs oder nur MKs) (Gaestel 2006). Diese werden spezifisch entweder von den ERKs (RSKs, MSKs, MNKs) oder von p38 (MSKs, MNK1, MK2, MK3, MK5) aktiviert (Gaestel 2008).

Für das MK2-Gen sind zwei alternativ gesplice Transkripte beschrieben, die für ein 370 Aminosäure großes Protein (MK2A) und ein 400 Aminosäure großes Protein (MK2B) kodieren (Chevalier&Allen 2000). Am C-Terminus des MK2B-Proteins befindet sich ein Nukleus-Lokalisationssignal (NLS), das beim MK2A Protein fehlt. Hieraus ergibt sich auch die zelluläre Verteilung der beiden MK2-Protein: MK2A ist hauptsächlich im Zytoplasma, während MK2B im Nukleus von ruhenden Zellen zu finden ist (Engel *et al.* 1998, Neufeld *et al.* 2000). Zudem beinhaltet das NLS eine sogenannte D-Domäne, über die eine spezifische Interaktion mit p38 vermittelt wird (Smith *et al.* 2000). N-terminal vom NLS befindet sich ein Nukleus-Exportsignal (NES). Da MK2 nach Aktivierung aus dem Nukleus in das Zytoplasma transloziert (Ben-Levy *et al.* 1998), geht man davon aus, dass das NLS konstitutiv aktiv ist, während das NES erst durch Phosphorylierung aktiviert werden muss. Zudem scheint nicht nur die Aktivierung des NES, sondern auch die Bindung von p38 an MK2 durch Maskierung des NLS für die Translokation aus dem Nukleus in das Zytoplasma verantwortlich ist (Seternes *et al.* 2002). Am N-Terminus des MK2-Proteins findet sich eine Prolinreiche Domäne (PRD), die zwei putative *Src homology 3* (SH3) Bindungsmotive aufweist, über die z.B. die Interaktion mit der Tyrosinkinase c-Abl vermittelt wird (Plath *et al.* 1994). Zwischen der Prolinreichen-Domäne und dem NES liegt die Calcium/Kalmodulin (CaM)-ähnliche katalytische Domäne von MK2. MK2 wird ubiquitär exprimiert, findet sich aber in größeren Mengen in Herz, Sklettmuskel und Niere (Stokoe *et al.* 1992). Im Gehirn ist MK2 in

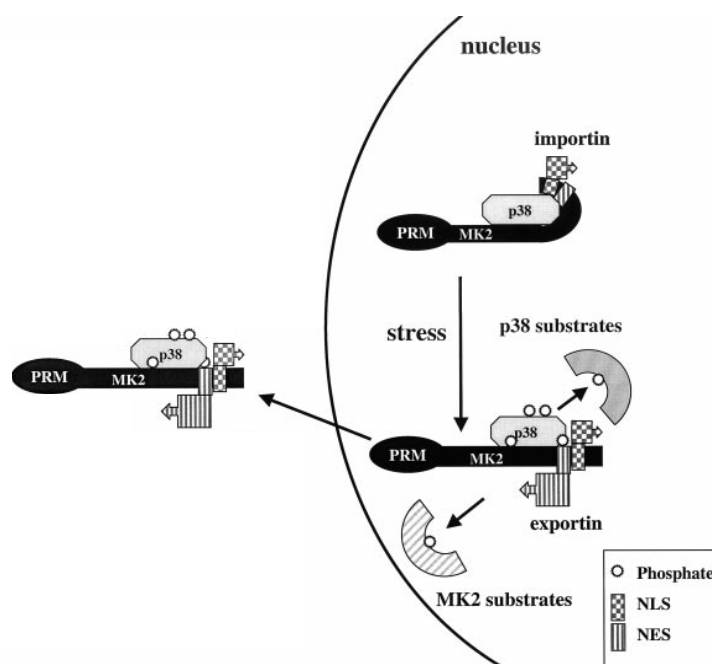
Mikroglia stärker exprimiert als in Astrozyten oder Neuronen (Culbert *et al.* 2006).  
Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der MK2-Primärstruktur.



**Abbildung 3:** Struktur der beiden MK2-Proteine MK2A und MK2B. (Quelle: Roux & Blenis 2004)

Die Proteinkinasen ERK1/2 und p38 wurden beide als Aktivatoren der MK2 *in vitro* beschrieben (Ben-Levy *et al.* 1995, Engel *et al.* 1995, Stokoe *et al.* 1992), doch stellen ERK1/2 keine physiologischen Kinasen für MK2 dar. Folglich wird die MK2 Aktivität durch Stimulation der p38 MAPK, hier insbesondere durch die Isoformen p38 $\alpha$  und p38 $\beta$ , induziert. Die p38 MAPKs phosphorylieren MK2 an den Positionen Thr25, Thr222, Ser272 und Thr334 (Ben-Levy *et al.* 1995). Die Funktion der Phosphorylierungsstelle Thr25 ist unbekannt, doch könnte es aufgrund seiner Lokalisation zwischen den beiden SH3 Bindungsdomänen in der Prolinreichen-Region eine Regulation bei Protein-Protein-Interaktionen von MK2 inne haben. Der Threonin-Rest an Position 222 innerhalb der Aktivierungsschleife in der katalytischen Domäne sowie das Threonin an Position 334 in der Verbindungsregion zwischen der katalytischen Domäne und dem NES sind essenziell für die MK2 Kinase-Aktivität (Ben-Levy *et al.* 1995, Engel *et al.* 1995, Stokoe *et al.* 1992). Aus der Kristallstruktur von MK2 geht hervor, dass die Phosphorylierung von Thr334 als Schalter für den MK2 Kernexport/-import dienen könnte (Meng *et al.* 2002). Die Phosphorylierung von Thr334 schwächt bzw. löst die Bindung des C-Terminus von MK2 an die katalytische Domäne auf, so dass das NES freigelegt wird und MK2 aus dem Zellkern exportiert wird. Ein solcher Konformationswechsel in MK2 nach Aktivierung konnte durch FRET Analyse eines GFP-getaggtten MK2-Proteins experimentell bestätigt werden (Neininger *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von MK2 zu einer offenen Proteinkonformation führt, die nur im Zytoplasma von aktivierten Zellen gefunden werden kann. MK2 wird im Nukleus nicht nur durch p38 aktiviert, sondern bestimmt auch deren zelluläre Lokalisation. So konnte gezeigt

werden, dass nach Phosphorylierung und Aktivierung von MK2 nukleäres p38 in einem Komplex mit MK2 ins Zytoplasma transportiert wird (Ben-Levy *et al.* 1998). Die Interaktion von p38 und MK2 scheint auch zu einer Stabilisierung des p38-Proteins zu führen, da in MK2-defizienten Zellen ebenfalls ein reduzierter p38-Proteinlevel beschrieben ist. Durch Expression einer katalytisch inaktiven MK2-Proteinvariante kann dieser wiederhergestellt werden (Kotlyarov *et al.* 2002). Diese Daten zeigen, dass die Aktivierung und der nukleäre Export von MK2 ebenfalls für die Stabilität und die zelluläre Verteilung des p38 Proteins verantwortlich ist.



**Abbildung 4: Mechanismus des p38-vermittelten Exports von MK2 aus dem Zellkern.** In ruhenden Zellen liegt das MK2 Protein in einer gefalteten Konformation vor, in der ein Importin gebunden an die NLS für die nukleäre Lokalisation von MK2 verantwortlich ist. Nach Aktivierung geht MK2 in eine gestreckte Konformation über, wodurch das NES frei wird. Nach Bindung eines Exportins werden MK2 und p38 gemeinsam als Komplex aus dem Nucleus in das Zytoplasma transportiert. PRM = prolin-rich motif, NLS = Nucleus-Lokalisationssignal, NES = Nucleus-Exportsignal (Quelle: Kotlyarov *et al.* 2002, geändert)

### 1.1.2.2. Substrate und Funktionen

Die Proteinkinase MK2 ist ein direktes Substrat von p38 im Zellkern und wird durch diese nach zellulärem Stress mittels Phosphorylierung aktiviert (Rouse *et al.* 1994). Nach Aktivierung wandern p38 und MK2 als Komplex gemeinsam vom Nucleus in das Zytoplasma ein (Ben-Levy *et al.* 1998, Engel *et al.* 1998). Aus diesem Grunde wird MK2 eine mögliche Effektorfunktion in p38-vermittelten Prozessen zugeschrieben. Für p38 konnte u.a. eine Rolle



bei der Regulation der Biosynthese bestimmter Zytokine (Han *et al.* 1994, Lee *et al.* 1994) sowie bei der Zellmigration (Hedges *et al.* 1999, Piotrowicz *et al.* 1998) nachgewiesen werden. Die genetische Entfernung des MK2-Gens in Mäusen lieferte das aufgrund der Substratvielfalt von p38 überraschende Ergebnis, dass MK2 das Schlüsselenzym bei diesen p38-abhängigen biologischen Prozessen darstellt (Kotlyarov *et al.* 1999, Kotlyarov *et al.* 2002). Das Fehlen von MK2 führte zu einer reduzierten LPS-induzierten Synthese an den Zytokinen TNF $\alpha$ , IL-6 und IFN $\gamma$  (Kotlyarov *et al.* 1999) und veränderte ebenfalls die Migration von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Neutrophilen (Hannigan *et al.* 2001, Kotlyarov *et al.* 2002, Neininger *et al.* 2002). Untersuchungen, ob das reduzierte p38 Proteinlevel in MK2-defizienten Zellen für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, zeigten, dass durch das Einbringen einer katalytisch inaktiven MK2-Variante in MK2-/- Zellen zwar die Menge an p38-Protein wiederhergestellt werden konnte, die Fehlregulation der Zytokin-Biosynthese allerdings immer noch bestehen blieb (Kotlyarov *et al.* 2002). Somit stellt MK2 bei der p38-vermittelten Zytokinproduktion tatsächlich das Schlüsselenzym dar. Über die Phosphorylierung sowohl nukleärer als auch zytoplasmatischer Substrate hat MK2 eine Rolle bei vielen zellulären Prozessen inne (siehe Tabelle 1). Im Folgenden werden ausgewählte Funktionen von MK2 detaillierter beschrieben.

### a) Regulation der mRNA Stabilität

Die Charakterisierung von MK2-defizienten (MK2-/-) Mäusen zeigte eine wichtige Rolle von MK2 bei der Biosynthese von Zytokinen auf (Kotlyarov *et al.* 1999). So wiesen LPS-behandelte MK2-/- Mäuse im Vergleich zu ihren WT-Artgenossen eine um ca. 90% reduzierte Produktion des entzündungsfördernden Zytokins TNF $\alpha$  auf. Ebenso waren auch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  (um ca. 40%), IL-6 und IFN $\gamma$  (beide um ca. 85%), aber auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (um ca. 40%) in LPS-behandelten MK2-/- Mäusen reduziert. Später konnte auch eine Beteiligung von MK2 bei der Produktion von COX-2 (Subbaramaiah *et al.* 2003), IL-8 und GM-CSF (Winzen *et al.* 1999), uPA (Han *et al.* 2002), MIP1 $\alpha$  (Culbert *et al.* 2006) oder SOCS3 (Ehltling *et al.* 2007) gezeigt werden. Bei weiteren Analysen für das TNF $\alpha$  stellte sich heraus, dass in MK2-defizienten Makrophagen und Milzzellen nach LPS-Stimulation zwar reduziert war, die Menge an Zytokin-mRNA oder aber Protein-Prozessierung und TNF $\alpha$ -shedding durch den *knockout* unbeeinflusst blieb (Kotlyarov *et al.* 1999, Neininger *et al.* 2002). Hieraus wurde ersichtlich, dass MK2 die

Produktion an Zytokinen post-transkriptionell regulieren muss. Ein Deletieren der Adenin-Uracil-reichen Elemente (ARE) in der 3'-untranslatierten Region (UTR) der reifen Zytokin-mRNA konnte die Zytokinproduktion in MK2<sup>-/-</sup> Milzzellen wieder herstellen (Neininger *et al.* 2002). Mit Hilfe von Actinomycin D-Experimenten wurde deutlich, dass MK2 über die ARE die Stabilität der mRNA von TNF $\alpha$  und IL-6 positiv beeinflusst. Da MK2 allerdings keine RNA-bindende Domäne besitzt muss MK2 Substrate phosphorylieren, die in der Regulation der mRNA-Stabilität involviert sind. Hierfür kommen das heteronukleäre Ribonukleoprotein (hnRNP) A0 (Rousseau *et al.* 2002), Tristetraprolin (TTP) (Mahtani *et al.* 2001), das Poly-A-bindende Protein (PABP) 1 (Bollig *et al.* 2003) sowie HuR (Tran *et al.* 2003) in Frage. Diese Proteine besitzen alle RNA-Bindungseigenschaften und sind als MK2 Substrate bekannt. Mit Hilfe von TTP-MK2-Doppelknockout Mäusen konnte elegant gezeigt werden, dass TTP zumindest bei der TNF $\alpha$  Produktion das fehlende Bindeglied zwischen MK2 und der reduzierten mRNA-Stabilität ist (Hitti *et al.* 2006).

### b) Organisation des Zytoskeletts und Migration

Neben den Defiziten bei der Zytokinbiosynthese wiesen MK2-defiziente Zellen, wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, glatten Muskelzellen oder embryonischen Fibroblasten, auch ein verändertes Migrationsverhalten, z.B. bei der Chemotaxis, auf (Hannigan *et al.* 2001, Kobayashi *et al.* 2006, Kotlyarov *et al.* 2002). Der Grund hierfür lag in einer fehlenden Umorganisation ihres Aktin-Zytoskeletts und der Ausbildung von Stressfasern. Dieser Phänotyp konnte nur durch Einbringen des gesamten MK2-Proteins inklusive der prolinreichen Domäne in MK2<sup>-/-</sup> Fibroblasten wieder aufgehoben werden (Kotlyarov *et al.* 2002). Bei der verminderten Zytokinproduktion reichte hierbei eine Wiederherstellung der MK2 Kinaseaktivität aus.

Unter den zytoplasmatischen MK2-Substraten ist das Hitzeschockprotein (Hsp) 25 (human: Hsp27) ein mögliches Effektorprotein für den beobachteten Migrationphänotyp. Hsp25 bildet große Oligomere, die als molekulare Chaperone wirken und Zellen vor Hitzeschock und oxidativen Stress schützen (Lambert *et al.* 1999). Im unphosphorylierten Zustand kann Hsp25 an Aktinfilamente (sogenanntes F-Aktin) binden und so deren Polymerisation verhindern (Benndorf *et al.* 1994). Nach Phosphorylierung an Ser15, Ser78 und Ser82 durch MK2 dissoziiert Hsp27 in Tetramere und verliert so seine Fähigkeit die Aktinpolymerisation zu blockieren (Lambert *et al.* 1999, Rogalla *et al.* 1999).

In einem Proteomics-Experiment mit Zelllysaten von neutrophilen Granulozyten, in denen durch rekombinantes MK2 phosphorylierte Proteine massenspektrometrisch sequenziert wurden, konnte p16-Arc, die p16 Untereinheit des *actin related protein complex* (Arp) 2/3, als weiteres Substrat für MK2 identifiziert werden (Singh *et al.* 2003). p16-Arc hat eine regulatorische Funktion bei der Organisation des Aktinzytoskeletts inne und wird durch MK2 an Ser77 phosphoryliert. Somit könnte MK2 auch über die Phosphorylierung von p16-Arc in die Organisation des Zytoskeletts und folglich bei der Migration involviert sein. Als weitere Substrate von MK2 sind das Lymphozyten-spezifische Protein (LSP)-1 (Huang *et al.* 1997) und Vimentin (Cheng&Lai 1998) beschrieben. LSP-1 bindet ähnlich wie Hsp25 an F-Aktin und reguliert so dessen Polymerisation, Vimentin ist ein Bestandteil von Intermediärfilamenten.

### c) Zellzyklus

Bereits 1995 konnte in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* gezeigt werden, dass die MK2-Homologe Rck1 und Rck2 den Übergang von der G2- in die M-Phase des Zellzyklus regulieren (Dahlkvist *et al.* 1995). Für Säugetierzellen konnte erst sechs Jahre später eine p38 MAPK-Abhängigkeit beim diesem Prozess nachgewiesen werden (Bulavin *et al.* 2001). Weitere vier Jahre später konnte schließlich gezeigt werden, dass MK2 über die Phosphorylierung der Zellzyklus-Phosphatasen CDC25B und CDC25C den G2/M-Übergang sowie die S-Phasen Progression reguliert (Manke *et al.* 2005). So führte der *knockdown* von MK2 in UV-behandelten Osteosarcomazellen zu einem Verlust des G2/M-checkpoints. Seitdem wird MK2 zusammen mit CHK1 und CHK2 zu den durch DNA-Schädigung aktivierten Zellzyklus-regulierenden Kinasen gezählt (Reinhardt&Yaffe 2009).

Neben der Kontrolle des Zellzyklus wird MK2 auch eine mögliche Funktion bei der Transkription von Genen zugeschrieben. Die Transkriptionsfaktoren serum response factor (SRF) und E47 sind z.B. direkte Substrate von MK2 (Heidenreich *et al.* 1999, Neufeld *et al.* 2000). Über die Phosphorylierung von SRF ist MK2 bei der stressvermittelten Transkription von Genen, über E47 bei der gewebsspezifischen bzw. während der Zelldifferenzierung benötigten Genexpression beteiligt.

## Einleitung

---

Funktion	Substrat	Referenz
mRNA Stabilität/Translation	Tristetraprolin (TTP) HuR eEF2 Kinase PABP1 hnRNP A0	(Mahtani <i>et al.</i> 2001) (Tran <i>et al.</i> 2003) (Knebel <i>et al.</i> 2001) (Bollig <i>et al.</i> 2003) (Rousseau <i>et al.</i> 2002)
Transkription/Zellzyklus	SRF CDC25B, CDC25C ER81 E47 Bmi1 HDM2	(Heidenreich <i>et al.</i> 1999) (Manke <i>et al.</i> 2005) (Janknecht 2001)1 (Neufeld <i>et al.</i> 2000) (Voncken <i>et al.</i> 2005) (Weber <i>et al.</i> 2005)
Organisation des Zytoskeletts	Hsp25/27 p16-Arc LSP1 Vimentin	(Stokoe <i>et al.</i> 1992) (Singh <i>et al.</i> 2003) (Huang <i>et al.</i> 1997) (Cheng&Lai 1998)
Andere Funktionen	5-Lipoxygenase Tyrosinhydroxylase Glykogensynthase Tuberin Akt 14-3-3ζ TAB3 αB-Crystallin CDC25	(Werz <i>et al.</i> 2000) (Sutherland <i>et al.</i> 1993) (Stokoe <i>et al.</i> 1992) (Li <i>et al.</i> 2003) (Rane <i>et al.</i> 2001) (Powell <i>et al.</i> 2003) (Mendoza <i>et al.</i> 2008) (Hoover <i>et al.</i> 2000) (Huard <i>et al.</i> 2008)

**Tabelle 1:** Auswahl an MK2-Substraten geordnet nach ihren Funktionen

### 1.1.2.3. MK2 bei der Pathogenese von Erkrankungen

Die Aktivierung und somit eine funktionelle Rolle der MAPK p38 bei der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen ist allgemein bekannt (Lee *et al.* 2000). Durch die Entwicklung MK2-defizienter Mäuse, die im Gegensatz zu den embryonal letalen p38 $\alpha$  *knockout* Mäusen überlebensfähig und fertil sind, konnte die Funktion von MK2 in Mausmodellen für verschiedene humane Erkrankungen untersucht werden.

Nach LPS-Behandlung waren MK2<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu ihren WT Artgenossen resistenter gegenüber endotoxischem Schock (Kotlyarov *et al.* 1999). Dem zugrunde lag eine reduzierte Produktion vor allem an TNF $\alpha$ . Aber auch die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  waren im Vergleich zu WT-Mäusen verringert. In dem Kollagen-induzierten Mausmodell für rheumatische Arthritis konnte MK2 ebenfalls mit der Hochregulation der inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 in Zusammenhang gebracht werden (Hegen *et al.* 2006). Aufgrund dessen zeigten MK2<sup>-/-</sup> Mäuse ein verspätetes Auftreten erster Arthritis-Symptome sowie einen milderen Verlauf der Erkrankung. In einer Studie mit primären humanen Chondrozyten von an Arthrose leidenden Patienten konnte die MK2 Aktivität mit der Ausschüttung des inflammatorisch wirksamen Prostaglandin-E2 sowie der Matrixmetalloproteasen (MMP) 3 und MMP13 in Verbindung gebracht werden (Jones *et al.* 2009). Dieses Ergebnis deutet auf eine direkte Beteiligung von MK2 bei der Pathogenese der Osteoarthritis im Menschen hin.

Neben der Funktion bei der Regulation der inflammatorischen Antwort bei pathologischen Bedingungen scheint MK2 auch in die Expression des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) involviert zu sein. Als Folge einer reduzierten Expression von VCAM-1 auf vaskulären Endothelzellen von MK2-defizienten hypercholesterolen Mäusen litten diese weniger an Atherosklerose (Jagavelu *et al.* 2007). In dem Ovalbumin-induzierten Tiermodell für Asthma wiesen MK2<sup>-/-</sup> Mäuse ebenfalls eine reduzierte VCAM-1 Expression auf (Gorska *et al.* 2007). Zusätzlich waren die Expression an  $\beta$ -Catenin, einer essenziellen Komponente von Zell-Zell-Verbindungen (*tight junctions*), sowie die Aktinpolymerisation zur Bildung von interzellulären Lücken gestört. Dies hatte eine erhöhte Stabilität der Blut-Lungen-Schranke und eine reduzierte Einwanderung von T-Zellen in das Lungengewebe zur Folge. Somit wiesen MK2<sup>-/-</sup> Mäuse eine reduzierte Inflammation in der Lunge auf und litten damit weniger an Asthma.

In einem experimentellen Modell für Hirn-Ischämie führte das Fehlen von MK2 zu einer reduzierten Infarkt-Größe sowie zu einer Reduktion an neurologischen Defiziten (Wang *et al.* 2002). Im Kortex von transgenen Alzheimer-Mäusen konnte neben einem erhöhten Level an MK2-Transkript und MK2-Aktivität auch eine erhöhte Neuroinflammation detektiert werden (Culbert *et al.* 2006). Ob es einen direkten Zusammenhang hierbei gibt, konnte diese Studie allerdings nicht zeigen.

### 1.2. Zellen des Gehirns und ihre Funktionen

Im zentralen Nervensystem unterscheidet man grob zwei Zelltypen. Zum einen die für unser Gedächtnis und unser Bewusstsein verantwortlichen Nervenzellen (Neurone) und zum anderen die Gliazellen, welche Stütz-, Hüll- und Ernährungsfunktionen innehaben, aber auch für die Immunität im Gehirn verantwortlich sind.

#### 1.2.1. Neurone

Das zentrale Nervensystem (ZNS) besteht aus mehr als  $10^{11}$  Nervenzellen (Neuronen), wobei das Neuron die kleinste strukturelle und funktionelle Einheit des Nervensystems darstellt. Ein typisches Neuron besitzt einen Zellkörper, Soma genannt, sowie zwei Arten von Fortsätzen, die Dendriten und das Axon. Über die meist baumartig verzweigten Dendriten nimmt die Nervenzelle aktivierende oder hemmende Informationen in Form von elektrischen Impulsen von anderen Nervenzellen auf (sogenannte afferente Signale) und bildet über der Zellmembran des Somas eine Signalsumme. Das Axon leitet nach Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes durch die afferenten Signale ein Aktionspotential in Richtung Synapse weiter und ist somit für die Signalweitergabe an andere Zellen, wie Neurone, Muskelzellen oder Drüsenzellen, zuständig (efferentes Nervensignal). Auch das Axon kann weitere Verzweigungen ausbilden (sogenannte Kollaterale) und somit sein Signal an mehrere Effektorzellen weitergeben. Zur schnellen und vor allem verlustfreien Signalweitergabe kann es von Oligodendrozyten im ZNS und von Schwann-Zellen in der Peripherie durch Myelinscheiden elektrisch isoliert werden. Die Myelinscheiden sind durch sogenannte Ranvier-Schnürringe voneinander getrennt, an denen die Signalweitergabe „sprunghaft“ von Schnürring zu Schnürring stattfindet (saltatorische Reizweiterleitung).

Die Unterscheidung der verschiedenen Neurone im Gehirn kann auf mehrere Weisen erfolgen. Zum einen kann die Morphologie der Nervenzellen in Form der Anzahl an Verzweigungen als Unterscheidungskriterium herangezogen werden. Man unterscheidet dabei zwischen uni-, bi- und multipolaren Neuronen. So zählen z.B. die primären Sinneszellen der Netzhaut zu den unipolaren Neuronen, da sie nur einen einzigen Fortsatz besitzen. Zu den bipolaren Nervenzellen mit zwei Fortsätzen zählen u.a. Neurone in der Retina oder die Ganglien des Hör-Gleichgewichtsnervs. Weisen die Nervenzellen zahlreiche Dendriten und ein Axon auf, so spricht man von multipolaren Neuronen. Eine weitere Einteilung kann über den an der Synapse ausgeschütteten Neurotransmitter erfolgen. Als Neurotransmitter dienen die Aminosäuren Glutamat, Glycin und GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) sowie biogene Amine (z.B. Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin, Acetylcholin, Serotonin), Neuropeptide wie z.B. die Substanz P, oder auch Gase (Stickstoffmonoxid). Schüttet ein Neuron Dopamin als Neurotransmitter in den synaptischen Spalt aus, so wird diese Nervenzelle als dopaminerg bezeichnet. Analog sezernieren cholinerge Neurone Acetylcholin oder glutamaterge Neurone Glutamat als Neurotransmitter. Der wichtigste erregende (exzitatorische) Neurotransmitter ist Glutamat, während GABA und Glycin inhibierend auf die postsynaptische Zelle wirken. Eine weitere Einteilungsmöglichkeit der Neurone liegt in ihrer Effektorfunktion. So bezeichnet man ein Neuron, das eine Muskelzelle innerviert, als motorische Nervenzelle, während eine sensorische Nervenzelle die Informationen der Sinnesorgane an das Gehirn weiterleitet. Den größten Anteil an Neuronen bilden jedoch sogenannte Interneurone, welche Informationen verarbeiten und an andere Nervenzellen weiterleiten. Interneurone sind also weder motorisch noch sensorisch, sondern besitzen Vermittlerfunktion.

### 1.2.2. Makroglia (Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen)

Unter dem Begriff Gliazellen fasst man im Nervensystem vorkommende Zellen zusammen, die sich strukturell und funktionell von den Neuronen unterscheiden. Innerhalb der Gliazellen unterscheidet man zwischen Makroglia und Mikroglia. Die Makroglia bilden in erster Linie ein Stützgerüst (Stützfunktion) oder sorgen für die elektrische Isolation der Nervenzellen (Hüllfunktion). Zudem sind Makroglia maßgeblich an der Aufrechterhaltung des inneren Milieus des Nervensystems und hierüber auch an der Informationsverarbeitung beteiligt, indem sie nicht nur den Stoff- und Flüssigkeitstransport regulieren (Ernährungsfunktion),

sondern auch die Homöostase (z.B. Kaliumhaushalt) im Gehirn aufrechterhalten. Zu den Makroglia zählen Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen.

### a) Astroglia, Astrozyten

Die Astroglia sind die am häufigsten vorkommende Zellart im Gehirn. Unter dem Mikroskop lassen sich viele Zellfortsätze erkennen, wodurch Astrozyten eine sternförmige Morphologie besitzen, was ihnen ihren Namen gegeben hat (griechisch, *astron* = Stern). Ihre Ausläufer enden meist an Nervenzellen oder Blutgefäßen. An den Blutgefäßen bilden sie zusammen mit einer durch *tight junctions* fest verbundenen Endothelschicht die Blut-Hirn-Schranke, welche das Eindringen polarer Substanzen oder pathogener Strukturen aus dem Blut in das Gehirn verhindert. Auf diese Weise kontrollieren Astrozyten auch den Stoffaustausch zwischen Nervenzellen und Blut und sind damit maßgeblich an der Ernährung des Nervengewebes beteiligt. Außerdem sind sie für die Aufrechterhaltung des inneren Milieus im zentralen Nervensystem verantwortlich. So können Astrozyten z.B. die während einer neuronalen Depolarisation frei werdenden  $K^+$ -Ionen aufnehmen und regulieren so neben dem  $K^+$ -Haushalt des Gehirns auch dessen pH-Wert. Durch die Aufnahme von ausgeschütteten Neurotransmittern im synaptischen Spalt beeinflussen Astrozyten auch die Weiterleitungsgeschwindigkeit von Erregungen und partizipieren so an der interneuronalen Signalweitergabe (Fellin 2009, Markowitz *et al.* 2007, Newman 2005). Zudem können sie die in Vesikeln gespeicherten Neurotransmitter wieder abgeben und so benachbarte Neurone aktivieren. Nach Durchtrennung der Axone von Nervenzellen bilden Astrozyten sogenannte Glianarben, die das Nachwachsen der Axone verhindern.

### b) Oligodendrozyten

Neben den Astrozyten zählen auch die Oligodendrozyten zur Makroglia. Oligodendrozyten kommen nur im zentralen Nervensystem vor und bilden dort die aus Myelin bestehenden Markscheiden der Nervenzellen. Die Myelin-bildenden Zellen der Peripherie werden als Schwannsche Zellen oder nur Schwann-Zellen bezeichnet. Im Gegensatz zu diesen können die Oligodendrozyten Abschnitte mehrerer Axone isolieren, während die Schwann-Zellen immer nur ein neuronales Axon umwickeln. Neben reifen Oligodendrozyten sind im Gehirn auch Oligodendrozyten-Vorläuferzellen vorhanden (Baumann&Pham-Dinh 2001). Diese



können zu reifen Oligodendrozyten differenzieren und so einen Verlust ersetzen, wie er z.B. bei der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose vorkommt (Keegan&Noseworthy 2002, Storch&Lassmann 1997).

### c) Ependymzellen

Das Ependym ist ein einschichtiges Epithel in den inneren Flüssigkeitsräumen (Ventrikel) des Gehirns und im zentralen Spinalkanal, welches von Cilien tragenden Zellen, den Ependymzellen, gebildet wird (Dempsey&Nielsen 1976). Es trennt die Hirnflüssigkeit (Liquor) vom eigentlichen Hirngewebe. Die Funktion der Ependymzellen, insbesondere der Cilien, ist bis heute nur unzureichend bekannt. Ein Fehler in der Entwicklung des Ependyms oder in der Cilienbewegung führt z.B. zur Ausbildung eines Wasserkopfes (Hydrocephalus) (Banizs *et al.* 2005, Dominguez-Pinos *et al.* 2005). Aktuell wird auch über eine mögliche Beteiligung der Ependymzellen bei der Wanderung von Neuroblasten spekuliert (Sawamoto *et al.* 2006).

### 1.2.3. Mikroglia

Mikroglia sind die im Gehirn residierenden Immunzellen, welche ungefähr 12% der Zellen im Gehirn ausmachen. Sie besitzen aufgrund ihrer Herkunft und ihrer Eigenschaften große Ähnlichkeit mit peripheren Makrophagen und werden deshalb auch häufig als „Makrophagen des Gehirns“ bezeichnet. Mikroglia stammen ebenfalls von einer peripheren myeloiden Vorläuferzelle ab und wandern während der Embryogenese in das Gehirn ein (Barron 1995, Cuadros&Navascues 1998). Unter normalen Umständen liegen Mikroglia in einem ruhenden Status im Gehirn vor, der sich morphologisch vor allem durch feine, unregelmäßige Verästelungen auszeichnet (Davalos *et al.* 2005, Nimmerjahn *et al.* 2005). Nach Kontakt mit einem Antigen werden Mikroglia aktiviert, woraufhin sich auch ihre Morphologie ändert. Neben einem Zellwachsen (Hypertrophie) entwickeln sich auch die Zellfortsätze stärker, wodurch die aktivierten Mikroglia ein amöboides Aussehen erhalten. Diese morphologische Veränderung wird ebenfalls von Monozyten bei ihrer Differenzierung in Makrophagen beobachtet. Als weitere Veränderung nach Aktivierung exprimieren Mikroglia eine Reihe an immunrelevanter Oberflächenmoleküle, wie z.B. den CD14-Rezeptor, MHC-Moleküle oder Chemokin-Rezeptoren (Rock *et al.* 2004). Aktivierte Mikroglia sind zur Phagozytose fähig

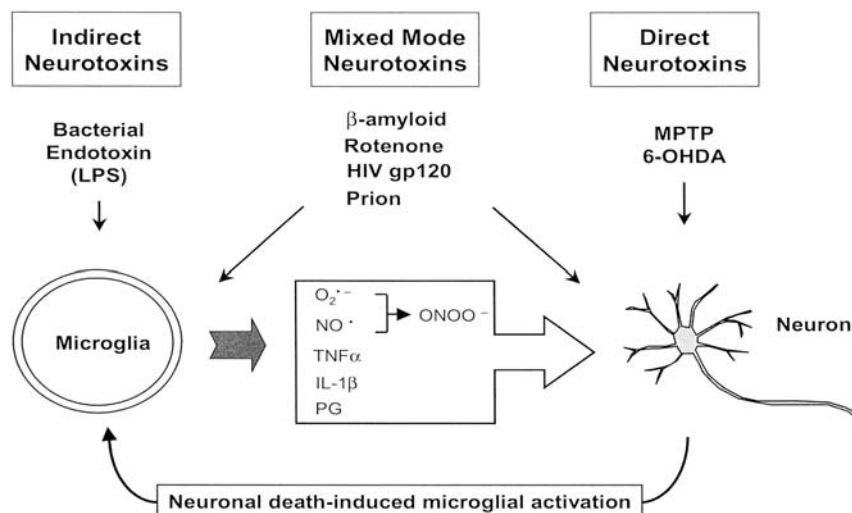
und befreien so das Gehirn von Fremdkörpern und abgestorbenen Zellen oder deren Bestandteile. Zudem produzieren aktivierte Mikroglia genauso wie Makrophagen eine große Anzahl an Zytokinen, die z.B. die Proliferation von Astrozyten und so die Eindämmung der Immunreaktion zur Folge hat. Unter bestimmten Umständen, wie z.B. durch den massiven Untergang von Neuronen bei neurodegenerativen Erkrankungen, können Mikroglia überaktiviert werden und so zur weiteren Schädigung des Gehirns beitragen. Der Grund für die Überaktivierung der Mikroglia ist bis heute ungeklärt und Gegenstand intensiver Forschung.

### 1.2.3.1. Neuroinflammation - Die Entzündungsreaktion im Gehirn

Das Gehirn wurde lange Zeit aufgrund der Stabilität der Blut-Hirn-Schranke und der ungewöhnlich hohen Toleranz gegenüber transplantiertem Gewebe als immunologisch benachteiligt angesehen (McGeer&McGeer 1998). Mit der Entdeckung und funktionellen Charakterisierung der Gliazellen konnte jedoch ein eigenes Immunsystem für das Gehirn nachgewiesen werden. Heute geht man davon aus, dass eine chronische Inflammation im Gehirn, vermittelt vor allem durch Mikroglia, eine wichtige Rolle beim Voranschreiten von neurodegenerativen Erkrankungen spielt (Kim&Joh 2006, McGeer *et al.* 2006, Zecca *et al.* 2006). Die Beobachtung, dass man im alternden gesunden Gehirn mit der Zeit eine erhöhte Anzahl an aktivierten Mikroglia findet (Conde&Streit 2006, Vaughan&Peters 1974) und dass sich der Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen mit dem Alter verschlechtert, lassen über einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Neuroinflammation im Alter und der Progression neurodegenerativer Erkrankungen spekulieren. In der Tat ist bei Mäusen der Verlust an dopaminergen Neuronen in der SNpc des Mittelhirns sowie die Aktivierung der Mikroglia nach MPTP Intoxikation vom Alter abhängig (Sugama *et al.* 2003).

Nach dem heutigen Verständnis nehmen Mikroglia und ihre Aktivierung eine zentrale Rolle bei der Entzündungsreaktion im Gehirn ein (siehe Abbildung 5). Bezogen auf den Untergang von Nervenzellen unterscheidet man drei Arten neurotoxischer Substanzen: indirekte, direkte und gemischte Neurotoxine. Die indirekten Neurotoxine wirken ausschließlich auf Mikroglia und führen direkt zu deren Aktivierung. Das in Zellwänden von gram-negativen Bakterien vorkommende Polysaccharid LPS zählt z.B. zu diesen Substanzen und wirkt nur in Gegenwart von Mikroglia neurotoxisch (Bronstein *et al.* 1995, Gao *et al.* 2002, Gibbons&Dragunow 2006). Als Resultat der Aktivierung durch LPS produzieren Mikroglia inflammatorische Mediatoren wie Interleukine (IL), Tumor Nekrose Faktoren (TNF),

Prostaglandine (PG), Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffradikale (engl. *reactive oxygene species*, ROS). In der Tat werden höhere Konzentration dieser Substanzen bei neurologischen Erkrankungen gefunden (Bessler *et al.* 1999, Huberman *et al.* 1994, Lee *et al.* 2002). In Neuronen bewirken die von den Mikroglia produzierten Entzündungsstoffe die Induktion des programmierten Zelltods, also die Neurodegeneration. Im Gegensatz dazu wirken direkte Neurotoxine, wie MPTP, 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) oder Glutamat, ausschließlich auf Neurone und lösen direkt deren Apoptose aus. Als Folge hiervon reichern sich zytoplasmatische Proteine (z.B. Laminin, Neuromelanin) im Extrazellularraum an und führen so zur Mikroglia-Aktivierung (Mikrogliose) und Mediatoren-Ausschüttung. Dass ein Zusammenhang zwischen direkter und durch Neuroinflammation vermittelter Neurotoxizität besteht, konnten Studien mit Mäusen, die defizient an inflammatorischen Faktoren sind, zeigen. Nach MPTP Injektionen wiesen die genetisch veränderten Mäuse eine geringere Neurodegeneration in der SNpc auf (siehe Kapitel 1.1.3.2.). Indirekte und direkte Neurotoxine können sich synergistisch potenzieren. So verstärkt eine LPS-Behandlung z.B die Neurotoxizität von MPTP auf dopaminerge Neurone (Cunningham *et al.* 2005, Gao *et al.* 2003, Gao *et al.* 2003). Zu den gemischten Neurotoxinen zählen Substanzen wie z.B das für die Alzheimer-Erkrankung typische  $\beta$ -Amyloid, das sowohl direkte als auch indirekte neurotoxische Mechanismen initiieren kann.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Mikroglia und Neurodegeneration.** Mikroglia werden entweder direkt durch immunogene Substanzen wie LPS oder indirekt durch den massiven Untergang von Neuronen aktiviert (Mikroglia). Daraufhin produzieren sie Entzündungsmediatoren, die auf Neurone wiederum neurotoxisch wirken können. Sogenannte gemischte Neurotoxine wirken sowohl neurotoxisch als auch Mikroglia-aktivierend. LPS=Lipopolysaccharid, NO=Stickstoffmonoxid, TNF $\alpha$ =Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ =Interleukin-1beta, PG=Prostaglandine, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>=Peroxid, ONOO<sup>-</sup>=Peroxynitrit, MPTP=1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin, 6-OHDA=6-Hydroxydopamin. (Quelle: Liu & Hong 2003)

### 1.3. Morbus Parkinson

#### 1.3.1. Krankheitsformen

Die Parkinsonsche Erkrankung (PD, engl. *Parkinson's disease*), auch als Morbus Parkinson oder einfach nur Parkinson bezeichnet, ist nach dem Morbus Alzheimer die häufigste neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems. Derzeit wird in Deutschland eine Prävalenz von 375-500 pro 100.000 Einwohnern angenommen, weshalb mit 300.000-400.000 Betroffenen gerechnet werden muss. Parkinson ist altersabhängig und beginnt meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, wobei Männer und Frauen gleichermaßen häufig betroffen sind. Bis zum 75. Lebensjahr steigt die Anzahl an Erkrankten mit zunehmendem Alter an, von den über 80 jährigen sind etwa 2% von einem Parkinson-Syndrom betroffen.

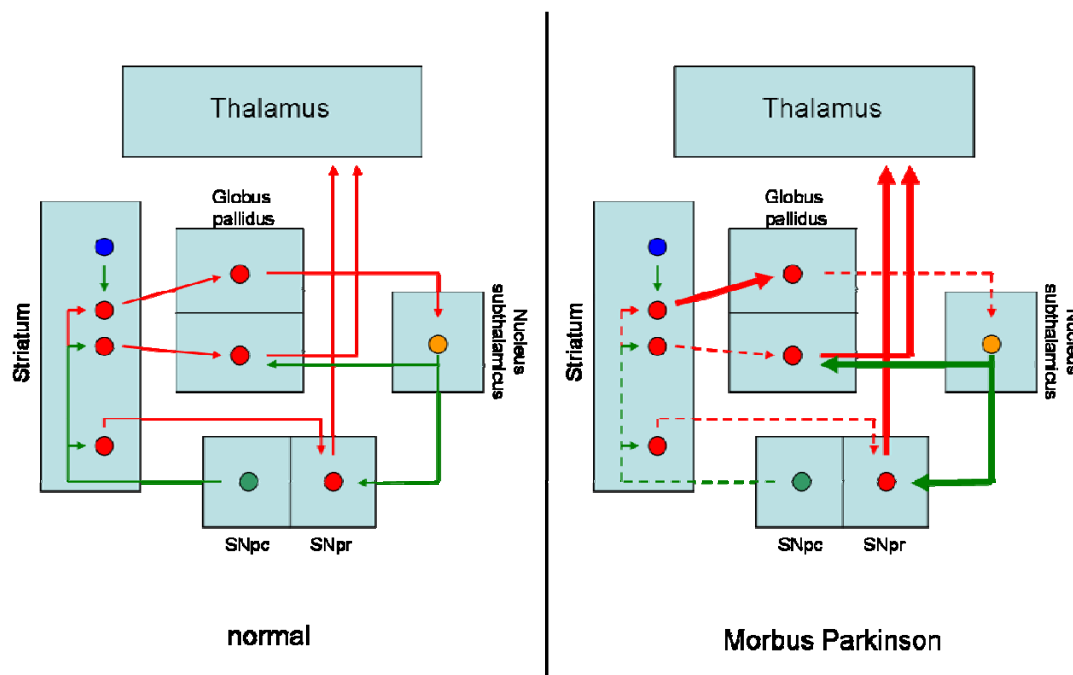
Die Parkinsonsche Krankheit kann in vier verschiedenen Krankheitsformen auftreten. An dem idiopathischen Parkinson-Syndrom, das auch primäres Parkinson-Syndrom genannt wird, erkrankt die größte Anzahl an Patienten (ca. 75% der Fälle). Die Ursache für den Ausbruch dieser Parkinson-Form ist bislang noch unbekannt. Hiervon muss das symptomatische bzw. sekundäre Parkinson-Syndrom unterschieden werden, das durch Medikamente (z.B. Neuroepileptika), Toxine (z.B. Mangan, Kohlenmonoxid, Methylalkohol, MPTP), Schädel-Hirn-Traumen (z.B. bei Boxern) oder eine Gehirnentzündung (Enzephalitis) hervorgerufen werden kann. Eine weitere Form stellt das sehr selten auftretende familiäre Parkinson-Syndrom dar. Dieses ist vererblich, da es in einer Mutation, meist des  $\alpha$ -Synuclein-Gens, begründet liegt. Außer den bisher drei genannten Krankheitsformen des Morbus Parkinson kann es noch im Rahmen anderer neurologischer Erkrankungen zu einem sogenannten atypischen Parkinson-Syndrom kommen.

Allen Formen gemeinsam ist die Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) im Mittelhirn, was zu den typischen Krankheitssymptomen führt.

### 1.3.2. Pathophysiologie, Symptomatik und Therapie

Die Parkinsonsche Erkrankung ist die häufigste degenerative Erkrankung der Basalganglien. Pathophysiologisch kommt es zum Absterben von melanin-haltigen dopaminergen Nervenzellen in dem als pars compacta bezeichneten Teil der schwarzen Substanz (Substantia nigra) des Mittelhirns. Dadurch ergibt sich biochemisch betrachtet eine Dopamin-Verarmung des durch diese Neurone innervierten Striatums (Marsden 1990). Ein weiteres pathologisches Merkmal der Parkinson-Erkrankung ist das Auftreten sogenannter eosinophiler Lewy-Körperchen, deren Hauptbestandteil das Protein  $\alpha$ -Synuclein darstellt, in betroffenen Mittelhirn-Neuronen (Giasson *et al.* 2000, Spillantini&Goedert 2000). Erste Krankheitssymptome treten auf, wenn 70% der dopaminergen Neurone in der SNpc degeneriert sind.

Um die physiologischen Auswirkungen des Zelluntergangs in der SNpc auf die Motorik eines Parkinson-Patienten zu verstehen, muss man die neuronale Verschaltung der Basalganglien kennen. Zu den Basalganglien zählen vier funktionell zusammengehörige Kerngebiete, die schlussendlich den Thalamus als übergeordnete Struktur innervieren. Neben der Substantia nigra, bestehend aus den Teilen pars compacta (pc) und pars reticulata (pr), zählen auch das Striatum, der Globus pallidus sowie der Nucleus subthalamicus zu den Basalganglien. Die dopaminergen Neurone der SNpc wirken hauptsächlich exzitatorisch auf GABAerge Neurone des Striatums, welche wiederum inhibitorisch über die SNpr bzw. den Globus pallidus auf den Thalamus projizieren. Gleichzeitig inhibieren die dopaminergen Neurone aber auch GABAerge Neurone im Striatum, die wiederum über den Globus pallidus glutamaterge Neurone im Nucleus subthalamicus innervieren. Diese Nervenzellen aktivieren auf den Thalamus inhibitorisch wirkende Neurone in Globus pallidus und SNpc. Die Degeneration dopaminergener Neurone in der SNpc beim Morbus Parkinson führt zu einem Ungleichgewicht zwischen hemmenden und erregenden Bahnen innerhalb der Basalganglien, woraus sich eine überschießende Hemmung des Thalamus ergibt (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der funktionellen Neuroanatomie der Basalganglien und deren Störung bei Morbus Parkinson.** Durch den Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) bei der Parkinsonschen Krankheit kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen inhibitorischer (rote Pfeile) und exzitatorischer (grüne Pfeile) Innervierung der Neurone im Striatum, was letztlich in einer Hemmung des Thalamus resultiert. Neurotransmitter: ● =GABA ● =Dopamin ● =Glutamat ● =Acetylcholin, SNpr = Substantia nigra pars reticulata. (Quelle: eigene Zeichnung angelehnt an Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme Verlag, 1998)

Folge der Hemmung des Thalamus ist die Unterdrückung der Willkürmotorik, die sich in den typischen klinischen Parkinson-Symptomen Akinese (Bewegungslosigkeit), Hypokinesie (Bewegungsarmut), Rigor (Steifheit der Muskulatur) und Tremor (Muskelzittern) äußert. Die Akinese ist eine Verlangsamung aller Bewegungsvorgänge, so dass es Parkinson-Patienten schwer fällt Bewegungen zu initiieren bzw. abzustoppen. Besonders deutlich wird die Akinese bei der Veränderung des Gangbildes. Parkinson-Patienten können nur mit Mühe einen ersten Schritt tun, jedoch einmal in Bewegung, fällt es ihnen schwer anzuhalten oder die Richtung zu ändern. Andere klinische Äußerungen der Akinese sind Hypomimie (Maskengesicht), Mikrophonie (Sprechen wird leise und undeutlich) oder auch Mikrographie (Schriftbild wird kleiner). Durch die massive Steigerung des Muskeltonus (Rigor) zeigen Parkinson-Patienten oft eine typische leicht gebückte Haltung mit angewinkelten Armen und Beinen auf. Bei einem Teil der Patienten tritt ein Ruhetremor von 4-8 Schlägen pro Sekunde auf, der nach Beginn einer Bewegung mit der jeweiligen Extremität aufhört. Zu dem Ruhetremor können sich noch alternierende Bewegungen v.a. der Hände und Finger ergänzen (eine Bewegung wie beim „Pillendrehen“ oder „Münzenzählen“). Die Ausprägung dieser für die Parkinsonsche Erkrankung typischen Kardinalsymptome ist von Patient zu Patient

unterschiedlich stark und kann von vegetativen Symptomen (z.B. Salbengesicht, Hypotonie oder Thermoregulationsstörungen) sowie sensorischen oder psychischen Störungen (z.B. Depression, Demenz, Melancholie) begleitet werden (Errea&Ara 1999, Ravina *et al.* 2007, Worm Petersen 1974).

Bis heute gibt es keine Therapie-Möglichkeiten, die das Einsetzen oder die Progression des Morbus Parkinson verhindern. Die aktuellen Parkinson-Therapien sind somit nur symptom-reduzierend und zielen auf eine Erhöhung der synaptischen Konzentration von Dopamin ab. Hierzu wird vor allem L-Dopa, einer Vorstufe des Dopamins, verabreicht. Ein Ansprechen eines vermutlichen Parkinson-Patienten auf eine L-Dopa-Therapie wird auch als diagnostisches Mittel genutzt. Einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt stellt die Inhibition der Dopamin-abbauenden Enzyme Dopa-Decarboxylase und Monoaminoxidase bzw. die Gabe von Dopamin-Agonisten dar. Heutige Standardtherapien kombinieren einen Dopaminersatz mit einer Hemmung des Dopamin-Abbaus, da eine längerfristige Behandlung mit L-Dopa zu einem verringerten Ansprechen der Patienten auf diese Medikation führt. Auch chirurgische Methoden wie die Tiefenhirnstimulation, bei der die striatalen Neurone elektrisch angeregt werden, stellen eine ausschließlich symptomatische Behandlung dar und können die Progression der Krankheit nicht verhindern. Neueste Strategien versuchen durch die Transplantation dopaminergener Zellen aus embryonalem Gewebe in das Striatum die lokale Dopaminkonzentration zu erhöhen. Diese Methode ist Gegenstand intensiver Forschung (Kordower *et al.* 1995, Piccini *et al.* 1999, Piccini *et al.* 2000) und scheitert bisher meist an einem nur kurzen Überleben der transplantierten Zellen, was jedoch durch genetische Manipulation z.B. durch Überexpression des Fibroblasten Wachstumsfaktors (*fibroblast growth factor*, FGF) 2 bereits gesteigert werden konnte (Cesnulevicius *et al.* 2006). Neuere Studien versuchen die Progression des Morbus Parkinson durch Gabe anti-inflammatorischer Medikamente, sogenannter *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAID), zu verlangsamen und konnten bereits das Risiko an Parkinson zu erkranken reduzieren (Hernan *et al.* 2006, Ton *et al.* 2006).

### 1.3.3. Das MPTP-Tiermodell

Zur Untersuchung der zellulären Mechanismen, die zum Untergang der dopaminergen Neurone in der SNpc führen, wurden in der Vergangenheit verschiedene Tiermodelle zu Morbus Parkinson entwickelt. Hierbei stellt sich das durch systematische Injektionen von

1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) als das am besten charakterisierte Modell dar (Beal 2001, Bloem *et al.* 1990). Es wird routinemäßig an geeigneten Tieren wie Katzen, Nager oder Primaten durchgeführt. Eine MPTP Intoxikation spiegelt alle klinisch relevanten Zeichen inklusive Tremor, Rigor oder Akinese der Parkinsonschen Erkrankung wieder. Zudem reagieren mit MPTP behandelte Tiere exzellent auf eine Behandlung mit L-DOPA. Genauso wie bei Morbus Parkinson beim Menschen reagieren die dopaminergen Neurone in der SNpc im Vergleich zu denen im ventralen tegmentalen Areal (VTA) empfindlicher auf die MPTP-Toxizität. Der einzige Unterschied zwischen der humanen Parkinsonschen Erkrankung und dem experimentellen MPTP-Tiermodell ist das Fehlen typischer Lewy-Körperchen bei den Tieren. Der Grund hierfür scheint darin zu liegen, dass Parkinson eine schleichende Erkrankung ist, während das MPTP-Tiermodell einen akuten oder subakuten Prozess darstellt.

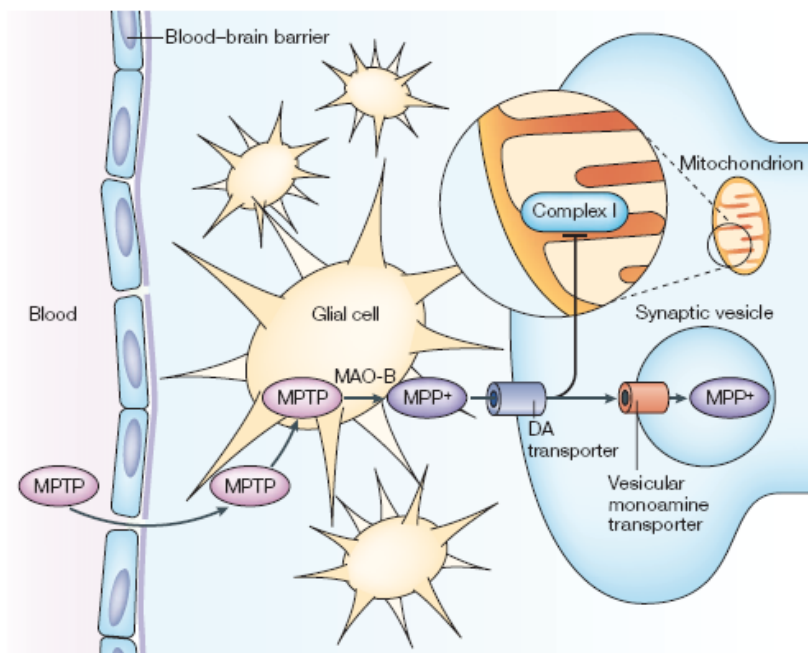
Die MPTP-Modelle gleichen somit nicht absolut dem humanem Morbus Parkinson, bieten jedoch eine unschätzbare Möglichkeit zur Aufdeckung der zellulären Mechanismen der neurodegenerativen Prozesse sowie neuer therapeutischer Strategien.

### 1.3.3.1. Wirkungsweise

MPTP wurde 1982 entdeckt, als eine Reihe junger Drogenabhängiger in Kalifornien akut auftretende, massive Parkinson-Symptome entwickelten (Langston&Ballard 1983). Anschließende Untersuchungen identifizierten MPTP, das als Nebenprodukt bei der Herstellung des synthetischen Heroin-Analogen 1-Methyl-4-phenyl-piropionoxypiperidin (MPPP) anfällt, als eigentliches Neurotoxin. Das hydrophobe MPTP kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und wird anschließend durch die Monoaminoxidase B (MaoB) über einen Zweischrittmechanismus in Astrozyten zum eigentlich toxischen Pyridiniumion  $MPP^+$  oxidiert. Nach Freisetzung wird  $MPP^+$  über einen spezifischen Dopamintransporter selektiv in dopaminerge Neurone aufgenommen und führt zu deren Untergang (Javitch *et al.* 1985). Mäuse, denen der Dopamintransporter fehlt, sind vor der MPTP-Toxizität geschützt (Bezard *et al.* 1999). In dopaminergen Neuronen akkumuliert  $MPP^+$  in Mitochondrien, in denen es den Komplex I der Atmungskette blockiert (Tipton&Singer 1993). Als Folge kommt es zu einer ATP-Verarmung und vor allem zu oxidativem Stress in Form einer erhöhten Produktion von ROS. Dabei scheinen NO und Peroxynitrit (gebildet aus einem NO-Radikal und einem  $O_2$ -Radikal) eine zentrale Rolle einzunehmen. 3-Nitrotyrosin, ein Marker für eine



Peroxyinitrit-vermittelte zelluläre Schädigung, konnte sowohl in MPTP-behandelten Tieren als auch *post mortem* in Gehirnen von PD-Patienten als erhöht nachgewiesen werden (Good *et al.* 1998, Pennathur *et al.* 1999, Schulz *et al.* 1995). Mäuse, die defizient an nNOS oder iNOS sind oder mit einem entsprechenden Inhibitor behandelt wurden, wiesen eine höhere Resistenz gegenüber der MPTP-induzierten Neurotoxizität auf (Hantraye *et al.* 1996, Liberatore *et al.* 1999, Przedborski *et al.* 1996). Neben einem erhöhten Spiegel an freien Radikalen konnte bei Parkinson-Patienten ebenfalls eine erniedrigte Konzentration an Antioxidantien, wie Vitamin A oder Glutathion, aber auch eine erhöhte oxidative Schädigung der DNA (Munch *et al.* 1998, Schapira 1996) nachgewiesen werden. Des Weiteren wird eine Kalzium-vermittelte Schädigung der dopaminergen Neuronen diskutiert. Man vermutet, dass MPP<sup>+</sup> entweder direkt N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren aktiviert oder dass dies durch Membrandepolarisation aufgrund des ATP-Mangel geschieht. Als Folge kommt es einer erhöhten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, die zelltoxisch wirkende Kaskaden aktiviert (Exzitotoxizität).



**Abbildung 7: Wirkmechanismus der MPTP-Neurotoxizität.** Das hydrophobe 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) passiert die Blut-Hirn-Schranke und wird intracranial von Gliazellen zu dem eigentlichen Neurotoxin 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) umgewandelt. Dieses wird über einen spezifischen Dopamintransporter in dopaminerge Neurone aufgenommen. Intrazellulär akkumuliert MPP<sup>+</sup> in Mitochondrien, in denen es zur Inhibition des Komplex I der Elektronentransportkette der Atmungskette führt. Als Folge hiervon kommt es zur Energieverarmung der Zelle und vor allem zur Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was zum Untergang dopaminergischer Nervenzellen führt. Über einen vesikulären Monoamintransporter kann MPP<sup>+</sup> noch in Vesikel gespeichert werden, womit die Neurotoxizität reduziert wird. DA=Dopamin, MAO-B=Monoaminoxidase-B. (Quelle: Vila & Przedborski 2003)

### 1.3.3.2. Apoptose vs. Neuroinflammation

Der Nachweis TUNEL-positiver dopaminerger Neurone im Gehirn von Patienten mit Parkinson deutete auf eine Beteiligung der Apoptose bei dieser Erkrankung hin (Mochizuki *et al.* 1996). Folgestudien konnten mittels immunzytochemischer Analysen eine erhöhte Expression der proapoptotischen Proteine Caspase-3 und Bax bei Morbus Parkinson nachweisen und somit diesen Verdacht bestätigten (Hartmann *et al.* 2000). Um die Beteiligung der Apoptose bei der Pathogenese des Morbus Parkinson weiter zu untersuchen, wurde das MPTP-Tiermodell an genetisch veränderten Mäusen angewandt. So konnte gezeigt werden, dass die dopaminergeren Neurone von Mäusen, die das antiapoptotische Protein Bcl-2 überexprimieren, vor dem programmierten Zelltod geschützt werden (Offen *et al.* 1998, Yang *et al.* 1998). Diese Neuroprotektion war allerdings in dem akuten MPTP-Modell signifikanter als bei einer chronischen Intoxikation. Mäuse, denen das proapoptotische Protein Bax fehlt, waren resistenter gegenüber der Neurotoxizität von MPTP (Vila *et al.* 2001). Auch eine Beteiligung der in die Apoptose involvierten c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) konnte über knockout- und Inhibitionsstudien nachgewiesen werden (Hunot *et al.* 2004, Saporito *et al.* 1999, Saporito *et al.* 2000). Zusätzlich zu der möglichen Beteiligung der Apoptose konnte auch die Rolle der Neuroinflammation bei der Pathogenese der MPTP-Toxizität demonstriert werden. Neuropathologische Studien an drei Patienten mit 3-16 jährigem MPTP-Konsum zeigten eine Anhäufung von Mikroglia um Neurone in Hirngebieten mit aktivem Zelltod (Langston *et al.* 1999). Nach MPTP-Gabe konnten in Mäusen sowohl aktivierte Mikroglia als auch aktivierte Lymphozyten nachgewiesen werden (Kurkowska-Jastrzebska *et al.* 1999). Zudem wurden bei MPTP-behandelten Tieren erhöhte proinflammatorische Zytokinspiegel gefunden (Kaku *et al.* 1999, Mogi *et al.* 1998). Die MPTP Toxizität ist signifikant reduziert in Mäusen, die defizient an proinflammatorischen Faktoren wie das Superoxid-bildende Enzym NADPH-Oxidase (Wu *et al.* 2003), Prostaglandine (Feng *et al.* 2002, Teismann&Ferber 2001, Vijitruth *et al.* 2006), NO (Liberatore *et al.* 1999, Przedborski *et al.* 1996, Sriram *et al.* 2006) oder TNF $\alpha$  (Sriram *et al.* 2006) sind. In diesem Zusammenhang erstaunt es auch nicht, dass antiinflammatorische Arzneistoffe wie Acetylsalicylsäure und Meloxicam einen deutlich neuroprotektiven Effekt gegen die MPTP-Toxizität zeigen (Teismann&Ferber 2001). Minocyclin, ein Antibiotikum, das die Aktivierung von Mikroglia durch Inhibition der p38 MAPK verhindert, hat ebenfalls eine neuroprotektive Wirkung nach MPTP-Intoxikation (Sriram *et al.* 2006).

## 1.4. Epilepsie

### 1.4.1. Definition

Die Epilepsie ist nach dem Schlaganfall die häufigste neurologische Erkrankung. Betroffen sind ungefähr 3,4% der Weltbevölkerung (Browne&Holmes 2001). Gekennzeichnet ist die Epilepsie durch kurzzeitige Krampfanfälle von einigen Sekunden bis wenigen Minuten Dauer, für die es meist keinen direkten Anlass gibt (Loscher 2002). Die Epilepsie stellt eine chronische Erkrankung des ZNS dar. Ursache für die auftretenden Krampfanfälle ist die synchrone, sich multizentrisch ausbreitende Depolarisation größerer Neuronenpopulationen hervorgerufen durch ein Ungleichgewicht zwischen neuronaler Hemmung und neuronaler Erregung (Browne&Holmes 2001). Als Folge kann es zur Aktivierung motorischer Funktionen in Form von Krampfanfällen, sensorischer Funktionen in Form von Sinnesindrücken, sowie vegetativer Funktionen (z.B. Speichelfluss) oder komplexer Funktionen (z.B. Befindungsstörungen) kommen. Der Auslöser für einen epileptischen Anfall ist unterschiedlicher Natur. So können im Kindesalter Fieberkrämpfe, Enzephalitis oder genetische Schäden zur Entstehung einer Epilepsie führen. Im Erwachsenenalter zählen Schädel-Hirn-Traumata und Tumore zu den häufigsten Ursachen (Wolf 2003).

Die verschiedenen Verlaufsformen der epileptischen Anfälle werden in fokale Krampfanfälle, die in einer bestimmten Hirnregion beginnen, und generalisierte Krampfanfälle, bei denen eine Beteiligung beider Hemisphären zugrunde liegt, unterschieden (Everitt&Sander 1999). Weiterhin werden die fokalen Anfälle in einfache (ohne Bewusstseinsverlust), komplexe (mit Bewusstseinsverlust) und sekundär generalisierte Anfälle eingeteilt. Bei den generalisierten Anfällen unterscheidet man durch Sturz, Verkrampfung (tonisch) und/oder rhythmischen Zuckungen (myoklonisch) charakterisierte konvulsive Anfälle von nicht konvulsiven, bei denen der Patient nicht stürzt aber eine kurze Bewusstseinspause „erlebt“, und myoklonischen Anfällen, die sich durch wiederholte Zuckungen einzelner Muskelgruppen äußern. Lang anhaltende oder sich wiederholende bzw. überlagernde Anfälle, bei denen der Patient nicht zur Erholung kommt, werden als Status epilepticus (SE) bezeichnet.

Die Einteilung der Epilepsien erfolgt in idiopathische, symptomatische und kryptogene Syndrome. Bei den idiopathischen Epilepsien ist die Ursache für den Ausbruch der Erkrankung noch unbekannt, vermutet bzw. teilweise bereits nachgewiesen sind genetische Defekte. Den symptomatischen Epilepsien liegen bekannte ZNS-Vorerkrankungen zugrunde,

während die kryptogenen Symptome ohne bekannten Grund entstehen. Die häufigste Anfallsform beim Menschen ist die Temporallappen-Epilepsie, einem komplex-fokale Anfall mit oder ohne sekundäre Generalisierung (Hauser *et al.* 1993). Im chronischen Verlauf der Temporallappenepilepsie kommt es typischerweise zu Läsionen des Hippokampus, die ihrerseits das Auftreten von Anfällen fördern und so den progressiven Charakter dieser Erkrankung widerspiegeln (Loscher *et al.* 2003).

### 1.4.2. Neuronale Depolarisation

Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die Plasmamembran einer Zelle innen negativ und außen positiv geladen. Das hieraus resultierende elektrische Potenzial wird bei nicht erregten Nervenzellen Ruhepotential genannt und beträgt etwa -80 mV. Die Ursache des Ruhepotentials liegt in einer Ungleichverteilung von Ionen, vor allem von  $K^+$ ,  $Na^+$  und Protein-Anionen, zwischen dem Zellinneren und dem Extrazellularraum. So ist die Konzentration an  $K^+$  und Protein-Anionen intrazellulär wesentlich größer, während die  $Na^+$  Konzentration extrazellulär erhöht ist. Grund für diese Ionenverteilung ist vor allem die selektive Durchlässigkeit der Plasmamembran sowie die Aufrechterhaltung der Ladungsverteilung durch die  $Na^+-K^+$ -Pumpe. Im Ruhezustand ist die Leitfähigkeit für  $K^+$ -Ionen groß, sodass  $K^+$  frei über die Membran entlang eines chemischen Gradienten diffundieren kann. Aufgrund der Impermeabilität der Membran für Protein-Anionen entsteht allerdings ein elektrischer Gradient und eine größere Konzentration an  $K^+$  verbleibt im Zellinneren. Zusätzlich pumpt die  $Na^+-K^+$ -ATPase unter Energieverbrauch drei  $Na^+$ -Ionen aus und zwei  $K^+$ -Ionen in die Zelle. Da die Leitfähigkeit der Plasmamembran für  $Na^+$ -Ionen sehr gering ist, wird die Rückdiffusion ins Zellinnere verhindert, woraus sich die oben beschriebene Ionenverteilung für  $Na^+$ ,  $K^+$  und Protein-Anionen ergibt. Da das hieraus resultierende Ruhepotential hauptsächlich auf die Mobilität der  $K^+$ -Ionen beruht, die Membranpermeabilität für  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  sowie  $Cl^-$ -Ionen aber ebenfalls gegeben ist, entspricht die auftretende Spannung nicht genau dem Kalium-Diffusionspotential von -95 mV.

Als Depolarisation bezeichnet man die Umkehrung der Ladungsverteilung an der Plasmamembran bzw. die Reduktion der Ruhespannung in Richtung weniger negative Werte. Hervorgerufen wird die Depolarisation durch Öffnung von  $Na^+$ -Kanäle durch Neurotransmitter oder eine weitergeleitete Erregung. Durch das Einströmen von  $Na^+$ -Ionen in die Zelle wird die Polarität der Membran langsam geändert und das Ruhepotential nimmt weniger

negative Werte an. Wird ein bestimmter Schwellenwert überschritten, so startet ein Aktionspotential, das als „Alles-oder-Nichts-Antwort“ abläuft. Dabei werden immer mehr spannungsgesteuerte  $\text{Na}^+$ -Kanäle geöffnet, was die Ladungsverschiebung an der Plasmamembran beschleunigt bis eine Ladungsumkehr stattgefunden hat. Da die Natrium-Kanäle bereits nach 0,1 ms inaktiv sind und sich zudem spannungsgesteuerte Kalium-Kanäle öffnen sowie die Na-K-Pumpe aktiv ist, kommt es wieder zur Potentialumkehr und zum Einstellen des Ruhepotentials. Dieser Vorgang wird als Repolarisation bezeichnet. Durch den Ausstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen aus der Zelle wird nach Repolarisation das Ruhepotential kurzzeitig erhöht (größerer negativer Wert) (Hyperpolarisation).

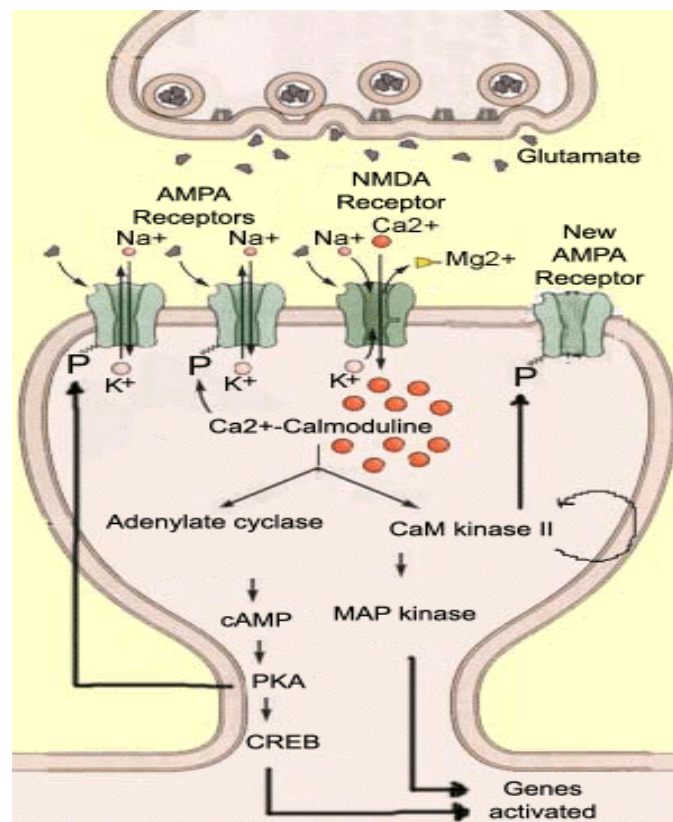
### 1.4.3. Synaptische Übertragung und Exzitotoxizität

An der chemischen Synapse wird das elektrische Signal eines Aktionspotentials in ein chemisches Signal durch Ausschüttung von Neurotransmittern umgewandelt. Durch diese Übersetzung kann an dem postsynaptischen Neuron eine Verrechnung erregender und hemmender Einflüsse erfolgen. Die Neurotransmitterfreisetzung erfolgt durch regulierte Exozytose sogenannter synaptischer Vesikel. Durch ein die präsynaptische Membran erreichendes Aktionspotential werden spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geöffnet. Durch den daraus resultierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx vermitteln die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven SNARE-Proteine Synaptotagmin, Syntaxin und SNAP-25 die Fusion der Neurotransmitter-enthaltenden Vesikel mit der synaptischen Membran und somit die Neurotransmitterfreisetzung. Je nachdem, welcher Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird, kann dieser die postsynaptische Membran durch Depolarisation erregen (exzitatorischer Neurotransmitter) oder mittels Hyperpolarisation hemmen (inhibitorischen Neurotransmitter).

Der Wirkmechanismus beider Transmitterarten an der postsynaptischen Membran ist gleich und wird im Folgenden anhand des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat exemplarisch vorgestellt. Nach Ausschüttung in den synaptischen Spalt bindet Glutamat an spezifische Rezeptoren vom NMDA (N-Methyl-D-aspartat)-, AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisazolpropionsäure)- oder Kainsäure-Typen (Greenamyre&Porter 1994). Diese Rezeptoren stellen Ionenkanäle (ionotrope Rezeptoren) dar und werden durch Bindung von Glutamat geöffnet, wodurch  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  in die postsynaptische Nervenzelle einströmen und diese depolarisieren. Bei inhibitorisch wirkenden Neurotransmittern wird meist die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit der Membran erhöht, weshalb das postsynaptische Neuron hyperpolarisiert wird. Durch den

## Einleitung

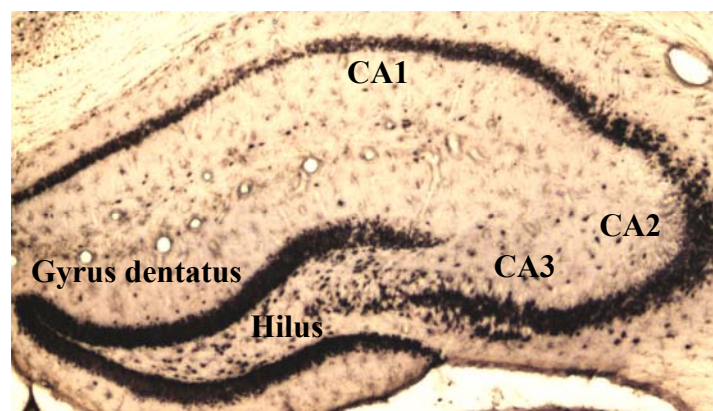
massiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom werden auch verschiedene Signalwege aktiviert. Hierzu zählen vor allem die Signalkaskaden der MAPK (Rosen *et al.* 1994) und der Proteinkinase A (Impey *et al.* 1998, Park *et al.* 2000), aber es findet auch eine Aktivierung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMK) (Aletta *et al.* 1996) und der Proteinkinasen C-Familie statt (Huang 1989). Die kombinierte Wirkung dieser Signalwege kann neben einer verstärkten Expression sogenannter Gene der frühen (*immediate early genes*) und späten (*delayed-response genes*) Antwort auch apoptotische Mechanismen aktivieren. Somit kann eine anhaltende Erregung und die hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zum Zelltod des betroffenen Neurons führen. Hierbei spricht man dann von Exzitotoxizität (Choi 1992).



**Abbildung 8: Glutamat-vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalwege in der postsynaptischen Nervenzelle.** Die Bindung von Glutamat an die ionotropen Glutamat-Rezeptoren NMDA und AMPA führt neben einer neuronalen Depolarisation zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration. Hierdurch werden u.a. über die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Kalzium-Calmodulin-abhängige (CaM) Kinase II die Signalkaskaden der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-kinasen aktiviert. Eine Aktivierung der Adenylat-Zyklase führt zu einem erhöhten Level an intrazellulärem cAMP und somit zu einer Proteinkinase A (PKA) vermittelten Transkription CREB-abhängiger Gene. NMDA = N-Methyl-D aspartat, AMPA =  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisazolpropionat. (Quelle: Li et al. 2003)

#### 1.4.4. Das Kainsäure-Tiermodell

Kainsäure oder auch Kainat (KA) ist ein durch den Seetang *Digenea simplex* gebildeter Stoff, der strukturverwandt mit der Aminosäure Glutamat ist (Sakai *et al.* 2005). Genauso wie diese wirkt Kainat stark exzitatorisch (Coyle 1987). Nach Bindung von Kainat an spezifische Kainat-Rezeptoren, die einen Subtypen der ionotropen Glutamatrezeptor-Familie darstellen, kommt es zur Glutamat Freisetzung aus der präsynaptischen Membran. Der Neurotransmitter Glutamat bindet wiederum an Glutamat-Rezeptoren vom NMDA und AMPA Subtypen, was einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die Depolarisation der postsynaptischen Membran zur Folge hat. Eine massive Akkumulation intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in den Neuronen induziert apoptotische Mechanismen, die zum Untergang der Nervenzelle führen (Choi 1992, Schauwecker 2002). Die größte Dichte an Kainat-Rezeptoren findet man im Hippocampus, einer pro Hemisphäre im Großhirn gelegenen Region, die an der Informationsübertragung vom Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis beteiligt ist. Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung der Anatomie des Hippocampus.



**Abbildung 9: NeuN-Färbung des Hippocampus.**  
CA = cornu ammonis (Ammonshorn). (Quelle: eigenes Bild)

Seit der Entdeckung, dass Kainat epileptische Anfälle und neuropathologische Veränderungen im Gehirn, im speziellen im Hippocampus, derart auslösen kann (Nadler *et al.* 1978), wie man sie bei Patienten mit Temporallappen-Epilepsie vorfindet (Ben-Ari *et al.* 1980, Nadler *et al.* 1981, Schwob *et al.* 1980), findet das Kainat-Modell häufig Anwendung in der Epilepsie-Forschung. Als besonders vulnerabel gelten der Hilus und die CA3-Region der Pyramiden-schicht im Hippocampus (Dudek&Sutula 2007). Neben dem Neuronenverlust ist auch eine deutliche Gliose vorzufinden.

Kainsäure kann intracranial (i.c.) direkt in bestimmte Hirnareale injiziert werden, aber auch eine intravenöse (i.v.), subcutane (s.c.) oder intraperitoneale (i.p.) Gabe von Kainat löst Krampfanfälle aus (Brandt *et al.* 2003, Nadler *et al.* 1978, Schauwecker 2000, Steppuhn&Turski 1993), deren Schwere nach den von Racine (1972) beschriebenen Stadien klassifiziert werden kann. Bei Mäusen treten nach ungefähr 10-15 min erste fokale Krampfaktivitäten auf, die sich in Form von Myoklonien (Muskelzuckungen) wie Augenzucken, Zittern der Tasthaare oder Kopfnicken äußern. Mit der Zeit steigern sich die Anfälle in Form von einseitigem Heben der Vorderextremitäten bis sie nach ungefähr 30 min generalisieren, d.h. auch die zweite Körperhälfte betreffen. Dauern die Anfälle ungewöhnlich lange bzw. überlagern sich zwei Anfälle, so spricht man auch vom Status epilepticus (SE). Dieser wird bei Mäusen meist 50-60 min nach Kainsäure-Administration erreicht und kann mehrere Stunden andauern. Nach frühestens einer Woche können anschließend spontane Krampfanfälle mit 1-3 minütiger Dauer und unterschiedlicher Krampfschwere auftreten (Dudek 2006).

Das Kainat-induzierte Epilepsie-Modell dient folglich als Tiermodell für fokale Anfälle mit sekundärer Generalisierung und eignet sich neben der Charakterisierung der zugrunde liegenden Pathomechanismen auch gut für pharmakologische oder therapeutische Untersuchungen, seltener findet es Anwendung als chronisches Epilepsiemodell (Loscher *et al.* 1999, Sperk 1994, Stables *et al.* 2002).



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Arbeiten mit Tieren

#### 2.1.1. Tiere

In *ex vivo* Cokultur-Experimenten kamen neben Wildtyp-Mäusen (WT) auch *knockout* Mäuse, die defizient in der Proteinkinase MK2 oder dem Zinkfingerprotein Tristetraprolin (TTP) waren, zum Einsatz. Die MK2 defizienten (MK2<sup>-/-</sup>) Mäuse sind überlebensfähig, fruchtbar und zeigen weder im Verhalten noch in ihrer Entwicklung (z.B. Größe) einen Unterschied im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Kotlyarov *et al.* 1999). TTP *knockout* (TTP<sup>-/-</sup>) Mäuse hingegen erscheinen bei Geburt normal, entwickeln aber schnell unter anderem eine inflammatorische Arthritis, Dermatitis, Cachexia, Autoimmunerkrankung und myeloide Hyperplastie. Dies äußert sich in einem stark verringerten Wachstum sowie in einem kränklichen Aussehen der Jungtiere (siehe Abbildung 10).



Abbildung 10: Phänotyp einer WT, MK2<sup>-/-</sup> und TTP<sup>-/-</sup> Maus. (Quelle: eigenes Foto)

Die MK2<sup>-/-</sup> als auch die TTP<sup>-/-</sup> Mäuse waren sowohl auf einem reinen C57BL/6 als auch auf einem gemischten 129/Ola-C57BL/6 genetischen Hintergrund vorhanden. Experimentell konnte allerdings kein Unterschied zwischen diesen Mausstämmen festgestellt werden. Für die Tierexperimente mit MPTP und Kainsäure wurden die MK2<sup>-/-</sup> Mäuse zuvor zehnmal

rückgekreuzt, um einen reinen C57Bl/6 Hintergrund zu garantieren. WT Wurfgeschwister (*littermates*) dienten sowohl bei den Cokultur- als auch bei den Tierexperimenten als Kontrolltiere.

<b><i>Knockout</i></b>	<b>Genetischer Hintergrund</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Referenz</b>
WT	C57BL/6	Harlan Laboratories , Wurfgeschwister von MK2+/- Eltern	
MK2	C57BL/6 129/Ola-C57BL/6	Eigene Zucht	Kotlyarov <i>et al</i> , 1999
TTP	C57BL/6 129/Ola-C57BL/6	Blackshear	Taylor <i>et al</i> , 1996

**Tabelle 2:** Übersicht über die verwendeten *knockout* Mausstämme und deren genetischer Hintergrund

### 2.1.2. Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse fand unter pathogenfreien Bedingungen im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover statt. Die Tiere wurden nach Geschlechtern getrennt bis zu maximal vier Tieren in sterilen Käfigen gehalten und erhielten autoklaviertes, pelletiertes Futter sowie Trinkwasser *ad libitum*. Die Umgebungstemperatur in den vollklimatisierten Stallräumen des Tierstalles wurde konstant bei 24°C gehalten, die Luftfeuchtigkeit betrug 55%. Ein Licht-Programm regelte einen Tag-Nacht-Zyklus in zwölfstündigen Intervallen, wobei die Hellphase von 6.30-18.30 Uhr dauerte. Die Haltung erfolgte auf Standardeinstreu für Labortiere. Mindestens einmal wöchentlich wurden die Mäuse in neue Käfige umgesetzt, das Trinkwasser erneuert und Futterpellets nachgefüllt. Während des ganzen Zeitraumes wurden die Tiere von einem Tierpfleger betreut.

### 2.1.3. Verpaarung von Mäusen

Die Verpaarung der Mäuse erfolgte in einem Verhältnis von 1:1 bis 3:1 (bevorzugt 2:1) Weibchen:Männchen. Die dabei verwendeten Tiere waren mindestens acht Wochen alt. Stets wurden die Weibchen zu einem allein sitzenden Männchen in den Käfig gesetzt, da sich im umgekehrten Falle eine Kopulation aufgrund Reviermarkierung des Männchens stark verschieben kann. Zur Generierung von  $MK2^{-/-}$  Embryonen wurden homozygote *knockout* Tiere miteinander verpaart. Dies stellte sicher, dass die Nachkommen ebenfalls homozygot für den entsprechenden Genotyp waren und erübrigte eine aufwendige Genotypisierung der präparierten Embryonen. Zur Generierung von  $TTP^{-/-}$  Embryonen konnten beim Zusammensetzen von homozygoten *knockout* Mäusen wegen des ausgeprägten Phänotypes (siehe Abschnitt 2.1.1.) keine Nachkommen erhalten werden. Stattdessen mussten heterozygote (+/-) Eltern verpaart und die gewonnenen Embryonen zur Identifizierung des *knockouts* einzeln genotypisiert werden.

### 2.1.4. Plug-Test

Um Embryonen eines bestimmten Entwicklungsstadiums zu erhalten, war es notwendig, das Datum der stattgefundenen Kopulation zu bestimmen. Dieses kann mit dem sogenannten „Plug-Test“ identifiziert werden. Hierzu wurden die Verpaarungskäfige, wie unter 2.1.3. beschrieben, nach 17 Uhr zusammengesetzt und die Weibchen am nächsten Morgen um 9.00 Uhr auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes („Plug“) überprüft. Dieser Vaginalplug ist ein weißes ausgehärtetes Sekret des Spermas des Männchens und verhindert in der Natur eine weitere Befruchtung des Weibchens durch ein anderes Männchen. 16-24 Stunden nach der Kopulation, die typischerweise nachts stattfindet, fällt der Plug allerdings wieder ab. Wenn am nächsten Morgen nach Ansetzen der Verpaarungskäfige kein Plug gefunden wurden, sind die Mäuse weiter zusammengelassen und das Weibchen jeden Morgen überprüft worden, bis sich ein Plug auffinden lässt. Mäuseweibchen stellen, wenn sie ohne Männchen zusammensitzen, ihren Zyklus ein. Aus diesem Grunde kann es nach dem Zusammensetzen mit einem Männchen bis zu drei Tage dauern, bis die Weibchen wieder in ihrem Zyklus sind. Wurde nach spätestens zwei Wochen kein Plug gefunden, sind die Weibchen zu einem anderen Männchen gesetzt worden. Das Vorhandensein eines Vaginalplugs ist keine Garantie einer Schwangerschaft, sondern nur der Nachweis einer stattgefundenen Kopulation.

Deswegen wurden die Weibchen zusätzlich vor Entnahme aus den Käfigen zwecks Präparation visuell überprüft, ob sie auch wirklich schwanger sind. Der Tag, an dem ein Plug in der Vagina eines Mäuseweibchens beobachtet werden konnte, wurde als embryonaler Entwicklungstag (E) 0 bezeichnet und hiervon ausgehend der Termin für die Entnahme der Embryonen errechnet. Die tatsächliche Entwicklung der einzelnen Embryonen wurde während der Präparation zusätzlich über äußerliche Merkmale sichergestellt (Bard *et al.* 1998).

### 2.1.5. Präparation von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Zur Genotypisierung wurden den Mäusen bzw. Embryonen die Schwanzspitze abgeschnitten, in ein zuvor gekennzeichnet Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl Lysispuffer versetzt. Vor Inkubation über Nacht bei 55 °C (schüttelnd) wurde dem Lysispuffer 20 µl Proteinase K zugegeben. Am nächsten Morgen ist die DNA mittels Phenol/Chloroform extrahiert worden. Hierzu wurden 500 µl Phenol/Chloroform zu dem Lysat gegeben, für 1 min bei Raumtemperatur gemischt und anschließend für 5 min bei 11.000xg zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Überstand nach Überführung in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß wiederholt. Nach einer weiteren Überführung in ein neues Eppendorf-Gefäß wurde 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zu dem Überstand gegeben, für 1 min gemischt und bei 11.000xg für 5 min zentrifugiert. Die DNA wurde aus dem Überstand nach Zugabe von 250 µl 7,5 M Ammoniumacetat mit 750 µl Isopropanol gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol sorgfältig gewaschen und nach Lufttrocknung in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Genotypisierung wurde mit der so isolierten DNA eine Real-Time PCR durchgeführt.

### 2.1.6. Genotypisierung

Die Genotypisierung von mutanten bzw. Wildtyp-Mäusen erfolgte über Real-Time PCR mit TaqMan Proben. Bei der Verpaarung von MK2<sup>-/-</sup> Elterntieren wurden die erhaltenen Embryonen nur stichprobenartig genotypisiert, da homozygote Tiere miteinander verpaart wurden. Bei der Verpaarung heterozygoter (+/-) TTP Mäuse war die Genotypisierung eines jeden Embryos einer jeden Präparation notwendig.

<i>Genotyp</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz der Primer</i>
MK2 -/-	MK2ko1a Tneorc TAQ Neo	5'-CGT GGG GGT GGG GTG ACA TGC TGG TTG AC-3' 5'-CTG TTG TGC CCA GTC ATA GCC G-3' 5'-(6-FAM) GAT GCA GTC GGG GCG GCG CGG TC (BHQ-6-FAM)-3'
MK2 +/+	MK2 200rc TMK2 d1 TAQ MK2	5'-CCC TCT CTA CCT CTT TCT GTG AAT GCC -3' 5'-CAT GCC ATG ATG AGG TGC CTC TGC-3' 5'-(Cy5) GGG GTG ACA TGC TGG TTG ACA GAT CTT TC (BHQ2- Q)-3'
TTP -/-	TTP screen d Tneorc TAQ Neo	5'-GAG GGC CGA AGC TGC GGC TGG GT - 3' 5'-CTG TTG TGC CCA GTC ATA GCC G-3' 5'-(6-FAM) CAC GCA GAT GCA GTC GGG GCG GCG CGG TC(BHQ-6-FAM)-3'
TTP +/+	TTP screen d TTP rc2 TAQ TTP	5'-GAG GGC CGA AGC TGC GGC TGG GT - 3' 5'-GGT GGC GAT TGG CTT GGC GAA G-3' 5'-(Cy59) CCT CCT CTC GAT ACA AGA CCG AGC TCT GTC GG (BHQ-Cy5)-3'

**Tabelle 3:** Verwendete Primer bei der Genotypisierung mittels Real-Time PCR.

	<b>Vorgang</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
<i>Hot start</i>	Denaturierung	15 min	95 °C
40 PCR-Zyklen	Denaturierung	25 s	95 °C
	<i>Annealing</i> MK2/TTP	25/25 s	65/55 °C
	Elongation	60 s	72 °C
Kühlung	Kühlung	60 s	60 °C

**Tabelle 4:** Real-Time PCR-Programme zur Genotypisierung

### 2.1.7. Tierversuche

Sämtliche Arbeiten mit Tieren wurden entsprechend den Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Genehmigung der Tierexperimente erfolgte durch das Regierungspräsidium Kassel.

#### 2.1.7.1. Injektion von MPTP bzw. Kainsäure

Zur Bestimmung der Rolle der MK2 bei Parkinson bzw. Epilepsie *in vivo* wurden in der Literatur beschriebene, pharmakologische Mausmodelle gewählt. Durch systemische Injektion von MPTP entwickeln Mäuse aufgrund der Degeneration von dopaminergen Neuronen in der SNpc parkinsonähnliche Symptome. Wird hingegen die excitatorisch wirkende Substanz Kainsäure systemisch appliziert, so werden Krämpfe hervorgerufen, wie sie bei Epileptiker bekannt sind.

MPTP·HCl (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurde in autoklaviertem bzw. sterilfiltriertem PBS gelöst und intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Die Mäuse erhielten in Abständen von zwei Stunden insgesamt vier Injektionen von jeweils 18 mg MPTP·HCl pro kg Körpergewicht (4x18mg/kg MPTP·HCl). Das Injektionsvolumen betrug zwischen 200-400 µl pro Maus. Kontrolltieren wurde ein entsprechendes Volumen an PBS injiziert. Die Zuordnung der Tiere zu den Kontroll- oder Versuchsgruppen erfolgte per Zufall. Acht Tage nach der letzten Injektion wurden die Mäuse getötet und die Gehirne zur weiteren Analyse entnommen. Ausdrücklich sei hier noch einmal auf die Toxizität von MPTP hingewiesen. Aus diesem Grund wurden geeignete Sicherheitsmaßnahmen bei der Handhabung von festem bzw. gelöstem MPTP getroffen. Diese beinhalteten die Verwendung des nichtflüchtigen Salzes MPTP·HCl und nicht der leichtflüchtigen freien Base. Bei der Herstellung der MPTP-Gebrauchslösungen wurden sowohl Kittel und Nitril-Handschuhe als auch Mundschutz und Schutzbrille getragen. Restmengen von MPTP-Lösungen wurden mit schwefelsaurer Kaliumpermanganat-Lösung, welche verbliebenes MPTP oxidiert, behandelt und somit unschädlich gemacht.

Die Untersuchungen in dem Kainsäure-Modell der Epilepsie wurden alle im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Heidrun Potschka durchgeführt. Versuchstieren wurde i.p. 25 mg/kg Kainsäure (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) gelöst in 3 ml/kg isotonischer NaCl-

Lösung injiziert. Zwei Stunden nach dem ersten generalisierten Anfall wurde den Mäusen Diazepam (10 mg/kg) i.p. gespritzt, welches die Wirkung der Kainsäure aufhob. Kontrolltiere wurden mit 3 ml/kg Kochsalzlösung anstelle von Kainsäure behandelt und erhielten Diazepam wie die Versuchstiere. Alle Tiere konnten sich wenigstens sieben Tage vor Beginn der Experimente an die neue Umgebung adaptieren. Nach Versuche erfolgte eine Erholungsphase von zwei Tagen, während der sich die Tiere regenerieren konnte.

### 2.1.7.2. Rotarod-Test

Der Rotarod-Apparat ist ein speziell für Mäuse entwickeltes Laufrad, mit dem die motorische Leistung, insbesondere die Koordination der Vorder- und Hinterläufe bzw. die Gleichgewichtsfunktion, erfasst werden kann. Der Apparat besteht aus einer mit rutschfestem Gummi überzogenen Stange mit 3 cm Durchmesser, die durch einen Elektromotor angetrieben wird. Sechs undurchsichtige Plastikscheiben trennen diese Stange in fünf Abschnitte, sodass die Messung von fünf Mäusen simultan durchgeführt werden kann. Wählbare Rotationsmodi waren ein Beschleunigungsmodus oder ein Konstantmodus. Beim Beschleunigungsmodus beginnt sich die Stange mit vier Umdrehungen pro Minute zu drehen. Nach jeweils 45 sec wird die Umdrehungsgeschwindigkeit um weitere vier Umdrehungen bis zu einem Maximum von 40 Umdrehungen pro Minute beschleunigt. Auf jeder Stufe kann die Beschleunigung gestoppt werden, woraus der Konstantmodus der jeweiligen Geschwindigkeit resultiert. Für die durchgeführten Rotarod-Tests wurde der Beschleunigungsmodus gewählt. Falls die Mäuse eine Dauer von sieben Minuten auf dem Rad durchhielten, wurde der Versuch durch langsame Reduktion der Geschwindigkeit auf den Ausgangswert (Reset) gestoppt. Die Versuchstiere wurden vier Tage lang einmal pro Tag vor Versuchsbeginn trainiert. Hierbei konnten sich die Tiere an die Apparatur und das häufige Berühren und Umsetzen gewöhnen. Nach MPTP- bzw. PBS-Gabe wurden die Tiere ebenfalls einmal täglich auf dem Rotarod untersucht. Sowohl beim Training als auch bei den Experimenten wurden drei Wiederholungsmessung pro Tier durchgeführt und daraus das arithmetische Mittel gebildet.



**Abbildung 11:** Rotarod der Firma Ugo Basile.

(Quelle: <http://www.ugobasile.com/87395fa3.htm>)

### 2.1.7.3. Krampfverhalten

Nach Kainsäure-Injektion wurden die Mäuse sorgfältig beobachtet und die epileptischen Anfälle während der Überwachungsphase hinsichtlich Krampfschwere und Krampfdauer beurteilt. Der Einteilung der Krampfschwere lag eine Klassifikation nach Racine zugrunde, bei der die Anfälle in folgende Stadien eingeordnet werden (Racine *et al.* 1972):

- I. Stadium 1 ist durch Immobilität der Mäuse sowie fazile Automatismen, wie z.B. Schließen eines oder beider Augen, Starren, Zittern der Tasthaare oder stereotypisches Schnüffeln, gekennzeichnet.
- II. Charakteristisch für Stadium 2 ist stereotypisches Nicken mit dem Kopf sowie ausgeprägtere Fazialklonien, z.B. in Form von klonischen Kaubewegungen (*mastication*).
- III. In Stadium 3 zeigen die Tiere einen unilateralen Vorextremitätenklonus durch Anheben einer Vorderpfote.



IV. Dieser Vorextrimitätenklonus tritt in Stadium 4 bilateral auf und ist somit mit dem Aufrichten der Tiere verbunden (engl. *rearing*).

V. Aus Stadium 4 kann sich durch Verlust des Gleichgewichtes Stadium 5 entwickeln, wobei die Tiere nach hinten oder zur Seite umfallen und generalisierte tonische und klonische Krämpfe zeigen.

Zusätzlich zu diesen 5 „klassischen“ Stadien wurden sind noch zwei weitere Stadien bei der Beurteilung der Krampfschwere eingegangen. Ein generalisierter klonischer Anfall ohne vorheriges Aufrichten und Umfallen der Tiere wurde als zusätzliches Charakteristikum für Stadium 5 gezählt. Als Stadium 6 galt ein generalisierter klonischer Anfall mit anschließendem '*running and bouncing*' (explosionsartig einsetzendes Herumrennen in Verbindung mit hohen Sprüngen).

Die Stadien 1 – 3 resultieren aus fokaler Krampfaktivität, während die Stadien 4 – 6 ein generalisiertes Krampfgeschehen anzeigen (Loscher&Schmidt 1988). Neben der Krampfschwere wurde auch die Anfallsdauer notiert, d.h. der Zeitraum vom sichtbaren Beginn bis zum Ende eines Krampfstadiums. Als Status epilepticus wurde entweder eine kontinuierliche fokale oder generalisierte Krampfaktivität definiert oder zahlreiche Anfälle hintereinander, wobei die Tiere in den dazwischen liegenden Pausen nicht das Bewusstsein wiedererlangten.

Stadium	Epileptische Symptome
1	Immobilität, fazile Automatismen (schwache Fazialklonien)
2	Kopfnicken, ausgeprägte Fazialklonien
3	Einseitiger Vorderextremitätenklonus
4	Beidseitiger Vorderextremitätenklonus (Aufrichten)
5	Gleichgewichtsverlust, generalisierte tonische und klonische Anfälle
6	<i>‘Running and bouncing’</i>

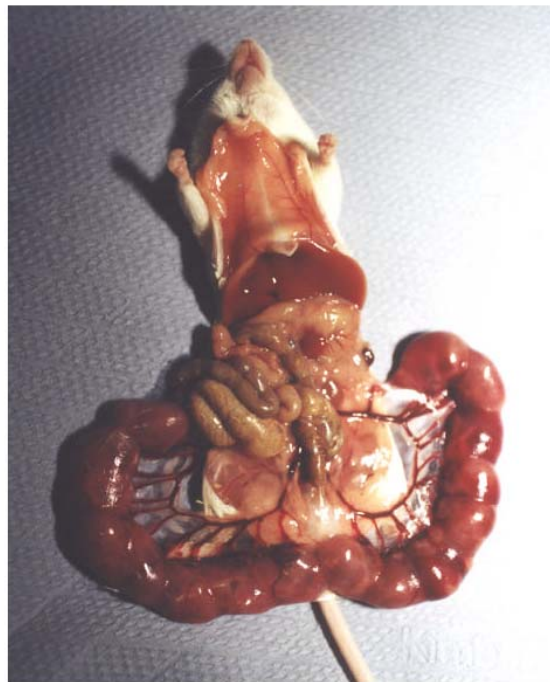
**Tabelle 5:** Charakteristika zur Beurteilung der Krampfschwere nach Racine (modifiziert)

### 2.1.8. Tötung von Mäusen

Die Muttermäuse wurden – in Übereinstimmung mit den tierschutzrechtlichen Bestimmungen – zum Zwecke der Embryonenisolation getötet. Hierzu wurden die trächtigen Weibchen entweder in einen zuvor mit CO<sub>2</sub> gefluteten Käfig gesetzt oder das Gas direkt in den Käfig mit den Tieren eingeleitet. Innerhalb von ca. 30 sec waren die Tiere verstorben. Trotzdem wurde der Tod durch anschließende zervikale Dislokation sichergestellt. Neugeborene Mäuse weisen aufgrund des fetalen Hämoglobins eine höhere Bindungsaffinität zu Sauerstoff auf als adulte Tiere. Aus diesem Grunde bräuchte es eine erheblich längere Zeit bis zum Eintritt des Todes durch CO<sub>2</sub>. Sie wurden deshalb – den tierrechtlichen Bestimmungen entsprechend - nicht vergast, sondern durch die Gioutine (Schere) getötet.

### 2.1.9. Präparation von Mausembryonen

13 bis 18 Tage nach positivem Plug-Test wurde das Muttertier getötet und die Bauchdecke des Tieres durch einen medianen Schnitt geöffnet (siehe Abbildung 12). Nach Herauspräparieren des Uterus wurde dieser zum Abwaschen des Blutes in eiskaltes PBS überführt. Anschließend wurden die Embryonen in einer mit kaltem PBS gefüllten Petrischale aus dem Uterus herauspräpariert und die Köpfe in ein ebenfalls mit kaltem PBS gefüllten 15 ml-Röhrchen überführt. Die Präparation wurde semi-steril am Laborplatz mit autoklaviertem PBS und mit Präparationsbesteck, das mit 70%igem Ethanol desinfiziert wurde, durchgeführt.



**Abbildung 12:** Geöffnete trächtige Maus. Die Embryonen sind im Uterus aufgereiht wie Perlen an einer Kette. (Quelle: unbekannt)

### 2.2. Zellkultur

#### 2.2.1. Inaktivierung von Serum

Zur Inaktivierung von Komplement wurde das bei -20 °C gelagerte fetale Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) bzw. Pferdeserum (*horse serum*, HS) über Nacht bei 4 °C aufgetaut und am nächsten Tag für 30 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Hierbei wurde das Serum alle 10 min zur Durchmischung invertiert. Anschließend wurden 50 ml Aliquots unter sterilen Bedingungen abgefüllt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.2. Generierung von ex vivo Kulturen

##### 2.2.2.1. Neuron-Glia Cokulturen aus embryonalem Mesencephalon

Primäre Neuron-Glia Cokulturen wurden aus Mittelhirnen (Mesencephali, Einzahl: Mesencephalon) von 13 Tage alten Mausembryonen unter einem biokularen Mikroskop präpariert. Aus den - wie unter Abschnitt 2.1.9. beschrieben - isolierten Köpfen wurde das Gehirn aseptisch herausgenommen und die Mesencephali abgetrennt. Nach Entfernung der Blutgefäße und Hirnhäute wurden die gepoolten Gewebe bei 800xg für 10 min pelletiert. Unter milder mechanischer Trituration mittels vorsichtigem Pipettieren durch eine blaue und gelbe Spitze wurden die Zellen in eiskaltem Kulturmedium dissoziiert und anschließend in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro 0,5 ml Medium pro *well* in einer mit Poly-L-Lysin beschichteten 24 *well* Platte ausgesät. Die so generierten Mittelhirn-Mischkulturen aus Neuronen und Gliazellen wurden im Inkubator bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Sieben bis acht Tage alte Cokulturen wurden in den Versuchen eingesetzt. Für die Experimente wurde das Medium auf Versuchsmedium umgestellt, welches neben einem reduzierten Serumanteil keine Aminosäuren enthält, um z.B. die Zytotoxizität von Glutamat zu umgehen.

Am Tag der Versuche wurde nach Trypsinierung die Gesamtzahl an Zellen durch Typanblau-Färbung bestimmt. Die Zusammensetzung der Kulturen wurde mittels Immunocytochemie bestimmt (siehe Abschnitt 2.5.1.). Zur Quantifizierung der einzelnen Zelltypen wurden bei eine Vergrößerung von 40x (dopaminerge Neurone) bzw. 100x (Astrozyten, Neurone, Mikroglia) neun repräsentative Bereiche pro *well* einer 24-*well*-Platte im Mikroskop

ausgezählt. Die Kulturen setzten sich aus ~47% Astrozyten, ~42% Neurone, ~10% Mikroglia und ~1-2% dopaminerge Neurone zusammen. Weder in der Gesamtzahl an Zellen noch in der Zellkulturzusammensetzung gab es einen Unterschied zwischen den verschiedenen Mausstämmen.

### Kulturmedium

DMEM *high glucose* mit GlutaMAX I + Na-Pyruvat  
+ 5% FCS  
+ 5% HS  
+ 1% non-essential aminoacids  
+ Pen/Strep

### Versuchsmedium

DMEM *high glucose* mit GlutaMAX I + Na-Pyruvat  
+ 1% FCS  
+ 1% HS  
+ Pen/Strep

---

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Medien für die Cokulturen.

#### 2.2.2.2. Neuronen angereicherte Kulturen

Zur Generierung von Neuronen angereicherten Kulturen wurden Mischkulturen wie oben beschrieben angelegt. Zwei Tage nach Aussaat wurde AraC (Cytosine-D-arabinofuranoside) in einer Konzentration von 10  $\mu$ M für eine Dauer von zwei bis drei Tagen dem Kulturmedium zusetzt. AraC inhibiert die Replikation und verhindert somit die Proliferation von Zellen. Im Falle von Neuron-Glia-Mischkulturen betrifft dies nur die Gliazellen, welche dadurch zugrunde gehen. Nach den 2-3 Tagen Behandlungszeit wurde das Medium wieder auf AraC-freies Kulturmedium umgestellt. Die so generierten Neuronen angereicherten Kulturen wurden nach sieben bis acht Tagen, gemessen vom Zeitpunkt der Aussaat, in die Experimente eingesetzt.

### 2.2.3. Kultivierung von Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert und bei Bedarf, meist zwei- bis dreimal die Woche, gesplittet. Es wurden folgende Zellkultur-Medien verwendet:

#### **PC12 Zellkulturmedium**

RPMI mit GlutaMAX I + Na-Pyruvat  
+ 5% FCS  
+ 10% HS  
+ Pen/Strep

#### **SH-SY5Y Zellkulturmedium**

RPMI mit GlutaMAX I + Na-Pyruvat  
+ 10% FCS  
+ Pen/Strep

#### **C17.2 Zellkulturmedium**

DMEM *high glucose* mit GlutaMAX I + Na-Pyruvat  
+ 10% FCS  
+ 5% HS  
+ Pen/Strep

#### **HEK 293, MEF und RAW 262.3 Zellkulturmedium**

DMEM *high glucose* mit GlutaMAX I + Na-Pyruvat  
+ 10% FCS  
+ Pen/Strep

---

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.

### 2.2.3.1. PC12 Zellen

Zur Langzeitkultivierung von PC12 Zellen wurden diese in 5 – 6 ml PC12-Medium in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gehalten. Sie wurden in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 gesplittet. Zur Passage wurde die Zellsuspension bei 800xg für 5 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und einmaligem Waschen mit sterilem PBS wurden die Zellen vorsichtig in 1 ml PC12-Medium aufgenommen und 100 µl bis 500 µl in eine neue Zellkulturflasche überführt, in der bereits 10 ml frisches PC12-Medium vorgelegt war.

### 2.2.3.2. RAW 262.3 Zellen

Die murine Makrophagenzelllinie RAW 262.3 wurde in 10 ml Makrophagenmedium in 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert. Sie wurden in einem Verhältnis von 1:2 bis maximal 1:4 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml frisches Makrophagenmedium auf die Zellen gegeben und die Zellen mittels eines Zellschabers vom der Schale gelöst. Nach vorsichtigem, zehnmaligem Auf- und Abpipettieren durch eine blaue Spitze wurden entsprechend des gewählten Verhältnisses 500 µl bis 1 ml der Zellsuspension in eine zuvor mit 10 ml frischen Makrophagenmedium versehende Zellkulturschale überführt.

### 2.2.3.3. Passage von C17.2, MEF und SH-SY5Y Zellen

Die neuronale Stammzelllinie C17.2 ist eine stark proliferierende Zelllinie. Aus diesem Grunde musste diese in einem Verhältnis von 1:8 bis 1:20 passagiert/gesplittet werden. Zur Zellzählung wie auch bei Kultivierung mussten die anhaftenden Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung gelöst werden. Hierzu wurde nach Abnahme des verbrauchten Wachstumsmediums und Waschen mit kaltem PBS 2 ml der Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und bei 37 °C im Brutschrank für 2 min inkubiert (Trypsinierung). Dabei werden durch das Trypsin Verbindungen von Adhäsionsproteinen zwischen den Zellen und zwischen Zellen und Flaschenwand gespalten. EDTA bildet dabei mit zweiwertigen Ionen, die für eine Zell-Substratbindung unbedingt erforderlich sind, Komplexe. Durch Zugabe von 10 ml frischen Mediums und mehrmaligem Spülen wurden die Zellen von der Kulturflaschenoberfläche abgelöst. Nach Zentrifugation bei 800xg für 5 min wurden die

pelletierten Zellen in 1 ml frischem C17.2-Wachstumsmedium aufgenommen und ein Aliquot von 50 – 125  $\mu$ l, in eine mit 10 ml frischem C17.2 Wachstumsmedium gefüllte Schale überführt.

### 2.2.3.4. HEK293-Zellen

Die humane adhärent wachsende Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney*) wurde bei Bedarf im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 gesplittet. Hierzu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit sterilem PBS gespült. Da HEK293 Zellen nicht stark an der Zellkulturschale adhären, können sie durch Spülen mit frischem Zellkultur-Medium gelöst und direkt - dem gewünschten Verhältnis entsprechend - in eine mit Medium gefüllte Schale überführt werden.

## 2.2.4. Behandlung von Zellen mit Substanzen

### 2.2.4.1. Depolarisation von PC12 Zellen und Behandlung mit Forskolin

Als Modell für eine Depolarisation wurden PC12 Zellen in Gegenwart von 50 mM KCl inkubiert. Des Weiteren wurden zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration verschiedenen Zelllinien mit Forskolin (Fsk) (Firma Alexis), einem starken Aktivator der Adenylatzyklase, in einer Endkonzentration von 50  $\mu$ M stimuliert. Die Analyse der MK2-Genexpression zu bestimmten Zeitpunkten erfolgte in Northernblot- und Westernblot-Experimenten.

### 2.2.4.2. Stimulation von Makrophagen und Cokulturen mittels LPS

Makrophagen als auch Mikroglia gehören immunologisch betrachtet zum angeborenen Immunsystem. Ihre Aufgabe besteht in der Aufnahme (Phagozytose) von Fremdstoffen, toten Zellen oder Zellfragmenten. Nach Phagozytose werden Makrophagen/Mikroglia aktiviert, so dass sie Cytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 usw., ausschütten.

Um Makrophagen bzw. Mikroglia in Cokulturen zu aktivieren, wurden diese mit 1  $\mu$ g/ml Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* (Sigma) inkubiert.



### 2.2.4.3. Induktion von Apoptose (SNP, TNF)

Natrium-Nitroprussid (engl. *sodium nitroprusside*, SNP) ist ein NO-Donor und wird häufig bei Untersuchungen zur NO-vermittelten Apoptose von Zellen eingesetzt.

Zur Induktion der Apoptose in Neuronen wurden die Substanzen SNP (Alexis) und TNF $\alpha$  (Sigma) in den Konzentrationen 100  $\mu$ M bzw. 20 ng/ml gegeben.

### 2.2.4.4. Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Zur Inhibition der Aktivität unterschiedlicher intrazellulärer Enzyme wurden kommerziell erhältliche Inhibitoren eingesetzt. Es wurden SB203580 (Calbiochem) zur Inhibition der p38 MAPK, PD184352 (Sigma) zur Inhibition des MEK-ERK-Signalweges, L-NMMA zur Inhibition von iNOS (Alexis) sowie MK2-I (Muster der Firma Bayer Schering Pharma) zur Inhibition von MK2 eingesetzt. Diese wurden 30-60 min vor Stimulation mit den jeweiligen Substanzen dem Zellkulturmedium zugesetzt, um eine möglichst quantitative Inhibition zu gewährleisten. Die Zugabe der Stimulatoren erfolgte in Gegenwart der Inhibitoren.

### 2.2.5. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Eine erfolgreiche Kryokonservierung von Zellen ist von einer möglichst langsamen Abkühlung und von der Gegenwart einer der Kristallisierung vorbeugenden Substanz, wie z.B. DMSO (Dimethylsulfoxid), abhängig. Zur Langzeitlagerung wurden logarithmisch wachsende Zellen sedimentiert, in 500  $\mu$ l Kulturmedium mit auf 20% erhöhtem FCS-Gehalt und 10% DMSO-Anteil aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach langsamem Abkühlen auf -80 °C über Nacht mittels einer speziellen Einfrierbox (Firma) wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die gelagerten Zellen durch schnelles Auftauen bei 37 °C in einem Wasserbad revitalisiert und sofort in 10 ml frischen Zellkulturmedium gegeben. Durch Zentrifugation bei 800 x g für 5 min und Abnahme des Überstandes wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO entfernt. Anschließend konnten die Zelllinien wie unter Abschnitt 3.2.3 beschrieben kultiviert werden.

### 2.2.6. Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Um ein adhärentes Anwachsen der Cokulturen zu gewährleisten, mussten die Kulturgefäße vorher mit Poly-L-Lysin beschichtet werden. Hierzu wurden je 500 µl einer 20 µg/ml Poly-L-Lysin-Stammlösung in jedes *well* einer 24 *well* Platte gegeben und über Nacht unter der Zellkulturbank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgesaugt und die Platten bei RT getrocknet. So hergestellte beschichtete Kulturplatten können direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

### 2.2.7. WST-1 Assay

Der WST-1 Assay der Firma Roche ist ein colormetrischer Test zur Quantifizierung der Lebend-Zellzahl in Zellkulturen. Das Prinzip des Assays beruht analog zum klassischen MTT-Assay auf der Umsetzung eines Tetrazolium-Salzes (WST-1, MTT) zum farbigen Produkt Formazan durch ein mitochondriales Enzym.

Zu den in 24 *well* Platten wachsenden Neuronen-angereicherten Kulturen wurden 24 Stunden nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen 50 µl WST-1 Reagenz (entspricht einem Zehntel des Kultivierungsvolumens) gegeben und die Reaktion bei 37 °C im Inkubator durchgeführt. Nach visueller Kontrolle (meistens 60 min) der Farbentwicklung wurde die Absorption bei 450 nm und 650 nm im ELISA-Reader gemessen.

### 2.2.8. Kristallviolett-Färbung

Die Färbung mit dem Triphenylmethan-Farbstoff Kristallviolett werden lebende Zellen durch Bindung des Farbstoffes an DNA-assoziierte Nukleoproteine angefärbt. Die Färbung ist reversibel und kann durch Behandlung mit 70%iger Ethanollösung wieder rückgängig gemacht werden. Hierbei ist die optische Dichte des Extraktes proportional zur Zellmasse.

Die Zellen wurden nach Abnahme des Überstandes einmal mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd für 10-30 min bei RT fixiert. Nach Abnehmen der Paraformaldehyd-Lösung und einem weiteren Waschschrift erfolgte die Kristallviolett-färbung (1% Kristallviolett in 50% Ethanol) für mindestens 10 min. Anschließend wurden die Kulturschalen zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff gründlich mit H<sub>2</sub>O gewaschen und bei Raumtemperatur

getrocknet. Die Extraktion der Farbe erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 70%igem Ethanol. Quantifiziert wurde mittels Detektion der Absorption bei 595 nm.

### 2.2.9. Trypanblau-Färbung

Die Bestimmung der Lebend-Zellzahl wurde mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstestes durchgeführt. Der Farbstoff Trypanblau lagert sich an cytoplasmatische Proteinstrukturen und kann nur bei defekter Plasmamembran ins Cytoplasma gelangen. Lebende Zellen mit intakter Membran werden im Gegensatz zu absterbenden oder toten Zellen nicht blau angefärbt.

Ein Aliquot der zu zählenden Zellsuspension wurde nach Vorverdünnung mit dem gleichen Volumen einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung (Sigma) vermischt und nach kurzer Inkubation in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus der mittleren Anzahl der lebenden Zellen der vier Großquadrate multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert mit dem konstanten Faktor  $10^4$  (Volumenfaktor der Zählkammer).

## Analytische Methoden

### 2.3. Proteinbiochemische und immunologische Methoden

#### 2.3.1. Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS von der Zellkulturschale mittels eines Zellschabers oder durch Trypsinierung gelöst und bei 800xg zentrifugiert. Die Extraktion der Proteine erfolgte durch Resuspendieren in Proteinlysispuffer (CelLytic M, Sigma), der Proteaseinhibitoren (*protease inhibitor cocktail complete mini EDTA-free*, Roche) sowie Phosphataseinhibitoren (*phosphatas inhibitor cocktail I und II*, Sigma) enthielt. Nach Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Lysate bei 16.000xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationen der so hergestellten Proteinlösungen wurden mittels eines Bradford Assays bestimmt.

### 2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Proteinkonzentrationen in Lösung wurden nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford 1976). Die Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue G250* an Proteine in saurer Lösung. Es entsteht ein blauer Farbkomplex, der bei einer Wellenlänge von 595nm photometrisch quantifiziert werden kann. Verwendet wurde der Mikroassay der Firma BioRad.

Die Proteinlösungen wurden so 1:10 bzw. 1:20 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt, dass ein Gesamtvolumen von mindestens 30 µl gegeben war. Parallel hierzu wurde jedes Mal eine Standardreihe von BSA mit den Konzentrationen 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml und 0,6 mg/ml angesetzt. Zu 1 ml Farbreagenz (1:5 Verdünnung der BioRad-Stammlösung) wurden 20 µl Probe bzw. Standard gegeben und nach Mischen für mindestens 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595nm bestimmt. Als Referenz diente 1 ml Farbreagenz mit 20 µl dH<sub>2</sub>O. Anhand der mitgeführten Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der gemessenen Lösung errechnet werden.

### 2.3.3. Westernblot

Als Westernblot wird der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran bezeichnet. Es handelt es sich um ein empfindliches Verfahren zum spezifischen Protein-Nachweis. Der Westernblot verbindet die hohe Trennschärfe der Gel-Elektrophorese mit der Spezifität der Antikörper-Erkennung und der Empfindlichkeit von Enzym-Assays. Dieses Dreischritt-Verfahren wird eingesetzt, um Proteine zunächst zu trennen und dann ein bestimmtes Protein nachzuweisen.

#### 2.3.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels eindimensionaler SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in einem diskontinuierlichen System unter denaturierenden Bedingungen. Benutzt wurde ein vertikales Gelsystem der Firma BioRad. Die Gele hatten eine Schichtdicke von 1,5 mm. Die Zusammensetzung des 5%igen Sammelgels und der verwendeten Trenngele kann in Tabelle 8 nachgelesen werden.

Nach dem Gießen der Gele wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 96 °C gekocht. Nach kurzer Zentrifugation wurden die so behandelten Proteinlösungen auf das SDS-Gel aufgetragen und bei 90 V in SDS-Laufpuffer gesammelt. Nach Übergang in das Trenngel wurde die Spannung auf 110 V erhöht und die Proteine solange getrennt bis die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreichte. Bei jedem Gellauf wurde ein vorgefärbter Proteinmarker zur Bestimmung des Molekulargewichtes der nachgewiesenen Proteine mitlaufen gelassen.

Zutat	Volumen (ml)	Zutat	Volumen (ml)
<b>Sammelgel (5%)</b>		<b>Trenngel (10%)</b>	
H <sub>2</sub> O	2,1	H <sub>2</sub> O	5,9
30% Acryl-Bisacrylamid Mix	0,5	30% Acryl-Bisacrylamid Mix	5,0
1,5 M Tris-Puffer (pH 6,8)	0,38	1,5 M Tris-Puffer (pH 6,8)	3,8
10% SDS	0,03	10% SDS	0,15
10% Ammoniumpersulfat	0,03	10% Ammoniumpersulfat	0,15
TEMED	0,003	TEMED	0,006
<b>SDS-Laufpuffer</b>		<b>Trenngel (12%)</b>	
Tris-HCl	250 mM	H <sub>2</sub> O	4,9
Glycin	192 mM	30% Acryl-Bisacrylamid Mix	6,0
SDS	1 %	1,5 M Tris-Puffer (pH 6,8)	3,8
		10% SDS	0,15
		10% Ammoniumpersulfat	0,15
		TEMED	0,006

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele bei der SDS-Gelelektrophorese

### 2.3.3.2. Proteintransfer und Immundetektion

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im sogenannten *Semidry*-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu wurden zwei Whatman-Filterpapiere und das Proteingel im Kathodenpuffer sowie drei weitere Whatman-Filterpapiere und die Nitrozellulose-Membran im Anodenpuffer äquilibriert. Anschließend wurde ein Blotsandwich in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf der Blotapparatur (Sigma) zusammengestellt: 3x Whatmanfilter, Nitrozellulose, SDS-Gel, 2x Whatmanfilter. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von ca. 45 mA pro Blot ( $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ ) bei maximal 20V für 90 min auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen.

Zur Immundetektion wurde die Nitrozellulose-Membran nach kurzem Waschen mit PBS zur Absättigung der unbesetzten Proteinbindungsstellen mit Blocklösung für 60 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die primären Antikörper hinzugegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zum Nachweis des gebundenen Primärantikörpers folgte am nächsten Tag nach dreimaligem Waschen mit PBST für je 5 min eine Inkubation für 60 min bei RT mit *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper in Blocklösung. Anschließend wurde die Membran wiederum dreimal gewaschen und mit 1 ml Luminol-Reagenz der Firma Santa Cruz benetzt. Die dabei ablaufende Chemilumineszenz-Reaktion an den Stellen der Antikörperkomplexe konnte mit Hilfe des Dokumentationssystems LAS-3000 (Fuji) detektiert werden.

Zutat	Finale Konz.	Zutat	Finale Konz.
<b>Anodenpuffer</b>		<b>Kathodenpuffer</b>	
Tris-HCl, pH 10.4	300 mM	Tris-HCl, pH 9.4	25 mM
Methanol	20 %	E-Aminocaprinsäure	40 mM
		Methanol	20 %
<b>PBST</b>			
Tween 20 in PBS	0,1 %		

**Tabelle 9:** Zusammensetzung des Anoden- und Kathodenpuffers beim Westernblot

### 2.3.3.3. Membranstripping

Die auf Nitrozellulose gebundenen Antikörperkomplexe können wieder gelöst werden (*strippen*). Hierzu wird die Membran für maximal 30 min bei 50 °C mit *Stripping*-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST kann eine erneute Immundetektion gegen ein weiteres Protein erfolgen. Bei längerer Inkubation als 30 min mit *Stripping*-Puffer besteht die Gefahr der Ablösung von Protein von der Nitrozellulose-Membran. Nach diesem Verfahren konnte eine Nitrozellulose-Membran bis zu fünfmal ohne Verlust an Signalstärke behandelt werden.

Zutat	Finale Konzentration
Tris pH 6,8	62,5 M
SDS	2%
Kann so bei RT gelagert werden.	
Vor Verwendung frisch dazugeben:	
β-Mercaptoethanol	100 mM
	(35 µl / 5 ml)

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des *Stripping*-Puffers.

### 2.3.4. Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation (IP) wird durch die Interaktion eines spezifischen Antikörpers mit seinem Antigen und anschließender Bindung dieser Immunkomplexe an eine Matrix selektiv ein Protein aus einem Proteingemisch isoliert. In anschließenden Analysemethoden sind die erhaltenen Ergebnisse spezifisch für dieses Protein. So können mittels Immunpräzipitation Protein-Bindungsstudien durchgeführt werden, indem ein Protein immunpräzipitiert und ein anderes Protein anschließend im Westernblot nachgewiesen wird (Coimmunpräzipitation). Des Weiteren können mittels Immunpräzipitation manche Expressionsstudien erst ermöglicht werden, da das zu untersuchende Protein antigener in einem Westernblot reagieren, so dass es überhaupt erst nachweisbar wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinkinase MK2 aus Gesamtlysat präzipitiert und deren Aktivität in einem Kinase Assay untersucht.

300 µg Gesamtprotein sowie 500 µl IP-Puffer und 5 µl MK2-Antiserum (Schultz *et al.* 1997) wurden auf Eis miteinander gemischt. Nach Zugabe von 30 µl einer 50%igen Suspension von in IP-Puffer äquilibrierter Protein G-Sepharose wurde die Lösung bei 4 °C über Nacht taumelnd/rotierend inkubiert. Am nächsten Tag konnte nach fünfmaligem Waschen mit IP-Puffer die Kinase-Reaktion durchgeführt werden.

### 2.3.5. Kinase-Assay

Zum Nachweis der Aktivität von Proteinkinasen macht man sich deren Eigenschaft das  $\gamma$ -Phosphat von ATP auf ihre Substrate zu übertragen zu nutze. Durch Gebrauch von radioaktiv markiertem  $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP und rekombinanten Hsp25 als Substrat wurde die MK2 Kinase-Aktivität nach SDS-PAGE als Inkorporation von Radioaktivität in Hsp25 mittels eines Phospho-Imagers (Fuji Bas-1500) visualisiert.

In einem typischen Experiment wurden zu 10 µg Gesamtlisat bzw. nach Immunpräzipitation zu den Beads 10 µl Substrat-Puffer und 5 µl ATP-Mix gegeben und für 30 min bei 30 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 µl 4xSDS-Loadingbuffer gestoppt. Nach SDS-PAGE mit 12%igen Gelen wurden diese im Vakuum getrocknet und der Einbau von  $\gamma^{33}\text{P}$ Phosphat in Hsp25 am Phospho-Imager detektiert. Die Zusammensetzung des auf Eis angesetzten Substrat-Puffers bzw. ATP-Mixes ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Zutat	Volumen (ml)	Zutat	Volumen (ml)
<b>Substrat-Puffer</b>		<b>ATP-Mix</b>	
10x Reaktionspuffer	2,5 µl	1 M Mg-Azetat	20 mM
rekombinantes Hsp25	10 µg	10 mM ATP	0,5 mM
Proteinkinase-Inhibitor	6,25 µM	$\gamma^{33}\text{P}$ -ATP	1 µCi
HA/H7	6,25 µM	dH <sub>2</sub> O	add 5 µl
dH <sub>2</sub> O	add 10 µl		
		<b>Reaktionspuffer</b>	
		EDTA pH 7,4	1 mM
		Na- $\beta$ -glycerophosphat	500mM

**Tabelle 11:** Zusammensetzung des Substratpuffers, des ATP-Mixes und des Reaktionspuffers für den MK2-Kinase-Assay.



### 2.3.6. Trocknung von Acrylamid-Gelen im Vakuum

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine durch Färben der Gele mittels Coomassie-Lösung für 20 min im Gel fixiert. Anschließend wurden die Gele auf zwei 1mm starke Filterpapiere (Schleicher&Schüll) gebracht und nach Abdecken mit Frischhaltefolie für 2,5 h bei 80 °C im Vakuum getrocknet.

### 2.3.7. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Produktion der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-10, IL-12, IL-6 und KC wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs) der Firma R&S Systems gemessen. Nach 4 h bzw. 24 h Stimulation mit LPS wurden die Konzentrationen von TNF $\alpha$  bzw. den anderen Zytokinen im Zellkulturmedium nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dabei wurde die Farbentwicklung nach visueller Überprüfung durch Zugabe von *stop solution* beendet und die optische Dichte bei 450 nm detektiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer bei jedem ELISA mitgeführten Standardreihe.

### 2.3.8. Bestimmung der Proteinhalbwertszeit mittels Cycloheximid

Zur Untersuchung von Proteinstabilitäten wird häufig das Antibiotikum Cycloheximid benutzt. Cycloheximid ist ein Imidazolderivat, das an die kleine 18S Untereinheit der Ribosomen bindet, eine Bildung von funktionstüchtigen Ribosomen bestehend aus 28S und 18S Untereinheit verhindert und somit den Fortgang der Translation inhibiert.

Die Proteinstabilität von MK2 wurde in PC12 Zellen analysiert. Hierzu wurde die MK2 Proteinexpression durch eine 16 stündige Inkubation mit Forkolin induziert und die Translation durch Zugabe von Cycloheximid (10  $\mu$ M final) gestoppt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Zelllysate erstellt und das gegenwärtige Level an MK2 Protein in Westernblot Experimenten detektiert. Der Nachweis des instabilen Proteins ERK3 diente dem Nachweis einer funktionellen Inhibition der Translation durch Cycloheximid.

### 2.4. Molekularbiologische Methoden

#### 2.4.1. Isolierung von RNA

Gesamt-RNA aus Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Hierzu wurden geerntete Zellen mittels Zentrifugation pelletiert und in 350  $\mu$ l RLT-Puffer, der zuvor mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt wurde (10  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol auf 1 ml RLT-Puffer), durch Auf- und Abpipettieren solange lysiert bis keine Zellklumpen mehr sichtbar waren. Nach Homogenisieren der Lysate mittels Zentrifugation (11.000g, 2 min) durch eine QIAshredder-Säule wurden der Lösung 350  $\mu$ l 70%iges Ethanol zugegeben und die RNA durch Zentrifugation (11.000g, 1 min) an eine RNeasy-Säule gebunden. Nach einmaligem Waschen mit 700  $\mu$ l RW1-Puffer und zweimaligem Waschen mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer wurde die Säule in ein sauberes RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und 50  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O mittig auf die Säule gebracht. Die Elution der RNA erfolgte nach einer Inkubationszeit von 1 min bei RT durch Zentrifugation (11.000g, 1 min).

#### 2.4.2. Konzentrationsbestimmung von RNA

Mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie kann die Konzentration sowie die Reinheit der isolierten RNA bestimmt werden.

Hierzu wurde ein kleines Volumen (2-5  $\mu$ l) der vorliegenden RNA-Lösung mit dH<sub>2</sub>O 1:20 – 1:100 verdünnt und in einer Quarzküvette die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Leerwert diente H<sub>2</sub>O in derselben Küvette. Bei sauberer RNA sollte das Extinktionsverhältnis  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  bei ungefähr 1,8 liegen. Ein zu geringer Wert deutet auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, welche bei 280 nm absorbieren. Die Konzentration wird über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Ein Wert von  $OD_{260 \text{ nm}} = 1,0$  entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu$ g/ml.

### 2.4.3. Agarose-Gelelektrophorese

Ein Verfahren zur Auftrennung von DNA bzw. RNA-Molekülen in einem elektrischen Feld ist die Agarose-Gelelektrophorese. Die dabei eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung der Fragmente bzw. die nachzuweisende RNA erfolgen soll. Hierbei gilt je höher die Agarosekonzentration des Gels ist, desto besser ist die Auftrennung für kleine Moleküle. Sowohl die DNA- als auch die RNA-Agarose-Gelelektrophorese wurde in horizontalen Gelsystemen durchgeführt.

#### a) DNA-Gele:

Für die Analyse von DNA in Form von PCR-Produkten wurde das Gelsystem der Firma Biometra benutzt.

Zur Herstellung von 1%igen (w/v) DNA-Agarosegelen wurden 0,25 g Agarose durch kurzes Aufkochen in 25 ml TAE-Puffer, welcher auch als Laufpuffer dient, gelöst. Nach Abkühlen für wenige Minuten wurden 1,5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel zum Aushärten in die Gelkammer gegossen. Vor dem Auftragen wurde die DNA enthaltene Lösung mit 5x Probenpuffer versetzt. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde jeweils 5 µl des Molekulargewichtsmarkers Hyperladder I der Firma Bionline mit aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 90 V und maximaler Stromstärke. Die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten DNA-Fragmente konnten im UV-Licht analysiert werden. Bei der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen ist zu berücksichtigen, dass ringförmige entspannte DNA eine geringere und ringförmige überspiralisierte (*supercoiled*) DNA eine größere elektrophoretische Mobilität als lineare DNA aufweist.

#### b) RNA-Gele:

RNA ist im Gegensatz zu DNA aufgrund der chemischen Struktur (Vorhandensein einer Hydroxygruppe an Position 2 der Ribose) sowie aufgrund der ubiquitär verbreiteten und zudem sehr stabilen Ribonucleasen (RNasen) wesentlich anfälliger für einen Abbau. Zudem liegt RNA als Einzelstrang vor, so dass RNA-Moleküle eine wesentlich höhere Anzahl an Sekundärstrukturen bilden als DNA-Moleküle. Aus diesen Gründen muss bei der elektrophoretischen Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen und mit von RNasen befreiten Reagenzien und Gelsystemen gearbeitet werden. Zu diesem Zwecke wurde zum einen das Nukleinsäuren-denaturierende Formaldehyd sowohl dem Agarosegel als auch

## Material und Methoden

---

dem Laufpuffer zugegeben. Zum anderen wurden nur für RNA-Gelelektrophorese vorgesehene Gelkammern benutzt, die vor jedem Lauf mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gereinigt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült wurden. Alle Lösungen wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt und während der Arbeit mit RNA Handschuhe getragen. Die Gelelektrophorese von RNA erfolgte in Gelkammern der Firma Sigma.

Zum Gießen 1%iger RNA-Gele wurden 1,5 g Agarose mit 108 ml DEPC-H<sub>2</sub>O solange in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat und keine Schlieren in der Lösung mehr zu sehen waren. Nach Abkühlen auf ungefähr 60 °C wurden 27 ml 37% (w/v) Formaldehydlösung sowie 15 ml 10x MOPS-Puffer unter dem Abzug hinzugegeben und das Gel ebenfalls unter dem Abzug in die Gelkammer gegossen. Während des Aushärtens des Gels wurden die RNA-Proben auf Eis vorbereitet. Nach Mischen von 10 µg Gesamt-RNA und RNA-Mastermix (siehe Tabelle 12) im Verhältnis 1:1 wurden die Proben bei 65 °C für 10 min denaturiert. Für die Dauer der Denaturierung wurde das bereits ausgehärtete Gel bei einer Spannung 100 V und maximaler Stromstärke vorlaufen gelassen. Nach Denaturierung wurde das Gel mit den Proben geladen und der Gellauf mit 1x MOPS als Laufpuffer gestartet.

Zutat	Volumen
<b>RNA-Mastermix</b>	
10x MOPS	12,5 µl
Formaldehyde, 37%ig	21,5 µl
Formamide	62,5 µl
Ethidiumbromid	2,5 µl
<b>10xMOPS</b>	
MOPS	2,0 M
Natriumazetat x 3 H <sub>2</sub> O	50 mM
mit Eisessig einstellen	pH 7
EDTA	10 mM
RNase-freies H <sub>2</sub> O	

**Tabelle 12:** Pippettierschema für das Ansetzen von 100µl RNA-Mastermix.

### 2.4.4. Northernblot

Der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA auf eine Trägermembran wird als Northernblot bezeichnet. Die Detektion erfolgt mittels Hybridisierung spezifischer fluoreszenz- bzw. radioaktiv-markierter Sonden, die durch Auflegen eines Röntgenfilms bzw. in einem PhosphorImager sichtbar gemacht werden können.

#### 2.4.4.1. Transfer von RNA auf Nylonmembran

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das RNA-Gel unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellens zurecht geschnitten und anschließend dreimal je 5 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen, um noch vorhandene Formaldehydreste zu entfernen. Während das Gel in 10x SSC-Puffer (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumzitat x 2 H<sub>2</sub>O, pH 7.0) äquilibrierte wurden vier Whatman-Filterpapiere und ein Stück Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham, England) in Größe des RNA-Gels zurechtgeschnitten und ebenfalls für 3 min in 10x SSC-Puffer getaucht. Anschließend wurde ein Blotsandwich in der Reihenfolge Salzbrücke, zwei Whatman-Filterpapiere, RNA-Gel, Nylonmembran und zwei Whatman-Filterpapiere in einer Wanne luftblasenfrei übereinander gelegt. Um den durch Kapillarkräfte vermittelte Transfer der RNA aus dem Gel auf die positiv geladenen Nylonmembran zu verstärken, wurden auf das Blotsandwich noch ungefähr 20 zurechtgeschnittene Papierhandtücher gelegt und das Ganze gegen umfallen geschützt mit Klebeband befestigt. Die Übertragung erfolgte bei RT über Nacht und konnte am nächsten Tag anhand der roten rRNA-Banden visuell überprüft werden.

#### 2.4.4.2. Generierung der DNA-Hybridisierungssonde

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde erfolgte mit Hilfe des *Megaprime Labeling Kit* der Firma Amersham.

50 ng spezifisches PCR-Produkt (siehe Punkt 2.4.5.2.), 12,5 µl dH<sub>2</sub>O und 5 µl Primer wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert und die Lösung langsam auf RT abgekühlt. Anschließend wurden 5 µl Reaktionspuffer, jeweils 4 µl dCTP, dGTP und dTTP sowie 5 µl α<sup>33</sup>P-ATP hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl Enzym gestartet und für 30-60 min bei 37 °C durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 5 µl 0,2 M EDTA dem Reaktionsansatz zugegeben und die Sonde mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen nach

## Material und Methoden

---

Angaben des Herstellers aufgereinigt. 1 µl der aufgereinigten Sonde wurde auf einem Papier durch Messung mit einem Geiger-Müller-Zählrohr überprüft und anschließend der Rest der Sonde dem Hybridisierungspuffer zugegeben.

### 2.4.4.3. Hybridisierung und Detektion

Nach erfolgreichem Transfer der RNA wurde die Nylonmembran bei RT getrocknet und die RNA mittels UV-Licht in einem sogenannten Crosslinker kovalent an die Membran gebunden. Alle anschließenden Hybridisierungsschritte wurden mit dem RAPID-HYB Puffer der Firma Amersham in einem Hybridisierungsofen durchgeführt. Nach einer Vorhybridisierung für 2-4 h bei 62 °C wurde die jeweilige <sup>33</sup>P-markierte Sonde dem Puffer zugegeben und über Nacht bei ebenfalls 62 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Blots zweimal mit Waschpuffer 1 (2xSSC, 0,1% SDS) und dreimal mit Waschpuffer 2 (0,1xSSC, 0,1% SDS) für je 20 min bei 68 °C gewaschen. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte durch Auflegen einer PhosphorImager-Platte und Visualisierung im PhosphorImager Bas-1500 der Firma Fuji.

## 2.5. Zellbiologische Methoden

### 2.5.1. Immunzytochemie

Zur Visualisierung einzelner Zelltypen in den Cokulturen wurden diese am Ende des Behandlungszeitraumes zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen für 20 min bei RT mit 4% Paraformaldehyde (PFA) in PBS fixiert. Nach Waschen mit PBS (2x) wurden die Zellen durch eine Behandlung für 5 min bei RT mit PBS, das 0,5% Triton X-100 enthielt, permeabilisiert. Anschließend wurde die Kulturen erneut mit PBS gewaschen (3x) und die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation der Zellen für 60 min bei RT mit *Blocking Solution* (PBS, 3% normal goat serum, 0,5% Triton X-100) geblockt. Die Kulturen wurden dann über Nacht bei 4 °C mit primärem Antikörper verdünnt in *Blocking Solution* inkubiert. Am nächsten Tag wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Es folgte eine Inkubation von 60 min mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper in PBS. Nach erneutem Waschen mit PBS (3x) konnten die so behandelten Kulturen an einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Alle Waschschritte wurden für je 5 min bei RT durchgeführt.

Neurone wurden mit einem Antikörper gegen das Protein  $\beta$ III-Tubulin, das im Cytoplasma und somit im Zellkörper (Soma) als auch in den Neuriten exprimiert wird, identifiziert. Dopaminerge Neurone wurden mit einem Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (TH), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym bei der Dopamin-Synthese, Mikroglia mit einem Antikörper gegen das Oberflächenprotein MAC-1 nachgewiesen. Astrozyten wurden mit einem Antikörper gegen das *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP), einem Intermediärfilament, dessen Expression auf Astroglia beschränkt ist, gefärbt.

### 2.5.2. Immunhistochemie

#### 2.5.2.1. Perfusion und Herstellung der Gefrierschnitte

Zur Perfusion wurden die Tiere mit einer 10%igen Chloralhydrat-Lösung (400 mg/kg, i.p.) narkotisiert und das Abdomen und der Thorax eröffnet. Anschließend wurde das noch schlagende Herz freipräpariert und eine Kanüle über die linke Herzkammer in die Aorta eingeführt. Nach Spülen des Blutkreislaufes mit PBS wurde die Fixierung der Gewebe durch Gabe von kalter Fixierlösung durchgeführt. Nach Öffnen des Schädels wurden das fixierte Gehirn so schnell wie möglich herauspräpariert und zur Kryoprotektion für drei Tage in 0,1 M phosphatgepufferter 30%iger Sucrose-Lösung bei 4 °C gelagert. Die 30  $\mu$ m dicken Gefrierschnitte wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Figomobil 1205, Jung, Heidelberg) angefertigt. Jeder sechste Schnitt wurde in PBS aufgefangen (fünf Serien insgesamt) und in Einfrierlösung bei -20 °C gelagert.

Eine der Serien wurde sofort auf entfettete Objektträger mit Hilfe von flüssiger Gelatine-Chromalaun-Lösung aufgezogen. Nach Trocknen an Luft bei RT wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 3 min in 96, 70, 50 %igem Alkohol sowie destilliertem Wasser), für etwa 90 sec in einer wässrigen Thionin-Lösung gefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Dauer und Konzentration entsprachen der absteigenden Reihe) wieder entwässert. Die Konservierung der Schnitte erfolgte für jeweils 3 min in einer Terpeneol-Xylolersatzmedium (XEM)-Mischung. Direkt im Anschluss wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Deckgläschen und Entellan (Merk, Darmstadt) eingedeckt.

### 2.5.2.2. Immunhistochemische Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung von Gewebsschnitten wurde eine Serie bei RT aufgetaut, dreimal für 5 min mit 0,05 M TBS pH 7,6 gewaschen und für 30 min in 0,5 %iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Schnitte für 60 min bei RT mit TBS pH 7,6, das 2% BSA, 0,3% Triton X-100 und 5% Kaninchenserum enthält (*Blocking-Solution*), geblockt. Die Inkubation mit primären Antikörper (NeuN, 1:2000) folgte direkt über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit TBS pH 7,6 gewaschen und für 60 min bei RT mit Biotin-markiertem sekundärem Antiserum (*rabbit anti-mouse IgG*, 1.2 µg/ml; DAKO, Hamburg, Germany) inkubiert. Nach Waschen mit TBS pH 7,6 wurden die Schnitte durch Inkubation mit Peroxidase-markierte Streptavidin-Lösung (1,65 µg/ml, DAKO) für 90 min und Nickel-verstärkter Diaminobenzidin (DAB) Reaktion (0,05% 3,3-Diaminobenzidin und 0,6% Ammoniumnickelsulfat; Sigma) in Gegenwart von 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 15 min entwickelt. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen, luftgetrocknet, mit Toluol für 1 min behandelt, auf Objektträger aufgezogen und mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die Antikörper wurden in TBS mit 1% Kaninchenserum, 1% BSA und 0,3 % Triton X-100 gelöst.

### 2.5.3. High-Affinity [<sup>3</sup>H]Dopamine Uptake Assay

Am Ende des Behandlungszeitraumes wurden die Kulturen zweimal mit kaltem Krebs-Ringer Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Kulturen zur Aufnahme des Neurotransmitters für 30 min bei 37 °C mit 1 µCi [<sup>3</sup>H]Dopamin in Krebs-Ringer Puffer (0,4 ml/*well*) inkubiert. Nach Entfernen des nicht aufgenommenen Dopamins durch dreimaliges Waschen mit Krebs-Ringer Puffer wurden die Zellen durch Behandlung mit 1 N NaOH-Lösung (0,5 ml/*well*) lysiert. Das Lysat wurde mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Roth, Karlsruhe) gemischt und die Radioaktivität im Szintillationszähler LS5000CE der Firma Beckman Coulter bestimmt. Die unspezifische Dopamin-Aufnahme wurde in Kulturen, die vor [<sup>3</sup>H]Dopamin-Gabe für 10 min bei 37 °C mit 10 µM Mazindol (Sigma), einem Inhibitor der neuronalen Dopamin-Aufnahme, behandelt wurden, bestimmt. Die spezifische Dopamin-Aufnahme ergibt sich aus der Subtraktion der unspezifischen Aufnahme von der gemessenen Radioaktivität der *wells*, die keine Mazindol-Behandlung erfahren haben.



### 2.5.4. Nitrite Assay

Stickstoffmonooxid (NO) wird im Zellkulturmedium schnell zu Nitrit (NO<sub>2</sub>) oxidiert und kann mittels kommerziell erhältlicher *Kits* als dieses nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Griess Reagenz der Firma Sigma zum kolometrischen Nachweis von NO als NO<sub>2</sub>-Akkumulation im Zellkulturüberstand von stimulierten Cokulturen eingesetzt. Hierzu wurden gleiche Volumina (50–100 µl) an Zellkulturüberstand und Griess-Reagenz miteinander vermischt und die Lösung für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 540 nm von 100 µl dieser Lösung in einer Kristallküvette (Firma Hellma, Müllheim, Germany) in einem UV/VIS Spectrophotometer (Pharmacia Biotech) gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Natriumnitrit Standardkurve.

### 3. Publizierte Ergebnisse

#### 3.1. Publikation 1

**MAPKAP kinase2-deficiency prevents neurons from neuronal cell death by reducing neuroinflammation – relevance in a mouse model of Parkinson's disease**

Tobias Thomas, Marco Timmer, Konstantin Cesnulevicius, Edward Hitti, Alexey Kotlyarov, and Matthias Gaestel

*Journal of Neurochemistry* 2008, Vol. 105, pp. 2039-2062

## MAPKAP kinase 2-deficiency prevents neurons from cell death by reducing neuroinflammation – relevance in a mouse model of Parkinson's disease

Tobias Thomas,<sup>\*,1</sup> Marco Timmer,<sup>†,1</sup> Konstantin Cesnulevicius,<sup>†</sup> Edward Hitti,<sup>\*,2</sup> Alexey Kotlyarov<sup>\*</sup> and Matthias Gaestel<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Institute of Biochemistry, Hannover Medical School, Hannover, Germany

<sup>†</sup>Department of Neuroanatomy, Hannover Medical School, Hannover, Germany

### Abstract

The inflammatory response in the brain is closely associated with the pathogenesis of degenerative neurological disorders. A role for the p38 stress-activated protein kinase/MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) axis in inflammation and apoptosis is well documented. Here, we provide evidence that neurodegeneration can be prevented by eliminating MK2. In primary mesencephalic neuron-glia co-cultures dopaminergic neurons from MK2-deficient (MK2<sup>-/-</sup>) mice were significantly more resistant to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity compared with cells from wild-type mice. This neuroprotection in MK2-deficient cultures was associated with a reduced inflammatory response, especially with reduced production of the inflammatory mediators tumor necrosis factor alpha, keratino-

cyte-derived chemokine, interleukin-6, and nitric oxide (NO). Interestingly, in primary neuron-enriched cell cultures p38 MAPK, but not MK2, also participates in NO-mediated neuronal cell death. In the MPTP mouse model for Parkinson's disease, MK2-deficient mice show a reduced neuroinflammation and less degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra after MPTP lesion compared with wild-type mice. In conclusion, our results reveal that MK2 does not directly participate in neuronal cell death, but indirectly contributes to neurodegeneration by the production of neurotoxic substances, such as NO or tumor necrosis factor alpha, from activated glia cells.

**Keywords:** ablation, inflammation, neurodegeneration, Parkinson's disease, protein kinases.

*J. Neurochem.* (2008) **105**, 2039–2052.

The pathogenesis of several neurological disorders, including Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease, and multiple sclerosis, as well as epilepsy and ischemia, has been closely associated with local inflammatory responses in the brain (Matyszak 1998; Vezzani and Granata 2005). During the progression of these diseases, the activation of glia cells is frequently observed. Activated microglia and astroglia release potential cytotoxic mediators, such as reactive oxygen species, tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ , and interleukin (IL)-1 (Lee *et al.* 1993).

The p38 MAPK pathway is activated by stress and inflammatory stimuli and plays a major role in the regulation of gene expression at the post-transcriptional level of many transcripts involved in inflammation like TNF $\alpha$ , IL-1, keratinocyte-derived chemokine (KC) and cyclooxygenase (COX)-2 (Clark *et al.* 2003). There is mounting evidence for a central role of the p38 MAPK pathway in various pathological CNS conditions such as Alzheimer's syndrome (Sun *et al.* 2003), PD (Wilms *et al.* 2003; Onyango *et al.*

2005) and cerebral ischemia (Barone *et al.* 2001). Inhibition of p38 MAPK decreases the loss of dopaminergic neurons in mesencephalic neuron-glia cultures or mice treated with

Received July 16, 2007; revised manuscript received February 7, 2008; accepted February 8, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Matthias Gaestel PhD, Hannover Medical School, Institute of Biochemistry, Carl-Neuberg-Str. 1, Hannover D-30625, Germany. E-mail: gaestel.matthias@mh-hannover.de

<sup>1</sup>These authors contributed equally.

<sup>2</sup>The present address of Edward Hitti is the King Faisal Specialist Hospital and Research Center, Riyadh, Saudi Arabia.

**Abbreviations used:** COX, cyclooxygenase; DA, dopamine; IL, interleukin; iNOS, inducible form of NO synthase; KC, keratinocyte-derived chemokine; L-NMMA, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine; LPS, lipopolysaccharide; MK2, MAPK-activated protein kinase 2; MK2-I, MK2 inhibitor; NO, nitric oxide; PBS, phosphate-buffered saline; PD, Parkinson's disease; PTIO, 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide; SNP, sodium nitroprusside; SNpc, substantia nigra pars compacta; TH, tyrosine hydroxylase; TNF, tumor necrosis factor; TTP, tristetraprolin; WT, wild-type.

lipopolysaccharide (LPS) (Jeohn *et al.* 2002; Ruano *et al.* 2006). This decrease in neuronal loss is paralleled by a reduction in nitric oxide (NO) synthesis. A direct role of p38 in inducible form of NO synthase (iNOS) expression in microglia and astroglia at the level of transcription has been demonstrated (Da Silva *et al.* 1997; Bhat *et al.* 2002). However, several lines of evidence also suggest a role of p38 in apoptotic processes (Harada and Sugimoto 1999; Yamagishi *et al.* 2001; Choi *et al.* 2004). p38 is involved in neuronal apoptosis induced by oxidative stress via a mechanism including Bax (Bcl-2-associated X protein) translocation (Ghatan *et al.* 2000). Interestingly, Bax-deficient mice show a dramatically higher resistance to MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration (Vila *et al.* 2001).

The MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) is one of several downstream targets of p38 MAPK. It is regulated through direct phosphorylation by p38 MAPK in response to stress stimuli (Rouse *et al.* 1994). The generation and analysis of MK2-deficient mice demonstrated a critical role of MK2 in bacterial LPS-induced biosynthesis of inflammatory cytokines, such as TNF $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , IL-1, and IL-6 (Kotlyarov *et al.* 1999; Neining *et al.* 2002). MK2 $^{-/-}$  mice show neuroprotection against ischemic injury (Wang *et al.* 2002) as well as increased susceptibility to infection by *Listeria monocytogenes* (Lehner *et al.* 2002) and exacerbation of inflammatory bowel disease (Kontoyiannis *et al.* 2002). Recently, an increased level of MK2 transcript and activity associated with an up-regulation of proinflammatory gene expression in the affected brain regions of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease has been reported (Culbert *et al.* 2006).

In this study, we used the sensitive *ex vivo* system of dopaminergic cell death in LPS-stimulated mesencephalic neuron-glia cultures to investigate the role of MK2 in neurodegeneration. We show that in MK2 $^{-/-}$  cultures neuroprotection is due to a reduced inflammatory response. Furthermore, we demonstrate that p38 MAPK, but not MK2, participates in NO-induced neuronal cell death. In the MPTP model of PD MK2-deficient mice were more resistant to neurodegeneration than wild-type (WT) mice, confirming neuroprotection by MK2 ablation *in vivo*.

## Materials and methods

### Reagents

$\gamma$ <sup>33</sup>P-ATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ L) was purchased from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany). [<sup>3</sup>H]dopamine (DA) was from Amersham Biosciences (Munich, Germany). Horse serum, fetal calf serum, penicillin, and streptomycin were from PAA (Pasching, Austria). The p38 MAPK inhibitor SB203580 was from Calbiochem–Novabiochem Corp. (La Jolla, CA, USA), the inhibitor for MK2 (MK2-I) (Vertii *et al.* 2006) was a kind gift of Dr A. Mengel (Bayer Schering Pharma, Berlin, Germany). Antibodies against

TNF $\alpha$ , MK2, pan-p38, and phospho-p38, the double phosphorylated (Thr180/Tyr182) catalytically active form of p38, were purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA). The antibody for neutralizing TNF $\alpha$  was from BD Pharmingen (Heidelberg, Germany). Secondary antibodies and iNOS antibody for western blot were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase antibody was from Chemicon (Temecula, CA, USA). Minimal essential medium non-essential amino acids (100x) was purchased from Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, Germany). Cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside and LPS were from Sigma, Munich, Germany. Recombinant TNF $\alpha$  was purchased from Roche (Mannheim, Germany). The iNOS inhibitor N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and the NO-scavenger 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (PTIO) were from Axxora (Lörrach, Germany).

### Animals

MK2 knockout mice were generated as described previously (Kotlyarov *et al.* 1999). For *ex vivo* experiments cells from MK2 knockout mice on a mixed 129v  $\times$  C57Bl/6 or a pure C57Bl/6 background were used. In these experiments, no differences between cells derived from these two different strains were detectable. For *in vivo* experiments, MK2 $^{-/-}$  mice backcrossed more than 10 times to C57Bl/6 of age of two to three months were used. All mice were kept under controlled environmental conditions (ambient temperature 24–25°C, humidity 50–60%, 12/12 h light/dark cycle, light on at 6:00 AM). Standard laboratory diet (Altromin 1324) and tap water were allowed *ad libitum*. All animal care and handling was conducted in compliance with the German Animal Welfare Act and was approved by the responsible governmental agency.

### MPTP treatment and Rotarod test

Mice were injected intraperitoneally (i.p.) four times (2 h intervals over 1 day) with either 18 mg/kg MPTP HCl (Sigma-Aldrich) or a corresponding volume of saline alone. The Rotarod apparatus consists of five rotating drums (3 cm in diameter) separated by flanges that enable five mice to be recorded simultaneously. Mice were first pre-trained once per day, four days in total, before MPTP treatment. Each day after MPTP or saline injections, the time on the rod was recorded. Pre-training and experiments were done in triplicates for each mouse using an acceleration mode. At indicated times one or eight days after the last injection, animals were killed and their brains were processed for further analysis. This protocol was in accordance with the National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

### Immunohistochemistry of brain sections

Brain sections were prepared as previously described (Volk *et al.* 2005). Briefly, animals were anaesthetized with 10% chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and fixed by transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde, 0.05% glutardialdehyde, and 1.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6). Brains were quickly removed and cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6) at 4°C for 3 days, frozen, and cryosectioned at 30  $\mu$ m thickness on a freezing microtome (Frigomobil 1205; Jung, Heidelberg, Germany). For immunohistochemistry sections were thawed at 25°C and incubated in 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. After blocking for 60 min with Tris-buffered saline containing 2% bovine serum albumin, 0.3%

Triton X-100, and 5% rabbit serum, sections were incubated with primary antibody over night. For staining, sections were successively incubated with biotin-labeled secondary antiserum (rabbit anti-mouse IgG, 1.2 µg/mL; Dako, Hamburg, Germany) for 60 min and horseradish peroxidase-labeled streptavidin (1.65 µg/mL; Dako) for 90 min, followed by a nickel-intensified diaminobenzidine reaction (0.05% 3,3-diaminobenzidine and 0.6% ammonium nickel sulfate; both from Sigma) in the presence of 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min. Sections were washed, air dried, treated with toluol for 1 min, and coverslipped with Entellan (Merck; Darmstadt, Germany). Dopaminergic neurons in sections of mice were identified with an antibody recognizing tyrosine hydroxylase (TH) (Chemicon; 1 : 1000), microglia with an antibody against MAC-1 (AbD Serotec, Düsseldorf, Germany).

### Morphological evaluation of the substantia nigra

Stereological methods were used to evaluate the number of TH-positive neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) as described (Timmer *et al.* 2007). In brief, the total number of TH-positive cells was estimated with the optical dissector method (West and Gundersen 1990). The borders of the SNpc at all levels in the rostrocaudal axis were defined at 4× magnification. One-third of the sections through the substantia nigra stained with TH immunohistochemistry were evaluated at 40× magnification. The counting frame was placed randomly on the first counting area and systematically moved through all fields. The estimate of the total number of neurons was calculated according to the optical dissector formula (Oorschot 1996). All neurons that were found inside of the counting frame or touching the inclusion lines (upper and right sides) were counted, whereas others were not. In order to obtain the estimated neuron number, the number of counted neurons was multiplied with the number of histological series and with the optical dissector and with the area evaluated. The investigator was not aware whether coded TH-stained sections were from knockout or WT mice.

### Measurement of striatal 1-methyl-4-phenylpyridinium ion

The HPLC with UV detection (wavelength, 295 nm) was used to measure striatal MPP<sup>+</sup> levels as described elsewhere (Przedborski *et al.* 1996). 90 min after the last i.p. injection of MPTP, animals were killed and striata were dissected and processed for HPLC measurement.

### Measurement of striatal dopamine and metabolites

Dopamine and its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid were analyzed using HPLC with electrochemical detection as described elsewhere (Przedborski *et al.* 1996). At day 8 after the last MPTP injection, animals were killed and striata were quickly dissected and processed for HPLC measurement. The mobile phase consisted of 90% 50 mM sodium phosphate/0.2 mM EDTA/1.2 mM heptane-sulfonic acid (pH = 3.5) solution and 10% methanol. Flow rate was 1.0 mL/min.

### Mouse mesencephalic neuron-glia cultures

Primary mesencephalic neuron-glia cultures were prepared from the brains of embryonic day 13/14 C57Bl/6 mice. The whole brain was removed aseptically and the mesencephalon was dissected. After removing the blood vessels and meninges, the pooled mesence-

phalic tissues were dissociated by mild mechanical trituration in ice-cold culture medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose with GlutaMAX I and Na-pyruvate (Gibco/Invitrogen) supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum and 5% heat-inactivated horse serum, 1× non-essential amino acids, 50 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin. After pelleting by centrifugation at 800 g, cells were resuspended and plated (5 × 10<sup>5</sup>/0.5 mL medium/well) to 24-well cell culture plates pre-coated with poly-L-lysine (20 µg/mL). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% air. Medium was changed every second day. Seven-day-old cultures were used for treatment. During the course of treatment, the culture medium was not supplemented with amino acids to avoid the cytotoxicity of glutamate.

At the time of treatment, the total number of cells per well was estimated by trypan blue counting of trypan-EDTA detached cells. The composition for major cell types in the culture was estimated by visual counting of immunostained cells. Neurons and dopaminergic neurons were stained with an antibody against βIII-tubulin (1 : 200; Upstate, Waltham, MA, USA) and TH (1 : 200; Chemicon), respectively. Astrocytes were stained with an antibody against glial fibrillary acidic protein (1 : 400, Sigma), microglia with an antibody against MAC-1 (AbD Serotec). For visual counting nine representative areas per well of the 24-well plate were counted under the microscope at 100× or 40× magnification. The mouse mesencephalic neuron-glia cultures contained ~47% astroglia, ~42% neurons, ~10% microglia, and ~1 to 2% dopaminergic neurons. This culture composition is in consistence with that described by others (Liu *et al.* 2000; Gao *et al.* 2003; Qin *et al.* 2004). No differences in composition between WT and MK2<sup>-/-</sup> cultures were detectable.

### Mesencephalic neuron-enriched cultures

Dissociated mouse mesencephalic cells were seeded first at 5 × 10<sup>5</sup> cells/well into poly-L-lysine-coated 24-well culture plates as described above. Then 2–3 days after initial seeding, cytosine β-D-arabinofuranoside (10 µM) was added to suppress the proliferation of glial cells. Two days later the cultures were changed back to fresh medium, 7-day-old cultures were used for experiments.

### Immunocytochemistry

Cells were fixed for 20 min at 25°C in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilised with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min. Non-specific staining was blocked by incubating with blocking solution (PBS containing 3% normal goat serum, 0.5% Triton X-100) for 60 min. The cultures were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted in blocking solution. The next day cultures were microscopied after incubation for 1 h with PBS containing secondary antibody (CY2, 1 : 200; JacksonImmunoResearch, Suffolk, UK) in the dark. The images were analyzed with a Nikon diaphot inverted microscope and recorded with a camera mounted to the microscope.

### High-affinity [<sup>3</sup>H]dopamine uptake assay

Cells were washed twice with 1 mL of Krebs-Ringer buffer (16 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 mM EDTA, and 5.6 mM glucose; pH 7.4) and then incubated with 1 µCi [<sup>3</sup>H] DA in Krebs-



Ringer buffer (0.4 mL/well) for 30 min at 37°C. Non-specific uptake of DA was determined in parallel wells receiving both [<sup>3</sup>H] DA and 10 μM mazindol (Sigma), an inhibitor of neuronal dopaminergic uptake. The cells were washed three times with Krebs–Ringer buffer (1 mL/well) and lysed with 1 N NaOH (0.5 mL/well). After mixing the lysate with 3 mL of scintillation fluid (Rotiszint ecoplus; Roth, Karlsruhe, Germany), radioactivity was determined with a liquid scintillation counter (LS5000CE; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). The specific dopaminergic uptake was calculated by subtracting the amount of radioactivity observed in the presence of mazindol from that observed in the absence of mazindol.

### Nitrite assay

The production of NO was assessed as nitrite accumulated in the medium using a colorimetric reaction with Griess reagent (Sigma). Equal volumes of culture supernatant and Griess reagent were mixed, incubated for 10 min at 25°C, and absorbance at 540 nm was determined. The concentrations of nitrite in the samples were determined from a sodium nitrite standard curve.

### Cytokine assays

The culture medium was collected after 4 h of stimulation with LPS for determination of TNFα and after 24 h of stimulation for measurement of IL-12, IL-6, and KC. The levels of cytokines in the culture medium were measured with ELISA kits (R&S Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

### Neurotoxicity assay in neuron-enriched cultures

Twenty-four hours after treatment neuronal cell viability was detected by a colorimetric assay using the cell proliferation reagent WST-1 (Roche) according to the manufacturer's instructions.

### Preparation of cell extracts

For preparation of culture lysates, cells were scraped from wells and centrifuged at 800 g. For preparation of lysates from treated mice, brains were quickly removed 24 h after the last injection, the midbrain dissected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Proteins were extracted by resuspending cell pellets in lysis buffer [20 mM Tris-acetate pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 5 mM pyrophosphate, 1% Triton X-100, 2 μg/mL leupeptine, 0.27 M sucrose, 10% protease inhibitor cocktail complete mini EDTA-free (Roche) and phosphatase inhibitor cocktail I and II (Sigma) 10% each]. After incubating on ice for 10 min lysates were centrifuged (16 000 g, 10 min, 4°C) and the supernatant was transferred to a new tube. Protein concentrations were determined using a Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### Western blot analysis

Equal amounts of protein (50 μg) were separated on 12% polyacrylamide gels and transferred to Hybond ECL nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech). The blots were blocked with PBS-0.01% Tween 20 containing 5% powdered skim milk for 1 h and incubated overnight at 4°C with primary antibody. Membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and developed with the chemilumi-

nescence ECL system (Santa Cruz Biotechnology) followed by detection in the documentation system LAS-3000 (FUJIFILM, Düsseldorf, Germany). Intensity of bands were quantified by densitometry using the program AIDA Image Analyzer 3.5.

### In vitro kinase assay

For determination of MK2 activity a kinase reaction containing 10 μg of total lysate, 20 μL of substrate buffer [10 μg HSP25, 6.25 μM protein kinase inhibitor, 6.25 μM HA/H7, 2.5 μL 10× reaction buffer (500 mM sodium-β-glycerophosphate, 1 mM EDTA, pH 7.4)] and 5 μL hot buffer (20 mM magnesium acetate, 0.5 mM ATP, 1 μCi γ<sup>33</sup>P-ATP) was incubated for 30 min at 30°C. Reaction was stopped by adding 8 μL of 4× Laemmli's sodium dodecyl sulfate sample buffer. After sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (12%), gels were dried and the incorporation into HSP25 was visualized by phospho-imaging using a Fuji Bas-1500.

### Statistical analysis

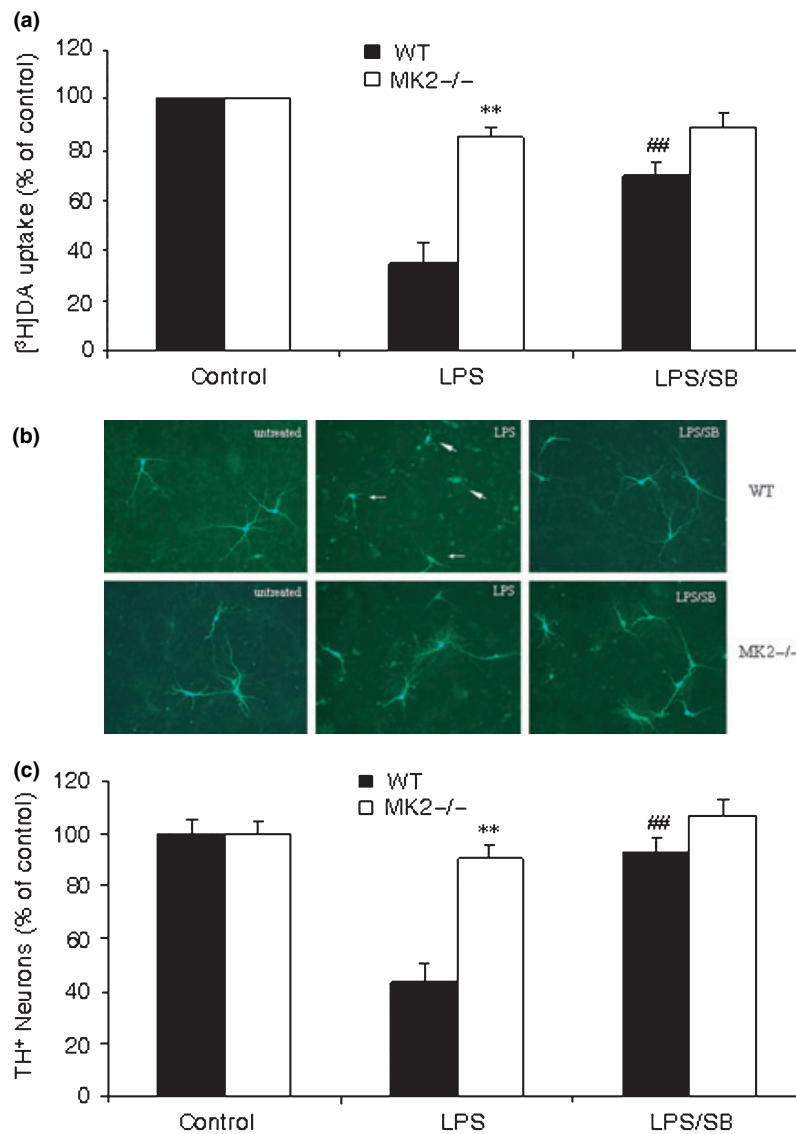
Statistical analyses to determine group differences were performed by student's two-tailed *t*-test using PRISM version 2.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA), or by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test for comparison involving more than two data groups. All data were presented as mean ± SEM.

## Results

### MK2-deficiency protects dopaminergic neurons from LPS-induced cell death

The bacterial endotoxin LPS has long been used as a model stimulus for studying inflammation in different biological systems, including the CNS (Galea *et al.* 1996). LPS-stimulated glial cells produce a mixture of various cytokines, free radicals and NO (Lee *et al.* 1993). This is similar to the response reported after brain injury or in neurodegenerative diseases (Shohami *et al.* 1994; Rostworowski *et al.* 1997). Therefore, we used LPS as a model stimulus to study the mechanisms of degeneration of dopaminergic neurons. We isolated neuron-glia cultures from murine mesencephalon and stimulated the cultures with a concentration of 1 μg/mL of LPS for 48 h. The capacity of the cultures to take up [<sup>3</sup>H] DA was examined as a functional indicator of the integrity of dopaminergic neurons (Fig. 1a). In WT cultures, LPS treatment reduced DA uptake to about 35% of control cultures. Pre-treatment of WT cultures with the p38 MAPK inhibitor SB203580 significantly prevented the LPS-induced decrease in DA uptake (75% of control cultures). Interestingly, MK2-deficient cultures exhibited a reduction of only 15% in DA-uptake and pre-incubation with SB203580 showed no further effect. These data suggest an important role of MK2 for the reduction of functional integrity of dopaminergic neurons after LPS treatment.

The reduction in DA uptake of LPS-treated neuron-glia cultures can be due to a decrease in cell number of



**Fig. 1** MK2-deficiency prevents dopaminergic neurons from LPS-induced cell death in mesencephalic neuron-glia cultures. Mesencephalic cultures were treated for 48 h with 1  $\mu$ g/mL LPS with or without a 60 min pre-incubation with 10  $\mu$ M SB203580. (a) [<sup>3</sup>H]dopamine (DA) uptake. Background level of DA uptake was measured in the presence of 10  $\mu$ M mazindol. DA uptake in untreated cultures was regarded as 100%. The data were represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments performed in triplicates. ###*p* < 0.01, compared with LPS treated cultures, \*\**p* < 0.01, compared with LPS-treated WT cultures. (b and c) Immunocytochemical detection of tyrosine hydroxylase TH (b). Healthy TH-positive neu-

rons in the untreated cultures had numerous and extensive neuritis. Following treatment with LPS, a loss of dopaminergic neurons was observed (c) and the neurites of remaining TH-positive neurons became much shorter (arrows in b) or disappeared (arrowheads in b). In WT cultures SB203580 significantly prevented the LPS-induced loss of TH-positive neurons and shortening of their neurites. MK2 ablation diminishes the LPS-induced loss of TH-neurons. Number of untreated control cultures was set as 100%. The data were represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments. ###*p* < 0.01, compared with LPS treated cultures, \*\**p* < 0.01, compared with LPS-treated WT cultures.

dopaminergic neurons or of glia cells or both. Immunocytochemical analysis with an antibody against TH revealed healthy neurites in the control midbrain cultures of WT and MK2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1b). Treatment of the cultures for 48 h with 1  $\mu$ g/mL LPS resulted in a marked shortening (arrows in Fig. 1b) or almost loss of neurites (arrowheads in Fig. 1b) in WT cultures, but not in MK2<sup>-/-</sup> cultures. In addition, the

number of TH-positive neurons was significantly reduced in LPS-treated WT cultures (43  $\pm$  7% of control cultures, Fig. 1c). MK2 ablation rescued the LPS-induced reduction in cell number of dopaminergic neurons almost completely (90  $\pm$  5% of control cultures). Although, treatment with SB203580 led to significant protection against the LPS-induced effect on the number and morphology of the

## Publizierte Ergebnisse

2044 | T. Thomas *et al.*

TH-positive neurons in WT midbrain cultures ( $92 \pm 6\%$  of control cultures), the inhibitor had no significant effect in MK2 knockout neuron-glia cultures ( $103 \pm 6\%$  of control cultures, Fig. 1b and c). There was no effect detectable neither in morphology nor in cell number of astrocytes (data not shown). Summing up, these data demonstrate that LPS-induced neurotoxicity is significantly decreased in MK2-deficient mesencephalic co-cultures and that this effect is independent of SB203580, indicating a primary role of MK2 in neurotoxicity caused by LPS.

### MK2-deficiency in mesencephalic neuron-glia cultures results in a decreased inflammatory response after LPS stimulation

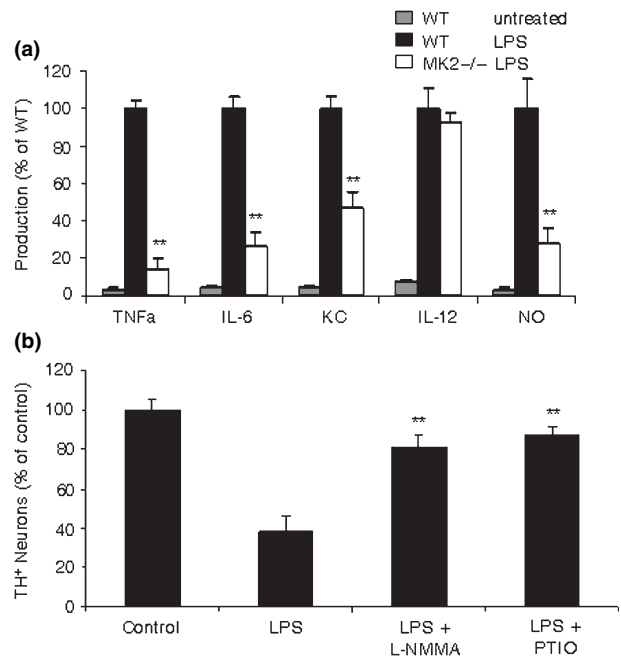
To investigate possible mechanisms of action for the neuroprotective effect of MK2-deficiency, we decided to examine the inflammatory response after LPS treatment in neuron-glia co-cultures. As shown in Fig. 2a, MK2-deficient neuron-glia cultures exhibit significant reductions in the release of the proinflammatory cytokines TNF $\alpha$  ( $14 \pm 6\%$  of WT) and IL-6 ( $26 \pm 7\%$  of WT), the chemokine KC ( $47 \pm 8\%$  of WT) and NO ( $27 \pm 9\%$  of WT) after treatment with LPS. In contrast, production of IL-12 p40 was not significantly affected ( $92 \pm 5\%$  of WT).

### Cell death of dopaminergic neurons in LPS-stimulated co-cultures is NO mediated

Nitric oxide is described to induce neuronal cell death *in vitro* and *in vivo* (Liberatore *et al.* 1999; Jeohn *et al.* 2002). To demonstrate that the cell death of dopaminergic neurons in LPS treated co-cultures is also NO mediated, we incubated neuron-glia cultures with L-NMMA (20  $\mu$ M), an inhibitor of the iNOS, or with the NO-scavenger PTIO (100  $\mu$ M) for 1 h before LPS-stimulation. Forty-eight hours later the number of TH-positive cells in culture was detected by cell counting. As expected, inhibition of iNOS activity ( $80 \pm 6\%$  of untreated control cultures) or eliminating of NO in the supernatant ( $87 \pm 4\%$  of control cultures) resulted in a significant protection from LPS-induced neurotoxicity ( $37 \pm 13\%$  of control cultures) (Fig. 2b). Interestingly, scavenging of NO in the supernatant of LPS-treated co-cultures with PTIO had no further effect on neuroprotection compared with inhibition of iNOS activity with L-NMMA. This suggests that the major source of NO production was from LPS-induced expression of iNOS, most probably in glia cells.

### Reduced NO level in MK2 deficient co-cultures is only partially because of reduced TNF $\alpha$ release

To figure out the relevance of MK2 within the p38 MAPK/MK2 axis in LPS-induced NO-synthesis, we treated neuron-glia cultures of WT and MK2 $^{-/-}$  mice with LPS in the presence or absence of the p38 MAPK inhibitor SB203580. We found, that the accumulation of NO in the supernatant of

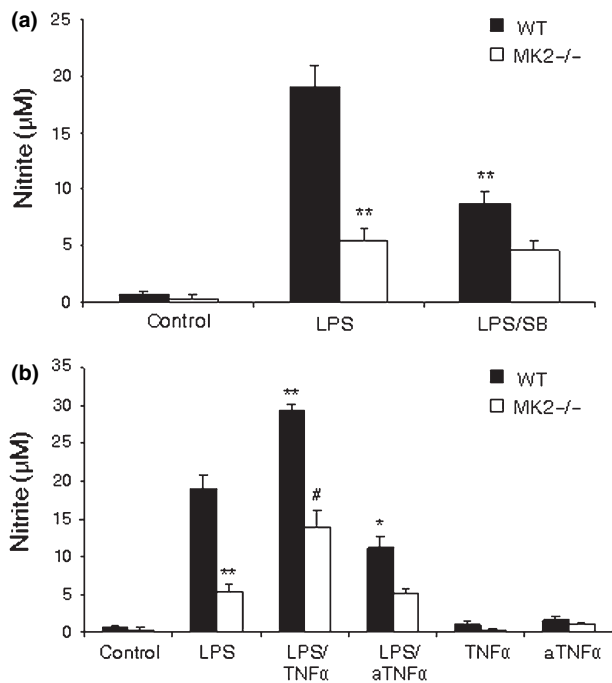


**Fig. 2** Analysis of cytokine production and NO-mediated dopaminergic cell death in stimulated neuron-glia co-cultures. (a) Mesencephalic co-cultures of WT and MK2-deficient mice were treated with 1  $\mu$ g/mL of LPS or left untreated. Cell supernatants were harvested after 4 h (TNF $\alpha$ ), 24 h (IL-12, IL-6, and KC) and 48 h (NO), respectively. Cytokine levels were measured by ELISA, production of NO was determined by Griess assay. MK2 ablation results in a reduced production of the proinflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-6, the chemokine KC, and nitric oxide. \*\* $p < 0.01$ , compared with LPS-treated WT cultures. (b) NO-mediated cell death of dopaminergic neurons. To analyze whether dopaminergic cell death occurs through NO production WT co-cultures were pre-treated for 60 min with the iNOS inhibitor N $^G$ -Monomethyl-L-arginine (L-NMMA) (20  $\mu$ M) or the NO-scavenger 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (PTIO) (100  $\mu$ M) before LPS-treatment. Forty-eight hours later the number of dopaminergic neurons was quantified by cell counting. The data are represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments. \*\* $p < 0.01$  compared with LPS-treated cultures.

LPS-stimulated WT co-cultures could be reduced by pre-incubation with the inhibitor (Fig. 3a). Interestingly, stimulation of MK2-deficient co-cultures with 1  $\mu$ g/mL LPS could only weakly induce NO synthesis which is independent of pre-treatment with SB203580. This suggests an important contribution of MK2 to the stimulation of NO production. Treatment of neuron-enriched cultures from WT or MK2-deficient mesencephalon with LPS did not result in an accumulation of NO in the supernatant (data not shown), demonstrating that glia cells, but not neurons, are the NO producing cells.

After LPS-stimulation NO production is increased via cytokine effects, mainly of TNF $\alpha$  (Chao *et al.* 1993; Posselt *et al.* 2000). To figure out whether the reduced NO level in





**Fig. 3** Nitric oxide production in LPS-treated co-cultures is MK2 dependent. Mesencephalic neuron-glia cultures of WT and MK2<sup>-/-</sup> mice were stimulated with 1 µg/mL LPS or left untreated. Forty-eight hours later NO release was quantified by Griess assay. (a) p38 MAPK-dependence of LPS-induced NO production. To inhibit p38 MAPK cultures were pre-incubated for 60 min with 10 µM SB203580. Note that inhibition of p38 MAPK in MK2 deficient co-cultures led to no further reduction in NO synthesis. \*\**p* < 0.01, compared with LPS-treated WT cultures. (b) TNFα dependence of NO production. To analyze synergistic effects between TNFα on LPS-induced NO production co-cultures were stimulated simultaneously with both substances. Simultaneous incubation of co-cultures with LPS and TNFα led to an increase in NO synthesis in both WT and MK2 co-cultures. For neutralizing TNFα cultures were pre-incubated for 60 min with a neutralizing antibody against TNFα prior to LPS stimulation. Neutralization of TNFα in supernatant of stimulated WT cultures resulted in a decrease of NO production, but not to the level of LPS-stimulated MK2-deficient cultures. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, compared with LPS-treated WT cultures, #*p* < 0.05, compared with LPS-treated MK2<sup>-/-</sup> cultures.

MK2-deficient cultures is an indirect effect caused by a decrease in TNFα production, we stimulated cells simultaneously with LPS/TNFα or treated cells with a neutralizing antibody against TNFα before stimulating with LPS. As shown in Fig. 3b, simultaneous stimulation with 1 µg/mL LPS and 20 ng/mL TNFα partially rescued the NO level production in MK2<sup>-/-</sup> co-cultures. A synergistic effect of LPS and TNFα could be also observed in WT co-cultures. TNFα alone was not able to induce NO production WT or MK2-deficient cultures. Incubating cultures with an anti-TNFα antibody sufficient to neutralize all newly synthesized TNFα (titration data not shown), resulted in a significant

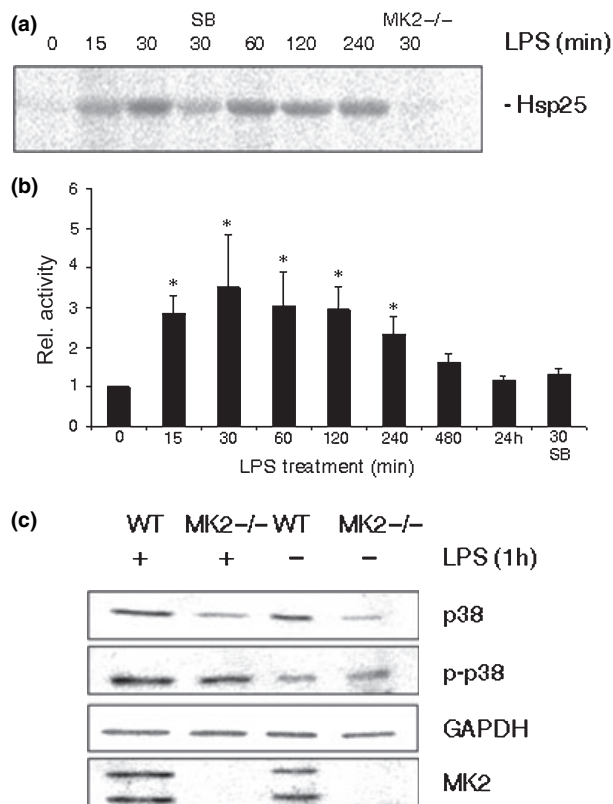
decrease in NO production of WT cultures, whereas NO levels in MK2<sup>-/-</sup> cultures decreased only slightly (Fig. 3b). One should note that NO level of LPS/anti-TNFα treated WT cultures did not reach the level of LPS-stimulated MK2<sup>-/-</sup> cultures, indicating further synergistic effects, which are absent in MK2-deficient cultures, or a direct effect of MK2 on NO production. These data demonstrate that the reduced NO level in MK2-deficient cultures is only partially because of a reduced release of TNFα.

**The reduced inflammatory response is due to the lack of MK2 and not to the reduced p38 level**

Analysis of MK2-deficient mice revealed a reduced p38 MAPK level in all tissues analyzed (Kotlyarov *et al.* 2002). This finding led to the question whether the reduced inflammatory response in the MK2<sup>-/-</sup> neuron-glia cultures can be simply because of the reduction of p38 MAPK in these cultures. To answer this question we first performed an *in vitro* kinase assay of LPS stimulated co-cultures to measure the activation level of MK2. As shown in Fig. 4a and b, MK2 is activated within 15 min reaching maximum after 30 min (about 3.5-fold basal activity). After 30 min MK2 activity is continuously decreased and reached background level after 24 h. MK2 activation could be mainly inhibited (to about 1.3-fold of basal activity) by a pre-incubation with SB203580, while cultures stimulated for 1 h with 1 µg/mL LPS could confirm the reduced p38 MAPK level in MK2-deficient cultures (Fig. 4c). However, there was no significant difference in the levels of active phospho-p38 detectable, indicating compensation of reduced p38 MAPK level by enhanced signaling within this pathway. Hence, the effects observed in the inflammatory response are a direct effect of lacking MK2 and not of decreased activity of p38 MAPK.

**p38 MAPK, but not MK2, is involved in neuronal cell death**

The rescuing effect of MK2 ablation on neurodegeneration can not only be ascribed to the reduced inflammatory response but could also be due to a role of MK2 in neuronal cell death itself. To investigate the role of MK2 in neuronal cell death we generated neuron-enriched cultures from WT and MK2-deficient mice and induced cell death by incubation with the NO-donor sodium nitroprusside (SNP). Twenty-four hours after addition of SNP cell number was measured by WST assay. Cell death caused by SNP was significantly attenuated in WT neurons pre-treated with SB203580 (Fig. 5). At a dose of 100 µM SNP that led to death of about 72 ± 13% of the cells after 24 h, only 30 ± 5% of the cell death was observed in the presence of SB203580 (10 µM). Interestingly, MK2 deficiency did not rescue neurons from NO-induced cell death (63 ± 16% of cell death). Also, specific inhibition of MK2 with the compound 2,4-diamino-5H-chromeno-[2,3-b]pyridine-3-carbonitrile [MK2-I, 25 µM final, (Vertii *et al.* 2006)] could not

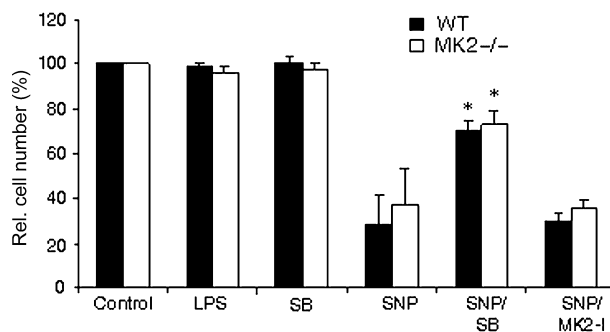


**Fig. 4** Activation of the p38 MAPK/MK2 pathway in WT and MK2-deficient co-cultures. Co-cultures of WT mice were treated with 1 µg/mL LPS for the indicated time points. (a) Protein extracts were prepared and 10 µg of total lysate was used in an *in vitro* kinase assay using HSP25 as substrate in the presence of [<sup>32</sup>P]-ATP. (b) Quantification of MK2 activation. The activity of unstimulated cultures was taken as one. Data were presented as mean ± SEM of three experiments. \**p* < 0.05, compared with untreated cultures. (c) After stimulation of neuron-glia cultures for 1 hour with 1 µg/mL LPS 50 µg of total lysates were analyzed in a western blot. MK2-deficient co-cultures exhibit a reduced level of total p38 but no differences in phospho-p38 (p-p38). The blot was developed against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a loading control.

protect SNP- treated WT cultures (70 ± 7% of cell death). Pre-incubation with the p38 inhibitor protected neurons from SNP-induced cell death in MK2<sup>-/-</sup> neuronal cultures (38 ± 6%) comparable with WT cultures (30 ± 5%). These results suggest that the p38 MAPK, but not MK2, plays an essential role in NO-mediated death of neurons. Although TNF-α is also known to induce cell death in neurons, we were not able to find any neurotoxicity when we treated neuron-enriched cultures of WT or MK2-deficient mice with 50 ng/mL TNF-α for 24 h (data not shown).

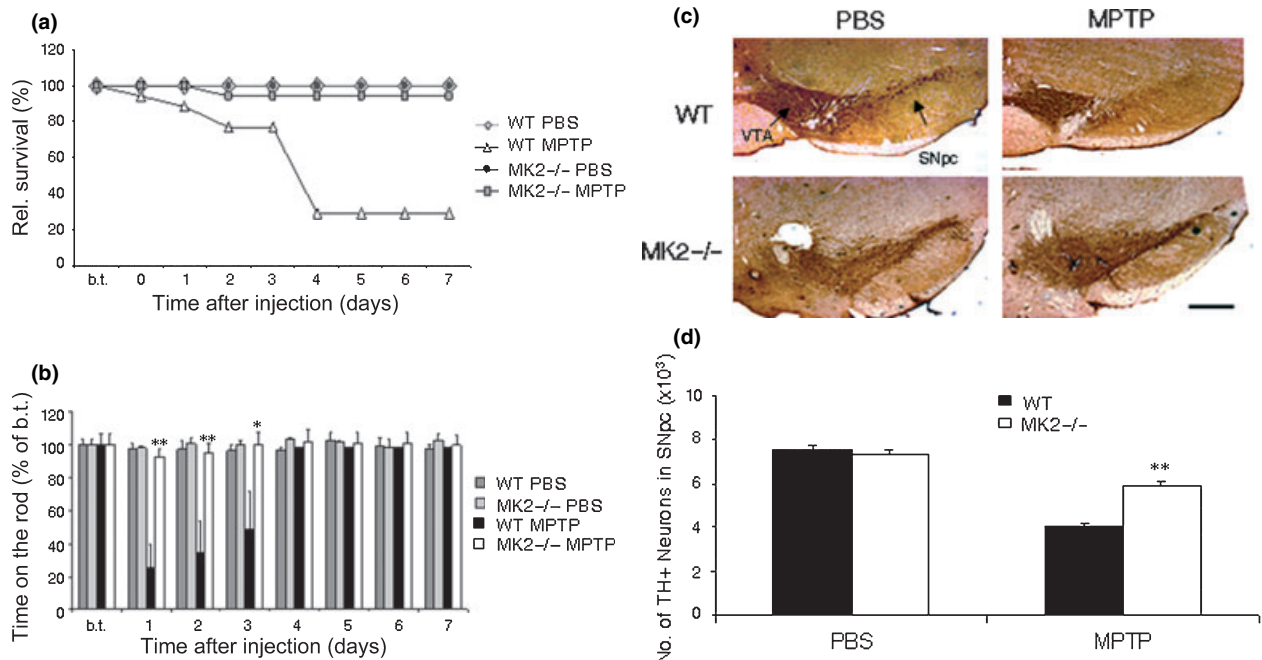
#### MK2-deficient mice are more resistant to MPTP

To investigate the role of MK2 in dopaminergic cell death *in vivo*, a phenomenon responsible for PD, we administered 18 mg/kg body mass MPTP or an equal volume of PBS to



**Fig. 5** MK2 is not involved in NO-induced neuronal cell death. Neuron-enriched cultures were incubated with 1 µg/mL LPS, 100 µM sodium nitroprusside (SNP), or left untreated. Twenty-four hours later cell viability was detected by WST-assay. Cultures were pre-incubated for 60 min with 10 µM SB 203580 to inhibit p38 MAPK activity or with 25 µM MK2 inhibitor (MK2-I) to inhibit MK2 activity. \**p* < 0.05, compared with SNP-treated cultures.

WT and MK2-deficient mice (5–17 mice per group). Directly after injections mice of both genotypes showed coat ruffling, akinesia, and general weakness. However, during a 2 h interval MK2<sup>-/-</sup> mice recovered, whereas WT mice still showed those impairments resulting in strongest differences prior to the last injection. MPTP treated WT mice either recovered slowly or died within the first 4 days, with the highest mortality at day 4 after injections (Fig. 6a). In contrast, MPTP treated MK2-deficient mice completely recovered 1 day after injections. In addition, we checked locomotory ability by performing Rotarod experiments each day until mice were killed 8 days after injections. Because of slow recovery of the MPTP treated WT mice these animals also showed decreased ability to stay at the rotating rod during days 1–3 (Fig. 6b). No difference in motor performance was detectable between saline-injected WT and MK2<sup>-/-</sup> mice. We originally expected that MPTP-treated WT animals will display a constant motor dysfunction, a symptomatic phenotype of PD as a result of a dramatic decrease of striatal DA level caused by the loss of about 70% of dopaminergic neurons in the SNpc (Pakkenberg *et al.* 1991). Surprisingly, there was no difference between WT and MK2<sup>-/-</sup> mice in motor performance on days 4–7 after injections (Fig. 6b). Brains were analyzed on day 8 after the last injection by immunohistochemistry to quantify TH-positive neurons in the SNpc. In control animals injected with saline only, no differences in dopaminergic cell content between WT and MK2 knockout mice were detectable (Fig. 6c and d) indicating that ablation of MK2 had no impact on the normal development of the nigrostriatal pathway. MPTP treatment induced a 47 ± 5% loss of TH-positive neurons in WT animals, whereas in MK2<sup>-/-</sup> mice a decrease in the number of dopaminergic neurons in this region of only 21 ± 3% was observed (Fig. 6d). In consistence with the loss of TH-positive cells in the SNpc,



**Fig. 6** The MK2 ablation prevents loss of dopaminergic neurons in midbrain and increases mouse survival in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. (a) Survival of WT and MK2-deficient mice after MPTP or saline treatment (5–17 mice per group), b.t. = before treatment. (b) Motor performance of PBS- or MPTP-treated WT and MK2-deficient mice measured on a Rotarod. The mean times on the rod show that MPTP-intoxicated MK2-deficient animals display significant improvement of motor function compared with MPTP-treated WT mice in the first 3 days. \*\**p* < 0.01, \**p* < 0.05, compared with MPTP injected

WT mice, b.t. = before treatment. (c) Immunohistochemistry for TH on midbrain sections from PBS- and MPTP-injected WT and MK2-deficient mice. Mice were analyzed 8 days after treatment, and photomicrographs were taken. Scale bars: 500 μm. (d) Quantification of TH-positive cells in the SNpc at day 8 after MPTP intoxication. MK2 ablation results in a protective effect against cell death of TH-positive neurons after MPTP treatment as compared with WT mice. Data were presented as mean ± SEM. \*\**p* < 0.01, compared with MPTP-injected WT mice.

the loss in striatal dopaminergic nerve terminals after MPTP administration, as assessed by measuring the levels of DA and its two main metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid, was also markedly attenuated in MK2<sup>-/-</sup> mice, compared with their WT littermates (Table 1). Probably because dopaminergic neuron reduction did not reach threshold levels necessary to develop constant

motor dysfunction, no impairment in Rotarod performance was detectable in WT mice after 4–7 days.

**MPTP metabolism is unaffected by MK2 ablation**

The main rate-limiting step in MPTP toxicity is its conversion in glia to MPP<sup>+</sup> by the enzyme monoamine oxidase B (Olanow and Tatton 1999). To confirm that the reduced neurodegeneration and the better survival of MK2-deficient mice was due to ablation of *MK2* gene and not to alteration of MPTP metabolism, we measured striatal levels of MPP<sup>+</sup> after administration of the toxin. There was no difference in the striatal content of MPP<sup>+</sup> in MK2-deficient mice compared to WT mice (Table 2). Thus, an altered drug metabolism was not the reason for the reduced MPTP toxicity in MK2<sup>-/-</sup> mice.

**Table 1** Striatal monoamine levels (ng/mg tissue). HPLV–UV measurement of dopamine and its metabolites were determined 7 days after the last MPTP injection

Mice	Dopamine	DOPAC	HVA
Saline			
Wild-type	12.2 ± 0.8	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.1
MK2 <sup>-/-</sup>	12.1 ± 0.9	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1
MPTP			
Wild-type	1.9 ± 0.1**	0.5 ± 0.05**	1.0 ± 0.1*
MK2 <sup>-/-</sup>	4.0 ± 0.3**,#	0.9 ± 0.1**,#	1.2 ± 0.2

DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovanillic acid. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 compared with PBS treated mice, #*p* < 0.05 compared with MPTP-treated WT mice. Data represent means ± SEM for three mice per group.

**MK2 deficiency reduces the inflammatory response after MPTP intoxication, but not MAC-1 expression characteristic for microglial activation**

The activation of glia cells is also reported to be a component of MPTP toxicity (Liberatore *et al.* 1999). These cells can intensify deleterious effects by the production of inflammatory mediators, including NO. To test whether glia activation

**Table 2** Striatal MPP<sup>+</sup> levels (µg/mg wet tissue weight) in MK2-deficient and wild-type mice. HPLC–UV measurement of striatal MPP<sup>+</sup> levels were determined 90 min after the last MPTP injection

Mice	90 min
Wild-type	6.99 ± 0.31
MK2 <sup>-/-</sup>	7.24 ± 0.42

*n* = 3 mice per group. Values represent the mean ± SEM.

is altered in MK2<sup>-/-</sup> mice we examined midbrain expression of MAC-1 as a marker for microglia activation. Immunohistochemical analysis showed an intensive activation of microglia in the SNpc 24 h after MPTP treatment in both WT and MK2-deficient mice (Fig. 7a). Detection and quantification of MAC-1 expression in western blot experiments demonstrated a comparable level (about 2.5-fold about PBS background level) of activated microglia in WT and MK2<sup>-/-</sup> mice. Although this finding could suggest that MK2 ablation does not interfere with overall glial cell activation, it is known that MK2 plays a major role in the regulation of gene expression at the post-transcriptional level of many transcripts involved in inflammation like TNFα, IL-1, and COX-2 (Clark *et al.* 2003). Therefore, an altered production of inflammatory mediators after MPTP intoxication could be the reason for the neuroprotection in MK2 deficient mice. Taking the expression of TNFα as a marker for inflammation (Fig. 7b), we found a threefold induction of this cytokine in WT mice 24 h after MPTP challenge. However, MPTP failed to induce TNFα expression in MK2<sup>-/-</sup> mice. Moreover, the expression of the iNOS, which is mainly elevated during immune responses, was reduced in MK2 deficient mice also (about 4.2-fold compared with MPTP-treated WT mice). These data suggest a reduced inflammatory response after MPTP challenge as the reason for the neuroprotection in MK2<sup>-/-</sup> mice.

## Discussion

In this study, we suggest a significant role for the p38 MAPK-activated protein kinase MK2 in the inflammatory response of the brain and subsequently a role in inflammation-dependent neurodegeneration. Using an *ex vivo* and an *in vivo* model we could demonstrate that the degeneration of neurons is significantly reduced in neuron-glia cultures or mice lacking MK2.

### MK2 is essential for immune response and neuronal toxicity in neuron-glia cultures

The MK2-deficient mesencephalic neuron-glia cultures showed an increased survival of dopaminergic neurons compared with WT cultures when stimulated by LPS. This neuroprotection seemed not to be due to an altered neuronal cell death (Fig. 5) but rather to a reduced production of

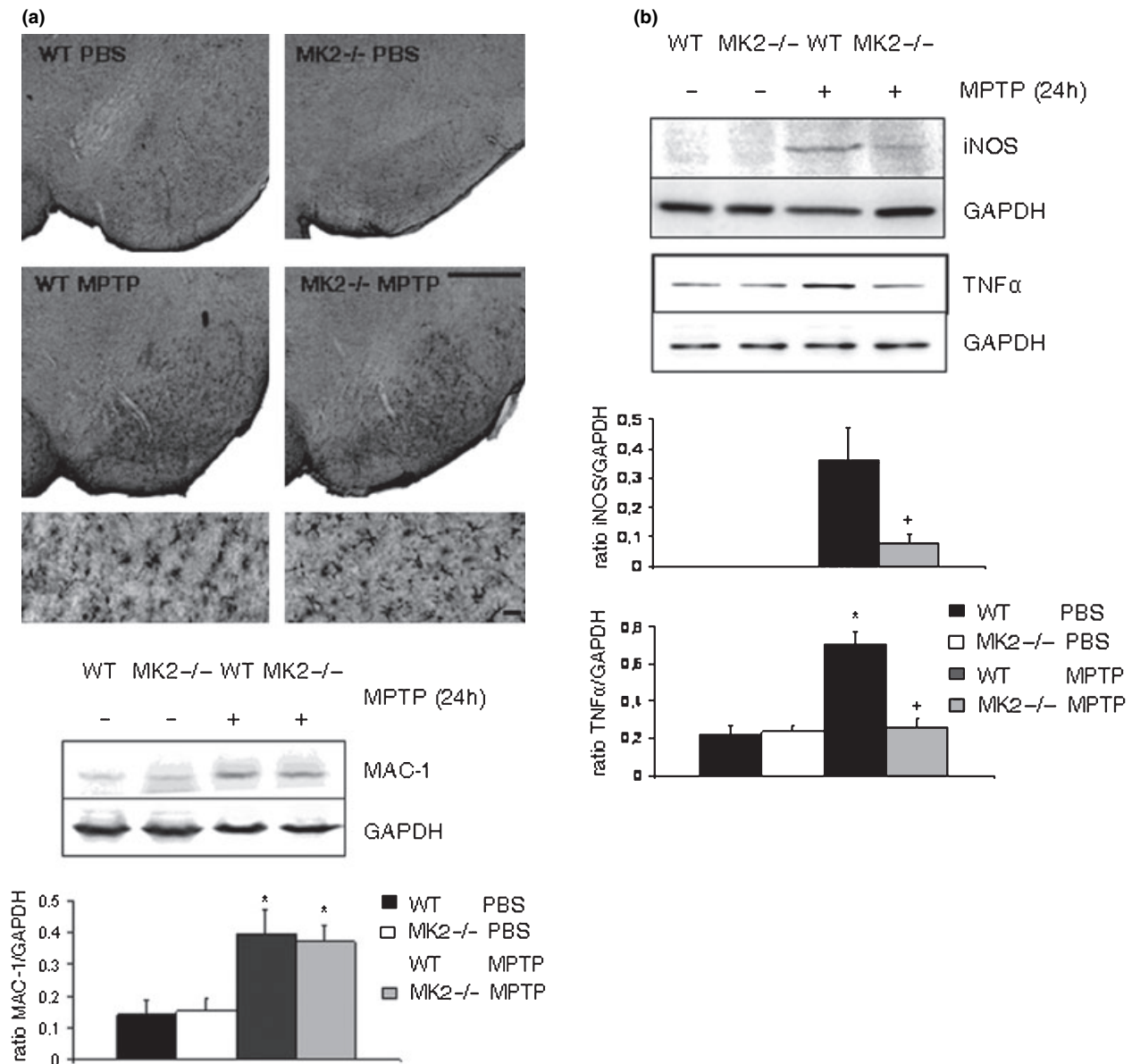
proinflammatory and neurotoxic factors, such as TNFα, IL-6, NO, and the chemokine KC (Fig. 2). Thus, the difference in the inflammatory response correlated with a higher ability of MK2<sup>-/-</sup> cultures to uptake the neurotransmitter DA and increased neuronal survival (Fig. 1). Inhibition of p38 MAPK before LPS stimulation could also reduce the inflammatory response and improved neuronal survival in WT, but not in MK2-deficient co-cultures. These findings indicate that MK2 is the key player in the inflammatory response after LPS stimulation. Further analysis of the p38 MAPK/MK2 pathway revealed no defects in signaling because of a reduced p38 MAPK protein level in MK2<sup>-/-</sup> cultures. These results are consistent with that of other (Culbert *et al.* 2006; Vertii *et al.* 2006), pointing to unknown compensating mechanism in the complex regulation of the p38 MAPK pathway. In summary, our observations clearly demonstrate an essential role of MK2 in neuroinflammation.

### MK2 effect is most probably because of the regulation of iNOS expression at the post-transcriptional level

Reactive oxygen species, including NO, are potent neurotoxic substances. Reducing either NO production by eliminating the iNOS gene or reactive oxygen species production by eliminating NADPH oxidase in mice significantly protects dopaminergic neurons from degeneration when animals or neuron-glia cultures are treated with substances like LPS, MPTP, or rotenone (Liberatore *et al.* 1999; Teismann *et al.* 2003; Qin *et al.* 2004). Here, inhibiting iNOS activity with L-NMMA or treatment with the NO-scavenger PTIO resulted in a marked reduction in degeneration of dopaminergic neurons in LPS-stimulated WT cultures (Fig. 2), demonstrating that neurodegeneration occurs through NO synthesis. Thus, neuroprotection in MK2-deficient cultures is most probably because of the reduced level of NO. On the other hand, the reduced TNFα levels in LPS-stimulated MK2<sup>-/-</sup> co-cultures could also be neuroprotective, as TNFα works synergistically on LPS-induced NO production (Fig. 3; Chao *et al.* 1993; Possel *et al.* 2000). However, in WT neuron-glia cultures neutralizing TNFα that was expressed after LPS stimulation led to a significant decrease of the NO level but did not reach the level of MK2<sup>-/-</sup> cultures stimulated with LPS only. This is a clear indication that the decrease in NO synthesis of MK2<sup>-/-</sup> cultures is only partial because of the reduced TNFα level. Furthermore, incubating neuron-enriched cultures with 50 ng/mL TNFα could not induce neuronal cell death (data not shown), indicating no direct role of TNFα in neuronal dying.

Mechanistically, the reduction in NO synthesis in MK2<sup>-/-</sup> cultures is most probably because of a reduced expression of iNOS which is regulated at the post-transcriptional level. The mRNA of iNOS contains the AU-rich elements, and it has been shown that the p38 MAPK/MK2 axis regulates mRNA stability and possibly also translation by a mechanism that involves the AU-rich element-binding





**Fig. 7** The MPTP-induced glial activation and reduced neuroinflammation in MK2-deficient mice. Mice were treated with MPTP and killed 24 h after the last injection. (a) MAC-1 expression characteristic for microglial activation. Immunohistochemistry of MAC-1 expression showed an intensive staining of activated microglia in the SNpc. In western blot experiments a similar level of MAC-1 24 h after MPTP treatment were detected. Scale bar lower magnification: 500  $\mu$ M, scale bar higher magnification: 15  $\mu$ M. (b) Analysis of

neuroinflammation. Western blots of TNF $\alpha$  and iNOS in the midbrain after MPTP treatment. As a loading control blots were developed against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Quantification was done by determining the intensity of bands by densitometry. Note that MK2-deficient mice show the same expression of MAC-1 but a reduced level of iNOS and TNF $\alpha$ ,  $n = 3$  mice per group. \* $p < 0.05$  compared with PBS injected mice, † $p < 0.05$  compared with MPTP-treated WT mice. Values were represented as mean  $\pm$  SEM.

protein tristetraprolin (TTP) (Clark *et al.* 2003; Dean *et al.* 2004; Hitti *et al.* 2006). Interestingly, the p38 MAPK is involved in the expression of iNOS in glia cells (Bhat *et al.* 2002) and recent reports suggest a direct role of TTP in the regulation of iNOS at the post-transcriptional level (Rodríguez-Pascual *et al.* 2000; Fechir *et al.* 2005). Accordingly, LPS-stimulation of mesencephalic neuron-glia cultures deficient in TTP resulted in an increased production of NO

(T. Thomas and E. Hitti, unpublished). These results strongly suggest a MK2-dependent regulation of iNOS expression at the post-transcriptional level.

#### MK2 is not directly involved in neuronal cell death

It has been shown that p38 MAPK has a role in neuronal apoptosis (Cheng *et al.* 2001; Choi *et al.* 2004) and that there is a role of MK2 in apoptosis of mouse embryonic fibroblast

cells after arsenite and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (Vertii *et al.* 2006). We demonstrate that p38 MAPK, but not MK2, participates in neuronal cell death (Fig. 5). Treatment of neuron-enriched cultures with the NO donor SNP resulted in neuronal cell death unaffected by MK2 ablation. Furthermore, in neuron-enriched WT cultures pre-incubation with the MK2-I had no influence on cell death. Accordingly, inhibition of p38 MAPK activity led to comparable decrease in neuronal cell death in WT and MK2-deficient neurons. The decrease is not complete as other kinases such as Jun N-terminal kinases are also involved in neuronal apoptosis (Nangung and Xia 2000; Harding *et al.* 2001; Kanda and Miura 2004; Ouyang and Shen 2006). In summary, our results show that MK2 together with p38 MAPK is involved in the endogenous production of NO in glia, while in NO-induced neuronal cell death only p38 MAPK participates. Interestingly, a recent report showed that MK2 is highly expressed in microglia but less expressed in astrocytes and neurons (Culbert *et al.* 2006). This correlates with our functional analysis of neuronal apoptosis and inflammation in this study.

### A role for MK2 in Parkinson's disease

The neurotoxin MPTP is a commonly used tool in PD research. Its in glia cells produced metabolite MPP<sup>+</sup> is uptaken by DA transporters expressed specifically on dopaminergic neurons, thus, causing their cell death (Tipton and Singer 1993). Here, we show that MK2-deficient mice exhibited a better Rotarod performance in the first 3 days after MPTP injections compared with WT mice (Fig. 6). Furthermore, all but one MK2<sup>-/-</sup> mice survived the treatment while about 70% of WT mice died. These data suggest a systemic toxic effect of MPTP possibly on the cardiovascular system as a reason for the initial locomotor impairment and the mortality in WT mice. We can rule out the possibility that the differences in Rotarod performance and survival between MK2<sup>-/-</sup> and WT mice are due an altered MPTP metabolism as there were no differences in MPP<sup>+</sup> levels in MK2 deficient or WT mice detected (Table 1). Interestingly, injection of MPTP to TNF $\alpha$  knockout mice revealed similar results in survival (Ferber *et al.* 2004), suggesting that the reduced TNF $\alpha$  production in MK2-deficient mice contributes to the reduced systemic toxicity of MPTP. Seven days after MPTP treatment no differences in Rotarod performance were detectable between MK2<sup>-/-</sup> and the surviving WT mice, implicating no differences in the development of PD. However, immunohistochemical analysis and quantification of loss of dopaminergic neurons in the SNpc revealed an increased number of TH-positive neurons in MK2<sup>-/-</sup> mice, demonstrating a protection of neurodegeneration by MK2 ablation *in vivo*. MPTP treatment of WT mice killed 47% of the dopaminergic neurons in the SNpc, while in MK2<sup>-/-</sup> only 21% died. For development of typical PD symptoms like tremor, slowness of movement, stiffness or

poor balance a loss of about 70% of dopaminergic neurons in the SNpc is needed (Pakkenberg *et al.* 1991) explaining the absence of PD symptoms on the Rotarod in our experiments. The neuroprotection after MPTP treatment in MK2-deficient mice seems not to be due to an altered activation of microglia but to a reduced production of inflammatory mediators and neurotoxic substances, like TNF $\alpha$  and iNOS (Fig. 7). Taken together our results together with the analysis of mice deficient in COX-2 or iNOS or the results when mice are pre-treated with anti-inflammatory drugs (Du *et al.* 2001; Wu *et al.* 2002; Lee *et al.* 2004) emphasizes the outstanding role of inflammation in PD. In an animal model of seizure disorder we could confirm protection from degeneration by MK2 ablation (Thomas *et al.*, in preparation). After injection of kainic acid and immunohistochemistry two days after status epilepticus MK2<sup>-/-</sup> mice exhibited a significant higher number of neurons in the pyramidal layer of the hippocampus compared with WT mice.

Overall, our findings suggest an essential role of MK2 in the p38 MAPK pathway-mediated inflammation resulting in neurodegeneration. We propose that the effect of MK2 in neuronal toxicity is at the expression of inflammatory genes in glia cells and not at the level of neuronal apoptosis. This makes MK2 an interesting target for an anti-inflammatory therapy of neurodegenerative diseases.

### Acknowledgements

We are grateful to T. Iakovleva for genotyping and introduction into mouse breeding. We also want to thank Maike Wesemann (Hannover Medical School, Germany) for helpful discussions in immunocytochemistry and for introduction and support in preparing mesencephalon from embryonic mice.

### References

- Barone F. C., Irving E. A., Ray A. M. *et al.* (2001) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia. *Med. Res. Rev.* **21**, 129–145.
- Bhat N. R., Feinstein D. L., Shen Q. and Bhat A. N. (2002) p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J. Biol. Chem.* **277**, 29584–29592.
- Chao C. C., Molitor T. W. and Hu S. (1993) Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *J. Immunol.* **151**, 1473–1481.
- Cheng A., Chan S. L., Milhavet O., Wang S. and Mattson M. P. (2001) p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 43320–43327.
- Choi W. S., Eom D. S., Han B. S., Kim W. K., Han B. H., Choi E. J., Oh T. H., Markelonis G. J., Cho J. W. and Oh Y. J. (2004) Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.* **279**, 20451–20460.

- Clark A. R., Dean J. L. and Saklatvala J. (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Lett.* **546**, 37–44.
- Culbert A. A., Skaper S. D., Howlett D. R., Evans N. A., Facci L., Soden P. E., Seymour Z. M., Guillot F., Gaestel M. and Richardson J. C. (2006) MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **281**, 23658–23667.
- Da Silva J., Pierrat B., Mary J. L. and Lesslauer W. (1997) Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 28373–28380.
- Dean J. L., Sully G., Clark A. R. and Saklatvala J. (2004) The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell. Signal.* **16**, 1113–1121.
- Du Y., Ma Z., Lin S. *et al.* (2001) Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 14669–14674.
- Fechir M., Linker K., Pautz A., Hubrich T., Forstermann U., Rodriguez-Pascual F. and Kleinert H. (2005) Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric-oxide synthase gene. *Mol. Pharmacol.* **67**, 2148–2161.
- Ferger B., Leng A., Mura A., Hengerer B. and Feldon J. (2004) Genetic ablation of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *J. Neurochem.* **89**, 822–833.
- Galea E., Reis D. J., Fox E. S., Xu H. and Feinstein D. L. (1996) CD14 mediate endotoxin induction of nitric oxide synthase in cultured brain glial cells. *J. Neuroimmunol.* **64**, 19–28.
- Gao H. M., Liu B. and Hong J. S. (2003) Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* **23**, 6181–6187.
- Ghatan S., Larner S., Kinoshita Y., Hetman M., Patel L., Xia Z., Youle R. J. and Morrison R. S. (2000) p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J. Cell Biol.* **150**, 335–347.
- Harada J. and Sugimoto M. (1999) An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspase and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Jpn. J. Pharmacol.* **79**, 369–378.
- Harding T. C., Xue L., Bienemann A., Haywood D., Dickens M., Tolkovsky A. M. and Uney J. B. (2001) Inhibition of JNK by overexpression of the JNL binding domain of JIP-1 prevents apoptosis in sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* **276**, 4531–4534.
- Hitti E., Iakovleva T., Brook M., Deppenmeier S., Gruber A. D., Radzioch D., Clark A. R., Blackshear P. J., Kotlyarov A. and Gaestel M. (2006) Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2399–2407.
- John G. H., Cooper C. L., Wilson B., Chang R. C., Jang K. J., Kim H. C., Liu B. and Hong J. S. (2002) p38 MAP kinase is involved in lipopolysaccharide-induced dopaminergic neuronal cell death in rat mesencephalic neuron-glia cultures. *Ann. NY Acad. Sci.* **962**, 332–346.
- Kanda H. and Miura M. (2004) Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J. Biochem.* **136**, 1–6.
- Kontoyiannis D., Boulougouris G., Manoloukos M. *et al.* (2002) Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* **196**, 1563–1574.
- Kotlyarov A., Neininger A., Schubert C., Eckert R., Birchmeier C., Volk H. D. and Gaestel M. (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- $\alpha$  biosynthesis. *Nat. Cell Biol.* **1**, 94–97.
- Kotlyarov A., Yannoni Y., Fritz S., Laass K., Telliez J. B., Pitman D., Lin L. L. and Gaestel M. (2002) Distinct cellular functions of MK2. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4827–4835.
- Lee S. C., Liu W., Dickson D. W., Brosnan C. F. and Berman J. W. (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J. Immunol.* **150**, 2659–2667.
- Lee S. M., Yune T. Y., Kim S. J., Kim Y. C., Oh Y. J., Markelonis G. J. and Oh T. H. (2004) Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF- $\alpha$  expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. *J. Neurochem.* **91**, 568–578.
- Lehner M. D., Schwoebel F., Kotlyarov A., Leist M., Gaestel M. and Hartung T. (2002) Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-deficient mice show increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **168**, 4667–4673.
- Liberatore G. T., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Mandir A. S., Vila M., McAuliffe W. G., Dawson V. L., Dawson T. M. and Przedborski S. (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat. Med.* **5**, 1403–1409.
- Liu B., Du L. and Hong J. S. (2000) Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 607–617.
- Matyszak M. K. (1998) Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. *Prog. Neurobiol.* **56**, 19–35.
- Namgung U. and Xia Z. (2000) Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* **20**, 6442–6451.
- Neininger A., Kontoyiannis D., Kotlyarov A., Winzen R., Eckert R., Volk H. D., Holtmann H., Kollias G. and Gaestel M. (2002) MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* **277**, 3065–3068.
- Olanow C. W. and Tatton W. G. (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 123–144.
- Onyango I. G., Tuttle J. B. and Bennett J. P. Jr (2005) Activation of p38 and N-acetylcysteine-sensitive c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase signaling cascades is required for induction of apoptosis in Parkinson's disease cybrids. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 452–461.
- Oorschot D. E. (1996) Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J. Comp. Neurol.* **366**, 580–599.
- Ouyang M. and Shen X. (2006) Critical role of ASK1 in the 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* **97**, 234–244.
- Pakkenberg B., Moller A., Gundersen H. J., Mouritzen Dam A. and Pakkenberg H. (1991) The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **54**, 30–33.
- Possel H., Noack H., Putzke J., Wolf G. and Sies H. (2000) Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia* **32**, 51–59.
- Przedborski S., Jackson-Lewis V., Yokoyama R., Shibata T., Dawson V. L. and Dawson T. M. (1996) Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-

- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 4565–4571.
- Qin L., Liu Y., Wang T., Wei S. J., Block M. L., Wilson B., Liu B. and Hong J. S. (2004) NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J. Biol. Chem.* **279**, 1415–1421.
- Rodriguez-Pascual F., Hausding M., Ihrig-Biedert I., Furneaux H., Levy A. P., Forstermann U. and Kleinert H. (2000) Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* **275**, 26040–26049.
- Rostworowski M., Balasingam V., Chabot S., Owens T. and Yong V. W. (1997) Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *J. Neurosci.* **17**, 3664–3674.
- Rouse J., Cohen P., Trigon S., Morange M., Alonso-Llamazares A., Zamanillo D., Hunt T. and Nebreda A. R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027–1037.
- Ruano D., Revilla E., Gavilan M. P., Vizuete M. L., Pintado C., Vitorica J. and Castano A. (2006) Role of p38 and inducible nitric oxide synthase in the in vivo dopaminergic cells' degeneration induced by inflammatory processes after lipopolysaccharide injection. *Neuroscience* **140**, 1157–1168.
- Shohami E., Novikov M., Bass R., Yamin A. and Gallily R. (1994) Closed head injury triggers early production of TNF alpha and IL-6 by brain tissue. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**, 615–619.
- Sun A., Liu M., Nguyen X. V. and Bing G. (2003) P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp. Neurol.* **183**, 394–405.
- Teismann P., Tieu K., Choi D. K., Wu D. C., Naini A., Hunot S., Vila M., Jackson-Lewis V. and Przedborski S. (2003) Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 5473–5478.
- Timmer M., Cesnulevicius K., Winkler C., Kolb J., Lipkatic-Takacs E., Jungnickel J. and Grothe C. (2007) Fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 3 are required for the development of the substantia nigra, and FGF-2 plays a crucial role for the rescue of dopaminergic neurons after 6-hydroxydopamine lesion. *J. Neurosci.* **27**, 459–471.
- Tipton K. F. and Singer T. P. (1993) Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J. Neurochem.* **61**, 1191–1206.
- Vertii A., Hakim C., Kotlyarov A. and Gaestel M. (2006) Analysis of properties of small heat shock protein Hsp25 in MAPK-activated protein kinase 2 (MK2)-deficient cells: MK2-dependent insolubilization of Hsp25 oligomers correlates with susceptibility to stress. *J. Biol. Chem.* **281**, 26966–26975.
- Vezzani A. and Granata T. (2005) Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* **46**, 1724–1743.
- Vila M., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Djaldetti R., Liberatore G., Offen D., Korsmeyer S. J. and Przedborski S. (2001) Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 2837–2842.
- Volk H., Potschka H. and Loscher W. (2005) Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 517–531.
- Wang X., Xu L., Wang H., Young P. R., Gaestel M. and Feuerstein G. Z. (2002) Mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 deficiency protects brain from ischemic injury in mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 43968–43972.
- West M. J. and Gundersen H. J. (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **296**, 1–22.
- Wilms H., Rosenstiel P., Sievers J., Deuschl G., Zecca L. and Lucius R. (2003) Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J.* **17**, 500–502.
- Wu D. C., Jackson-Lewis V., Vila M., Tieu K., Teismann P., Vadseth C., Choi D. K., Ischiropoulos H. and Przedborski S. (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J. Neurosci.* **22**, 1763–1771.
- Yamagishi S., Yamada M., Ishikawa Y., Matsumoto T., Ikeuchi T. and Hatanaka H. (2001) p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.* **276**, 5129–5133.



### 3.2. Publikation 2

**MAP-kinase-activated protein kinase 2 expression and activity is induced after neuronal depolarization**

Tobias Thomas, Edward Hitti, Alexey Kotlyarov, Heidrun Potschka, and Matthias Gaestel

*European Journal of Neuroscience, 2008, Vol. 28, pp. 642-654*

# MAP-kinase-activated protein kinase 2 expression and activity is induced after neuronal depolarization

Tobias Thomas,<sup>1,\*</sup> Edward Hitti,<sup>1,†</sup> Alexey Kotlyarov,<sup>1</sup> Heidrun Potschka<sup>2</sup> and Matthias Gaestel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Strasse 1, D-30625 Hannover, Germany

<sup>2</sup>Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

**Keywords:** forskolin, kainic acid, MK2 knockout mouse, p38 mitogen-activated protein kinase, protein kinase A

## Abstract

Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MK)2 is one of several downstream targets of p38 mitogen-activated protein kinase and has a well documented role in inflammation. Here, we describe a possible new function of MK2. We show that triggering depolarization by potassium chloride or increasing the cellular cAMP by forskolin treatment led to elevated levels of expression and activity of mouse MK2. In both treatments, the kinase inhibitor H89 completely prevented the up-regulation of MK2 at the transcript level. By the use of different cell lines we demonstrated that the induction of MK2 expression is characteristic of neuronal cells and is absent in fibroblasts, macrophages and kidney cells. *In vivo*, induction of a status epilepticus by systemic administration of the chemoconvulsant kainic acid resulted in markedly reduced neurodegeneration in the pyramidal layer of the hippocampus, dentate gyrus and hilus of MK2-deficient mice compared with wild-type mice. Together, our data suggest a possible role of MK2 in the cellular response after neuronal depolarization, in particular in excitotoxicity.

## Introduction

Depolarization events are not only important in transferring an action potential to the synapse of a neuron resulting in the release of neurotransmitters into the synaptic cleft but also play a major role in synaptic plasticity (Martin *et al.*, 2000). As a consequence of membrane depolarization, voltage-gated calcium channels open, whereupon the resulting  $\text{Ca}^{2+}$  influx activates various intracellular signal transduction pathways. These pathways include members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family (Rosen *et al.*, 1994), protein kinase A (PKA) (Impey *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000), calcium/calmodulin-dependent kinases (Aletta *et al.*, 1996) and members of the protein kinase C family (Huang, 1989). The combined action of these intracellular signaling pathways leads to activation of various transcription factors resulting in transcription of immediate-early genes within minutes and, at later stages, delayed-response genes over the course of many hours. Among the genes described to be inducible by depolarization are tyrosine hydroxylase (Lewis-Tuffin *et al.*, 2004), synaptotagmin IV (Vician *et al.*, 1995), the transcription factor c-fos (Sheng *et al.*, 1990) as well as the kinase induced by depolarization-1 and the salt-induced kinase (Liu *et al.*, 2003).

The p38 MAPK pathway is classically activated by stress and inflammatory stimuli such as heat shock, lipopolysaccharide or cytokine treatment (Kyriakis & Avruch, 2001). Once activated, p38 MAPK phosphorylates its substrates, including cytoplasmic and nuclear targets, to regulate diverse cellular responses such as cell

proliferation, differentiation, survival, the inflammatory response and even apoptosis. In addition to transcription factors, the MAPK-activated protein kinase (MK)2 is one of several targets of p38 MAPK in the nucleus. After phosphorylation, MK2 is translocated from the nucleus to the cytoplasm, making MK2 a possible candidate for a cytoplasmic effector role of p38 MAPK action (Ben-Levy *et al.*, 1998; Engel *et al.*, 1998). Substrates for MK2 include cytoplasmic and nuclear proteins, such as heat shock protein (HSP)27 (Stokoe *et al.*, 1992), the mRNA binding protein tristetraprolin (TTP) (Chrestensen *et al.*, 2004; Stoecklin *et al.*, 2004) or the transcription factor serum response factor (Heidenreich *et al.*, 1999). The best-characterized function of the p38 MAPK/MK2 axis is the post-transcriptional regulation of mRNAs containing adenylate/uridylate-rich elements in their 3' untranslated region most probably by a mechanism involving TTP (Dean *et al.*, 2004; Hitti *et al.*, 2006). In addition to the role of MK2 in inflammation, recent reports also suggest a role of MK2 in apoptosis and cell cycle control (Manke *et al.*, 2005; Vertii *et al.*, 2006). Interestingly, an elevated level of MK2 mRNA after kainic acid (KA)-induced seizures in the hippocampus of treated rats has also been reported (Vician *et al.*, 2004).

Due to the role of p38 MAPK in depolarization and KA-induced seizures (Enslin *et al.*, 1996; Jeon *et al.*, 2000) and the fact that an elevated level of MK2 mRNA can be found after KA administration in the rat hippocampus (Vician *et al.*, 2004), we decided to characterize the expression and activation of MK2 after depolarization and demonstrate a physiological function of MK2 in this process *in vivo*.

Correspondence: Dr M. Gaestel, as above.

E-mail: gaestel.matthias@mh-hannover.de

\*Present address: Department of Neurology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany.

†Present address: Program in BioMolecular Research, King Faisal Specialist Hospital and Research Center, Riyadh, Saudi Arabia.

Received 6 March 2008, revised 20 May 2008, accepted 19 June 2008

## Materials and methods

### Reagents

$\alpha/\gamma^{33}\text{P}$ -ATP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ ) was purchased from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany). Horse serum, fetal calf serum (FCS),

penicillin and streptomycin were from PAA (Pasching, Austria). The PKA inhibitor H89 was from Alexis (Lausen, Switzerland). Forskolin was obtained from Sigma (Hamburg, Germany). The p38 inhibitor SB203580 was from Calbiochem-Novabiochem Corp. (La Jolla, CA, USA). Antibodies against MK2, p38, p-p38, phospho-cAMP response element-binding protein (CREB) and extracellular signal-regulated kinase (ERK)3 were purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA). Actin and secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Antibody against glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) was purchased from Chemicon (Temecula, CA, USA).

#### Cell culture and treatment

Rat pheochromocytoma (PC)12 cells were cultured in RPMI medium with glutamine (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated horse serum, 5% FCS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The medium for the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y consisted of RPMI medium with glutamine (Gibco/Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Human embryonic kidney 293 cells, mouse embryonic fibroblasts and the murine macrophage cell line RAW 264.7 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, high glucose with L-glutamine and Na-pyruvate (Gibco/Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The murine neuronal stem cell line C17.2 was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% FCS and 5% horse serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. All cell lines were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

For those cultures stimulated for the expression of MK2, KCl dissolved in culture medium (50 mM final concentration) or forskolin (50 µM final concentration) was added. After exposure for the indicated times, cells were harvested and MK2 expression was analysed in Western and northern blot experiments.

#### MK2 protein stability experiments in PC12 cells

In protein stability experiments MK2 expression was induced by incubating PC12 cells in the presence of 50 µM forskolin for 16 h. After this induction period cycloheximide (10 µM final concentration) was added. After different time-points, lysates were prepared and the same amounts of total protein were applied to western blot analysis. Detection of the unstable protein ERK3 demonstrated functional inhibition of translation by cycloheximide. Control cultures were treated with vehicle only.

#### Inhibition of the PKA pathway

Protein kinase A was inhibited by culturing PC12 cells for 1 h in the presence of the inhibitor H89 (20 µM final concentration). After this preincubation period MK2 expression was induced by adding 50 µM forskolin for 24 h. For functional analysis of inhibition of the PKA pathway, the phosphorylated and activated form of the transcription factor CREB, phospho-CREB, was detected in western blot experiments.

#### Western blot analysis

Preparation of crude cell lysates and Western blot experiments was performed as previously described (Thomas *et al.*, 2008). Typically, 100 µg of total protein was loaded on 12% polyacrylamide gels and transferred to Hybond ECL nitrocellulose membranes (Amersham

Pharmacia Biotech, Munich, Germany). Specific protein bands were detected with the chemiluminescence ECL system (Santa Cruz Biotechnology) in the documentation system LAS-300 (FUJIFILM, Düsseldorf, Germany) and quantified by densitometry using the program AIDA Image Analyzer 3.5.

#### Immunoprecipitation and kinase assays

Immunoprecipitation buffer (500 µL) (1 × Tris-buffered saline, 50 mM NaF, 1% Triton X-100 and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) and MK2-specific antiserum (5 µL) (Engel *et al.*, 1998) were added to 300 µg of total protein. Protein G-sepharose beads (30 µL) (Amersham Pharmacia Biotech) (a 50% slurry pre-equilibrated in immunoprecipitation buffer) were added, the mixture was rotated at 4°C overnight and sepharose beads were washed five times with phosphate-buffered saline. The MK2 kinase reaction was carried out using HSP25 as substrate in the presence of γ<sup>33</sup>P-ATP as described previously (Shi *et al.*, 2003) with changes. In a typical experiment 10 µL of substrate buffer [10 µg HSP25, 2.5 µL 10 × reaction buffer (500 mM sodium-β-glycerophosphate, 1 mM EDTA, pH 7.4)] and 5 µL hot buffer (100 mM magnesium acetate, 2 mM ATP, 1 µCi γ<sup>33</sup>P-ATP) were incubated for 30 min at 30°C with the beads. The reaction was stopped by adding 8 µL of 4 × Laemmli's sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer. After SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (12%), gels were dried and the incorporation into HSP25 was visualized by phospho-imaging using a Bas-1500 (Fuji).

#### Northern blot analysis

Total RNA was isolated from PC12 cultures using the Qiagen RNeasy Kit. The RNA concentration was determined by spectrophotometric measurement at 260 nm. Appropriate amounts of RNA were separated on 1% agarose/formaldehyde gels and blotted onto nylon membrane (Hybond-N+, Amersham, UK). The membranes were prehybridized for 2–4 h at 62°C with RAPID-HYB buffer (Amersham Biosciences, Munich, Germany). MK2 mRNA was detected by hybridization to <sup>33</sup>P-labeled MK2 cDNA fragments (bp 28–986 of NM008551) overnight at 62°C in the same buffer. Afterwards, blots were washed twice with 2 × saline sodium citrate, 0.1% SDS and three times with 0.1 × saline sodium citrate, 0.1% SDS at 68°C. Detection of radioactivity was visualized by phospho-imaging using a Bas-1500 (Fuji). Intensity of the bands was quantitatively analysed using the program AIDA Image Analyzer 3.5. The mRNA levels were normalized with a 514-bp β-actin cDNA probe (Neininger *et al.*, 2002). The probes were labeled using the Megaprime Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

#### Animals and treatment

The MK2 knockout mice were generated as described previously (Kotlyarov *et al.*, 1999). All mice were kept under controlled environmental conditions and had a standard laboratory diet (Altromin 1324) and tap water *ad libitum*. For experiments, mice on a mixed 129v × C57Bl/6 background were injected i.p. with 25 mg/kg KA (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) dissolved in 3 mL/kg isotonic saline (pH 7.2). Control mice of each genotype were treated with saline instead of KA and received diazepam (10 mg/kg), as did the KA-treated mice. All mice developed a convulsive status epilepticus at this dose of kainate, characterized by generalized seizure activity. The time that a mouse spent in status epilepticus with generalized motor seizures was limited to 2 h by i.p. administration of diazepam (10 mg/kg). Animals were killed by cervical dislocation 2 days after

status epilepticus to determine the extent of neurodegeneration. All animal care and handling was conducted in compliance with the German Animal Welfare Act and was approved by the Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz.

#### Immunohistochemistry of brain sections

Brain sections were prepared as previously described (Volk *et al.*, 2005). Briefly, animals were anesthetized with 10% chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and fixed by transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde and 1.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6). Brains were quickly removed and cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6) at 4°C for 3 days, frozen and cryosectioned coronally at 30 µm thickness on a freezing microtome (Frigomobil 1205; Jung, Heidelberg, Germany). For immunohistochemistry, free-floating sections were thawed at room temperature (25°C) and incubated in 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. After blocking for 60 min with Tris-buffered saline containing 2% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100 and 5% rabbit serum, sections were incubated with primary antibody overnight. For staining, sections were successively incubated with biotin-labeled secondary antiserum (rabbit anti-mouse IgG, 1.2 µg/mL; Dako, Hamburg, Germany) for 60 min and horseradish peroxidase-labeled streptavidin (1.65 µg/mL; Dako) for 90 min, followed by a nickel-intensified diaminobenzidine reaction (0.05% 3,3-diaminobenzidine and 0.6% ammonium nickel sulfate; both from Sigma) in the presence of 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min. Sections were washed, mounted to slides, air dried, treated with toluol for 1 min and coverslipped with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Neurons in sections of KA-treated mice were identified with an antibody recognizing the neuron-specific nuclear protein (NeuN) (1 : 2000; Chemicon).

#### Morphological evaluation of the hippocampus

The number of NeuN-positive neurons in the hilus was determined as described previously (Brandt *et al.*, 2003). In brief, in every sixth NeuN-stained section the size of the hilus was determined under high magnification (10 × objective). Cell counting inside the defined borders was performed at 200 × magnification. Determination of the size and cell number was performed using an Axioskop and the image analysis system KS400 (Zeiss, Jena, Germany). On average, six sections per animal were analysed. All sections were defined by the atlas of Paxinos and Watson (1998) to ensure that corresponding sections were compared between groups. Additionally, neurodegeneration in the regions cornu ammonis (CA)1, CA3a, CA3c, dentate gyrus (DG) dorsal blade and DG ventral blade was determined using the following score: 0, no reduction; +1, slight reduction (20–40% neuronal loss); +2, intermediate reduction (40–60% neuronal loss) and +3, dramatic reduction (> 60% neuronal loss) of neuronal cell number. Neuronal loss must exceed 15–20% before it is reliably detected by visual inspection (Fujikawa *et al.*, 2000). The investigator was not aware whether coded NeuN-stained sections were from knockout or wild-type mice.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test using PRISM version 4.03 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). To determine group differences in the *in-vivo* experiments Student's two-tailed *t*-test was performed. All data are presented as mean ± SEM.

## Results

### *MK2 transcript and protein expression is induced in PC12 cells by depolarization and forskolin*

The MK2 protein level was analysed in PC12 cells after depolarization with high KCl (50 mM) or after increasing cellular cAMP levels with 50 µM forskolin. We found that exposure to high KCl or forskolin resulted in a significant up-regulation of MK2 protein, appearing as two related bands in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Cano *et al.*, 1996), after 8 h reaching a maximum at about 16 h (Fig. 1a). The same treatment did not cause changes in the protein level of the MAPK p38. Direct comparison of the forskolin or KCl induction showed that forskolin is the stronger inducer of MK2 expression (Fig. 1b). Quantitative analysis indicated an approximate threefold increase in the MK2 protein level after incubation for 24 h with high KCl, whereas forskolin increased the MK2 protein level approximately sixfold in this time (Fig. 1c).

As MK2 mRNA after high KCl-induced depolarization or forskolin treatment of PC12 cells has been described to be at a maximum after 4 h and then declines (Vician *et al.*, 2004), we asked how the relatively late maximum of MK2 protein expression (after 16–24 h) can be explained. Accordingly, we analysed the MK2 mRNA level and its protein stability after forskolin treatment. The analysis of the time course of the MK2 mRNA level in the presence of forskolin by northern blot experiments revealed results similar to those detected for MK2 protein. We found an induction of MK2 mRNA as early as 2 h after exposure, reaching saturation at about 8 h (Fig. 2a). Similar to the MK2 protein level, the level of MK2 transcript was still elevated after incubation for 24 h. The increase in MK2 transcript after high KCl treatment of PC12 cells revealed the same kinetics as found for forskolin treatment (data not shown). Forskolin also led to a higher MK2 mRNA expression after 24 h (about eightfold background level) compared with high KCl (about fourfold background level) (Fig. 2b). For protein stability experiments, we induced MK2 expression with forskolin for 16 h and added cycloheximide (final 10 µg/mL) to stop ribosomal protein translation. As controls, cells were stimulated with forskolin for 16 or 40 h or were left untreated. Interestingly, the MK2 protein level decreased slowly with an estimated half-life of about 12 h until it reached background level after 24 h (Fig. 2c). In the presence of cycloheximide, no MK2 protein was detectable after 48 h (data not shown). As a control, development of the same blot with an antibody against the unstable MAPK ERK3, which exhibits a half-life of only 30 min (Coulombe *et al.*, 2003), demonstrated functional inhibition of protein translation by cycloheximide. Hence, it seems that, within the time interval investigated, the induction of MK2 protein is the combined result of translation of accumulating transcripts and accumulation of the stable MK2 protein itself.

Taken together, our results demonstrate that depolarization and forskolin challenge of PC12 cells both result in induction of MK2 expression at the transcript and protein level.

### *Induction of MK2 expression depends on PKA activity*

The regulation of MK2 expression is reported to be under the control of ERK1/2 in mitogen-treated osteoblasts (Miguel *et al.*, 2005) and, additionally, ERK1/2 is activated after depolarization (Nashat & Langer, 2003) or forskolin treatment (Hansen *et al.*, 2003). Furthermore, depolarization and forskolin are known to activate CREB in a PKA-dependent manner (Ginty *et al.*, 1991; Misra & Pizzo, 2005). Consequently, we were interested in whether ERK or PKA activity is required for the induction of MK2 expression. We first tested the effect

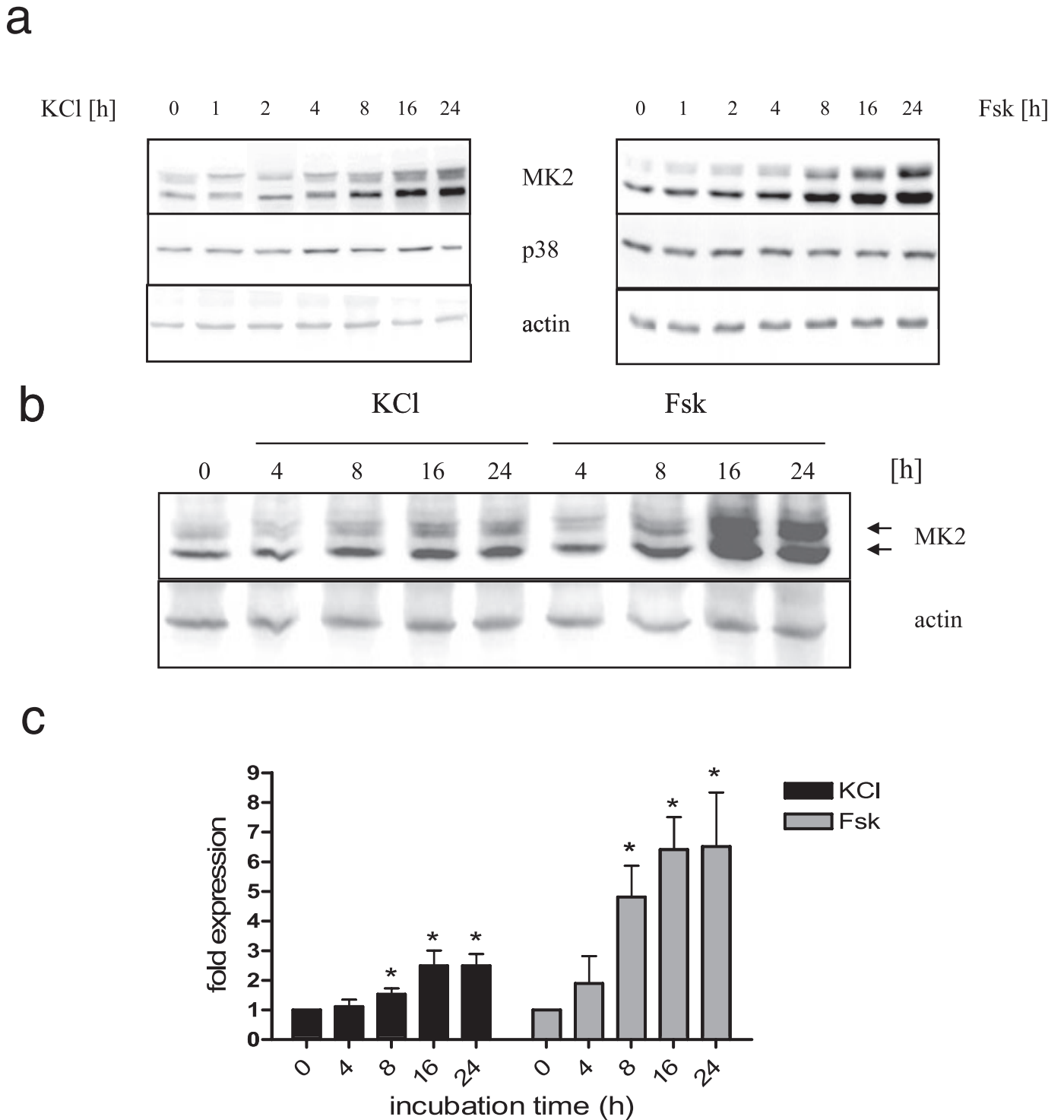
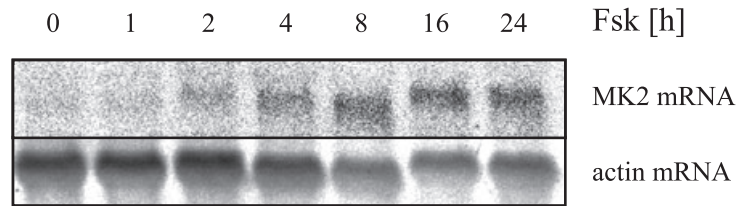


FIG. 1. MK2 protein expression is induced after depolarization by forskolin (Fsk) and high KCl treatment. PC12 cells were treated with either Fsk (50  $\mu$ M) or high KCl (50 mM) for the indicated time. Total lysates (100  $\mu$ g) were analysed in a western blot experiment using MK2 and p38 antibodies. In rodents MK2 is detected as a double band (arrows in b). As a loading control blots were developed against actin. (a) Comparison of the MK2 and p38 MAPK level after exposure to Fsk or high KCl. (b) Direct comparison of induction of MK2 protein expression after Fsk and high KCl exposure. (c) Quantification of MK2 protein expression levels. The intensity of MK2 bands was determined by densitometry and normalized to that of actin. The expression level of untreated cells was taken as 1. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P$  < 0.05 compared with untreated cultures.

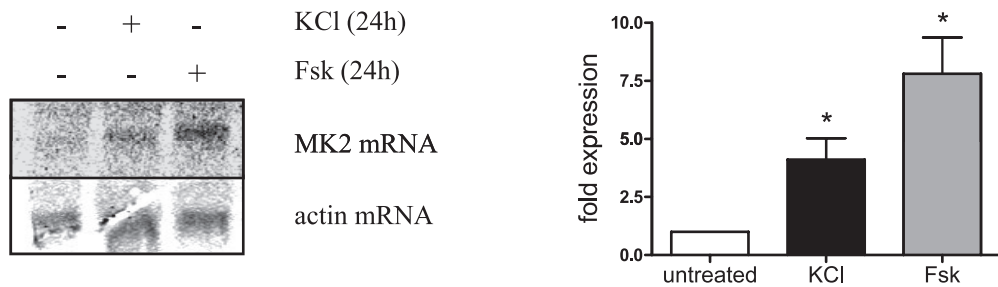
of the ERK inhibitor PD98059 and the PKA inhibitor H89 on the forskolin-induced up-regulation of the MK2 protein level. We found that a preincubation for 1 h with 20  $\mu$ M H89 completely inhibited the induction of MK2 protein by forskolin, whereas a preincubation with

PD98059 had no effect (Fig. 3a). To elucidate whether MK2 expression after depolarization is also controlled by the PKA pathway we incubated PC12 cells for 24 h with high KCl in either the presence or absence of the inhibitor. As expected, induction of MK2 expression

**a**



**b**



**c**

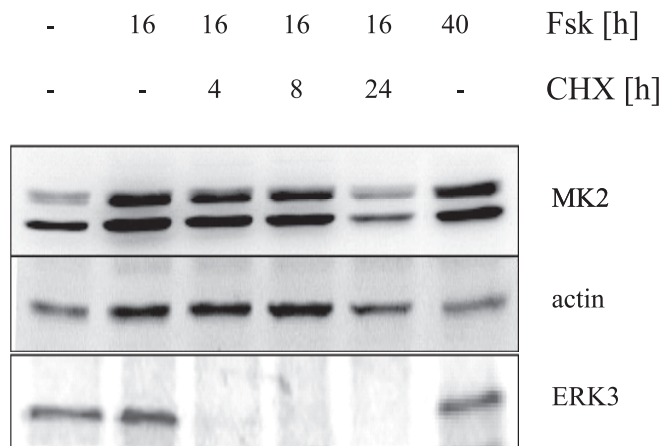


FIG. 2. Forskolin (Fsk) and high KCl treatment increase the MK2 transcript level. (a and b) The MK2 mRNA level is induced by Fsk or high KCl. (a) Total RNA was extracted from PC12 cells treated with 50  $\mu$ M Fsk for the indicated time-points. The RNA samples (10  $\mu$ g) were subjected to electrophoresis and transferred to a nylon membrane. The membrane was hybridized sequentially with MK2 and actin probes. (b) Comparison of MK2 mRNA levels of PC12 cells treated for 24 h with either high KCl or Fsk. Quantification was by densitometry and the MK2 mRNA level was normalized to that of actin. The expression level of untreated cells was taken as 1. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P$  < 0.05 compared with untreated cultures. (c) Estimation of protein stability of MK2. After an exposure for 16 h to 50  $\mu$ M Fsk, cycloheximide (CHX) (10  $\mu$ g/mL) was added for the indicated time-points to stop translation. Untreated cells and cells treated for 40 h with Fsk were taken as controls. Western blot analysis of cell lysates was performed for the detection of MK2. Blots were developed against actin as a loading control. Protein translation blots were developed against ERK3 for the analysis of functional inhibition.

by depolarization could also be prevented by inhibition of PKA activity (Fig. 3b). Developing the blot against phospho-CREB showed a functional inhibition by H89. To investigate whether PKA induces MK2 expression at the transcript level, we incubated PC12 for 24 h

with high KCl or forskolin either with or without a preincubation with H89 and performed northern blot experiments (Fig. 3b). We found that H89 prevented an increase in the MK2 transcript level for both cases of stimulation. It should be noted that incubation with H89 alone

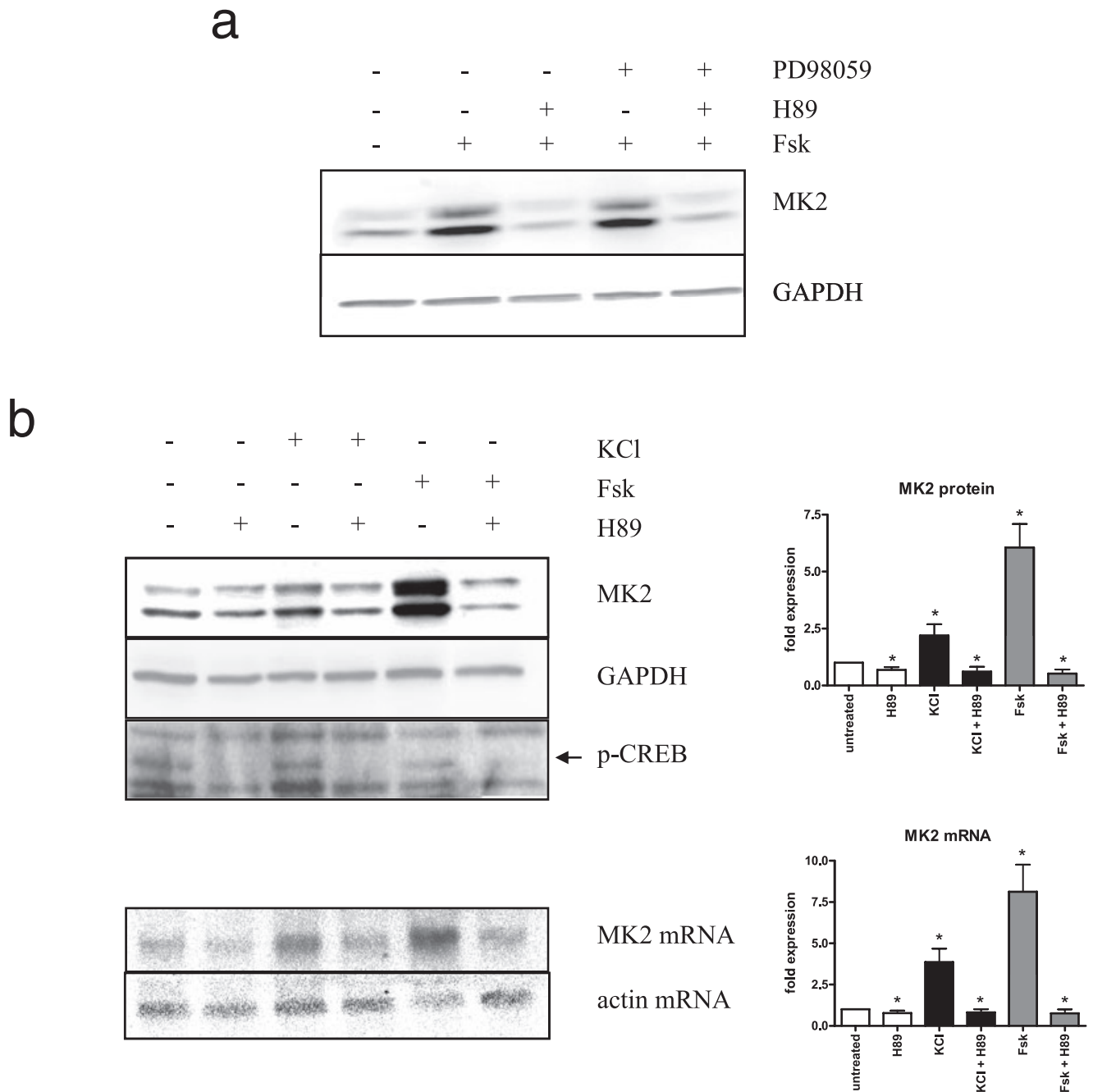


FIG. 3. PKA-dependent induction of MK2 expression after forskolin (Fsk) or high KCl exposure. PC12 cells were incubated for 24 h with either Fsk (50  $\mu$ M) or high KCl (50 mM) or left untreated. The ERK inhibitor PD98059 (10  $\mu$ M) and the PKA inhibitor H89 (20  $\mu$ M) were added 1 h before stimulation. (a) Fsk-induced MK2 protein expression is dependent on PKA but not on ERK activity. Total lysates (100  $\mu$ g) were analysed in western blot experiments after Fsk exposure with or without inhibition of ERK (PD98059) and/or PKA (H89). Blots were developed sequentially using MK2- and GAPDH-specific antibodies. (b) PKA controls MK2 expression after high KCl and Fsk treatment at the level of transcript. PC12 cells were incubated for 24 h with high KCl or Fsk in either the presence or absence of the PKA inhibitor H89. Upper panel: Western blot analysis of total lysates (100  $\mu$ g). To demonstrate the functional inhibition of PKA by H89, blots were first developed against phospho-CREB before detecting MK2 and GAPDH. Lower panel: Northern blot analysis of 10  $\mu$ g of RNA samples. MK2 and  $\beta$ -actin mRNA were detected by specific cDNA probes. Quantification of at least three (protein) or two (mRNA) independent experiments was performed by densitometry and the expression level was normalized to the level of the endogenous standard. The expression level of untreated cells was taken as 1. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P$  < 0.05 compared with untreated cultures.

significantly ( $P$  < 0.05) reduced MK2 expression to a level below that of untreated cells (Fig. 3b), indicating a role of PKA for the expression of endogenous MK2 as well. These results suggest that PKA activity is required for the induced expression and, in part, also for the endogenous expression of MK2 at the transcript level after depolarization and increasing cellular cAMP level.

*MK2 is activated in PC12 cells after treatment with high KCl and forskolin*

We next wondered whether the p38 MAPK/MK2 axis is activated after depolarization or forskolin treatment. To identify the enzymatic activation of p38 MAPK we performed western blot analysis with an antibody that recognizes the double-phosphorylated activated



form of p38 MAPK (p-p38 in Fig. 4). The expression level of p38 MAPK served as a loading control. As shown in Fig. 4 both stimuli activated p38 MAPK in a time-dependent manner. p38 MAPK was activated within 15 min (data not shown), reaching a maximum after 4 h (about twofold for KCl and 3.3-fold for forskolin exposure). After 4 h, p38 MAPK activity continuously decreased and reached background level after about 16 h. For detecting MK2 activity we performed an *in-vitro* kinase assay using HSP25 as substrate after immunoprecipitation of MK2. We found a kinetics for the activation of MK2 that was very similar to the kinetics of activation of p38 MAPK with a peak activity after 4 h of exposure (about 8.4-fold for forskolin and about 4.6-fold for high KCl). However, MK2 activity declined more slowly and was still detectable after 16 h when compared with p38 MAPK activation. A preincubation with the p38 MAPK-specific inhibitor SB203580 led to a total inhibition of MK2 activity. Surprisingly, inhibition of p38 MAPK also reduced the amount of phosphorylated p38 MAPK, suggesting autophosphorylation or activation of p38 MAPK by a positive feedback loop when PC12 cells are stimulated by high KCl or forskolin. Interestingly, MK2 activity was still slightly elevated after an incubation for 24 h with forskolin (about twofold over basal level), whereas it reached basal level when incubated with high KCl at this time (about 1.2-fold over basal level).

*Increasing MK2 protein level after forskolin treatment is specific for neuronal cells*

In the next set of experiments, we investigated whether induction of MK2 expression after increasing the cAMP level is a general cell-type-independent mechanism. Therefore, we incubated human embryonic kidney cells, mouse embryonic fibroblasts, murine macrophages (RAW 264.7), human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) and murine stem cells (line C17.2) with 50  $\mu$ M forskolin for the indicated time-points and analysed the MK2 protein level by specific antibodies using western blot (Fig. 5). Surprisingly, we could not detect a significantly increased MK2 protein level in any of these cell lines except for the neuronal cell line SH-SY5Y. These results suggest that the induction of MK2 expression controlled at the transcript level after increasing cellular cAMP level is specific for neuronal cells, represented by the cell lines SH-SY5Y and PC12.

*Reduced neurodegeneration in hippocampus of MK2-deficient mice after KA-induced epileptic seizures*

To evaluate the functional significance of MK2 in depolarization *in vivo*, we injected KA (25 mg/kg) into a group of wild-type ( $n = 7$ ) and MK2-deficient ( $n = 6$ ) mice. At this dose of KA, all mice developed a convulsive status epilepticus characterized by generalized

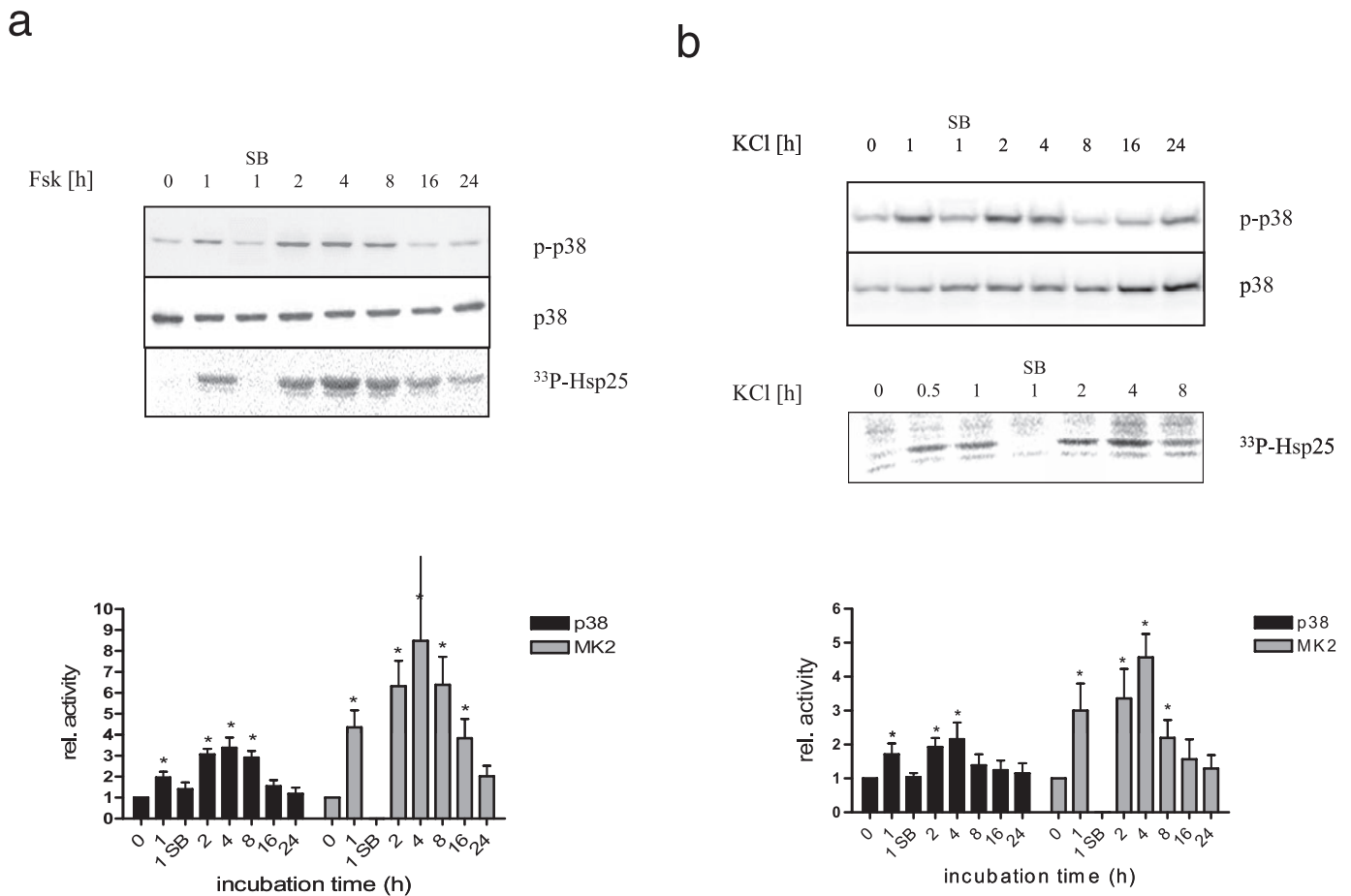


FIG. 4. The p38/MK2 pathway is activated after depolarization or forskolin (Fsk) treatment of PC12 cells. PC12 cells were treated with Fsk (a) or high KCl (b) for the indicated time-points. p38 was inhibited by a 1 h preincubation with SB203580 (SB) (10  $\mu$ M). Western blot analysis of cell lysates was performed for the detection of activated (p-p38) or total p38. For the detection of kinase activity, MK2 protein was immunoprecipitated from total lysates, used in a kinase assay and phosphorylation of HSP25 was detected. Quantification was performed by densitometry and the activity of untreated cells was taken as 1. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with untreated cultures.



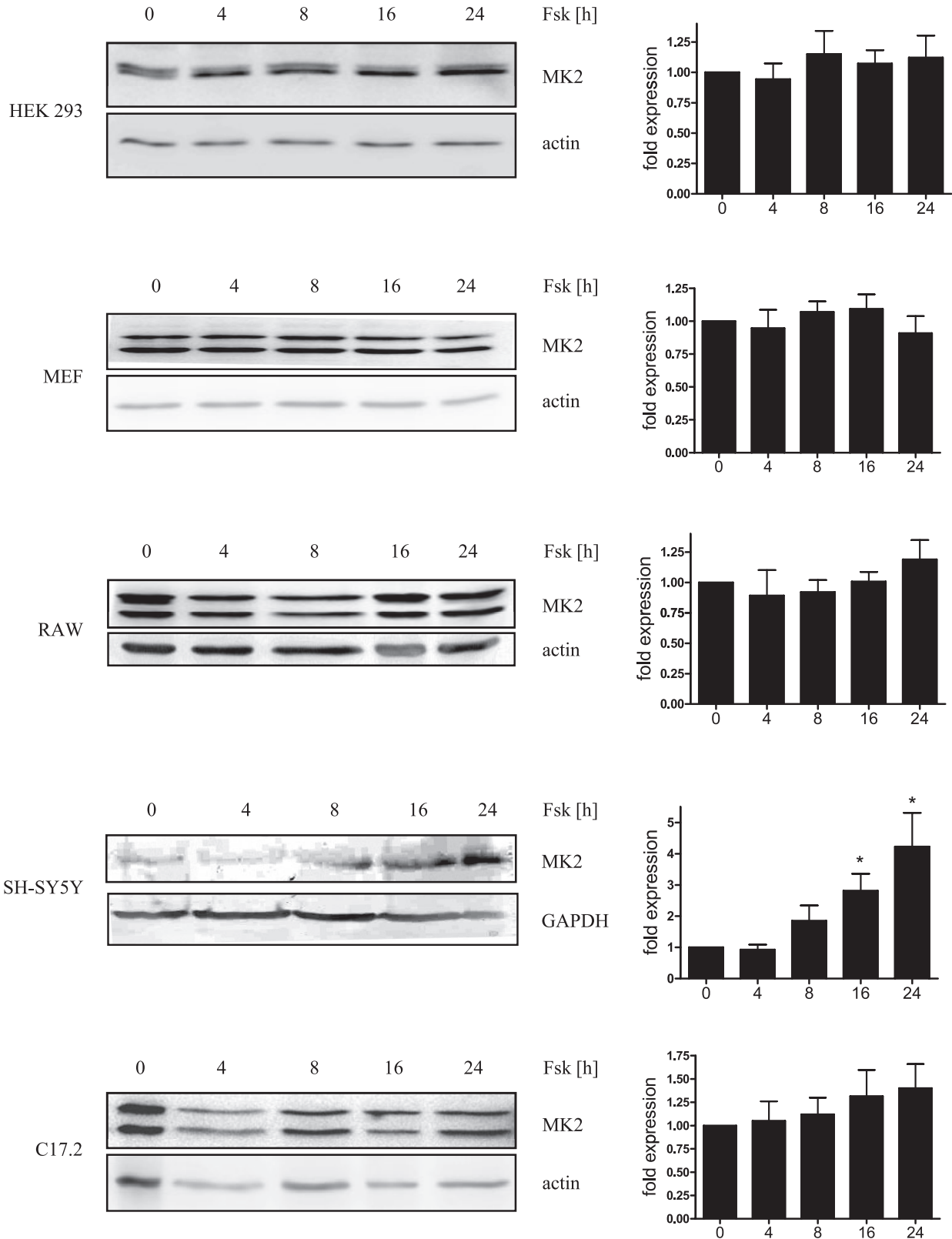


FIG. 5. Induction of MK2 expression after forskolin (Fsk) treatment is specific for neuronal cells. Kidney cells [human embryonic kidney (HEK)293], fibroblasts [mouse embryonic fibroblasts (MEFs)], macrophages (RAW 264.7), neuroblastoma cells (SH-SY5Y) and neuronal stem cells (C17.2) were incubated with Fsk for the indicated time-points or left untreated. Induction of MK2 protein expression was analysed in western blot experiments. Loading was controlled by developing blots against actin or GAPDH. Quantification was performed by densitometry and the MK2 protein level was normalized to the expression of the endogenous standard. The expression level of untreated cells was taken as 1. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with untreated cultures.

seizure activity. The time spent in status epilepticus with generalized motor seizures was limited to 2 h by i.p. administration of diazepam (10 mg/kg). The development of characteristic convulsive seizure behaviors was observed as early as 10 min after drug treatment in both groups. To quantify neurodegeneration, mice were kept after KA administration for an additional 2 days and the neuronal cell number in the hilus, a vulnerable region after traumatic brain injury and KA-induced seizures (Ben-Ari, 1985; Lowenstein *et al.*, 1992), was determined performing immunohistochemistry using anti-NeuN-specific antibodies. We found that, in KA-treated mice, MK2 deficiency led to a statistically significant ( $P < 0.05$ ) reduced neurodegeneration in the hilus compared with wild-type mice (Fig. 6a). To analyse the neuronal loss in the CA1, CA3a, CA3c and DG we used the following scores: 0, no reduction; +1, slight reduction; +2, intermediate reduction and +3, dramatic reduction of neuronal cell number. We found a significant decrease in neurodegeneration of MK2-deficient mice in all examined regions except for the ventral blade of the DG (DG vb in Fig. 6d). The strongest degeneration was observed in region CA3a followed by CA1, DG dorsal blade and CA3c. Determination of neurodegeneration in the region of the DG by score offered results similar to quantification of neuronal cell loss (cf. Fig. 6a and d, DG total). Overall, neurodegeneration in the pyramidal layer, DG and hilus together was significantly reduced in MK2-deficient mice (Fig. 6d, total).

## Discussion

In this study we provide evidence suggesting a role of the protein kinase MK2 in the cellular response after depolarization *in vitro* and *in vivo*. Using PC12 cells as a model system, we demonstrated that depolarization induced by a high extracellular concentration of KCl or elevating intracellular cAMP levels by exposure to forskolin resulted in a delayed induction of MK2 expression at the transcript and protein level. Inhibition by H89 completely prevented the up-regulation of MK2 mRNA. Furthermore, we showed a p38 MAPK-dependent immediate activation of MK2 protein after depolarization and forskolin treatment of PC12 cells suggesting functional importance. Consequently, we analysed the effect of ablation of MK2 *in vivo* and demonstrated an MK2-dependent KA-induced neurodegeneration in the hippocampus, supporting the significant role of MK2 in cellular events after neuronal depolarization.

### *De-novo synthesis of MK2 after depolarization in neurons is dependent on a protein kinase inhibited by H89 at the level of transcription*

Although p38 MAPK-directed phosphorylation and thus activation of MK2 is well documented, relatively few reports describe induced changes in the MK2 mRNA and protein level. The analysis of growth factor-treated 3T3 cells revealed a 6.5-fold increase in MK2 mRNA level in an oligonucleotide array study (Fambrough *et al.*, 1999). MK2 expression is also up-regulated in lung tissue exposed to diesel exhaust particles (Reynolds & Richards, 2001) or in lipopolysaccharide/interferon ( $\gamma$ )-stimulated microglia (Culbert *et al.*, 2006). Although an induction of a precursor and mature RNA of MK2 was detected after depolarization in PC12 cells, it was not clear whether this transcript induction had any consequences at the level of MK2 protein or enzymatic activity (Vician *et al.*, 2004). Here, we demonstrated that exposure of PC12 cells to either high KCl or forskolin resulted in a persisting increase of MK2 transcript, protein and enzymatic activity. Interestingly, the same treatment caused

neither up-regulation of the p38 MAPK protein level nor of the mRNA level of MK3 (Vician *et al.*, 2004), another substrate kinase of p38 MAPK with high structural and functional similarity to MK2 (Ronkina *et al.*, 2007). This suggests that, within the p38 MAPK signaling module, MK2 expression and activation are dominant in the cellular response to depolarization.

It is well documented that the depolarization triggered by high KCl concentration induces a  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cell resulting in activation of adenylyl cyclase, whereas forskolin directly activates this enzyme. Therefore, incubation of PC12 cells with either high KCl or forskolin elevates the cAMP level within the cell leading to PKA activation and CREB-dependent gene expression. However, high KCl or forskolin treatment of PC12 cells also activates other signaling pathways, such as the ERK MAPK pathway, which is reported to be involved in the mitogenic-induced MK2 expression (Miguel *et al.*, 2005). Stimulating PC12 cells in the presence of the PKA inhibitor H89 or the MEK1 inhibitor PD98059 clearly demonstrated that the *de-novo* synthesis of MK2 after high KCl or forskolin treatment is independent of ERK activity. Moreover, inhibition by H89 completely prevented both high KCl-induced and forskolin-induced expression of MK2 even below the basal level, indicating an involvement of PKA also in the endogenous expression of MK2. However, although H89 is known to cross-inhibit other kinases, such as MSK, ROCKII or calcium/calmodulin-dependent kinase II, with a potency similar to PKA (Davies *et al.*, 2000), the absence of induction of MK2 expression after depolarization could be due to side inhibitions by H89. Indeed, a role of calcium/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin in the expression of MK2 transcript was recently demonstrated, suggesting a synergy of different signaling pathways after depolarization (Machado *et al.*, 2008). The lack of an elevated level of phospho-CREB after exposure for 24 h to either KCl or forskolin, where high MK2 mRNA levels are still present, further suggests an involvement of PKA-independent signaling pathways in the late phase of MK2 expression. However, the high MK2 expression level at these late time-points could simply be due to a stable MK2 transcript. The existence of a putative cAMP-responsive element, 5'-ACGTC-3', within the promoter region of the murine MK2 gene favors a possible role of the PKA/CREB pathway in the expression of MK2. Incubation with forskolin induced MK2 expression significantly more strongly than incubation with high KCl. This is probably due to a higher cellular cAMP level resulting from the more specific and stronger activation of adenylyl cyclase by forskolin. Altogether, our data suggest that the expression of MK2 after depolarization and increasing cellular cAMP level is of a complex nature, involving PKA and further H89-sensitive signaling pathways.

Most interestingly, the up-regulation of MK2 expression after depolarization is specific for neuronal cells. Stimulation of PC12 cells as well as the neuroblastoma cell line SH-SY5Y with forskolin resulted in the induction of an increased MK2 protein level, whereas this treatment could not induce MK2 in the macrophage-like cell line (RAW 264.7), kidney cells (human embryonic kidney 293) or fibroblasts (mouse embryonic fibroblasts). However, the missing induction of MK2 expression in non-neuronal cells may be due to the already high basal level of MK2 in these cells. Indeed, a lower level of MK2 transcript is found in neurons when compared with microglia and astroglia (Culbert *et al.*, 2006). The absence of the MK2 up-regulation in neuronal stem cells (C17.2), which can differentiate into neurons and glia (Snyder *et al.*, 1992), could also be explained by the undifferentiated stage of these stem cells and the lack of a fully developed neuronal character. Thus, induction of MK2 expression after depolarization could be restricted to neurons.

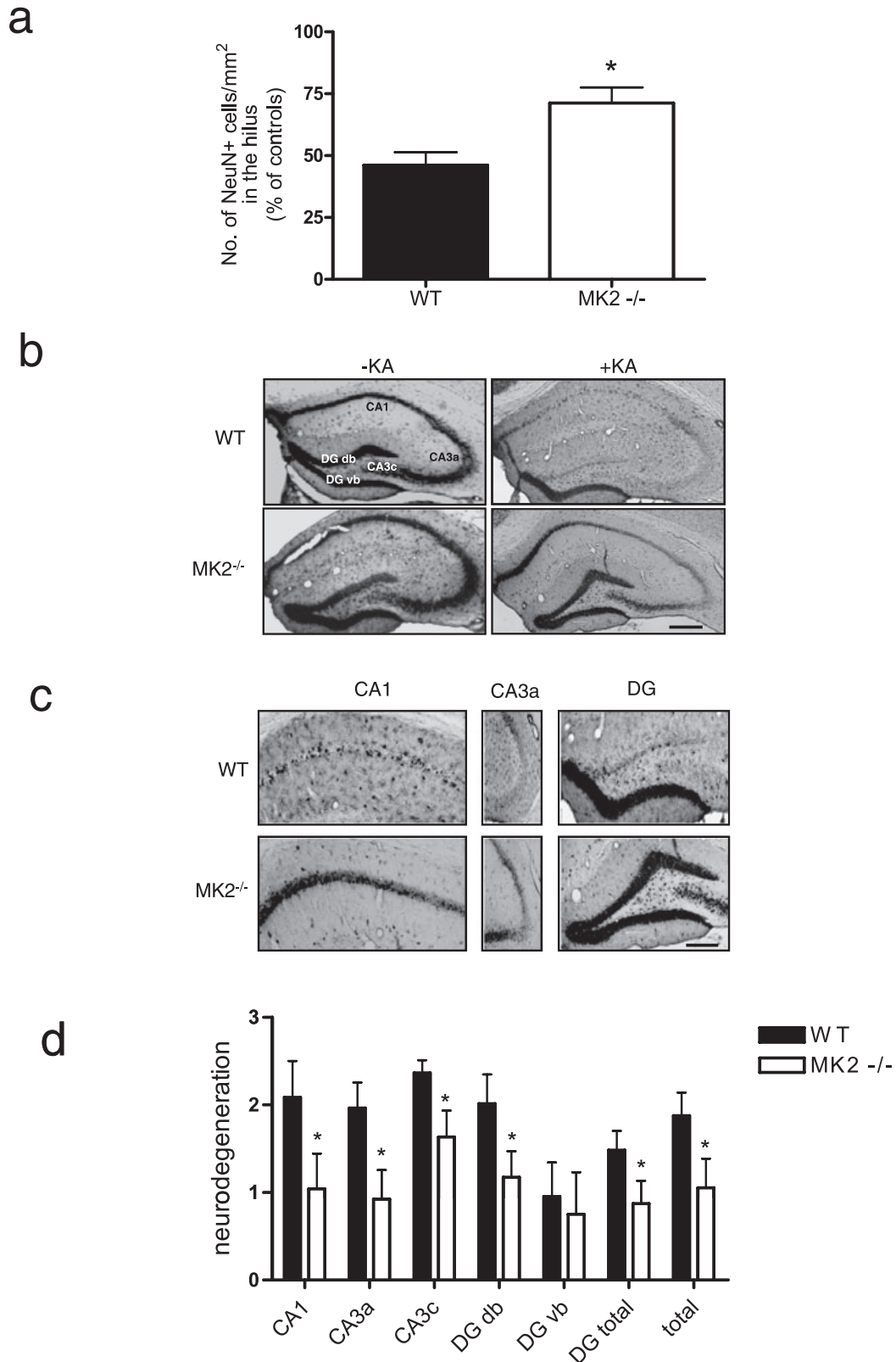


FIG. 6. MK2-deficient mice show less neurodegeneration in the KA status epilepticus model. Wild-type (WT) ( $n = 7$ ) and MK2-deficient ( $n = 6$ ) mice were injected i.p. with 25 mg/kg KA or left untreated ( $n = 3$ ). The time that mice spent in status epilepticus was limited to 2 h by i.p. administration of diazepam (10 mg/kg). Sections were prepared and stained for NeuN 2 days later. (a) Number of NeuN-positive cells/mm<sup>2</sup> in the hilus of KA-treated animals. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , Student's *t*-test. (b) Photomicrographs of NeuN-stained sections of a WT and an MK2 knockout mouse either untreated or treated with KA. Magnification, 40  $\times$ . db, dorsal blade; vb, ventral blade. Scale bar, 300  $\mu$ m. (c) Higher magnification of the CA1, CA3a and DG region of KA-treated animals. Magnification, 100  $\times$ . Scale bar, 200  $\mu$ m. (d) Assessment of neuronal loss in special hippocampal regions of KA-treated mice. 0, no reduction; 1, slight reduction; 2, intermediate reduction; 3, dramatic reduction of neuronal cell number. All data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , Student's *t*-test.

**MK2 activity is important for neuronal function after depolarization**

The protein kinase MK2 is a component of the p38 MAPK pathway and is classically activated by stress and inflammatory stimuli. It has a major function in cytokine production after lipopolysaccharide stimulation (Kotlyarov *et al.*, 1999). The p38 MAPK pathway has also been implicated in the induction of apoptosis in a number of cell types, including PC12 cells withdrawn from nerve growth factor (Xia *et al.*, 1995). Here, we describe a new role for the p38 MAPK/MK2 axis in the cellular response after depolarization. Exposure of PC12 cells to high KCl or forskolin immediately induced both p38 MAPK and MK2 activation in a time-dependent manner. Stimulation in the presence of SB203580 clearly demonstrated that MK2 activation is exclusively regulated by p38 MAPK. Interestingly, the activation of MK2 was stronger after treatment with forskolin compared with high KCl. This result suggests a PKA-dependent activation of the p38 MAPK/MK2 axis in neurons after depolarization, as demonstrated for the ERK pathway (Obara *et al.*, 2007; Sindreu *et al.*, 2007) and as we suggest for MK2 expression here. Furthermore, MK2 activation was still detectable after incubation with forskolin for 24 h, whereas MK2 activity after high KCl treatment of PC12 cells had already reached background level at this time-point. This phenomenon could be due to a higher MK2 protein level in the forskolin-treated cells. Thus, the delayed induction of MK2 protein expression could cause an extension of the immediate MK2 activation and could represent a cellular preparation for the next depolarization event, affirming the importance of MK2 in the cellular response after depolarization. Similar results are described in a recent report where an up-regulation in MK2 mRNA and activity could be linked with a possible role in Alzheimer's disease (Culbert *et al.*, 2006). After depolarization or forskolin treatment of PC12 cells for 24 h, the MK2 activity had reached approximately background level, whereas the MK2 protein level was still elevated even after 40 h of exposure. Thus, neurons might prepare for a second stress by up-regulation of MK2 expression.

The best-established cellular function of the p38 MAPK/MK2 axis is the stabilization of mRNAs containing adenylate/uridylylate-rich elements in their 3' untranslated region. The SNARE protein synaptotagmin IV is reported to be up-regulated after depolarization or in the hippocampus of KA-treated rats (Vician *et al.*, 1995). SNARE proteins play a primary role in the fusion of cellular transport vesicles with the cell membrane or with a target compartment (Scales *et al.*, 2001). The transcript of the synaptotagmin IV gene contains adenylate/uridylylate-rich elements in its mRNA. Consequently, the depolarization-induced expression of synaptotagmin IV could be augmented by MK2-dependent stabilization of its message. Indeed, stabilization of the oncogene PIM-1 mRNA, which also contains adenylate/uridylylate-rich elements and is induced after depolarization (Liu *et al.*, 2003), has been demonstrated after mitogen stimulation of lymphocytes (Wingett *et al.*, 1991). Thus, the p38 MAPK/MK2 pathway-mediated mRNA stabilization may not be limited to those messages traditionally considered to be inflammation related, such as cyclo-oxygenase-2, tumor necrosis factor- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ . Therefore, induction of MK2 expression could also contribute to synaptic function like neurotransmitter release. Interestingly, involvement of the p38 MAPK pathway in the control of synaptic function has been demonstrated by Cavalli *et al.* (2001).

**Role of MK2 in KA-induced seizures**

In the KA-induced animal model of seizure disorder, we investigated the role of MK2 in depolarization *in vivo*. After injection of KA, we

found a reduced degeneration of neurons in the hilus, DG and pyramidal layer of the hippocampus of MK2-deficient mice when compared with wild-type mice. By score, the reduction in neurodegeneration in MK2-deficient mice was estimated as CA3a followed by CA1, DG dorsal blade and CA3c. These results are in good agreement with another study reporting a strong neurodegeneration in the CA3a and a slight neurodegeneration in the CA1 region of the hippocampal pyramidal layer after KA-induced seizures in mice (Kim *et al.*, 2004). However, the neurodegeneration observed in this study was surprisingly strong. One explanation could be the method and dose of KA administration, as Kim *et al.* (2004) injected 0.15  $\mu\text{g}$  (about 7.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of the drug *i.c.v.*, whereas we gave 25 mg/kg systemically by *i.p.* injection. In addition, we analysed neuronal cell number in the hilus at 2 days after KA administration. In this time period, a strong gliosis could develop and result in further neurodegeneration. As the role of MK2 in inflammation is well known, the observed neuroprotection could be a secondary effect due to a diminished inflammation caused by neuronal cell death in MK2-deficient mice. Indeed, in an animal model for Parkinson's disease we recently demonstrated that MK2 ablation protects neurons from degeneration by reducing neuroinflammation, in particular by reducing the production of the neurotoxic substances tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide (Thomas *et al.*, 2008).

The p38 MAPK is described to be involved in the apoptosis of neurons especially when induced by glutamate treatment (Cao *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2004). In addition, it could be shown by inhibition experiments that p38 MAPK is activated by KA and is involved in hippocampal neurodegeneration (Jeon *et al.*, 2000; Ferrer *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). Furthermore, a neuroprotective effect of HSP27 against KA-induced seizures and hippocampal cell death has been demonstrated in transgenic mice (Akbar *et al.*, 2003). These data, together with our above findings and with the knowledge of an elevated MK2 mRNA level in the hippocampus after KA treatment (Vician *et al.*, 2004), indicate an important role of the p38 MAPK/MK2/HSP27 axis in KA-induced neurodegeneration and suggest a role of MK2 within this signaling module in excitotoxicity.

In conclusion, our findings suggest a role of MK2 in the cellular response after depolarization in neurons. The neuronal-specific induction of MK2 expression and the demonstration of p38 MAPK/MK2 axis activation after depolarization together with reduced neurodegeneration in the hippocampus after KA administration to MK2-deficient mice make it tempting to speculate that MK2 is a player in brain functions such as learning, memory, synaptic plasticity or excitotoxicity.

**Acknowledgements**

We thank T. Yakovleva (Hannover Medical School) for breeding and genotyping of the mice, and D. Pieper-Matriciani, C. Bartling and M. Weissing (University for Veterinary Medicine, Hannover) for KA injections, transcardial perfusion and support in immunohistochemistry, respectively.

**Abbreviations**

CA, cornu ammonis; CREB, cAMP response element-binding protein; DG, dentate gyrus; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FCS, fetal calf serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; HSP, heat shock protein; IFN, interferone; KA, kainic acid; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MK, mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase; NeuN, neuron-specific nuclear protein; PC, pheochromocytoma; PKA, protein kinase A; SDS, sodium dodecyl sulfate.

## References

- Akbar, M.T., Lundberg, A.M., Liu, K., Vidyadaran, S., Wells, K.E., Dolatshad, H., Wynn, S., Wells, D.J., Latchman, D.S. & de Belleruche, J. (2003) The neuroprotective effects of heat shock protein 27 overexpression in transgenic animals against kainate-induced seizures and hippocampal cell death. *J. Biol. Chem.*, **278**, 19956–19965.
- Aletta, J.M., Selbert, M.A., Naim, A.C. & Edelman, A.M. (1996) Activation of a calcium-calmodulin-dependent protein kinase I cascade in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 20930–20934.
- Ben-Ari, Y. (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, **14**, 375–403.
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F. & Marshall, C.J. (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol.*, **8**, 1049–1057.
- Brandt, C., Potschka, H., Loscher, W. & Ebert, U. (2003) N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, **118**, 727–740.
- Cano, E., Doza, Y.N., Ben-Levy, R., Cohen, P. & Mahadevan, L.C. (1996) Identification of anisomycin-activated kinases p45 and p55 in murine cells as MAPKAP kinase-2. *Oncogene*, **12**, 805–812.
- Cao, J., Semenova, M.M., Solovyan, V.T., Han, J., Coffey, E.T. & Courtney, M.J. (2004) Distinct requirements for p38 $\alpha$  and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death. *J. Biol. Chem.*, **279**, 35903–35913.
- Cavalli, V., Vilbois, F., Corti, M., Marcote, M.J., Tamura, K., Karin, M., Arkinstall, S. & Gruenberg, J. (2001) The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Mol. Cell*, **7**, 421–432.
- Choi, W.S., Eom, D.S., Han, B.S., Kim, W.K., Han, B.H., Choi, E.J., Oh, T.H., Markelonis, G.J., Cho, J.W. & Oh, Y.J. (2004) Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8 and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.*, **279**, 20451–20460.
- Chrestensen, C.A., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Peló, J.W., Worthington, M.T. & Sturgill, T.W. (2004) MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J. Biol. Chem.*, **279**, 10176–10184.
- Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J. & Meloche, S. (2003) Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 4542–4558.
- Culbert, A.A., Skaper, S.D., Howlett, D.R., Evans, N.A., Facci, L., Soden, P.E., Seymour, Z.M., Guillot, F., Gaestel, M. & Richardson, J.C. (2006) MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, **281**, 23658–23667.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. & Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.*, **351**, 95–105.
- Dean, J.L., Sully, G., Clark, A.R. & Saklatvala, J. (2004) The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal.*, **16**, 1113–1121.
- Engel, K., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. (1998) Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J.*, **17**, 3363–3371.
- Enslin, H., Tokumitsu, H., Stork, P.J., Davis, R.J. & Soderling, T.R. (1996) Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 10803–10808.
- Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A. & Lander, E.S. (1999) Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell*, **97**, 727–741.
- Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., Puig, B., Dominguez, I. & Vinals, F. (2002) Active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates are differentially expressed following systemic administration of kainic acid to the adult rat. *Acta Neuropathol.*, **103**, 391–407.
- Fujikawa, D.G., Itabashi, H.H., Wu, A. & Shinmei, S.S. (2000) Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy. *Epilepsia*, **41**, 981–991.
- Ginty, D.D., Glowacka, D., Bader, D.S., Hidaka, H. & Wagner, J.A. (1991) Induction of immediate early genes by Ca<sup>2+</sup> influx requires cAMP-dependent protein kinase in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17454–17458.
- Hansen, T.O., Rehfeld, J.F. & Nielsen, F.C. (2003) KCl potentiates forskolin-induced PC12 cell neurite outgrowth via protein kinase A and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Neurosci. Lett.*, **347**, 57–61.
- Heidenreich, O., Neining, A., Schrat, G., Zinck, R., Cahill, M.A., Engel, K., Kotlyarov, A., Kraft, R., Kostka, S., Gaestel, M. & Nordheim, A. (1999) MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **274**, 14434–14443.
- Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A.D., Radzioch, D., Clark, A.R., Blackshear, P.J., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. (2006) Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 2399–2407.
- Huang, K.P. (1989) The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci.*, **12**, 425–432.
- Impey, S., Obrietan, K., Wong, S.T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., Deloulme, J.C., Chan, G. & Storm, D.R. (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*, **21**, 869–883.
- Jeon, S.H., Kim, Y.S., Bae, C.D. & Park, J.B. (2000) Activation of JNK and p38 in rat hippocampus after kainic acid induced seizure. *Exp. Mol. Med.*, **32**, 227–230.
- Kim, S.W., Yu, Y.M., Piao, C.S., Kim, J.B. & Lee, J.K. (2004) Inhibition of delayed induction of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates kainic acid-induced neuronal loss in the hippocampus. *Brain Res.*, **1007**, 188–191.
- Kotlyarov, A., Neining, A., Schubert, C., Eckert, R., Birschmeier, C., Volk, H.D. & Gaestel, M. (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- $\alpha$  biosynthesis. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 94–97.
- Kyriakis, J.M. & Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.*, **81**, 807–869.
- Lewis-Tuffin, L.J., Quinn, P.G. & Chikaraishi, D.M. (2004) Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus. *Mol. Cell Neurosci.*, **25**, 536–547.
- Liu, W., Feldman, J.D., Machado, H.B., Vician, L.J. & Herschman, H.R. (2003) Expression of depolarization-induced immediate early gene proteins in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.*, **72**, 670–678.
- Lowenstein, D.H., Thomas, M.J., Smith, D.H. & McIntosh, T.K. (1992) Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J. Neurosci.*, **12**, 4846–4853.
- Machado, H.B., Vician, L.J. & Herschman, H.R. (2008) The MAPK pathway is required for depolarization-induced “promiscuous” immediate early gene expression but not for depolarization-restricted immediate-early gene expression in neurons. *J. Neurosci. Res.*, **86**, 593–602.
- Manke, I.A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M.Q., Elia, A.E. & Yaffe, M.B. (2005) MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol. Cell*, **17**, 37–48.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D. & Morris, R.G. (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.*, **23**, 649–711.
- Miguel, S.M., Namdar-Attar, M., Noh, T., Frenkel, B. & Bab, I. (2005) ERK1/2-activated de novo Mapkap2 synthesis is essential for osteogenic growth peptide mitogenic signaling in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 37495–37502.
- Misra, U.K. & Pizzo, S.V. (2005) Coordinate regulation of forskolin-induced cellular proliferation in macrophages by protein kinase A/cAMP-response element-binding protein (CREB) and Epac1-Rap1 signaling: effects of silencing CREB gene expression on Akt activation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 38276–38289.
- Nashat, A.H. & Langer, R. (2003) Temporal characteristics of activation, deactivation, and restimulation of signal transduction following depolarization in the pheochromocytoma cell line PC12. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 4788–4795.
- Neining, A., Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Winzen, R., Eckert, R., Volk, H.D., Holtmann, H., Kollias, G. & Gaestel, M. (2002) MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3065–3068.
- Obara, Y., Horgan, A.M. & Stork, P.J. (2007) The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, **101**, 470–482.

- Park, J.H., Park, J.K., Bae, K.W. & Park, H.T. (2000) Protein kinase A activity is required for depolarization-induced proline-rich tyrosine kinase 2 and mitogen-activated protein kinase activation in PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, **290**, 25–28.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th edition, Academic Press, Sydney.
- Reynolds, L.J. & Richards, R.J. (2001) Can toxicogenomics provide information on the bioreactivity of diesel exhaust particles? *Toxicology*, **165**, 145–152.
- Ronkina, N., Kotlyarov, A., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Hitti, E., Milarski, K., Askew, R., Marusic, S., Lin, L.L., Gaestel, M. & Telliez, J.B. (2007) The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 170–181.
- Rosen, L.B., Ginty, D.D., Weber, M.J. & Greenberg, M.E. (1994) Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron*, **12**, 1207–1221.
- Scales, S.J., Finley, M.F. & Scheller, R.H. (2001) Cell biology. Fusion without SNAREs? *Science (N.Y.)*, **294**, 1015–1016.
- Sheng, M., McFadden, G. & Greenberg, M.E. (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron*, **4**, 571–582.
- Shi, Y., Kotlyarov, A., Laabeta, K., Gruber, A.D., Butt, E., Marcus, K., Meyer, H.E., Friedrich, A., Volk, H.D. & Gaestel, M. (2003) Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 7732–7741.
- Sindreu, C.B., Scheiner, Z.S. & Storm, D.R. (2007) Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases regulate ERK-dependent activation of MSK1 during fear conditioning. *Neuron*, **53**, 79–89.
- Snyder, E.Y., Deitcher, D.L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartwig, E.A. & Cepko, C.L. (1992) Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell*, **68**, 33–51.
- Stoeklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W.F., Blackwell, T.K. & Anderson, P. (2004) MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.*, **23**, 1313–1324.
- Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P. & Gaestel, M. (1992) Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.*, **313**, 307–313.
- Thomas, T., Timmer, M., Cesnulevicius, K., Hitti, E., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. (2008) MAPKAP kinase 2-deficiency prevents neurons from cell death by reducing neuroinflammation – relevance in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **105**, 2039–2052.
- Vertii, A., Hakim, C., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. (2006) Analysis of properties of small heat shock protein Hsp25 in MAPK-activated protein kinase 2 (MK2)-deficient cells: MK2-dependent insolubilization of Hsp25 oligomers correlates with susceptibility to stress. *J. Biol. Chem.*, **281**, 26966–26975.
- Vician, L., Lim, I.K., Ferguson, G., Tocco, G., Baudry, M. & Herschman, H.R. (1995) Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 2164–2168.
- Vician, L.J., Xu, G., Liu, W., Feldman, J.D., Machado, H.B. & Herschman, H.R. (2004) MAPKAP kinase-2 is a primary response gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. *J. Neurosci. Res.*, **78**, 315–328.
- Volk, H., Potschka, H. & Loscher, W. (2005) Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 517–531.
- Wingett, D., Reeves, R. & Magnuson, N.S. (1991) Stability changes in pim-1 proto-oncogene mRNA after mitogen stimulation of normal lymphocytes. *J. Immunol.*, **147**, 3653–3659.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. & Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science (N.Y.)*, **270**, 1326–1331.

### 3.3. Publikation 3

**Nucleofection is the most efficient nonviral transfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephali with no changes in cell composition or dopaminergic fate**

Konstantin Cesnulevicius, Marco Timmer, Maike Wesemann, Tobias Thomas, Tanja Barkhausen, and Claudia Grothe

*Stem Cells 2006, Vol. 24, pp. 2776-2791*

# Nucleofection Is the Most Efficient Nonviral Transfection Method for Neuronal Stem Cells Derived from Ventral Mesencephali with No Changes in Cell Composition or Dopaminergic Fate

KONSTANTIN CESNULEVICIUS,<sup>a</sup> MARCO TIMMER,<sup>a</sup> MAIKE WESEMANN,<sup>a</sup> TOBIAS THOMAS,<sup>b</sup> TANJA BARKHAUSEN,<sup>c</sup> CLAUDIA GROTHE<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Neuroanatomy and Center for Systems Neuroscience Hannover, <sup>b</sup>Institute of Biochemistry, and <sup>c</sup>Department of Trauma Surgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany

**Key Words.** Dopaminergic neurons • Neural stem cells • Nucleofection • Transfection • Transplantation

## ABSTRACT

Neuronal progenitor cells (NPCs) play an important role in potential regenerative therapeutic strategies for neurodegenerative diseases, such as Parkinson disease. However, survival of transplanted cells is, as yet, limited, and the identification of grafted cells *in situ* remains difficult. The use of NPCs could be more effective with regard to a better survival and maturation when transfected with one or more neurotrophic factors. Therefore, we investigated the possibility of transfecting mesencephalic neuronal progenitors with different constructs carrying neurotrophic factors or the expression reporters enhanced green fluorescence protein (EGFP) and red fluorescent protein (DsRed). Different techniques for transfection were compared, and the highest transfection rate of up to 47% was achieved by nucleofection. Mesencephalic neuronal progenitors survived the transfection procedure; 6 hours after transfection, viability was approximately 40%, and the transfected cells differen-

tiated into, for example, tyrosine hydroxylase-positive neurons. Within the group of transfected cells, many progenitors and several neurons were found. To provide the progenitor cells with a neurotrophic factor, different isoforms of fibroblast growth factor-2 were introduced. To follow the behavior of the transfected cells *in vitro*, functional tests such as the cell viability assay (water-soluble tetrazolium salt assay [WST-1]) and the cell proliferation assay (5-bromo-2'-deoxyuridine-enzyme-linked immunosorbent assay) were performed. In addition, these transfected NPCs were viable after transplantation, expressed tyrosine hydroxylase *in vivo*, and could easily be detected within the host striatum because of their EGFP expression. This study shows that genetic modification of neural progenitors could provide attractive perspectives for new therapeutic concepts in neurodegenerative diseases. *STEM CELLS* 2006;24:2776–2791

## INTRODUCTION

Transplantation of embryonic dopaminergic (DA) cells [1–3] or alternatively stem cells [4–10] provides a potentially attractive therapeutic concept for late stages of Parkinson disease (PD), resulting in reinnervation of the striatum and behavioral recovery in both lesioned animals [11, 12] and patients [13–15]. However, three major problems have so far remained unsolved: (a) severe dyskinesias found in double-blind clinical trials [16–18]; (b) limited supply of donor tissue [19]; and (c) the identification of grafted allogeneic cells *in vivo* [20, 21]. The focus of this study was the two latter problems.

Transplantation of *in vitro* expanded and subsequent differentiated ventral mesencephalic progenitor (VMP) cells into DA neurons also resulted in behavioral recovery, but after grafting these proliferated cells failed to show a substantial gain in number compared with embryonic cells from later stages [22–24]. To overcome the above-mentioned limitations, the delivery of DNA encoding additional growth factors and/or reporter genes such as enhanced green fluorescence protein (EGFP) is necessary to promote the expansion and differentiation capacity and the survival potential, as well as to identify the donor cells within the host brain. It has been shown previously that basic fibroblast growth factor (FGF-2), which is a physiological neurotrophic factor in the nigro-

Correspondence: Claudia Grothe, Dr. rer. nat., Department of Neuroanatomy, Center of Anatomy, OE 4140 Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Strasse 1, D-30623 Hannover, Germany. Telephone: 49-511-532-2896; Fax: 49-511-532-2880; e-mail: grothe.claudia@mh-hannover.de Received March 24, 2006; accepted for publication August 4, 2006; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* August 10, 2006. ©AlphaMed Press 1066-5099/2006/\$20.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2006-0176



striatal system, stimulates neurite formation, protects DA cells from 6-hydroxydopamine (6-OHDA) toxicity in vitro [25–31], and displays beneficial effects in vivo [32–34]. Our group has shown that cotransplantation of FGF-2 overexpressing Schwann cells with fetal mesencephalic cells increased survival, reinnervation, and functional recovery in Parkinsonian rats [35]. However, cotransplantations of two or more different cell sources are only a makeshift; an optimized approach should provide the cells of interest directly with one or more neurotrophic factors by introducing foreign DNA for ectopic expression.

Viral techniques are the most efficient systems to deliver DNA into cells [36–39], but viral vectors have many disadvantages, mainly involving safety risks (e.g., infections). In addition, the use of viral vectors such as adenoassociated virus, lentivirus, or retrovirus requires each cDNA to be cloned into specific vectors, cDNAs must not be too long, and these techniques are very demanding in technical skills, time, and laboratory safety precautions [40, 41]. Several nonviral methods are available for generating transiently and stably transfected cells, including calcium phosphate precipitation; the use of particles; electroporation, which is the most commonly used [42]; and lipofection, which is a liposome-based method that uses, for example, Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>). All of these techniques have been applied successfully, although the efficiency of these methods is quite low and most protocols are designed for permanent cell lines.

Two years ago, a new highly effective nonviral method for gene transfer into primary cells was developed by Amaxa Biosystems (Cologne, Germany, <http://www.amaxa.com>) [41]. This is an electroporation-based method that uses the combination of a specific nucleofector solution and specific electrical parameters to achieve the delivery of plasmid DNA into the cell nucleus. It was successfully applied to hematological and immunological cells [43–45] and also to embryonic and adult stem cells [46–49]. To date, there have been only a few reports of gene delivery to neurons by using the recently developed nucleofector technology [40, 41, 50, 51], and there is only one report about nucleofection of NSCs, which was done with spinal cord progenitors [52]. So far, there have been no reports about nucleofection of neuronal progenitors from the brain, including dopaminergic ones.

With regard to a putative application of genetically modified neurons in brain restoration, the following objectives were investigated in the present study: first, to compare different nonviral transfection methods and to establish an efficient one for VMP cells; second, to transfect VMP cells with both a reporter gene (EGFP/DsRed) and with an efficient growth factor gene (FGF-2); third, to analyze whether transfection of the cells alters their composition or changes their morphology, their properties, or their expansion and differentiation potential; and fourth, to determine whether these manipulated cells can survive transplantation.

Here we demonstrate that nucleofection shows transfection rates of nearly 50% of primary VMP cultures when using EGFP plasmid and, in addition, an efficient expression of FGF-2. Furthermore, these cells can be grafted efficiently and are therefore an attractive alternative cell source for the treatment of, for example, PD.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of Embryonic Tissue

Ventral mesencephalic (VM) progenitors were obtained from fetuses of Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, <http://www.criver.com>) at embryonic day 11.5 (E11.5). The VM tissue was dissected as described by Nikkhah et al. [53, 54] based on the cell suspension technique according to Bjorklund et al. [55]. All alterations and the exact procedure are described by Timmer et al. [24].

### Cell Culture

After dissociation of the tissue [24] the cells were counted using a cell-counting chamber (hemocytometer) and adjusted to the final number of 2,000,000–3,000,000 cells per milliliter. One ml of the suspension was seeded per 25-mm<sup>2</sup> cell culture dish (Nunc GmbH, Wiesbaden, Germany, <http://www.nunc.de>) with 5 ml of medium I (Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 medium [DMEM/F12], 3% fetal calf serum [FCS] [PAA Laboratories, Linz, Austria, <http://www.paa.at>], 20 ng/ml FGF-2 [18 kDa] [Peprotech, Rocky Hill, NJ, <http://www.peprotech.com>], B27, N2 [1 ml/100 ml of a 100× stock solution] [Gibco, Grand Island, NY, <http://www.invitrogen.com>], 1 mM sodium pyruvate, 0.25% bovine serum albumin [BSA] [Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>], and 2 mM glutamine). The culture dishes were precoated with polyornithine (Sigma-Aldrich, 0.1 mg/ml in 15 mM boric acid buffer, pH 8.4) and laminin (Sigma-Aldrich, 6 μg/ml) in distilled water for 24 hours at room temperature then washed twice with distilled water before cell seeding. After 24 hours of cell culture, medium I was removed and replaced by medium II (a modification of medium I, without FCS and B27 supplement). Then the cells were cultivated for 3 days. The day with medium I was considered day in vitro 0 (DIV0). On DIV3 (for fluorescence-activated cell sorting [FACS] and transplantation on DIV6), medium II was removed from the flasks, the surface was rinsed with phosphate-buffered saline once, and the cells were removed with trypsin/EDTA (PAA) incubation for 3–4 minutes. Trypsinization was stopped by adding medium I. Afterward, the cells were counted, the volumes were adjusted, and the transfection procedure was performed (described below). After transfection, the cells were seeded on 96-well plates with a density of 15,000; 30,000 or 60,000 cells in 100 μl/well and incubated for 24 hours with medium I for attachment. Then medium I was replaced by medium II for the next 4 days of proliferation (to expand transfected culture). For some experiments, medium II was changed to medium III (DMEM/F12, 0.25% BSA, B27, 1% FCS, 100 μM ascorbic acid, and 2 mM glutamine) at day 5 of proliferation for differentiation of transfected progenitor cultures. The cells were incubated with medium III for the next 6 days.

### Transfection

Three different methods were analyzed using primary mesencephalic progenitor cultures: chemical transfection with Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen), electroporation using Easyjet Optima electroporator (EquiBio, Kent, U.K., <http://www.flowgen.co.uk>), and nucleofection with Nucleofector device (Amaxa). DNA plasmid constructs used for transfection were as follows: pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA, [- 98 -](http://</a></p></div><div data-bbox=)

www.clontech.com), pDsRed-N2 (Clontech), pCIneo-FGF18kDa [56], pDsRed-23kDa-FGF-2, and pEGFP-23kDa-FGF-2 [57, 58]; pCIneo was used as empty control vector (Promega, Madison, WI, <http://www.promega.com>).

**Lipofection.** The procedure was performed according to the manufacturer's protocol. An optimization test was performed once to find the optimal ratio of DNA and Lipofectamine 2000 reagent. The "rapid" transfection protocol in 96-well plates was also used to have similar conditions compared with other methods. Shortly before the cell seeding, the DNA and reagent mixes were prepared in 96-well plates. Each well contained 50  $\mu$ l of OptiMEM I medium (Gibco) solution with 0.5  $\mu$ g of DNA mixed with 0.5  $\mu$ l of Lipofectamine 2000 reagent. The detached cells (see above) were adjusted to the volume of 60,000 cells per 100  $\mu$ l in medium I, and 100  $\mu$ l of the cell suspension was added to each well on the day of transfection. Cells were incubated for 24 hours. After incubation the medium was replaced by medium II, and the cells were cultured as described above.

**Electroporation.** To test the capability of physical transfection to efficiently deliver DNA to primary VMP cells, we used an electroporation technique under high-voltage and low-capacitance settings: EasyJect electroporator was set to voltage of 350 V, and capacitance parameter varied from 75 to 1,500  $\mu$ F to establish an optimal setup. The optimal parameters were as follows: 350 V, 75  $\mu$ F, 100  $\mu$ g of DNA/500,000 cells, DIV3 as the day for transfection, and 4 days of further proliferation. The detached cells (see above) were adjusted to the volume of 500,000 cells per milliliter in medium I. Afterward, the cells were centrifuged (600 rpm for 5 minutes), and the medium was removed. Four hundred  $\mu$ l of electroporation buffer (50 mM  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  [11.41 g], 20 mM potassium acetate [1.96 g], pH = 7.35), 10  $\mu$ l of magnesium sulfate (1 M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH = 6.7), and 100  $\mu$ g of DNA were added, and the cells were resuspended. There was no incubation on ice before or after the electroporation. After the pulse, 500  $\mu$ l of medium I were added to neutralize the electroporation buffer, and the cells were seeded on the 96-well plates with a density of 30,000 cells per well. After incubation for 24 hours the medium was replaced by medium II and the cells were cultured as described above. It is important not to vortex or mix the cells after the pulse, for it can cause decreased cell survival.

**Nucleofection.** For nucleofection of primary mesencephalic progenitor cultures, Basic Nucleofector Kit for primary mammalian neurons (Amaxa) was used. In the beginning, two programs were chosen: A-033 and O-005, both of which were designed for transfection of primary neurons. Program A-033 showed better results in transfection efficiency and was used for further experiments. The transfection was performed according to the manufacturer's protocol for adult rat neuronal stem cells. Detached cells (see above) were adjusted to a volume of 2,000,000 cells per milliliter in medium I. Afterward, the cells were centrifuged (600 rpm for 5 minutes), and medium was removed. The cells were resuspended in 100  $\mu$ l of nucleofection solution with 5  $\mu$ g of plasmid DNA. After the pulse, 500  $\mu$ l of RPMI 1640 medium (Biochrom AG, Berlin, [\[biochrom.de\]\(http://www.biochrom.de\)\) containing 10% FCS was immediately added to neutralize the nucleofection solution. Cells were seeded on 96-well plates at a final volume of 15,000 or 30,000 cells per well and cultured further \(see above\).](http://www.</a></p></div><div data-bbox=)

### Immunocytochemistry

The immunostaining was performed according to the previously described protocol [24]. The following primary antibodies were used: anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH), 1:200 (Chemicon, Temecula, CA, <http://www.chemicon.com>); anti-nestin, 1:550 (Chemicon); anti-glial fibrillary acidic protein (anti- $\alpha$ -GFAP), 1:400 (Sigma-Aldrich); anti- $\beta$ -tubulin type III, 1:140 (Upstate, Charlottesville, VA, <http://www.upstate.com>); anti-fibroblast growth factor-2 (anti- $\alpha$ -FGF-2), 1:500 [59]. Detection of bound primary antibody was performed with either Cy2- (1:200) or Cy3- (1:600) conjugated secondary antibodies. Nuclei were visualized by 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) staining when required.

### Cell-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Cell-enzyme-linked immunosorbent assay (cell-ELISA) was performed in 96-well microtiter plates as previously described [60]. The following dilutions of primary antibodies were used: anti-TH, 1:200; anti- $\beta$ -III-tubulin, 1:140; anti-GFAP, 1:600, and anti-FGF-2, 1:300 (Transduction Laboratories). The relative absorbance was measured at 405 nm (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Germany). Data were corrected for blank values obtained in the absence of the first antibody [29].

### Cell Viability and Proliferation Assay

Cell viability and proliferation were evaluated after nucleofection by WST-1 assay (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland, <http://www.roche-applied-science.com>) [61] according to the manufacturer's protocol. To each well of the 96-well plate, each containing 100  $\mu$ l of medium, 10  $\mu$ l of WST-1 reagent was added. The control well contained medium and WST-1 reagent but no cells. After incubation for 105 minutes in the incubator (37°C), the relative absorbance was measured with ELISA reader (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Germany, <http://www.mikrotek.de>) at 490 nm. To achieve viability curves, different time points were selected (6 hours, 48 hours, 5 days, 7 days, and 11 days after nucleofection). In some experiments, cell-ELISA for FGF-2 expression was performed with the same cells following WST-1 assay.

### Cell Proliferation Assay

Cell proliferation was evaluated after nucleofection by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation ELISA (Roche) according to the manufacturer's protocol. Different time points (18 hours, 48 hours, 5 days, 7 days, and 11 days after nucleofection) were selected.

### Western Blotting

Western blot analysis was performed as previously described [24, 62]. Protein was received from expanded cells after nucleofection. The same amounts of protein were loaded on each gel. FGF-2 was detected by using a monoclonal anti-FGF-2 antibody (1:250) (Transduction Laboratories, Lexington, KY, <http://www.bdbiosciences.com/pharming>) and the enhanced chemiluminescence system (Santa Cruz Biotech-

nology Inc., Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>) followed by documentation in the LAS-3000 (Fuji, Duesseldorf, Germany, <http://www.fujifilm.de>).

### Cell Counting

EGFP-positive or red fluorescent cells (DsRed-positive) were counted to measure the transfection rate 24–48 hours after transfection. Cells were counted at  $\times 10$  magnification using an inverse Olympus fluorescent microscope (Tokyo, <http://www.olympus-global.com>). Five fields were randomly selected in every well, and at least four to six wells were counted for each sample. Transfection rate was calculated from the relationship between EGFP- and DAPI-positive, or DsRed- and DAPI-positive cells, respectively. The number of TH-positive cells was measured as a relative grade, since these cells gather into the clusters after differentiation and it is hard to obtain the exact number. The following grades were used: 5+, preferably large and small clusters of TH-positive cells in the culture; 4+, preferably large clusters; 3+, preferably small clusters and separate cells; 2+, preferably separate cells; 1+, only a few TH-positive cells in the culture. All experiments were performed at least in triplicate.

### FACS Analysis

Primary VMP cells were collected as described above. Prior to nucleofection the cells were expanded in culture for 6 days under proliferation conditions. Afterward, the cells were transfected with EGFP plasmid and reseeded for the following proliferation or differentiation. Either proliferated or differentiated transfected cells were taken for further analysis. Analysis of EGFP expression was performed using the FL1 channel of a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, <http://www.bdbiosciences.com>). Nontransfected cells served as negative controls to determine background fluorescence. Cell debris was excluded from analysis by forward- and side-scatter gating. Data were analyzed using the software Cell Quest Pro software (BD Pharmingen, San Diego, <http://www.bdbiosciences.com/pharmingen>).

### Generation of Immortalized VMP Cells

The freshly prepared dissociated VMP cells (see above) were cultivated for 3 days under proliferation conditions and then nucleofected with the construct containing the T-large antigen of SV40 (pSV<sub>3</sub>neo). After transfection, the cells were grown in selection medium with G418 for 2 weeks and then cloned using limiting dilution. The fastest growing clones were selected and frozen for storage.

### Transplantation and Evaluation of the Graft

The procedure was described in detail previously [24]. Transplantation of progenitor cells transfected with EGFP construct was performed during the proliferation phase, one day after transfection into the striatum of 6-OHDA-lesioned adult Sprague-Dawley rats (for anesthesia, 6-OHDA lesion, and animal handling, see Timmer et al. [35]). The animals received eight 1- $\mu$ l deposits containing 100,000 cells each. Intra-striatal stereotaxic injections according to the modified microtransplantation approach [54] were done at the following coordinates: tooth bar, 0; anterior posterior, 0, +1; lateral, -2.3, -3.3; vertical, -4, -5. Experimental protocols were approved by the Bezirksregierung Hannover, Germany, and meet the guidelines

of the Tierschutzgesetz (under the law 25.05.1998). One week after grafting, the rats were perfused with 4% paraformaldehyde, coronal sections were cut on a freezing microtome at 30- $\mu$ m thickness, and TH immunohistochemistry was performed [24]. The sections were also immunostained with monoclonal anti-green fluorescent protein (anti-GFP) antibody (1:200) (Roche) and visualized by Cy2 (1:200) secondary antibody.

### Statistical Analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SD. Statistical evaluation was performed using the SigmaStat program (Version 2.0; Jandel Corporation, San Rafael, CA, <http://www.systat.com>). Comparisons between the groups were performed using one-factor analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's post hoc test if the data were normally distributed or by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks followed by Dunn's post hoc test if the data were not normally distributed. If only two groups were compared, a two-tailed *t* test for normally distributed data or Mann-Whitney test for data not normally distributed was performed. *p* values of  $<0.05$  were considered significant.

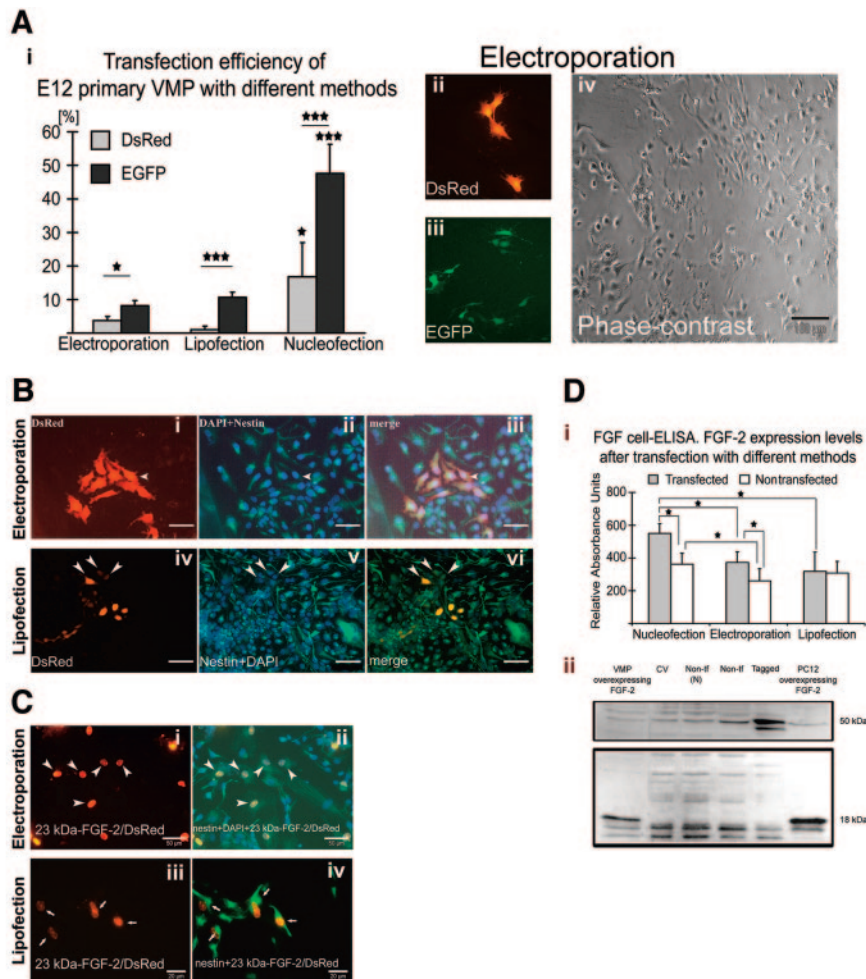
## RESULTS

### Comparison of Different Nonviral Transfection Methods Showed Highest Efficiency for Nucleofection

To establish an efficient nonviral transfection protocol for primary VMP cells, electroporation, lipofection, and nucleofection were compared. DsRed- and EGFP-positive cells were counted 48 hours after transfection. All three methods resulted in the delivery of the reporter gene coding for DsRed or EGFP even if the transfection rates differed significantly (Fig. 1A, i). The highest transfection efficiency was reached by nucleofection:  $47.6 \pm 8.6\%$  ( $p < .001$ ) (Fig. 1A, i); this value was also confirmed by FACS (described below, in Flow Cytometry). The percentage of EGFP-positive cells was in all cases significantly higher than the DsRed-positive cells, with electroporation (EGFP,  $8.1 \pm 1.55\%$ ; DsRed,  $3.2 \pm 1.49\%$ ;  $p < .01$ ), lipofection (EGFP,  $10.7 \pm 1.47\%$ ; DsRed,  $1.1 \pm 0.95\%$ ;  $p < .001$ ), and nucleofection (EGFP,  $47.6 \pm 8.6\%$ ; DsRed,  $16.7 \pm 10.25\%$ ;  $p < .001$ ). Cells transfected with pDsRed-N2 showed a more intense, contrasting, and constant fluorescence signal occupying the entire cell, including cytoplasm, nucleus, and processes. EGFP-expressing cells (transfected with pEGFP-N2) showed different levels of fluorescence intensity, which varied from low-intensity, blurred cells, where only parts of the cells could be seen, to high intensity with clearly visualized processes (Fig. 1A, ii–iii). Transfected cells displayed an unaltered morphological appearance when they were investigated under phase-contrast microscopy 3 days after transfection (Fig. 1A, iv).

To confirm that transfected cells are neural progenitors, nestin immunocytochemistry was performed (Fig. 1B, i–vi). After electroporation,  $86.9 \pm 7.2\%$  of the cells were immunopositive for nestin, and after lipofection,  $79.7 \pm 1.07\%$ , indicating high progenitor richness within the VMP cultures. There was a colocalization of DsRed and nestin immunoreactivity in both methods, with a more intense cytoplasmatic DsRed signal after electroporation (Fig. 1B, iii, vi).



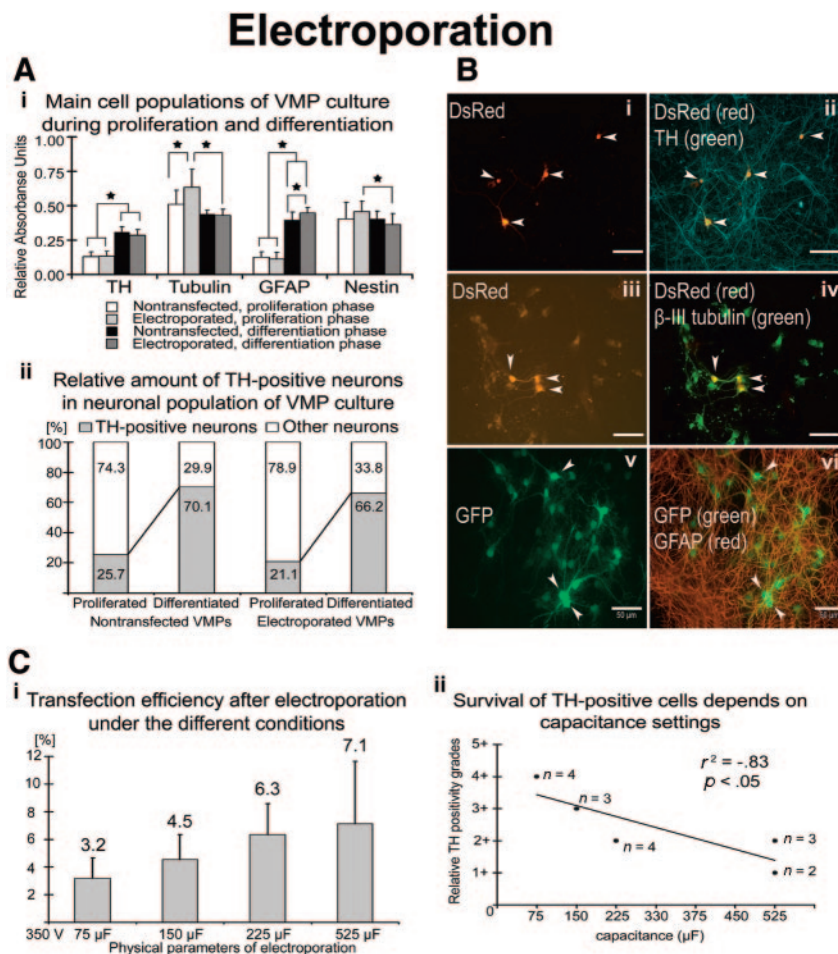


**Figure 1.** Transfection of primary VMP cells. Comparison of different nonviral transfection methods showed highest efficiency for nucleofection. (A): Comparison of transfection efficiencies after electroporation, lipofection, and nucleofection of two reporter constructs, pDsRed-N2 and pEGFP-N2. i, electroporation reached 3.2% transfection rate with pDsRed-N2 and 8.1% with pEGFP-N2; lipofection: 1.1% (DsRed) and 10.7% (EGFP); nucleofection: 16.7% (DsRed) and 47.6% (EGFP). Red fluorescence represents DsRed-positive transfected cells (ii), green fluorescence represents EGFP-positive transfected cells (iii), and phase-contrast of these cells is shown (iv) 3 days after electroporation in proliferation phase. Scale bar = 100  $\mu$ m. (B): Comparison of electroporated and lipofected cell cultures in proliferation phase. Shown are transfected cells visualized by DsRed (i), progenitor cells immunostained for nestin (ii), and nuclei visualized by DAPI (blue; ii). Merge picture (iii) represents colocalization of nestin and DsRed (arrowheads). Scale bars = 50  $\mu$ m (electroporation), 100  $\mu$ m (lipofection). (C): Transfection with pDsRed-23kDa-FGF-2. Red fluorescence represents DsRed expression (i, iii), blue represents nuclei visualized by DAPI (ii), and green fluorescence represents immunocytochemistry for nestin (ii, iv). Arrowheads show DsRed colocalization with nestin; arrows show DsRed-positive nuclei. Scale bars = 50  $\mu$ m (electroporation), 20  $\mu$ m (lipofection). (D): 18-kDa FGF-2 overexpression 2 days after electroporation, lipofection, and nucleofection with pCIneo-FGF18kDa. i, FGF cell-ELISA shows FGF-2 expression levels. ii, the representative Western blot shows FGF-2 expression after nucleofection. The plots represent the average of three independent experiments. Error bars indicate SD; \*,  $p < .05$ , \*\*\*,  $p < .001$ . Abbreviations: cell-ELISA, cell-enzyme-linked immunosorbent assay; CV, control vector (pCIneo); DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; EGFP, enhanced green fluorescence protein; FGF, fibroblast growth factor; non-tf (N), nucleofected without plasmid; non-tf, nontransfected; tagged, transfected with pEGFP-23kDa-FGF-2 (50 kDa); VMP, ventral mesencephalic progenitor.

Cell counting 3 days (proliferation phase) and 11 days (differentiation phase) after transfection revealed that during proliferation lipofected cultures showed higher cell numbers than electroporated ones;  $55.8 \pm 16.3\%$  of the electroporated cells and  $228.2 \pm 79.8\%$  of lipofected cells were detected after the transfection compared with the control group (the cells of the control group were detached and reseeded but not transfected). This difference was not significant ( $p > .05$ ). At the end of the differentiation phase (11 days after transfection, 6 days in differentiation medium), there was no more difference in cell numbers (data not shown).

- 101 -

In addition to the transfection of reporter genes, we were interested in delivering a “gene of interest.” Therefore, we expressed in the cells a 23-kDa isoform of FGF-2 protein (which is localized in the nucleus [57, 58]) fused with DsRed using a pDsRed-23kDa-FGF-2 construct. The 23-kDa FGF-2 is known to stimulate the survival and neurite formation of dopaminergic neurons both in vitro and in vivo [29, 35, 63]. An analysis 48 hours after transfection with pDsRed-23kDa-FGF-2 revealed that nestin-positive cells expressing DsRed colocalized with DAPI nuclear staining (Fig. 1C, i-iv).



**Figure 2.** Characterization of primary VMP cultures after electroporation. (A): Analysis performed 11 days after transfection with pDsRed-N2 (4 days in proliferation phase and 7 days in differentiation phase). i, cell-enzyme-linked immunosorbent assay analysis shows distribution of different cell types in VMP culture after electroporation, both after proliferation and differentiation:  $\beta$ -III-tubulin-positive neurons, nestin-positive progenitors, TH-positive neurons, and GFAP-positive astrocytes. ii, the relative amount of dopaminergic phenotype in the neuronal population displayed no differences between transfected and nontransfected cultures. (B): Immunostaining of transfected culture after differentiation. The cells were transfected with pDsRed-N2 (i–iv) or with pEGFP-N2 (v, vi). i, transfected cells expressed DsRed. ii, TH identified dopaminergic neurons; arrowheads show colocalization of DsRed and TH. iii, transfected cells expressed DsRed. iv,  $\beta$ -III-tubulin-positive neurons; arrowheads show colocalization of DsRed and  $\beta$ -III-tubulin. v, transfected cells express EGFP; vi, GFAP identified astrocytes; arrowheads show colocalization of EGFP and GFAP. Scale bars = 50  $\mu$ m. (C): The transfection rates of VMP cells after electroporation under different capacitance conditions. The cells were transfected with pDsRed-N2. i, increase of capacitance parameter elevated transfection efficiency under the high voltage conditions. It was possible to increase transfection rate up to 7.1%. ii, TH immunoreactivity of differentiated VMP cells after electroporation under different capacitance conditions. Increase of capacitance significantly reduced TH-positive neuron population. The plots represent the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviation; \*,  $p < .05$ . Abbreviations: GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescent protein; TH, tyrosine hydroxylase; VMP, ventral mesencephalic progenitor.

Evaluation of the FGF-2 expression levels 3 days after transfection by cell-ELISA showed that nucleofection resulted in an almost twofold increase in FGF-2 expression ( $181.5 \pm 19.4\%$ ; Fig. 1A, i), and this was confirmed in Western blot (Fig. 1D, ii). Electroporation showed only a slight overexpression ( $122.8 \pm 23.2\%$ ;  $p < .05$ ;  $F = 35.258$ ), whereas lipofection failed to produce overexpression in the primary VMP cells (Fig. 1A, i).

### Electroporation Did Not Alter the Cellular Composition and Differentiation Potential of Primary Mesencephalic Progenitors

After the transfection and subsequent differentiation (described in Materials and Methods), cultures were evaluated with respect

to culture composition. Immunocytochemistry showed the presence of differentiated populations of VMP cells:  $\beta$ -III tubulin-positive neurons, including TH-positive ones, and GFAP-positive astrocytes (Fig. 2B, ii, iv, vi). We found transfected cells in each cell population (Fig. 2B, i–vi); however, the majority of them were astrocytes, whereas only a few transfected TH-positive neurons were detected (Fig. 2B, i–ii).

To increase the number of transfected cells, the capacitance parameters from 75 to 1,500  $\mu$ F were varied and resulted in an increase of the transfection efficiency from  $3.2 \pm 1.49\%$  to  $7.1 \pm 4.51\%$  (transfection with pDsRed-N2), but the increase was not significant (Fig. 2C, i;  $p > .05$ ;  $F = 1.473$ ). To analyze possible negative effects on survival of dopaminergic neurons

after electroporation, TH immunocytochemistry was performed. Higher capacitance conditions resulted in a lower number of surviving cells (visualized by nuclear DAPI staining) and dramatically decreased the population of TH-positive neurons (data not shown). We analyzed the relationship between capacitance variables and TH positivity of electroporated culture and found that it showed a strong negative correlation (Fig. 2C, ii; Pearson correlation,  $r = -.829$ ,  $p < .001$ ). The highest TH-positive cell survival was achieved with the following parameters: voltage, 350 V; capacitance, 75  $\mu\text{F}$ .

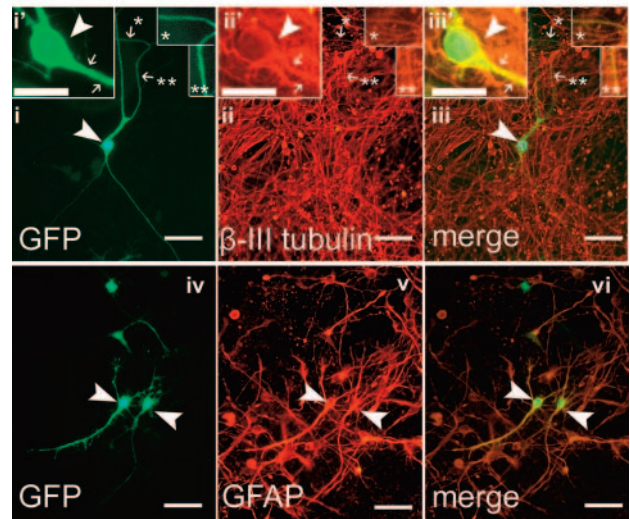
Using the established conditions, we analyzed the population composition of the electroporated VMP cultures during proliferation and after differentiation by cell-ELISA. TH-positive neurons and astrocytes increased in number after differentiation, but not  $\beta$ -III-tubulin-positive neurons or nestin-positive progenitors (Fig. 2A, i). In nontransfected cultures, TH-positive neurons increased from  $12.6 \pm 3.4\%$  to  $29.4 \pm 4.02\%$ , and in electroporated cultures, they increased from  $12.8 \pm 3.36\%$  to  $27.3 \pm 4.08\%$  ( $p < .001$ ;  $F = 89.369$ ). Similarly, the astrocyte population increased from  $12.2 \pm 3.73\%$  to  $37.7 \pm 5.88\%$  in nontransfected cultures and from  $10.9 \pm 4.67\%$  to  $42.8 \pm 3.87\%$  in electroporated cultures ( $p < .001$ ;  $F = 196.403$ ). There was no difference between nontransfected and electroporated cells in the TH-positive population after differentiation ( $p > .05$ ), but more astrocytes were found in electroporated cultures compared with nontransfected ones ( $p < .05$ ). We found fewer  $\beta$ -III-tubulin-positive neurons after differentiation; nontransfected cultures showed a  $\beta$ -III-tubulin positivity decrease from  $48.9 \pm 9.96\%$  to  $42.0 \pm 3.09\%$  ( $p > .05$ ), and electroporated cultures showed a decrease from  $60.7 \pm 12.45\%$  to  $41.3 \pm 4.28\%$  ( $p < .001$ , Fig. 2A, i). There was no reduction of nestin-positive progenitors in nontransfected cultures ( $38.9 \pm 11.5\%$  during proliferation and  $38.6 \pm 5.49\%$  after differentiation;  $p > .05$ ), whereas in electroporated cultures, nestin positivity was reduced from  $44.0 \pm 7.33\%$  to  $34.7 \pm 7.93\%$  after differentiation ( $p < .05$ ;  $F = 3.169$ ; Fig. 2A, i). The differentiation potential of primary VMP cells was not altered by electroporation, and the relative amount of TH-positive neurons in neuronal population increased from 25.7% (proliferation phase) to 70.1% (differentiation phase) in nontransfected controls, whereas in electroporated cultures, it increased from 21.1% to 66.2% (Fig. 2A, ii).

### Lipofection

To compare the physical transfection method with the chemical liposome-based approach, Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) and pEGFP-N2 were used for transfection of primary VMP cells. Culture composition of differentiated transfected cells (described in Materials and Methods) was evaluated by immunocytochemistry. Both populations of differentiated VMP cells (astrocytes [GFAP-positive] and neurons [ $\beta$ -III-tubulin-positive]), including TH-positive ones, were present; however, no transfected TH-positive neurons were found, but some  $\beta$ -III-tubulin-positive neurons were (Fig. 3, i–iii, i'–iii'), and astrocytes preferably expressed EGFP (Fig. 3, iv–vi). The transfection efficiency was not improved by enhancing the concentration of plasmid DNA (data not shown), changes in plasmid DNA concentration did not correlated with survival of TH-positive cells, and the number of surviving TH-positive cells was greatly variable (data not shown).

- 103 -

## Lipofection

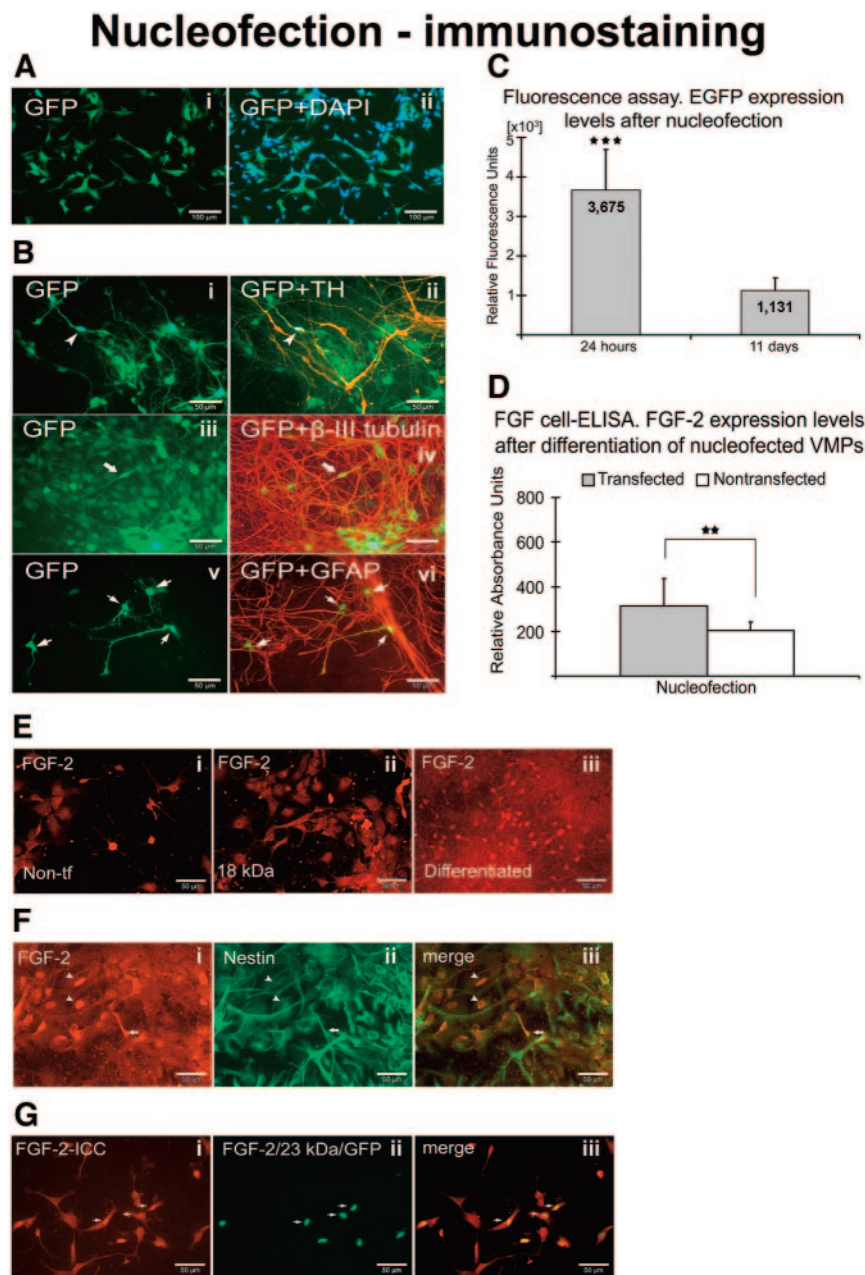


**Figure 3.** Characterization of differentiated primary ventral mesencephalic progenitor cells after lipofection; analysis performed 11 days after transfection with pEGFP-N2 (4 days in proliferation phase and 7 days in differentiation phase). Immunostaining of transfected culture. i, transfected cells expressed enhanced green fluorescence protein (EGFP) (green). ii,  $\beta$ -III-tubulin identified neurons (red). Arrowheads show  $\beta$ -III-tubulin immunoreactive neuron expressing EGFP. iii, merge picture shows colocalization of EGFP and  $\beta$ -III-tubulin. Note the arrows and stars following the fibers of transfected neuron (i–iii). Insets (i'–iii') represent another sample of  $\beta$ -III-tubulin immunoreactive neuron expressing EGFP under higher magnification. iv, transfected cells expressed EGFP (green). v, GFAP identified astrocytes (red). vi, merge picture shows colocalization of EGFP and GFAP (arrowheads). Contrary to electroporation, no transfected TH-positive cells were found. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$  (i–vi), 25  $\mu\text{m}$  (i'–iii'). Abbreviations: GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescent protein.

### Nucleofection

Neither electroporation nor lipofection resulted in efficient gene delivery to primary VMP cells despite a high number of transfected cells displayed by nucleofection. To evaluate the transfection efficiency in more detail, transfected cultures were stained with DAPI (for visualization of nuclei) and quantified (Fig. 4A, i–ii). The counting showed an approximately 48% transfection rate (Fig. 1A, i). Similar to the cell culture protocols after electroporation or lipofection, the nucleofected cultures were further expanded for 4 days and differentiated for 6 days, and then immunocytochemistry was performed. Mainly, three populations within the differentiated VMP cultures were obvious (Fig. 4B, i–vi), and the amount of TH-positive neurons was similar to that in nontransfected cultures (data not shown). Among transfected cells, few TH-positive neurons were found (Fig. 4B, i–ii); other neurons were visualized by  $\beta$ -III-tubulin (Fig. 4B, iii–iv) and astrocytes (GFAP-positive; Fig. 4B, v–vi). With regard to the stability of transfection,  $30.8 \pm 9.6\%$  of the previous fluorescence signal was still detected after 11 days in culture (Fig. 4C), and overexpression of FGF-2 was still present ( $153.4 \pm 60.5\%$ ;  $p < .01$ ; Fig. 4D).





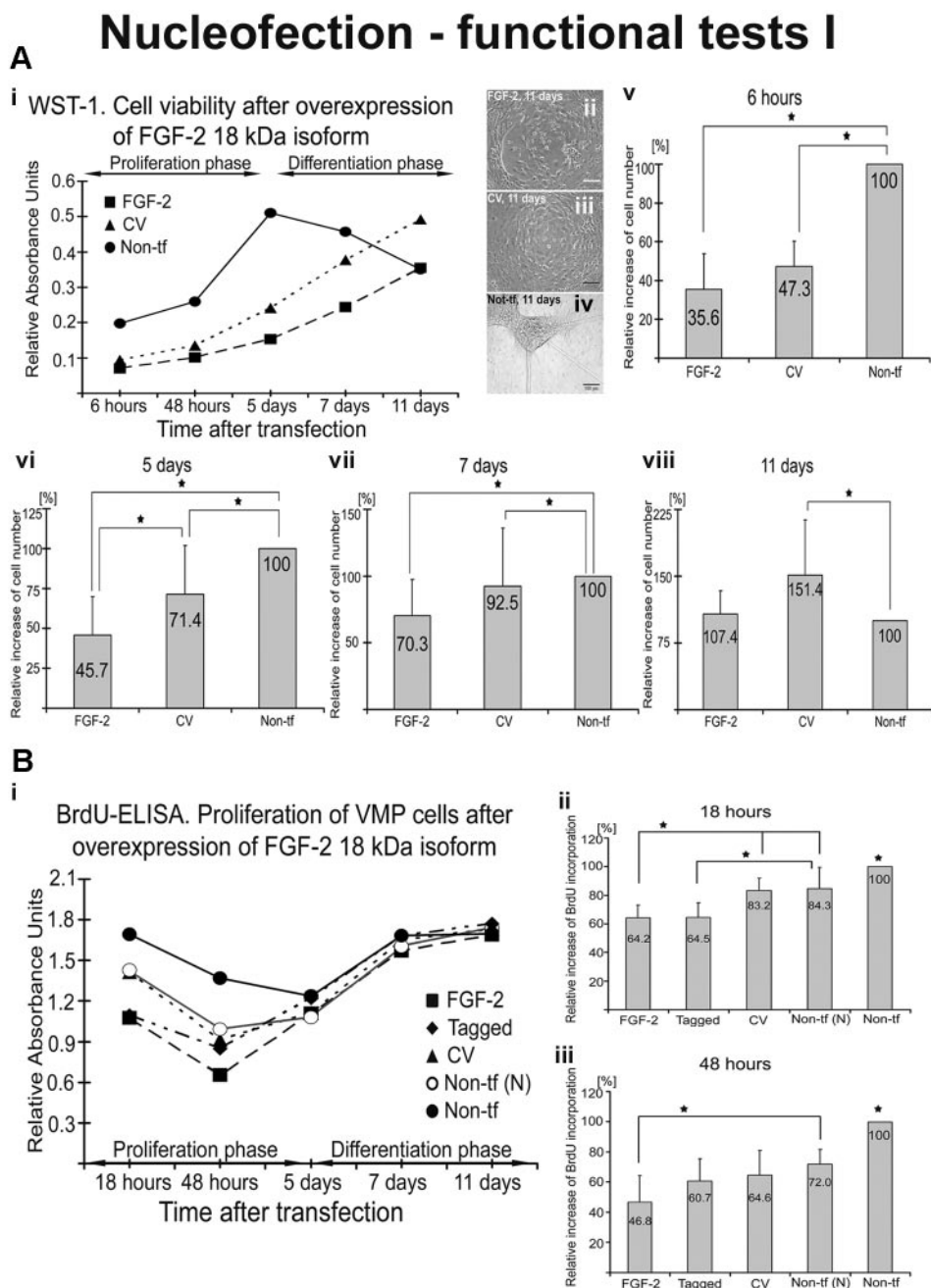
**Figure 4.** Immunofluorescence analysis of transfected primary mesencephalic (VMP) cultures after nucleofection with pEGFP-N2. **(A):** Green fluorescence of VMP cells 24 hours after transfection. i, transfected VMP cells expressed EGFP. ii, nuclei (blue) were visualized by DAPI staining. Scale bars = 100  $\mu$ m. **(B):** Immunostaining of transfected culture after differentiation: i, ii, TH; iii, iv,  $\beta$ -III-tubulin-positive neurons; v, vi, GFAP. i, iii, v, transfected cells expressed EGFP; ii, iv, vi, arrowheads and arrows show colocalization of corresponding marker and EGFP. Scale bars = 50  $\mu$ m. **(C):** EGFP fluorescence analysis of transfected VMP culture. EGFP expression levels were measured after 24 hours and after 11 days in cell culture to evaluate the durability of protein expression. At the end of differentiation phase, EGFP expression was reduced threefold. **(D):** 18-kDa FGF-2 expression at the end of differentiation phase. The cells were transfected with pCIneo-FGF18kDa. Overexpression of FGF-2 was still detectable 11 days after nucleofection. **(E):** Transfection with pCIneo-FGF18kDa and immunostaining for FGF-2. Immunofluorescence analysis did not show any differences between nontransfected (i) and transfected (ii) cultures either in proliferation phase (i, ii) or in differentiation phase (iii). Scale bars = 50  $\mu$ m. **(F):** Immunostaining of VMP cells in proliferation phase for FGF-2 showed two nestin-positive (ii) cell populations with different FGF-2 localization (i), with preferably nuclear localization (arrowheads) or with preferably cytoplasmic localization (arrow). iii, merge picture depicts colocalization of FGF-2 and nestin. Scale bars = 50  $\mu$ m. **(G):** VMP cells transfected with pEGFP-23kDa-FGF-2. i, the cells were immunostained for FGF-2. ii, EGFP was expressed in nuclei. iii, arrows show the colocalization of EGFP and FGF-2 in transfected cells. Scale bars = 50  $\mu$ m. Error bars indicate SD; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ . Abbreviations: DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; EGFP, enhanced green fluorescence protein; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FGF, fibroblast growth factor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescent protein; ICC, immunocytochemistry; non-tf, nontransfected; TH, tyrosine hydroxylase; VMP, ventral mesencephalic progenitor.

### Nucleofection with FGF-2

Since we found that nucleofection produces a high transfection rate, transfection of VMP cells with pCIneo-FGF18kDa, leading to overexpression of the 18-kDa isoform of FGF-2, was performed and followed by immunocytochemistry. Immunofluorescence analysis showed no differences in FGF-2 immunoreactivity between nontransfected and nucleofected cells, either in proliferation phase (Fig. 4E, i-ii) or after differentiation (Fig. 4E, iii). However, in proliferation phase at least two different cell populations with regard to FGF-2 cellular localization could be distinguished: cells with predominantly nuclear FGF-2 localization, which did not colocalize with nestin (Fig. 4F, i-iii, arrowheads), and cells with predominantly cytoplasmic FGF-2

localization, which colocalized with nestin (Fig. 4F, i-iii, arrow). To confirm the synthesis of FGF-2 in the cells, we used the construct coding for the 23-kDa isoform of FGF-2, which has a nuclear localization, fused with EGFP (pEGFP-23kDa-FGF-2). Fluorescence analysis after transfection showed that a number of FGF-2-positive cells had a nuclear green fluorescence signal (Fig. 4G, i-iii).

To investigate the possible effects of endogenous overexpression of FGF-2 on primary VMP cells, cells transfected for expression of the 18-kDa isoform of FGF-2 (pCIneo-FGF18kDa) were analyzed with regard to cell viability and proliferation (Fig. 5A, i). The toxicity of this method was more than 50%; 6 hours after nucleofection,  $47.3 \pm 12.9\%$



**Figure 5.** Functional analysis of VMP cultures after overexpression of FGF-2 18 kDa by nucleofection (part I). **(A):** Cell viability and cell number were evaluated by WST-1 assay. i, the actual reagent absorbance on different time points during the cell culture protocol. ii-iv, phase-contrast microscopy of the transfected and nontransfected differentiated cultures at 11 days after transfection; cell clustering and continuous cell loss were detected in non-tf cultures (11 days). v-viii, the plots show in detail the cell number changes during the cell culture protocol on different time points; spontaneous proliferation of the cells was excluded, whereas the cell number of non-tf cultures was considered as 100% on every time point. **(B):** The proliferation rate was evaluated by BrdU incorporation-ELISA. i, actual reagent absorbance on different time points during the cell culture protocol. ii, iii the plots show in detail the proliferation rates of each transfected group in comparison with non-tf control; spontaneous proliferation of the cells was excluded, whereas the proliferation rate of non-tf cultures was considered as 100% on every time point. Scale bar = 100  $\mu$ m. The plots represent the average of three independent experiments. Error bars indicate SD; \*,  $p < .05$ . Abbreviations: BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; CV, empty control vector (pCIneo); ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FGF, fibroblast growth factor; non-tf (N), nucleofected without plasmid; non-tf, nontransfected; tagged, pEGFP-23kDa-FGF2; VMP, ventral mesencephalic progenitor.

the cells transfected with empty control vector (pCIneo) survived, compared with nontransfected controls ( $p < .05$ ; Fig. 5A, v). The cells overexpressing FGF-2 showed even

lower viability ( $35.6 \pm 18.3\%$  survived); there was no significant difference between the transfected groups ( $p > .05$ ; Fig. 5A, v). This situation did not change within the first 2



days; at the end of proliferation phase, however (on day 5 after transfection), the cells transfected with control vector (pCIneo) showed an increase in cell number up to  $71.4 \pm 30.5\%$ ; FGF-2 overexpressing cells increased only up to  $45.7 \pm 24.3\%$  ( $p < .05$ ; Fig. 5A, vi). On day 7 after transfection, when the cells were exposed to differentiation medium, this significant difference disappeared (Fig. 5A, vii). At the end of the differentiation phase, the cell number in the FGF-2 overexpressing group reached the level of the nontransfected group ( $107.4 \pm 26.3\%$ ; Fig. 5A, viii). Nevertheless, when nontransfected cells were analyzed under the phase-contrast microscope, cell clustering and continuous cell loss were detected, which caused a relative increase in cell numbers of the transfected groups (Fig. 5A, ii–iv).

To investigate the proliferation rate of primary VMP cells after transfection, BrdU incorporation ELISA was performed (Fig. 5B, i). As in the previous assay, the VMP cells were transfected with pCIneo-FGF18kDa for overexpression of the 18-kDa isoform of FGF-2 (FGF-2 group) and with pCIneo as a control. For detailed analysis, the groups transfected with pEGFP-23kDa-FGF-2 and nucleofected without plasmid were added to this assay as additional controls. The transfected cells showed reduced proliferation compared with nontransfected controls 18 hours after transfection ( $64.2 \pm 9.2\%$  and  $64.5 \pm 10.2\%$  in FGF-2 and tagged groups, respectively;  $p < .05$ ; Fig. 5B, ii). Proliferation was still different between the experimental groups 48 hours after transfection (Fig. 5B, iii), but after 5 days, different BrdU incorporation was not obvious anymore (data not shown).

To analyze the 18-kDa FGF-2 overexpression profile during the cell culture protocol, we performed FGF-ELISA and adjusted the values to the corresponding values of the WST-1 assay to exclude the influence of cell number differences. Analysis showed that 6 hours after nucleofection, FGF-2 overexpression had already reached  $427.8 \pm 213.5\%$  of the level of nontransfected controls ( $p < .001$ ; Fig. 6C, i). Admittedly, the cells transfected with empty control vector (pCIneo) also showed an increase in FGF-2 expression, up to  $268.8 \pm 66.15\%$  of the level of nontransfected controls ( $p < .001$ ; Fig. 6C, i), indicating that nucleofection itself causes an increase in FGF-2 expression. FGF-2 overexpression continuously decreased during the cell culture protocol, and in differentiation phase, it reached the level of nontransfected cells (Fig. 6C, i). In FGF-2-overexpressing cultures, the FGF-2 expression levels during the proliferation phase were significantly higher than in the differentiation phase (Fig. 6C, ii;  $p < .05$ ).

To investigate a possible toxic effect of overflowing the cells with 18-kDa FGF-2, we transfected the VMP cells with decreasing concentrations of plasmid DNA (pCIneo-FGF18kDa) from  $5.0 \mu\text{g}$  (standard concentration) to  $0.05 \mu\text{g}$  (Fig. 6A). To confirm the regressing FGF-2 expression in transfected cells, we used a cell line of immortalized VMP cells for transfection and performed Western blotting 24 hours after transfection (Fig. 6D, i). Western blot analysis showed that after transfection with  $3.0 \mu\text{g}$  of plasmid DNA, the FGF-2 expression was reduced to  $29.7 \pm 10.86\%$  (Fig. 6D, ii;  $p < .01$ ); at lower concentrations, an overexpression was no longer detectable (Fig. 6D, i). The same results were achieved after transfection of physiological primary VMP cells with the same construct (Fig. 6D, i). However, when BrdU incorporation ELISA was per-

formed with the groups transfected with different concentrations of pCIneo-FGF18kDa, it did not show any differences in the cell proliferation between the transfected groups (Fig. 6A), indicating that high overexpression of the isoform of 18-kDa FGF-2 is not a reason for reduced proliferation of transfected VMP cells.

To investigate the influence of different 18-kDa FGF-2 overexpression levels on the survival of TH-positive neurons, two different culture conditions were analyzed using TH cell-ELISA. First, when the transfected cells were cultivated without exogenous FGF-2 during the proliferation phase, and second, when the exogenous FGF-2 was added to proliferation medium to induce rescue effects (Fig. 6B). Analysis showed that TH positivity of transfected cultures varied from  $90.8 \pm 18.99\%$  ( $0.5\text{-}\mu\text{g}$  group) to  $79.9 \pm 12.32\%$  ( $5.0\text{-}\mu\text{g}$  group) in the presence of exogenous FGF-2 (PM + FGF-2), in comparison with  $82.5 \pm 18.5\%$  ( $0.5\text{-}\mu\text{g}$  group) to  $69.1 \pm 16.66\%$  ( $5.0\text{-}\mu\text{g}$  group) without exogenous FGF-2 (PM – FGF-2). A slight rescue effect of exogenous FGF-2 was found only in the  $5.0\text{-}\mu\text{g}$  group (Fig. 6B;  $p < .05$ ) indicating a possible negative effect of excessive overexpression of 18-kDa FGF-2 on survival of TH-positive neurons.

### Flow Cytometry

We have further analyzed the VMP cells nucleofected with pEGFP-N2 by FACS. It revealed a transfection efficiency of  $45.2 \pm 13.9\%$  (Fig. 7A, i–ii). Prior to FACS analysis, the transfected cells were cultured further in either proliferation or differentiation medium after nucleofection for an additional 4 days, and FACS analysis revealed that differentiated cells were—as expected—smaller than proliferating cells, resulting in a cell size shift of  $10 \pm 2.5\%$  (Fig. 7B, i–ii;  $p < .05$ ), indicating an increase of smaller cell populations, which are more differentiated cells. These data are congruent with qualitative morphological observations of the cell culture.

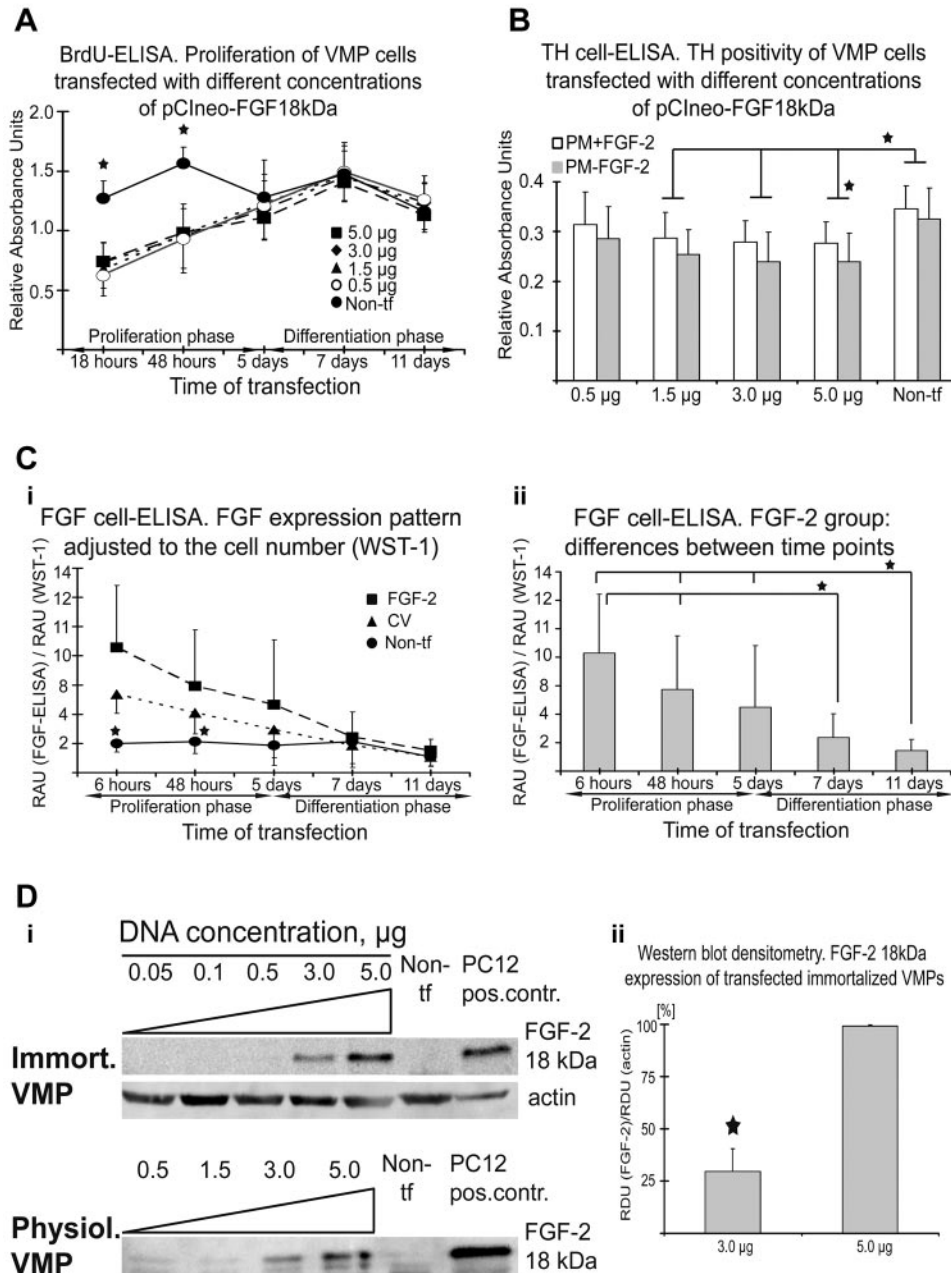
### Transplantation of Nucleofected VMP Cells into 6-OHDA Lesioned Rat Brains

We next examined whether transfected VMP cells (a) could survive transplantation and (b) express TH after grafting. TH immunohistochemistry showed that transfected VMP cells survive the transplantation (tx) procedure and are TH immunopositive *in vivo*, but compared with the number of grafted cells, only a small percentage survived (Fig. 7C, i–ii). In addition, the grafted cells were still EGFP-positive *in vivo* (Fig. 7C, ii'). We found some macrophages within the tx region (not shown). The degree of reinnervation is very limited, because we had already sacrificed the animals 1 week after the cell tx. Interestingly, some grafted cells migrated away from the tx site but nevertheless expressed some TH (Fig. 7C, i'). These migrated cells looked much smaller than the DA neurons, and the TH positivity was much lower.

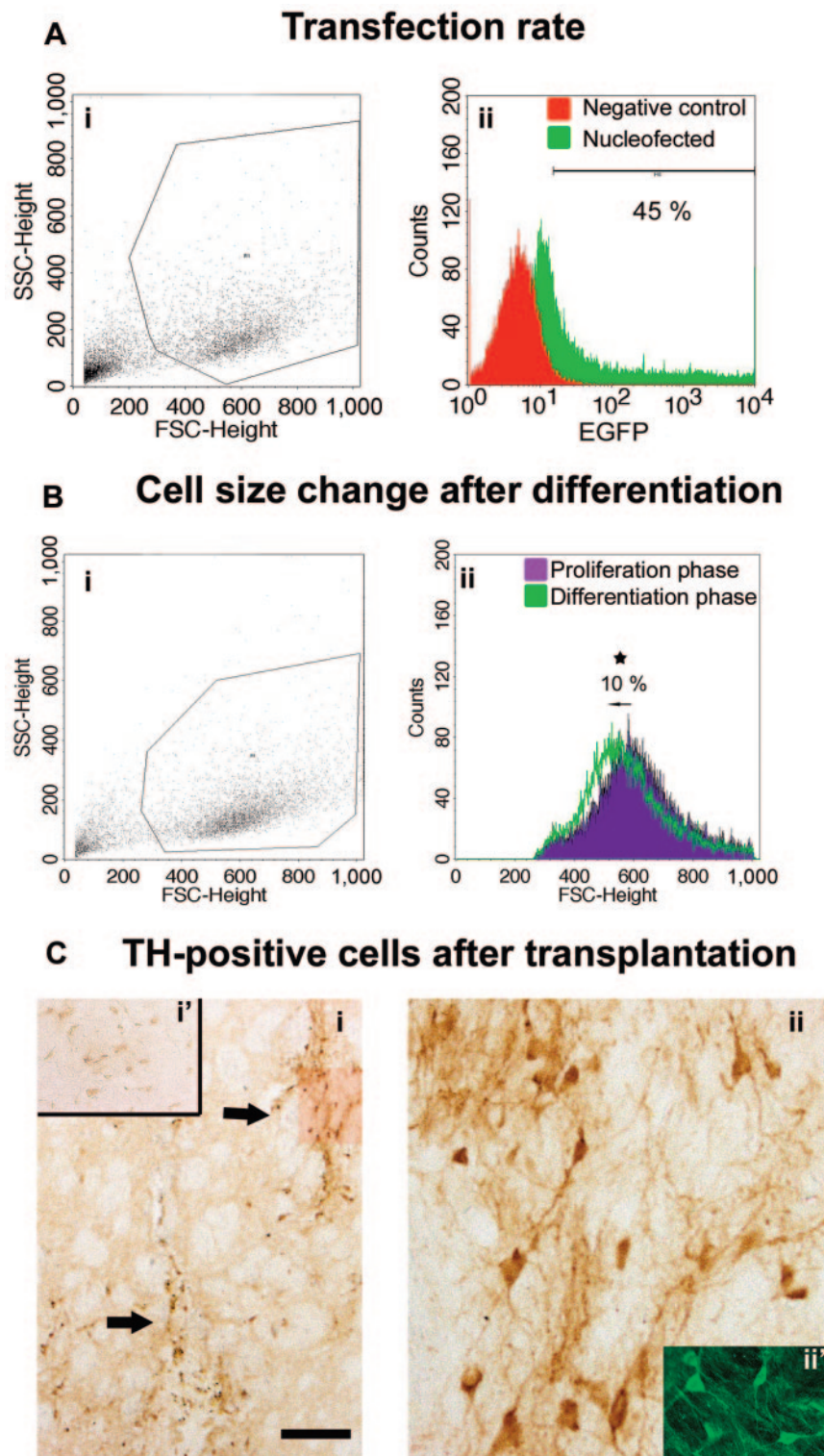
### DISCUSSION

In this study, we compare three different approaches for transfection of primary VMP cells: electroporation, lipofection, and nucleofection. Our results show significant improvement in transfection efficiency of primary VMP cells by using nucleofection. Using standard electroporation or lipofection, approximately 10% of transfection efficiency was reached, whereas nucleofection was nearly 5 times more efficient, allowing to high concentrations of a

## Nucleofection - functional tests II



**Figure 6.** Functional analysis of the primary VMP cultures after overexpression of 18-kDa FGF-2 by nucleofection (part II). **(A):** BrdU incorporation of the cells transfected with regressive concentrations of pCIneo-FGF18kDa. The concentration was reduced from 5.0  $\mu\text{g}$  to 0.5  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA. There was no difference in proliferation rate between the transfected groups. **(B):** The number of TH-positive cells after differentiation of transfected cultures was analyzed by cell-ELISA. Two different conditions were evaluated: when the exogenous FGF-2 was added to proliferation medium (PM + FGF-2; white bars), and proliferation phase without exogenous FGF-2 (PM - FGF-2; gray bars). A slight rescue effect of exogenous FGF-2 was detected only in the group transfected with the highest concentration of plasmid DNA (5.0  $\mu\text{g}$ ). **(C):** FGF-2 expression pattern after the transfection with pCIneo-FGF18kDa during the cell culture protocol. i, already, 6 hours after transfection FGF-2 was overexpressed almost fivefold (FGF-2 group) in comparison with non-tf controls. ii, a comparison of FGF-2 expression in the group overexpressing 18-kDa FGF-2 on different time points in cell culture. The highest FGF-2 expression was detected in the proliferation phase. **(D):** The regressive overexpression of 18-kDa FGF-2 after transfection was confirmed by Western blotting; actin served as loading control. i, immortalized and physiological VMP cells were transfected with regressive concentrations of pCIneo-FGF18kDa. ii, quantitative densitometry of Western blotting. After transfection with 3.0  $\mu\text{g}$  of plasmid 18-kDa FGF-2 overexpression was reduced to 30% in comparison with non-tf controls. The plots represent the average of three independent experiments. Error bars indicate SD; \*,  $p < .05$ ; \*\*\*,  $p < .001$ . Abbreviations: BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; CV, empty control vector (pCIneo); ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FGF, fibroblast growth factor; immort, immortalized; non-tf, nontransfected; pos.contr., positive control; physiol, physiological primary; RAU, relative absorbance unit(s); RDU, relative densitometry unit(s); TH, tyrosine hydroxylase; VMP, ventral mesencephalic progenitor.



**Figure 7.** Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of ventral mesencephalic progenitor (VMP) cells nucleofected with pEGFP-N2 and transplantation of them into 6-hydroxydopamine lesioned rat brains. (A): Representative plots of FACS analysis of green fluorescent cells (green) shows a transfection rate of 45%. Autofluorescence of nontransfected cells (red) was excluded from the analysis. (B): FACS analysis of relative cell size shows the 10% cell size decrease after 4 days in differentiation phase compared with proliferation phase. (C): Transplantation of VMP cells transfected with pEGFP-N2. i, TH-positive neurons in the medial and lateral (arrows) deposits of the graft. Inset (i') represents migrated TH-positive cells, which do not show typical neuronal morphology and were smaller than the neurons at the graft site. ii, the picture shows the higher magnification of the grafted cells. ii', the EGFP-expressing cells (green) were visualized by anti-GFP staining. Scale bar = 250  $\mu\text{m}$ . \*,  $p < .05$ . Abbreviations: EGFP, enhanced green fluorescence protein; FSC, forward scatter (cell size); SSC, side scatter (cell granularity); TH, tyrosine hydroxylase.

gene product to be reached. These findings show a higher efficiency compared with the results of Bauer et al., who report only 150 transfected primary VMP cells out of 100,000 cells by lipofection [64], a transfection efficiency of 0.15%. Nucleofection was also applied for transfection of other stem cell types, such as ESCs and multipotent adult progenitor cells with a similar efficiency of

up to 60% [48, 65]. To the same extent as the VMP cells, primary hippocampal neurons were transfected with approximately 50% efficiency [40]. Similarly to the results of Dityateva et al. [40], in the present protocol, the expression levels of transfected proteins could be efficiently controlled by changing the amounts of DNA per transfection. Nucleofection is also more suitable for transfec-



tion with different genes, probably because of the direct transfer of a gene to the nucleus. Nucleofection showed 88% colocalization of EGFP and DsRed when they were cotransfected in a mixture of both reporters [40]. However, we showed significant differences in transfection efficiency between EGFP and DsRed constructs.

Previous reports show that nucleofection is a powerful tool for gene delivery [40, 50, 51] and gene silencing [41, 51] in postmitotic neurons. Transplantation of postmitotic neurons has so far been used for brain restoration, even though it has several limitations [1, 16]. NSCs seem to be more promising for brain repair approaches in terms of both genetic manipulations and transplantation [7, 9, 10, 66]. The only work of nucleofection of NSCs with GFP was done on spinal cord progenitors by Richard et al. [52], but they could not show the differentiation of transfected spinal progenitors toward neuronal fate either *in vitro* or *in vivo*. Richard et al. transplanted spinal cord progenitors ectopically into retina, where they found only astrocytes [52]. In the present study, the transfected VMP cells were grafted into their main target area, the striatum, where DA neurons are usually implanted in clinical applications. Furthermore, our grafted VMP cells differentiated into neuronal phenotype and expressed TH. Here, for the first time, we report on nucleofection as an efficient method for nonviral transfection of dopaminergic progenitors.

We demonstrate here that not only could the reporter gene be efficiently delivered to VMP cells by nucleofection, but the gene expressing a growth factor could as well. First we transfected the cells with a construct, coding for the 23-kDa isoform of FGF-2 gene tagged with EGFP (or DsRed) to evaluate the quality of the transfection. We found the typical restriction to a nuclear expression of FGF-2 for this isoform [57, 58], independent of the transfection method used (nucleofection, standard electroporation, or lipofection). Second, in the same manner, cells were transfected with a construct coding for the untagged 18-kDa isoform of FGF-2, which is localized in both cytoplasm and nucleus, and we analyzed the overexpression level after the transfection. The FGF-2 overexpression was stronger after nucleofection than after electroporation, whereas lipofection failed to show significant overexpression of FGF-2. These findings suggest that nucleofection does not affect the quality of FGF-2 expression but results in higher amounts of growth factor, which could potentiate its effect on the cells. This approach could therefore be useful for transplantation purposes. We could also show that the fluorescence intensity of EGFP was reduced by threefold 2 weeks after transfection compared with the intensity 24 hours after transfection. These results suggest that nucleofection produces a transient rather than stable transfection, and this correlates with the findings of Lakshmipathy et al., which show a sixfold lower stable transfection rate in comparison with a transient one [48]. However, this finding could be rather an advantage than a disadvantage for transplantation purpose, because the crucial time for the survival of transplanted cells is the first 6 days after transplantation, which involves implantation procedure, the immediate period (first 1–3 days) after graft injection into new adult host environment, and the following phase of graft maturation when transplanted cells might die because of a lack of appropriate neurotrophic support. Therefore the highest concentration of the growth factor in the graft is essential during the first week after transplantation, whereas it is not necessary in later stages, when it could interfere

with the physiological functioning of already integrated transplanted cells [26, 36] (for details, see the review of Brundin et al. [19]).

Nucleofection is an electroporation-based gene transfer [40, 52], but its predefined settings do not allow us to analyze which physical parameters could influence the functionality of transfected primary neuronal progenitors. For this purpose, we used a standard electroporation procedure, which allows us to manipulate voltage and capacitance parameters [67]. In our results, we could show that optimal conditions for transfection of primary VMP cells with standard electroporation are 350 V and 75  $\mu$ F, and although increase of capacitance setting (and therefore increase of the pulse time) slightly elevates the transfection efficiency, at the same time, it greatly affects the survival of the VMP cells in general and especially of the TH-positive neurons after differentiation. However, under the optimal conditions, we found populations of differentiated cells in the same proportions as in nontransfected cultures, under both proliferating and differentiating conditions. These results suggest that electroporation under these optimal conditions does not alter the population composition and differentiation potential of primary VMP cells. In addition, it allows gene delivery into postmitotic cells such as neurons [42, 68, 69]. Since nucleofection is an electroporation-based method, it is very likely that under the optimal program, similar effects on cell culture composition will be present. This suggestion is supported by a recent report from Lakshmipathy et al. showing that nucleofected ESCs have levels of expression of ESC markers identical to the nontransfected controls [48].

Our study further shows that after differentiation of transfected progenitors, the transfected cells were detected in both neuronal and glial populations, but only a few transfected TH-positive neurons were detected (after electroporation and nucleofection) within the dopaminergic neuron population. The fivefold enhancement of transfection efficiency could not increase the number of transfected dopaminergic neurons, whereas the overall amount of these neurons was not affected by transfection. These findings suggest that this type of the neuronal cells is extremely sensitive to any kind of genetic modification. Yet this fact does not interfere with the idea of transplanting genetically modified VMP cells into the host brain, because: (a) it could be favorable if the graft contains not the pure population of dopaminergic neurons but a mixed composition of other neuron types and glial cells to induce maximum effect (whereas recent studies suggest that astrocytes not only give a trophic support to the neurons but also play an important role for fate decision by progenitors before or after transplantation [7, 66]); (b) the other cell types of the graft (neurons and glia), which are genetically modified, produce a trophic factor to support surviving dopaminergic neurons and in the same way, the DA neurons are not altered or somehow modified (assumed that most DA cells do not survive this kind of transfection). In the previous reports from our group it was already shown that cotransplantation of Schwann cells—genetically modified to produce FGF-2—enhances survival, reinnervation, and functional recovery of intrastriatal dopamine grafts [35]. But cotransplantation approaches are only a vehicle, and these results give evidence that the same results could be achieved directly without the necessity of a cogaft.

However, the overexpression of the 18-kDa isoform of FGF-2 in VMP cells seems to reduce their viability and prolifer-

eration during the proliferation phase (under serum-free conditions) *in vitro*. We demonstrated that in the first days after transfection, the expression of the delivered gene was the strongest; FGF-2 overexpression was increased fourfold in transfected VMP cells, but FGF-2 was also overexpressed in cells transfected with empty control vector, indicating that nucleofection itself causes an increase in FGF-2 expression too, probably through interactions with heat shock proteins (HSPs) [70] or due to FGF-2 release from dead cells. The number of surviving cells was significantly diminished in comparison with nontransfected and sham-transfected controls. Moreover, in the first 2 days after transfection, also, the proliferation rate decreased significantly. These effects led to the reduced TH immunoreactivity of 20% after differentiation of transfected VMP cultures. Keeping in mind that excessive overproduction of the growth factor protein could interfere with functionality of the cells [36], we reduced the concentration of plasmid DNA used for transfection, resulting in a decreased expression of the FGF-2 in the transfected cells, even though it had no effect on cell proliferation. Application of exogenous FGF-2 during proliferation phase elicited a slight but significant rescue effect of TH immunoreactivity, although only in the group transfected with the highest DNA concentration. These findings suggest that excessive overexpression of FGF-2 could have some negative effect on survival of TH-positive neurons, which is supported by results of Georgievskia et al. [36] but cannot explain the reduction of the cell viability and proliferation. And despite the reduced cell viability and proliferation of the FGF-2 transfected cells in proliferation phase, after differentiation the overall cell number equals that of the nontransfected group. This result indirectly shows a better cell survival in the FGF-2-transfected group. Previous studies have shown that FGF-2 can induce apoptosis by activation of the tumor necrosis factor- $\alpha$  pathway [71]; in addition, the studies done in mutant mice showed that FGF-2 is involved in apoptotic processes mediated by FGFR3 signaling [72], and on the other hand, FGF-2 promotes neuronal survival via FGFR1/2 (for details, see the review of Grothe et al. [73]). Therefore, we speculate that the negative effects of 18-kDa FGF-2 overexpression on VMP cell viability and proliferation could be caused by the domination of proapoptotic mechanisms over antiapoptotic ones induced by a bimodal action of FGF-2.

The ventral midbrain-derived VMP cells (stage E12) were not (pre-)differentiated *in vitro* prior to transplantation, as done previously by Timmer et al. [24] Nevertheless, the cells were TH-immunoreactive *in vivo*, suggesting that the differentiation was initiated by local stimuli within the host striatum. These results indicate that an *in vitro* differentiation is not necessary before grafting in terms of TH expression; however, predifferentiation seems to be important for preventing cell migration

and to get more surviving TH<sup>+</sup> cells *in vivo*. Altogether, our *in vivo* results show that (a) VMP cells survive transplantation after nucleofection; (b) the transfected cells remain EGFP-positive *in vivo* and can therefore be detected easily within the host brain after transplantation, which has so far been a major problem; and (c) nucleofection does not prevent VMP cells to differentiate into a DA phenotype *in vivo*.

With regard to the implementation of novel cell replacement strategies for Parkinson disease, these results are promising for the detection of implanted cells and transfecting them with growth factor(s); nevertheless, cell survival has to be improved (e.g., by immunosuppression).

## Conclusions

This study shows that nucleofection is the most effective nonviral gene delivery method for primary VMP cells, which are the important source of dopaminergic neurons for cell replacement strategies in Parkinson disease. It allows the transfection of neural progenitors with high efficiency and does not alter the population composition and differentiation potential. It also delivers a growth factor gene into the cells efficiently that allows the manipulation of cell properties *in vitro*. Unfortunately, the comparatively high toxicity of the method to the neuronal progenitors remains a limiting factor for the wide application in transplantation studies and needs to be improved. The effective nonviral transfection method could minimize the risks associated with viral transfection, which include strong immunoinflammatory response, possible protein processing interference, and abnormal protein targeting. These results could help to optimize current transplantation strategies by manipulating both primary neuronal cells and neuronal stem cells before using them for therapeutic applications.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Center for Systems Neuroscience, Hannover Medical School, Hannover, Germany. We thank the Department of Experimental Nephrology (Hannover Medical School) for the permission to use the Amaxa Nucleofector device. We thank Anastassiia Vertii, Kerstin Kuhlemann, Hella Brinkmann, Natascha Heidrich, Hildegard Streich, Ursula Jensen, and Jürgen Wittek for excellent technical support and Peter Claus, Julia Jungnickel, Kirsten Haastert, Alexander Bruns, Ester Lipocatic, and Fabian Himstedt for discussions. K.C. and M.T. contributed equally to this work.

## DISCLOSURES

The authors indicate no potential conflicts of interest.

## REFERENCES

- Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ et al. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1995;332:1118–1124.
- Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A et al. Dopamine release from nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 1999;2:1137–1140.
- Piccini P, Lindvall O, Bjorklund A et al. Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol* 2000;48:689–695.
- Chung S, Sonntag KC, Andersson T et al. Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 2002;16:1829–1838.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50–56.

- 6 Lee S-H, Lumelsky N, Studer L et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000;18:675–679.
- 7 Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 2004;10(Suppl):42–50.
- 8 Nishimura F, Yoshikawa M, Kanda S et al. Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models: Improved behavior by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells. *STEM CELLS* 2003;21:171–180.
- 9 Roybon L, Christophersen NS, Brundin P, Li JY. Stem cell therapy for Parkinson's disease: Where do we stand? *Cell Tissue Res* 2004;318:261–273.
- 10 Snyder BJ, Olanow CW. Stem cell treatment for Parkinson's disease: An update for 2005. *Curr Opin Neurol* 2005;18:376–385.
- 11 Brundin P, Bjorklund A. Survival, growth and function of dopaminergic neurons grafted to the brain. *Prog Brain Res* 1987;71:293–308.
- 12 Nikkhah G, Bentlage C, Cunningham MG et al. Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci* 1994;14:3449–3461.
- 13 Lindvall O, Hagell P. Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2000;127:299–320.
- 14 Lindvall O, Sawle G, Widner H et al. Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1994;35:172–180.
- 15 Polgar S, Morris ME, Reilly S et al. Reconstructive neurosurgery for Parkinson's disease: A systematic review and preliminary meta-analysis. *Brain Res Bull* 2003;60:1–24.
- 16 Freed CR, Greene PE, Breeze RE et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001;344:710–719.
- 17 Hagell P, Piccini P, Bjorklund A et al. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2002;5:627–628.
- 18 Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:403–414.
- 19 Brundin P, Karlsson J, Emgard M et al. Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: A review over current approaches. *Cell Transplant* 2000;9:179–195.
- 20 Sorensen AT, Thompson L, Kirik D et al. Functional properties and synaptic integration of genetically labelled dopaminergic neurons in intrastriatal grafts. *Eur J Neurosci* 2005;21:2793–2799.
- 21 Zhao S, Maxwell S, Jimenez-Beristain A et al. Generation of embryonic stem cells and transgenic mice expressing green fluorescence protein in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 2004;19:1133–1140.
- 22 Brundin P, Bjorklund A. Survival of expanded dopaminergic precursors is critical for clinical trials. *Nat Neurosci* 1998;1:537.
- 23 Studer L, Tabar V, McKay RD. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1998;1:290–295.
- 24 Timmer M, Grosskreutz J, Schlesinger F et al. Dopaminergic properties and function after grafting of attached neural precursor cultures. *Neurobiol Dis* 2006;21:587–606.
- 25 Beck KD, Knusel B, Hefti F. The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des(1-3)-insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 1993;52:855–866.
- 26 Bouvier MM, Mytilineou C. Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J Neurosci* 1995;15:7141–7149.
- 27 Engele J, Bohn MC. The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia. *J Neurosci* 1991;11:3070–3078.
- 28 Ferrari G, Minozzi MC, Toffano G et al. Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. *Dev Biol* 1989;133:140–147.
- 29 Grothe C, Schulze A, Semkova I et al. The high molecular weight fibroblast growth factor-2 isoforms (21,000 mol. wt and 23,000 mol. wt) mediate neurotrophic activity on rat embryonic mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. *Neuroscience* 2000;100:73–86.
- 30 Knusel B, Michel PP, Schwaber JS et al. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J Neurosci* 1990;10:558–570.
- 31 Mayer E, Dunnett SB, Pellitteri R et al. Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons—I. Effects in vitro. *Neuroscience* 1993;56:379–388.
- 32 Date I, Yoshimoto Y, Imaoka T et al. Enhanced recovery of the nigrostriatal dopaminergic system in MPTP-treated mice following intrastriatal injection of basic fibroblast growth factor in relation to aging. *Brain Res* 1993;621:150–154.
- 33 Mayer E, Fawcett JW, Dunnett SB. Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons—II. Effects on nigral transplants in vivo. *Neuroscience* 1993;56:389–398.
- 34 Takayama H, Ray J, Raymon HK et al. Basic fibroblast growth factor increases dopaminergic graft survival and function in a rat model of Parkinson's disease. *Nat Med* 1995;1:53–58.
- 35 Timmer M, Muller-Ostermeyer F, Kloth V et al. Enhanced survival, reinnervation, and functional recovery of intrastriatal dopamine grafts co-transplanted with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2 isoforms. *Exp Neurol* 2004;187:118–136.
- 36 Georgievska B, Kirik D, Bjorklund A. Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor using a lentiviral vector induces time- and dose-dependent downregulation of tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. *J Neurosci* 2004;24:6437–6445.
- 37 Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A et al. Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: Intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci* 2000;20:4686–4700.
- 38 Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y et al. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2140–2145.
- 39 Smith-Arica JR, Thomson AJ, Ansell R et al. Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors. *Cloning Stem Cells* 2003;5:51–62.
- 40 Dityateva G, Hammond M, Thiel C et al. Rapid and efficient electroporation-based gene transfer into primary dissociated neurons. *J Neurosci Methods* 2003;130:65–73.
- 41 Gresch O, Engel FB, Nescic D et al. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 2004;33:151–163.
- 42 Mertz KD, Weisheit G, Schilling K et al. Electroporation of primary neural cultures: A simple method for directed gene transfer in vitro. *Histochem Cell Biol* 2002;118:501–506.
- 43 Lai W, Chang CH, Farber DL. Gene transfection and expression in resting and activated murine CD4 T cell subsets. *J Immunol Methods* 2003;282:93–102.
- 44 Martinet W, Schrijvers DM, Kockx MM. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnol Lett* 2003;25:1025–1029.
- 45 Trompeter HI, Weinhold S, Thiel C et al. Rapid and highly efficient gene transfer into natural killer cells by nucleofection. *J Immunol Methods* 2003;274:245–256.
- 46 Aluigi M, Fogli M, Curti A et al. Nucleofection is an efficient non-viral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *STEM CELLS* 2006;24:454–461.

- 47 Kobayashi N, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A et al. Gene delivery to embryonic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005;75:10–18.
- 48 Lakshminpathy U, Pelacho B, Sudo K et al. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *STEM CELLS* 2004;22:531–543.
- 49 Lorenz P, Harnack U, Morgenstern R. Efficient gene transfer into murine embryonic stem cells by nucleofection. *Biotechnol Lett* 2004; 26:1589–1592.
- 50 Leclere PG, Panjwani A, Docherty R et al. Effective gene delivery to adult neurons by a modified form of electroporation. *J Neurosci Methods* 2005;142:137–143.
- 51 Gartner A, Collin L, Lalli G. Nucleofection of primary neurons. *Methods Enzymol* 2006;406:374–388.
- 52 Richard I, Ader M, Sytnyk V et al. Electroporation-based gene transfer for efficient transfection of neural precursor cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;138:182–190.
- 53 Nikkhah G, Cunningham MG, Jodicke A et al. Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model. *Brain Res* 1994;633:133–143.
- 54 Nikkhah G, Olsson M, Eberhard J et al. A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat Parkinson model: A detailed account of the methodology. *Neuroscience* 1994;63:57–72.
- 55 Bjorklund H, Dahl D, Haglid K et al. Astrocytic development in fetal parietal cortex grafted to cerebral and cerebellar cortex of immature rats. *Brain Res* 1983;285:171–180.
- 56 Muller-Ostermeyer F, Claus P, Grothe C. Distinctive effects of rat fibroblast growth factor-2 isoforms on PC12 and Schwann cells. *Growth Factors* 2001;19:175–191.
- 57 Claus P, Bruns AF, Grothe C. Fibroblast growth factor-2(23) binds directly to the survival of motoneuron protein and is associated with small nuclear RNAs. *Biochem J* 2004;384:559–565.
- 58 Claus P, Doring F, Gringel S et al. Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J Biol Chem* 2003;278:479–485.
- 59 Grothe C, Zachmann K, Unsicker K et al. High molecular weight forms of basic fibroblast growth factor recognized by a new anti-bFGF antibody. *FEBS Lett* 1990;260:35–38.
- 60 Fuhrmann S, Kirsch M, Wewetzer K, Hofmann HD. Use of cell ELISA for the screening of neurotrophic activities on minor cell populations in retinal monolayer cultures. *J Neurosci Methods* 1997;75:199–205.
- 61 Francoeur A-M, Assalian A. MICROCAT: A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1. [http://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/BIOCHEM/No.3\\_96/no3\\_toc.htm](http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEM/No.3_96/no3_toc.htm)
- 62 Meisinger C, Zeschmigg C, Grothe C. In vivo and in vitro effect of glucocorticoids on fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 1 expression. *J Biol Chem* 1996;271:16520–16525.
- 63 Dono R. Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R867–R881.
- 64 Bauer M, Meyer M, Sautter J et al. Liposome-mediated gene transfer to fetal human ventral mesencephalic explant cultures. *Neurosci Lett* 2001; 308:169–172.
- 65 Siemen H, Nix M, Endl E et al. Nucleofection of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2005;14:378–383.
- 66 Lindvall O, Bjorklund A. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 2004;1:382–393.
- 67 Gehl J. Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 2003;177:437–447.
- 68 Kawabata I, Umeda T, Yamamoto K et al. Electroporation-mediated gene transfer system applied to cultured CNS neurons. *Neuroreport* 2004;15:971–975.
- 69 Yang ZJ, Appleby VJ, Coyle B et al. Novel strategy to study gene expression and function in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci Methods* 2004;132:149–160.
- 70 Piotrowicz RS, Martin JL, Dillman WH et al. The 27-kDa heat shock protein facilitates basic fibroblast growth factor release from endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:7042–7047.
- 71 Eves EM, Skoczylas C, Yoshida K et al. FGF induces a switch in death receptor pathways in neuronal cells. *J Neurosci* 2001;21:4996–5006.
- 72 Jungnickel J, Klutzny A, Guhr S et al. Regulation of neuronal death and calcitonin gene-related peptide by fibroblast growth factor-2 and FGFR3 after peripheral nerve injury: Evidence from mouse mutants. *Neuroscience* 2005;134:1343–1350.
- 73 Grothe C, Haastert K, Jungnickel J. Physiological function and putative therapeutic impact of the FGF-2 system in peripheral nerve regeneration—Lessons from in vivo studies in mice and rats. *Brain Res Brain Res Rev* 2006;51:293–299.

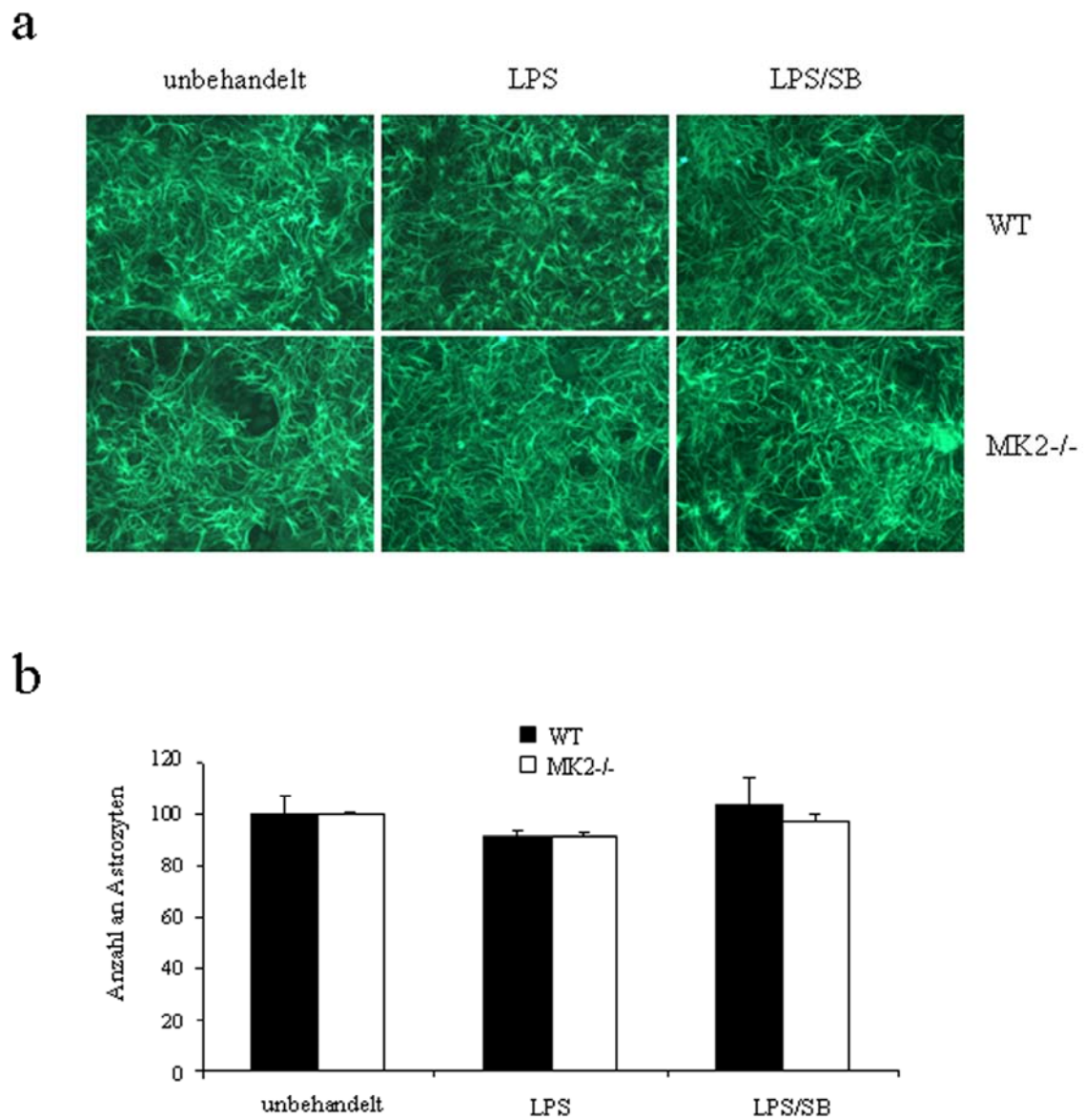
### 4. Unpublizierte Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind in der Veröffentlichung zu den Untersuchungen im MPTP Parkinson-Model als „*data not shown*“ angegeben (Thomas *et al.* 2008). Da sie aber das Verständnis über den zugrundeliegenden Mechanismus ergänzen und in die Diskussion mit einfließen, werden sie hier noch einmal separat dargestellt.

#### 4.1. Die Anzahl an Astroglia ist nicht reduziert in LPS-stimulierten Mischkulturen

Die Behandlung von mesencephalen Neuron-Glia-Kulturen mit LPS *ex vivo* führte zu einer verminderten Aufnahme an radioaktiv markiertem Dopamin sowohl in WT- als auch in MK2<sup>-/-</sup> Kulturen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 1a, S. 72). Da neben dopaminergen Neuronen auch Astroglia den Neurotransmitter über spezifische Rezeptoren intrazellulär aufnehmen können, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen gemacht, um festzustellen, ob die reduzierte [<sup>3</sup>H] Dopaminaufnahme aus einer geringeren Anzahl an dopaminergen Neuronen, an Astroglia oder an beiden Zelltypen resultierte. Hierzu wurden Cokulturen nach einer Vorinkubation von 60 min mit SB203580 oder ohne Vorinkubation mit dem p38-Inhibitor für 48 h mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Anschließend erfolgte die spezifische immunzytochemische Färbung nach Paraformaldehyd-Fixierung mit einem Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (TH) für dopaminerge Neurone bzw. gegen *glial fibrillar acidic protein* (GFAP) für Astroglia. Ausgewertet wurden sowohl die Morphologie als auch die Anzahl an TH- bzw. GFAP positiven Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop. Die Behandlung mit LPS führte zu einer SB203580-abhängigen Verkürzung bis hin zu einem vollständigen Verlust an Neuriten in WT, nicht aber in MK2 Kulturen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 1b, S. 72). Diese morphologischen Unterschiede gingen einher mit einer reduzierten Anzahl an TH-positiven Neuronen in WT Neuron-Glia-Kulturen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 1c, S. 72), während in MK2<sup>-/-</sup> Kulturen der Untergang nur marginal war. Auf die Morphologie oder Zellzahl an Astrozyten hatte die LPS-Behandlung keinen Einfluss (Abbildung 13). Somit liegen die gefundenen Unterschiede in der Dopamin-Aufnahme begründet in einer reduzierten strukturellen Integrität (Zellzahl und Neuriten-Netzwerk) der dopaminergen Neuronen und nicht der Astroglia.

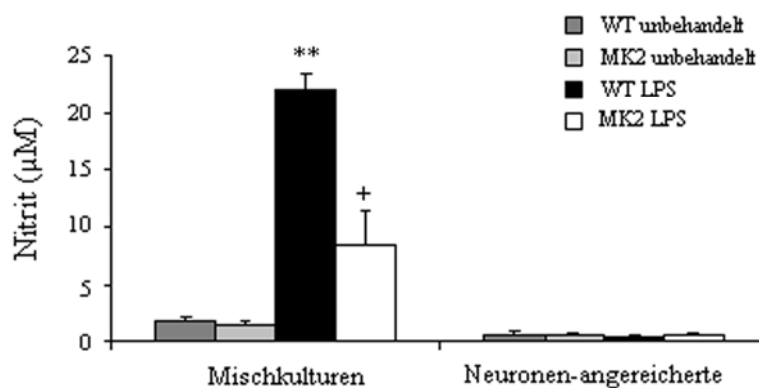




**Abbildung 13: LPS-Behandlung von Neuron-Glia-Kulturen hat keinen Einfluss auf die Morphologie oder Zellzahl von Astrozyten.** Mesencephale Mittelhirn-Cokulturen wurden mit oder ohne eine 60-minütigen Vorinkubation mit SB203580 für 48 Stunden mit 1 $\mu$ g/ml LPS behandelt. Anschließend wurde eine Immunfärbung der Astrozyten mit einem GFAP-Antikörper durchgeführt (a) und die Anzahl an positiven Zellen gezählt (b). Die Anzahl der Astrozyten in den unbehandelten Kontrollkulturen wurde als 100% angenommen. Sowohl die Morphologie als auch die Zellzahl der Astrozyten ist genotypisch unabhängig in keiner der Kulturen durch die LPS-Behandlung verändert.

### 4.2. NO wird von Glia, nicht von Neuronen, produziert

NO ist eine nicht nur von immunkompetenten Zellen sezernierte Substanz zur Abtötung fremder Mikroorganismen, sondern hat im Nervensystem auch eine Funktion als Neurotransmitter inne. Das NO-herstellende Enzym ist die NO-Synthase (NOS), welche in drei Isoenzymen vorkommt. Hierzu zählt neben der epithelialen NOS (eNOS) auch die induzierbare NOS (iNOS), die in immunkompetenten exprimiert wird, sowie die neuronale NOS (nNOS). Um zu klären, ob das nach LPS-Behandlung von Neuron-Glia-Mischkulturen produzierte NO von Glia, Neuronen oder von beiden hergestellt wird, wurden neben den Cokulturen auch Neuronen-angereicherte Kulturen mit LPS behandelt und das produzierte NO als Nitrit im Überstand detektiert und quantifiziert. Wie erwartet, produzieren ausschließlich Gliazellen das nach Behandlung mit dem immunogenen LPS produzierte NO. Neurone waren nicht in der Lage nach LPS-Stimulation NO zu produzieren (Abbildung 14).

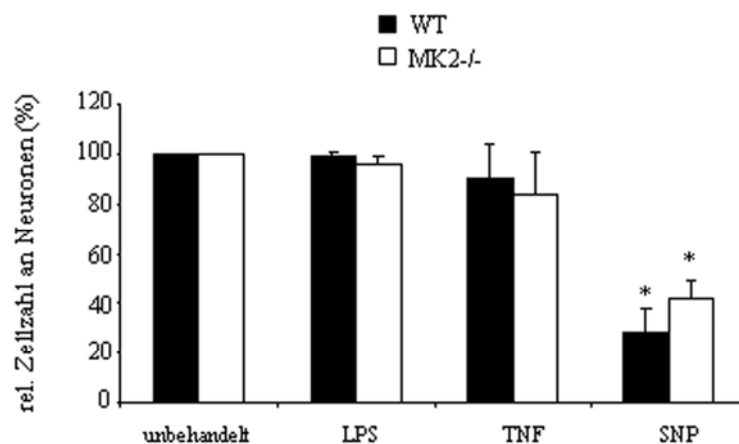


**Abbildung 14: NO-Produktion von Neuron-Glia-Mischkulturen und Neuronen-angereicherten Kulturen nach LPS-Behandlung.** 48 Stunden nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS wurde das produzierte NO mittels Griess-Assay im Überstand von Cokulturen als auch in Neuronen-angereicherten detektiert. Die genetische Entfernung von MK2 führt zu einem signifikant reduzierten Level an NO in den Mischkulturen. Neurone beider Genotypen waren nicht in der Lage nach LPS-Behandlung NO zu produzieren. Somit wird NO nach Stimulation mit LPS ausschließlich von Gliazellen produziert. \*\*,  $p < 0,01$  im Vergleich zu unbehandelten WT-Kulturen, +,  $p < 0,05$  im Vergleich zu LPS-behandelten WT-Kulturen.

### 4.3. TNF $\alpha$ löst keinen neuronalen Zelltod aus

Die Untersuchungen zum Untergang von dopaminergen Neuronen in LPS-stimulierten Mischkulturen deuten auf NO als hauptsächlichen neurotoxischen Faktor hin (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 2b, S. 73). So führte eine Inhibition der iNOS oder das Abfangen an

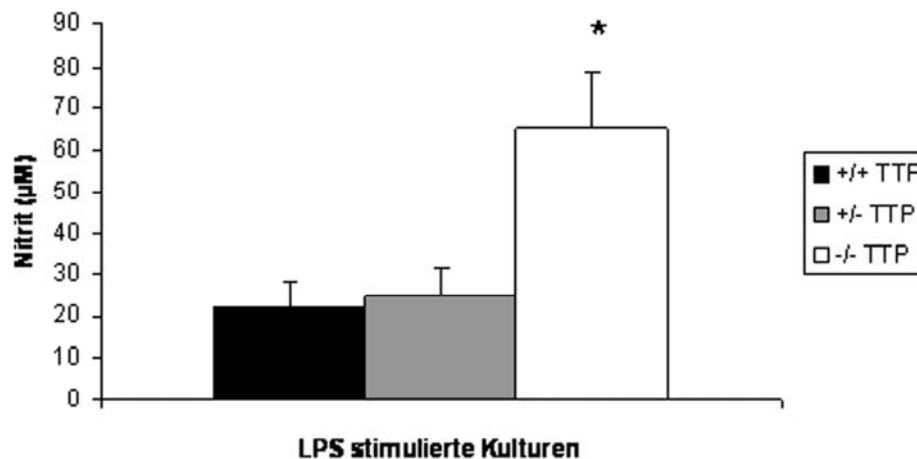
produziertem NO mit PTIO zu einer fast vollständigen Protektion vor dem neuronalen Zelltod. Um zu klären, ob die ausbleibende Differenz zu unbehandelten Kulturen durch TNF $\alpha$ , das ebenfalls als neurotoxisch bekannt ist (Harry *et al.* 2008), hervorgerufen wird, wurden Neuronen-angereicherte Kulturen für 24 Stunden in Gegenwart von 1 $\mu$ g/ml LPS, 50ng/ml TNF $\alpha$  oder 100 $\mu$ M SNP inkubiert und die Lebendzellzahl mittels WST-1 Assay bestimmt (Abbildung 15). Wie erwartet, löste LPS alleine keinen Zelltod aus. Überraschenderweise galt gleiches für die Inkubation mit TNF $\alpha$ , die ebenfalls zu keiner signifikant reduzierte Zellzahl führte. Die Gabe von TNF $\alpha$ , KC oder MIP1 $\alpha$  als rekombinante Proteine sind weder alleine noch in Kombination als toxisch für kortikale Neurone beschrieben (Culbert *et al.* 2006) und bestätigen zumindest die Funde zur Neurotoxizität von TNF $\alpha$  hier. Die Behandlung der Neuronen-angereicherten Kulturen ausschließlich mit dem NO-Donor SNP resultierte in einem allerdings von MK2 unabhängigen Zellsterben. Diese Daten machen eine Beteiligung von TNF $\alpha$  bei der Neurodegeneration unwahrscheinlich und betonen zusammen mit den gefundenen Ergebnissen zur NO-Neutralisation mit PTIO in den Neuron-Glia-Mischkulturen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 2b, S. 73) die Neurotoxizität von NO. Zudem deuten sie auf keine Beteiligung von MK2 beim neuronalen Zelltod hin, was durch Inhibitionsversuche später bestätigt werden konnte (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 5, S. 75).



**Abbildung 15: Auswirkungen von TNF $\alpha$  und NO auf den neuronalen Zelltod.** Neuronen-angereicherte Kulturen wurden mit 1 $\mu$ g/ml LPS, 50ng/ml TNF $\alpha$  oder 100 $\mu$ M SNP inkubiert oder blieben unbehandelt. 24 h später wurde die Lebendzellzahl mittels WST-1 Assay bestimmt. Die Anzahl an lebenden Zellen in den unbehandelten Kulturen wurden als 100% gesetzt. Nur SNP konnte einen von MK2 unabhängigen Zelltod der Neurone auslösen. \*, P<0,05 im Vergleich zu unbehandelten Kulturen.

### 4.4. In TTP<sup>-/-</sup> Kulturen ist die NO-Produktion erhöht

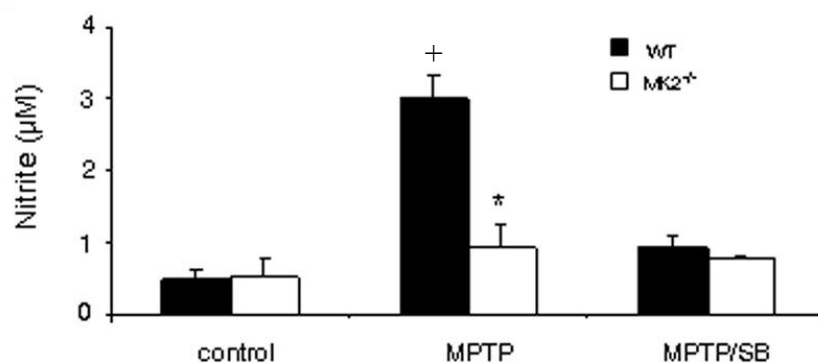
Die Ergebnisse aus den Versuchen zur TNF $\alpha$ -Neutralisation in LPS-stimulierten WT-Kulturen im Vergleich zu nur mit LPS-behandelten MK2<sup>-/-</sup> Kulturen deuten auf eine direkte Beteiligung von MK2 bei der NO-Synthese hin (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 3, S. 74). Das RNA-bindende Protein TTP ist ein direktes Substrat von MK2 und ebenfalls in die Stabilisierung von mRNA involviert. Ein Zusammenhang zwischen TTP und MK2 bei der Expression von TNF $\alpha$  konnte bereits demonstriert werden (Hitti *et al.* 2006). Um zu klären, ob TTP möglicherweise auch bei der Expression von iNOS und somit bei der NO-Synthese eine Rolle spielt, wurden Neuron-Glia-Kulturen sowohl von WT Embryonen als auch von Embryonen, die heterozygoten bzw. homozygoten für den TTP *knockout* sind, mit 1 $\mu$ g/ml LPS stimuliert und die Produktion an NO 48 h später im Überstand der Kulturen quantifiziert. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, ist die Menge an abgegebenen NO nur bei TTP<sup>-/-</sup> Cokulturen im Vergleich zu WT-Kulturen signifikant erhöht. Allerdings muss bei der Interpretation der Daten ein erhöhtes Level an TNF $\alpha$  in den TTP-defizienten Kulturen berücksichtigt werden, so dass auch hier synergistische Effekte eine Rolle spielen. Somit ist eine Beteiligung von TTP bei der NO-Synthese wahrscheinlich, aber nicht bewiesen.



**Abbildung 16: TTP-defiziente Neuron-Glia-Kulturen weisen nach LPS-Stimulation eine erhöhte Produktion an NO auf.** Mittelhirn Cokulturen von WT als auch von TTP<sup>+/-</sup> und TTP<sup>-/-</sup> Embryonen wurden in Gegenwart von 1 $\mu$ g/ml LPS für 48 Stunden inkubiert. Die Menge an produziertem NO wurde mittels Griess-Assay im Überstand der Kulturen bestimmt und mittels einer NO<sub>2</sub>-Standardreihe quantifiziert. \*, P<0,05 im Vergleich zu LPS-behandelten WT-Kulturen.

#### 4.5. MK2-defiziente Kokulturen produzieren weniger NO nach MPTP-Behandlung

LPS ist eine Substanz, die durch Bindung an den *Toll like receptor* (TLR) 4 immunkompetente Zellen, vor allem Makrophagen/Mikroglia, aktiviert. Somit zeigen die Daten aus den LPS-Versuchen eine entzündungsvermittelte Degeneration von dopaminergen Neuronen auf (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 1-3, S. 72-74). Primär bei der Parkinsonschen Erkrankung ist allerdings eine Neurodegeneration, die sekundär eine chronische craniale Entzündung zur Folge hat. Deutlich wurde das vor allem mit der Entdeckung von MPTP (siehe Kapitel 1.3.3.). Um zu zeigen, dass eine Neurodegeneration *ex vivo* ebenfalls inflammatorische Prozesse initiieren kann, wurden mesencephale Neuron-Glia-Kulturen von WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäusen mit 10  $\mu$ M MPTP für vier Tage behandelt und die Produktion an NO als Nitrit im Überstand bestimmt. Ausschließlich in MPTP-behandelten WT-Kulturen konnte eine signifikante NO-Synthese im Vergleich zu unbehandelten WT-Kulturen festgestellt werden (Abbildung 17). Sowohl eine MK2-Defizienz als auch eine Inhibition von p38 mittels SB203580 führte zu einer Reduktion der NO-Produktion bis auf das Niveau von unbehandelten Kontrollkulturen zurück. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Daten aus den LPS-Versuchen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 3c, S. 74) und deuten auf eine Beteiligung von Entzündungsprozessen bei der MPTP-vermittelten Neurodegeneration. Zudem stellen sie eine Verbindung der *ex vivo* Untersuchungen zu den *in vivo* Tierversuchen dar.



**Abbildung 17: Produktion an NO nach MPTP-Behandlung von Mittelhirnkulturen.** Neuron-Glia-Mischkulturen aus embryonalem Mittelhirn wurden für vier Tage mit 10  $\mu$ M MPTP behandelt und anschließend die Produktion an NO mittels Griess-Assay im Überstand bestimmt. Durch eine 60 minütige Vorinkubation mit 10  $\mu$ M SB203580 wurde die MAPK p38 inhibiert. +,  $p < 0,01$  im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen. \*,  $p < 0,01$  im Vergleich zu MPTP-behandelten WT-Kulturen.

### 5. Diskussion

#### 5.1. Rolle von MK2 bei neurodegenerativen Erkrankungen

Der p38 MAPK Signalweg wird durch zellulären Stress, wie z.B. Hitzeschock, UV-Licht oder Zytokine, aktiviert. Eine Funktion von p38 bei neurologischen Erkrankungen konnte bereits in verschiedenen Tiermodellen zu Parkinson, Epilepsie, Alzheimer oder auch Ischämie demonstriert werden (Barone *et al.* 2001, Kim *et al.* 2004, Sun *et al.* 2003, Wilms *et al.* 2003). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Neuron-Glia-Mischkulturen und Tierexperimenten die Rolle der Proteinkinase MK2, einem Substrat der Proteinkinase p38, bei der Neurodegeneration *ex vivo* und *in vivo* charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass MK2 eine wesentliche Rolle bei der Entzündungsreaktion im Gehirn und hierüber bei der Degeneration von Neuronen spielt.

##### 5.1.1. MK2 ist wichtig für die Neuroinflammation

Die Funktion von MK2 bei der Entzündungsreaktion in der Peripherie ist bereits ausgiebig beschrieben. So ist bekannt, dass MK2 die Stabilität von mRNAs, die ARE in ihrer 3'-UTR aufweisen, reguliert (Clark *et al.* 2003, Dean *et al.* 2004). Als Folge weisen MK2-defiziente Mäuse z.B. eine reduzierte Produktion an den Zytokinen TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL6 oder IL1 auf und sind resistenter gegen LPS-induzierten endotoxischen Schock (Kotlyarov *et al.* 1999). Ob MK2 eine ähnliche Rolle bei der Entzündungsreaktion in dem als immunprivilegiertes Organ betrachtete Gehirn spielt, war allerdings nicht bekannt und sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Nach LPS-Behandlung wiesen MK2-defiziente Mittelhirn-Cokulturen eine signifikant größere Menge an aufgenommenem Neurotransmitter Dopamin auf als WT-Kulturen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 1a, S. 72). Grund hierfür war eine erhöhte Anzahl an dopaminergen Neuronen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 1c, S. 72) als Folge einer reduzierten Produktion an proinflammatorischen Zytokinen und neurotoxischen Faktoren, wie TNF $\alpha$ , IL-6 und vor allem NO (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 2a, S. 73) und nicht ein verändertes Verhalten im Zelltod der Nervenzellen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 5, S. 75). Auch konnte ein Rückgang in der Anzahl an Astroglia, die Neurotransmitter ebenfalls aufnehmen können, als Grund für die geringere Menge an aufgenommenem DA

ausgeschlossen werden (Abbildung 13, S. 114). MK2 scheint eine Schlüsselrolle bei der Entzündungsreaktion im Gehirn inne zu haben, da eine Inhibition der MAPK p38 vor LPS-Behandlung ebenfalls die inflammatorische Antwort (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 3a, S. 74) reduzierte und das neuronale Überleben in WT-Kulturen verbesserte, aber keinen solchen Effekt in MK2<sup>-/-</sup> Cokulturen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 1, S. 72) zeigte. Unterstützt wird diese Annahme durch die funktionelle Untersuchungen des p38 MAPK/MK2 Signalweges in LPS-behandelten Cokulturen, die keinen Defizit an Signalweitergabe aufgrund einer geringeren p38 MAPK Expression in MK2-defizienten Kulturen aufdeckten (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 4, S. 75).

Als möglicher zugrundeliegender Mechanismus für die Neuroprotektion in MK2<sup>-/-</sup> Kulturen kommt eine reduzierte Produktion an als neurotoxisch bekanntem NO in den Gliazellen in Frage. So führte eine LPS-Stimulation von Neuronen-angereicherten Kulturen zu keiner NO-Synthese (Abbildung 14, Seite 115), was auf die Gliazellen als NO-produzierende Zellen deutet. Zudem führte eine Inhibition der iNOS Aktivität mittels L-NMMA oder Abfangen des produzierten NO nach LPS-Behandlung mit PTIO resultierte zu einem fast vollständigen Rückgang an Neurodegeneration in WT-Neuron-Glia-Mischkulturen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 2b, S. 73). Studien mit Tieren, die eine Reduktion an produziertem NO bzw. eine Verminderung der Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies aufgrund einer Defizienz an iNOS bzw. NADPH Oxidase aufweisen, zeigten ein signifikant besseres Überleben an dopaminergen Neuronen, wenn diese Tiere bzw. entsprechende Neuron-Glia-Cokulturen mit Substanzen wie LPS oder MPTP behandelt wurden (Liberatore *et al.* 1999, Qin *et al.* 2004). Diese Funde zusammen mit den Daten aus dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass die Degeneration an dopaminergen Neuronen NO-vermittelt und ein reduziertes NO-Level nach Stimulation der Grund für die Neuroprotektion in MK2-defizienten Kulturen ist. Andererseits ist auch das als zytotoxisch beschriebene TNF $\alpha$  in LPS-stimulierten MK2<sup>-/-</sup> Cokulturen reduziert. Somit könnte die Neuroprotektion auch aufgrund des reduzierten TNF $\alpha$  Levels in MK2<sup>-/-</sup> Kulturen hervorgerufen werden. Eine Inkubation von Neuronen-angereicherten WT-Kulturen mit TNF $\alpha$  führte allerdings nicht zum Zelltod (Abbildung 15, S. 116), womit eine direkte Beteiligung von TNF $\alpha$  an der Neurodegeneration unwahrscheinlich ist. Allerdings ist bekannt, dass TNF $\alpha$  synergistisch auf die LPS-induzierten NO Produktion wirkt (Chao *et al.* 1993, Possel *et al.* 2000, Thomas *et al.* 2008). Versuche, in denen das nach LPS-Behandlung produzierte TNF $\alpha$  mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers neutralisiert wurde, zeigten eine signifikante Abnahme an produziertem NO in WT-Mischkulturen. Allerdings lag das Niveau

an NO in diesen Kulturen immer noch über dem von nur mit LPS stimulierten MK2-/- Kulturen. Somit wird das verminderte Level an NO in MK2-defizienten Kulturen nur teilweise aufgrund des reduzierten TNF $\alpha$  Levels hervorgerufen. Der Grund für die Differenz zwischen TNF $\alpha$ -neutralisierten WT-Kulturen und LPS-stimulierten MK2-/- Kulturen könnte das Fehlen weiterer synergistischer Effekte in MK2-/- Kulturen oder auch eine direkte Beteiligung von MK2 an der NO Synthese sein. Letzteres lässt sich durch das Vorkommen von ARE in der iNOS mRNA stützen. So könnte MK2 die Stabilität als auch die Expression des iNOS-Transkript über das ARE-bindende Protein TTP regulieren, so wie es für TNF $\alpha$  bereits bekannt ist (Hitti *et al.* 2006). Interessanterweise sind sowohl die MK2-aktivierende Kinase p38 (Bhat *et al.* 2002) als auch das MK2-Substrat TTP direkt an der Regulation der iNOS Expression beteiligt (Fechir *et al.* 2005, Rodriguez-Pascual *et al.* 2000). Zudem führte eine LPS-Stimulation von TTP-defizienten Neuron-Glia Mittelhirnkulturen zu einer erhöhten Produktion an NO (siehe Kapitel 3.4.). Diese Funde deuten stark auf eine MK2-abhängige Regulation der iNOS-Expression und somit bei der NO Synthese auf post-transkriptioneller Ebene hin.

### 5.1.2. MK2 spielt keine Rolle bei der neuronalen Apoptose

Neben einer reduzierten Produktion an neurotoxischen Substanzen wie TNF $\alpha$  und insbesondere NO, könnte ein verändertes Verhalten bei der Apoptose von MK2-defizienten dopaminergen Neuronen ebenfalls zu einem verbesserten Überleben dieser Zellen in den LPS-behandelten Cokulturen führen. In der Tat konnte eine Beteiligung der MAPK p38 beim neuronalen Zelltod (Cheng *et al.* 2001, Choi *et al.* 2004) als auch eine Rolle von MK2 bei der Apoptose von Arsenit und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) (Vertii *et al.* 2006) demonstriert werden. Inkubation von Neuronen-angereicherten Kulturen mit dem NO-Donor SNP resultierte allerdings in einem MK2-unabhängigen Absterben der Nervenzellen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 5, S. 75). Eine Inhibition von MK2 in WT-Neuronen mit einem spezifischen Inhibitor hatte ebenfalls keinen Einfluss auf das apoptotische Verhalten. Diese beiden Funde zeigen deutlich, dass MK2 nicht in dem NO-vermittelten Zelltod von Nervenzellen involviert ist. Überraschenderweise führte eine Inhibition der MK2-aktivierenden p38 zu einem annähernd gleichstarken signifikanten Schutz vor dem NO-induzierten Absterben sowohl in WT- als auch in MK2-defizienten Neuronenkulturen. Daraus lässt sich schließen, dass p38 über die Phosphorylierung anderer

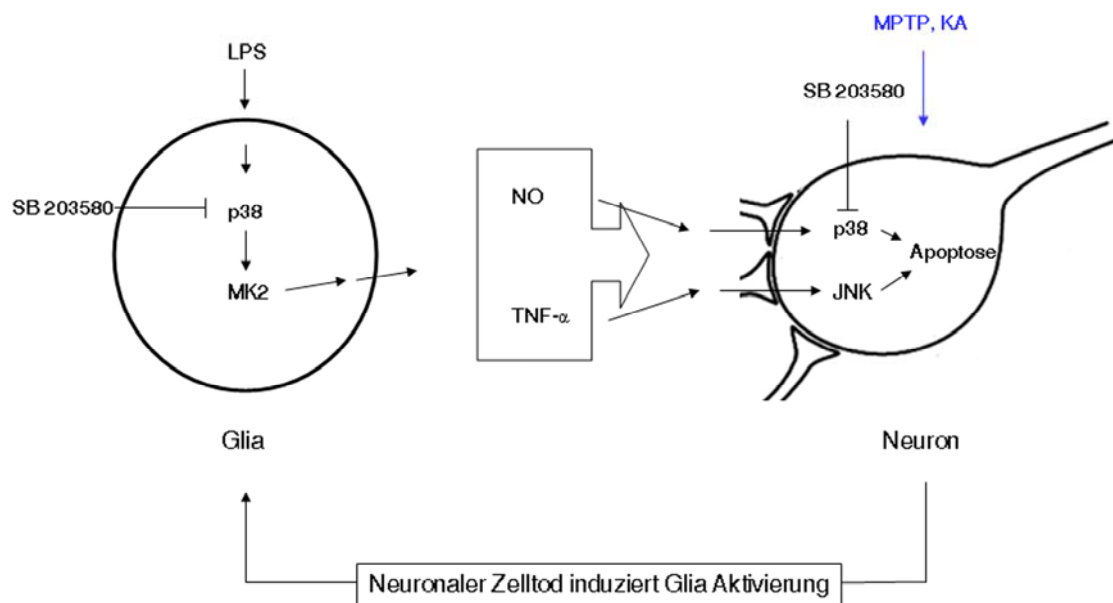


Substrate, wie z.B. p53, an der neuronalen Apoptose beteiligt ist. Die Protektion vor dem Zelltod war sowohl bei WT als auch bei MK2<sup>-/-</sup> Neuronen nicht vollständig, da andere Kinasen, wie z.B. die stressabhängigen JNKs, ebenfalls als in der neuronalen Apoptose involviert beschrieben sind (Harding *et al.* 2001, Kanda&Miura 2004, Namgung&Xia 2000). Expressionsstudien an Primärzellen und verschiedenen Zelllinien konnten zeigen, dass basal MK2 in Neuronen am geringsten und in immunkompetenten Zellen wie Mikroglia oder Makrophagen am stärksten exprimiert wird (Culbert *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2008). Dies könnte im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit gefundenen funktionellen Abhängigkeiten der Entzündungsreaktion und des neuronalen Zelltods von MK2 stehen bzw. diese erklären.

### 5.1.3. MK2 bei Parkinson

Die Charakterisierung der Funktion von MK2 bei der Neurodegeneration *in vivo* erfolgte im akuten MPTP-Mausmodell für die Parkinson'sche Krankheit. Bei diesem wird das systemisch verabreichte Neurotoxin MPTP in Gliazellen zu MPP<sup>+</sup> verstoffwechselt und sezerniert. Durch Aufnahme von speziell auf dopaminergen Neuronen exprimierten Dopamin-Transportern führt es über verschiedene Mechanismen zu deren Absterben (Tipton&Singer 1993). MK2-defiziente Mäuse zeigten bereits bei den Injektionen eine bessere Verträglichkeit gegenüber MPTP als ihre WT Artgenossen. So war nach der vierten Injektion das Befinden der MK2<sup>-/-</sup>-Mäuse deutlich besser als das der WT-Mäuse. In den ersten drei Tagen nach den MPTP-Injektionen zeigten die MK2-defizienten Mäuse ebenfalls ein besseres Laufverhalten auf dem Rotarod als ihre WT Artgenossen (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 6, S. 76). Zudem überlebten bis auf eine Ausnahme, alle MK2<sup>-/-</sup> Mäuse, während ungefähr 70% der WT-Tiere verstarben. Diese Funde lassen auf einen systemischen toxischen Effekt von MPTP schließen. Ein veränderter MPTP Metabolismus in den MK2-defizienten Tieren konnte ausgeschlossen werden, da kein Unterschied im MPP<sup>+</sup> Gehalt zwischen MK2-defizienten und WT Mäusen gefunden wurde (Tabelle 1, S. 43). Interessanterweise ist ein ähnlicher Befund im Überleben bei MPTP-behandelten TNF $\alpha$ -defizienten Mäusen beschrieben (Ferber *et al.* 2004). Somit könnte eine reduzierte TNF $\alpha$  Produktion in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen für die beschriebenen Beobachtungen verantwortlich sein. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass neben Neuronen und Astrozyten auch Lymphozyten das MPTP-metabolisierende Enzym MAO-B exprimieren (Bond&Cundall 1977, Wong *et al.* 2002). Eine Verstoffwechslung von MPTP durch diese immunkompetenten Zellen könnte eine Aktivierung und damit auch eine

TNF $\alpha$ -Produktion mit sich ziehen. Eine exzessive Produktion dieses Zytokins würde in den WT Mäusen zu einem Zustand, ähnlich einem endotoxischen Schock führen, gegen den MK2 $^{-/-}$  Mäuse bekanntermaßen resistenter sind (Kotlyarov *et al.* 1999). Sieben Tage nach MPTP Behandlung konnten keine Unterschiede zwischen den Mausgenotypen im Laufverhalten auf dem Rotarod festgestellt werden, woraus sich auch kein Unterschied bei der Entwicklung der Parkinson'schen Erkrankung ergäbe. Immunhistochemische Analysen und Quantifizierung der Anzahl an dopaminergen Neuronen in der SNpc zeigten allerdings eine signifikant erhöhte Anzahl an TH-positiven Neuronen in MK2-defizienten Tieren. Der Grund für das Fehlen einer ausgebildeten Parkinson-Symptomatik liegt in dem zahlenmäßig nicht ausreichenden Untergang an dopaminergen Neuronen in der SNpc. So betrug die Degeneration an bei WT Mäusen 47%, während bei MK2 Tieren nur 21% der Nervenzellen abstarben. Für die Ausprägung von typischen PD Symptomen wie Tremor, langsame Bewegungen, Steifheit oder schlecht Balance ist ein Verlust von ca. 70% an dopaminergen Neuronen notwendig (Pakkenberg *et al.* 1991). Der zugrunde liegende zelluläre Mechanismus für die Neuroprotektion nach MPTP Behandlung in MK2 $^{-/-}$  Mäusen lag nicht in einer verminderten Mikrogliaaktivierung, sondern in einer reduzierten Neuroinflammation und Produktion an NO (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 7, S. 78). Zusammen mit den Analysen von MPTP behandelten Mäusen, die defizient an COX-2 oder iNOS sind oder mit anti-inflammatorischen Substanzen behandelt wurden (Du *et al.* 2001, Liberatore *et al.* 1999, Teismann *et al.* 2003, Wu *et al.* 2002), unterstreichen diese Daten die Wichtigkeit der Entzündungsreaktion bei der Parkinson'schen Erkrankung und lassen eine zentrale Rolle von MK2 bei diesem Prozess vermuten. In dem KA-Tiermodell für Epilepsie konnte die Neuroprotektion durch den systemischen *knockout* von MK2 bestätigt werden (Thomas *et al.*, JNC, Abbildung 6, S. 92). Abbildung 18 zeigt eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge zwischen MK2 und Neurodegeneration.



**Abbildung 18: Schema zur Funktion von MK2 bei der Neurodegeneration.** Im Gehirn vorhandene Gliazellen können durch inflammatorische Stimuli wie LPS aktiviert werden. Daraufhin produzieren diese MK2-abhängig eine Vielfalt an Endzündungsmediatoren wie TNF $\alpha$  oder NO, welche einen MAPK abhängigen (p38 und JNK), aber MK2 unabhängigen neuronalen Zelltod auslösen. Bei neurodegenerativen Erkrankung (blau) führt der massive Untergang von Neuronen zu einer Aktivierung der Gliazellen und dadurch zur Auslösung der neuroinflammatorischen Antwort. Die genetische Entfernung von MK2 wirkt aufgrund einer Reduktion der cranialen Entzündung neuroprotektiv bei diesem Prozess.

## 5.2. Rolle von MK2 bei der neuronalen Depolarisation

Neben der Charakterisierung der Funktion von MK2 bei der Neuroinflammation in neurodegenerativen Erkrankungen, wurde in dieser Arbeit auch die Rolle von MK2 bei der Depolarisation von Neuronen mit Hilfe von PC12 Zellen *in vitro* und im KA-Modell für Epilepsie *in vivo* untersucht.

### 5.2.1. Expression von MK2 nach Depolarisation und erhöhtem intrazellulärem cAMP-Level

Auch wenn eine p38 -abhängige Phosphorylierung und Aktivierung von MK2 in der Literatur gut beschrieben ist, so berichten nur wenige Studien über eine veränderte MK2 mRNA- oder Protein-Expression. In einer Oligonukleotid Array Studie wurde ein 6,5 fachen Anstieg des MK2-mRNA-Levels in mit Wachstumsfaktoren behandelten 3T3-Zellen beschrieben (Fambrough *et al.* 1999). Eine Hochregulation der MK2-Expression ist ebenfalls in

Lungengewebe nach Exposition mit Dieselabgasen (Reynolds&Richards 2001) oder in LPS/IFN $\gamma$ -behandelten Mikroglia dokumentiert (Culbert *et al.* 2006). Ebenso ist die Vorläufer- und reife mRNA von MK2 nach Depolarisation von PC12 Zellen induziert (Vician *et al.* 2004), doch ging aus dieser Studie nicht hervor, ob dies irgendwelche Konsequenzen auf das MK2-Proteinlevel oder die MK2-Aktivität hatte. Untersuchungen hierzu wurden in dieser Arbeit durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von PC12 Zellen mit KCl oder Forskolin in eine beständige Hochregulation von MK2 Transkript, Protein und Aktivität zur Folge hatte (Thomas *et al.*, EJM, Abbildung 1-4, S. 86-89). Die gleiche Behandlung führte weder zu einer Induktion der p38 MAPK-Proteinexpression noch zu einer Induktion der MK3-Expression (Vician *et al.* 2004), einem anderen p38-Substrat mit hoher Struktur- und Funktionshomologie zu MK2 (Ronkina *et al.* 2007). Daraus ließe sich eine herausragende Rolle von MK2 innerhalb des p38 MAPK-Signalweges bei der zellulären Antwort nach Depolarisation interpretieren.

Es ist bekannt, dass auf eine neuronale Depolarisation ausgelöst durch eine hohe extrazelluläre KCl-Konzentration ein Ca<sup>2+</sup>-Influx in die Zelle folgt, welcher wiederum die Aktivierung des Enzyms Adenylatzyklase und somit den Anstieg des intrazellulären cAMP-Levels zur Folge hat (siehe Kapitel 1.4.2.). Aus diesem Grunde führt eine Inkubation von PC12 Zellen mit KCl oder Forskolin aufgrund des erhöhten intrazellulären cAMP-Levels zu einer PKA-Aktivierung und CREB-abhängigen Genexpression. Allerdings werden auch andere Signalwege aktiviert, so z.B. der ERK/MAPK-Signalweg, der eine Rolle bei der Mitogen-induzierten MK2-Expression in Osteoblasten innehat (Miguel *et al.* 2005). Stimulation von PC12 Zellen in Gegenwart des PKA-Inhibitors H89 oder des MEK1 Inhibitors PD98059 zeigte deutlich, dass die *de novo* Synthese von MK2 nach KCl- oder Forskolin-Behandlung unabhängig von einer ERK-Aktivierung ist (Thomas *et al.*, EJM, Abbildung 3a, S. 88). Vielmehr verhinderte die Inhibition durch H89 die KCl-induzierte und Forskolin-induzierte MK2-Expression vollständig, sogar unter das Level von unbehandelten Zellen. Ebenso führte eine Inkubation von PC12 Zellen mit H89 alleine ebenfalls zu einer Reduktion der endogenen MK2-Expression. Hieraus lässt sich eine Beteiligung von PKA sowohl bei der induzierten als auch bei der basalen Expression von MK2 herleiten. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass H89 ebenfalls andere Kinasen, wie MSK, ROCKII oder CaMK II, mit einer Wirksamkeit ähnlich wie PKA inhibiert (Davies *et al.* 2000). Somit könnten die Funde der H89-Inhibitionsversuche auch aus einer Kreuz-Inhibition einer oder mehrerer der oben genannten Kinasen resultieren. In der Tat konnte kürzlich eine Rolle von

CaMK II und Calcineurin bei der Expression von MK2-Transkript nach Depolarisation gezeigt werden (Machado *et al.* 2008). Das Fehlen einer erhöhten CREB-Phosphorylierung 24 Stunden nach KCl- oder Forskolin-Exposition auf der einen Seite und die Gegenwart eines erhöhten MK2-Proteinlevels zu diesem Zeitpunkt auf der anderen Seite deuten auf die Beteiligung eines PKA-unabhängigen Signalweges in der späten Phase der MK2-Expression. Allerdings könnte ein hohes MK2-Proteinlevel zu den späten Zeitpunkten auch durch ein stabiles MK2-Transkript erklärt werden. Das Vorhandensein einer putativen CRE-Sequenz (5'-ACGTC-3') innerhalb der Promotorregion des murinen MK2-Genes favorisiert wiederum eine Abhängigkeit der MK2-Expression vom PKA/CREB-Signalweg. Auch die Tatsache, dass Forskolin die MK2 Expression stärker induzierte als KCl unterstützt eine PKA-Abhängigkeit. Denn Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase direkt und führt somit u.U. zu einer stärkeren Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels. Zusammenfassend kann die MK2-Expression nach Depolarisation als komplex mit einer Beteiligung von PKA und anderen H89-sensitiven Signalwegen beschrieben werden.

Interessanterweise zeigten MK2-Expressionsanalysen in verschiedenen Zelllinien eine neurospezifische Induktion nach Forskolin-Behandlung auf (Thomas *et al.*, EJM, Abbildung 5, S. 90). Stimulation von PC12 Zellen und der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y resultierte in einer signifikanten Induktion der MK2-Expression, während diese in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW 264.7, in Nierenzellen (HEK 293) oder auch in Fibroblasten (MEF) nicht erfolgte. Das Ausbleiben der Induktion der MK2-Expression in nicht-neuronalen Zellen könnte in dem bereits hohen basalen Level an MK2 in diesen Zellen begründet liegen. Tatsächlich konnte im Vergleich zu Mikroglia oder Astrozyten ein geringeres Level an MK2-Transkript in Neuronen gefunden werden (Culbert *et al.* 2006). Das Fehlen der MK2 Hochregulation in neuronalen Stammzellen (C17.2), welche sowohl in Neurone als auch in Gliazellen differenzieren können (Snyder *et al.* 1992), wäre durch einen undifferenzierten Status also dem Fehlen eines ausreichend neuronalen Charakters dieser Zellen erklärbar. Mit diesem Hintergrund lässt sich die Induktion der MK2-Expression nach erhöhtem intrazellulärem cAMP-Levels als Neuronen-spezifischen zusammenfassen.

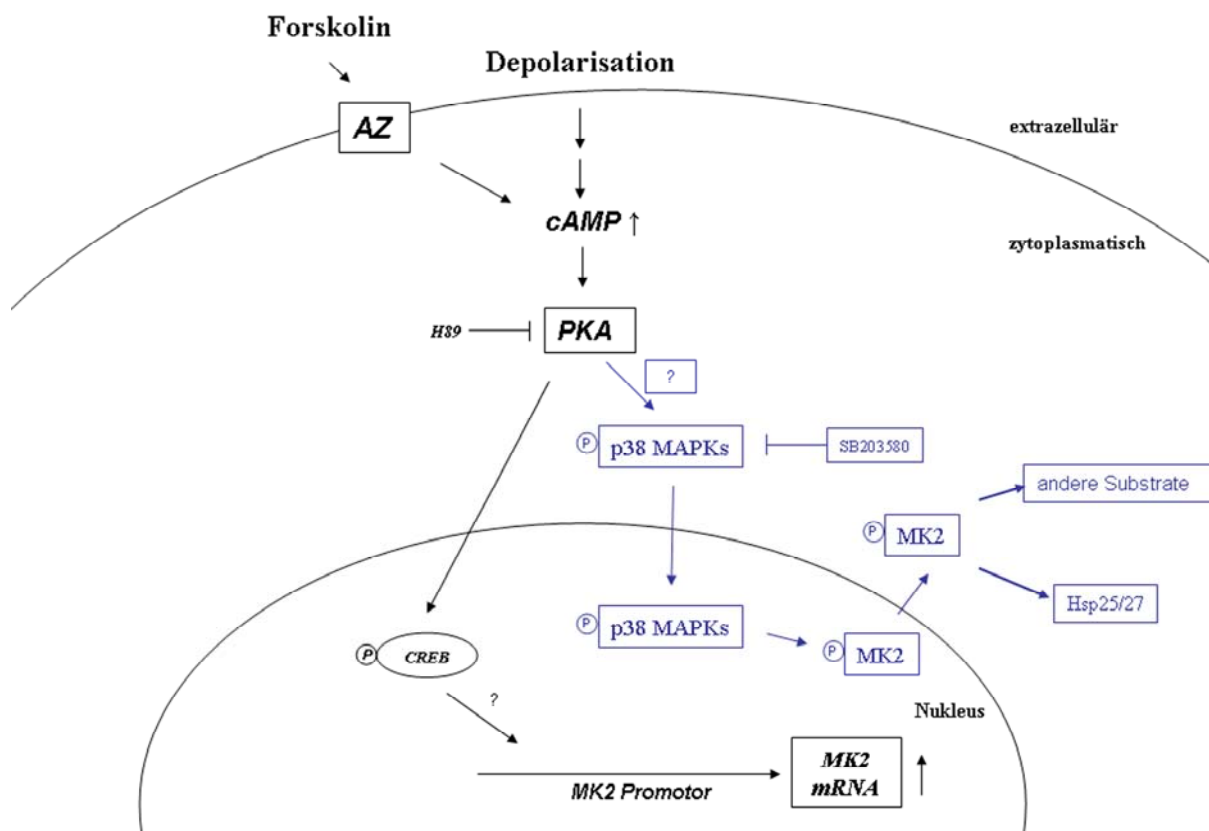
### 5.2.2. MK2 und die Funktion der Neurone

Klassisch wird der p38/MK2 Signalweg mit einer physiologischen Funktion bei der Entzündungsreaktion durch die Regulation der Expression von bestimmten inflammationsrelevanten Transkripten, wie Zytokine oder Adhäsionsmoleküle, verbunden (Gaestel 2006, Gorska *et al.* 2007, Hegen *et al.* 2006, Kotlyarov *et al.* 1999). Die *in vitro* Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien in dieser Arbeit deuten eine mögliche neue Funktion dieses Signalweges bei der zellulären Antwort nach Depolarisation von Neuronen an. Behandlung von PC12 Zellen mit 50mM KCl oder 50µM Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylatzyklase, führte zu einer schnellen (innerhalb von 15min; Daten nicht gezeigt) Aktivierung sowohl von p38 als auch von MK2 (Thomas *et al.*, EJN, Abbildung 4, S. 89). Der Einsatz des p38 -Inhibitors SB203580 ließ erkennen, dass MK2 durch beide Stimuli ausschließlich über p38 aktiviert wird. Quantifizierung ergab eine stärkere MK2-Aktivierung nach Behandlung mit Forskolin im Vergleich zu KCl. Grund hierfür könnte eine PKA-abhängige Aktivierung der p38/MK2 Achse sein, wie es für den ERK-Signalweg von anderen (Obara *et al.* 2007, Sindreu *et al.* 2007) oder für die MK2-Expression in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Die MK2-Aktivität war 24 Stunden nach Forskolin-Behandlung noch detektierbar, während sie zum gleichen Zeitpunkt bei Inkubation mit KCl bereits nicht mehr von der Hintergrundaktivität zu unterscheiden war (Thomas *et al.*, EJN, Abbildung 4, S. 89). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in dem zu diesem Zeitpunkt höheren MK2-Proteinlevel in den Forskolin-behandelten Zellen liegen. Somit würde die verzögerte Induktion der MK2-Proteinexpression eine Verlängerung der frühen MK2-Aktivierung verursachen und die Zelle u.U. auf eine folgende Depolarisierung vorbereiten. Dies unterstützt die These, dass MK2 eine wichtige Funktion in der zellulären Antwort bei der Depolarisation von Neuronen spielt. Ein ähnlicher Sachverhalt zwischen erhöhter mRNA-Expression und verlängerter Aktivität konnte mit einer möglichen Rolle von MK2 bei Alzheimer in Zusammenhang gebracht werden (Culbert *et al.* 2006). Andererseits hatte die MK2-Aktivität nach 24 Stunden basales Niveau erreicht, während die MK2-Proteinexpression sogar 40 Stunden nach KCl oder Forskolin Behandlung noch immer signifikant erhöht war. Hiermit könnten sich Neurone durch Erhöhung des MK2-Proteinlevels auf einen zweiten von einer Depolarisation verschiedenen, aber MK2-abhängigen Zellstress, wie z.B. dem Einleiten der neuronalen Apoptose, vorbereiten. Eine Abhängigkeit der Apoptose von der Aktivität der p38 MAPK oder von der MK2-vermittelten Phosphorylierung von Hsp25 konnte bereits in

verschiedenen Zelltypen gezeigt werden (Cheng *et al.* 2001, Quigney *et al.* 2003, Vertii *et al.* 2006, Xia *et al.* 1995).

Die am besten verstandene und beschriebene Funktion des p38/MK2 Signalweges ist die Stabilisierung von mRNAs, die in ihrer 3' UTR sogenannte ARE enthalten. Das murine Transkript des SNARE Proteins Synaptotagmin IV enthält sieben solcher ARE. Zudem wird Synaptotagmin IV nach Depolarisierung oder nach KA-Behandlung von Ratten im Hippocampus verstärkt exprimiert (Vician *et al.* 1995). Grund hierfür könnte eine durch MK2-vermittelte Stabilisierung der Synaptotagmin IV-mRNA sein. Somit wäre die bekannteste Funktion des p38/MK2-Signalweges nicht auf die klassischen entzündungsrelevanten Transkripte, wie z.B. COX-2, TNF $\alpha$  oder IFN $\gamma$ , beschränkt. Da SNARE Proteine eine wichtige Rolle bei der Fusion von intrazellulären Vesikeln mit der Zellmembran oder mit der Membran von anderen Zellkompartimenten (Scales *et al.* 2001) spielen, könnte MK2 bei der synaptischen Funktion, wie z.B. bei der Ausschüttung von Neurotransmittern, über die Stabilisierung der mRNA von Synaptotagmin IV partizipieren. Interessanterweise konnte eine Beteiligung von p38 bei der Kontrolle der synaptischen Funktion bereits beschrieben werden (Cavalli *et al.* 2001).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten eine wichtige Rolle von MK2 in der zellulären Antwort nach der neuronalen Depolarisation und, im Besonderen, nach der Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in Neuronen an. Die Induktion der MK2-Proteinexpression zusammen mit dem Nachweis der Aktivierung der p38/MK2 Achse nach Depolarisation, lassen über eine Schlüsselfunktion von MK2 bei physiologischen bzw. pathophysiologischen Gehirnfunktionen wie Lernen, Gedächtnis, synaptische Plastizität oder Exzitotoxizität spekulieren. Abbildung 19 fasst die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zur Expression und Aktivierung von MK2 nach Depolarisation und Fsk-Behandlung zusammen.



**Abbildung 19: Schematische Zusammenfassung zur Induktion der Aktivierung (blau) und der PKA-abhängigen Transkription (schwarz) von MK2 in Neuronen nach Depolarisation oder Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus.** Eine durch eine erhöhte extrazelluläre Konzentration an KCl ausgelöste Depolarisation führt ebenso wie die Aktivierung der Adenylatzyklase (AZ) durch Forskolin zu einem erhöhten cAMP Level innerhalb der Neurone. Als Folge wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert und vermittelt vermutlich CREB-abhängig die Induktion der MK2-Transkription. Neben der MK2-Expression wird auch die Aktivierung der p38-MK2-Achse durch Depolarisation und einer erhöhten intrazellulären cAMP Konzentration induziert, vermutlich ebenfalls PKA-abhängig.

### 5.2.3. MK2 bei Epilepsie

Die Funktion von MK2 bei der Depolarisation *in vivo* wurde in dem KA-Modell für Epilepsie untersucht. Zwei Tage nach Induktion von epileptischen Anfällen durch i.p. Injektion von Kainsäure wurde in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen eine reduzierte Neurodegeneration im Hilus, im Gyrus dentatus und in der Pyramidenschicht des Hippocampus im Vergleich zu behandelten WT Mäusen gefunden. Semi-quantitative Analyse mittels Score zeigte eine Neuroprotektion durch den MK2 k.o. in der Reihenfolge CA3a, CA1, DG und CA3c. Dieser Fund stimmt mit dem einer anderen Studie überein, in der eine starke Neurodegeneration in der CA3a und nur eine leichte Neurodegeneration in der CA1 Region der Pyramidenschicht des Hippocampus nach



KA-induzierten Krämpfen bei Mäusen beschrieben ist (Kim *et al.* 2004). Die Degeneration in den *in vivo* Experimenten hier (Thomas *et al.*, EJN, Abbildung 6, S. 92) war allerdings überraschend stark. Eine Erklärung dafür könnte in der Art und Dosis der KA Gabe liegen, denn Kim *et al.* (2004) verabreichten 0,15 µg (entspricht ungefähr 7,5 µg/kg) der Droge i.c.v., während die Mäuse in dieser Arbeit hier 25 mg/kg systemisch erhielten. Ein weiterer Grund für die starke Neurodegeneration könnte aus der Tatsache resultieren, dass sowohl die quantitative Analyse der neuronalen Zellzahl im Hilus als auch die semi-quantitative Beurteilung mittels Score erst zwei Tage nach KA-Injektionen bestimmt wurde. Während dieser Zeit könnte sich eine starke Aktivierung von Gliazellen (Gliose) und somit eine Entzündungsreaktion im Gehirn aufbauen, die zu einem weiteren Untergang von Neuronen führt. Da die Rolle von MK2 bei der Inflammation bereits bekannt ist, könnte die gefundene Neuroprotektion auch ein sekundärer Effekt aufgrund einer reduzierten durch ein normales Absterben von Neuronen hervorgerufene Entzündung im Gehirn von MK2<sup>-/-</sup> Mäusen sein. Ein solcher Sachverhalt konnte in den Parkinson-Experimenten zur Rolle von MK2 bei neurodegenerativen Erkrankungen in dieser Arbeit aufgedeckt werden (Thomas *et al.* 2008). Gestützt wird diese Annahme auch durch die Tatsache, dass p38 nach KA-Gabe in Astrozyten aktiviert wird und eine Inhibition mit SB203580 die Degeneration von Neuronen in der CA1 und CA3 Region des Hippocampus reduziert (Kim *et al.* 2004). Auf der anderen Seite wird p38 nach KA-Injektion auch in Neuronen aktiviert und ist unter anderem in der Glutamat-vermittelten Apoptose dieser Zellen involviert (Cao *et al.* 2004, Choi *et al.* 2004, Ferrer *et al.* 2002). Des Weiteren ist ein protektiver Effekt von Hsp27 gegenüber der KA-induzierten Degeneration von Neuronen im Hippocampus von transgenen Mäusen bekannt (Akbar *et al.* 2003). Diese Fakten zusammen mit den Erkenntnissen aus dieser Arbeit deuten auf eine wichtige Rolle der p38/MK/Hsp27 Achse in der KA-induzierten Neurodegeneration und lassen aufgrund der Tatsache, dass KA-behandelte Mäuse ein erhöhtes MK2-mRNA-Level im Hippocampus aufweisen (Vician *et al.* 2004), eine herausragende Funktion von MK2 innerhalb dieses Signalweges vermuten.

### 6. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe unterschiedlicher Modelle für Neurodegeneration und neuronale Depolarisation die Rolle von MK2 bei diesen Prozessen beschrieben.

In *ex vivo* Neuron-Glia-Mischkulturen aus embryonalem Mittelhirn wurde der Mechanismus, über den MK2 bei der Degeneration von dopaminergen Neuronen beteiligt ist, identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass MK2 nur in der Neuroinflammation und nicht im neuronalen Zelltod selbst involviert ist. Über eine reduzierte Produktion an inflammatorischen Mediatoren, vor allem aber an NO, wirkt die genetische Deletion von MK2 neuroprotektiv. Diese Befunde konnten in dem MPTP-Tiermodell für Morbus Parkinson *in vivo* bestätigt werden. Auch hier wiesen MK2 k.o. Mäuse trotz einer gleichstarken Gliose eine reduzierte Expression an iNOS und TNF $\alpha$  und somit eine größere Anzahl an dopaminergen Neuronen in der SNpc im Vergleich zu WT-Tieren auf. Insgesamt untermauern diese Daten die Relevanz der cranialen Entzündungsreaktion beim Voranschreiten neurodegenerativer Erkrankungen. Zudem zeigen sie deutlich auf, dass MK2 eine Schlüsselrolle bei der durch den p38 MAPK-Signalweg vermittelten Neuroinflammation inne hat. Dies macht MK2 zu einem attraktiven Ziel für eine anti-inflammatorische Therapie bei neurodegenerativen Erkrankungen im Allgemeinen. Zwar ist p38 neben der Inflammation auch in den NO-vermittelten neuronalen Zelltod involviert, doch mit dem Hintergrund, dass ein p38 $\alpha$  *knockout* zu einer Sterblichkeit der Embryonen führt und dass MK2 $^{-/-}$  Mäuse lebensfähig und fruchtbar sind, ist eine Inhibition von MK2 gegenüber einer Inhibition von p38 in Bezug auf mögliche Nebeneffekte zu bevorzugen. Interessanterweise ist die Entwicklung neuer und die Verbesserung bereits vorhandener MK2-Inhibitoren aktueller Gegenstand intensiver Forschung (Anderson *et al.* 2007, Chiang *et al.* 2008, Goldberg *et al.* 2008, Hillig *et al.* 2007).

Der neuroprotektive Effekt durch die genetische Entfernung von MK2 konnte in dem KA-induzierten Mausmodell für Epilepsie bestätigt werden. Allerdings geht aus den Untersuchungen nicht hervor, ob MK2 direkt oder indirekt über eine reduzierte Neuroinflammation an dieser Art der Neurodegeneration beteiligt ist. Dass die Neuroinflammation auch bei Epilepsie eine Rolle spielt, ist bereits aus mehreren Studien bekannt (Kim *et al.* 2004, Vezzani&Granata 2005) und macht daher eine Beteiligung von MK2 über den bei den Parkinson-Versuchen gefundenen Mechanismus wahrscheinlich. Die *in vitro* Untersuchungen bezüglich neuronaler Depolarisation hingegen deuten eine direkte Beteiligung von MK2 bei

diesem Prozess an. Allerdings konnte die genaue Funktion von MK2 hierbei nicht aufgedeckt werden und genaue Klärung bedarf weiterer Untersuchungen. Die Tatsache, dass MK2 nach KA-Gabe in den Bereichen des neuronalen Zelltods *in vivo* (Vician *et al.* 2004) und nach Depolarisation *in vitro* (Thomas *et al.* 2008) verstärkt exprimiert vorliegt, machen es durchaus möglich, dass MK2 bei dieser Art der Neurodegeneration (Exitotoxizität) direkt beteiligt ist.

Die Daten aus dieser Arbeit legen die Grundlagen für das Verständnis zur Rolle von MK2 beim Untergang von Neuronen. Es kann sicher angenommen werden, dass MK2 eine herausragende Rolle bei der p38-vermittelten Neuroinflammation spielt. Eine Beteiligung von MK2 im NO-vermittelten Zelltod von Nervenzellen ist ausgeschlossen, während das Auslösen der neuronalen Apoptose durch andere Stimuli, wie sie z.B. bei einer Exitotoxizität vorkommen, durchaus über MK2 erfolgen kann. Zusammenfassend lassen die hier gezeigten Ergebnisse im Kontext des Fachgebietes auf eine erfolgreich anti-inflammatorische MK2-Therapie zum Stoppen des Voranschreitens von neurodegenerativen Erkrankungen für die Zukunft hoffen.

### 7. Literatur

**Abe M.K., Kahle K.T., Saelzler M.P., Orth K., Dixon J.E. and Rosner M.R. (2001)** ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family *J Biol Chem* **276**(24), 21272-21279

**Abe M.K., Saelzler M.P., Espinosa R., 3rd, Kahle K.T., Hershenson M.B., Le Beau M.M. and Rosner M.R. (2002)** ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family *J Biol Chem* **277**(19), 16733-16743

**Akbar M.T., Lundberg A.M., Liu K., Vidyadaran S., Wells K.E., Dolatshad H., Wynn S., Wells D.J., Latchman D.S. and de Belleruche J. (2003)** The neuroprotective effects of heat shock protein 27 overexpression in transgenic animals against kainate-induced seizures and hippocampal cell death *J Biol Chem* **278**(22), 19956-19965

**Aletta J.M., Selbert M.A., Nairn A.C. and Edelman A.M. (1996)** Activation of a calcium-calmodulin-dependent protein kinase I cascade in PC12 cells *J Biol Chem* **271**(34), 20930-20934

**Ambrosino C. and Nebreda A.R. (2001)** Cell cycle regulation by p38 MAP kinases *Biol Cell* **93**(1-2), 47-51

**Anderson D.R., Meyers M.J., Vernier W.F., Mahoney M.W., Kurumbail R.G., Caspers N., Poda G.I., Schindler J.F., Reitz D.B. and Mourey R.J. (2007)** Pyrrolopyridine inhibitors of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK-2) *J Med Chem* **50**(11), 2647-2654

**Banizs B., Pike M.M., Millican C.L., Ferguson W.B., Komlosi P., Sheetz J., Bell P.D., Schwiebert E.M. and Yoder B.K. (2005)** Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus *Development* **132**(23), 5329-5339

**Bard J.L., Kaufman M.H., Dubreuil C., Brune R.M., Burger A., Baldock R.A. and Davidson D.R. (1998)** An internet-accessible database of mouse developmental anatomy based on a systematic nomenclature *Mech Dev* **74**(1-2), 111-120

**Barone F.C., Irving E.A., Ray A.M., Lee J.C., Kassis S., Kumar S., Badger A.M., Legos J.J., Erhardt J.A., Ohlstein E.H., Hunter A.J., Harrison D.C., Philpott K., Smith B.R., Adams J.L. and Parsons A.A. (2001)** Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia *Med Res Rev* **21**(2), 129-145

**Barron K.D. (1995)** The microglial cell. A historical review *J Neurol Sci* **134 Suppl**, 57-68

**Baumann N. and Pham-Dinh D. (2001)** Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system *Physiol Rev* **81**(2), 871-927

**Beal M.F. (2001)** Experimental models of Parkinson's disease *Nat Rev Neurosci* **2**(5), 325-334

**Ben-Ari Y., Tremblay E. and Ottersen O.P. (1980)** Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy *Neuroscience* **5**(3), 515-528

**Ben-Levy R., Hooper S., Wilson R., Paterson H.F. and Marshall C.J. (1998)** Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2 *Curr Biol* **8**(19), 1049-1057

**Ben-Levy R., Leighton I.A., Doza Y.N., Attwood P., Morrice N., Marshall C.J. and Cohen P. (1995)** Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2 *Embo J* **14**(23), 5920-5930

**Benndorf R., Hayess K., Ryazantsev S., Wieske M., Behlke J. and Lutsch G. (1994)** Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity *J Biol Chem* **269**(32), 20780-20784

- 
- Bessler H., Djaldetti R., Salman H., Bergman M. and Djaldetti M. (1999)** IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease *Biomed Pharmacother* **53**(3), 141-145
- Bezard E., Gross C.E., Fournier M.C., Dovero S., Bloch B. and Jaber M. (1999)** Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter *Exp Neurol* **155**(2), 268-273
- Bhat N.R., Feinstein D.L., Shen Q. and Bhat A.N. (2002)** p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2 *J Biol Chem* **277**(33), 29584-29592
- Blank J.L., Gerwins P., Elliott E.M., Sather S. and Johnson G.L. (1996)** Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase *J Biol Chem* **271**(10), 5361-5368
- Bloem B.R., Irwin I., Buruma O.J., Haan J., Roos R.A., Tetrud J.W. and Langston J.W. (1990)** The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease *J Neurol Sci* **97**(2-3), 273-293
- Bollig F., Winzen R., Gaestel M., Kostka S., Resch K. and Holtmann H. (2003)** Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization *Biochem Biophys Res Commun* **301**(3), 665-670
- Bond P.A. and Cundall R.L. (1977)** Properties of monoamine oxidase (MAO) in human blood platelets, plasma, lymphocytes and granulocytes *Clin Chim Acta* **80**(2), 317-326
- Boulton T.G., Nye S.H., Robbins D.J., Ip N.Y., Radziejewska E., Morgenbesser S.D., DePinho R.A., Panayotatos N., Cobb M.H. and Yancopoulos G.D. (1991)** ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF *Cell* **65**(4), 663-675
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* **72**, 248-254
- Brandt C., Potschka H., Loscher W. and Ebert U. (2003)** N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy *Neuroscience* **118**(3), 727-740
- Branger J., van den Blink B., Weijer S., Madwed J., Bos C.L., Gupta A., Yong C.L., Polmar S.H., Olszyna D.P., Hack C.E., van Deventer S.J., Peppelenbosch M.P. and van der Poll T. (2002)** Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia *J Immunol* **168**(8), 4070-4077
- Bronstein D.M., Perez-Otano I., Sun V., Mullis Sawin S.B., Chan J., Wu G.C., Hudson P.M., Kong L.Y., Hong J.S. and McMillian M.K. (1995)** Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures *Brain Res* **704**(1), 112-116
- Browne T.R. and Holmes G.L. (2001)** Epilepsy *N Engl J Med* **344**(15), 1145-1151
- Bulavin D.V., Higashimoto Y., Popoff I.J., Gaarde W.A., Basrur V., Potapova O., Appella E. and Fornace A.J., Jr. (2001)** Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase *Nature* **411**(6833), 102-107
- Caivano M. and Cohen P. (2000)** Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages *J Immunol* **164**(6), 3018-3025
- Cao J., Semenova M.M., Solovyan V.T., Han J., Coffey E.T. and Courtney M.J. (2004)** Distinct requirements for p38alpha and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death *J Biol Chem* **279**(34), 35903-35913
-

- Cavalli V., Vilbois F., Corti M., Marcote M.J., Tamura K., Karin M., Arkinstall S. and Gruenberg J. (2001)** The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex *Mol Cell* **7**(2), 421-432
- Cesnulevicius K., Timmer M., Wesemann M., Thomas T., Barkhausen T. and Grothe C. (2006)** Nucleofection is the most efficient nonviral transfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephali with no changes in cell composition or dopaminergic fate *Stem Cells* **24**(12), 2776-2791
- Chao C.C., Molitor T.W. and Hu S. (1993)** Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia *J Immunol* **151**(3), 1473-1481
- Chen Z., Hutchison M. and Cobb M.H. (1999)** Isolation of the protein kinase TAO2 and identification of its mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase binding domain *J Biol Chem* **274**(40), 28803-28807
- Cheng A., Chan S.L., Milhavel O., Wang S. and Mattson M.P. (2001)** p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells *J Biol Chem* **276**(46), 43320-43327
- Cheng T.J. and Lai Y.K. (1998)** Identification of mitogen-activated protein kinase-2 as a vimentin kinase activated by okadaic acid in 9L rat brain tumor cells *J Cell Biochem* **71**(2), 169-181
- Chevalier D. and Allen B.G. (2000)** Two distinct forms of MAPKAP kinase-2 in adult cardiac ventricular myocytes *Biochemistry* **39**(20), 6145-6156
- Chiang P.C., South S.A., Daniels J.S., Anderson D.R., Wene S.P., Albin L.A., Mourey R.J. and Selbo J.G. (2008)** Aqueous versus non-aqueous salt delivery strategies to enhance oral bioavailability of a mitogen-activated protein kinase-2 inhibitor in rats *J Pharm Sci*
- Choi D.W. (1992)** Excitotoxic cell death *J Neurobiol* **23**(9), 1261-1276
- Choi W.S., Eom D.S., Han B.S., Kim W.K., Han B.H., Choi E.J., Oh T.H., Markelonis G.J., Cho J.W. and Oh Y.J. (2004)** Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons *J Biol Chem* **279**(19), 20451-20460
- Clark A.R., Dean J.L. and Saklatvala J. (2003)** Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38 *FEBS Lett* **546**(1), 37-44
- Conde J.R. and Streit W.J. (2006)** Microglia in the aging brain *J Neuropathol Exp Neurol* **65**(3), 199-203
- Coyle J.T. (1987)** Kainic acid: insights into excitatory mechanisms causing selective neuronal degeneration *Ciba Found Symp* **126**, 186-203
- Cuadros M.A. and Navascues J. (1998)** The origin and differentiation of microglial cells during development *Prog Neurobiol* **56**(2), 173-189
- Culbert A.A., Skaper S.D., Howlett D.R., Evans N.A., Facci L., Soden P.E., Seymour Z.M., Guillot F., Gaestel M. and Richardson J.C. (2006)** MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease *J Biol Chem* **281**(33), 23658-23667
- Cunningham C., Wilcockson D.C., Champion S., Lunn K. and Perry V.H. (2005)** Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration *J Neurosci* **25**(40), 9275-9284
- Da Silva J., Pierrat B., Mary J.L. and Lesslauer W. (1997)** Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes *J Biol Chem* **272**(45), 28373-28380

- 
- Dahlkvist A., Kanter-Smoler G. and Sunnerhagen P. (1995)** The RCK1 and RCK2 protein kinase genes from *Saccharomyces cerevisiae* suppress cell cycle checkpoint mutations in *Schizosaccharomyces pombe* *Mol Gen Genet* **246**(3), 316-326
- Dan I., Watanabe N.M. and Kusumi A. (2001)** The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades *Trends Cell Biol* **11**(5), 220-230
- Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J.V., Zuo Y., Jung S., Littman D.R., Dustin M.L. and Gan W.B. (2005)** ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo *Nat Neurosci* **8**(6), 752-758
- Davies S.P., Reddy H., Caivano M. and Cohen P. (2000)** Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors *Biochem J* **351**(Pt 1), 95-105
- Dean J.L., Sully G., Clark A.R. and Saklatvala J. (2004)** The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation *Cell Signal* **16**(10), 1113-1121
- Dempsey L.C. and Nielsen S.L. (1976)** Surface ultrastructure of human ependyma *J Neurosurg* **45**(1), 52-55
- Dominguez-Pinos M.D., Paez P., Jimenez A.J., Weil B., Arraez M.A., Perez-Figares J.M. and Rodriguez E.M. (2005)** Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(7), 595-604
- Dorow D.S., Devereux L., Tu G.F., Price G., Nicholl J.K., Sutherland G.R. and Simpson R.J. (1995)** Complete nucleotide sequence, expression, and chromosomal localisation of human mixed-lineage kinase 2 *Eur J Biochem* **234**(2), 492-500
- Du Y., Ma Z., Lin S., Dodel R.C., Gao F., Bales K.R., Triarhou L.C., Chernet E., Perry K.W., Nelson D.L., Luecke S., Phebus L.A., Bymaster F.P. and Paul S.M. (2001)** Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25), 14669-14674
- Dudek F.E. (2006)** Activation of Fos during spontaneous hippocampal seizures in a model of temporal lobe epilepsy *Epilepsy Curr* **6**(2), 57-58
- Dudek F.E. and Sutula T.P. (2007)** Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective *Prog Brain Res* **163**, 755-773
- Ehltling C., Lai W.S., Schaper F., Brenndorfer E.D., Matthes R.J., Heinrich P.C., Ludwig S., Blackshear P.J., Gaestel M., Haussinger D. and Bode J.G. (2007)** Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade *J Immunol* **178**(5), 2813-2826
- Engel K., Kotlyarov A. and Gaestel M. (1998)** Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation *Embo J* **17**(12), 3363-3371
- Engel K., Schultz H., Martin F., Kotlyarov A., Plath K., Hahn M., Heinemann U. and Gaestel M. (1995)** Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 by mutation of phosphorylation sites and an A-helix motif *J Biol Chem* **270**(45), 27213-27221
- Enslin H., Tokumitsu H., Stork P.J., Davis R.J. and Soderling T.R. (1996)** Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20), 10803-10808
- Errea J.M. and Ara J.R. (1999)** [Cognition deterioration in Parkinson's disease: associated risk factors] *Rev Neurol* **28**(5), 439-443
-

- Everitt A.D. and Sander J.W. (1999)** Classification of the epilepsies: time for a change? A critical review of the International Classification of the Epilepsies and Epileptic Syndromes (ICEES) and its usefulness in clinical practice and epidemiological studies of epilepsy *Eur Neurol* **42**(1), 1-10
- Fambrough D., McClure K., Kazlauskas A. and Lander E.S. (1999)** Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes *Cell* **97**(6), 727-741
- Farooq A. and Zhou M.M. (2004)** Structure and regulation of MAPK phosphatases *Cell Signal* **16**(7), 769-779
- Fechir M., Linker K., Pautz A., Hubrich T., Forstermann U., Rodriguez-Pascual F. and Kleinert H. (2005)** Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric-oxide synthase gene *Mol Pharmacol* **67**(6), 2148-2161
- Feijoo C., Campbell D.G., Jakes R., Goedert M. and Cuenda A. (2005)** Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly *J Cell Sci* **118**(Pt 2), 397-408
- Fellin T. (2009)** Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity *J Neurochem* **108**(3), 533-544
- Feng Z.H., Wang T.G., Li D.D., Fung P., Wilson B.C., Liu B., Ali S.F., Langenbach R. and Hong J.S. (2002)** Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra *Neurosci Lett* **329**(3), 354-358
- Ferger B., Leng A., Mura A., Hengerer B. and Feldon J. (2004)** Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum *J Neurochem* **89**(4), 822-833
- Ferrer I., Blanco R., Carmona M., Puig B., Dominguez I. and Vinals F. (2002)** Active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates are differentially expressed following systemic administration of kainic acid to the adult rat *Acta Neuropathol (Berl)* **103**(4), 391-407
- Fijen J.W., Tulleken J.E., Kobold A.C., de Boer P., van der Werf T.S., Ligtenberg J.J., Spanjersberg R. and Zijlstra J.G. (2002)** Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase: dose-dependent suppression of leukocyte and endothelial response after endotoxin challenge in humans *Crit Care Med* **30**(4), 841-845
- Gaestel M. (2006)** MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(2), 120-130
- Gaestel M. (2008)** Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: kinases' tango nuevo *Front Biosci* **13**, 6050-6059
- Gao H.M., Hong J.S., Zhang W. and Liu B. (2003)** Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease *J Neurosci* **23**(4), 1228-1236
- Gao H.M., Jiang J., Wilson B., Zhang W., Hong J.S. and Liu B. (2002)** Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease *J Neurochem* **81**(6), 1285-1297
- Gao H.M., Liu B., Zhang W. and Hong J.S. (2003)** Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease *Faseb J* **17**(13), 1957-1959
- Gerwins P., Blank J.L. and Johnson G.L. (1997)** Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway *J Biol Chem* **272**(13), 8288-8295



- Ghatan S., Larner S., Kinoshita Y., Hetman M., Patel L., Xia Z., Youle R.J. and Morrison R.S. (2000)** p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons *J Cell Biol* **150**(2), 335-347
- Giasson B.I., Jakes R., Goedert M., Duda J.E., Leight S., Trojanowski J.Q. and Lee V.M. (2000)** A panel of epitope-specific antibodies detects protein domains distributed throughout human alpha-synuclein in Lewy bodies of Parkinson's disease *J Neurosci Res* **59**(4), 528-533
- Gibbons H.M. and Dragunow M. (2006)** Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide *Brain Res* **1084**(1), 1-15
- Goldberg D.R., Choi Y., Cogan D., Corson M., DeLeon R., Gao A., Gruenbaum L., Hao M.H., Joseph D., Kashem M.A., Miller C., Moss N., Netherton M.R., Pargellis C.P., Pelletier J., Sellati R., Skow D., Torcellini C., Tseng Y.C., Wang J., Wasti R., Werneburg B., Wu J.P. and Xiong Z. (2008)** Pyrazinoindolone inhibitors of MAPKAP-K2 *Bioorg Med Chem Lett* **18**(3), 938-941
- Gonzalez F.A., Raden D.L., Rigby M.R. and Davis R.J. (1992)** Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues *FEBS Lett* **304**(2-3), 170-178
- Good P.F., Hsu A., Werner P., Perl D.P. and Olanow C.W. (1998)** Protein nitration in Parkinson's disease *J Neuropathol Exp Neurol* **57**(4), 338-342
- Gorska M.M., Liang Q., Stafford S.J., Goplen N., Dharajiya N., Guo L., Sur S., Gaestel M. and Alam R. (2007)** MK2 controls the level of negative feedback in the NF-kappaB pathway and is essential for vascular permeability and airway inflammation *J Exp Med* **204**(7), 1637-1652
- Greenamyre J.T. and Porter R.H. (1994)** Anatomy and physiology of glutamate in the CNS *Neurology* **44**(11 Suppl 8), S7-13
- Han J., Jiang Y., Li Z., Kravchenko V.V. and Ulevitch R.J. (1997)** Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation *Nature* **386**(6622), 296-299
- Han J., Lee J.D., Bibbs L. and Ulevitch R.J. (1994)** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells *Science* **265**(5173), 808-811
- Han Q., Leng J., Bian D., Mahanivong C., Carpenter K.A., Pan Z.K., Han J. and Huang S. (2002)** Rac1-MKK3-p38-MAPKAPK2 pathway promotes urokinase plasminogen activator mRNA stability in invasive breast cancer cells *J Biol Chem* **277**(50), 48379-48385
- Hannigan M.O., Zhan L., Ai Y., Kotlyarov A., Gaestel M. and Huang C.K. (2001)** Abnormal migration phenotype of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2<sup>-/-</sup> neutrophils in Zigmund chambers containing formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine gradients *J Immunol* **167**(7), 3953-3961
- Hantraye P., Brouillet E., Ferrante R., Palfi S., Dolan R., Matthews R.T. and Beal M.F. (1996)** Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons *Nat Med* **2**(9), 1017-1021
- Harding T.C., Xue L., Bienemann A., Haywood D., Dickens M., Tolkovsky A.M. and Uney J.B. (2001)** Inhibition of JNK by overexpression of the JNK binding domain of JIP-1 prevents apoptosis in sympathetic neurons *J Biol Chem* **276**(7), 4531-4534
- Harper S.J. and LoGrasso P. (2001)** Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38 *Cell Signal* **13**(5), 299-310
- Harry G.J., Lefebvre d'Hellencourt C., McPherson C.A., Funk J.A., Aoyama M. and Wine R.N. (2008)** Tumor necrosis factor p55 and p75 receptors are involved in chemical-induced apoptosis of dentate granule neurons *J Neurochem* **106**(1), 281-298

- Hartmann A., Hunot S., Michel P.P., Muriel M.P., Vyas S., Faucheux B.A., Mouatt-Prigent A., Turmel H., Srinivasan A., Ruberg M., Evan G.I., Agid Y. and Hirsch E.C. (2000)** Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6), 2875-2880
- Hauser W.A., Annegers J.F. and Kurland L.T. (1993)** Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984 *Epilepsia* **34**(3), 453-468
- Hedges J.C., Dechert M.A., Yamboliev I.A., Martin J.L., Hickey E., Weber L.A. and Gerthoffer W.T. (1999)** A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration *J Biol Chem* **274**(34), 24211-24219
- Hegen M., Gaestel M., Nickerson-Nutter C.L., Lin L.L. and Telliez J.B. (2006)** MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis *J Immunol* **177**(3), 1913-1917
- Heidenreich O., Neining A., Schrott G., Zinck R., Cahill M.A., Engel K., Kotlyarov A., Kraft R., Kostka S., Gaestel M. and Nordheim A. (1999)** MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo *J Biol Chem* **274**(20), 14434-14443
- Hernan M.A., Logroscino G. and Garcia Rodriguez L.A. (2006)** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease *Neurology* **66**(7), 1097-1099
- Hillig R.C., Eberspaecher U., Monteclaro F., Huber M., Nguyen D., Mengel A., Muller-Tiemann B. and Egner U. (2007)** Structural basis for a high affinity inhibitor bound to protein kinase MK2 *J Mol Biol* **369**(3), 735-745
- Hitti E., Iakovleva T., Brook M., Deppenmeier S., Gruber A.D., Radzioch D., Clark A.R., Blackshear P.J., Kotlyarov A. and Gaestel M. (2006)** Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element *Mol Cell Biol* **26**(6), 2399-2407
- Holzman L.B., Merritt S.E. and Fan G. (1994)** Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases *J Biol Chem* **269**(49), 30808-30817
- Hoover H.E., Thuerauf D.J., Martindale J.J. and Glembotski C.C. (2000)** alpha B-crystallin gene induction and phosphorylation by MKK6-activated p38. A potential role for alpha B-crystallin as a target of the p38 branch of the cardiac stress response *J Biol Chem* **275**(31), 23825-23833
- Huang C.K., Zhan L., Ai Y. and Jongstra J. (1997)** LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils *J Biol Chem* **272**(1), 17-19
- Huang K.P. (1989)** The mechanism of protein kinase C activation *Trends Neurosci* **12**(11), 425-432
- Huard S., Elder R.T., Liang D., Li G. and Zhao R.Y. (2008)** Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle G2 arrest through Src1/MK2-mediated phosphorylation of Cdc25 *J Virol* **82**(6), 2904-2917
- Huberman M., Shalit F., Roth-Deri I., Gutman B., Brodie C., Kott E. and Sredni B. (1994)** Correlation of cytokine secretion by mononuclear cells of Alzheimer patients and their disease stage *J Neuroimmunol* **52**(2), 147-152
- Hunot S., Vila M., Teismann P., Davis R.J., Hirsch E.C., Przedborski S., Rakic P. and Flavell R.A. (2004)** JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(2), 665-670
- Hutchison M., Berman K.S. and Cobb M.H. (1998)** Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades *J Biol Chem* **273**(44), 28625-28632

- Ichijo H., Nishida E., Irie K., ten Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T., Takagi M., Matsumoto K., Miyazono K. and Gotoh Y. (1997)** Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways *Science* **275**(5296), 90-94
- Impey S., Obrietan K., Wong S.T., Poser S., Yano S., Wayman G., Deloulme J.C., Chan G. and Storm D.R. (1998)** Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation *Neuron* **21**(4), 869-883
- Jagavelu K., Tietge U.J., Gaestel M., Drexler H., Schieffer B. and Bavendiek U. (2007)** Systemic deficiency of the MAP kinase-activated protein kinase 2 reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic mice *Circ Res* **101**(11), 1104-1112
- Janknecht R. (2001)** Cell type-specific inhibition of the ETS transcription factor ER81 by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 *J Biol Chem* **276**(45), 41856-41861
- Javitch J.A., D'Amato R.J., Strittmatter S.M. and Snyder S.H. (1985)** Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(7), 2173-2177
- Jeon S.H., Kim Y.S., Bae C.D. and Park J.B. (2000)** Activation of JNK and p38 in rat hippocampus after kainic acid induced seizure *Exp Mol Med* **32**(4), 227-230
- Jiang Y., Gram H., Zhao M., New L., Gu J., Feng L., Di Padova F., Ulevitch R.J. and Han J. (1997)** Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta *J Biol Chem* **272**(48), 30122-30128
- Jones S.W., Brockbank S.M., Clements K.M., Le Good N., Campbell D., Read S.J., Needham M.R. and Newham P. (2009)** Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK2) modulates key biological pathways associated with OA disease pathology *Osteoarthritis Cartilage* **17**(1), 124-131
- Kaku K., Shikimi T., Kamisaki Y., Shinozuka K., Ishino H., Okunishi H. and Takaori S. (1999)** Elevation of striatal interleukin-6 and serum corticosterone contents in MPTP-treated mice *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**(9), 680-683
- Kanda H. and Miura M. (2004)** Regulatory roles of JNK in programmed cell death *J Biochem (Tokyo)* **136**(1), 1-6
- Keegan B.M. and Noseworthy J.H. (2002)** Multiple sclerosis *Annu Rev Med* **53**, 285-302
- Kim S.W., Yu Y.M., Piao C.S., Kim J.B. and Lee J.K. (2004)** Inhibition of delayed induction of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates kainic acid-induced neuronal loss in the hippocampus *Brain Res* **1007**(1-2), 188-191
- Kim Y.S. and Joh T.H. (2006)** Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease *Exp Mol Med* **38**(4), 333-347
- Knebel A., Morrice N. and Cohen P. (2001)** A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38delta *Embo J* **20**(16), 4360-4369
- Kobayashi M., Nishita M., Mishima T., Ohashi K. and Mizuno K. (2006)** MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration *Embo J* **25**(4), 713-726
- Kolch W. (2000)** Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions *Biochem J* **351 Pt 2**, 289-305
- Kordower J.H., Freeman T.B., Snow B.J., Vingerhoets F.J., Mufson E.J., Sanberg P.R., Hauser R.A., Smith D.A., Nauert G.M., Perl D.P. and et al. (1995)** Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease *N Engl J Med* **332**(17), 1118-1124

- Kotlyarov A., Neiningner A., Schubert C., Eckert R., Birchmeier C., Volk H.D. and Gaestel M. (1999)** MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis *Nat Cell Biol* **1**(2), 94-97
- Kotlyarov A., Yannoni Y., Fritz S., Laass K., Telliez J.B., Pitman D., Lin L.L. and Gaestel M. (2002)** Distinct cellular functions of MK2 *Mol Cell Biol* **22**(13), 4827-4835
- Kramer R.M., Roberts E.F., Um S.L., Borsch-Haubold A.G., Watson S.P., Fisher M.J. and Jakubowski J.A. (1996)** p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2 *J Biol Chem* **271**(44), 27723-27729
- Kurkowska-Jastrzebska I., Wronska A., Kohutnicka M., Czlonkowski A. and Czlonkowska A. (1999)** The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse *Exp Neurol* **156**(1), 50-61
- Kyriakis J.M. and Avruch J. (2001)** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation *Physiol Rev* **81**(2), 807-869
- Lambert H., Charette S.J., Bernier A.F., Guimond A. and Landry J. (1999)** HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus *J Biol Chem* **274**(14), 9378-9385
- Lange-Carter C.A., Pleiman C. and Johnson G.L. (1994)** A novel upstream activator in the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway *Recent Prog Horm Res* **49**, 341-345
- Langston J.W. and Ballard P.A., Jr. (1983)** Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine *N Engl J Med* **309**(5), 310
- Langston J.W., Forno L.S., Tetud J., Reeves A.G., Kaplan J.A. and Karluk D. (1999)** Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure *Ann Neurol* **46**(4), 598-605
- Lee J.C., Kassis S., Kumar S., Badger A. and Adams J.L. (1999)** p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials *Pharmacol Ther* **82**(2-3), 389-397
- Lee J.C., Kumar S., Griswold D.E., Underwood D.C., Votta B.J. and Adams J.L. (2000)** Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy *Immunopharmacology* **47**(2-3), 185-201
- Lee J.C., Laydon J.T., McDonnell P.C., Gallagher T.F., Kumar S., Green D., McNulty D., Blumenthal M.J., Heys J.R., Landvatter S.W. and et al. (1994)** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis *Nature* **372**(6508), 739-746
- Lee Y.B., Nagai A. and Kim S.U. (2002)** Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia *J Neurosci Res* **69**(1), 94-103
- Li Y., Inoki K., Vacratsis P. and Guan K.L. (2003)** The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3 *J Biol Chem* **278**(16), 13663-13671
- Liberatore G.T., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Mandir A.S., Vila M., McAuliffe W.G., Dawson V.L., Dawson T.M. and Przedborski S. (1999)** Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease *Nat Med* **5**(12), 1403-1409
- Liu B. and Hong J.S. (2003)** Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanism and strategy in therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther* **304**(1), 1-7
- Loscher W. (2002)** Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy *Trends Pharmacol Sci* **23**(3), 113-118

- 
- Loscher W., Honack D. and Gramer M. (1999)** Effect of depth electrode implantation with or without subsequent kindling on GABA turnover in various rat brain regions *Epilepsy Res* **37**(2), 95-108
- Loscher W., Potschka H., Wlaz P., Danysz W. and Parsons C.G. (2003)** Are neuronal nicotinic receptors a target for antiepileptic drug development? Studies in different seizure models in mice and rats *Eur J Pharmacol* **466**(1-2), 99-111
- Loscher W. and Schmidt D. (1988)** Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations *Epilepsy Res* **2**(3), 145-181
- Ludwig S., Hoffmeyer A., Goebeler M., Kilian K., Hafner H., Neufeld B., Han J. and Rapp U.R. (1998)** The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway *J Biol Chem* **273**(4), 1917-1922
- Machado H.B., Vician L.J. and Herschman H.R. (2008)** The MAPK pathway is required for depolarization-induced "promiscuous" immediate-early gene expression but not for depolarization-restricted immediate-early gene expression in neurons *J Neurosci Res* **86**(3), 593-602
- Mahtani K.R., Brook M., Dean J.L., Sully G., Saklatvala J. and Clark A.R. (2001)** Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability *Mol Cell Biol* **21**(19), 6461-6469
- Manke I.A., Nguyen A., Lim D., Stewart M.Q., Elia A.E. and Yaffe M.B. (2005)** MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation *Mol Cell* **17**(1), 37-48
- Markowitz A.J., White M.G., Kolson D.L. and Jordan-Sciutto K.L. (2007)** Cellular interplay between neurons and glia: toward a comprehensive mechanism for excitotoxic neuronal loss in neurodegeneration *Cellscience* **4**(1), 111-146
- Marsden C.D. (1990)** Parkinson's disease *Lancet* **335**(8695), 948-952
- McGeer P.L. and McGeer E.G. (1998)** Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions *Alzheimer Dis Assoc Disord* **12 Suppl 2**, S1-6
- McGeer P.L., Rogers J. and McGeer E.G. (2006)** Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years *J Alzheimers Dis* **9**(3 Suppl), 271-276
- McLaughlin M.M., Kumar S., McDonnell P.C., Van Horn S., Lee J.C., Livi G.P. and Young P.R. (1996)** Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase *J Biol Chem* **271**(14), 8488-8492
- Mendoza H., Campbell D.G., Burness K., Hastie J., Ronkina N., Shim J.H., Arthur J.S., Davis R.J., Gaestel M., Johnson G.L., Ghosh S. and Cohen P. (2008)** Roles for TAB1 in regulating the IL-1-dependent phosphorylation of the TAB3 regulatory subunit and activity of the TAK1 complex *Biochem J* **409**(3), 711-722
- Meng W., Swenson L.L., Fitzgibbon M.J., Hayakawa K., Ter Haar E., Behrens A.E., Fulghum J.R. and Lippke J.A. (2002)** Structure of mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 suggests a bifunctional switch that couples kinase activation with nuclear export *J Biol Chem* **277**(40), 37401-37405
- Miguel S.M., Namdar-Attar M., Noh T., Frenkel B. and Bab I. (2005)** ERK1/2-activated de novo Mapkapk2 synthesis is essential for osteogenic growth peptide mitogenic signaling in osteoblastic cells *J Biol Chem* **280**(45), 37495-37502
- Mochizuki H., Goto K., Mori H. and Mizuno Y. (1996)** Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease *J Neurol Sci* **137**(2), 120-123
-

- Mogi M., Togari A., Ogawa M., Ikeguchi K., Shizuma N., Fan D., Nakano I. and Nagatsu T. (1998)** Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1beta and nerve growth factor in the striatum *Neurosci Lett* **250**(1), 25-28
- Munch G., Gerlach M., Sian J., Wong A. and Riederer P. (1998)** Advanced glycation end products in neurodegeneration: more than early markers of oxidative stress? *Ann Neurol* **44**(3 Suppl 1), S85-88
- Nadler J.V., Perry B.W. and Cotman C.W. (1978)** Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells *Nature* **271**(5646), 676-677
- Nadler J.V., Perry B.W., Gentry C. and Cotman C.W. (1981)** Fate of the hippocampal mossy fiber projection after destruction of its postsynaptic targets with intraventricular kainic acid *J Comp Neurol* **196**(4), 549-569
- Namgung U. and Xia Z. (2000)** Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase *J Neurosci* **20**(17), 6442-6451
- Neininger A., Kontoyiannis D., Kotlyarov A., Winzen R., Eckert R., Volk H.D., Holtmann H., Kollias G. and Gaestel M. (2002)** MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels *J Biol Chem* **277**(5), 3065-3068
- Neininger A., Thielemann H. and Gaestel M. (2001)** FRET-based detection of different conformations of MK2 *EMBO Rep* **2**(8), 703-708
- Neufeld B., Grosse-Wilde A., Hoffmeyer A., Jordan B.W., Chen P., Dinev D., Ludwig S. and Rapp U.R. (2000)** Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix transcription factor E47 and repress its transcriptional activity *J Biol Chem* **275**(27), 20239-20242
- Newman E.A. (2005)** Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity *J Neurosci* **25**(23), 5502-5510
- Nimmerjahn A., Kirchhoff F. and Helmchen F. (2005)** Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo *Science* **308**(5726), 1314-1318
- Obara Y., Horgan A.M. and Stork P.J. (2007)** The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells *J Neurochem* **101**(2), 470-482
- Offen D., Beart P.M., Cheung N.S., Pascoe C.J., Hochman A., Gorodin S., Melamed E., Bernard R. and Bernard O. (1998)** Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10), 5789-5794
- Onyango I.G., Tuttle J.B. and Bennett J.P., Jr. (2005)** Activation of p38 and N-acetylcysteine-sensitive c-Jun NH2-terminal kinase signaling cascades is required for induction of apoptosis in Parkinson's disease cybrids *Mol Cell Neurosci* **28**(3), 452-461
- Pakkenberg B., Moller A., Gundersen H.J., Mouritzen Dam A. and Pakkenberg H. (1991)** The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **54**(1), 30-33
- Park J.H., Park J.K., Bae K.W. and Park H.T. (2000)** Protein kinase A activity is required for depolarization-induced proline-rich tyrosine kinase 2 and mitogen-activated protein kinase activation in PC12 cells *Neurosci Lett* **290**(1), 25-28
- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K. and Cobb M.H. (2001)** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions *Endocr Rev* **22**(2), 153-183

- Pennathur S., Jackson-Lewis V., Przedborski S. and Heinecke J.W. (1999)** Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease *J Biol Chem* **274**(49), 34621-34628
- Piccini P., Brooks D.J., Bjorklund A., Gunn R.N., Grasby P.M., Rimoldi O., Brundin P., Hagell P., Rehncrona S., Widner H. and Lindvall O. (1999)** Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient *Nat Neurosci* **2**(12), 1137-1140
- Piccini P., Lindvall O., Bjorklund A., Brundin P., Hagell P., Ceravolo R., Oertel W., Quinn N., Samuel M., Rehncrona S., Widner H. and Brooks D.J. (2000)** Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts *Ann Neurol* **48**(5), 689-695
- Piotrowicz R.S., Hickey E. and Levin E.G. (1998)** Heat shock protein 27 kDa expression and phosphorylation regulates endothelial cell migration *Faseb J* **12**(14), 1481-1490
- Plath K., Engel K., Schwedersky G. and Gaestel M. (1994)** Characterization of the proline-rich region of mouse MAPKAP kinase 2: influence on catalytic properties and binding to the c-abl SH3 domain in vitro *Biochem Biophys Res Commun* **203**(2), 1188-1194
- Possel H., Noack H., Putzke J., Wolf G. and Sies H. (2000)** Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies *Glia* **32**(1), 51-59
- Powell D.W., Rane M.J., Joughin B.A., Kalmukova R., Hong J.H., Tidor B., Dean W.L., Pierce W.M., Klein J.B., Yaffe M.B. and McLeish K.R. (2003)** Proteomic identification of 14-3-3zeta as a mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 substrate: role in dimer formation and ligand binding *Mol Cell Biol* **23**(15), 5376-5387
- Przedborski S., Jackson-Lewis V., Yokoyama R., Shibata T., Dawson V.L. and Dawson T.M. (1996)** Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10), 4565-4571
- Qin L., Liu Y., Wang T., Wei S.J., Block M.L., Wilson B., Liu B. and Hong J.S. (2004)** NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia *J Biol Chem* **279**(2), 1415-1421
- Quigney D.J., Gorman A.M. and Samali A. (2003)** Heat shock protects PC12 cells against MPP+ toxicity *Brain Res* **993**(1-2), 133-139
- Racine R.J., Gartner J.G. and Burnham W.M. (1972)** Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures *Brain Res* **47**(1), 262-268
- Raingaud J., Gupta S., Rogers J.S., Dickens M., Han J., Ulevitch R.J. and Davis R.J. (1995)** Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine *J Biol Chem* **270**(13), 7420-7426
- Rane M.J., Coxon P.Y., Powell D.W., Webster R., Klein J.B., Pierce W., Ping P. and McLeish K.R. (2001)** p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils *J Biol Chem* **276**(5), 3517-3523
- Ravina B., Camicioli R., Como P.G., Marsh L., Jankovic J., Weintraub D. and Elm J. (2007)** The impact of depressive symptoms in early Parkinson disease *Neurology* **69**(4), 342-347
- Reinhardt H.C. and Yaffe M.B. (2009)** Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2 *Curr Opin Cell Biol*

- Reynolds L.J. and Richards R.J. (2001)** Can toxicogenomics provide information on the bioreactivity of diesel exhaust particles? *Toxicology* **165**(2-3), 145-152
- Rincon M., Flavell R.A. and Davis R.A. (2000)** The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses *Free Radic Biol Med* **28**(9), 1328-1337
- Rock R.B., Gekker G., Hu S., Sheng W.S., Cheeran M., Lokensgard J.R. and Peterson P.K. (2004)** Role of microglia in central nervous system infections *Clin Microbiol Rev* **17**(4), 942-964, table of contents
- Rodriguez-Pascual F., Hausding M., Ihrig-Biedert I., Furneaux H., Levy A.P., Forstermann U. and Kleinert H. (2000)** Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR *J Biol Chem* **275**(34), 26040-26049
- Rogalla T., Ehrnsperger M., Preville X., Kotlyarov A., Lutsch G., Ducasse C., Paul C., Wieske M., Arrigo A.P., Buchner J. and Gaestel M. (1999)** Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation *J Biol Chem* **274**(27), 18947-18956
- Ronkina N., Kotlyarov A., Dittrich-Breiholz O., Kracht M., Hitti E., Milarski K., Askew R., Marusic S., Lin L.L., Gaestel M. and Telliez J.B. (2007)** The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK *Mol Cell Biol* **27**(1), 170-181
- Rosen L.B., Ginty D.D., Weber M.J. and Greenberg M.E. (1994)** Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras *Neuron* **12**(6), 1207-1221
- Rouse J., Cohen P., Trigon S., Morange M., Alonso-Llamazares A., Zamanillo D., Hunt T. and Nebreda A.R. (1994)** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins *Cell* **78**(6), 1027-1037
- Rousseau S., Morrice N., Peggie M., Campbell D.G., Gaestel M. and Cohen P. (2002)** Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs *Embo J* **21**(23), 6505-6514
- Roux P.P. and Blenis J. (2004)** ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2), 320-344
- Ruano D., Revilla E., Gavilan M.P., Vizuete M.L., Pintado C., Vitorica J. and Castano A. (2006)** Role of p38 and inducible nitric oxide synthase in the in vivo dopaminergic cells' degeneration induced by inflammatory processes after lipopolysaccharide injection *Neuroscience* **140**(4), 1157-1168
- Sakai R., Minato S., Koike K., Koike K., Jimbo M. and Kamiya H. (2005)** Cellular and subcellular localization of kainic acid in the marine red alga *Digenea simplex* *Cell Tissue Res* **322**(3), 491-502
- Saporito M.S., Brown E.M., Miller M.S. and Carswell S. (1999)** CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons In vivo *J Pharmacol Exp Ther* **288**(2), 421-427
- Saporito M.S., Thomas B.A. and Scott R.W. (2000)** MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo *J Neurochem* **75**(3), 1200-1208
- Sawamoto K., Wichterle H., Gonzalez-Perez O., Cholfin J.A., Yamada M., Spassky N., Murcia N.S., Garcia-Verdugo J.M., Marin O., Rubenstein J.L., Tessier-Lavigne M., Okano H. and Alvarez-Buylla A. (2006)** New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain *Science* **311**(5761), 629-632
- Scales S.J., Finley M.F. and Scheller R.H. (2001)** Cell biology. Fusion without SNAREs? *Science* **294**(5544), 1015-1016



- Schapira A.H. (1996)** Neurotoxicity and the mechanisms of cell death in Parkinson's disease *Adv Neurol* **69**, 161-165
- Schauwecker P.E. (2002)** Modulation of cell death by mouse genotype: differential vulnerability to excitatory amino acid-induced lesions *Exp Neurol* **178**(2), 219-235
- Schauwecker P.E. (2000)** Seizure-induced neuronal death is associated with induction of c-Jun N-terminal kinase and is dependent on genetic background *Brain Res* **884**(1--2), 116-128
- Schultz H., Engel K. and Gaestel M. (1997)** PMA-induced activation of the p42/44ERK- and p38RK-MAP kinase cascades in HL-60 cells is PKC dependent but not essential for differentiation to the macrophage-like phenotype *J Cell Physiol* **173**(3), 310-318
- Schulz J.B., Matthews R.T., Muqit M.M., Browne S.E. and Beal M.F. (1995)** Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice *J Neurochem* **64**(2), 936-939
- Schwob J.E., Fuller T., Price J.L. and Olney J.W. (1980)** Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study *Neuroscience* **5**(6), 991-1014
- Seternes O.M., Johansen B., Hegge B., Johannessen M., Keyse S.M. and Moens U. (2002)** Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress *Mol Cell Biol* **22**(20), 6931-6945
- Sindreu C.B., Scheiner Z.S. and Storm D.R. (2007)** Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases regulate ERK-dependent activation of MSK1 during fear conditioning *Neuron* **53**(1), 79-89
- Singh S., Powell D.W., Rane M.J., Millard T.H., Trent J.O., Pierce W.M., Klein J.B., Machesky L.M. and McLeish K.R. (2003)** Identification of the p16-Arc subunit of the Arp 2/3 complex as a substrate of MAPK-activated protein kinase 2 by proteomic analysis *J Biol Chem* **278**(38), 36410-36417
- Smith J.A., Potect-Smith C.E., Lannigan D.A., Freed T.A., Zoltoski A.J. and Sturgill T.W. (2000)** Creation of a stress-activated p90 ribosomal S6 kinase. The carboxyl-terminal tail of the MAPK-activated protein kinases dictates the signal transduction pathway in which they function *J Biol Chem* **275**(41), 31588-31593
- Snyder E.Y., Deitcher D.L., Walsh C., Arnold-Aldea S., Hartweg E.A. and Cepko C.L. (1992)** Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum *Cell* **68**(1), 33-51
- Sperk G. (1994)** Kainic acid seizures in the rat *Prog Neurobiol* **42**(1), 1-32
- Spillantini M.G. and Goedert M. (2000)** The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy *Ann N Y Acad Sci* **920**, 16-27
- Sriram K., Matheson J.M., Benkovic S.A., Miller D.B., Luster M.I. and O'Callaghan J.P. (2006)** Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha *FASEB J* **20**(6), 670-682
- Stables J.P., Bertram E.H., White H.S., Coulter D.A., Dichter M.A., Jacobs M.P., Loscher W., Lowenstein D.H., Moshe S.L., Noebels J.L. and Davis M. (2002)** Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland *Epilepsia* **43**(11), 1410-1420
- Steppuhn K.G. and Turski L. (1993)** Modulation of the seizure threshold for excitatory amino acids in mice by antiepileptic drugs and chemoconvulsants *J Pharmacol Exp Ther* **265**(3), 1063-1070
- Stokoe D., Campbell D.G., Nakielny S., Hidaka H., Leever S.J., Marshall C. and Cohen P. (1992)** MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase *Embo J* **11**(11), 3985-3994

- Stokoe D., Engel K., Campbell D.G., Cohen P. and Gaestel M. (1992)** Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins *FEBS Lett* **313**(3), 307-313
- Storch M. and Lassmann H. (1997)** Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases *Curr Opin Neurol* **10**(3), 186-192
- Subbaramaiah K., Marmo T.P., Dixon D.A. and Dannenberg A.J. (2003)** Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR *J Biol Chem* **278**(39), 37637-37647
- Sugama S., Yang L., Cho B.P., DeGiorgio L.A., Lorenzl S., Albers D.S., Beal M.F., Volpe B.T. and Joh T.H. (2003)** Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice *Brain Res* **964**(2), 288-294
- Sun A., Liu M., Nguyen X.V. and Bing G. (2003)** P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain *Exp Neurol* **183**(2), 394-405
- Sutherland C., Alterio J., Campbell D.G., Le Bourdelles B., Mallet J., Haavik J. and Cohen P. (1993)** Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2 *Eur J Biochem* **217**(2), 715-722
- Teismann P. and Fergler B. (2001)** Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease *Synapse* **39**(2), 167-174
- Teismann P., Tieu K., Choi D.K., Wu D.C., Naini A., Hunot S., Vila M., Jackson-Lewis V. and Przedborski S. (2003)** Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9), 5473-5478
- Thomas T., Hitti E., Kotlyarov A., Potschka H. and Gaestel M. (2008)** MAP-kinase-activated protein kinase 2 expression and activity is induced after neuronal depolarization *Eur J Neurosci* **28**(4), 642-654
- Thomas T., Timmer M., Cesnulevicius K., Hitti E., Kotlyarov A. and Gaestel M. (2008)** MAPKAP kinase 2-deficiency prevents neurons from cell death by reducing neuroinflammation--relevance in a mouse model of Parkinson's disease *J Neurochem* **105**(5), 2039-2052
- Tipton K.F. and Singer T.P. (1993)** Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds *J Neurochem* **61**(4), 1191-1206
- Ton T.G., Heckbert S.R., Longstreth W.T., Jr., Rossing M.A., Kukull W.A., Franklin G.M., Swanson P.D., Smith-Weller T. and Checkoway H. (2006)** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease *Mov Disord* **21**(7), 964-969
- Tran H., Maurer F. and Nagamine Y. (2003)** Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 *Mol Cell Biol* **23**(20), 7177-7188
- van den Blink B., Branger J., Weijer S., Gupta A., van Deventer S.J., Peppelenbosch M.P. and van der Poll T. (2004)** P38 mitogen activated protein kinase is involved in the downregulation of granulocyte CXC chemokine receptors 1 and 2 during human endotoxemia *J Clin Immunol* **24**(1), 37-41
- Vaughan D.W. and Peters A. (1974)** Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscope study *J Neurocytol* **3**(4), 405-429
- Vertii A., Hakim C., Kotlyarov A. and Gaestel M. (2006)** Analysis of properties of small heat shock protein Hsp25 in MAPK-activated protein kinase 2 (MK2)-deficient cells: MK2-dependent insolubilization of Hsp25 oligomers correlates with susceptibility to stress *J Biol Chem* **281**(37), 26966-26975

- 
- Vezzani A. and Granata T. (2005)** Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence *Epilepsia* **46**(11), 1724-1743
- Vician L., Lim I.K., Ferguson G., Tocco G., Baudry M. and Herschman H.R. (1995)** Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6), 2164-2168
- Vician L.J., Xu G., Liu W., Feldman J.D., Machado H.B. and Herschman H.R. (2004)** MAPKAP kinase-2 is a primary response gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain *J Neurosci Res* **78**(3), 315-328
- Vijitruth R., Liu M., Choi D.Y., Nguyen X.V., Hunter R.L. and Bing G. (2006)** Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease *J Neuroinflammation* **3**, 6
- Vila M., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Djaldetti R., Liberatore G., Offen D., Korsmeyer S.J. and Przedborski S. (2001)** Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl- 4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5), 2837-2842
- Vila M. and Przedborski S. (2003)** Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* **4**(5), 365-375
- Voncken J.W., Niessen H., Neufeld B., Rennefahrt U., Dahlmans V., Kubben N., Holzer B., Ludwig S. and Rapp U.R. (2005)** MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1 *J Biol Chem* **280**(7), 5178-5187
- Wang X., Xu L., Wang H., Young P.R., Gaestel M. and Feuerstein G.Z. (2002)** Mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 deficiency protects brain from ischemic injury in mice *J Biol Chem* **277**(46), 43968-43972
- Wang X.S., Diener K., Manthey C.L., Wang S., Rosenzweig B., Bray J., Delaney J., Cole C.N., Chan-Hui P.Y., Mantlo N., Lichenstein H.S., Zukowski M. and Yao Z. (1997)** Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase *J Biol Chem* **272**(38), 23668-23674
- Wang X.Z. and Ron D. (1996)** Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase *Science* **272**(5266), 1347-1349
- Waskiewicz A.J., Flynn A., Proud C.G. and Cooper J.A. (1997)** Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2 *Embo J* **16**(8), 1909-1920
- Weber H.O., Ludwig R.L., Morrison D., Kotlyarov A., Gaestel M. and Vousden K.H. (2005)** HDM2 phosphorylation by MAPKAP kinase 2 *Oncogene* **24**(12), 1965-1972
- Werz O., Klemm J., Samuelsson B. and Radmark O. (2000)** 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10), 5261-5266
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B. and Johnson G.L. (1999)** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human *Physiol Rev* **79**(1), 143-180
- Wilms H., Rosenstiel P., Sievers J., Deuschl G., Zecca L. and Lucius R. (2003)** Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease *Faseb J* **17**(3), 500-502
- Winzen R., Kracht M., Ritter B., Wilhelm A., Chen C.Y., Shyu A.B., Muller M., Gaestel M., Resch K. and Holtmann H. (1999)** The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism *Embo J* **18**(18), 4969-4980
- Wolf P. (2003)** [Might it be epilepsy? What should the general practitioner look out for in differential diagnosis] *MMW Fortschr Med* **145 Suppl 2**, 15-19
-

**Wong W.K., Ou X.M., Chen K. and Shih J.C. (2002)** Activation of human monoamine oxidase B gene expression by a protein kinase C MAPK signal transduction pathway involves c-Jun and Egr-1 *J Biol Chem* **277**(25), 22222-22230

**Worm Petersen J. (1974)** [Treating patients with Parkinson,s disease is a specialty: Parkinson,s disease - an abundant set of symptoms] *Sygeplejersken* **74**(49), 4-5

**Wu D.C., Jackson-Lewis V., Vila M., Tieu K., Teismann P., Vadseth C., Choi D.K., Ischiropoulos H. and Przedborski S. (2002)** Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease *J Neurosci* **22**(5), 1763-1771

**Wu D.C., Teismann P., Tieu K., Vila M., Jackson-Lewis V., Ischiropoulos H. and Przedborski S. (2003)** NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10), 6145-6150

**Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J. and Greenberg M.E. (1995)** Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis *Science* **270**(5240), 1326-1331

**Yamaguchi K., Shirakabe K., Shibuya H., Irie K., Oishi I., Ueno N., Taniguchi T., Nishida E. and Matsumoto K. (1995)** Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction *Science* **270**(5244), 2008-2011

**Yang L., Matthews R.T., Schulz J.B., Klockgether T., Liao A.W., Martinou J.C., Penney J.B., Jr., Hyman B.T. and Beal M.F. (1998)** 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2 *J Neurosci* **18**(20), 8145-8152

**Zecca L., Zucca F.A., Albertini A., Rizzio E. and Fariello R.G. (2006)** A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease *Neurology* **67**(7 Suppl 2), S8-11

**Zhu A.X., Zhao Y., Moller D.E. and Flier J.S. (1994)** Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3 *Mol Cell Biol* **14**(12), 8202-8211

8. Anhang8.1. **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Überblick über die Signalkaskaden der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen. ...	3
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des p38 MAPK-Signalweges. ....	6
<b>Abbildung 3:</b> Struktur der beiden MK2-Proteine MK2A und MK2B. ....	8
<b>Abbildung 4:</b> Mechanismus des p38-vermittelten Exports von MK2 aus dem Zellkern. ....	9
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Mikrogliose und Neurodegeneration.. ....	20
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung der funktionelle Neuroanatomie der Basalganglien und deren Störung bei Morbus Parkinson. ....	23
<b>Abbildung 7:</b> Wirkmechanismus der MPTP-Neurotoxizität. ....	26
<b>Abbildung 8:</b> Glutamat-vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalwege in der postsynaptischen Nervenzelle. ....	31
<b>Abbildung 9:</b> Histologische Nissle-Färbung des Hippocampus. ....	32
<b>Abbildung 10:</b> Phänotyp einer WT, MK2 <sup>-/-</sup> und TTP <sup>-/-</sup> Maus. ....	34
<b>Abbildung 11:</b> Rotarod der Firma Ugo Basile. ....	41
<b>Abbildung 12:</b> Geöffnete trächtige Maus. ....	44
<b>Abbildung 13:</b> LPS-Behandlung von Neuron-Glia-Kulturen hat keinen Einfluss auf die Morphologie oder Zellzahl von Astrozyten. ....	114
<b>Abbildung 14:</b> NO-Produktion von Neuron-Glia-Mischkulturen und Neuronen-angereicherten Kulturen nach LPS-Behandlung. ....	115
<b>Abbildung 15:</b> Auswirkungen von TNF $\alpha$ und NO auf den neuronalen Zelltod. ....	116
<b>Abbildung 16:</b> TTP-defiziente Neuron-Glia-Kulturen weisen nach LPS-Stimulation eine erhöhte Produktion an NO auf. ....	117
<b>Abbildung 17:</b> Produktion an NO nach MPTP-Behandlung von Mittelhirnkulturen. ....	118
<b>Abbildung 18:</b> Schema zur Funktion von MK2 bei der Neurodegeneration. ....	124
<b>Abbildung 19:</b> Schematische Zusammenfassung zur Induktion der Aktivierung (blau) und der PKA-abhängigen Transkription (schwarz) von MK2 in Neuronen nach Depolarisation oder Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels. ....	129

## 8.2. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Auswahl an MK2-Substraten geordnet nach ihren Funktionen .....	12
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über die verwendeten <i>knockout</i> Mausstämmen und deren genetischer Hintergrund .....	35
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Primer bei der Genotypisierung mittels Real-Time PCR. ....	38
<b>Tabelle 4:</b> Real-Time PCR-Programme zur Genotypisierung .....	38
<b>Tabelle 5:</b> Charakteristika zur Beurteilung der Krampfschwere nach Racine (modifiziert)...	43
<b>Tabelle 6:</b> Zusammensetzung der Medien für die Cokulturen. ....	46
<b>Tabelle 7:</b> Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.....	47
<b>Tabelle 8:</b> Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele bei der SDS-Gelelektrophorese.....	54
<b>Tabelle 9:</b> Zusammensetzung des Anoden- und Kathodenpuffers beim Westernblot .....	55
<b>Tabelle 10:</b> Zusammensetzung des <i>Stripping</i> -Puffers.....	56
<b>Tabelle 11:</b> Zusammensetzung des Substratpuffers, des ATP-Mixes und des Reaktionspuffers für den MK2-Kinase-Assay. ....	57
<b>Tabelle 12:</b> Pippettierschema für das Ansetzen von 100µl RNA-Mastermix. ....	61

### 8.3. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Matthias Gaestel danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können, seiner steten Diskussionsbereitschaft und im Besonderen für die große Unterstützung bei dem Verfassen der Veröffentlichungen.

Bei Herrn Prof. Jürgen Alves möchte ich mich ganz herzlich für das erneut übernommene Korreferat bedanken.

Herrn Prof. Anaclet Ngezahayo danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes sowie seiner Bereitschaft als Drittprüfer zu fungieren.

Herrn Dr. Alexey Kotlyarov muss ich für die Auswahl dieses spannenden Themas, sowie für das Schreiben der Tieranträge danken.

Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka danke ich für ihre Unterstützung bei den Epilepsieversuchen. Vor allem möchte ich mich bei ihr aber für die vielen motivierenden Gespräche bedanken, ohne die ich sicherlich der Wissenschaft der Rücken gekehrt hätte.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Edward Hitti aussprechen, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Durch unsere vielen wissenschaftlichen Diskussionen und seiner tatkräftigen Hilfe beim Formulieren der Veröffentlichungen habe ich viel gelernt. Aber auch unsere nicht so wissenschaftlichen Gespräche waren Balsam im rauen Laboralltag.

Des Weiteren möchte ich auch Herrn Marco Timmer meinen besonderen Dank aussprechen. Durch seine aufopferungsvolle Unterstützung bei den MPTP-Versuchen sowie seine stets positive Art hat er mir die Arbeit und das Drumrum sehr erleichtert.

Allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gaestel, Sashi Kant, Anastassiiia Vertii, Kathrin Laass, Stefanie Schumacher, Jessica Schwermann, Carsten Frank, Corinna Meier, Tatiana Yakovleva, Dorothea Krone und Kasia Schewe möchte ich für die zahlreichen Diskussionen, die angenehme Atmosphäre und emotionale Stütze danken.

Auch bei den weiteren Mitarbeitern der Physiologischen Chemie möchte ich mich ebenfalls für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die Arbeitsgruppen-übergreifenden Hilfe danken.

Meiner Lebenspartnerin Alexandra Sticklies danke ich mehr als Worte sagen können. Die Zeit mit ihr, wird durch sie erst einzigartig.

### 8.4. Publikationsliste

#### Wissenschaftliche Originalarbeiten

**Thomas T.**, Hitti E., Kotlyarov A., Potschka H., and Gaestel M. (2008)  
MAPKAP kinase 2 expression and activity is induced after neuronal depolarization.  
*Eur J Neurosci* 28:642-654

**Thomas T.**, Timmer M., Cesnulevicius K., Hitti E., Kotlyarov A., and Gaestel M. (2008)  
MAPKAP kinase 2-deficiency prevents neurons from cell death by reducing neuroinflammation – relevance in a mouse model of Parkinson´s disease.  
*J Neurochem* 105(5):2039-52.

Cesnulevicius K., Timmer M., Wesemann M., **Thomas T.**, Barkhausen T., and Grothe C. (2006)  
Nucleofection is the most efficient nonviral transfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephali with no changes in cell composition or dopaminergic fate.  
*Stem Cells* 24:2776-2791

#### Posterpräsentationen

“Detektion der Interferon-gamma und Interferon-beta Expression in peripheren Leukozyten als möglicher Marker für das Ansprechen auf eine Interferon-Basistherapie”  
Dornes C., **Thomas T.**, Retzlaff K., Kaps M., Oschmann P.. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 10.-13. September 2008, Hamburg, Deutschland.

“Interferon-beta therapy reduces tumor necrosis factor signalling of B-cells via the proinflammatory tumor necrosis factor-receptor 2”  
Theis A., **Thomas T.**, Retzlaff K., Kaps M., Blaes F., Oschmann P.. European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. 11.-14. Oktober 2007, Prag, Tschechische Republik veröffentlicht in *Multiple Sclerosis* Vol. 13, Supp2

„IFN-gamma induces transient MHC I expression in neuroblastoma cells – influence of suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1“  
Kneifel N., **Thomas T.**, Kirsten A., Kaps M., Roth J., and Blaes F.. European Cancer Conference Organisation, 23.-27. September 2007, Barcelona, Spanien.

„Einfluss einer Interferon-beta Therapie auf die endogene IFN-beta Synthese bei MS-Patienten“  
Retzlaff K., Ruess M., **Thomas T.**, Kaps M., Blaes F..Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 12.-15. September 2007, Berlin, Deutschland.

#### Patente

“Stabilisiertes Interferon-Gamma”. (2004)  
Erfinder: **Thomas T.**, Battermann F., Kresin M., Schmalz C., Busche A., Zakaria H., Otto B.  
Firma: Fraunhofer Gesellschaft, Hannover  
Internationale Patentanmeldung Amtsaktenzeichen PCT/EP2004/004677



### 8.5. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

---

(Unterschrift)

Name: T. Thomas

### 8.6. Lebenslauf

Name: Tobias Thomas  
Geburtsdatum: 01.04.1975  
Geburtsort: Bremen  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

#### **Beruflicher Werdegang**

seit 2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Universitätsklinikum Gießen  
Neurologische Klinik  
Arbeitsgruppe Neuroimmunologie und Multiple Sklerose

Seit 2004 Promotionsthema: „Die Rolle der MAPKAP Kinase 2 bei der Neurodegeneration und neuronalen Depolarisation“

2002 – 2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Medizinische Hochschule Hannover  
Zentrum Biochemie  
Institut für Physiologische Chemie

#### **Ausbildung**

1996 – 2002 Studium der Biochemie  
Universität Hannover  
Abschluss: Diplom  
Thema Diplomarbeit „PEGylierung des rekombinanten humanen Interferon- $\gamma$  (rhu-IFN- $\gamma$ )“

#### **Zivildienst**

1994 – 1996 Pflegehelfer  
Kreiskrankenhaus Osterholz-Scharmbeck  
Abteilung Innere Station

#### **Schulbildung**

1987 – 1994 Gymnasium Osterholz-Scharmbeck  
Abschluss: Abitur

1985 – 1987 Gymnasium Naila

1981 – 1985 Grundschule Bad Meinberg, Grundschule Bad Steben