

Aus der Klinik für Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr) im Zentrum Neurologische Medizin
der Fakultät der Universität Göttingen

**Die Rolle von HGF für Neuroprotektion und axonale Regeneration
im Nervus opticus der Ratte**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Thomas Ostendorf
aus
Damme
Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Lingor
II. Berichterstatter/in:
III. Berichterstatter/in:
Tag der mündlichen Prüfung:

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 NEUROTRAUMA.....	1
1.2 APOPTOSE.....	2
1.2.1 EXTRINSISCHE UND INTRINSISCHE APOPTOSEINDUKTION	4
1.2.3 LÄSIONSINDUZIERTER ZELLTOD.....	5
1.2.4 NEUROPROTEKTIVE THERAPIEN	6
1.3 AXONALE REGENERATION IM ZNS	8
1.3.1 MECHANISMEN DER AXONALEN REGENERATION IM ZNS	8
1.3.2 AKTUELLE THERAPEUTISCHE ANSÄTZE FÜR REGENERATION IM ZNS	11
1.4 BEDEUTUNG VON NEUROTROPHEN FAKTOREN FÜR DIE AXONALE REGENERATION	12
1.5 HEPATOCYTE GROWTH FACTOR (HGF).....	14
1.6 DER HGF-REZEPTOR C-MET.....	18
1.7 HGF/C-MET IN DER RETINA.....	20
1.8 ZIELE DER VERSUCHE	20
2. MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 MATERIALIEN.....	22
2.1.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	22
2.1.2 SOFTWARE	23
2.2 IN VITRO EXPERIMENTE.....	23
2.2.1 PRIMÄRE RETINALE GANGLIENZELLKULTUR (PRGC-KULTUR)	23
2.2.2 PRGC-ÜBERLEBEN NACH NEUROTROPHINDEPRIVATION UND BEHANDLUNG MIT HGF	24
2.2.3 PRGC-AUSWACHSTUM NACH HGF-BEHANDLUNG	25
2.2.4 RGC5-ZELLKULTUR	25
2.2.5 RGC-5-ÜBERLEBEN NACH SERUMDEPRIVATION	26
2.2.6 WESTERN BLOT	27
2.3 IN VIVO-EXPERIMENTE	28
2.3.1 INTRAPERITONEALE NARKOSE.....	28
2.3.2 INTRAVITREALE INJEKTIONEN	29
2.3.3 AXOTOMIE DES OPTISCHEN NERVS.....	29
2.3.4 CRUSH-LÄSION DES OPTISCHEN NERVS.....	31
2.3.5 TRANSKARDIALE PERFUSION.....	31
2.3.6 IMMUNHISTOLOGIE.....	33
3. ERGEBNISSE.....	34
3.1 NEUROPROTEKTION UND NEURITENWACHSTUM PRIMÄRER RETINALER GANGLIENZELLEN NACH HGF-BEHANDLUNG IN VITRO.....	34
3.1.1 PRGC-ÜBERLEBEN NACH NEUROTROPHINDEPRIVATION IN ABHÄNGIGKEIT VON HGF-BEHANDLUNG	34
3.1.2 RGC-5-ÜBERLEBEN NACH SERUMDEPRIVATION IN ABHÄNGIGKEIT VON HGF-BEHANDLUNG	36
3.1.3 NEURITENAUSWACHSTUM VON PRGC NACH HGF-BEHANDLUNG.....	37
3.1.4 ANALYSE NEUROPROTEKTIVER SIGNALKASKADEN	38
3.2 DIE ROLLE VON HGF BEI NEUROPROTEKTION UND AXONALER REGENERATION RETINALER GANGLIENZELLEN IN VIVO.....	41
3.2.2 AXONALE REGENERATION 28 TAGE NACH CRUSH.....	44
4. DISKUSSION.....	47

4.1 EINE HGF-BEHANDLUNG FÜHRT ZU EINEM GESTEIGERTEN ÜBERLEBEN VON RGC-5-ZELLEN NACH SERUMDEPRIVATION UND VON PRIMÄREN RETINALER GANGLIENZELLEN NACH NEUROTROPHINENTZUG <i>IN VITRO</i>.....	48
4.2 DAS ÜBERLEBEN RETINALER GANGLIENZELLEN <i>IN VIVO</i> NACH AXOTOMIE WIRD DURCH EINE HGF-BEHANDLUNG SIGNIFIKANT GESTEIGERT.....	51
4.3 DAS AUSWACHSEN PRIMÄRER RETINALER GANGLIENZELLENAXONE <i>IN VITRO</i> VERBESSERT SICH NACH EINER HGF-BEHANDLUNG.....	53
4.4 EINE HGF-BEHANDLUNG FÜHRT ZU EINER GESTEIGERTEN REGENERATION RETINALER GANGLIENZELLENAXONE <i>IN VIVO</i> NACH CRUSH.....	55
4.5 AKTIVIERUNG NEUROPROTEKTIVER SIGNALKASKADEN.....	57
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG UND ABSCHLIEßENDE BEMERKUNGEN.....</u>	<u>59</u>
<u>6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>61</u>
<u>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>64</u>
<u>PUBLIKATION.....</u>	<u>65</u>
<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>66</u>

1. Einleitung

1.1 Neurotrauma

Jährlich überleben etwa 130.000 Menschen eine Rückenmarksverletzung, so dass weltweit ca. 2,5 Millionen Patienten mit den Folgen einer Rückenmarksverletzung konfrontiert sind. Bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 33,4 Jahren und einer annähernd normalen Lebenserwartung sind die Patienten häufig für viele Jahrzehnte betroffen. Durch die aktuelle demographische Entwicklung findet sich darunter aber auch ein zunehmender Anteil an älteren Menschen mit Demenzen und Bewegungsstörungen, die aufgrund von Stürzen eine Rückenmarksverletzung erleiden (Adams und Cavanagh 2004; van den Berg et al. 2010). Die meist inkomplette Durchtrennung beziehungsweise Quetschung des Rückenmarks kann in motorischen, sensorischen und autonomen Funktionseinschränkungen resultieren (Furlan et al. 2011). Aktuell sind nur wenige spezifische Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der Querschnittssyndrome bekannt. Aufgrund der möglichen ausgeprägten kardiovaskulären, pulmonalen und gastrointestinalen Komplikationen ist meist eine initiale intensivmedizinische Überwachung indiziert. Im Falle einer Kompression des Rückenmarks ist eine frühzeitige chirurgische Dekompression anzustreben. Bei vorliegender Instabilität der Wirbelsäule kann eine weitere operative Versorgung notwendig sein oder eine konservative Lagerungsbehandlung erfolgen (Wilson et al. 2012). Eine Behandlung mit Methylprednisolon kann innerhalb der ersten 8 Stunden nach dem Trauma versucht werden (Bracken et al. 1997). Jedoch ist diese Behandlung nur geringgradig evidenzbasiert und wird bezüglich Effektivität und aufgrund möglicher Komplikationen wie beispielsweise einer erhöhten Thromboserate angezweifelt (Hurlbert 2000; Short et al. 2000). Neben diesen Therapien und der Vermeidung von Komplikationen spielen vor allem rehabilitative Maßnahmen wie kombinierte physio- und ergotherapeutische, passive und aktive Übungsbehandlungen eine Rolle in der Behandlung von Rückenmarksverletzungen (Übersicht in Dietz 2002). Die Prognose der Rückenmarksverletzungen hängt im Wesentlichen vom Ausmaß der Schädigung ab. Sind große Bereiche des Rückenmarks geschädigt, zeigen sich häufig irreversible Funktionsverluste, die durch einen kompletten beziehungsweise inkompletten Verlust der Motorik und der Sensibilität gekennzeichnet sind (Schuller-Weidekamm 2008). Die ausgeprägten bleibenden Funktionseinschränkungen mit den damit verbundenen Kosten für die medizinische und soziale Versorgung erfor-

dern ein besseres Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen, die sich nach einer Schädigung des zentralen Nervensystems abspielen, um effektive Therapiestrategien entwickeln zu können.

In der gegenwärtigen Forschung zur Therapie neurotraumatischer und neurodegenerativer Erkrankungen werden vor allem zwei unterschiedliche Ziele verfolgt. Auf der einen Seite wird versucht, den Zelltod zu verhindern, auf der anderen Seite soll die Regeneration der Nervenzellen und ihrer Fortsätze gefördert beziehungsweise die Degeneration verlangsamt werden. Diese Teilprozesse sind jedoch nicht vollständig voneinander zu trennen. Die Hemmung des Zelltodes allein ist ungenügend für die Wiederherstellung von funktionsfähigen Nervenzellen. Die angestrebte Regeneration ist ihrerseits stark von der Existenz überlebender Zellen abhängig. Das Scheitern der Regeneration kann unter anderem der schädigungsassoziierten Apoptose, der verminderten intrinsischen Wachstumskapazität adulter Neurone und der wachstumshemmenden Umgebung im adulten zentralen Nervensystem zugeschrieben werden (Huebner und Strittmatter 2009). Es ist daher wichtig, diese Teilaspekte bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien zu berücksichtigen, um die neuronale Funktionsfähigkeit wieder herzustellen.

1.2 Apoptose

Apoptose bezeichnet einen Prozess des programmierten Zelltodes, der verschiedene biochemische Vorgänge beinhaltet und zu charakteristischen zellmorphologischen Veränderungen und schließlich zum Untergang der Zelle führt. Zu den morphologischen Veränderungen zählen unter anderen die Vesikelbildung, der Verlust des Zellzusammenhalts, das Schrumpfen der Zelle, die Zellkernfragmentation, die Chromatinkondensation und –fragmentation (Kerr et al. 1972).

Der Vorgang der Apoptose wurde erstmalig von Kerr et al. 1972 beschrieben und ist ein genetisch stark konservierter Mechanismus, den alle Vielzeller besitzen. Er ist für die normale Gewebeentwicklung und –homöostase von essentieller Bedeutung. Im Gegensatz zur Nekrose, einem bedeutenden Mechanismus des Zelltodes, läuft die Apoptosekaskade streng kontrolliert ab. Die Prozesse sind vom Vorliegen von ATP und damit vom Energiehaushalt der Zellen abhängig. Zellen im gleichen Gewebeverbund, die nicht dem Stimulus unterliegen, werden nicht geschädigt (Danial und Korsmeyer 2004; Smali et al. 2009).

Der äußerst komplexe Vorgang der Apoptose kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden. Der extrinsische Weg wird über sogenannte Todes-Rezeptoren (*death receptors*) auf der Zelloberfläche ausgelöst, die beispielsweise durch die Ligandenbindung von TNF- α oder dem Fas-Liganden aktiviert werden (Guicciardi und Gores 2009).

Der intrinsische Weg hingegen steht in einem engen Zusammenhang mit den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum (Danial und Korsmeyer 2004; Foo et al. 2005). So kann beispielsweise durch den Tumorsuppressor p53, der durch eine Schädigung der DNA aktiviert wird, die Apoptoseinduktion erfolgen. p53 bewirkt über eine Expressionssteigerung von Mitgliedern der proapoptotischen Bcl-2-Familie, dass aus dem Inneren der Mitochondrien das Cytochrom C freigesetzt wird (Shimizu und Tsujimoto 2000). Das Cytochrom C bildet zusammen mit Apaf-1, dATP und der Pro-Caspase 9 das Apoptosom, wodurch die Caspase 9 aktiviert wird (Zou et al. 1999).

Der intrinsische und extrinsische Weg können konvergieren und führen beide letztendlich zu einer Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7. Caspasen (*cysteiny/aspartate specific protease*) sind Proteasen, die in ihrem aktivem Zentrum Cystein enthalten und Peptidbindungen am C-terminalen Ende von Aspartat spalten können (Wyllie 2010). Zunächst wird dabei der Zelltod durch die Initiator-Caspasen, wie z.B. Caspase 8 oder 9, eingeleitet. Diese spalten die Vorläuferstufen der Effektor-Caspasen, was zu deren Aktivierung führt. Die Effektor-Caspasen spalten dann zell-eigene Proteine wie Aktin und Lamin und aktivieren durch Spaltung Nukleasen, die wiederum für den Abbau der DNA verantwortlich sind.

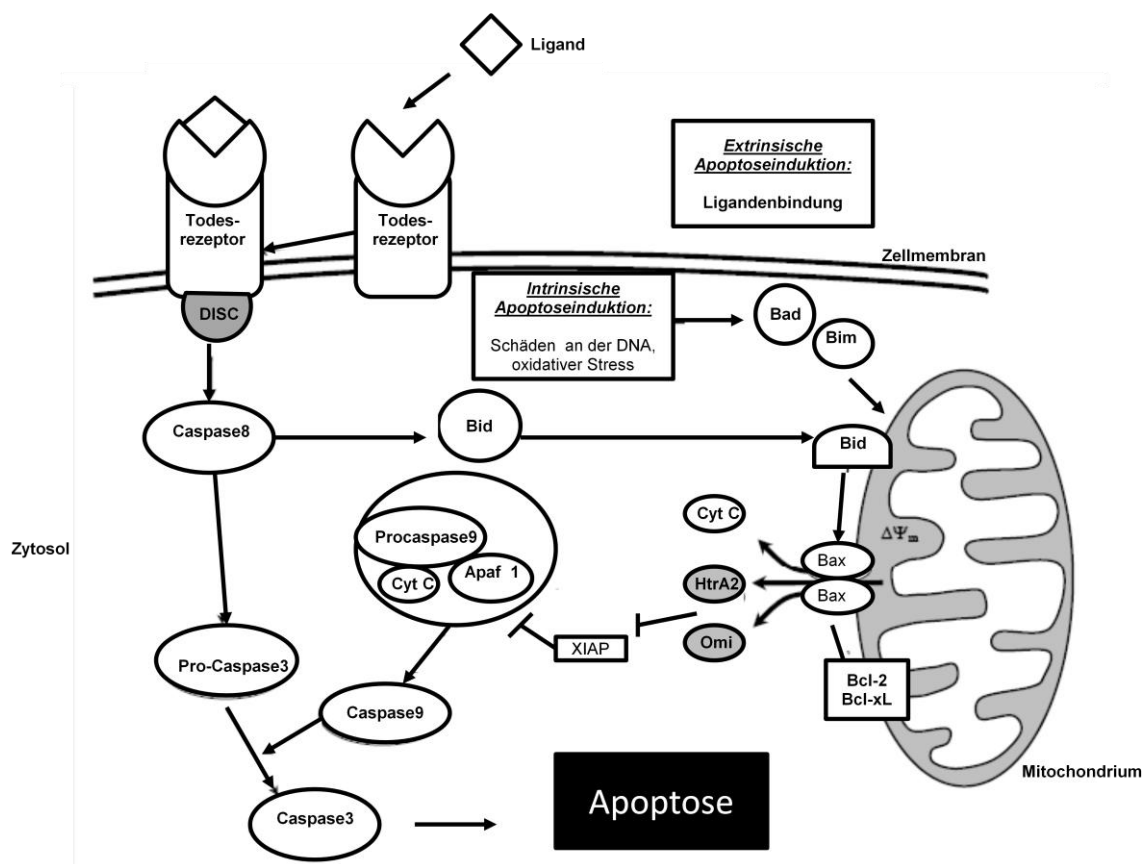


Abbildung 1: Schema der Apoptoseinduktion

Nach der Bindung des Liganden an den Todesrezeptor kommt es zu einer Caspase 8-Aktivierung. Die Caspase 8 kann daraufhin die Procaspase 3 zur Caspase 3 aktivieren. Indirekt über die Spaltung von Bid, welches darauf ins Mitochondrium transloziert, kann die Caspase 8 zu einer Oligomerisierung von Bak/Bax führen. Dadurch bilden sich Poren in der Mitochondrienmembran, durch die z.B. Cytochrom-c ins Zytosol gelangt und mit der Caspase 9, Apaf-1 und dATP das Apoptosom bilden. Spitzer Pfeil = Aktivierung; Balkenpfeil = Hemmung; runde Form = pro-apoptotisches Protein; eckige Form = anti-apoptotisches Protein; $\Delta\Psi_m$ = Mitochondrienmembranpotential. (adaptiert nach (Bahr und Lingor 2006))

1.2.1 Extrinsische und intrinsische Apoptoseinduktion

Im Wesentlichen werden zwei unterschiedliche Mechanismen der Apoptoseinduktion unterschieden. Beim extrinsischen Weg der Apoptoseinduktion führt die Ligandenbindung von beispielsweise TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) oder dem Fas-Liganden an den Todesrezeptor (*death receptor*) zu einer Interaktion zwischen dem Rezeptor und dem Adaptorprotein FADD (*Fas-associated death domain protein*) (Baker und Reddy 1998; Wajant 2002). Die Interaktion ermöglicht die Bildung des *death-inducing signalling complex* (Disc), welcher nach Dimerisierung die Procaspase 8 zu Caspase 8 aktiviert. Die Caspase 8 aktiviert anschließend die

Caspase 3, die dann für die Spaltung von diversen zytoplasmatischen Proteinen und der kernständigen DNA verantwortlich ist (Vermeulen et al. 2005).

Der intrinsische Weg der Apoptoseinduktion wird durch zellinterne Faktoren wie oxidativen Stress oder durch Schäden an der DNA vermittelt. Diese Faktoren aktivieren pro-apoptotische BH 3-only-Proteine der Bcl 2-Familie wie zum Beispiel Bid, Bad und Bim (Gross et al. 1999; Li et al. 1998; Luo et al. 1998). Nach Spaltung von Bid und der damit verbundenen Aktivierung zu t-Bid wird dieses ins Mitochondrium transloziert und aktiviert dort Bax und Bak, was zur Porenbildung und Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen ins Zytoplasma führt. Zu diesen freigesetzten Proteinen zählen unter anderen das Cytochrom C, Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 (Antonsson et al. 2000). Diese Veränderungen führen dann zu einem Verlust des Mitochondrienmembranpotenzials, Mitochondrienschwellung und der Freisetzung von Cytochrom C (Antonsson et al. 2000). Die Freisetzung von Cytochrom C führt wiederum zur Bildung des Apoptosoms, eines Komplexes aus Apaf-1, Cytochrom C, dATP und Caspase 9 (Zou et al. 1999). Der Komplex führt durch proteolytische Spaltung der Procaspase 9 zur Aktivierung von Caspase 9 und führt zu einer Verstärkung des Todessignals durch direkte Aktivierung von Caspase 3 (Hakem et al. 1998). Die letzten Schritte der Apoptose werden eingeleitet, wenn kritische Konzentrationen der Caspase 3 erreicht sind.

Durch die aktivierten Caspasen kommt es zu einem Schrumpfen der Zelle, Membraneinstülpungen und zur Freisetzung von Phosphatidylserinen. Zu den weiteren Charakteristika zählen die Vesikelbildung, die Kernfragmentation, die Chromatinkondensation und der DNA-Abbau (Kerr et al. 1972). Die Zellintegrität ist am Ende der Apoptose aufgehoben und die verbleibenden Zellreste werden von Phagozyten aufgenommen. Eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe findet nicht statt (Krammer 1999).

1.2.3 Läsionsinduzierter Zelltod

Die Axotomie des optischen Nervs bezeichnet die Durchtrennung des N. opticus unter Schonung der die Retina versorgenden Blutgefäße und stellt ein etabliertes Modell dar, um Apoptosevorgänge im ZNS zu untersuchen (Berkelaar et al. 1994; Isenmann und Bahr 1997; Isenmann et al. 1997; Lingor et al. 2008; Planchamp et al.

2008; Villegas-Perez et al. 1993). Binnen zwei Wochen führt das Durchtrennen der Axone zu einem selektiven neuronalen Absterben von ungefähr 90% der retinalen Ganglienzellen (Villegas-Perez et al. 1988). Das Maximum der Degenerationskinetik wird nach etwa 5 bis 7 Tagen erreicht (Isenmann et al. 1997). Es findet sich ein Schrumpfen der Zellen, eine DNA-Fragmentation, ein Abbau von Zellorganellen, aber keine wesentliche Entzündungsreaktion. Damit finden sich viele gemeinsame Eigenschaften mit der Apoptose (Bahr 2000). Es werden darüber hinaus viele der Kaskaden aktiviert, die auch beim programmierten Zelltod während der Entwicklung eine Rolle spielen (Potts et al. 1982). Die Durchtrennung des optischen Nerven führt in adulten retinalen Ganglienzellen beispielsweise zu einem Verlust von Bcl-2 und Bcl-X_L und einer gesteigerten Expression von Bax (Antonsson et al. 2001). Es zeigt sich ebenso eine Aktivierung der Apoptose auslösenden Caspasen 3 und 9 (Kermer et al. 2000; Kermer et al. 1999). Diese wird begleitet von einem Anstieg von c-Jun, einem Transkriptionsfaktor. Eine Verminderung von c-Jun kann das Ausmaß des apoptotischen Zelltods reduzieren (Lingor et al. 2005).

Es liegen zudem Hinweise vor, dass die Konzentration an intrazellulärem Kalzium mit dem Zelltod korreliert (Smaili et al. 2009). Die Speicherung des Kalzium innerhalb der Zelle findet vor allem in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum statt (Rizzuto und Pozzan 2006). An der Regulation des Kalziumhaushalts der Zelle sind unter anderem die Proteine der Bcl-2-Familie beteiligt, die die Freisetzung von Kalzium beeinflussen können (Rong und Distelhorst 2008). Der Ca²⁺-Einstrom, dem man eine Rolle in der Apoptose durch die Modifikation von Proteinphosphorylierung und durch die Veränderung von Signalkaskaden zuspricht, findet sich sowohl post-traumatisch als auch nach Ischämien sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen (Choi 1988; Ermak und Davies 2002). Auch die Degenerationsvorgänge im optischen Nerv zeigen eine Anhängigkeit von der Kalziumkonzentration (Knöferle et al., 2010). Die Axotomie des optischen Nerven bietet aufgrund der vielen gemeinsamen Charakteristika die Möglichkeit, Apoptosevorgänge im ZNS zu untersuchen.

1.2.4 Neuroprotektive Therapien

Synthetische Proteine können aktivierte Caspasen in ihrer Enzymaktivität hemmen. Diese Caspase-Inhibitoren können intravitreal appliziert werden und im traumati-

schen Nervenverletzungsmodell die retinalen Ganglienzellen vor dem Zelltod bewahren (Chaudhary et al. 1999). Jedoch können sie den Zelltod nur einige Zeit hinauszögern, weil zu späteren Zeitpunkten andere Wege zum Tod der retinalen Ganglienzellen führen (Kermer et al. 1999). Weitere Proteine wie XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) aus der IAP-Familie (*Inhibitor of apoptosis*) vermögen ebenfalls den Zelltod hinauszuzögern (Kugler et al. 2001). Durch RNA-Interferenz können spezifisch proapoptotische Proteine wie c-Jun, Apaf-1 und Bax herunterreguliert werden. Dadurch zeigen sich signifikant mehr überlebende retinale Ganglienzellen nach Axotomie des optischen Nervs (Lingor et al. 2005). Diese Therapiestrategien greifen jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt der Apoptosekaskade an, indem sie die ausführenden Schritte inhibieren. Obwohl so ein vermehrtes Überleben der Zellkörper temporär erreicht werden kann, ist ein Wiederauswachsen der Nervenfortsätze und damit eine funktionelle Wiederherstellung der Nervenverbindungen nicht möglich. Als Therapieansätze sind diese Inhibitoren daher ungeeignet.

Das Überleben von ZNS-Neuronen wird außerdem von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren beeinflusst und hängt von ihrer neurotrophen Unterstützung ab (Oppenheim 1996). Hier bieten sich Möglichkeiten für einen therapeutischen Einsatz. Die Wachstumsfaktoren sind Polypeptide und lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen. Man unterscheidet die Neurotrophine, die Neurokine und die TGF- β -Familie. Zu den Neurotrophinen zählen bei Säugetieren der *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *Neurotrophin-3* (NT-3), *Neurotrophin-4* (NT-4) und *Neurotrophin-5* (NT-5) (Lewin und Barde 1996). Die Gruppe der Neurokine beinhaltet *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und *leukaemia inhibitory factor* (LIF). Neben TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 zählt auch *glia cell derived neurotrophic factor* (GDNF) zur TGF- β -Familie (Johnson et al. 2008).

Nach Applikation von BDNF, CNTF oder GDNF in den Glaskörper zeigt sich eine Überlebenssteigerung der retinalen Ganglienzellen nach Axotomie des optischen Nervs um das Doppelte bis Dreifache (Koeberle und Ball 1998; Mey und Thanos 1993). Auch durch Adenovirus-vermittelte Verabreichung von CNTF und GDNF steigert sich die Überlebensrate der retinalen Ganglienzellen nachweislich (Schmeer et al. 2002). Diese Ergebnisse weisen auf die enorme Bedeutung der neurotrophen Faktoren für das neuronale Überleben hin.

Neben den Neurotrophinen, Neurokinen und der TGF- β -Familie existieren weitere Faktoren, die das Überleben von Neuronen fördern. *Hepatocyte growth factor* (HGF) ist ein multifunktionales Zytokin, das in die Plasminogen-Prothrombin-Familie einzuordnen ist. In dieser Familie werden zwei Unterfamilien unterschieden. HGF, *macrophage-stimulating protein* (MSP), Plasminogen und Apolipoprotein A bilden dabei eine Unterfamilie. In der anderen Unterfamilie finden sich Prothrombin, HGF-Aktivator und die Plasminogen-Aktivatoren.

Neuroprotektive Eigenschaften von HGF sind bereits für Hippocampusneurone, dopaminerge Neurone des Mesenzephalons, Motoneurone, sensorische und sympathische Neurone beschrieben (Ishigaki et al. 2007; Ishihara et al. 2005; Koike et al. 2006; Maina et al. 1998). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass HGF auch im retinofugalen System positive Effekte ausüben kann.

1.3 Axonale Regeneration im ZNS

1.3.1 Mechanismen der axonalen Regeneration im ZNS

Nach einem mechanischen Trauma oder einer metabolischen Schädigung besitzen adulte Neurone im ZNS nur eine geringe Fähigkeit zur Regeneration, die für die funktionelle Wiederherstellung nicht ausreicht. Als Grund dafür werden verschiedene Ursachen angenommen, die nachfolgend am Beispiel einer mechanischen Nervenverletzung aufgezeigt werden sollen.

Bereits durch das mechanische Trauma kommt es zu einer Durchtrennung axonaler Verbindungen, sodass die Funktion des ZNS zerstört ist. Nach dieser primären Schädigung folgt eine komplexe Kaskade, die man als sekundäre Schädigung zusammenfasst. Die sekundäre Schädigung beinhaltet vaskulär bedingte Veränderungen wie Ödembildung, Ischämie und Hypoxie. Zelluläre Mechanismen wie die Invasion von Immunzellen und die Aktivierung von Gliazellen führen zu einer Schädigung des Neurons und seines Axons. Zytotoxische Vorgänge wie die Bildung freier Radikale und Stickstoffmonoxid und die Freisetzung von Proteasen führen dann zum Zelltod. Die sekundäre Schädigung hält mehrere Tage an und breitet sich in beide Richtungen von der initialen Läsionsstelle aus und trägt somit zu einem progredienten Sterben der Neurone bei (Übersicht in Hausmann 2003).

Für die Wiederherstellung der Funktion des ZNS ist das Überleben von Neuronen eine Grundvoraussetzung. Ein Überleben der Zellen allein führt jedoch nicht zu einer funktionellen Wiederherstellung des Gewebes. Die verbliebenen Neurone müssen zusätzlich neue axonale Verbindungen bilden.

Ein Wiederauswachsen der Nervenzellen ist jedoch durch die geringe intrinsische Regenerationskapazität der adulten ZNS-Neurone erschwert. Adulte Nervenzellen zeigen im Vergleich zu embryonalen Neuronen ein deutlich abgeschwächtes Wachstumspotential und reagieren weniger stark auf neurotrophe Stimulierung (Zhou und Snider 2006). In den adulten Neurone muss eine Aktivierung bestimmter Transkriptionsmuster erfolgen, damit sie die Fähigkeit zur Regeneration besitzen (Bradke et al. 2012).

So ist unter anderem ein Anstieg des intrazellulären Botenstoffs zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wichtig für die Regeneration von Nervenzellen. Auch Neurotrophine können einen Anstieg des cAMP-Spiegels vermitteln. Durch den cAMP-Anstieg wird die Proteinkinase A aktiviert, welche durch die Rho GTPase direkte Effekte auf das Zytoskelett des Wachstumskegels ausübt. Zusätzlich führen die erhöhten cAMP-Spiegel zu einem regenerationsfördernden Genexpressionmuster. So wird neben einer Vielzahl anderer Gene auch die Arginase I induziert. Eine Überexpression dieses Schlüsselenzyms der Polyaminsynthese vermochte eine Myelinvermittelte Wachstumshemmung durch das *myelin-associated glycoprotein* (MAG) *in vitro* und *in vivo* zu überwinden (Cai et al. 2002). Die Effekte eines erhöhten cAMP-Spiegels werden dabei entscheidend durch das *cAMP response element-binding protein* (CREB) vermittelt. Dieser gut untersuchte Transkriptionsfaktor bewirkt neben der Förderung des neuronalen Überlebens auch eine gesteigerte Regeneration (Watson et al. 2001). CREB wird offensichtlich stromabwärts in der Signalkaskade von cAMP für die Arginase I-Hochregulierung benötigt. Eine Blockade der Polyaminsynthese führte entsprechend zu einer Abschwächung des CREB-vermittelten Effekts. CREB ist in diesem Sinne ein Schlüsselfaktor der cAMP-vermittelten Aufhebung der Myelin-vermittelten Wachstumshemmung. Durch Neurotrophine stimuliert verändert CREB das neuronale Transkriptionsmuster. So wird die Regeneration von Nervenzellen durch cAMP und CREB sowohl direkt als auch indirekt über ein verbessertes Überleben der Neurone gefördert.

Die Regeneration von Nervenzellen wird darüber hinaus durch Moleküle beeinflusst, die das Aktinzytoskelett des Wachstumskegels beeinflussen. Das bekannteste dieser Moleküle, *growth associated protein 43* (GAP43), wird während des axonalen Wachstums und der Synapsenbildung in hohen Konzentrationen exprimiert und akkumuliert dabei an präsynaptischen Nervenendigungen. Eine artifizielle Herunterregulierung von GAP 43 führte zu einer verminderten Verzweigung von Axonen. Die Expression persistiert auch im adulten Nervensystem, insbesondere in Regionen hoher Plastizität (Übersicht in (Aigner et al. 1995). GAP43 moduliert über den PIP2-Signalweg (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) die Aktinfilamentdynamik. GAP43 wird dabei durch die Proteinkinase C aktiviert und wird in hohen Konzentrationen im Wachstumskegel von regenerierenden Axonen, aber auch während der neuronalen Entwicklung exprimiert. Entsprechend führten Inhibitoren der Proteinkinase C in Schneckenneuronen zu einer komplett fehlenden Ausbildung des Wachstumskegels (Übersicht in Teng und Tang 2006).

Neben der geringen intrinsischen Wachstumskapazität wird die Regeneration von Nervenzellen im ZNS durch eine wachstumsfeindliche Mikroumgebung bestimmt. Die Bedeutung der Umgebungsfaktoren wird deutlich, wenn man ZNS-Axone in ein Transplantat eines peripheren Nervs einwachsen lässt. Unter diesen Bedingungen können die Axone für mehrere Zentimeter regenerieren (David und Aguayo 1981), während sie im verletzten Gewebe des zentralen Nervensystems kaum über die Läsionsstelle hinauswachsen (Tom et al. 2004). Nach einer Verletzung können verschiedene Bestandteile des Gliagewebes, insbesondere myelinhaltige Strukturen der Oligodendrozyten, zerstört werden. Durch wachstumshemmende Proteine, wie beispielsweise Nogo, MAG, *oligodendrocyte myelin glycoprotein* (OMgp), die sich auf der Zelloberfläche der Oligodendrozyten befinden, wird die Regeneration der Axone erschwert (Filbin 2003; Sandvig et al. 2004). Die Glianarbe selbst stellt durch die Rekrutierung von Mikroglia, Oligodendrozytenvorläuferzellen und Astrozyten ein Hindernis dar, das die regenerierenden Neuriten überwinden müssen (Silver und Miller 2004). Zwar besitzt die Glianarbe auch positive Effekte, indem sie die lokale Immunreaktion eindämmt und für Reperationsprozesse erforderlich ist (Rolls et al. 2009), aber sie beinhaltet auch extrazellulär Matrixbestandteile wie CSPGs (Chondroitinsulfatproteoglykane), die das Wiederauswachsen von Neuriten ebenfalls einschränken (Bradbury und Carter 2011)

Im zentralen Nervensystem führen Nogo-A, MAG und OMgp durch eine Interaktion mit einem trimerischen Rezeptor-Komplex, der aus dem Nogo-Rezeptor-1, LINGO-1 und TROY bzw. p75^{NTR} besteht, zu einer Hemmung des axonalen Wachstums und zum Kollaps des für die Regeneration essentiellen Wachstumskegels (Fournier et al. 2001; Mi et al. 2004). Der Wachstumskegel ist eine vor allem Aktin und Mikrotubuli enthaltende dynamische Struktur, die durch diverse an der Oberfläche sitzende Rezeptoren das Wachstum eines Neuriten steuert (Dent und Gertler 2003). Durch ihre Bindung an den NgR/p75-Rezeptor und dessen Corezeptoren vermitteln die Myelinproteine eine Wachstumshemmung (Fournier et al. 2001; GrandPre et al. 2002; GrandPre et al. 2000). An diesem Signalweg ist neben Kalzium auch die Rho-GTPase RhoA und die nachgeschaltete Rho-assoziierte coiled-coil kinase (ROCK) beteiligt (Filbin 2003; Niederost et al. 2002; Wong et al. 2002; Yiu und He 2006). Die Aktivierung dieser Kaskade resultiert in einer Inaktivierung von Cofilin durch eine Phosphorylierung durch die LIM Kinase (Hsieh et al. 2006; Yang et al. 1998). Cofilin ist ein wichtiger Regulator der Aktinfilamentdynamik. Durch die Cofilin-Phosphorylierung kommt es zu einer Aktinpolymerisation und zu einer Stabilisierung des Wachstumskegels (Ng und Luo 2004). Durch diese Stabilisierung ist das Wiederauswachsen der Axone erschwert (Jalink et al. 1994; Lehmann et al. 1999).

1.3.2 Aktuelle therapeutische Ansätze für Regeneration im ZNS

Im Vergleich zum peripheren Nervensystem ist die Expression oder die Hochregulierung von wachstumsassoziierten Proteinen im ZNS weniger effektiv und die Effekte halten nur vorübergehend an. Betrachtet man GAP43 nach einer Schädigung im PNS, so findet sich eine Hochregulation dieses mit dem neuronalen Wachstum im Zusammenhang stehenden Proteins, was auf eine verbesserte intrinsische Kapazität zur axonalen Regeneration deutet (Skene und Virag 1989). Im ZNS hingegen ist dieser Effekt transient (Fernandes et al. 1999). In transgenen Mäusen, in denen GAP43 unter einem Purkinjenzell-spezifischen Promoter überexprimiert wurde, zeigte sich nach einer stereotaktisch gesteuerten Purkinjenzell-Axotomie eine gesteigertes, axonales Auswachsen in die weiße Substanz (Gianola und Rossi 2004). Ebenso führt eine GAP43-Überexpression in der Substantia nigra durch einen viralen Vektor zu einer vermehrten Verzweigung der nigrostriatalen Projektionen (Klein et al. 1999). Allerdings zeigte sich in transgenen, GAP43-überexprimierenden Mäusen keine nen-

nenswerte Verbesserung der axonalen Regeneration von thalamischen Neuronen in das Transplantat eines peripheren Nervs. Somit scheint die fehlende Regeneration thalamokortikaler Projektionen nicht allein durch die insuffiziente GAP43-Expression bedingt zu sein (Mason et al. 2000). Eine Überexpression von GAP43 führt somit in Abhängigkeit vom zellulären Kontext zu einer Verbesserung der Regenerationskapazität (Denny 2006).

Die axonale Regenerationsfähigkeit ist darüber hinaus von den Umgebungsbedingungen abhängig (Schwab und Thoenen 1985). Bei MAG-knock-out-Mäusen und mutanten Mäusen, bei denen eine oder alle Isoformen von Nogo (Nogo-A, B, C) fehlten, zeigte sich allerdings kein nennenswertes Wiederauswachsen nach einer Rückenmarkverletzung (Bartsch et al. 1995; Kim et al. 2003; Zheng et al. 2003). Ebenso zeigen NgR-defiziente Mäuse keine oder nur wenig verbesserte axonale Regeneration. Obwohl die Axone von p75NTR-defizienten Mäusen *in vitro* weniger durch Myelin gehemmt werden, findet sich keine Verbesserung der Regeneration im kortikospinalen Trakt nach Hemisektion *in vivo* (Zheng et al. 2005). Eine alleinige Hemmung der Myelin-abgeleiteten Wachstumsinhibitoren scheint daher ebenfalls ungeeignet, die Regeneration zu verbessern. Möglicherweise begründen sich diese Ergebnisse in weiteren Proteinen wie beispielsweise Ephrinen und Semaphorinen, die ebenfalls eine Wachstumshemmung bewirken können (Bolsover et al. 2008).

Anhand von PC-12-Zellen, Spinalganglienzellen aus Ratten und c-Jun^{-/-} transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass auch der Transkriptionsfaktor c-Jun für das Überleben und die Regeneration erforderlich ist. So zeigen c-Jun überexprimierende PC-12-Zellen ein reduziertes axonales Wachstum (Dragunow et al. 2000; Lindwall und Kanje 2005; Raivich et al. 2004).

Auch neurotrophe Faktoren können das axonale Wiederauswachsen zu einem gewissen Ausmaß verbessern. Im Folgenden soll auf ihre Rolle genauer eingegangen werden.

1.4 Bedeutung von neurotrophen Faktoren für die axonale Regeneration

Die Tatsache, dass einige zentrale Nervenzellen, wie zum Beispiel hippocampale Neurone, die Fähigkeit zum axonalen Wiederauswachsen nach einer Schädigung besitzen, führte zur Suche nach Molekülen, die das Überleben dieser Zellen und de-

ren axonales Wachstum fördern (Nakatomi et al. 2002). Wachstumsfaktoren sind Proteine, die verschiedene intrazelluläre Prozesse steuern und insbesondere in der Entwicklung von vielzelligen Organismen eine Rolle spielen. So können neurotrophe Faktoren, wie beispielsweise BDNF und CNTF, das Überleben von retinalen Ganglienzellen steigern (Johnson et al. 1986; Meyer-Franke et al. 1995). Diese Wirkung üben sie über Rezeptoren aus, die sowohl in der sich entwickelnden als auch in der adulten Retina vorkommen (Jelsma et al. 1993). Allerdings ist die Kapazität der ZNS-Neurone, auf die Stimulierung durch Wachstumsfaktoren zu reagieren, abhängig vom Entwicklungsstadium der Zellen. So findet sich mit zunehmendem Alter der Zellen eine abgeschwächte Antwort auf die neurotrophen Stimuli (Avwenagha et al. 2003; Chierzi et al. 2005).

Entdeckt als wachstums- und überlebensfördernde Faktoren für Neurone, spielen Neurotrophine vermutlich eine entscheidende Rolle in der Regulation vieler Aspekte der neuronalen Entwicklung und neuronalen Funktion, wie zum Beispiel der Plastizität und Bildung von Synapsen (Huang und Reichardt 2001; Kaplan und Miller 2000; Korsching 1993; Lewin und Barde 1996). Für die Regeneration von Nervenzellen scheinen sie ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen.

Durch die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen können neben den klassischen Neurotrophinen auch die Mitglieder einer Vielzahl anderer Proteinfamilien das neuronale Überleben und viele weitere Aspekte der neuronalen Entwicklung und Funktion beeinflussen (Reichardt 2006). Neurotrophine kontrollieren über ihre korrespondierenden Rezeptoren auf diese Weise viele Bereiche der neuronalen Entwicklung und Funktion (Chao 2003). Sie spielen für die Proliferation von zellulären Vorläufern und deren Differenzierung eine wichtige Rolle, aber auch das Zellüberleben, die Ausbildung und das Wachstum von axonalen und dendritischen Verbindungen, der Membrantransport und die Synapsenausbildung und -funktion wird durch Neurotrophine entscheidend beeinflusst (Reichardt 2006).

Die Neurotrophine interagieren mit zwei unterschiedlichen Rezeptorklassen. Die Rezeptortyrosinkinasenfamilie umfasst über 60 Proteine und lässt sich in 14 Untergruppen einteilen (Heldin 1995). Der p75-Neurotrophinrezeptor (p75NTR) aus der Superfamilie der Tumor necrose factor-Rezeptoren wurde als Bindungspartner von NGF identifiziert, bindet aber auch die anderen Neurotrophine mit der gleichen Affinität (Rodriguez-Tebar et al. 1990). Der Rezeptor selbst besitzt keine katalytische Akti-

vität. Er interagiert aber mit einer Vielzahl von Proteinen, die für das Überleben von Nervenzellen, deren Differenzierung und darüber hinaus für die Plastizität von Synapsen wichtig sind. (Chao 2003; Huang und Reichardt 2003). Diese transmembranösen Rezeptoren besitzen eine zytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne, die eine vom Phosphorylierungsgrad abhängige Bindungsstelle für zytoplasmatische Adaptorproteine und Enzyme darstellt. Die Bindung des Neurotrophins resultiert in einer Dimerisierung des Rezeptors, der dann durch Transphosphorylierung aktiviert wird. Bei der Transphosphorylierung werden organische Phosphatgruppen zwischen den Tyrosinkinasedomänen übertragen (Ballotti et al. 1989). Die einzelnen Neurotrophine binden dabei spezifisch an ihrem jeweiligen Rezeptor (Reichardt 2006).

Nur die reifen Neurotrophine führen zu einer Trk-Rezeptoraktivierung, sodass die Proteasen, die die Vorstufen der Neurotrophine spalten, eine regulierende Wirkung besitzen (Lee et al. 2001).

1.5 Hepatocyte growth factor (HGF)

Hepatocyte growth factor (HGF) wurde ursprünglich als ein Wachstumsfaktor für Hepatozyten identifiziert und stellt das stärkste Mitogen der Leberzellen dar (Nakamura et al. 1986). Synonym wurde früher auch der mittlerweile veraltete Begriff *scatter factor* (SF) verwendet, der auf die Fähigkeit hinweist, vor allem in Zellen epithelialen Ursprungs Motilität, Proliferation und Morphogenese auszulösen (Birchmeier und Gherardi 1998; Maina und Klein 1999). Naldini et al. konnten jedoch zeigen, dass es sich bei HGF und dem *scatter factor* um ein und dasselbe Molekül handelt (Naldini et al. 1991).

HGF spielt auch eine wichtige Rolle für die normale embryonale Entwicklung. HGF-knock-out-Mäuse können die embryonale Entwicklung nicht abschließen und sterben bereits *in utero*. Es zeigt sich zum Beispiel eine reduzierte Anzahl an Leberparenchymzellen und eine gestörte Entwicklung der Plazenta (Schmidt et al. 1995). Im Nervensystem beeinflusst HGF die Entwicklung von sensorischen, sympathischen, parasympathischen und kortikalen Neuronen. Die Proliferation von oligodendrozytären Vorläuferzellen und die Differenzierung in Oligodendrozyten wird durch HGF reguliert (Ohya et al. 2007). Auch auf die Motilität von Zellen kann HGF

Einfluss nehmen. HGF wirkt als chemischer Lockstoff für die Axone spinaler Motoneurone und für die Projektionen der Motoneurone zu den Extremitätenmuskeln (Ebens et al. 1996). In der *Madin-Darby canine kidney* (MDCK)-Zelllinie der Niere wird durch HGF die Ausbildung von tubulären Strukturen gesteuert, was den Effekt auf die Morphogenese unterstreicht (Montesano et al. 1991).

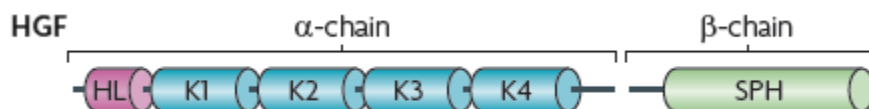


Abbildung 2: Struktureller Aufbau des HGF-Moleküls

HGF besteht aus sechs unterschiedlichen Domänen. Die α -Kette enthält eine N-terminale-Haarnadelstruktur und vier *kringle*-Domänen. Die β -Kette besitzt eine Serin-Protease-ähnliche Struktur, der die Protease-Aktivität jedoch fehlt. In seiner Proteinstruktur und Aminosäuresequenz ähnelt HGF dem für die Fibrinolyse benötigten Plasminogen (Okajima et al. 1990). (nach Trusolino et al. 2010).

HGF wird als die inaktive einzelkettige Vorstufe proHGF in die extrazelluläre Matrix sekretiert. Durch die proteolytische Spaltung dieses Vorläuferproteins in eine 69-kDa α -Kette und eine 34 kDa- β -Kette, verbunden über eine einzelne Disulfidbrücke, erfolgt die biologische Aktivierung (Nakamura et al. 1989). An dieser posttranslationalen Prozessierung sind verschiedene extrazelluläre Proteasen beteiligt, wie zum Beispiel HGF-A (*hepatocyte growth factor activator*), Urokinase sowie die Gewebsplasminogenaktivatoren uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) und tPA (*tissue-type plasminogen activator*) (Mars et al. 1993; Naldini et al. 1992). Insbesondere in verletzten Geweben findet eine Aktivierung von HGF durch HGF-A statt. HGF-A wird im verletzten Gewebe durch die konsekutiv ausgelöste Gerinnungskaskade und dadurch entstehendes Thrombin aus der Vorstufe pro-HGF-A gebildet (Nakamura et al. 2011).

Das fertig prozessierte HGF bindet dann an den C-Met/HGF-Rezeptor, wodurch das Signal nach intrazellulär weitergeleitet wird. Nach Rezeptorinteraktion vermittelt HGF ein gesteigertes Überleben von Hippocampusneuronen, dopaminergen Neuronen im Mesenzephalon, Motoneuronen, sensorischen Neuronen und sympathischen Neuroblasten (Ebens et al. 1996; Hamanoue et al. 1996; Honda et al. 1995; Maina et al. 1998; Maina und Klein 1999). Verschiedene Studien konnten sowohl pro- als auch

antiapoptotische Effekte von HGF zeigen (Trusolino et al.). So induziert HGF beispielsweise in der humanen Leberkarzinom-Zelllinie Hep G2 und in Myofibroblasten der Leber Apoptose (Matteucci et al. 2001). Der Mechanismus ist bisher nur teilweise verstanden. Für die unterschiedliche Wirkung von HGF auf Apoptoseinduktion oder -protektion scheinen die Umgebungsbedingungen, eine Interaktion des MET-Rezeptors mit dem Fas-Rezeptor und die jeweilige HGF-Konzentration verantwortlich zu sein.

Unter physiologischen Bedingungen und geringen HGF-Konzentrationen verhindert die Interaktion der extrazellulären Domäne des Met-Rezeptors mit dem Fas-Rezeptor eine Erkennung des Fas-Liganden an seinem Rezeptor. So wird durch eine verringerte extrinsische Apoptoseinduktion eine antiapoptotische Wirkung vermittelt. Vermutlich können erhöhte HGF-Konzentrationen jedoch die Zelle für eine Fas-vermittelte Apoptose sensibilisieren, indem durch die erhöhte HGF-Konzentration die Interaktion der extrazellulären MET-Domäne mit dem Fas-Rezeptor sinkt und damit eine vermehrte extrinsische Apoptoseinduktion resultiert (Wang et al. 2002).

Unter Stressbedingungen wird die intrazelluläre MET-Domäne an zwei unterschiedlichen Aspartatsäureresten durch Caspasen gespalten. Durch die beiden Spaltungen wird ein die Kinaseaktivität beinhaltenes, proapoptotisches Fragment freigesetzt, sodass der Zelltod ausgelöst wird. Eine erhöhte HGF-Konzentration unter Stressbedingungen bewirkt eine reduzierte Caspasenaktivität, sodass die vermehrte HGF-Stimulation antiapoptotisch wirkt (Foveau et al. 2007; Tulasne et al. 2004).

Wie bereits erwähnt, ist eine ausschließlich antiapoptotische Wirkung für die Wiederherstellung von funktionellen Nervenzellen nicht ausreichend. HGF besitzt neben den antiapoptotischen Effekten jedoch weitere Eigenschaften, die nahelegen, dass dieses Protein die Regeneration von Nervenzellen positiv beeinflussen könnte. Bei sympathischen Neuronen konnte ein verstärktes Längenwachstum und eine ausgeprägtere Verzweigung der Neuriten beobachtet werden (Maina et al. 1998). In der Entwicklung von sensorischen Neuronen wird der positive Effekt von NGF auf das Auswachsen von Neuriten verstärkt (Maina und Klein 1999). Neurone des Thalamus weisen während der Entwicklung ein verstärktes axonales Auswachsen in Abhängigkeit von HGF auf (Powell et al. 2003). In Hippocampusneuronen führt eine exogene Behandlung mit HGF zu einer größeren Anzahl und einer vermehrten Verzweigung der dendritischen Fortsätze (Tyndall et al. 2007). In Neuronen des olfaktorischen

Systems zeigt sich nach einer Behandlung mit einem HGF-neutralisierenden Antikörper ein reduziertes Längenwachstum der olfaktorischen Neurone (Giacobini et al. 2007). In zerebralen Kortex-Explantaten konnte die neuritogene Aktivität nach HGF-Applikation mit nachfolgender MET-Autophosphorylierung und MAP-Kinase-Aktivierung gezeigt werden (Hamanoue et al. 1996). Nach einer Rückenmarksverletzung führt eine Behandlung mit HGF durch einen rekombinationsinkompetenten Herpes simplex Virus-1 zu verbesserten endogenen Regenerationsprozessen durch ein verbessertes Überleben von Neuronen und Oligodendrozyten mit einem verbesserten axonalen Wiederauswachsen, einer verstärkten Angiogenese und verbesserter funktioneller Erholung (Kitamura et al. 2007). Zusammenfassend machen die antiapoptischen, neuritogenen und proregenerativen Eigenschaften HGF zu einem interessanten Molekül, das in Zukunft zur Behandlung von traumatischen Verletzungen des zentralen Nervensystems und neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden könnte.

1.6 Der HGF-Rezeptor C-Met

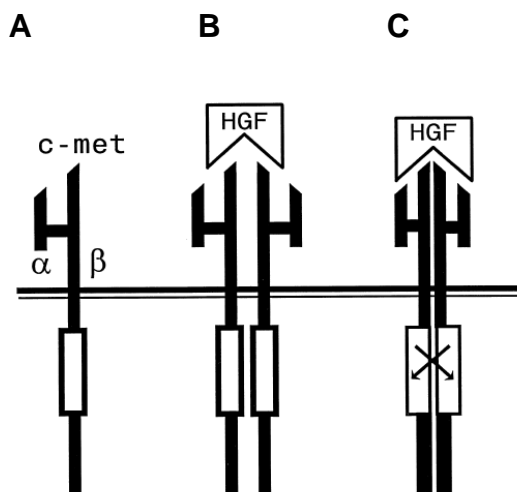


Abbildung 3: Aktivierung des C-Met-Rezeptors durch HGF

A: Der HGF-Rezeptor C-Met besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit, die über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Die transmembranöse β -Untereinheit besitzt eine intrazellulär gelegene Tyrosinkinase-Domäne. **B:** Die Bindung des Liganden HGF führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors. **C:** Nach der Dimerisierung kommt es zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste, über die dann weitere Adaptormoleküle phosphoryliert und somit intrazelluläre Signalkaskaden gesteuert werden (nach Vargas et al. 2000).

HGF vermittelt seine Wirkungen über den C-Met-Rezeptor, der durch das Protoonkogen C-Met codiert wird. C-Met wurde auf einer Vielzahl von neuronalen und nicht neuronalen Zellen im zentralen Nervensystem identifiziert. Neben kortikalen, hippocampalen und sympathischen Neuronen, wird der C-Met-Rezeptor auch auf Motoneuronen exprimiert. Auch auf nicht-neuronalen Zellen, wie zum Beispiel auf Gliazellen, lässt sich der C-Met-Rezeptor nachweisen (Maina et al. 1998; Sun et al. 1999). Der Rezeptor wurde zuerst als mesenchymal-epithelialer Transitionsfaktor (Met) beschrieben und gehört zur Gruppe der bereits im Abschnitt Neurotrophine erwähnten Rezeptortyrosinkinasen (Bottaro et al. 1991).

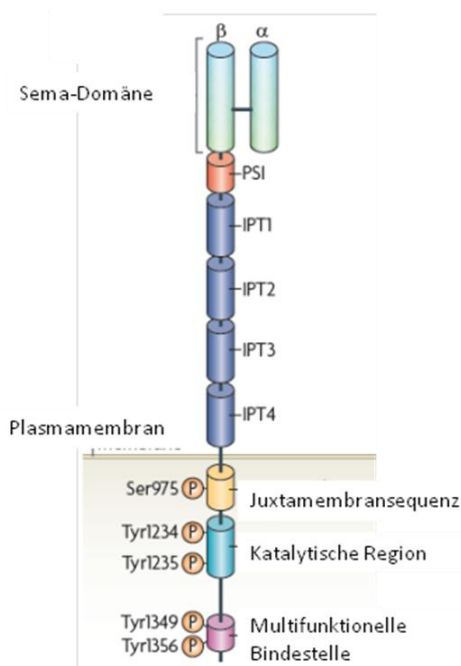


Abbildung 4: Struktureller Aufbau des C-Met-Rezeptors

Der C-Met-Rezeptor ist aus drei extrazellulären und drei intrazellulären funktionellen Domänen aufgebaut. Eine HGF-Bindung an den extrazellulären Anteil des Rezeptors führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors und nachfolgender Phosphorylierung der Tyrosinreste der katalytischen Region und der multifunktionalen Bindestelle (nach Trusolino et al. 2010).

HGF bindet mit hoher Affinität an den C-MET-Rezeptor und vermittelt durch die Bindung eine Aktivierung (Bottaro et al. 1991; Naldini et al. 1991). Der Rezeptor wird dabei durch eine Autophosphorylierung aktiviert. Nachfolgend wird durch die Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen eine komplexe Signaltransduktionskaskade aktiviert (Ponzetto et al. 1994).

Die HGF-Bindung an die extrazellulären MET-Domänen bewirkt zunächst eine Dimerisierung des Rezeptors. Dadurch resultiert eine Transphosphorylierung von zwei katalytischen Tyrosinresten (Tyr 1234, Tyr 1235). Nachfolgend werden zwei weitere Tyrosinreste (Tyr 1349, Tyr 1356) phosphoryliert, die der Rekrutierung von Adaptorproteinen dienen (Ponzetto et al. 1994). Durch die Aktivierung des Rezeptors entstehen so multiple Interaktionsmöglichkeiten, die der Signalvermittlung dienen. Zu den Bindungspartnern zählen die etablierten Signalmoleküle wie PI3K (Phosphoinosid-3-Kinase), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*), PLC- γ (Phospholipase C- γ), SOS (*Ras guanine nucleotide exchange factor son-of-sevenless*), Src Kinase und die SHP2 (*Src homology domain 2 (SH2)-containing tyrosine phosphatase*) (Boccaccio et al. 1998; Fixman et al. 1996; Graziani et al. 1991; Graziani et al. 1993; Ponzetto et al. 1994). Darüber hinaus werden aber noch weitere Adaptorproteine wie Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), SHC (*Src homology 2 domain-containing*), Crk/CRKL und Gab1 am aktivierten C-Met-Rezeptor gebunden (Garcia-Guzman et al. 1999; Pelicci et al. 1995; Ponzetto et al. 1994; Weidner et al. 1996). Grb2 vermittelt über eine Rekrutierung von SOS die Induktion des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs (Schlessinger 1993). Durch die Adaptorproteine werden zahlreiche Signaltransduktionswege aktiviert. Zu diesen zählt die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Kaskade, mit den Kinasen ERK1 (*extracellular signal-regulated kinase1*), ERK2, JNK (*Jun amino-terminal kinase*) und p38. Darüber hinaus werden der PI3K-Akt-Signalweg, der STAT-Signalweg und der nuclear factor- κ B-inhibitor- α (I κ B α)- nuclear factor- κ B (NF- κ B)-Komplex aktiviert (Birchmeier et al. 2003; Lai et al. 2009; Maroun et al. 1999; Maroun et al. 2000; Sipeki et al. 1999).

Dieses komplexe Zusammenspiel, der einzelnen an der Rezeptorfunktion beteiligten Proteine, hat eine Aktivierung von obengenannten nachgeschalteten Signaltransduktionswegen zur Folge. Das Resultat des Zusammenspiels aus

Rezeptoraktivierung, moduliert durch Adaptorproteine und Corezeptoren, mit nachfolgender Signalwegaktivierung begünstigt ein verbessertes Überleben, Proliferation und Migration (Trusolino et al., 2010).

1.7 HGF/C-Met in der Retina

Die neuroprotektiven Eigenschaften von HGF wurden bereits in einigen Arbeiten in der Retina untersucht. So zeigten sich in einem Retina-Ischämie-Reperfusionmodell nach einer HGF-Behandlung neuroprotektive Effekte auf die Zellen in der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerzellschicht. Mittels RT-PCR (Real time-Polymerase-Kettenreaktion) und Western-blot-Analysen konnten eine Hochregulation von HGF und der mRNA des C-Met-Rezeptors 6 Stunden nach Reperfusion im Vergleich zur normalen Retina gezeigt werden. Immunhistochemische Untersuchungen konnten darüber hinaus eine Expression von HGF im retinalen Pigmentepithel und in Zellen der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerzellschicht 24 Stunden nach Reperfusion nachweisen (Shibuki et al. 2002). Auch die Wundheilung des retinalen Pigmentepithels kann durch eine HGF-Behandlung verbessert werden (Miura et al. 2003). Bis dato liegen keine Forschungsergebnisse über die Effekte von HGF auf das Überleben und die Regeneration von retinalen Ganglienzellen vor. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die intravitreale Applikation von HGF einen signifikanten neuroprotektiven Effekt auf die Photorezeptordegeneration nach Phototoxizität ausüben kann (Machida et al. 2004). In einem Natriumiodat-Retina-Toxizitätsmodell konnte ein protektiver Effekt von HGF gegen die Degeneration der Photorezeptoren und des retinalen Pigmentepithels gezeigt werden (Ohtaka et al. 2006). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass HGF auch eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt (Colombo et al. 2007). So konnten erhöhte HGF-Spiegel im Glaskörper und im Serum von Patienten mit proliferativer Retinopathie gefunden werden (Lashkari et al. 2000).

1.8 Ziele der Versuche

Die vielfältigen Eigenschaften von HGF legen nahe, dass das multifunktionelle Zytokin ein vielversprechendes therapeutisches Molekül für die Förderung von neuronalem Überleben darstellt. Auf der anderen Seite könnte HGF auch für die

Ausbildung von axonalen Verbindungen der RGCs eine entscheidende Rolle spielen. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung von Effekten von HGF auf das Überleben retinaler Ganglienzellen *in vitro* und *in vivo* sowie die Charakterisierung der regenerationsfördernden Wirkung *in vitro* und *in vivo*.

Um die Rolle von HGF für das Überleben retinaler Ganglienzellen zu untersuchen sollten etablierte Zelltodparadigmen verwendet werden. Dabei sollte den RGC-5-Zellen das Serum bzw. primären retinalen Ganglienzellen die Neurotrophine entzogen und so die Apoptose induziert werden. Durch die anschließende Bestimmung der Anzahl an vitalen Zellen kann der neuroprotektive Effekt nach einer HGF-Behandlung quantifiziert werden.

Darüber hinaus sollten die überlebensfördernden Eigenschaften für retinale Ganglienzellen *in vivo* anhand der Axotomie des optischen Nerven in einem Tierversuchsmodell der Ratte untersucht werden. Durch die Axotomie des optischen Nerven sollte in den retinalen Ganglienzellen Apoptose induziert werden. Durch die Bestimmung der Anzahl überlebender retinaler Ganglienzellen kann der antiapoptotische Effekt nach einer HGF-Behandlung quantifiziert werden.

Zur Evaluation der wachstumsfördernden Eigenschaften von HGF wurde das Neuritenlängenwachstum primärer retinaler Ganglienzellen in einem Vollmedium in Abhängigkeit von einer HGF-Behandlung untersucht.

Weil nach einer traumatischen Nervenläsion das Wiederauswachsen der Neuriten durch inhibitorische Myelinproteine zusätzlich erschwert wird, sollten die regenerationsfördernden Eigenschaften auch in einem Tierversuchsmodell der Ratte untersucht werden. Nach einer Crush-Läsion des optischen Nerven sollte die Anzahl und die Länge regenerierender Axone im optischen Nerv in Abhängigkeit von einer HGF-Behandlung bestimmt werden.

Um den Wirkmechanismus der HGF-Behandlung zu charakterisieren, sollten Proteinanalysen von RGC-5 und primären retinalen Ganglienzellen zum Nachweis beteiligter intrazellulärer Signalkaskaden durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Ampicillin Sigma, Taufkirchen, Deutschland

B-27-Zusatz Gibco, Karlsruhe, Deutschland

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Tebu, Offenbach, Deutschland

Bromophenol blau Natriumsalz Serva, Heidelberg, Deutschland

Rinderserumalbumin (BSA) Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Chloralhydrat Fluka, Seelze, Deutschland

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) Tebu, Offenbach, Deutschland

Cumarsäure Fluka, Taufkirchen, Deutschland

Cryomatrix Thermoshandon, Frankfurt/Main, Deutschland

D(+)-Saccharose AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Gibco, Karlsruhe, Deutschland

DMEM/F12 (1:1) Gibco, Karlsruhe, Deutschland

ECL-Plus Reagenz (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)

Ethanol AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Formaldehyd Merck, Darmstadt, Deutschland

Forskolin Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Glycerin Roth, Karlsruhe, Deutschland

Insulin Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Laminin Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Mowiol CalbioChem, La Jolla, CA, USA

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) R&D Systems,
Deutschland

Neurobasales Medium Opti-MEM Gibco, Karlsruhe, Deutschland

Neugeborenes Ziegenserum (NGS) PAA, Coelbe, Deutschland

N-propyl-Gallat Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Papain Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland

Paraformaldehyd (PFA) AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS 1x) AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Penicillin/Streptomycin/Neomycin (PSN) PAA, Coelbe, Deutschland

Proteaseinhibitor (Complete tablets) Roche, Mannheim, Deutschland

Transferrin Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Triiodothyronin Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-Base) AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Triton X-100 Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Trypsin Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Trypsin-Inhibitor Boehringer, Mannheim, Deutschland

2.1.2 Software

Axiovert

Corel Draw

Image J

2.2 *In vitro* Experimente

2.2.1 Primäre retinale Ganglienzellkultur (pRGC-Kultur)

Zur Herstellung der primären retinalen Ganglienzellkultur wurden 7-8 Tage postnatale Wistar-Ratten verwendet. Die immungereinigten RGC-Kulturen wurden dabei nach einem zweischrittigen panning-Protokoll hergestellt und gereinigt. Dies führt zu einer 99,5%igen Reinheit an retinalen Ganglienzellen (Barres et al. 1988).

In Vorbereitung der RGC-Dissektion wurden zunächst die Panning-Platten vorbereitet: Der Marker Thy-1 wird sowohl auf RGCs als auch auf Makrophagen exprimiert. Um spezifisch die retinalen Ganglienzellen aus dem Zellhomogenat zu selektieren, wurden zwei sequentielle Inkubationsschritte mit verschiedenen Antikörpern verwendet. Zunächst wurden die Makrophagen durch makrophagenspezifische Antikörper entfernt und dann die RGCs durch Thy-1 selektioniert. Dafür wurden Panning-Platten für Makrophagen bei 4°C über Nacht mit einem IgG-Antikörper aus der Ziege gegen Kaninchen in Tris-HCl 50mM pH 9,5 (1:400; spezifisch für anti-Makrophagen-Antikörper aus Kaninchen) beschichtet. Die RGC-panning-Platten wurden analog dazu mit einem IgM-Antikörper aus Ziege gegen Maus (1:600, spezifisch für anti-Thy1-Antikörper aus Maus) beschichtet. Nach dem Waschen wurden die Makrophagen-panning-Platten mit BSA 0,2% in DPBS geblockt, während die RGC-panning-Platten bei Raumtemperatur mit Maus anti-Thy1-Antikörpern ebenfalls mit BSA 0,2% in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) inkubiert wurden.

Wistar-Ratten wurden am 7 Tag postnatal durch Dekapitation getötet. Im Anschluss wurden die Augen extrahiert. Die Kornea, die Linse und der Glaskörper wurden entfernt und nur die Retinae in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) wurden gesammelt. Das Medium wurde anschließend entfernt und das retinale Gewebe bei 37°C für 15min in Papain (165 Einheiten) inkubiert. Die Papain-Aktivität wurde dann durch die Zugabe von 750µl low Ovomuroid und 100µl DNase geblockt. Die Makrophagen wurden dann in der vorliegenden Lösung mit den oben genannten Antikörpern markiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension für 11 min bei 1000 rpm (106 g) bei 25 °C zentrifugiert und anschließend in High Ovomuroid Lösung wieder gelöst. Nach weiteren 11 min der Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde das Gewebe getrennt und durch ein steriles Nylonnetz (Heidland, Gütersloh, Germany) gefiltert. Bei diesem Schritt wurde BSA 0,2 % in DPBS verwendet, um eine Aggregation der Zellen zu verhindern. Die Blocking-Lösung wurde dann aus den Makrophagenpanning-Platten mit Anti-Kaninchen-IgG entfernt. Die Zellsuspension wurde dann erneut zweimal für 20 bzw. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Makrophagen zu binden und zu entfernen. Eine weitere Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur in RGC-panning-Platten mit Ziegen-anti-Maus- und Maus-anti-Thy1-Antikörpern wurde zur Selektion der retinalen Ganglienzellen durchgeführt. Danach erfolgte ein sehr gründliches wiederholtes Waschen, um eine hohe Reinheit der Zellkultur sicherzustellen. Abschließend wurden die Zellen durch Gabe von 200 µl Trypsin 2,5 % für 15 min bei 37 °C von den Platten gelöst und für 18 min bei 800 rpm und 25 °C zentrifugiert und konnten für die nachfolgend beschriebenen Versuche ausplattiert werden.

2.2.2 pRGC-Überleben nach Neurotrophindeprivation und Behandlung mit HGF

Die so gewonnenen retinalen Ganglienzellen wurden dann in einer Konzentration von 3000 RGCs pro 100 µl pro Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen in einem serumfreien Vollkulturmedium aus Neurobasal-Medium einschließlich Glutamin, Cystein, Pyruvat, Triiodthyronin, B27, Sato (Rinderserumalbumin, Transferrin, Progesteron, Putrescin, Natriumselenit), Forskolin (Endkonzentration 10 mM), BDNF (Endkonzentration 50 ng/mL), CNTF (Endkonzentration 10 ng/mL) und Insulin (Endkonzentration 5 mg/mL) ausplattiert. Außerdem wurden analog dazu 8000 RGCs in 500µl pro Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen mit dem gleichen Medium kultiviert. Nach 48h wurde das Medium gewechselt und gegen ein Medium

ohne die Zusätze Forskolin, BDNF, CNTF, Insulin ausgetauscht. Bei der Positivkontrolle wurde entsprechend gegen das oben genannte Vollmedium gewechselt. Zusätzlich wurde direkt nach dem Wechseln des Mediums HGF in verschiedenen Endkonzentrationen appliziert (1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml), bevor die weitere Kultivierung für 72 Stunden erfolgte.

Zur Auswertung des Zellüberlebens wurde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in einer Konzentration von 5 mg/ml zu den Zellen gegeben und diese dann für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert und dann unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Zähllokulars ausgezählt. MTT ist ein gelbes Tetrazoliumsalz, mit dem man den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen messen kann. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs MTT in ein blauviolett, wasserunlösliches Formazan. Die Menge gibt dabei Aufschluss über die Glykolyserate. Um eine repräsentative Auswertung zu gewährleisten, wurden mindestens drei Ansätze ausgewertet. Pro Vertiefung wurden dabei jeweils sechs randomisierte Bilder gemacht.

2.2.3 pRGC-Auswachstum nach HGF-Behandlung

Es wurden 5000 RGCs pro 250 µl pro Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen in dem bereits erwähnten Vollmedium ausplattiert. Die Behandlung mit HGF erfolgte 48h nach dem Ausplattieren ebenfalls mit den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle. Nach weiteren 48 h bzw. 72 h wurden die pRGCs dann mikroskopiert und es wurden Bilder zur Dokumentation und Auswertung gemacht. Die Längenbestimmung der Neuriten der retinalen Ganglienzellen erfolgte mit dem halbautomatischen Programm ImageJ und dem NeuronJ plugin.

2.2.4 RGC5-Zellkultur

Die RGC5-Zellkultur ist eine transformierte Zelllinie aus retinalen Ganglienzellen der Ratte. Zur Herstellung wurden initial retinale Zellen von 1 Tag postnatalen Ratten mit einem ψ 2 E1A Virus transformiert. Zur anschließenden Isolation retinaler Ganglien-

zellen wurden einzelne Zellklone randomisiert aus den transformierten Zellen ausgewählt. Eine genauere Charakterisierung dieser Zellen erfolgte durch die Untersuchung bestimmter zellspezifischer Proteine mittels Immunoblotting, Immunhistochemie und RT-PCR, um die Subpopulationen der verschiedenen retinalen Zelltypen zu unterscheiden. Thy-1 wurde als Markerprotein für retinale Ganglienzellen, glial fibrillary acidic protein (GFAP) zum Nachweis von Müllerzellen, HPC-1/syntaxin zur Identifizierung von amakrinen Zellen sowie 8A1 als Protein zum Nachweis von Horizontal- und Ganglienzellen verwendet. Einer der so gewonnenen RGC5-Zellklone zeigte sich positiv für Thy-1, Brn-3C, Neuritin, den NMDA-Rezeptor, den GABA-B-Rezeptor und wies eine Synaptophysinexpression auf. Eine Expression von GFAP, HPC-1, and 8A1 konnte nicht nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen konnten die Zelllinie genauer charakterisieren. Bei den Zellen ließ sich die Expression von Neurotrophinen und deren zugehörigen Rezeptoren nachweisen. Nach Differenzierung mit Succinylconcanavalin A zeigten sich die Zellen sensitiv für Glutamattoxizität, und nach Wachstumsfaktor- beziehungsweise Serumentzug gingen die Zellen in Apoptose. Ein Ersatz der Wachstumsfaktoren durch BDNF und NT-4 konnte die Zellen vor Apoptose schützen. Damit erfüllte diese Zelllinie wesentliche Eigenschaften retinaler Ganglienzellen und dient zur Untersuchung der Zellbiologie und –physiologie von retinalen Ganglienzellen *in vitro* (Krishnamoorthy et al. 2001).

2.2.5 RGC-5-Überleben nach Serumdeprivation

In einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen mit serumfreien DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) wurden 1000 RGC-5-Zellen/100 µl/Vertiefung ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das serumfreie Medium bei der Positiv-Kontrolle durch ein serumhaltiges Medium ersetzt. Zusätzlich wurde bei allen Konditionen Concanavalin zur Differenzierung der Zellen und gemäß den unterschiedlichen Konditionen HGF in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml eingesetzt. Die Behandlung mit HGF wurde an Tag 3 und 5 erneut durchgeführt. An Tag 7 erfolgte die Auswertung in gleicher Weise wie bei den primären retinalen Ganglienzellen mit MTT und anschließender Mikroskopie.

2.2.6 Western Blot

Zum Nachweis der Proteine, die in der intrazellulären Signaltransduktionskaskade beteiligt sind, wurde eine Proteinanalyse mittels Western Blot durchgeführt. Dazu wurde die RGC-5-Zelllinie nach Trypsinierung dreimalig in EBSS gewaschen und anschließend in einer Konzentration von 1.000.000 Zellen/well in serumfreiem Medium mit Concanavalin A in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde dann HGF in einer finalen Konzentration von 50 ng/ml hinzugegeben. Aus der Zellkultur wurden dann nach 10 min, 30 min, 2 h, 6 h, 12 h oder 24 h Lysate hergestellt. Der Lysepuffer bestand aus 10 mM HEPES (pH 7.2), 142 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA und dem nicht-ionischen Tensid IGEPAL (1%) sowie Proteaseinhibitor. Zusätzlich wurde eine Analyse von Retina-Lysaten aus 200-250 g schweren weiblichen Wistar-Ratten durchgeführt, die zuvor intravitreal mit HGF (10 µg in 3,5 µl PBS) behandelt wurden. Dazu wurden die Retinae direkt nach der Axotomie, einen Tag oder 4 Tage nach der Axotomie des optischen Nervs, entnommen. Nach der Entfernung der Cornea, des Linsenapparates und des Glaskörpers wurde der verbleibende Augenbecher schockgefroren und für die weitere Prozessierung bei -80 °C aufbewahrt. Nachdem die Präparate vorsichtig aufgetaut wurden, folgten die Lyseprozeduren in einem EBM-Lyse-Puffer bestehend aus 20mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 10 % Glycerol, 1 % Triton, mit einem Protease- und einem Phosphatase-Inhibitor. Der Proteingehalt der Retinalysate wurde mit dem Bradford-Assay und gleichen Mengen von Protein (50 µg) bestimmt und das Lysat durch eine Natriumdodecylsulphat–Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS–PAGE) aufgetrennt und anschließend mittels Elektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Nachdem Transfer auf die Membran wurde mit fettfreier Milch in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung/0.1 % Tween-20 (PBS-T) für 1 Stunde geblockt.

Die Membranen wurden dann mit den primären Antikörpern für 24 Stunden bei 4 °C in PBS-T und 5 % Milch inkubiert. Anti-phospho-Akt, anti-phospho-MAPK, anti-MAPK, und anti-phospho-Met wurden dafür in einer Konzentration von 1:1000 verwendet. Die Verdünnung von Anti-phospho-Gab1 erfolgte 1:2000. Anti-Met wurde 1:200 verdünnt und Anti-HGF in einer Konzentration von 1:500 verwendet. Die Inkubation mit den zugehörigen Meerrettichperoxidase-gebundenen sekundären Antikörpern (1:4000) wurde anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Auf die Membran wurde abschließend das ECL-Plus Reagenz gegeben. ECL-Plus-

Reagenzien erlauben mittels Elektrolumineszenz den nicht-radioaktiven Nachweis von Antigenen, an denen Meeretichperoxidase-gebundenen Antikörper gebunden haben. Die Fluoreszenz wurde mit einem Kodakfilm sichtbar gemacht.

2.3 *In vivo*-Experimente

Für die durchgeführten *in vivo*-Experimente wurden ausschließlich weibliche Wistar-Ratten (200 g bis 250 g) verwendet (Charles River; Zentrale Tiereinheit Göttingen). Diese wurden gemäß den Richtlinien der niedersächsischen Tierversuchsbestimmungen (kontrollierte Grenzwerte für die physikalische Umwelt) gehalten. Die Unterbringung erfolgte in einem Macralon-Käfig mit einer Mindestgrundfläche von 310 cm² und einer Höhe von 18 cm. Die Temperatur im Tierraum betrug 22 °C mit einer Toleranz von 2°C. Die Luftfeuchtigkeit wurde in einem Bereich zwischen 40-70 % gehalten. Ein Luftwechsel wurde mit einer Rate von 15-20 Wechseln/Stunde sichergestellt. Zur Beleuchtung wurden Leuchtstoffröhren mit geringer Intensität und einer Wellenlänge von 486 nm verwendet. Bei den verwendeten Wistar-Ratten handelt es sich um einen Albinostamm der eine Beleuchtungsstärke von unter 60 lux im Käfig benötigt. Die Versuchstiere unterlagen einem regelmäßigen Hell-Dunkel-Wechsel mit einer Hell-Phase von 14 Stunden und einer Dunkel-Phase von 10 Stunden. Der Geräuschpegel wurde unter 60dB gehalten. Alle Tierversuche wurden durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt.

2.3.1 Intraperitoneale Narkose

Für die Durchführung der Axotomien und die Crush-Läsionen des optischen Nervs sowie die intravitrealen Injektionen erfolgte eine an das Gewicht adaptierte intraperitoneale Narkose der Versuchstiere mit Chloralhydrat 7% (420 mg/kg Körpergewicht). Die intraperitoneale Injektionen wurden mit einer 1ml Spritze und einer Subkutannadel durchgeführt. Die Versuchstiere wurden dafür unter einem Stofftuch fixiert. Anschließend erfolgte die Punktion im Bereich des mittleren Abdomens der Ratte nahe der Linea alba. Bis zum Einsetzen der Narkose verblieben die Versuchstiere in ihrem Käfig. Die Prozeduren wurden nur dann durchgeführt, wenn eine suffiziente Sedierung erreicht war. Als primäre Kontrollpunkte für die Tiefe der Narkose

wurden das Vorhandensein bzw. Fehlen von Schutzreflexen (z.B. Kornealreflex) und die Reaktion auf Schmerzreize genutzt. Die Frequenz und die Tiefe der Atmung, dienten als sekundäres Merkmal.

2.3.2 Intravitreale Injektionen

Die Applikation des HGF erfolgte direkt in den Glaskörper mittels einer Hamilton-Nadel nach einer gewichtsadaptierten, intraperitonealen Chloralhydratnarkose. Dafür wurde nur das linke Auge hinter der Ora serrata unter Sicht punktiert. Das kontralaterale Auge wurde nicht injiziert. Eine Verletzung des Linsenapparates muss aufgrund der Gefahr der Kataraktentstehung vermieden werden. Versuchstiere mit einer Katarakt wurden aus dem Versuch ausgeschlossen. Um eine Glaukomentwicklung auf Grund eines erhöhten intraokulären Druckes zu verhindern, wurde ein Injektionsvolumen von 3,5 μl gewählt. Es wurden eine hohe Konzentration mit 10 μg HGF pro 3,5 μl und eine niedrige Konzentration mit 2 μg pro 3,5 μl verwendet (entspricht ca. 2,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bzw. 0,57 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Durch Diffusion können die HGF-Moleküle zur retinalen Ganglienzellschicht gelangen. Um ausreichende Wirkkonzentrationen zu erreichen, wurde direkt nach der Axotomie bzw. nach der Crush-Läsion und zusätzlich drei Tage postoperativ ein Volumen von 3,5 μl appliziert.

2.3.3 Axotomie des optischen Nervs

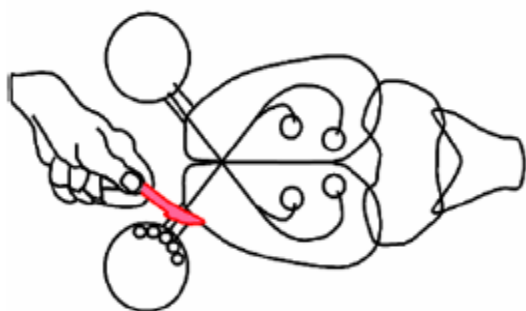


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Axotomie des optischen Nervs

Nach Präparation der den Nerv umgebenden Hüllen wurde der optische Nerv 2 mm hinter dem hinteren Augenpol durchtrennt.

Als Axotomie wird hier die Durchtrennung des optischen Nervs unter Schonung der die Retina versorgenden Blutgefäße bezeichnet. Die nachfolgende Beschreibung der Axotomien bezieht sich jeweils auf das linke Auge der Ratte, weil immer nur das linke Auge axotomiert wurde.

Wie oben beschrieben, erfolgte für die Axotomien eine gewichtsadaptierte, intraperitoneale Narkose mit Chloralhydrat. Nachdem das Tier eine ausreichende Narkosetiefe erreicht hat wurde das Fell über dem operativen Zugang zwischen den Augen entfernt. Anschließend erfolgte zur Reduktion der Keimzahl die Desinfektion der Haut mittels 70 %igem Ethanol. Nun wurde die Kopfhaut medial mit einem sterilen Skalpell über eine Länge von ca. 2 cm eröffnet. Mit kleinen Hähchen wurde die Kopfhaut samt Galea aponeurotica eingespannt. Mittels Diathermie erfolgte die Eröffnung der linken Orbitahöhle am kranialen Rand unter Schonung benachbarter Strukturen (rostral bis zum Ende des Orbitarandes und caudal bis zum Musculus temporalis). Der Nervus supraorbitalis wurde mittels Kauterisierung durchtrennt. Es folgte die schonende Luxation der Glandula lacrimalis nach nasal. Durch Traktion an den oberen Augenmuskeln und dem damit verbundenen Loslösen am Arcus tendineus wurde der Bulbus oculi nach ventral rotiert, um eine ausreichende Sicht auf den Nervus opticus zu ermöglichen. Es folgte die longitudinale Inzision der Hüllen des Nervs durch eine mikrochirurgische Schere unter Schonung der Zentralarterie, um eine ausreichende Blutversorgung der Retina zu gewährleisten. In einem Abstand von ca. 2 mm vom Bulbus oculi wurde der Sehnerv mit einer feinen Schere durchtrennt. Anschließend wurde an das proximale Nervenende ein 2x2 mm messendes, mit Fluorogold getränktes Stück aus Gelfoam zur retrograden Darstellung der retinalen Ganglienzellen eingebracht. Unter Vorsicht erfolgte die Rückrotation des Bulbus oculi um eine Dislokation des Gelfoams zu verhindern. Anschließend folgte die orthotope Rückverlagerung der Glandula lacrimalis und die schichtweise Adaptation der Wundränder. Abschließend wurde eine 3-0-Hautnaht in fortlaufender Technik durchgeführt und die Haut erneut desinfiziert. Direkt postoperativ erfolgten die oben beschriebenen intravitrealen Injektionen von HGF gelöst in PBS bzw. ausschließlich PBS mittels einer Hamilton-Nadel. Eine weitere intravitreale Injektion wurde drei Tage postoperativ nach erneuter Anästhesie durchgeführt. In den folgenden Tagen wurden die Tiere auf Infektionen und Linsenverletzungen untersucht. Im Falle einer Schädigung des Auges wurden die Ratten durch CO₂-Inhalation schmerzlos getötet.

Vierzehn Tage nach der Axotomie erfolgte die Entnahme der Retinae. Dazu wurden die Ratten durch CO₂-Inhalation schmerzlos getötet. Anschließend wurde das komplette Auge mit einem Teil des Sehnervs entfernt. Daraufhin wurden die Cornea, der Linsenapparat und der Glaskörper durch einen äquatorialen Schnitt auf Höhe der Ora serrata entfernt. Der verbleibende Teil des Augapfels wurde in 4% PFA in PBS

(pH= 7,4) für eine Stunde fixiert. Die Entnahme der Retinae wurde in Glycerol-PBS (1:1) mit einer feinen Pinzette durchgeführt. Dafür wurde der optische Nerv am Durchtritt durch die Lederhaut durchtrennt. Es folgten vier Inzisionen bei drei, sechs, neun und zwölf Uhr. Die so entstehende Kleeblattform der Retina wurde daraufhin mit einem Tropfen Glycerol-PBS (1:1) auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt.

2.3.4 Crush-Läsion des optischen Nervis

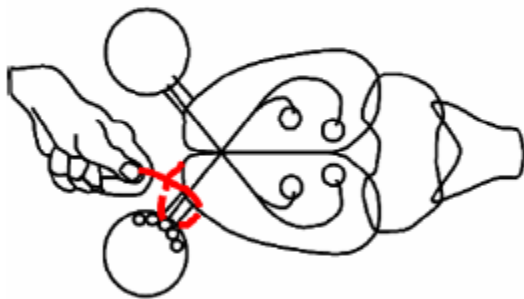


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Crush-Läsion

Der optische Nerv wird nach Präparation der Nervenscheiden mit einem 10-0-Faden dicht hinter dem hinteren Augenpol definiert gequetscht.

Unter einer Crush-Läsion versteht man eine definierte Quetschung des optischen Nervis, so dass die Axone zwar durchtrennt sind, aber an Ort und Stelle verbleiben. Sowohl die Anästhesie als auch das operative Vorgehen wurde analog zu den Axotomien durchgeführt. Im Gegensatz zur Axotomie folgte jedoch der Freilegung des Nervis nicht dessen Durchtrennung, sondern die umschriebene Quetschung mittels einer 10-0-Naht. Diese wurde für 15 Sekunden als einfacher Knoten zugezogen und anschließend sofort wieder gelöst und entfernt. Anschließend wurde der operative Zugang adaptiert und die Haut mit einer 3-0-Naht verschlossen. Nach 28 Tagen postoperativ wurden die Ratten durch Kohlendioxidinsufflation getötet und direkt danach transkardial perfundiert.

2.3.5 Transkardiale Perfusion

Diese Methode dient der Fixierung des optischen Nervis und wird in ähnlicher Weise auch für die Fixierung anderer Gewebe eingesetzt. Sie dient dabei als Vorbereitung

für die immunhistochemische Untersuchung. Durch das Fixans Paraformaldehyd werden Methylenbrücken und Verbindungen über eine Schiff'sche Base geschaffen, die während der Antigenwiederherstellung durch Waschen mit unterschiedlichen Pufferlösungen wieder gelöst werden. Dies ist die Voraussetzung für die der Immunhistochemie zugrunde liegende Antigen-Antikörper-Reaktion. Man nutzt in diesem Verfahren das Gefäßsystem der Ratte um die Fixationslösung in das zu untersuchende Gewebe einzubringen.

Zur Durchführung der transkardialen Perfusionen wurden die Ratten in einen Kasten gesetzt, in den CO₂ eingeleitet wurde bis das Bewußtsein und jegliche Reaktion auf äußere Reize aussetzte und schließlich die Atmung sistierte. Daraufhin wurden die Ratten auf einer Styroporunterlage auf dem Rücken liegend fixiert und die Bauchhöhle durch einen Schnitt mit einer Schere eröffnet. Dieser Schnitt wurde in der Medianebene nach kranial erweitert und das Sternum mittels einer kräftigen Schere durchtrennt. Außerdem wurde das Zwerchfell, um einen besseren Zugang zur Thoraxhöhle zu ermöglichen, beidseits inzidiert. Zum Einbringen des Perfusionskatheters wurde das Herz am Apex cordis linksventrikulär eröffnet. Dieser stumpfendige Katheter wurde im Folgenden durch den linken Ventrikel in die Aorta vorgeschoben. Nach Lagekontrolle unter Sicht wurde die Position des Katheters durch eine gebogene Klemme gesichert. Um eine ausreichende Perfusion der oberen Extremität zu gewährleisten, wurde die abdominale Aorta mit einer gummiüberzogenen Klemme abgeklemmt. Um ein Entweichen des Blutes aus dem Blutkreislauf zu ermöglichen, erfolgten Inzisionen der Leber und der Nase. Die Perfusion mit PBS wurde solange durchgeführt, bis die aus der Nase entweichende Flüssigkeit kein Blut mehr enthielt. Dafür waren in der Regel in etwa 300 ml PBS notwendig. Anschließend wurde die gleiche Menge an eisgekühltem PFA 4 % perfundiert. Nach der Perfusion wurde das Auge mit dem optischen Nerv vorsichtig entfernt. Für die zusätzliche Fixierung wurden die Cornea, die Linse und der Glaskörper vorsichtig entfernt und für eine weitere Stunde in PFA 4 % in einem Eppendorf-Cup eingelegt. Abschließend wurden die verbleibenden Augenschalen mit den daran befindlichen optischen Nerven in Sucrose 30 % für 24 h bei 4 °C dehydriert und für die Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.6 Immunhistologie

Die Immunhistologie dient der räumlich aufgelösten Darstellung von Proteinen in einem Gewebeverband. Das fixierte Gewebe wurde zunächst in einer Cryomatrix eingebettet und dann mit Hilfe eines Kryostaten (Leica) in 16 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden auf einem Objektträger aufgefangen und anschließend bei -20 °C eingefroren.

Zur Vorbereitung der Immunhistochemie wurden die Schnitte bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde eine Behandlung mittels TBS-T (pH 9,0) bei 60 °C durchgeführt, um die Antigene besser zu demaskieren. Daraufhin wurden die Objektträger mit 10% normalisiertem Ziegen Serum (normal goat serum, NGS) geblockt. Es folgte die Gabe eines anti-GAP43-Antikörpers in einer 1:250-fachen Verdünnung mit dem Ziel regenerierende Nervenfasern anzufärben (Schreyer und Skene 1993). Die Schnitte wurden im Anschluss über Nacht bei 4 °C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst zweimal in PBS gewaschen und dann mit einem Cy3-Antikörper für 45 min bei Raumtemperatur behandelt. Eine Kernfärbung erfolgte zusätzlich mit DAPI. Anschließend wurden die Schnitte in Mowiol eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt.

3. Ergebnisse

3.1 Neuroprotektion und Neuritenwachstum primärer retinaler Ganglienzellen nach HGF-Behandlung *in vitro*

Die durchgeführten *in vitro* Versuche dienen der Untersuchung der Effekte von HGF auf zellulärer Ebene. Zum einen sollten sie beantworten, ob der Wachstumsfaktor HGF einen Einfluss auf die Apoptose und damit auf das Überleben von retinalen Ganglienzellen ausübt. Zum anderen wurden die Effekte von HGF auf das Neuritenwachstum untersucht.

3.1.1 pRGC-Überleben nach Neurotrophindeprivation in Abhängigkeit von HGF-Behandlung

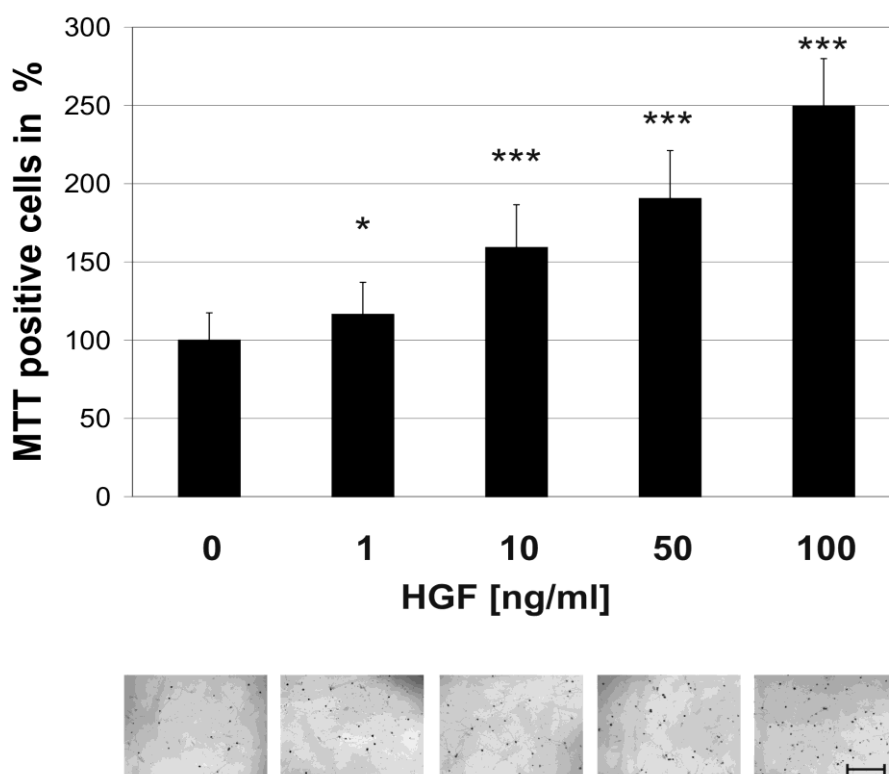


Abbildung 7: Anzahl MTT-positiver Zellen in Abhängigkeit von der HGF-Konzentration in Prozent der nicht behandelten Kontrollgruppe

Durch die Behandlung mit HGF zeigt sich ein konzentrationsabhängiges gesteigertes Überleben. Der Maßstabsbalken entspricht 250 µm.

Der Versuch diente der Überprüfung des Effekts der HGF-Behandlung auf das Überleben von retinalen Ganglienzellen nach Apoptoseinduktion durch Neurotrophindeprivation. Es wurden primäre retinale Ganglienzellen verwendet, um möglichst vergleichbare Ergebnisse zum *in vivo*-Modell zu erhalten. Den retinalen Ganglienzellen wurden hierfür die im Vollmedium ergänzten neurotrophen Faktoren entzogen. Zu diesem Zweck wurde das Medium nach 48 Stunden gegen ein Medium ohne die neurotrophen Faktoren Forskolin, BDNF, CNTF und Insulin ausgetauscht. Durch den fehlenden neurotrophen Support wird in den Zellen die Apoptose induziert. Durch die selektive Anfärbung lebender Zellen durch MTT, die auf der Reduktion und der damit verbundenen Farbänderung des Farbstoffs beruht, lassen sich die Effekte der HGF-Behandlung auf das Überleben nach Wachstumsfaktordeprivation durch das mikroskopische Auszählen MTT-positiver Zellen quantifizieren. Dieser Versuchsansatz wurde dreimal wiederholt, und die Ergebnisse der einzelnen Versuche wurden zusammengefasst, um die durchschnittliche Anzahl der überlebenden Zellen zu ermitteln. Zum Vergleich der unterschiedlichen Gruppen wurde die Anzahl der überlebenden Zellen in der Kontrollgruppe, in der lediglich ein Neurotrophinentzug erfolgte, als einhundert Prozent definiert. Die Anzahl der MTT-positiven Zellen der HGF-Behandlungsgruppen wurden mit der Anzahl der MTT-positiven Zellen aus der Kontrollgruppe korreliert.

Die Abbildung 7 illustriert die Ergebnisse nach Wachstumsfaktorentzug. Bei einer finalen Konzentration von 1 ng/ml überlebten $116 \% \pm 25 \%$ der primären retinalen Ganglienzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch eine weitere Steigerung der finalen Konzentration auf 10ng/ml stieg die Überlebensrate auf $159 \% \pm 27 \%$ an. Eine HGF-Konzentration von 50ng/ml führte zu einer weiteren Steigerung der Überlebensrate auf $191 \% \pm 31 \%$. Die meisten MTT-positiven Zellen fanden sich bei einer Endkonzentration von 100 ng/ml mit $249 \% \pm 30 \%$. Die Behandlung mit HGF nach Wachstumsfaktordeprivation führte somit zu einem signifikanten, konzentrationsabhängigen, gesteigerten Überleben der primären retinalen Ganglienzellen.

3.1.2 RGC-5-Überleben nach Serumdeprivation in Abhängigkeit von HGF-Behandlung

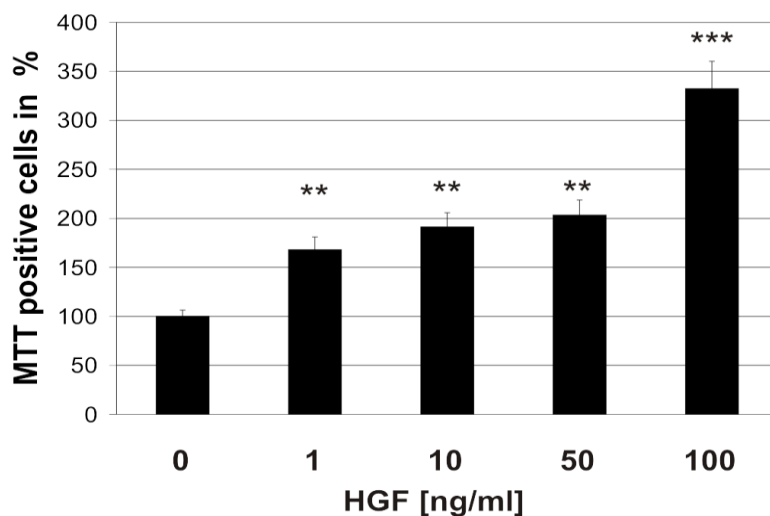


Abbildung 8: Überleben der RGC-5-Zellen nach Apoptoseinduktion durch eine Serumdeprivation

Nach einem Entzug des Serums führt eine HGF-Behandlung zu einer konzentrationsabhängigen Überlebenssteigerung der RGC-5-Zellen.

Die Effekte einer HGF-Behandlung auf das Überleben retinaler Ganglienzellen wurde ergänzend in der Zelllinie RGC-5 nach Serumdeprivation untersucht. Diese immortalisierte Zelllinie erlaubte eine ausreichende Materialgewinnung für die Herstellung von Proteinlysaten, die für die Western Blot-Analyse der neuroprotektiven Signalkaskaden benötigt wurden. Dazu wurden die RGC-5-Zellen in einem serumfreien Medium ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mittels Concanavalin A ausdifferenziert, und es erfolgte die erste Behandlung mit HGF in einer Konzentration von 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml. Zusätzliche Gaben von HGF erfolgten an Tag 3 und 5. Am siebten Tag wurden die lebenden Zellen mit MTT gefärbt und anschließend erfolgte die Auswertung mit einem 8x8 Zähllokular an 6 randomisierten Stellen. Dieser Versuchsansatz wurde mindestens dreimal wiederholt und statistisch ausgewertet. Die Kontrollgruppe wurde lediglich in serumfreiem Medium ausplattiert, während in den anderen Gruppen zusätzlich HGF in unterschiedlichen Zielkonzentrationen appliziert wurde. Die Anzahl der MTT-positiven Zellen in der Kontrollgruppe wurde dabei analog zu den Überlebensversuchen der primären retinalen Ganglienzellen als Referenzwert (100%) verwendet und mit den überlebenden Zellen der unterschiedlichen HGF-Konzentrationen verglichen. Es zeigte sich,

dass in Abhängigkeit von der HGF-Konzentration mehr RGC5-Zellen überlebten. Bei einer finalen Konzentration von 1ng/ml überlebten $168 \pm 13\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe $100 \pm 6\%$. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml zeigte sich eine Überlebensrate von $191 \pm 14\%$. Eine Behandlung mit einer finalen Konzentration von 50ng/ml steigerte das Überleben auf $203 \pm 15\%$. Die größte Anzahl überlebender RGC5-Zellen zeigte sich bei einer Konzentration von 100 ng/ml, bei der $332 \pm 28\%$ im Vergleich zu den unbehandelten RGC5-Zellen überlebten.

3.1.3 Neuritenauswachsung von pRGC nach HGF-Behandlung

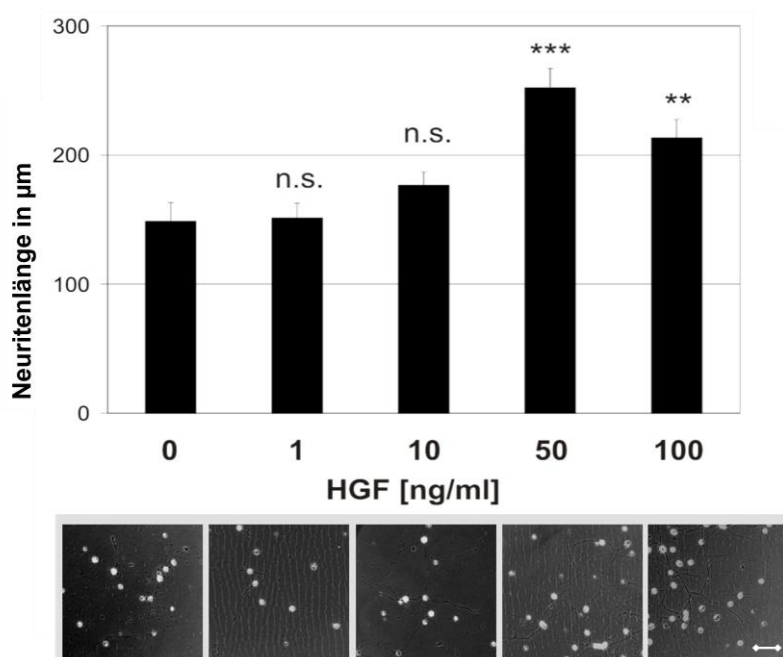


Abbildung 9: Neuritenlänge von primären retinalen Ganglienzellen (µm) in Abhängigkeit von der HGF-Konzentration (ng/ml)

Während HGF-Konzentrationen von 1 ng/ml und 10 ng/ml zu einer geringen, nicht signifikanten Zunahme des Neuritenwachstums führten, zeigten sich bei einer HGF-Konzentration von 50 ng/ml eine signifikante Zunahme der Neuritenlänge. Eine noch höhere HGF-Konzentration führte zu keiner weiteren Steigerung der Neuritenlänge. Im unteren Teil der Abbildung finden sich repräsentative, mikroskopische Bilder der korrespondierenden Kulturen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

In diesem Versuch wurde der Einfluss einer HGF-Behandlung auf das Auswachsen von Neuriten untersucht. Dazu wurden die primären retinalen Ganglienzellen in Vollmedium ausplattiert und nach 48 Stunden mit unterschiedlichen HGF-Konzentrationen behandelt. Nach weiteren 48 Stunden wurden mit einem Axiovert-

Mikroskop an vier randomisierten Stellen Bilder aufgenommen, die mit dem Softwareprogramm ImageJ halbautomatisch ausgewertet wurden.

Die primären Ganglienzellen, die ausschließlich im Vollmedium wuchsen, bildeten eine Gesamtneuritenlänge von $149 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$. Im Vergleich zu dieser Kontrollgruppe zeigten die primären retinalen Ganglienzellen, die mit einer HGF-Konzentration von 1 ng/ml behandelt wurden, ein nicht signifikantes, gering gesteigertes Längenwachstum von $151 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m}$. Bei einer HGF-Endkonzentration von 10 ng/ml erreichte die Summe der Neuriten eine größere Länge von $177 \mu\text{m} \pm 13 \mu\text{m}$. Das am stärksten ausgeprägte Längenwachstum fand sich bei einer finalen HGF-Konzentration von 50 ng/ml . Unter dieser Konzentration erreichten die Neuriten eine Gesamtlänge von $252 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$. Eine weitere Steigerung der HGF-Konzentration auf 100 ng/ml führte zu keiner zusätzlichen Steigerung des Neuritenlängenwachstums. Die Gesamtlänge der Neuriten, die mit einer HGF-Konzentration von 100 ng/ml behandelt wurden, zeigte sich mit $213 \mu\text{m} \pm 14 \mu\text{m}$ geringer, als die Neuritenlänge der Behandlungsgruppe mit einer HGF-Konzentration von 50 ng/ml .

Im Vergleich zu der nicht mit HGF behandelten Kontrollgruppe fand sich zusammenfassend eine nicht signifikant gesteigerte Zunahme des Neuritenwachstums für die HGF-Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml und signifikant längere Neuriten für die HGF-Konzentrationen von 50 ng/ml und 100 ng/ml .

3.1.4 Analyse neuroprotektiver Signalkaskaden

Um die zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen zu untersuchen, die nach der Interaktion von HGF mit dem C-Met-Rezeptor zu den antiapoptotischen und progenerativen Effekten führen, wurde eine Proteinanalyse mittels Western Blot durchgeführt. Die Western Blots wurden im Rahmen einer wissenschaftlichen Zusammenarbeit im Institut für Entwicklungsbiologie in Marseille durchgeführt (Tonges et al. 2011). Es wurden serumdeprivierte RGC-5-Zelllysate nach einer HGF-Behandlung mit einer Konzentration von 50 ng/ml zu verschiedenen Zeitpunkten auf das Vorliegen des C-Met-Rezeptors und dessen phosphorylierter Isoform untersucht. Ebenso wurde untersucht, welche Signalkaskaden durch den C-Met-Rezeptor akti-

viert werden. Hierfür wurden der ERK/MAPK- und der Akt-Signalweg und das Multiadaptorprotein Gab1 untersucht.

Bereits 10 min nach HGF-Gabe fand sich ein Anstieg des phosphorylierten C-Met-Rezeptors, der nach 30 min auf das Ausgangsniveau zurück fiel. Eine Veränderung der totalen Menge des C-Met-Rezeptors fand sich bis 30 min nach HGF-Behandlung nicht. Nachfolgend zeigte sich eine Herunterregulierung des Rezeptors im Sinne eines negativen feedback-Mechanismus im Zeitraum von 2 bis 6 Stunden nach HGF-Behandlung. Nach ca. 12 Stunden wurde wieder das Ausgangsniveau erreicht.

Die HGF-Gabe führt bereits nach 10 min zu einem schnellen Anstieg von phosphoMAPK, phosphoAkt und phosphoGab1. Der phosphoMAPK und phosphoAkt-Anstieg sistiert nach ca. 2 Stunden. Der Anstieg von phosphoGab1 fällt nach 6 bis 12 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau.

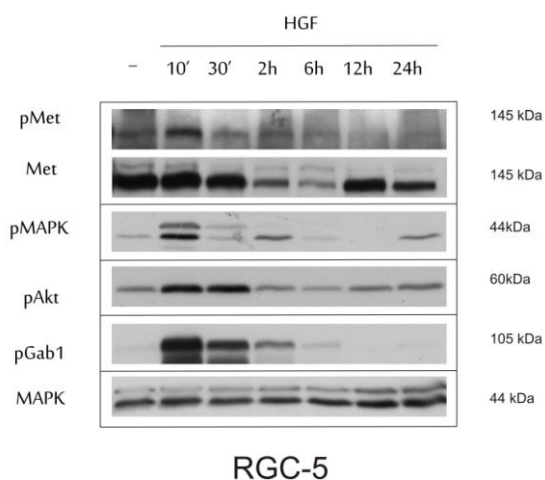


Abbildung 10: Repräsentative Western Blots von RGC-5-Lysaten zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer HGF-Behandlung

Nach 10 min findet sich ein Anstieg der phosphorylierten Isoform des C-Met-Rezeptors. Im Zeitraum von zwei bis sechs Stunden folgt eine Herunterregulierung des Rezeptors. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Zunahme der phosphorylierten Isoform des Multiadaptorproteins Gab1 und zu einer Aktivierung des ERK-/MAPK- und des Akt-Signalwegs.

Um die Rezeptoraktivierung und die Aktivierung der Signalkaskaden in der primären Zellkultur zu bestätigen, wurden pRGCs nach einem Wachstumsfaktorentzug für 10 Minuten mit 50ng/ml HGF behandelt. Analog zu den RGC-5-Zellen fand sich ein ver-

gleichbares Aktivierungsmuster der Signalkaskaden. 10 Minuten nach der HGF-Applikation zeigt sich eine Aktivierung des C-Met-Rezeptors mit nachfolgender Aktivierung von Gab1, Akt und MAPK.

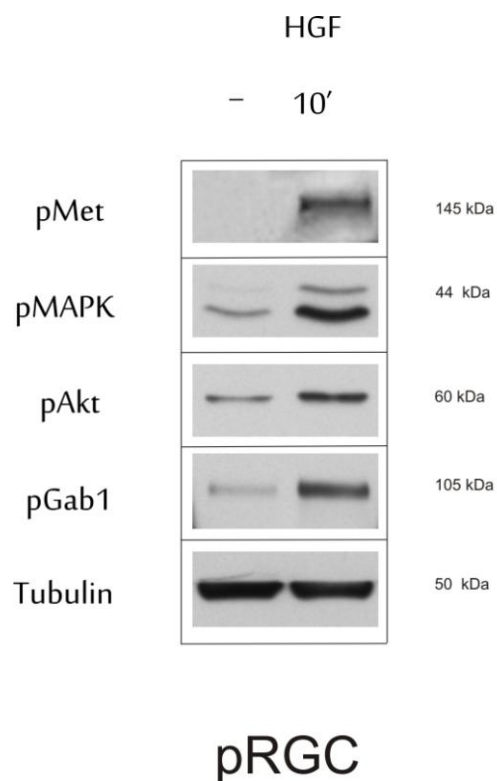


Abbildung 11: Western Blots von primären retinalen Ganglienzellen nach Wachstumsfaktorentzug vor und 10 Minuten nach HGF-Behandlung.

Nach Aktivierung des C-Met-Rezeptors findet sich wie bei den RGC-5-Zellen ein Anstieg der Phosphorylierung von Gab1, MAPK und Akt.

Um herauszufinden, ob das intravitreal applizierte pro-HGF tatsächlich zur Retina gelangt und zu einer Rezeptoraktivierung führt, wurden die Retinae von axotomierten Ratten nach HGF-Behandlung direkt nach der Axotomie lysiert. Um die proteolytische Spaltung nachzuweisen, wurden sowohl pro-HGF als auch die HGF- α -Kette detektiert.

Es zeigte sich nach einem Tag nach HGF-Behandlung ein Anstieg des pro-HGF und der HGF- α -Kette. Nach vier Tagen ist das pro-HGF fast vollständig zum Ausgangsniveau zurückgekehrt. Der Anstieg der HGF- α -Kette als Nachweis für das reife HGF hält in den HGF-behandelten Retinae bis über den vierten Tag hinaus an. Eine

Rezeptoraktivierung, nachgewiesen durch einen Anstieg der phosphorylierten Isoform des C-Met-Rezeptors, findet sich sowohl am ersten als auch am vierten Tag

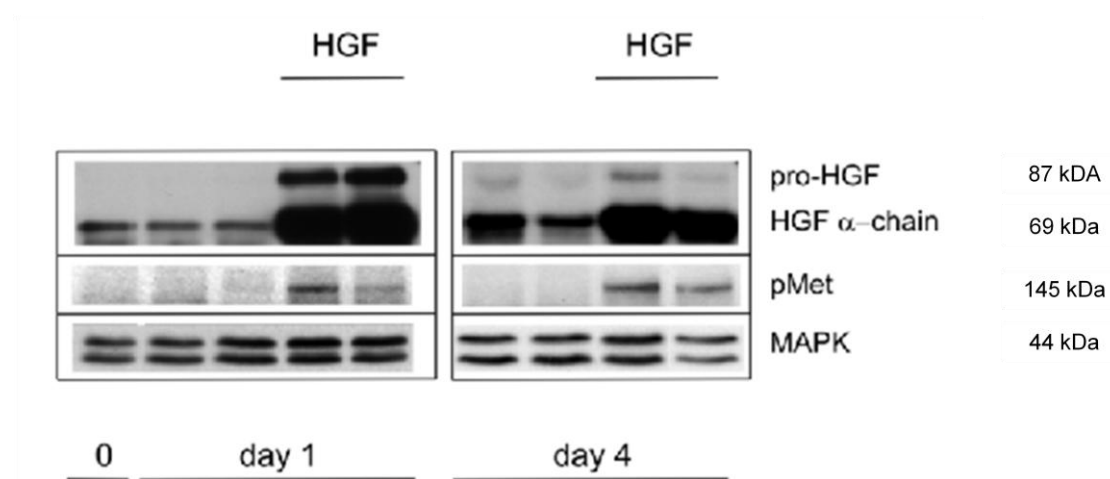


Abbildung 12: Western Blots von Retina-Lysaten nach Axotomie des optischen Nervs

Nach einer initialen HGF-Behandlung findet sich ein pro-HGF-Anstieg. Durch Spaltung in die biologisch aktive Form (Nachweis über HGF- α -Kette) fällt die pro-HGF-Menge bis ca. am vierten Tag das Ausgangsniveau erreicht wird. Das reife HGF zeigt sich am vierten Tag weiter erhöht. Nach der HGF-Applikation erfolgt eine Phosphorylierung des C-Met-Rezeptors.

3.2 Die Rolle von HGF bei Neuroprotektion und axonaler Regeneration retinaler Ganglienzellen *in vivo*

Die Effekte von HGF auf Apoptose und Regeneration von RGC wurden in zwei unterschiedlichen *in vivo* Modellen getestet. Als Modell zur Untersuchung der Apoptose wurde die Axotomie des Sehnervs gewählt. Um Regenerationsvorgänge im optischen Nerv zu untersuchen, wurde eine Crush-Läsion durchgeführt.

3.2.1 RGC-Überleben 14 Tage nach Axotomie

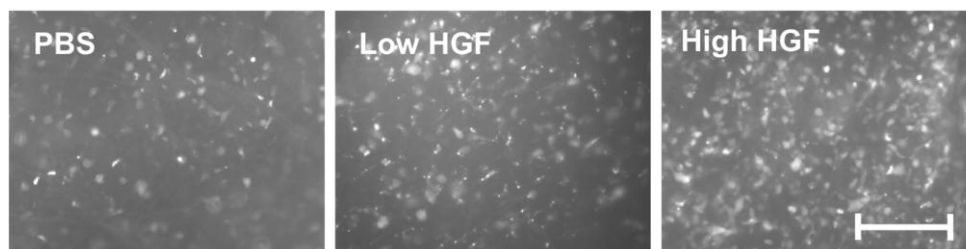
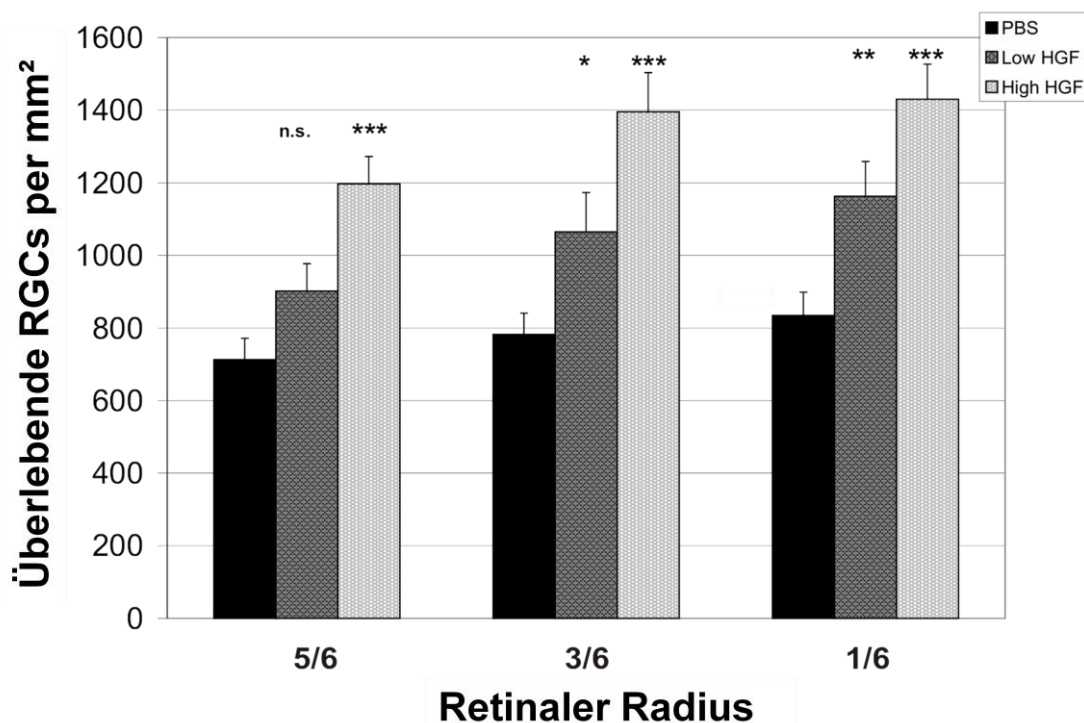


Abbildung 13: Anzahl überlebender RGC (pro mm² retinaler Oberfläche) 14 Tage nach Axotomie des optischen Nervs nach intravitrealer Injektion von HGF in zwei unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe

Es zeigt sich bei den HGF-behandelten Gruppen ein konzentrationsabhängiger, gesteigerter Überlebensvorteil für die RGC. Die repräsentativen Mikroskopien der einzelnen Gruppen sind im unteren Teil dargestellt.

Die Axotomie des optischen Nervs ist ein etabliertes Modell, um neuroprotektive Effekte *in vivo* zu untersuchen. Am Tag der Axotomie und drei Tage danach erfolgte die intravitreale Applikation von 3,5 µl HGF in einer Konzentration von 0,57 µg/µl (Low HGF) und 2,9 µg/µl (High HGF) bzw. 3,5 µl des Vehikels PBS. 14 Tage nach der Durchführung der Axotomie des Nervus opticus wurde das Überleben der retinalen Ganglienzellen untersucht. Durch die retrograde Darstellung der retinalen Ganglienzellen mittels intraoperativer Fluorogold-Applikation an den Nervenstümpfen

konnten die retinalen Ganglienzellen in den nach 14 Tagen hergestellten retinalen Flachpräparaten quantifiziert werden. Es wurden pro Retina insgesamt zwölf mikroskopische Gesichtsfelder mittels Zählkular ausgezählt. Dafür wurde der Abstand von der Retinamitte zur Peripherie gedrittelt und in jedem Drittel wurden die Fluorogold-positiven RGC ermittelt. Pro Retina wurden auf diese Weise alle vier Quadranten ausgewertet. Anschließend wurde die korrespondierenden Retinadrittel der Gruppen Low HGF und High HGF mit denen der Kontrolle verglichen. Da sich in den inneren Retinabereichen mehr retinale Ganglienzellen befinden als in den äußeren Retinabereichen, wurden nur die Bereiche der gleichen retinalen Radien miteinander verglichen.

Im äußeren Retinadrittel überlebten bei der Kontrollgruppe, bei der nur eine Injektion von 3,5 µl des Vehikels PBS erfolgte, im Mittel 713 ± 59 RGC/mm². Im Vergleich dazu fanden sich im gleichen Drittel bei der Low HGF-Gruppe mehr RGC/mm² (901 ± 47). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. In der Behandlungsgruppe mit der hohen HGF-Konzentration überlebten 1197 ± 76 RGC/mm² und damit signifikant mehr als in dem vergleichbaren Bereich der Kontrollgruppe.

Im mittleren Retinadrittel überlebten in der Kontrollgruppe 782 ± 59 RGC/mm². In der mit der niedrigen HGF-Konzentration behandelten Gruppe überlebten mit 1065 ± 48 RGC/mm² signifikant mehr RGC/mm². Eine weitere Steigerung des Überlebens zeigte sich in der Behandlungsgruppe mit der hohen HGF-Konzentration (1395 ± 108 RGC/mm²).

Im inneren Retinadrittel überlebten in der Kontrollgruppe 835 ± 64 RGC/mm². Signifikant mehr RGC/mm² konnten in der Gruppe mit der niedrig konzentrierten HGF-Behandlung (1163 ± 53) nachgewiesen werden. In der High-HGF Konzentration überlebten in diesem Bereich der Retina signifikant mehr RGC/mm² (1430 ± 96).

Zusammenfassend zeigt sich ein von der HGF-Konzentration abhängiger Überlebensvorteil 14 Tage nach Axotomie des optischen Nervs. Dabei sind alle Unterschiede signifikant im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrollgruppe, abgesehen von dem äußeren Retinadrittel, das mit der niedrigen HGF-Konzentration behandelt wurde. Hier zeigt sich lediglich ein Trend ohne statistische Signifikanz.

3.2.2 Axonale Regeneration 28 Tage nach Crush

Die Crush-Läsion des optischen Nervs ist ein etabliertes Modell, um Regenerationsvorgänge von ZNS-Neuronen zu untersuchen. Direkt im Anschluss an die durchgeführte Läsion und weitere 3 Tage später wurde eine intravitreale Injektion von 3,5 μl HGF in der hohen Konzentration (2,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oder PBS vorgenommen. 28 Tage nach der Crush-Läsion wurden die Ratten durch CO_2 -Inhalation getötet und anschließend perfundiert. Von den entnommenen Nerven wurden Kryoschnitte angefertigt, die mit einem GAP43-Antikörper gefärbt wurden. Von den Kryoschnitten wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop einzelne Teilaufnahmen des optischen Nervs in 20-facher Vergrößerung gemacht. Die Teilaufnahmen wurden anschließend mit dem Programm Corel Draw zu einem Gesamtbild des optischen Nervs zusammengefügt. Mit Hilfe eines an den Crush gelegten Maßbalkens wurden die GAP43-positiven Axone in 50 μm Schritten gezählt, die den entsprechenden Abstand vom Crush erreichten (siehe Abbildung 14).

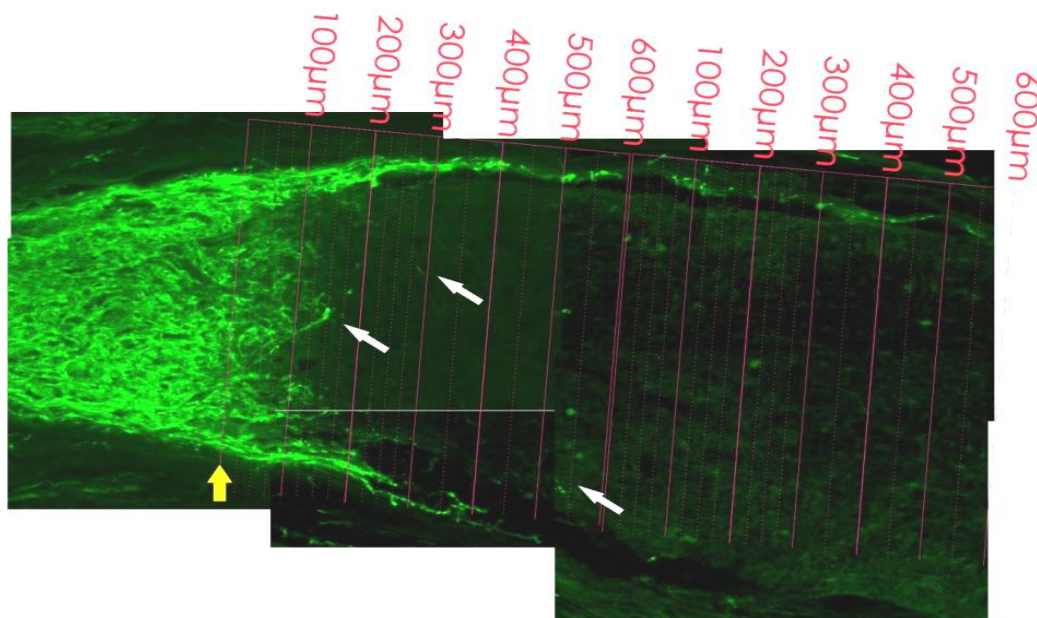


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der Untersuchungsmethode zur Beurteilung der axonalen Regeneration im optischen Nerv

Aus mikroskopischen Einzelaufnahmen in 20-facher Vergrößerung wurde ein Gesamtbild des optischen Nervs zusammengestellt. In grün sind GAP43-positive Axone immunhistochemisch markiert.

Anhand des roten Maßstabalkens kann die Regeneration der retinalen Ganglienzellaxone von der Crush-Läsion quantifiziert werden. Der gelbe Pfeil markiert den Crush und die weißen Pfeile zeigen exemplarisch regenerierende Axone.

Es wurden 6 Tiere als Kontrolle mit PBS behandelt. In der HGF-Gruppe wurden 4 Tiere ausgewertet. Direkt im Bereich der Crush-Läsion fanden sich im Mittel mehr GAP43-positive Axone in den mit HGF behandelten Nerven (24 ± 4) als in den Nerven der Kontrolltiere (15 ± 6). Auch distal der Crush-Stelle fanden sich in allen Abständen signifikant mehr GAP43-positive Axone nach einer HGF-Behandlung. Die am längsten ausgewachsenen Axone der HGF-Gruppe reichten $2000 \mu\text{m}$ über die Läsion hinaus, während die längsten Axone der Kontroll-Gruppe eine Entfernung von $1150 \mu\text{m}$ nicht überschritten (Abbildung 15).

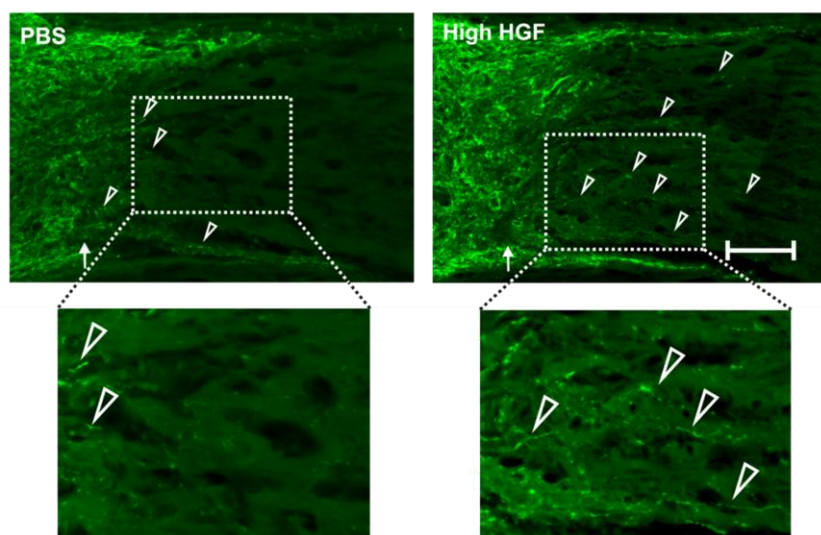
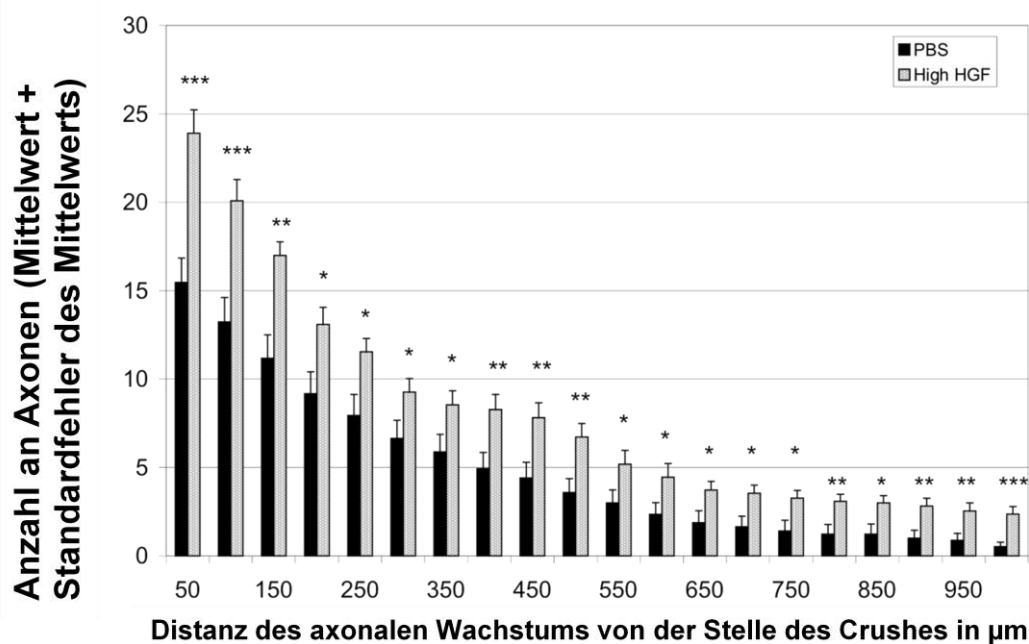


Abbildung 15: Quantifizierung der regenerierenden GAP43-positiven Axone bis 1000 µm 28 Tage nach Crush-Läsion von HGF-behandelten Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe

Im Bereich des Crush findet sich eine erhöhte Anzahl regenerierender Axone. Auch distal zeigen sich im gesamten untersuchten Verlauf des optischen Nervs mehr GAP43-positive Axone als in der Kontrollgruppe. Im unteren Teil der Abbildung sind aus einzelnen Teilaufnahmen zusammengesetzte Übersichtsaufnahmen des optischen Nervs demonstriert. Die GAP43-positiven Axone sind immunhistochemisch mit Cy2 gefärbt und wurden mit einem eGFP-Filter aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 150 µm. Ganz unten finden sich vergrößerte Ausschnitte der oberen Abbildungen.

4. Diskussion

Die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für die Behandlung traumatischer Nervenschädigungen und neurodegenerativer Erkrankungen stellt eine große Herausforderung für die aktuelle neurowissenschaftliche Forschung dar. Potentielle, antiapoptotische und proregenerative Behandlungsmethoden werden unter anderem in den klassischen Läsionparadigmen Axotomie und Crush-Läsion des optischen Nervs untersucht (Thanos und Thiel 1991). Die Wiederherstellung funktioneller axonaler Verbindungen ist im retinofugalen System durch einen progredienten Zelluntergang, eine geringe intrinsische Wachstumskapazität der ZNS-Neurone und durch eine regenerationsfeindliche Mikroumgebung erschwert. Diese Hinderungsgründe stellen therapeutische Angriffspunkte dar, die nicht für sich allein betrachtet werden dürfen, sondern vielmehr in einer kombinierten Therapie überwunden werden müssen. In früheren Untersuchungen mit läsionierten retinalen Ganglienzellen als Modell für neuroprotektive Mechanismen im zentralen Nervensystem konnten wir in unserer Arbeitsgruppe bereits einen Synergismus von überlebensfördernden und regenerationsfördernden Substanzen zeigen. Der neurotrophe Faktor CNTF und der ROCK-Inhibitor Y-27632 können bei gleichzeitiger Behandlung zwar zusätzliche Effekte auf Neuritenauswachsung und –regeneration erzielen, jedoch scheint eine Interaktion auf Ebene der Signalkaskaden eine noch ausgeprägtere Regenerationsantwort der retinalen Ganglienzellen zu verhindern (Lingor et al. 2008). Die Verwendung einer einzelnen Substanz, die sowohl überlebensfördernde als auch regenerationsfördernde Eigenschaften besitzt, erscheint somit auch vor dem Hintergrund von potentiellen Nebenwirkungen und Interaktionen für einen möglichen therapeutischen Einsatz besser geeignet.

Die Beobachtung, dass einige Säugetier-ZNS-Neurone, wie beispielsweise Neurone der thalamischen, retikulären und der tiefen, zerebellären Nuclei, die Fähigkeit zum Wiederauswachsen nach einer traumatischen Schädigung behalten, führte zur Suche nach molekularen Mechanismen, die das Überleben und das axonale Auswachsen verschiedener ZNS-Neurone fördern können (Anderson et al. 1998). Aufgrund ihrer antiapoptotischen und regenerationsfördernden Eigenschaften wurden unter anderem auch Wachstumsfaktoren in verschiedenen experimentellen Studien untersucht. So können beispielsweise BDNF und NT-4 das Auswachsen von frühen emb-

ryonalen und adulten retinalen Ganglienzellaxonen in signifikantem Ausmaß steigern (Avwenagha et al. 2003).

Auch der Wachstumsfaktor HGF kann durch seine multifunktionelle Wirkung den Zelltod in verschiedenen neuronalen Zelllinien nach unterschiedlichen Schädigungsmechanismen reduzieren (Ebens et al. 1996; Machida et al. 2004; Shibuki et al. 2002; Wong et al. 1997; Yamamoto et al. 1997). Beispielsweise werden die neuroprotektiven Effekte von HGF während der embryonalen Entwicklung von sympathischen und sensorischen Neuronen benötigt. Es liegen jedoch auch Hinweise vor, dass HGF nicht nur neuroprotektive Eigenschaften besitzt, sondern auch eine Rolle für die Regeneration von zentralen Axonen spielen könnte (Caton et al. 2000; Ebens et al. 1996). Beispielsweise konnte die Herpes-simplex-Virus-vermittelte Expression von HGF in einem Rückenmarksverletzungsmodell zu verbesserten endogenen Reparationsvorgängen und einer teilweisen funktionellen Wiederherstellung führen (Kitamura et al. 2007). Der Wachstumsfaktor HGF adressiert somit die beiden zentralen Ziele Überlebenssteigerung und Regenerationsförderung, die für die Wiederherstellung funktionsfähiger Neurone und ihrer axonaler Verbindungen erforderlich sind. HGF könnte daher ein interessantes Therapeutikum für traumatische Nervenschädigungen darstellen und darüber hinaus zur Behandlung verschiedener degenerativer Erkrankungen des Nervensystems oder zum Beispiel beim Glaukom eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde daher die Rolle des Wachstumsfaktors HGF für Neuroprotektion und Regeneration im optischen Nerv der Ratte untersucht.

4.1 Eine HGF-Behandlung führt zu einem gesteigerten Überleben von RGC-5-Zellen nach Serumdeprivation und von primären retinalen Ganglienzellen nach Neurotrophinentzug *in vitro*

Zahlreiche Studien demonstrieren die Rolle von HGF als Überlebensfaktor für eine Vielzahl von neuronalen Zellpopulationen in der Entwicklung und unter Stressbedingungen. Für embryonale Motoneurone stellt HGF einen wichtigen Überlebensfaktor dar und fungiert zusätzlich als sog. Chemoattraktant (Maina und Klein 1999). Bei der Axotomie fazialer neonataler Motoneurone konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass HGF auch nach einer mechanischen Läsion neuroprotektive Eigenschaften ausüben kann (Koyama et al. 2003). In Hypoglossusmotoneuronen zeigt sich nach Axotomie eine durch Degenerationsvorgänge bedingte verminderte Cholinacetyltransferase-Immunreaktivität. Behandelt man diese Neurone mit HGF,

findet man eine verstärkte Cholinacetyltransferaseexpression als Ausdruck einer verminderten Degeneration der Hypoglossusmotoneurone (Okura et al. 1999). Die Wirksamkeit von HGF in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen konnte in einem Modell der Amyotrophen Lateralsklerose mit transgenen Ratten durch intrathekale Applikation von HGF gezeigt werden. Neben einer verzögerten Degeneration der Motoneurone konnte zudem ein verzögerter Krankheitsverlauf beobachtet werden (Ishigaki et al. 2007). Diese Ergebnisse konnten für transgene HGF-überexprimierende Mäuse reproduziert werden. Durch die vermehrte Expression von HGF zeigte sich ein verlängertes Überleben der transgenen Mäuse (Sun et al. 2002). In einem Tierversuchsmodell zur Gentherapie des Morbus Parkinson führte eine Injektion von HGF-Plasmiden zu einem verzögerten Krankheitsbeginn und zu einem deutlich vermehrten Überleben dopaminergener Neurone. Während nach einer 6-Hydroxy-dopamin-Läsion nur weniger als 10% der dopaminergen Neurone überleben, zeigen sich 70% der dopaminergen Neurone vital, wenn eine Behandlung mit dem HGF-DNA-Plasmid erfolgte (Koike et al. 2006). Auch das Überleben von Hippocampusneuronen nach NMDA-induziertem exzitotoxischen Zelltod zeigt sich nach einer Behandlung mit HGF verbessert (Ishihara et al. 2005). Auch nach ischämischen Ereignissen kann HGF das Überleben neuronaler Zellen fördern. In verschiedenen Okklusionmodellen der Halsschlagader konnte die neuroprotektive Wirkung von HGF auf Hippocampusneurone durch einen verminderten, verzögerten Zelltod der Neurone gezeigt werden (Miyazawa et al. 1998; Niimura et al. 2006). Ebenso findet sich nach einer transienten, fokalen cerebralen Ischämie ein reduziertes Infarktvolumen durch eine intraventrikuläre HGF-Behandlung (Tsuzuki et al. 2000). Nach einer intrathekalen Injektion von HGF mittels genmodifizierter Knochenmarksstromazellen zeigten sich auch in einem spinalen Ischämie-Reperusionsmodell des Kaninchens neuroprotektive Effekte (Shi et al., 2010).

Auch für die verschiedenen Zelltypen der Retina sind bereits antiapoptische Effekte von HGF beschrieben. So wirkte intravitreal injiziertes HGF in einem Retina-Ischämie-Reperusionsmodell auf die verschiedenen retinalen Zellpopulationen der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerzellschicht neuroprotektiv (Shibuki et al. 2002). Die intravitreale Injektion von HGF hat außerdem einen positiven Einfluss auf die Photorezeptordegeneration nach Phototoxizität (Machida et al. 2004). Die Degeneration der Photorezeptoren und des retinalen Pigmentepithels nach systemischer Natriumiodat-Gabe wird durch eine intravitreale HGF-Injektion reduziert.

Damit liegen zahlreiche Untersuchungen vor, die die antiapoptotischen Effekte des Wachstumsfaktors HGF für verschiedene neuronale Zellen nach mechanischer, metabolischer, ischämischer Schädigung dokumentieren. Bis dato sind die neuroprotektiven Eigenschaften von HGF für retinale Ganglienzellen nicht untersucht worden.

In dieser Arbeit wurden daher die Effekte einer HGF-Behandlung auf das Überleben von retinalen Ganglienzellen zunächst *in vitro* untersucht. Dafür wurden zwei unterschiedliche Zelltodparadigmen verwendet. Zum einen wurden primären retinalen Ganglienzellen die Wachstumsfaktoren entzogen und zum anderen wurde ein Serumentzug bei der RGC-5-Zelllinie durchgeführt. Durch das Entziehen der Wachstumsfaktoren bzw. des Serums wird bei diesen Zellen die Apoptose induziert. Somit bieten die Zelltodparadigmen die Möglichkeit antiapoptotische Effekte zu untersuchen.

Es zeigte sich in der primären Ganglienzellkultur nach Neurotrophinentzug ein konzentrationsabhängiger Überlebensvorteil für die mit HGF behandelten Zellen (siehe Abbildung 7). Der antiapoptotische Effekt der HGF-Behandlung konnte in der RGC-5-Zelllinie reproduziert werden. Auch in der RGC-5-Zelllinie resultierte die HGF-Behandlung nach Serumdeprivation in einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Steigerung des Überlebens (siehe Abbildung 9). Die HGF-Behandlung führte bei beiden Zelllinien zu einem ähnlichen Effekt.

Die *in vitro*-Versuche zeigen somit, dass der Wachstumsfaktors HGF ein wichtiger Überlebensfaktor auch für retinale Ganglienzellen ist, der nach einer Verschlechterung der Umgebungsbedingungen, die Anzahl der vitalen Zellen konzentrationsabhängig erhöht. Im Weiteren werden die Ergebnisse der HGF-Behandlung mit denen anderer Wachstumsfaktoren verglichen um die Bedeutung von HGF für weitere Therapiestrategien einzuschätzen. Für den Vergleich wird die 50ng/ml-Konzentration verwendet, um die Effekte unterschiedlicher Wachstumsfaktorkonzentrationen berücksichtigen zu können. In der primären retinalen Ganglienzellkultur führte eine HGF-Behandlung in dieser Konzentration dazu, dass ca. doppelt so viele Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe überlebten (191% der Kontrollgruppe). Auch bei der RGC-5-Zelllinie zeigte sich nach einer HGF-Behandlung mit einer Konzentration von 50 ng/ml in etwa eine Verdoppelung der Anzahl überlebender Zellen (203% der Kontrollgruppe).

Demgegenüber führt CNTF in einer Konzentration von 50 ng/ml zu einem in etwa vierfach gesteigerten Überleben der RGC-5-Zellen nach Serumentzug. In primären retinalen Ganglienzellen verdoppelt sich die Anzahl überlebender Zellen nach Entzug der neurotrophen Faktoren und CNTF-Behandlung (Lingor et al. 2008). Behandelt man retinale Ganglienzellen mit BDNF in einer Konzentration von 50 ng/ml zeigt sich eine 5- bis 6-fach höhere Anzahl retinaler Ganglienzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In einer retinalen Mischkultur, in der neben den retinalen Ganglienzellen auch nicht neuronale Zellen ausplattiert werden, steigert sich das Überleben der retinalen Ganglienzellen nach einer BDNF-Behandlung mit der gleichen Konzentration sogar um den Faktor 9 (Johnson et al. 1986). Somit ist HGF ein Wachstumsfaktor, der das Überleben retinaler Ganglienzellen fördert, jedoch ist der Überlebensvorteil bei einigen, anderen Wachstumsfaktoren noch stärker ausgeprägt.

4.2 Das Überleben retinaler Ganglienzellen *in vivo* nach Axotomie wird durch eine HGF-Behandlung signifikant gesteigert

Zellkulturversuche spiegeln nur sehr begrenzt die physiologischen Verhältnisse *in vivo* wider. Allerdings waren diese Versuche für uns wichtig, um direkte Wirkungen von HGF auf RGC zu untersuchen, was *in vivo* aufgrund zahlreicher anderer vorhandener Zelltypen nicht möglich ist. Aus diesem Grund haben wir die Axotomie des optischen Nerven der Ratte als Modell für eine traumatische Nervenläsion gewählt, um die Effekte von HGF auf das Überleben von retinalen Ganglienzellen in einem Tierversuch zu untersuchen. Auch wenn die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind, liefern sie jedoch wichtige Hinweise für die noch ungenügend verstandenen Mechanismen, die sich bei der Apoptose und der Regeneration zentraler Neurone abspielen. Nach einer Axotomie des optischen Nerven und der damit verbundenen Deafferenzierung sterben über 90% der retinalen Ganglienzellen innerhalb von zwei Wochen durch Apoptose (Vidal-Sanz et al. 1988). Damit eignet sich dieses Modell, neuroprotektive Effekte *in vivo* zu untersuchen (Kermer et al 1998, Lingor et al 2005, Malik et al 2005).

In dieser Arbeit wurde der Effekt von HGF auf das Überleben von retinalen Ganglienzellen nach Axotomie untersucht. Die HGF-Behandlung erfolgte dabei am Tag der Axotomie und drei Tage nach der Axotomie durch intravitreale Applikation von 3,5 µl

HGF in einer Konzentration von 2,9 µg/µl (HGF high) beziehungsweise 0,57 µg/µl (HGF low). Im Vergleich dazu wurde bei der Kontrollgruppe nur 3,5 µl des Vehikels PBS injiziert.

Analog zu den Ergebnissen der *in vitro* Versuche findet sich auch in dem verwendeten Tierversuchsmodell ein konzentrationsabhängiger Überlebensvorteil für die retinalen Ganglienzellen, wenn eine Behandlung mit HGF erfolgte. Diese Untersuchungsergebnisse unterstreichen die Bedeutung von HGF als antiapoptotischer Wachstumsfaktor für retinale Ganglienzellen und machen HGF zu einem guten Kandidaten für weitere neuroprotektive Therapiestrategien. Neben HGF können auch andere Wachstumsfaktoren im Axotomie-Modell des optischen Nervs neuroprotektive Effekte ausüben. Der stärkste überlebensfördernde Wachstumsfaktor für retinale Ganglienzellen ist BDNF. So führt die einmalige oder mehrzeitige intravitreale Injektion von BDNF nach Axotomie des optischen Nervs zu einem Überlebensvorteil für die retinalen Ganglienzellen. Während nach zwei Wochen bei den Vehikel-injizierten Kontrollen nur noch ca. 10 % der ursprünglichen retinalen Ganglienzellen überlebten, führte die BDNF-Behandlung in dieser Studie zu einem in etwa vierfach gesteigerten Überleben der retinalen Ganglienzellen (Mansour-Robaey et al. 1994). In einer anderen Studie, in der ebenfalls die Effekte von neurotrophen Faktoren auf das Überleben retinaler Ganglienzellen untersucht wurden, überlebten im Vergleich zur Vehikel-injizierten Kontrollgruppe zwei- bis dreimal so viele retinale Ganglienzellen nach Axotomie des optischen Nervs und anschließender intravitrealer BDNF-Injektion. Das Neurotrophin NT-4 zeigte einen geringeren Überlebensvorteil im Vergleich zur BDNF-Behandlung. Hier überlebten im Vergleich zur Kontrolle 1,6-fach mehr retinale Ganglienzellen. Das ebenfalls untersuchte Neurotrophin NT-3 führte zu keiner signifikanten Überlebenssteigerung (Peinado-Ramon et al. 1996). Zweizeitige, intravitreale GDNF-Injektionen direkt nach der Axotomie des optischen Nervs führten ebenfalls zu einem konzentrationsabhängigen gesteigerten Überleben der retinalen Ganglienzellen. In diesem Versuch wurden Konzentrationen von 1 µg/µl und 5 µg/µl verwendet. Bei der geringeren GDNF-Konzentration überlebten ca. 2,5-mal mehr und bei der hohen GDNF-Konzentration ca. 2,8-mal mehr retinale Ganglienzellen im Vergleich zur Kontrolle, bei der das Cytochrom C injiziert wurde. Interessanterweise fanden sich in den Retinae, bei denen die Cytochrom C-Injektion erfolgten, mehr überlebende retinale Ganglienzellen, als wenn nur eine Axotomie und keine Injektion durchgeführt wurde. Dieses Phänomen führen die Autoren auf eine endogenen

Wachstumsfaktorexpression als Antwort auf die intravitreale Injektion zurück (Yan et al. 1999).

4.3 Das Auswachsen primärer retinaler Ganglienzellenaxone *in vitro* verbessert sich nach einer HGF-Behandlung

Für die Wiederherstellung funktionstüchtiger Nervenzellverbindungen nach beispielsweise einer traumatischen Nervenschädigung ist eine alleinige Überlebenssteigerung der verbleibenden Nervenzellen nicht ausreichend. Therapeutische Strategien müssen auch ein Wiederauswachsen von axonalen Verbindungen adressieren. Nur durch axonale Regeneration und der dadurch möglichen Wiederverbindung von Nervenzellen, können relevante Funktionen wie beispielsweise das Sehen, wiederhergestellt werden. Per se ist das regenerative Potential aufgrund des adulten Entwicklungsstands der zentralen Nervenzellen gering, sodass ZNS-Neurone nach einer Schädigung nur in einem geringen Ausmaß regenerieren (Campbell et al. 1999).

HGF weist neben seiner neuroprotektiven Wirkung auch wachstumsfördernde Eigenschaften für Nervenzellfortsätze auf. Insbesondere für Neurone in der Entwicklung sind wachstumsfördernde Wirkungen beschrieben. Während der neuronalen Entwicklung werden die Axone durch Wachstumsfaktoren als chemische Lockstoffe zu ihren Zielorganen geführt. Unter anderem werden beispielsweise aussprossende Motoneurone durch abstoßende und anziehende chemotrope Faktoren zu ihren Zielmuskeln geführt. Vom Mesenchym der Extremitäten gebildetes HGF wirkt in diesem Sinne für spinale Motoneurone als Chemoattraktant und hat so auf Neuriten einen wachstumsfördernden Effekt (Ebens et al. 1996; Maina und Klein 1999). HGF fördert auch das Auswachsen von embryonalen, neokortikalen Neuronen, und in der Mittelhirnkultur zeigte sich zudem nach einer HGF-Applikation eine fortgeschrittenere Differenzierung der Neuriten und stärkere Dopaminaufnahme von Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen (Hamanoue et al. 1996). Nach einer 48-stündigen Behandlung mit HGF verstärken sich das Wachstum und die Verzweigungen der Dendriten von Pyramidenzellen in Kulturen aus Kortexschnitten von postnatalen Mäusen (Gutierrez et al. 2004). Dass endogenes HGF auch die Ausbildung von olfaktorischen Nervfortsätzen während der Entwicklung fördert, wird durch ein vermindertes Längenwachstum der olfaktorischen Neurone nach einer Behandlung mit einem HGF-neutralisierenden Antikörper deutlich (Giacobini et al. 2007). In Zellkulturen aus sich

entwickelnden Hippocampuszellen zeigen sich nach einer HGF-Behandlung eine erhöhte Anzahl und ein gesteigertes Längenwachstum der Dendriten (Lim und Walikonis 2008). Eine Mutation im C-Met-Rezeptor von Mäusen, die zu einer gestörten Signalweiterleitung des HGF-Rezeptors führt, bewirkt eine deutlich reduzierte Innervation der Haut durch sensorische Nerven. Zusammen mit NGF steigert eine HGF-Behandlung das axonale Auswachsen von kultivierten Hinterwurzelganglienzellen, was die Bedeutung von HGF für sensorische Nervenzellen während der Entwicklung unterstreicht (Maina et al. 1997). Ein vergleichbarer Synergismus findet sich für sympathische Neurone während der Entwicklung. HGF führt in einer Kombination mit NGF zu einem gesteigerten Neuritenwachstum und die Anzahl der Verzweigungspunkte von sympathischen Axonen zeigt sich erhöht (Maina et al. 1998; Maina und Klein 1999). In einem *in vitro* Assay konnte zudem ein neuritogener Effekt auf sich entwickelnde thalamische Neurone nachgewiesen werden (Powell et al. 2003). HGF übt jedoch nicht nur einen wachstumsfördernden Effekt auf eine Vielzahl sich entwickelnder Neurone aus, sondern vermittelt auch bei adulten Neurone ein vermehrtes Wachstum der Nervenzellfortsätze. Analog zu sich entwickelnden Hippocampusneuronen führt HGF auch bei adulten Hippocampuszellen zu einer gesteigerten Anzahl an Dendriten, einer größeren Dendritenlänge und einer Ausbildung eines komplexeren Dendritennetzes (Tyndall et al. 2007). Ebenso werden adulte sensorische Neurone *in vitro* durch Vorläuferzellen von Oligodendrozyten durch HGF zur Ausbildung von Neuriten stimuliert (Zhang et al. 2006).

Zusammenfassend kann HGF als wichtiger Überlebensfaktor für zahlreiche neuronale Zelltypen charakterisiert werden, der auch das Wachstum von Nervenzellfortsätzen fördern kann. Ob HGF auch für das Auswachsen und die Regeneration von retinalen Ganglienzellen von Bedeutung ist, wurde daher zunächst *in vitro* anhand der primären retinalen Ganglienzellkultur untersucht.

In der primären retinalen Ganglienzellkultur lässt sich das Wachstum von zentralen Nervenzellen untersuchen. Nach einer Behandlung mit HGF zeigten die retinalen Ganglienzellen ein vermehrtes Auswachsen im Vergleich zur Kontrolle. Signifikante Unterschiede des Neuritenwachstums im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich für die finalen Konzentrationen von 50 ng/ml und 100 ng/ml. Diese Ergebnisse zeigen, dass HGF das axonale Wachstum auch von retinalen Ganglienzellen fördert. In der 50

ng/ml-Konzentration steigerte sich die Gesamtneuritenlänge ca. um den Faktor 1,6 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sie unterstreichen die Bedeutung von HGF für die Ausbildung und das Längenwachstum von Neuriten von zentralen Nervenzellen. Andere Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise CNTF, stimulieren jedoch das Neuritenwachstum noch stärker. In der vergleichbaren 50ng/ml-Konzentration steigert sich das Neuritenwachstum der retinalen Ganglien auf mehr als das Doppelte (Lingor et al. 2008).

4.4 Eine HGF-Behandlung führt zu einer gesteigerten Regeneration retinaler Ganglienzellenaxone *in vivo* nach Crush

In einem lebenden Organismus ist das Wiederauswachstum von retinalen Ganglienzellaxonen im Vergleich zu den *in vitro*-Versuchen zusätzlich durch die inhibitorischen Myelinproteine in der Umgebung der Nervenschädigung erschwert (Filbin 2003). Ein Tierversuchsmodell spiegelt daher vielmehr die tatsächlichen Wachstumsbedingungen wider. Lokale Effekte wie die Narbenbildung durch Gliazellen erschweren die Regeneration der Nerven zusätzlich. Durch die Glianarbe wird zum einen eine mechanische Barriere gebildet, zum anderen werden durch reaktive Astrozyten Moleküle, wie beispielsweise CSPG, exprimiert, die wachstumshemmende Eigenschaften besitzen (Qiu et al. 2000). Im ZNS-Gewebe finden sich zudem nach einer Verletzung diverse neurotoxische Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies, freie Radikale sowie ein Ungleichgewicht an exzitatorischen Aminosäuren und Ionen. Ebenso kann eine deutliche Entzündungsreaktion beobachtet werden, die die Regeneration der Nervenzellen zusätzlich erschwert (Rolls et al. 2009).

Die *in vivo*-Effekte einer HGF-Behandlung wurden bereits in peripheren und zentralen Nervenläsionsmodellen untersucht. Nach Crush-Läsion des peripheren Nervus ischiadicus führt HGF zu einer verbesserten histologischen und elektrophysiologischen Erholung des Nervs (Kato et al. 2005). Nach einer Transsektion des Nervus ischiadicus steigert die adenovirusvermittelte HGF-Behandlung die Regeneration und die Verzweigungen von regenerierenden Axonen in ein azelluläres Nerventransplantat (Li et al. 2008). Über die Effektivität einer proregenerativen HGF-Behandlung im zentralen Nervensystem *in vivo* liegen bisher nur die Ergebnisse einer Studie vor. Nach einer Rückenmarksläsion führte eine Herpes-simplex-Virus-vermittelte HGF-

Therapie zu einem vermehrten axonalen Wiederauswachsen und einer gebesserten funktionellen Erholung (Kitamura et al. 2007). *In vivo*-Untersuchungen mit rekombinantem HGF sind für ZNS-Neurone bisher nicht durchgeführt worden. Der Einsatz von rekombinantem HGF besitzt den Vorteil, dass die typischen Risiken einer therapeutischen Methode fehlen.

Nach Crush-Läsion des optischen Nervs der Ratte zeigte sich eine signifikant gesteigerte Regenerationsantwort. Es fanden sich im statistischen Mittel mehr regenerierende Axone in jeder Entfernung distal der Crush-Stelle. Darüber hinaus zeigten die Tiere, die mit HGF behandelt wurden, längere regenerierende Fasern von bis zu 2000 μm . Diese Ergebnisse zeigen die regenerationsfördernde Wirkung von HGF auf Axone von retinalen Ganglienzellen und sind somit der erste Beleg dafür, dass eine rekombinante HGF-Behandlung die Regeneration von Neuronen des zentralen Nervensystems verbessern kann. HGF ist daher ein vielversprechender Kandidat, um die Effekte auch in weiteren Modellen neurologischer Erkrankungen zu untersuchen, bei denen die regenerative Antwort gering ausfällt. Um die Bedeutung von HGF für zukünftige Therapiestrategien zu beurteilen, sollen die Ergebnisse dieser Studie denen anderer Wachstumsfaktoren gegenübergestellt und mit ihnen verglichen werden.

In unserer aktuellen Studie findet sich eine Zunahme der Anzahl regenerierender Axone um ca. das 1,4-fache. Fast alle Wachstumsfaktoren, die zu einem verbesserten Überleben der retinalen Ganglienzellen führten, konnten keinen nennenswerten Regenerationsvorteil im optischen Nerv auslösen. Beispielsweise der Wachstumsfaktor BDNF, der am stärksten das Überleben von retinalen Ganglienzellen förderte, führte zu keiner verbesserten Regenerationsantwort in ein wachstumspromotives, peripheres Nerventransplantat oder in den optischen Nerv selbst (Isenmann et al. 2003; Yip und So 2000). Jedoch gibt es auch Wachstumsfaktoren, die bereits positiv im Modell des optischen Nervs nach Crush-Läsion getestet wurden. Eine mehrmalige intravitreale Injektion von CNTF in einer Konzentration von ca. 0,5 μl direkt nach der Crush-Läsion und am dritten sowie sechsten Tag nach Läsion erhöht die Anzahl regenerierender Axone um das ca. 2,5-fache im Vergleich zur Vehikel-injizierten Kontrolle (Lingor et al. 2008). Die CNTF-vermittelte Regenerationsförderung ist somit stärker als die durch HGF vermittelten Effekte.

4.5 Aktivierung neuroprotektiver Signalkaskaden

Der HGF-Rezeptor C-Met ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der mit dem Multiadaptorprotein Gab1 interagiert (Maina et al. 2001). Nach einer Stimulation von RGC-5-Zellen und primären retinalen Ganglienzellen durch eine HGF-Behandlung lässt sich mittels Western Blot nach 10 min eine Phosphorylierung des C-Met-Rezeptors nachweisen (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Durch diese Transphosphorylierung wird der Rezeptor aktiviert. Nachfolgend wird das zentrale Adaptorprotein Gab1 ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. Gab1 führt anschließend zu einer raschen Aktivierung des MAPK-Signalwegs und des PI3K/Akt-Signalwegs. Diese beiden zentralen intrazellulären Signalwege spielen für das zelluläre Überleben nach einer Schädigung eine zentrale Rolle. Ebenso wie in der humanen Leiomyosarcoma-Zelllinie und in primären Körnerzellen des Kleinhirns scheint HGF seine neuroprotektiven Eigenschaften für retinale Gangleinzellen über den PI3K/Akt- und den MAPK-Signalweg zu vermitteln (Hossain et al. 2002; Xiao et al. 2001). Die funktionelle Relevanz der Expression des C-Met-Rezeptors in der adulten Retina der Ratte, insbesondere in der Ganglienzellschicht, wurde bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt. Es konnte eine Hochregulation der Expression der mRNA von HGF und des C-Met-Rezeptors während der Entwicklung nachgewiesen werden. Auch im Erwachsenenalter findet sich weiterhin eine hohe Expression dieser mRNA. Immunhistochemisch lässt sich darüber hinaus der C-Met-Rezeptor auf den wichtigsten, unterschiedlichen retinalen Neuronen während der Differenzierungsphase dieser Zellen nachweisen. Auch in den Retinae von adulten Ratten kann der C-Met-Rezeptor auf retinalen Ganglienzellen nachgewiesen werden (Sun et al. 1999). Die neuroprotektive Rolle der C-Met-Rezeptor-vermittelten Signalkaskade wurde anhand einer vorübergehenden intraokulären Druckerhöhung in einem retinalen Ischämie-Modell gezeigt. Nach einer Behandlung durch rekombinantes HGF überlebten mehr retinale Ganglienzellen, und es zeigten sich verbesserte Amplituden in den durchgeführten Elektroretinogrammen. 6 Stunden nach der retinalen Ischämie zeigte sich in den Retinae eine Hochregulation des C-Met-Rezeptors mit einem weiteren Anstieg nach 24 Stunden (Shibuki et al. 2002). In unserer Arbeitsgruppe wurde zusätzlich die Expression der mRNA des C-Met-Rezeptors in den Retinae der Ratten sowohl direkt nach als auch an Tag 1 und 4 nach Axotomie des optischen Nervs der Ratte untersucht. Die mRNA des C-Met-Rezeptors lässt sich bereits direkt nach der Axotomie im Sinne einer basalen Expression nachweisen. Die retinalen Ganglienzellen zeigten

dabei eine unterschiedlich starke Expression und wurden so in Subgruppen unterteilt. Die Anzahl der retinalen Ganglienzellen mit einer starken Expression steigt bereits nach einem Tag an und nimmt zum vierten Tag weiterhin zu (Tonges et al., 2011). Retinale Ganglienzellen können nach einer Läsion juvenile Wachstumsprogramme reaktivieren und werden so in einen progenerativen Status versetzt (Fischer et al. 2004). Die retinalen Ganglienzellen mit der starken mRNA-Expression des C-Met-Rezeptors könnten diese Umstellung vollzogen haben und so eine bessere Ansprechbarkeit auf eine Wachstumsfaktorstimulation entwickelt haben. Eine Behandlung zu diesen frühen Zeitpunkten scheint daher am vielversprechendsten.

Eine genetische Regulation des C-Met-Rezeptors selbst scheint jedoch nicht geeignet zu sein, das Überleben von retinalen Ganglienzellen nach Axotomie zu fördern. Vergleicht man C-Met-Rezeptor-überexprimierende Mäuse 1 Tag und 14 Tage nach Axotomie des optischen Nerven mit Mäusen, bei denen ein Funktionsverlust des C-Met-Rezeptors bzw. keine Veränderung der Rezeptoraktivität vorliegt, finden sich keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate der retinalen Ganglienzellen. Auch führt ein Funktionsverlust des C-Met-Rezeptors nicht zu einer Apoptoseinduktion während der Entwicklung der retinalen Ganglienzellen, weil sich initial eine gleiche Anzahl an retinalen Ganglienzellen findet. Der fehlende Anstieg des Überlebens der retinalen Ganglienzellen von transgenen C-Met-überexprimierenden Mäusen könnte durch die hauptsächlich intrazellulär gelegene Lokalisation von HGF und eine insuffiziente Sekretion begründet sein (Tonges et al., 2011) Eine verstärkte Expression von HGF selbst hingegen vermittelt in anderen genetischen Modellen neuroprotektive Effekte. Doppelt transgene Mäuse, die neben HGF auch das Superoxiddismutase 1 (G93A)-Gen als Modell für die Amyotrophe Lateralsklerose überexprimieren, zeigen geringere klinische Symptome, einen reduzierten Zelltod der Motoneurone, und die begleitende Gliose durch Astrozyten und Mikroglia verringert sich (Kadoyama et al. 2009; Sun et al. 2002). Die Phosphorylierung des C-Met-Rezeptors zeigt dabei eine spezifische Regulierung im Sinne einer verstärkten Aktivierung des C-Met-Signalwegs in den untersuchten fazialen Motoneuronen der transgenen Mäuse mit der Superoxid-Dismutase-Mutation (Kadoyama et al. 2009). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass HGF abhängig vom neuronalen Subtyp unterschiedliche Rollen im Bezug auf Krankheitsprozesse und während der Entwicklung spielen kann.

Dass rekombinantes HGF neben den neuroprotektiven Eigenschaften auch proregenerative Funktionen für neuronale Zellen vermittelt, ist eine neue Feststellung. Die Serin/Threonin-Kinase Akt fördert das neuronale Überleben. Neben dieser gut bekannten Funktion konnte eine Schlüsselrolle von Akt für viele Aspekte des Neuritenwachstums, einschließlich Längenwachstum, Verzweigung und Neuritendurchmesser, nachgewiesen werden. Die Neurotrophine NGF, BDNF und NT3 führen nach ihrer Bindung an Tyrosinkinaserzeptoren zu einer Aktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs (Huang und Reichardt 2003). Die Förderung des Neuritenwachstums wird wahrscheinlich durch im Signalweg nachgeschaltete Substrate wie die Glycogen Synthase Kinase 3 β , *mammalian target of rapamycin* (mTOR), Peripherin, CREB und δ -Catenin vermittelt (Read und Gorman 2009). So reguliert der PI3K/Akt/GSK-Signalweg frühe Stadien der Dendritenbildung in hippocampalen Neuronen. HGF führt zu einem gesteigerten hippocampalen Neuritenwachstum durch eine Akt-Aktivierung. Eine pharmakologische Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs blockiert diese HGF-Effekte (Lim und Walikonis 2008). Jedoch können auch weitere Signalwege, an der unter anderem die MAPK-Kaskade und cAMP beteiligt sind, das Neuritenwachstum abhängig vom Zelltyp fördern (Kamata et al. 2007; Piiper et al. 2002). In adulten Hinterwurzelganglienneuronen führt NGF zu einem gesteigerten Neuritenwachstum. Ein siRNA-vermitteltes Ausschalten von Akt blockiert das Neuritenwachstum, während eine Inhibition des MAPK-Signalwegs keinen signifikanten Effekt besitzt (Tucker et al. 2008).

5. Zusammenfassung und abschließende Bemerkungen

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen die Bedeutung von HGF als einem starken Überlebensfaktor für retinale Ganglienzellen, der außerdem die Regeneration retinaler Axone nach einer Läsion fördert. In Zusammenschau mit den bereits in anderen neuronalen Läsionsmodellen gewonnenen Erkenntnissen stellt HGF einen neurotrophen Faktor dar, welcher zunehmend für weitere Behandlungsstrategien bei neuronalen Funktionseinschränkungen an Bedeutung gewinnt. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass HGF als ein einzelnes Molekül durch die C-Met-Rezeptor-vermittelten Signalkaskaden nicht nur das Überleben fördert, sondern auch eine proregenerative Wirkung nach einer Läsion vermittelt. Diese Fähigkeiten spiegeln sich auch in der Rolle von HGF während der neuronalen Entwicklung wider, wo

HGF sowohl ein vermehrtes Überleben der Neurone bewirkt, aber auch die Neuritogenese stimuliert. Die Eignung als potentes Neuroprotektivum scheint direkt an die Rolle während der Entwicklung gebunden zu sein, indem HGF den läsierten Nervenzellen die neurotrophe Unterstützung gibt, die die Neurone bereits während der Entwicklung erfahren haben. So könnte in läsierten Neuronen ein entwicklungsassoziierter Stimulus reaktiviert werden und so eine starke proregenerative Wirkung vermittelt werden. Somit stellt HGF ein mögliches Therapeutikum für neurodegenerative und neurotraumatische Funktionsstörungen dar.

6. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CSPG	Chondroitinsulfatproteoglykan
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
GAB1	<i>GRB2-associated-binding protein 1</i>
GAP43	<i>growth associated protein 43</i>
GDNF	<i>glial cell derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein2</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HGF-A	<i>hepatocyte growth factor-activator</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
JNK	<i>Jun-amino-terminal kinase</i>
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
MAG	myelin associated glycoprotein
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>

MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
Met	<i>mesenchymal-epithelial transcription factor</i>
mRNA	<i>messenger-Ribunukleinsäure</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NT-3	Neurotrophin 3
NT-4	Neurotrophin 4
NT-5	Neurotrophin 5
OMgp	<i>oligodendrocyte myelin glycoprotein</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat
PI3K	Phosphoinosid-3-Kinase
PLC- γ	Phospholipase C γ
PC12	<i>Pheochromocytoma cell line - 12</i>
PNS	peripheres Nervensystem
RGC	retinale Ganglienzellen
ROCK	<i>rho-associated coiled-coil kinase</i>
RT-PCR	<i>real-time-Polymerasekettenreaktion</i>
SF	<i>scatter factor</i>
SHC	<i>Src homology 2 domain-containing</i>
SHP2	<i>Src homology domain 2 containing tyrosine phosphatase</i>
SOS	<i>Ras guanine nucleotide exchange factor son-of-sevenless</i>
Src	Sarcoma (<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>)
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TGF- β	<i>tumor growth factor-β</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
Trk	Tyrosinkinase
Tyr	Tyrosin

uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Apoptoseinduktion	4
Abbildung 2: Struktureller Aufbau des HGF-Moleküls	15
Abbildung 3: Aktivierung des C-Met-Rezeptors durch HGF	18
Abbildung 4: Struktureller Aufbau des C-Met-Rezeptors	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Axotomie des optischen Nervs	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Crush-Läsion.....	31
Abbildung 7: Anzahl MTT-positiver Zellen in Abhängigkeit von der HGF-Konzentration in Prozent der nicht behandelten Kontrollgruppe.....	34
Abbildung 8: Überleben der RGC-5-Zellen nach Apoptoseinduktion durch eine Serumdeprivation.....	36
Abbildung 9: Neuritenlänge von primären retinalen Ganglienzellen (μm) in Abhängigkeit von der HGF-Konzentration (ng/ml)	37
Abbildung 10: Repräsentative Western Blots von RGC-5-Lysaten zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer HGF-Behandlung	39
Abbildung 11: Western Blots von primären retinalen Ganglienzellen nach Wachstumsfaktorentzug vor und 10 Minuten nach HGF-Behandlung.....	40
Abbildung 12: Western Blots von Retina-Lysaten nach Axotomie des optischen Nervs	41
Abbildung 13: Anzahl überlebender RGC (pro mm^2 retinaler Oberfläche) 14 Tage nach Axotomie des optischen Nervs nach intravitrealer Injektion von HGF in zwei unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe.....	42
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der Untersuchungsmethode zur Beurteilung der axonalen Regeneration im optischen Nerv.....	44
Abbildung 15: Quantifizierung der regenerierenden GAP43-positiven Axone bis $1000 \mu\text{m}$ 28 Tage nach Crush-Läsion von HGF-behandelten Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	46

Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der Publikation

Tönges L, **Ostendorf T**, Lamballe F, Genestine M, Dono R, Koch JC, Bähr M, Maina F, Lingor P: Hepatocyte growth factor protects retinal ganglion cells by increasing neuronal survival and axonal regeneration *in vitro* and *in vivo*.

J Neurochem. 2011 Jun;117(5):892-903. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07257.x.

veröffentlicht.

Literaturverzeichnis

- Adams M Cavanagh JF (2004): "International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis (ICCP): another step forward for spinal cord injury research." *Spinal Cord* 42(5): 273-280.
- Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR Caroni P (1995): "Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice." *Cell* 83(2): 269-278.
- Anderson PN, Campbell G, Zhang Y Lieberman AR (1998): "Cellular and molecular correlates of the regeneration of adult mammalian CNS axons into peripheral nerve grafts." *Prog Brain Res* 117: 211-232.
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B Martinou JC (2001): "Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells." *J Biol Chem* 276(15): 11615-11623.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R Martinou JC (2000): "Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria." *Biochem J* 345 Pt 2: 271-278.
- Avwenagha O, Campbell G Bird MM (2003): "The outgrowth response of the axons of developing and regenerating rat retinal ganglion cells in vitro to neurotrophin treatment." *J Neurocytol* 32(9): 1055-1075.
- Bahr M (2000): "Live or let die - retinal ganglion cell death and survival during development and in the lesioned adult CNS." *Trends Neurosci* 23(10): 483-490.
- Bahr M Lingor P (2006): "Brain repair: Experimental treatment strategies, neuroprotective and repair strategies in the lesioned adult CNS." *Adv Exp Med Biol* 557: 148-163.
- Baker SJ Reddy EP (1998): "Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily." *Oncogene* 17(25): 3261-3270.
- Ballotti R, Lammers R, Scimeca JC, Dull T, Schlessinger J, Ullrich A Van Obberghen E (1989): "Intermolecular transphosphorylation between insulin receptors and EGF-insulin receptor chimeras." *EMBO J* 8(11): 3303-3309.
- Barres BA, Silverstein BE, Corey DP Chun LL (1988): "Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning." *Neuron* 1(9): 791-803.
- Bartsch U, Bandtlow CE, Schnell L, Bartsch S, Spillmann AA, Rubin BP, Hillenbrand R, Montag D, Schwab ME Schachner M (1995): "Lack of evidence that myelin-associated glycoprotein is a major inhibitor of axonal regeneration in the CNS." *Neuron* 15(6): 1375-1381.
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM Aguayo AJ (1994): "Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats." *J Neurosci* 14(7): 4368-4374.
- Birchmeier C Gherardi E (1998): "Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase." *Trends Cell Biol* 8(10): 404-410.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E Vande Woude GF (2003): "Met, metastasis, motility and more." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(12): 915-925.
- Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C Comoglio PM (1998): "Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway." *Nature* 391(6664): 285-288.
- Bolsover S, Fabes J Anderson PN (2008): "Axonal guidance molecules and the failure of axonal regeneration in the adult mammalian spinal cord." *Restor Neurol Neurosci* 26(2-3): 117-130.
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kniecik TE, Vande Woude GF Aaronson SA (1991): "Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product." *Science* 251(4995): 802-804.
- Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, et al. (1997): "Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results

- of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study." *JAMA* 277(20): 1597-1604.
- Bradbury EJ Carter LM (2011): "Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury." *Brain Res Bull* 84(4-5): 306-316.
- Bradke F, Fawcett JW Spira ME (2012): "Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration." *Nat Rev Neurosci* 13(3): 183-193.
- Cai D, Deng K, Mellado W, Lee J, Ratan RR Filbin MT (2002): "Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro." *Neuron* 35(4): 711-719.
- Campbell G, Holt JK, Shotton HR, Anderson PN, Bavetta S Lieberman AR (1999): "Spontaneous axonal regeneration after optic nerve injury in adult rat." *Neuroreport* 10(18): 3955-3960.
- Caton A, Hacker A, Naeem A, Livet J, Maina F, Bladt F, Klein R, Birchmeier C Guthrie S (2000): "The branchial arches and HGF are growth-promoting and chemoattractant for cranial motor axons." *Development* 127(8): 1751-1766.
- Chao MV (2003): "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." *Nat Rev Neurosci* 4(4): 299-309.
- Chaudhary P, Ahmed F, Quebada P Sharma SC (1999): "Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection." *Brain Res Mol Brain Res* 67(1): 36-45.
- Chierzi S, Ratto GM, Verma P Fawcett JW (2005): "The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK." *Eur J Neurosci* 21(8): 2051-2062.
- Choi DW (1988): "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system." *Neuron* 1(8): 623-634.
- Colombo ES, Menicucci G, McGuire PG Das A (2007): "Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes retinal angiogenesis through increased urokinase expression." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(4): 1793-1800.
- Danial NN Korsmeyer SJ (2004): "Cell death: critical control points." *Cell* 116(2): 205-219.
- David S Aguayo AJ (1981): "Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats." *Science* 214(4523): 931-933.
- Denny JB (2006): "Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43." *Curr Neuropharmacol* 4(4): 293-304.
- Dent EW Gertler FB (2003): "Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance." *Neuron* 40(2): 209-227.
- Dietz V (2002): "Proprioception and locomotor disorders." *Nat Rev Neurosci* 3(10): 781-790.
- Dragunow M, Xu R, Walton M, Woodgate A, Lawlor P, MacGibbon GA, Young D, Gibbons H, Lipski J, Muravlev A, et al. (2000): "c-Jun promotes neurite outgrowth and survival in PC12 cells." *Brain Res Mol Brain Res* 83(1-2): 20-33.
- Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG, Jr., Bladt F, Birchmeier C, Barres BA Tessier-Lavigne M (1996): "Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons." *Neuron* 17(6): 1157-1172.
- Ermak G Davies KJ (2002): "Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death." *Mol Immunol* 38(10): 713-721.
- Fernandes KJ, Fan DP, Tsui BJ, Cassar SL Tetzlaff W (1999): "Influence of the axotomy to cell body distance in rat rubrospinal and spinal motoneurons: differential regulation of GAP-43, tubulins, and neurofilament-M." *J Comp Neurol* 414(4): 495-510.
- Filbin MT (2003): "Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS." *Nat Rev Neurosci* 4(9): 703-713.
- Fischer D, Petkova V, Thanos S Benowitz LI (2004): "Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation." *J Neurosci* 24(40): 8726-8740.
- Fixman ED, Fournier TM, Kamikura DM, Naujokas MA Park M (1996): "Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein." *J Biol Chem* 271(22): 13116-13122.

- Foo RS, Mani K, Kitsis RN (2005): "Death begets failure in the heart." *J Clin Invest* 115(3): 565-571.
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2001): "Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration." *Nature* 409(6818): 341-346.
- Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V, Tulasne D (2007): "Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor." *Cell Death Differ* 14(4): 752-764.
- Furlan JC, Noonan V, Singh A, Fehlings MG (2011): "Assessment of impairment in patients with acute traumatic spinal cord injury: a systematic review of the literature." *J Neurotrauma* 28(8): 1445-1477.
- Garcia-Guzman M, Dolfi F, Zeh K, Vuori K (1999): "Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1 - Crk signaling complex formation." *Oncogene* 18(54): 7775-7786.
- Giacobini P, Messina A, Wray S, Giampietro C, Crepaldi T, Carmeliet P, Fasolo A (2007): "Hepatocyte growth factor acts as a motogen and guidance signal for gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration." *J Neurosci* 27(2): 431-445.
- Gianola S, Rossi F (2004): "GAP-43 overexpression in adult mouse Purkinje cells overrides myelin-derived inhibition of neurite growth." *Eur J Neurosci* 19(4): 819-830.
- GrandPre T, Li S, Strittmatter SM (2002): "Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration." *Nature* 417(6888): 547-551.
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM (2000): "Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein." *Nature* 403(6768): 439-444.
- Graziani A, Gramaglia D, Cantley LC, Comoglio PM (1991): "The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor associates with phosphatidylinositol 3-kinase." *J Biol Chem* 266(33): 22087-22090.
- Graziani A, Gramaglia D, dalla Zonca P, Comoglio PM (1993): "Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates the Ras-guanine nucleotide exchanger." *J Biol Chem* 268(13): 9165-9168.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ (1999): "Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death." *J Biol Chem* 274(2): 1156-1163.
- Guicciardi ME, Gores GJ (2009): "Life and death by death receptors." *FASEB J* 23(6): 1625-1637.
- Gutierrez H, Dolcet X, Tolcos M, Davies A (2004): "HGF regulates the development of cortical pyramidal dendrites." *Development* 131(15): 3717-3726.
- Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, et al. (1998): "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo." *Cell* 94(3): 339-352.
- Hamanoue M, Takemoto N, Matsumoto K, Nakamura T, Nakajima K, Kohsaka S (1996): "Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on central nervous system neurons in vitro." *J Neurosci Res* 43(5): 554-564.
- Hausmann ON (2003): "Post-traumatic inflammation following spinal cord injury." *Spinal Cord* 41(7): 369-378.
- Heldin CH (1995): "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." *Cell* 80(2): 213-223.
- Honda S, Kagoshima M, Wanaka A, Tohyama M, Matsumoto K, Nakamura T (1995): "Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain: implication as neurotrophic factor." *Brain Res Mol Brain Res* 32(2): 197-210.
- Hossain MA, Russell JC, Gomez R, Latterra J (2002): "Neuroprotection by scatter factor/hepatocyte growth factor and FGF-1 in cerebellar granule neurons is phosphatidylinositol 3-kinase/akt-dependent and MAPK/CREB-independent." *J Neurochem* 81(2): 365-378.
- Hsieh SH, Ferraro GB, Fournier AE (2006): "Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase." *J Neurosci* 26(3): 1006-1015.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001): "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.

- Huang EJ Reichardt LF (2003): "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." *Annu Rev Biochem* 72: 609-642.
- Huebner EA Strittmatter SM (2009): "Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems." *Results Probl Cell Differ* 48: 339-351.
- Hurlbert RJ (2000): "Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care." *J Neurosurg* 93(1 Suppl): 1-7.
- Isenmann S Bahr M (1997): "Expression of c-Jun protein in degenerating retinal ganglion cells after optic nerve lesion in the rat." *Exp Neurol* 147(1): 28-36.
- Isenmann S, Kretz A Cellierino A (2003): "Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration." *Prog Retin Eye Res* 22(4): 483-543.
- Isenmann S, Wahl C, Krajewski S, Reed JC Bahr M (1997): "Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat." *Eur J Neurosci* 9(8): 1763-1772.
- Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H Itoyama Y (2007): "Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model." *J Neuropathol Exp Neurol* 66(11): 1037-1044.
- Ishihara N, Takagi N, Niimura M, Takagi K, Nakano M, Tanonaka K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T Takeo S (2005): "Inhibition of apoptosis-inducing factor translocation is involved in protective effects of hepatocyte growth factor against excitotoxic cell death in cultured hippocampal neurons." *J Neurochem* 95(5): 1277-1286.
- Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S Moolenaar WH (1994): "Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho." *J Cell Biol* 126(3): 801-810.
- Jelsma TN, Friedman HH, Berkelaar M, Bray GM Aguayo AJ (1993): "Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve." *J Neurobiol* 24(9): 1207-1214.
- Johnson EO, Charchanti A Soucacos PN (2008): "Nerve repair: experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration." *Injury* 39 Suppl 3: S37-42.
- Johnson JE, Barde YA, Schwab M Thoenen H (1986): "Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells." *J Neurosci* 6(10): 3031-3038.
- Kadoyama K, Funakoshi H, Ohya-Shimada W, Nakamura T, Matsumoto K Matsuyama S (2009): "Disease-dependent reciprocal phosphorylation of serine and tyrosine residues of c-Met/HGF receptor contributes disease retardation of a transgenic mouse model of ALS." *Neurosci Res* 65(2): 194-200.
- Kamata Y, Shiraga H, Tai A, Kawamoto Y Gohda E (2007): "Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by the medium-chain fatty acid octanoic acid." *Neuroscience* 146(3): 1073-1081.
- Kaplan DR Miller FD (2000): "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." *Curr Opin Neurobiol* 10(3): 381-391.
- Kato N, Nemoto K, Nakanishi K, Morishita R, Kaneda Y, Uenoyama M, Ikeda T Fujikawa K (2005): "Nonviral HVJ (hemagglutinating virus of Japan) liposome-mediated retrograde gene transfer of human hepatocyte growth factor into rat nervous system promotes functional and histological recovery of the crushed nerve." *Neurosci Res* 52(4): 299-310.
- Kermer P, Klocker N, Labes M, Thomsen S, Srinivasan A Bahr M (1999): "Activation of caspase-3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo." *FEBS Lett* 453(3): 361-364.
- Kermer P, Ankerhold R, Klocker N, Krajewski S, Reed JC Bahr M (2000): "Caspase-9: involvement in secondary death of axotomized rat retinal ganglion cells in vivo." *Brain Res Mol Brain Res* 85(1-2): 144-150.
- Kerr JF, Wyllie AH Currie AR (1972): "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-257.
- Kim JE, Li S, GrandPre T, Qiu D Strittmatter SM (2003): "Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B." *Neuron* 38(2): 187-199.

- Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, et al. (2007): "Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury." *J Neurosci Res* 85(11): 2332-2342.
- Klein RL, McNamara RK, King MA, Lenox RH, Muzyczka N Meyer EM (1999): "Generation of aberrant sprouting in the adult rat brain by GAP-43 somatic gene transfer." *Brain Res* 832(1-2): 136-144.
- Knoferle J, Koch JC, Ostendorf T, Michel U, Planchamp V, Vutova P, Tonges L, Stadelmann C, Bruck W, Bahr M, et al. (2010): "Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(13): 6064-6069.
- Koeberle PD Ball AK (1998): "Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy." *Vision Res* 38(10): 1505-1515.
- Koike H, Ishida A, Shimamura M, Mizuno S, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y Morishita R (2006): "Prevention of onset of Parkinson's disease by in vivo gene transfer of human hepatocyte growth factor in rodent model: a model of gene therapy for Parkinson's disease." *Gene Ther* 13(23): 1639-1644.
- Korsching S (1993): "The neurotrophic factor concept: a reexamination." *J Neurosci* 13(7): 2739-2748.
- Koyama J, Yokouchi K, Fukushima N, Kawagishi K, Higashiyama F Moriizumi T (2003): "Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on neonatal facial motor neurons." *Neurol Res* 25(7): 701-707.
- Krammer PH (1999): "CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die." *Adv Immunol* 71: 163-210.
- Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, Vopat K, Lambert W, Sheedlo HJ, Pang IH, Shade D, Wordinger RJ, Yorio T, et al. (2001): "Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line." *Brain Res Mol Brain Res* 86(1-2): 1-12.
- Kugler S, Meyn L, Holzmüller H, Gerhardt E, Isenmann S, Schulz JB Bahr M (2001): "Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors." *Mol Cell Neurosci* 17(1): 78-96.
- Lai AZ, Abella JV Park M (2009): "Crosstalk in Met receptor oncogenesis." *Trends Cell Biol* 19(10): 542-551.
- Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, McMeel JW, Kazlauskas A Rahimi N (2000): "Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity." *Am J Pathol* 156(4): 1337-1344.
- Lee R, Kermani P, Teng KK Hempstead BL (2001): "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." *Science* 294(5548): 1945-1948.
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G McKerracher L (1999): "Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration." *J Neurosci* 19(17): 7537-7547.
- Lewin GR Barde YA (1996): "Physiology of the neurotrophins." *Annu Rev Neurosci* 19: 289-317.
- Li H, Zhu H, Xu CJ Yuan J (1998): "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* 94(4): 491-501.
- Li Z, Peng J, Wang G, Yang Q, Yu H, Guo Q, Wang A, Zhao B Lu S (2008): "Effects of local release of hepatocyte growth factor on peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts." *Exp Neurol* 214(1): 47-54.
- Lim CS Walikonis RS (2008): "Hepatocyte growth factor and c-Met promote dendritic maturation during hippocampal neuron differentiation via the Akt pathway." *Cell Signal* 20(5): 825-835.
- Lindwall C Kanje M (2005): "The Janus role of c-Jun: cell death versus survival and regeneration of neonatal sympathetic and sensory neurons." *Exp Neurol* 196(1): 184-194.
- Lingor P, Koeberle P, Kugler S Bahr M (2005): "Down-regulation of apoptosis mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death in vivo." *Brain* 128(Pt 3): 550-558.
- Lingor P, Tonges L, Pieper N, Bermel C, Barski E, Planchamp V Bahr M (2008): "ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion cells." *Brain* 131(Pt 1): 250-263.

- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998): "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* 94(4): 481-490.
- Machida S, Tanaka M, Ishii T, Ohtaka K, Takahashi T, Tazawa Y (2004): "Neuroprotective effect of hepatocyte growth factor against photoreceptor degeneration in rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(11): 4174-4182.
- Maina F, Klein R (1999): "Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons." *Nat Neurosci* 2(3): 213-217.
- Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R (1997): "Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons." *Genes Dev* 11(24): 3341-3350.
- Maina F, Hilton MC, Andres R, Wyatt S, Klein R, Davies AM (1998): "Multiple roles for hepatocyte growth factor in sympathetic neuron development." *Neuron* 20(5): 835-846.
- Maina F, Pante G, Helmbacher F, Andres R, Porthin A, Davies AM, Ponzetto C, Klein R (2001): "Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes." *Mol Cell* 7(6): 1293-1306.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994): "Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(5): 1632-1636.
- Maroun CR, Naujokas MA, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Park M (2000): "The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase." *Mol Cell Biol* 20(22): 8513-8525.
- Maroun CR, Holgado-Madruga M, Royal I, Naujokas MA, Fournier TM, Wong AJ, Park M (1999): "The Gab1 PH domain is required for localization of Gab1 at sites of cell-cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase." *Mol Cell Biol* 19(3): 1784-1799.
- Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK (1993): "Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA." *Am J Pathol* 143(3): 949-958.
- Mason MR, Campbell G, Caroni P, Anderson PN, Lieberman AR (2000): "Overexpression of GAP-43 in thalamic projection neurons of transgenic mice does not enable them to regenerate axons through peripheral nerve grafts." *Exp Neurol* 165(1): 143-152.
- Matteucci E, Castoldi R, Desiderio MA (2001): "Hepatocyte growth factor induces pro-apoptotic genes in HepG2 hepatoma but not in B16-F1 melanoma cells." *J Cell Physiol* 186(3): 387-396.
- Mey J, Thanos S (1993): "Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo." *Brain Res* 602(2): 304-317.
- Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA (1995): "Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture." *Neuron* 15(4): 805-819.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, et al. (2004): "LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex." *Nat Neurosci* 7(3): 221-228.
- Miura Y, Yanagihara N, Imamura H, Kaida M, Moriwaki M, Shiraki K, Miki T (2003): "Hepatocyte growth factor stimulates proliferation and migration during wound healing of retinal pigment epithelial cells in vitro." *Jpn J Ophthalmol* 47(3): 268-275.
- Miyazawa T, Matsumoto K, Ohmichi H, Katoh H, Yamashima T, Nakamura T (1998): "Protection of hippocampal neurons from ischemia-induced delayed neuronal death by hepatocyte growth factor: a novel neurotrophic factor." *J Cereb Blood Flow Metab* 18(4): 345-348.
- Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L (1991): "Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor." *Cell* 67(5): 901-908.
- Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A (1986): "Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(17): 6489-6493.

- Nakamura T, Sakai K, Matsumoto K (2011): "Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor." *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1: 188-202.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S (1989): "Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor." *Nature* 342(6248): 440-443.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002): "Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors." *Cell* 110(4): 429-441.
- Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM (1992): "Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor." *EMBO J* 11(13): 4825-4833.
- Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, et al. (1991): "Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor." *EMBO J* 10(10): 2867-2878.
- Ng J, Luo L (2004): "Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways." *Neuron* 44(5): 779-793.
- Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE (2002): "Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1." *J Neurosci* 22(23): 10368-10376.
- Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Ishihara N, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T, Takeo S (2006): "Prevention of apoptosis-inducing factor translocation is a possible mechanism for protective effects of hepatocyte growth factor against neuronal cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 26(11): 1354-1365.
- Ohtaka K, Machida S, Ohzeki T, Tanaka M, Kurosaka D, Masuda T, Ishii T (2006): "Protective effect of hepatocyte growth factor against degeneration of the retinal pigment epithelium and photoreceptor in sodium iodate-injected rats." *Curr Eye Res* 31(4): 347-355.
- Ohya W, Funakoshi H, Kurosawa T, Nakamura T (2007): "Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat." *Brain Res* 1147: 51-65.
- Okajima A, Miyazawa K, Kitamura N (1990): "Primary structure of rat hepatocyte growth factor and induction of its mRNA during liver regeneration following hepatic injury." *Eur J Biochem* 193(2): 375-381.
- Okura Y, Arimoto H, Tanuma N, Matsumoto K, Nakamura T, Yamashita T, Miyazawa T, Matsumoto Y (1999): "Analysis of neurotrophic effects of hepatocyte growth factor in the adult hypoglossal nerve axotomy model." *Eur J Neurosci* 11(11): 4139-4144.
- Oppenheim RW (1996): "The concept of uptake and retrograde transport of neurotrophic molecules during development: history and present status." *Neurochem Res* 21(7): 769-777.
- Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (1996): "Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(4): 489-500.
- Pellicci G, Giordano S, Zhen Z, Salcini AE, Lanfrancone L, Bardelli A, Panayotou G, Waterfield MD, Ponzetto C, Pellicci PG, et al. (1995): "The mitogenic and motogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein." *Oncogene* 10(8): 1631-1638.
- Piiper A, Dikic I, Lutz MP, Leser J, Kronenberger B, Elez R, Cramer H, Muller-Esterl W, Zeuzem S (2002): "Cyclic AMP induces transactivation of the receptors for epidermal growth factor and nerve growth factor, thereby modulating activation of MAP kinase, Akt, and neurite outgrowth in PC12 cells." *J Biol Chem* 277(46): 43623-43630.
- Planchamp V, Bermel C, Tonges L, Ostendorf T, Kugler S, Reed JC, Kermer P, Bahr M, Lingor P (2008): "BAG1 promotes axonal outgrowth and regeneration in vivo via Raf-1 and reduction of ROCK activity." *Brain* 131(Pt 10): 2606-2619.

- Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G Comoglio PM (1994): "A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family." *Cell* 77(2): 261-271.
- Potts RA, Dreher B Bennett MR (1982): "The loss of ganglion cells in the developing retina of the rat." *Brain Res* 255(3): 481-486.
- Powell EM, Muhlfriedel S, Bolz J Levitt P (2003): "Differential regulation of thalamic and cortical axonal growth by hepatocyte growth factor/scatter factor." *Dev Neurosci* 25(2-4): 197-206.
- Qiu J, Cai D Filbin MT (2000): "Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS." *Glia* 29(2): 166-174.
- Raivich G, Bohatschek M, Da Costa C, Iwata O, Galiano M, Hristova M, Nateri AS, Makwana M, Riera-Sans L, Wolfer DP, et al. (2004): "The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration." *Neuron* 43(1): 57-67.
- Read DE Gorman AM (2009): "Involvement of Akt in neurite outgrowth." *Cell Mol Life Sci* 66(18): 2975-2984.
- Reichardt LF (2006): "Neurotrophin-regulated signalling pathways." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1473): 1545-1564.
- Rizzuto R Pozzan T (2006): "Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences." *Physiol Rev* 86(1): 369-408.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G Barde YA (1990): "Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor." *Neuron* 4(4): 487-492.
- Rolls A, Shechter R Schwartz M (2009): "The bright side of the glial scar in CNS repair." *Nat Rev Neurosci* 10(3): 235-241.
- Rong Y Distelhorst CW (2008): "Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis." *Annu Rev Physiol* 70: 73-91.
- Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A Logan A (2004): "Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration." *Glia* 46(3): 225-251.
- Schlessinger J (1993): "How receptor tyrosine kinases activate Ras." *Trends Biochem Sci* 18(8): 273-275.
- Schmeer C, Straten G, Kugler S, Gravel C, Bahr M Isenmann S (2002): "Dose-dependent rescue of axotomized rat retinal ganglion cells by adenovirus-mediated expression of glial cell-line derived neurotrophic factor in vivo." *Eur J Neurosci* 15(4): 637-643.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E Birchmeier C (1995): "Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development." *Nature* 373(6516): 699-702.
- Schreyer DJ Skene JH (1993): "Injury-associated induction of GAP-43 expression displays axon branch specificity in rat dorsal root ganglion neurons." *J Neurobiol* 24(7): 959-970.
- Schuller-Weidekamm C (2008): "[Cervical spine injury. Diagnosis, prognosis and management]." *Radiologe* 48(5): 480-487.
- Schwab ME Thoenen H (1985): "Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors." *J Neurosci* 5(9): 2415-2423.
- Shi E, Jiang X, Wang L, Akuzawa S, Nakajima Y Kazui T "Intrathecal injection of hepatocyte growth factor gene-modified marrow stromal cells attenuates neurologic injury induced by transient spinal cord ischemia in rabbits." *Anesthesiology* 113(5): 1109-1117.
- Shi E, Jiang X, Wang L, Akuzawa S, Nakajima Y Kazui T (2010): "Intrathecal injection of hepatocyte growth factor gene-modified marrow stromal cells attenuates neurologic injury induced by transient spinal cord ischemia in rabbits." *Anesthesiology* 113(5): 1109-1117.
- Shibuki H, Katai N, Kuroiwa S, Kurokawa T, Arai J, Matsumoto K, Nakamura T Yoshimura N (2002): "Expression and neuroprotective effect of hepatocyte growth factor in retinal ischemia-reperfusion injury." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(2): 528-536.
- Shimizu S Tsujimoto Y (2000): "Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 577-582.

- Short DJ, El Masry WS Jones PW (2000): "High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective." *Spinal Cord* 38(5): 273-286.
- Silver J Miller JH (2004): "Regeneration beyond the glial scar." *Nat Rev Neurosci* 5(2): 146-156.
- Sipeki S, Bander E, Buday L, Farkas G, Bacsy E, Ways DK Farago A (1999): "Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to Erk1/Erk2 MAP kinase activation associated with hepatocyte growth factor-induced cell scattering." *Cell Signal* 11(12): 885-890.
- Skene JH Virag I (1989): "Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43." *J Cell Biol* 108(2): 613-624.
- Smaili S, Hirata H, Ureshino R, Monteforte PT, Morales AP, Muler ML, Terashima J, Oseki K, Rosenstock TR, Lopes GS, et al. (2009): "Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging." *An Acad Bras Cienc* 81(3): 467-475.
- Sun W, Funakoshi H Nakamura T (1999): "Differential expression of hepatocyte growth factor and its receptor, c-Met in the rat retina during development." *Brain Res* 851(1-2): 46-53.
- Sun W, Funakoshi H Nakamura T (2002): "Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS." *J Neurosci* 22(15): 6537-6548.
- Teng FY Tang BL (2006): "Axonal regeneration in adult CNS neurons--signaling molecules and pathways." *J Neurochem* 96(6): 1501-1508.
- Thanos S Thiel HJ (1991): "Mechanisms governing neuronal degeneration and axonal regeneration in the mature retinofugal system." *J Cell Sci Suppl* 15: 125-134.
- Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM Silver J (2004): "Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury." *J Neurosci* 24(29): 6531-6539.
- Tonges L, Ostendorf T, Lamballe F, Genestine M, Dono R, Koch JC, Bahr M, Maina F Lingor P (2011): "Hepatocyte growth factor protects retinal ganglion cells by increasing neuronal survival and axonal regeneration in vitro and in vivo." *J Neurochem* 117(5): 892-903.
- Trusolino L, Bertotti A Comoglio PM (2010): "MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(12): 834-848.
- Tsuzuki N, Miyazawa T, Matsumoto K, Nakamura T, Shima K Chigasaki H (2000): "Hepatocyte growth factor reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats." *Acta Neurochir Suppl* 76: 311-316.
- Tucker BA, Rahimtula M Mearow KM (2008): "Src and FAK are key early signalling intermediates required for neurite growth in NGF-responsive adult DRG neurons." *Cell Signal* 20(1): 241-257.
- Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C, Puchois E, Moumen A, Maina F, Mehlen P, et al. (2004): "Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage." *Mol Cell Biol* 24(23): 10328-10339.
- Tyndall SJ, Patel SJ Walikonis RS (2007): "Hepatocyte growth factor-induced enhancement of dendritic branching is blocked by inhibitors of N-methyl-D-aspartate receptors and calcium/calmodulin-dependent kinases." *J Neurosci Res* 85(11): 2343-2351.
- van den Berg ME, Castellote JM, Mahillo-Fernandez I de Pedro-Cuesta J (2010): "Incidence of spinal cord injury worldwide: a systematic review." *Neuroepidemiology* 34(3): 184-192; discussion 192.
- Vargas GA, Hoeflich A Jehle PM (2000): "Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality." *Kidney Int* 57(4): 1426-1436.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR Berneman ZN (2005): "Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer." *Ann Hematol* 84(10): 627-639.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP, Bray GM Aguayo AJ (1988): "Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil." *Exp Neurol* 102(1): 92-101.
- Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM Aguayo AJ (1988): "Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats." *J Neurosci* 8(1): 265-280.

- Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM Aguayo AJ (1993): "Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats." *J Neurobiol* 24(1): 23-36.
- Wajant H (2002): "The Fas signaling pathway: more than a paradigm." *Science* 296(5573): 1635-1636.
- Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Padiaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK Zarnegar R (2002): "A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met." *Mol Cell* 9(2): 411-421.
- Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ Segal RA (2001): "Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response." *Nat Neurosci* 4(10): 981-988.
- Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J Birchmeier W (1996): "Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis." *Nature* 384(6605): 173-176.
- Wilson JR, Singh A, Craven C, Verrier MC, Drew B, Ahn H, Ford M Fehlings MG (2012): "Early versus late surgery for traumatic spinal cord injury: the results of a prospective Canadian cohort study." *Spinal Cord*.
- Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M Poo MM (2002): "A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein." *Nat Neurosci* 5(12): 1302-1308.
- Wong V, Glass DJ, Arriaga R, Yancopoulos GD, Lindsay RM Conn G (1997): "Hepatocyte growth factor promotes motor neuron survival and synergizes with ciliary neurotrophic factor." *J Biol Chem* 272(8): 5187-5191.
- Wyllie AH (2010): ""Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology." *Mol Neurobiol* 42(1): 4-9.
- Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF Testa JR (2001): "Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(1): 247-252.
- Yamamoto Y, Livet J, Pollock RA, Garces A, Arce V, deLapeyriere O Henderson CE (1997): "Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons." *Development* 124(15): 2903-2913.
- Yan Q, Wang J, Matheson CR Urich JL (1999): "Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." *J Neurobiol* 38(3): 382-390.
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E Mizuno K (1998): "Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization." *Nature* 393(6687): 809-812.
- Yip HK So KF (2000): "Axonal regeneration of retinal ganglion cells: effect of trophic factors." *Prog Retin Eye Res* 19(5): 559-575.
- Yiu G He Z (2006): "Glial inhibition of CNS axon regeneration." *Nat Rev Neurosci* 7(8): 617-627.
- Zhang YW, Denham J Thies RS (2006): "Oligodendrocyte progenitor cells derived from human embryonic stem cells express neurotrophic factors." *Stem Cells Dev* 15(6): 943-952.
- Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O Tessier-Lavigne M (2003): "Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice." *Neuron* 38(2): 213-224.
- Zheng B, Atwal J, Ho C, Case L, He XL, Garcia KC, Steward O Tessier-Lavigne M (2005): "Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(4): 1205-1210.
- Zhou FQ Snider WD (2006): "Intracellular control of developmental and regenerative axon growth." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1473): 1575-1592.
- Zou H, Li Y, Liu X Wang X (1999): "An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." *J Biol Chem* 274(17): 11549-11556.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. P. Lingor, für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die hervorragende Betreuung während der Promotionsarbeit. In zahlreichen Diskussionen gab er mir wertvolle Anregungen, die zum Gelingen dieser Promotionsschrift beigetragen haben. Meinem Betreuer Dr. med. L. Tönges danke ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Thematik, Diskussionen von Ergebnissen, Hilfestellung bei dem Anfertigen der Statistiken und die kontinuierliche, gute Betreuung. Ein besonderer Dank gilt auch unserer medizintechnischen Assistentin E. Barski, die mich in zahlreiche Methoden einarbeitete und bei technischen Fragen stets ansprechbar war. Ich möchte mich ebenso bei allen Co-Doktoranten und Arbeitsgruppenmitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Lingor für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe um Dr. Flavio Maina am *Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy* für die fruchtbare Zusammenarbeit bei diesem Projekt, insbesondere bei der Herstellung der Western Blots, der Diskussion der Ergebnisse und Zusammenstellung des veröffentlichten Manuskriptes.

Weiterer Dank geht an Dr. Krishnamoorthy vom *Department of Cell Biology and Genetics der University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, Texas USA*, der die RGC-5-Zelllinie als ein freundliches Geschenk zur Verfügung stellte.

Lebenslauf

Ich wurde am 02.06.1982 in Damme geboren. 1989 wurde ich an der katholischen Grundschule Osterfeine eingeschult. Von 1993-1995 besuchte ich die HSO Damme , um 1995 zum Gymnasium Damme zu wechseln, wo ich 2002 mein Abitur erlangte. Im Sommersemester 2003 begann ich mein Humanmedizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen. Im Frühjahr 2005 legte ich die Ärztliche Vorprüfung (Physikum) ab und habe im Frühjahr 2009 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden. Seit dem Juli 2009 bin ich als Assistenzarzt in der Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen tätig und befinde mich dort in der Facharztausbildung zum Neurologen.