

Kinom und cochleäre Spiralganglienzellen (cSGZ): Inhibitoren von Proteinkinasen beeinflussen auch die Neuritenlänge von cSGZ. *M Bernhardt, K Pak, W Shehata-Dieler, AF Ryan, R Hagen*

Einleitung: Beschädigte cochleäre Spiralganglienzellen (cSGZ) können die Ursache einer sensorineuralen Schwerhörigkeit sein. Die Funktion von Cochleaimplantaten wird durch defekte cSGZ beeinflusst. Das Wachstumsverhalten der Spiralganglienzellen ist daher seit langem im Fokus zahlreicher Studien. Die genauen Wachstumsmechanismen für cSGZ sind bisher nur unvollständig erforscht. Proteinkinasen spielen für zelluläre Signalwege eine entscheidende Rolle, indem Signale durch eine reversible Phosphorylierung modifiziert werden. Manning und Kollegen untersuchten 2002 humane Proteinkinasen und stellten fest, dass das menschliche Genom 518 Gene für Proteinkinasen umfasst. Die Gesamtheit dieser Gene wird als Kinom bezeichnet. Eine selektive Hemmung einer Proteinkinase durch einen Inhibitor erlaubt eine gezielte Beeinflussung und Untersuchung zellulärer Signalwege. Mit Hilfe einer Proteinkinase-Inhibitor-Bibliothek können Zellen und ihr Wachstumsverhalten in einem Screening-Verfahren untersucht werden. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass mehrere Inhibitoren von Proteinkinasen die Neuritenanzahl von cSGZ signifikant vermindern. In einem zweiten Schritt wurde nun der Einfluss von Proteinkinase-Inhibitoren auf das Längenwachstum der Nervenfortsätze der cSGZ untersucht.

Material und Methoden: Aus den Cochleae von p3-5 Sprague-Dawley-Ratten wurden SGZ-Präparate gewonnen und in 48-Well-Platten kultiviert. Es wurden kommerziell erhältliche Proteinkinase-Inhibitor-Bibliotheken mit 160 verschiedenen Inhibitoren (InhibitorSelect™ Protein Kinase Inhibitor Library I und II © EMD Millipore Corporation, USA) eingesetzt. Die Inhibitoren wurden in Zellkulturmedium verdünnt und den Spiralganglienexplantaten hinzugefügt. Es wurden drei Inhibitorkonzentrationen hergestellt (0.05, 0.5 und 5 µmol) und je Konzentrationsstufe drei cSGZ-Präparate verwendet. Dabei wurden 3 Gruppen, die Inhibitorgruppe, eine BDNF-Kontrollgruppe und eine Negativ-Kontrollgruppe untersucht. Dem Nährmedium der Inhibitorgruppe wurde der Proteinkinase-Inhibitor sowie BDNF hinzugefügt. Bei BDNF-Kontrollgruppe wurde nur BDNF beigegeben. Negativ-Kontrollgruppe erhielt weder einen Inhibitor noch BDNF. Nach Fixierung der Explantate erfolgte die Färbung mit einem primären (Neurofilament-Ak) und einem sekundären Antikörper (Immunfluoreszenz-Ak), (**Abb.1**). Die Auswertung der Explantate wurde mit Hilfe einer Mikroskopkamera vorgenommen. Für jedes Explantat wurden manuell die fünf längsten Neuriten ausgemessen. Anschließend erfolgte eine statistische Auswertung.

Ergebnisse: Die Neuritenlänge in der BDNF-Kontrollgruppe und in der Negativ-Kontrollgruppe betrug 373,11 µm bzw. 281,90 µm (p=0,0029). 17 von 160 Proteinkinase-Inhibitoren zeigten im Vergleich zu den BDNF-Kontrollen einen signifikanten Einfluss auf das Längenwachstum (**Tab.1**). Dieser Effekt war bereits in der niedrigsten Konzentration nachweisbar. Bei 14 von 17 Inhibitoren war ein Einfluss auf das Längenwachstum in allen drei Konzentrationen nachweisbar. Nur 4 der 17 Proteinkinasen zeigten in Vorstudien auch einen Einfluss auf die Neuritenanzahl. Eine Analyse der signifikanten Proteinkinasen ergab in der Mehrzahl Kinasen, die bei der Zellproliferation oder dem BDNF-Signalweg eine entscheidende Rolle spielen.

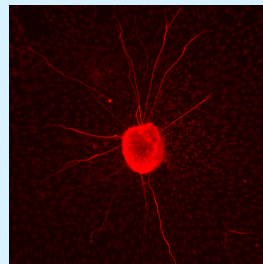


Abbildung 1: cSGZ; Färbung mit einem primären (Neurofilament-Ak) und einem sekundären Antikörper (Immunfluoreszenz-Ak DyLight594)

Inhibitoren (n=17)	Familie
Akt Inhibitor IV	AGC
Akt Inhibitor V, Triciribine	AGC
PDK1/Akt/Fit Dual Pathway Inhibitor	AGC, Atypical, TK
PI-103	Lipid
Herbimycin A, Streptomyces sp.	TK
PD 158780	TK
PD 174265	TK
PDGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor III	TK
PDGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor IV	TK
PI3-Ky Inhibitor	Lipid
Rapamycin	AGC
Src Kinase Inhibitor I	TK
Staurosporine, Streptomyces sp.	AGC, CAMK, TK
Aloisine A, RP107	CMGC
Cdk/Crk Inhibitor	CMGC
K-252a, Nocardiopsis sp.	AGC
SB 218078	CAMK

Tabelle 1: 17 Proteinkinase-Inhibitoren und ihre zugehörige Proteinkinasefamilie. Grün: Inhibitoren mit Einfluss auf Neuritenlänge und Neuritenanzahl. AGC: PKA, PKG, and PKC Containing Group; TK: Tyrosine Kinase Group; CMGC: Cdk, MAP, GSK3, and CLK Containing Group; CAMK: Ca2+/Calmodulin Dependent Protein Kinases; CK: Casein Protein Kinases; Lipid: Lipid Kinases; Atypical: Atypical Kinases

Diskussion und Zusammenfassung: 160 Proteinkinase-Inhibitoren wurden auf ihren Effekt auf das Wachstum von cSGZ untersucht. 17 Kinaseinhibitoren beeinflussten das Neuritenlängenwachstum signifikant. Dabei fanden sich bereits bekannte Kinasen, die eine Rolle im Zellwachstum sowie in der Zellproliferation spielen. Auch Kinasen des BDNF-Signalweges wurden identifiziert. Die gefundenen Proteinkinasen und deren zelluläre Signalwege müssen nun weiter erforscht werden, um daraus klinische Anwendungsmöglichkeiten zu erarbeiten. Weitere Versuche mit einer größeren Anzahl an Zellexplantaten sind geplant, um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen und zu überprüfen.