

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Antiapoptotische und neuroprotektive Wirkung von Thiaminderivaten
*in vitro***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Paul Ohlmeier
geboren am 07.05.1996 in Göttingen

Betreuer: Apl. Prof. Dr. med. Christian Scheller
Zweitbetreuer: Prof. Dr. med. Christian Strauss

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte, Halle (Saale)
Prof. Dr. Ilker Eyüpoglu, Dresden

Datum der Verteidigung: 01.03.2024

Referat

Bei operativen Eingriffen sind die Zellen des Nervensystems (NS) verschiedenen Stressoren ausgesetzt, was neben Primär- auch zu Sekundärschädigung am Nervengewebe führen kann. Hier spielen vorrangig Prozesse der sterilen Neuroinflammation eine Rolle, in dessen Kontext die Zellen u.a. oxidativem Stress ausgesetzt sind (1, 2).

Bisher gibt es kaum Erkenntnisse über neuroprotektive Substanzen, welche einer operativen Nervenschädigung vorbeugen können. Als solche hat sich bereits das Nimodipin herausgestellt (3-5). Thiaminhydrochlorid (THCl) und dessen Vorstufen Sulbuthiamin (SBT), Dibenzoylthiamin (DBT), und Benfothiamin (BFT) könnten sich möglicherweise ebenfalls als neuroprotektiv erweisen. Thiamin ist ein essentieller Cofaktor im Energiestoffwechsel (6, 7), dessen Mangel die Nervenleitgeschwindigkeit senkt (6) und zur Wernicke-Enzephalopathie führen kann (8). Auch ein Zusammenhang von Thiaminmangel und neurodegenerativen Erkrankungen (9), sowie traumatischen Hirnverletzungen (7) wird angenommen. Zusätzlich wurde bereits eine neurotoxische Wirkung des Thiaminmangels (7) und eine antiapoptotische Funktion des Thiamins und BFT für Endothelzellen beschrieben (10), was zur Untersuchung einer neuroprotektiven Wirkung Anlass gab. Aufgrund dessen war das Ziel dieser Studie zu untersuchen, ob verschiedene Thiaminderivate neuroprotektive Eigenschaften aufweisen, um diese in Zukunft möglicherweise etwa für verbesserte Operationsergebnisse zu nutzen.

Es wurde ein Zellmodell mit neuronalen und Schwann-Zellen entwickelt, die mit den vier genannten Thiaminderivaten behandelt wurden. Mit diesem Modell wurde im ersten Schritt eine Wachstumsmessung durchgeführt, wobei Thiamin das Wachstumsverhalten nicht beeinflusste. Unter Hinzunahme von osmotischem oder oxidativem Stress wurde eine mögliche Verbesserung des Zellüberlebens unter Stress durch Thiamin im Sinne einer möglichen Neuroprotektion untersucht. Dabei konnte nicht gezeigt werden, dass sich das Überleben der Zellen durch Thiamin verbesserte.

Es schloss sich eine Quantifizierung antiapoptotischer Proteine mittels Western Blot unter Stressbedingungen und Thiaminbehandlung an, um antiapoptotische Veränderungen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die antiapoptotischen Proteine AKT, CREB und ERK waren bevorzugt in neuronalen Zellen und unter osmotischem Stress schwach erhöht. Die gewonnenen Erkenntnisse geben keinen hinreichenden Anlass zu weiteren Bemühungen dieser Art, wenngleich Thiamin noch weiteres therapeutisches Potential haben könnte.

Ohlmeier, Paul: Antiapoptotische und neuroprotektive Wirkung von Thiaminderivaten *in vitro*, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 80 Seiten, 2023

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	III
III.	Abbildungsverzeichnis	V
IV.	Tabellenverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Funktionelle Bedeutung des Thiamins	1
1.2	Thiamin als Nahrungsergänzung	2
1.2.1	Thiaminhydrochlorid	2
1.2.2	Die „Weiterentwicklung“ Sulbuthiamin	3
1.2.3	Weitere Thiaminderivate: Dibenzoylthiamin, Benfothiamin	4
1.3	Versorgungssituation in heutiger Zeit	5
1.4	Thiamin-B1-Mangel	5
1.5	Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, Wernicke-Enzephalopathie und Neurodegeneration als Folgen des Thiamin-B1-Mangels	6
1.6	Die Bedeutung von Thiamin für Lernprozessen und Psyche	7
1.7	Einfluss von Thiamin auf traumatische Hirnverletzung	7
1.8	Thiaminmangel und Apoptose	9
1.9	Hypothese zum Mechanismus einer Neuroprotektion des Thiamins	11
1.10	Die Rolle von AKT, CREB und ERK in der Apoptose	12
2	Zielstellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Materialien, Chemikalien, Geräte	15
3.2	Zellkulturen	19
3.2.1	Kultivierung der Zellen	19
3.2.2	Passage	19
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl	19
3.2.4	Zellkonservierung	19
3.3	Behandlung der Zellen	20
3.3.1	Vorbereitung der Zellen und Thiaminbehandlung	20
3.3.2	Stressinduktion	21
3.4	Zellstressunabhängige Wachstumsmessung mittels XTT-Messung	21
3.5	Ermittlung der Zytotoxizität mittels Messung der Laktatdehydrogenase	22
3.6	Proteinanalyse	24

3.6.1	Proteinisolierung	24
3.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	24
3.6.3	SDS-PAGE	26
3.6.4	Western Blot	27
4	Ergebnisse	31
4.1	Kein Einfluss von Thiamin auf das reguläre Zellwachstum	31
4.2	Keine antiapoptotischen Effekte durch Thiaminderivate bei Schwann-Zellen	33
4.2.1	Keine Hinweise auf Zelltodreduktion durch THCl	33
4.2.2	Kein Verhindern des Zelltods durch SBT	34
4.2.3	Kein verbessertes Zellüberleben durch DBT	34
4.2.4	Keine Überlebensvorteile durch BFT	35
4.3	Kein antiapoptotischer Effekt von Thiamin auf neuronale Zellen	35
4.3.1	Keine Verhinderung des Zelltods durch THCL bei neuronalen Zellen	35
4.3.2	Keine antiapoptotischen Effekte von SBT auf neuronale Zellen	36
4.3.3	Durch DBT kein Schutz neuronaler Zellen vor Apoptose	36
4.3.4	Kein neuroprotektiver Effekt von BFT auf neuronale Zellen	37
4.4	Wirkungen von Thiamin auf antiapoptotische Proteine in Schwann-Zellen und neuronalen Zellen	38
4.4.1	Steigerung antiapoptotischer Proteine bei Schwann-, kaum bei neuronalen Zellen durch THCl	38
4.4.2	Steigerung antiapoptotischer Proteine und deren Aktivität durch SBT unter osmotischem Stress	43
4.4.3	Einfluss von DBT unter osmotischem Stress auf die Aktivierung antiapoptotischer Proteine	49
4.4.4	Steigerung antiapoptotischer Proteine unter BFT	52
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	58
5	Diskussion	59
5.1	Das Zellmodell	59
5.2	Gute Verträglichkeit des Thiamins <i>in vitro</i>	61
5.3	Gleichbleibend stressbedingter Zelltod unter Thiamin	62
5.4	Weiterhin unklares Potential von Thiamin	63
5.5	Weitere Erklärungsmodelle: Thiamin eher glykoprotektiv?	64
5.6	Verstärktes Auftreten antiapoptotischer Proteine unter Thiamin	65
5.7	Allgemeine Limitationen der <i>in vitro</i> Methodik	68
6	Zusammenfassung und Ausblick	69
7	Literaturverzeichnis	72
8	Thesen	80

II. Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
AGEs	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPAR	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
B	Behandlung
BFT	Benfothiamin
BSA	Rinderserumalbumin
CoA	Coenzym A
DBT	Dibenzoylthiamin
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMEM/F-12	Dulbeccos Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAAT1/2	exzitatorischer Aminosäuretransporter 1/2
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunden
INT	Jodtetrazoliumchlorid
K	Kontrolle
LDH	Laktatdehydrogenase
Lmk	Lösungsmittelkontrolle
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NS	Nervensystem
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PNS	Peripheres NS
PRT	Pyriithiamin
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

SBT	Sulbuthiamin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
<i>SLC19A3</i>	<i>Solute Carrier Family 13 member 3</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THCl	Thiaminhydrochlorid
ThTr1	Thiamintransporter 1
THMD2	Thiaminrezeptor 2
t_v	mittlere Verdopplungszeit
VSCC	spannungsabhängiger Kalziumkanal vom L-Typ
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)- 5-[(phenylamino)carbonyl]-hydroxid
ZNS	Zentrales NS

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Thiamin im aeroben Stoffwechsel	1
Abbildung 2: Chemische Struktur von THCl und SBT	3
Abbildung 3: Chemische Struktur von DBT und BFT	4
Abbildung 4: Folgeschäden nach traumatischer Hirnschädigung	8
Abbildung 5: Die Apoptose als zelluläre Antwort auf Thiaminmangel.	10
Abbildung 6: Hypothese zur Apoptoseprävention durch Thiamin	11
Abbildung 7: Antiapoptotische Signalwege	13
Abbildung 8: Grundaufbau der Hauptversuche	20
Abbildung 9: Beispiel einer Wachstumsmessung	22
Abbildung 10: Prinzip der Zytotoxizitätsmessung	23
Abbildung 11: Repräsentatives Beispiel einer Eichgeraden	25
Abbildung 12: Wachstumsmessung ohne und mit 10 µmol/l Thiamin	32
Abbildung 13: Wachstumsmessung mit 20 µmol/l und 50 µmol/l Thiamin	32
Abbildung 14: Wachstumsmessung mit 100 µM Thiamin und Direktvergleich der Wachstumskurven	33
Abbildung 15: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen	34
Abbildung 16: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen	34
Abbildung 17: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen	35
Abbildung 18: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen	35
Abbildung 19: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen	36
Abbildung 20: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen	36
Abbildung 21: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen	37
Abbildung 22: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen	37
Abbildung 23: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von THCl bei Schwann-Zellen	38
Abbildung 24: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von THCl bei neuronalen Zellen	39
Abbildung 25: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von SBT und DBT bei Schwann-Zellen	44
Abbildung 26: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von SBT und DBT bei neuronalen Zellen	44
Abbildung 27: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von BFT bei Schwann-Zellen	53
Abbildung 28: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von BFT bei neuronalen Zellen	53
Abbildung 29: Antiapoptotische Wirkung von Nimodipin an Schwann-Zellen, neuronalen Zellen und Astrozyten	60
Abbildung 30: Antiapoptotische Wirkung von Thiaminderivaten bei neuronalen und Schwann-Zellen	66

IV. Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Thiamin im aeroben Stoffwechsel	1
Abbildung 2: Chemische Struktur von THCl und SBT	3
Abbildung 3: Chemische Struktur von DBT und BFT	4
Abbildung 4: Folgeschäden nach traumatischer Hirnschädigung	8
Abbildung 5: Die Apoptose als zelluläre Antwort auf Thiaminmangel.	10
Abbildung 6: Hypothese zur Apoptoseprävention durch Thiamin	11
Abbildung 7: Antiapoptotische Signalwege	13
Abbildung 8: Grundaufbau der Hauptversuche	20
Abbildung 9: Beispiel einer Wachstumsmessung	22
Abbildung 10: Prinzip der Zytotoxizitätsmessung	23
Abbildung 11: Repräsentatives Beispiel einer Eichgeraden	25
Abbildung 12: Wachstumsmessung ohne und mit 10 µmol/l Thiamin	32
Abbildung 13: Wachstumsmessung mit 20 µmol/l und 50 µmol/l Thiamin	32
Abbildung 14: Wachstumsmessung mit 100 µM Thiamin und Direktvergleich der Wachstumskurven	33
Abbildung 15: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen	34
Abbildung 16: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen	34
Abbildung 17: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen	35
Abbildung 18: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen	35
Abbildung 19: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen	36
Abbildung 20: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen	36
Abbildung 21: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen	37
Abbildung 22: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen	37
Abbildung 23: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von THCl bei Schwann-Zellen	38
Abbildung 24: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von THCl bei neuronalen Zellen	39
Abbildung 25: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von SBT und DBT bei Schwann-Zellen	44
Abbildung 26: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von SBT und DBT bei neuronalen Zellen	44
Abbildung 27: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von BFT bei Schwann-Zellen	53
Abbildung 28: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von BFT bei neuronalen Zellen	53
Abbildung 29: Antiapoptotische Wirkung von Nimodipin an Schwann-Zellen, neuronalen Zellen und Astrozyten	60
Abbildung 30: Antiapoptotische Wirkung von Thiaminderivaten bei neuronalen und Schwann-Zellen	66

1 Einleitung

1.1 Funktionelle Bedeutung des Thiamins

Thiaminpyrophosphat ist die biologisch aktive Form des Thiamins und übernimmt als Cofaktor wichtige Aufgaben im Energiestoffwechsel (11-15) (Abbildung 1). Es decarboxyliert die Pyruvatdehydrogenase (PDH), welche als zentrales Enzym des PDH-Komplexes die Verbindung zwischen Glykolyse und Citratzyklus herstellt. Außerdem unterstützt es im Citratzyklus als Cofaktor die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und beeinflusst damit die Umwandlung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-Coenzym A (-CoA). Auch im Pentosephosphatweg (PPW), der ebenfalls eng mit der Glykolyse verknüpft ist (Abbildung 1), wird Thiamin als Cofaktor der Transketolase benötigt. Darüber hinaus spielt Thiamin im Rahmen der Umsetzung verzweigtkettiger Aminosäuren eine Rolle, sowie im Rahmen der α -Oxidation in den Peroxisomen (16).

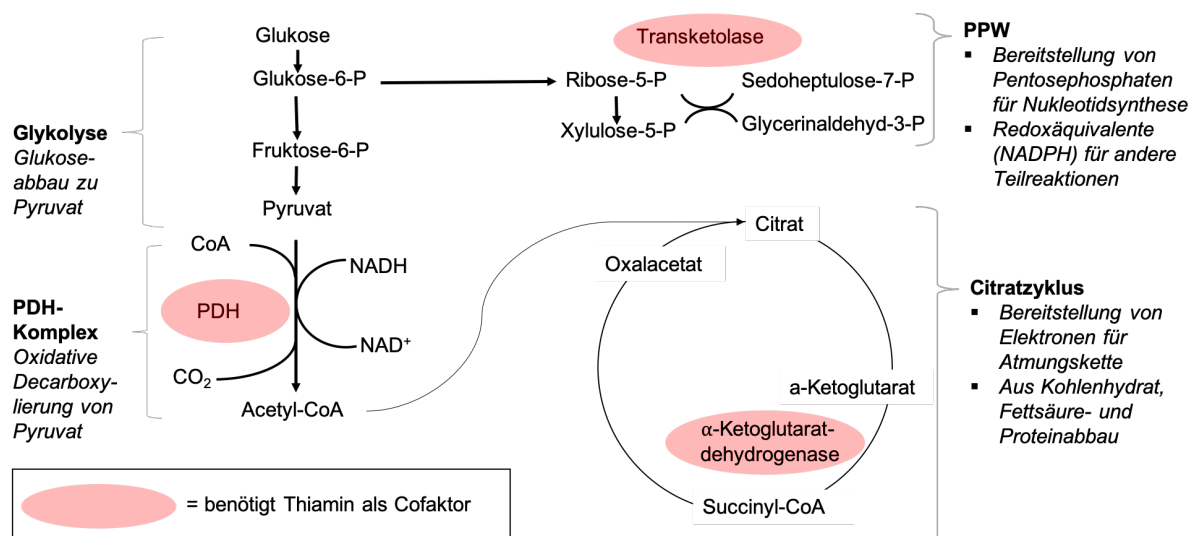


Abbildung 1: Thiamin im aeroben Stoffwechsel

Vereinfachte schematische Darstellung des intrazellulären Energiestoffwechsels. Thiamin gilt als Schlüsselcoenzym, da es mehreren Enzymen von zentraler Bedeutung als Cofaktor dient. Abbildung adaptiert nach (17-21).

Die aktuelle Forschung orientiert sich neben den oben beschriebenen biochemischen Funktionen des Thiamins als Coenzym-Vorläufer um die nicht-coenzymabhängigen Effekte (6), auf die im Folgenden weiter eingegangen werden soll.

1.2 Thiamin als Nahrungsergänzung

Thiamin war bereits in der Antike bekannt, wichtige Erkenntnisse über seine enorme Bedeutung und die Folgen einer Hypovitaminose wurden erst spät erkannt: Ende des 19. Jahrhunderts nahm die Beriberi-Krankheit in Ostasien in erschreckendem Ausmaß zu, da mit modernen Reisschälmaschinen zunehmend Reis ohne die vitaminreiche Hülle konsumiert wurde (22). Dieser Zusammenhang wurde von dem niederländischen Arzt Eijkmann erkannt, der jedoch eine unbekannte Mikrobe vermutete. Erst 1909 konnte die Ursache im Sinne eines Thiamin-Mangelzustands festgestellt werden. 1926 gelang durch Jansen und Donath die erste Isolierung der Reinsubstanz und 1936 wurde die Strukturformel durch Williams publiziert (22) (Abbildung 2).

1.2.1 Thiaminhydrochlorid

Unternehmen vermarkten den Wirkstoff heute in Form sogenannter „Nootropika“. Dieser Begriff subsumiert im ursprünglich pharmakologischen Sinne Substanzen, denen ein vorteilhafter Effekt auf das ZNS zugesprochen wird - dazu zählen etwa Antidementiva. Die Substanz Thiaminhydrochlorid (THCl) wird als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Etwa ein Drittel der Erwachsenen greift regelmäßig zu Nahrungsergänzungsmitteln (23).

Laut Angaben der Firma *Sunday Natural* leistet Vitamin B1 einen Beitrag zur normalen Funktion des NS und der Psyche, sowie des Energiestoffwechsels und des Herzens. Aufgrund der Schlüsselfunktion im aeroben Stoffwechsel der Mitochondrien werde es besonders empfohlen für Sportler oder Menschen mit besonderen geistigen Leistungsanforderungen. Die Firma bietet THCl als welches die Vorstufe des eigentlichen Coenzym Thiaminpyrophosphat, oder auch Thiamindiphosphat darstelle (24).

Dennoch wird Thiamin laut der Pressemitteilung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie vom März 2018 zur Bekämpfung neuropathischer Schmerzen nicht empfohlen. Hier wird u.a. neben Cannabis-Extrakten von Thiamin und dem verwandten BFT abgeraten (25). Die Studienlage zur Wirkung des Thiamins sei bisher insgesamt mangelhaft – es existierten nicht genügend Studien für eine gute Evidenzlage (25).

1.2.2 Die „Weiterentwicklung“ Sulbuthiamin

Die Aufnahme von Thiamin ist limitiert durch die begrenzte Kapazität hochaffiner Thiamintransporter des Darmepithels (12). Dies wurde durch die Entwicklung der lipophilen Thiaminvorstufen umgangen, die in der Lage sind, durch schnelle Diffusion die Plasmakonzentration stark zu erhöhen (12).

Eine solche lipophile Vorstufe ist das chemisch veränderte Thiaminderivat Sulbuthiamin (SBT). Es wurde in den mittleren 1960er Jahren in Japan entwickelt und verspricht – ebenfalls als Nahrungsergänzungsmittel - einen psychostimulierenden Effekt (26).

Ähnlich dem THCI wird SBT wegen seiner psychostimulierenden Wirkung auch als Ergänzungsmittel für Sportler verwendet, weshalb manche Autoren es als „maskierende Dopingstrategie“ bewerten (26). SBT hat demnach ein Potential, welches weit über seine zuerst beschriebene Funktion – Erhöhung der Gewebekonzentration zum Ausgleich eines Mangels – hinausgehen könnte und weiter untersucht werden sollte (26).

Zudem kann SBT ergänzend zur Therapie mit Antidepressiva verwendet werden (27). SBT wirkt psychischer Verhaltenshemmung, welche charakteristisch für depressive Episoden ist, entgegen (28).

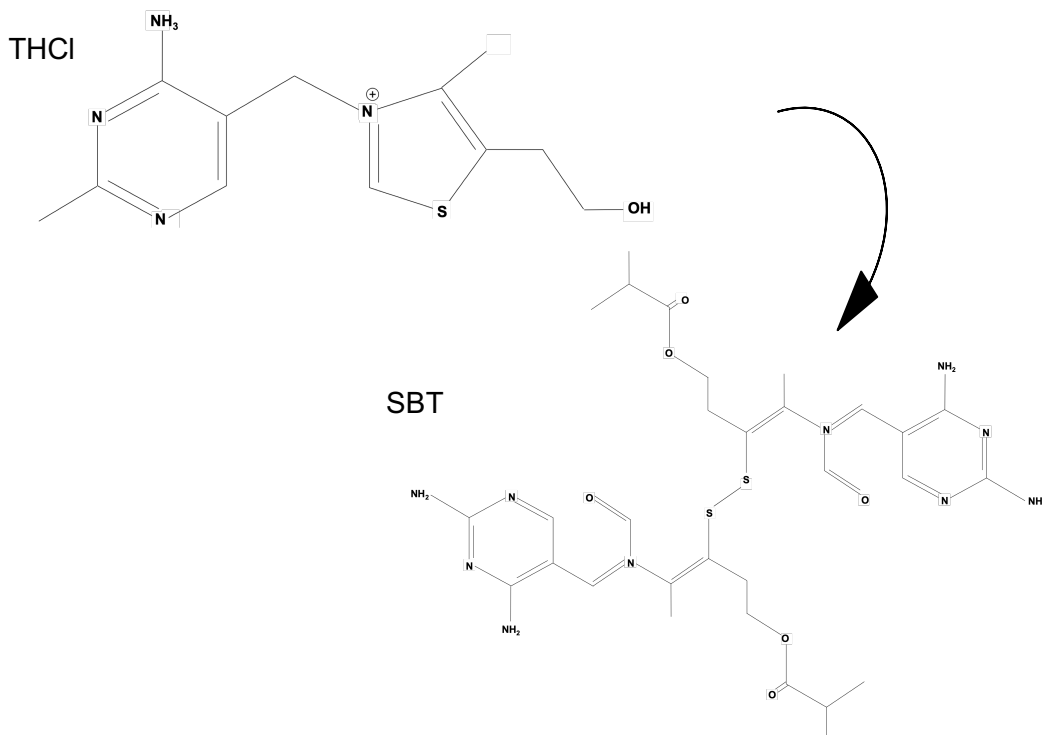


Abbildung 2: Chemische Struktur von THCI und SBT

Dargestellt ist die chemische Struktur von THCI (links) und SBT (rechts): Bei der Herstellung des SBT werden die Thiazolringe zweier Thiaminmoleküle aufgebrochen und über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Hierdurch gehen hydrophile Moleküleigenschaften verloren, SBT ist lipophil. Abbildung adaptiert nach (21, 29-31).

Es wirkt nach L o et al. zwar nicht direkt antidepressiv, Probanden gaben jedoch an, im Vergleich zur Placebogruppe affektiv, kognitiv, emotional und verhaltensbezogen von der Substanz zu profitieren. Dabei löste SBT keine unangemessenen Verhaltensweisen, Manie oder Suizidversuche aus (28).

SBT wird eine Wirkung gegen Gedächtnisstörungen zugeschrieben. Es kann eine Ergänzung zur Therapie mit Acetylcholinesteraseinhibitoren sein, wie sie in der Alzheimertherapie bislang unterschiedlich erfolgreich Anwendung findet. Demnach hatte SBT einen günstigen Einfluss auf Aktivitäten des täglichen Lebens (32).

1.2.3 Weitere Thiaminderivate: Dibenzoylthiamin, Benfothiamin

Dibenzoylthiamin (DBT, Abbildung 3A) ist ebenfalls ein lipophiles Thiaminderivat. In Mausmodellen hatte DBT auch einen starken antioxidativen und entzündungshemmenden Effekt (12). Dies konnte auch für SBT gezeigt werden (26), DBT war dabei anderen Thiaminderivaten überlegen (12) und ist dadurch noch wirksamer als Benfothiamin (BFT) (21). Die Wirkung entfaltet sich aus coenzym-unabhängigen Mechanismen, die eine Translokation vom *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- B) zur Folge hat (12, 33). Sambon et al. zufolge sind Entzündungen und oxidative Prozesse die zwei Hauptmerkmale neurodegenerativer Erkrankungen, woraus abgeleitet werden könne, dass DBT gegen diese prophylaktisch wirkt, sodass hier ein therapeutisches Potential gesehen wird. Ähnlich dem SBT deuten Ergebnisse darauf hin, dass depressions hnliches Verhalten im Mausmodell reduziert werden kann (12).

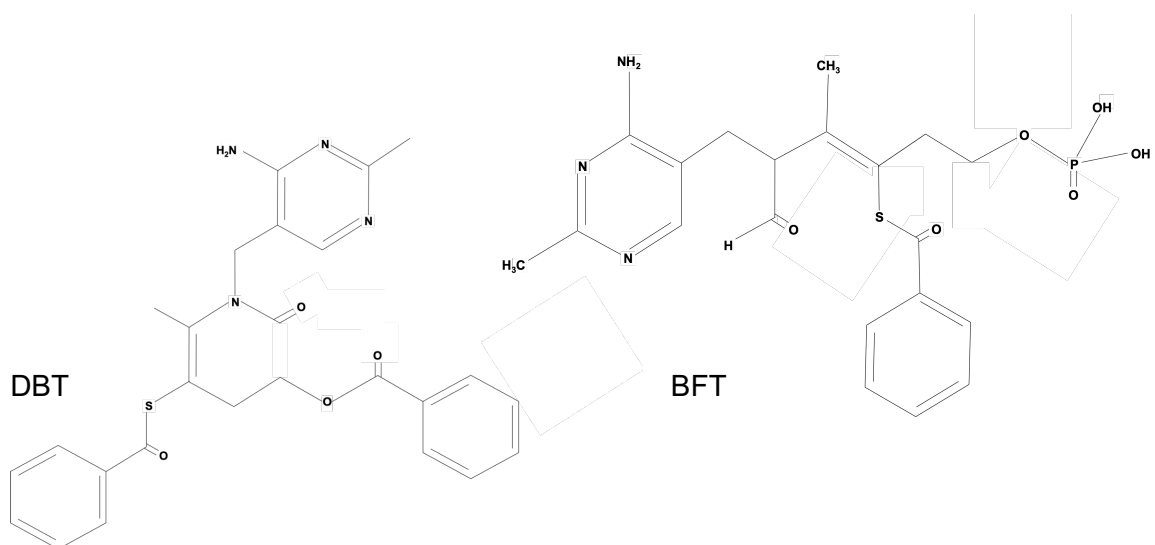


Abbildung 3: Chemische Struktur von DBT und BFT
Dargestellt ist die chemische Struktur von DBT (links) und BFT (rechts). Abbildung adaptiert nach (21, 29, 31, 34)

BFT (Abbildung 3 B) besitzt als fettlösliche Vorstufe des Thiamins bei äquimolarer Gabe eine 5-fache Bioverfügbarkeit gegenüber Thiaminmononitrat (35). Es ist jedoch weniger wirksam als das DBT, dabei handelt es sich um das am besten untersuchte Thiaminderivat (12).

1.3 Versorgungssituation in heutiger Zeit

Laut Nationaler Verzehrstudie des Max-Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, erreichen 21 % der Männer und 32 % der Frauen die empfohlenen Tagesdosen nicht (36). Für Erwachsene wird eine Dosierung von 1,1 - 1,3 mg pro Tag bei Männern und 1,0 mg pro Tag bei Frauen empfohlen (23, 37, 38). Laut EFSA-Studie werden für erwachsene Männer g zwischen 0,96 und 1,13 und Frauen zwischen 0,78 und 0,91 mg pro Tag benötigt (23).

Die Aufnahme von Vitamin B1 erscheint laut Bundesinstitut für Risikobewertung in Deutschland ausreichend, da erwachsene Männer und Frauen hier je nach Studie im Median 1,3 - 1,8 bzw. 1,1 - 1,3 mg am Tag aufnehmen (23, 36).

Laut dieser Studie kann auf eine Ergänzung der Substanz in der Nahrung verzichtet werden und ist eine abwechslungsreiche Ernährung ausreichend. Ein Überangebot, also eine Hypervitaminose, scheint kein gesundheitliches Problem zu sein, sodass keine Höchstgrenzen festgesetzt wurden (23). Die Datenlage deutet darauf hin, dass aktuell entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung die Zufuhrempfehlung für Vitamin D, Kalzium, Folsäure und Jod gilt (23).

1.4 Thiamin-B1-Mangel

Thiaminmangel tritt im Zusammenhang mit genetischer Prädisposition, sowie alkohol- oder nicht alkoholassoziierten Faktoren auf (15).

Die Resorption des Thiamins aus dem Darmlumen wird hauptsächlich durch den Thiaminrezeptor 2 (THMD2) geregelt (39-42), während der Thiamintransporter 1 (ThTr1) für die aktive Aufnahme in die Zellen verantwortlich ist (43, 44). *Solute Carrier Family 13 member 3 (SLC19A3)* - Mangel ist eine neurodegenerative Erkrankung, die auf Mutationen im *SLC19A3* - Gen, das für THMD2 codiert, zurückzuführen ist. Mäuse mit *SLC19A3* - Mangel, die mit thiaminarmer Diät gefüttert wurden, starben innerhalb von 30 Tagen und es wurden Hirnläsionen beobachtet (45). Mehr als die Hälfte der auf dieselbe Weise behandelten Mäuse konnte jedoch mithilfe einer langanhaltenden Hochdosis-Thiamintherapie überleben. Wurde die Thiamintherapie unterbrochen, setzten sich die Hirnläsionen fort (45).

1.5 Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, Wernicke-Enzephalopathie und Neurodegeneration als Folgen des Thiamin-B1-Mangels

Laut der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit trägt Thiamin zu einem normalen Energiestoffwechsel, einer normalen Funktion des NS und des Herzens bei (38). Wegen der schlechten Speicherfähigkeit – etwa 30 mg (46) - wird es zu den „kritischen Vitaminen“ der embryonalen Entwicklung gezählt, da der Mangel rasch zu Fehlbildungen führt (40). Hier zu nennen wäre vor allem die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (40).

Ein Thiaminmangel kann, typischerweise bei chronischem Alkoholmissbrauch entstehen (47, 48). Charakteristisch für die heute als Wernicke-Enzephalopathie bekannte klinische Diagnose ist die 1881 von Wernicke beschriebene Symptomtrias aus Augenmotilitätsstörungen (11, 49), Desorientiertheit und Gangataxie (49, 50). Die Wernicke-Enzephalopathie stellt einen akuten neuropsychiatrischen Notfall dar, der durch einen Thiaminmangel ausgelöst wird (8, 49), der häufig im Kontext alkoholischer Suchterkrankungen auf eine Fehlernährung zurückzuführen ist. Thiaminabhängige Enzyme sind vermindert aktiv, was zu einem nervalen Zelluntergang führt (47). Bei Patienten, die aufgrund eines Thiaminmangels verstarben, wurden punktartige Hämorrhagien der Mamillarkörper (51) gefunden – daher auch die ursprüngliche Bezeichnung der 1881 erstmalig von Carl Wernicke beschriebenen (*Polio*)*encephalitis haemorrhagica superior* (15, 51).

Wenige Jahre später beschrieb der russische Psychiater Sergei Korsakoff das Wernicke-Korsakoff-Syndrom (15, 52), bei dem zusätzlich Konfabulation und Gedächtnisverlust auftreten (11, 50).

Bei einem Vitamin-B1-Mangel kommt es zur Unterbrechung und zum Erliegen der in Abbildung 1 dargestellten oxidativen Zellatmung. Dies äußert sich klinisch durch Laktatazidose (7, 11) und neurologischen Störungen wie peripherer Neuropathie.

Zellen des NS scheinen also im Gegensatz zu Zellen anderer Organe besonders von Thiamin abhängig zu sein (51). Diese Beobachtung macht das Thiamin als potentiell neuroprotektive Substanz so interessant.

Thiamin ist schon jetzt ein wichtiges Pharmakon in der modernen Medizin. Die Wernicke-Enzephalopathie ist potentiell reversibel (8) und wird mit dieser Substanz behandelt (8, 53), Jedoch gibt es bislang keine einheitlichen Leitlinien für Dosis, Art, Häufigkeit oder Dauer der Behandlung (8).

Einige Quellen weisen auf den Zusammenhang zwischen Thiaminmangel und Neurodegeneration (7) hin, was speziell bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) ein wichtiger Pathomechanismus zu sein scheint (7, 54). Dennoch müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Anwendbarkeit des Thiamins gegen Schäden des NS zu etablieren.

1.6 Die Bedeutung von Thiamin für Lernprozessen und Psyche

Thiaminmangel, ausgelöst durch die Substanz Pyriithiamin, führt im Rattenmodell zu Lern- und Gedächtnisverlust (55). Niedrigen Thiaminspiegeln wird eine Relevanz hinsichtlich der Ätiogenese neurodegenerativer Erkrankungen zugeschrieben (12).

Die bei Versuchstieren geschädigten Mammilarkörper (55) sind wichtig für das episodische Gedächtnis (56) und Afferenzen aus dem an der Gedächtnisbildung beteiligten Hippocampus münden in diese (56, 57).

Thiamin fördert ebenfalls indirekt die Neurogenese des Hippocampus (58) und könnte sich so positiv auf Lernprozesse auswirken. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass mithilfe von Thiamin die Unterdrückung der Neurogenese durch Stress reduziert werden konnte (58). Weiterhin führte Thiamin zu einem besseren Schutz der Zellen gegen oxidativen und psychischen Stress, der durch Raubtiere ausgelöst wurde. Damit bietet Thiamin möglicherweise Potential für die Therapie von Angststörungen (58).

1.7 Einfluss von Thiamin auf traumatische Hirnverletzung

Thiamin kann Heilungsprozessen traumatischer Schäden fördern, so wird Thiamin ein günstiger Einfluss auf traumatische Hirnverletzungen zugesprochen. Es gibt Hinweise, dass SBT dabei Folgeprozesse traumatischer Hirnverletzungen günstig beeinflusst (59, 60) – und im Zusammenhang mit Schädel-Hirn-Traumata (SHT) vorrangig das häufig auftretende Symptom der Asthenie reduziert (59).

Zentralnervöse Läsionen, wie das traumatische SHT, können einerseits zu Primärschädigung führen, dazu zählen Kontusion, Hämorrhagie oder axonale Ruptur (61) (Abbildung 4).

Andererseits kann es zur Akkumulation potentiell schädigender Mediatoren kommen, die sekundäre Schäden bewirken können, die durch ionische, metabolische oder immunologische Veränderungen bedingt sein können (61). Es kann zu ischämischen Prozessen kommen, die durch Faktoren wie begleitende Hirnschwellung, erhöhten Hirndruck und dadurch abnehmende Gewebepfusion weiter verstärkt werden kann, was zu Nekrose oder Apoptose, aber auch Regeneration führen kann (61).

Schädigend wirken Neuroinflammation, exzitotoxischer Stress, der durch eine massive Freisetzung von Neurotransmittern hervorgerufen wird, und oxidativer Stress (1, 2, 60, 62-66). Studien belegen, dass die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies sowie Laktat eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Neuroinflammation und neurodegenerativer Erkrankungen spielt (67-69) (Abbildung 4). Das Auftreten von osmotischem Stress wurde bereits im Sinne einer Sekundärschädigung im Rahmen von Operationen durch Ionenverschiebungen beschrieben (4, 61). Osmotischer Stress entsteht typischerweise ebenfalls bei einem zu raschem Ausgleich einer Hyponatriämie, dadurch kann es zu Demyelinisierung und Zelluntergang kommen (70).

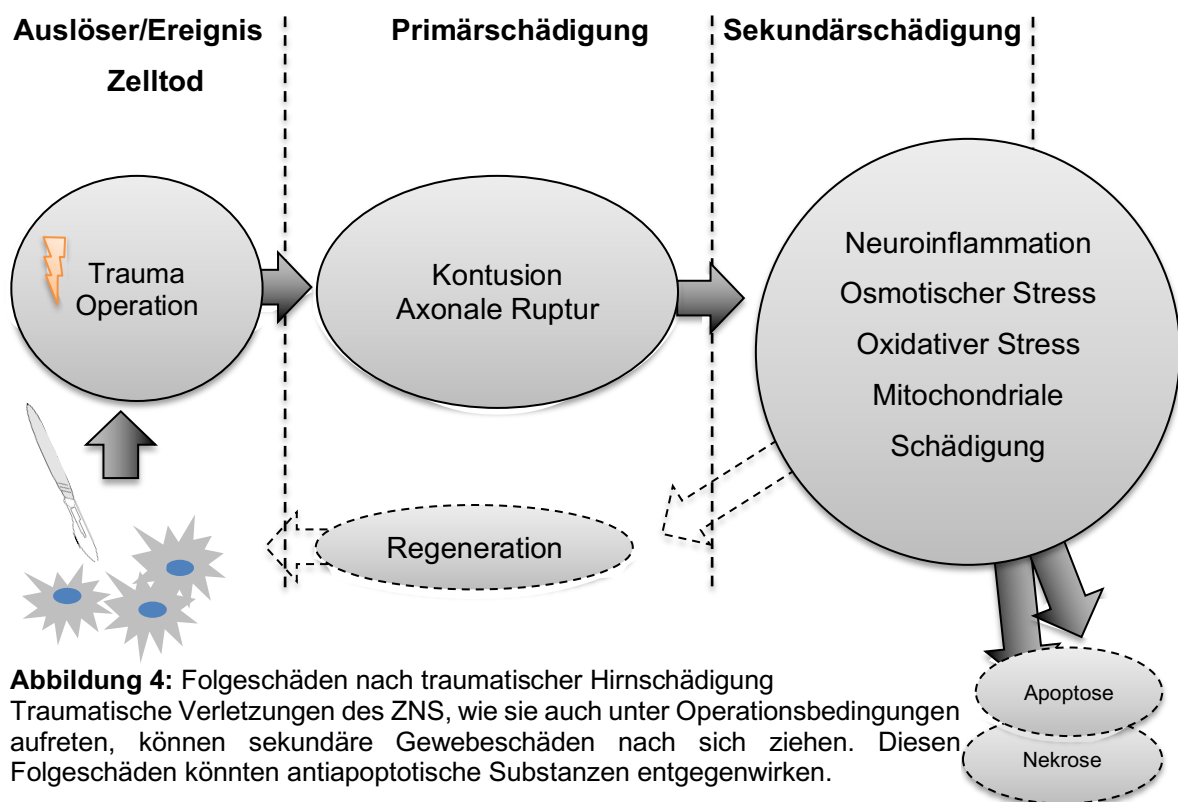


Abbildung 4: Folgeschäden nach traumatischer Hirnschädigung
Traumatische Verletzungen des ZNS, wie sie auch unter Operationsbedingungen auftreten, können sekundäre Gewebeschäden nach sich ziehen. Diesen Folgeschäden könnten antiapoptotische Substanzen entgegenwirken.

Durch zerebrale Ischämie und Bildung radikaler Sauerstoffspezies kommt es sekundär auch zur mitochondrialen Schädigung (64). In der Literatur gibt es bereits Hinweise, dass Thiamin die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion im Rahmen solcher traumatischer Läsionen im Rattenmodell unterstütze (60). Dies wurde vermutlich durch eine Aufrechterhaltung der Funktion des 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes – hier synonym für α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (Abbildung 1) - erreicht. Dieser Feststellung geht die Annahme voraus, dass Symptome traumatischer Hirnschädigungen unter anderem auf eine mitochondriale Dysfunktion zurückzuführen sind.

Andere Enzyme – wie etwa die ebenfalls von Thiamin abhängige PDH (Abbildung 1) waren im Rahmen von Hirntraumata in dieser Studie jedoch nicht verringert feststellbar. Eine verringerte 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Funktion begünstigt hingegen nicht nur traumatische Hirnschäden, sondern auch Neurodegeneration (71).

Das Prinzip der pharmakologischen Begrenzung der in Abbildung 4 gezeigten Sekundärschädigung bei SHT stellt in der klinischen Praxis – trotz vielversprechender Hinweise auf eine Wirksamkeit des SBT - eine bisher ungelöste Herausforderung dar (64).

1.8 Thiaminmangel und Apoptose

Eine Erklärung einer möglichen antiapoptotischen Wirkung des Thiamins könnte ein antioxidativer Effekt sein, denn bei Thiaminmangel wurde vermehrt die Entstehung von oxidativem Stress im Rahmen eines entzündlichen multifaktoriellen Geschehens gemessen (7). Die antioxidative Wirksamkeit war beim DBT besonders deutlich (12). Ein Thiaminmangel (indirekt herbeigeführt durch den Thiaminantagonisten Phyrithiamin) führt zu mehr Apoptosen. Zur Apoptosebestimmung wurde hierbei Annexin V gemessen. (7, 72).

Im Kontext des Thiaminmangels besteht ein Apoptosemechanismus neuronaler Zellen nach Jhala et al. (7) in einer mitochondrial bedingten Erniedrigung von Adenosintriphosphat (ATP) in der Präsynapse, durch welche die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase sinkt (7). Dadurch kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von Glutamat (Abbildung 5). Ein zusätzlicher Faktor, der den Glutamatspiegel im synaptischen Spalt anhebt, ist eine durch Thiaminmangel bedingte Herabregulierung exzitatorischer Aminosäuretransporter 1/2 (EAAT 1/2) in den Astrozyten. Dies ist zurückzuführen auf einen ATP-abhängigen Glutamatabbau, der durch Thiaminmangel beeinträchtigt ist. Es kommt bedingt durch den Glutamatanstieg verstärkt zu Depolarisationen, die wiederum zu einem vermehrten postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom führen. Im Wesentlichen werden dabei der α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor (AMPA), N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR) und spannungsabhängige Kalziumkanäle vom L-Typ (VSCC) aktiviert. Der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel führt schließlich zur Induktion der Expression spezifischer Gene, die den Zelltod auslösen (7) (Abbildung 5).

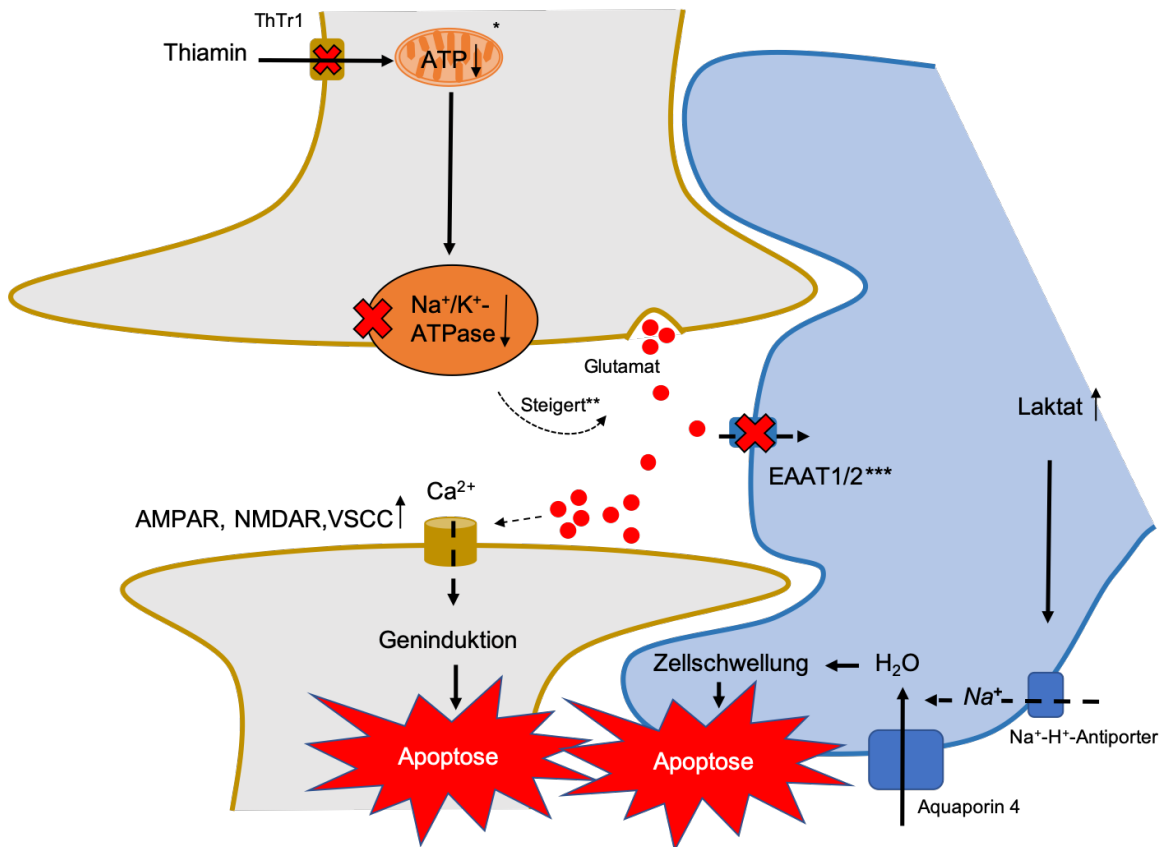


Abbildung 5: Die Apoptose als zelluläre Antwort auf Thiaminmangel.

Thiaminmangel bewirkt die Hochregulation des Apoptosis-Inducing Factor im Mitochondrium (*). Es kommt zur Spaltung von Caspase und zur Fragmentierung von DNS. Bedingt durch Thiamin- und damit ATP-Mangel kommt es zur verminderten Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase. Dies führt zu vermehrten Depolarisationen, dadurch wird indirekt vermehrt Glutamat freigesetzt (**). Die Freisetzung wird einerseits durch Aktivierung von VSCC und andererseits durch die Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration begünstigt. Der Thiaminmangel führt dazu, dass astrozytäre Glutamattransporter (***) nicht mehr ausreichend Glutamat in die Zelle transportieren können, sodass der Glutamatspiegel im synaptischen Spalt weiter ansteigt (7). Abbildung adaptiert nach Jhala et al. (7).

Jhala et al. (7) weisen zusätzlich auf einen Mechanismus hin, der die Apoptose der Astrozyten begünstigt: Durch den Thiaminmangel kommt es zum Laktatanstieg. Darauf reagiert die Zelle mit gesteigerter Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers. Dieser sorgt für einen erhöhten Na^+ -Einstrom in die Astrozyten. Dies kann einen Wassereinstrom und dadurch bedingte Zellschwellung und Zelltod zur Folge haben (Abbildung 5). Außerdem kann es durch den Na^+ -Einwärtsstrom zu einer Umkehrung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers kommen. Dies führt zu einer Ca^{2+} -Verschiebung nach intrazellulär, durch die der Astrozyt ebenfalls verstärkt zur Apoptose neigt (nicht in der Abbildung) (7, 56).

1.9 Hypothese zum Mechanismus einer Neuroprotektion des Thiamins

Wie bereits gezeigt wurde, kann Thiamin gesteigerte Apoptose durch hyperglykämischen Stress bei Endothelzellen und Perizyten verhindert. Durch Einsatz von Thiamin und BFT konnte eine Reduktion der Apoptose erzielt werden. Mit diesen Ergebnissen ergeben sich Anhaltspunkte, Thiamin als Prävention gegen diabetische Mikroangiopathien zu nutzen (10).

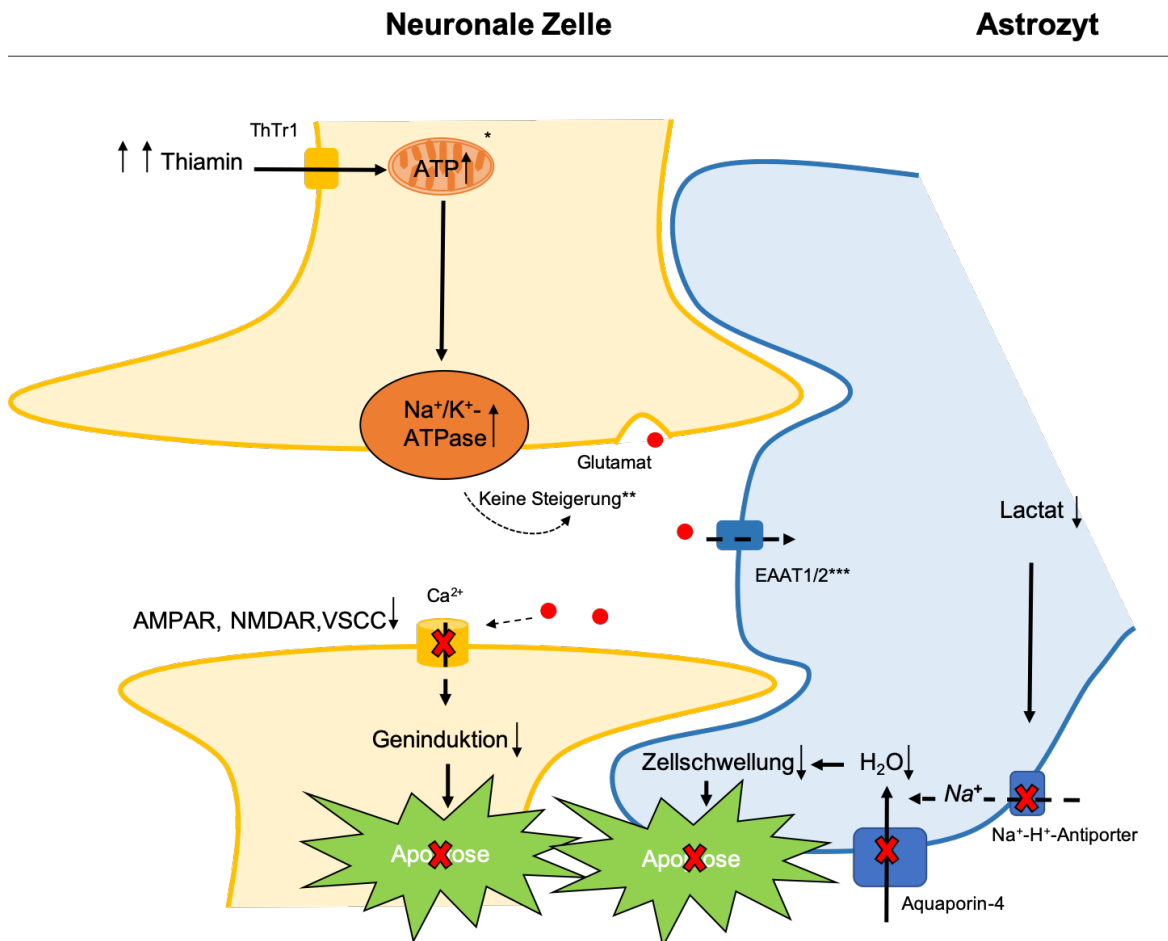


Abbildung 6: Hypothese zur Apoptoseprävention durch Thiamin

Die Hochregulation des Apoptosis-Inducing Factor im Mitochondrium bleibt aus (*). Dadurch wird auch die Spaltung von Caspase 3 und zur Fragmentierung von DNS herabgeregelt. (**) Die Na⁺/K⁺-ATPase wird in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt. Vermehrte Depolarisationen treten nicht auf, es kommt nicht zur vermehrten Freisetzung von Glutamat. (***) Zusätzlich kann Glutamat nun ausreichend in die Zelle transportiert werden, sodass der Glutamat Spiegel im synaptischen Spalt nicht erhöht ist (7). Abbildung adaptiert nach Jhala et al. (7)

In Abbildung 5 wurden die Mechanismen dargestellt, die unter Thiaminmangel zur Apoptose führen können. Hypothetisch könnte umgekehrt geschlossen werden, dass die Substitution von Thiamin über eine Umkehrung dieser Mechanismen Apoptosen reduziert, dies ist in Abbildung 6 dargestellt.

1.10 Die Rolle von AKT, CREB und ERK in der Apoptose

Die Proteinkinase B (AKT) ist im Sinne eines Signalweges mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus, Proliferation und schützt die Zelle (73-75). AKT induziert die Phosphorylierung des zyklischen Adenosin-Monophosphat bindenden Proteins (CREB) am Serinrest 133 (76). CREB ist ein Schlüsselregulator, der das Überleben der Zelle bei DNS-Schäden insbesondere unter Stress und Hypoxie reguliert (77, 78).

Als Transkriptionsfaktor hat CREB hemmenden Einfluss auf die Apoptose, indem es die Expression zellulärer Gene induziert (76). Es wurde bereits gezeigt, dass CREB-vermittelte Genexpressionen das Zellüberleben fördern (76, 79, 80), bzw. neuroprotektiv wirken (3, 4), und auch das Wachstum und die Differenzierung der Zelle fördern kann (79, 80). Andersherum zeigte die experimentelle Inhibierung des AKT-CREB-Signalwegs in Neuroblastom-Zellen vermehrt Apoptose gegen neurotoxische Substanzen wie etwa Formaldehyd (81).

Der AKT-CREB-Signalweg ist somit an der antiapoptotischen Wirkung beteiligt. Studien haben gezeigt, dass Apoptoseinhibitoren die proteolytische Aktivität der Caspase 3 und 7 hemmen, und damit dem programmierten Zelltod entgegenwirken können (82-84). Insbesondere der AKT-CREB-Signalweg ist auch mit der Verringerung der Aktivität von Caspase 3 und 7 assoziiert (Abbildung 7) (3). Bei diesen handelt es sich um Effektorcaspasen, die irreversibel die Apoptose einleiten, indem sie den Abbau der Zellmembran und des Zytoskelett bewirken (85-88).

Aus vermehrtem Vorkommen dieser Proteine kann auf eine antiapoptotische Funktion der eingesetzten Substanz geschlossen werden, so können AKT und CREB als Marker für eine antiapoptotische Wirkung verwendet werden (89-91).

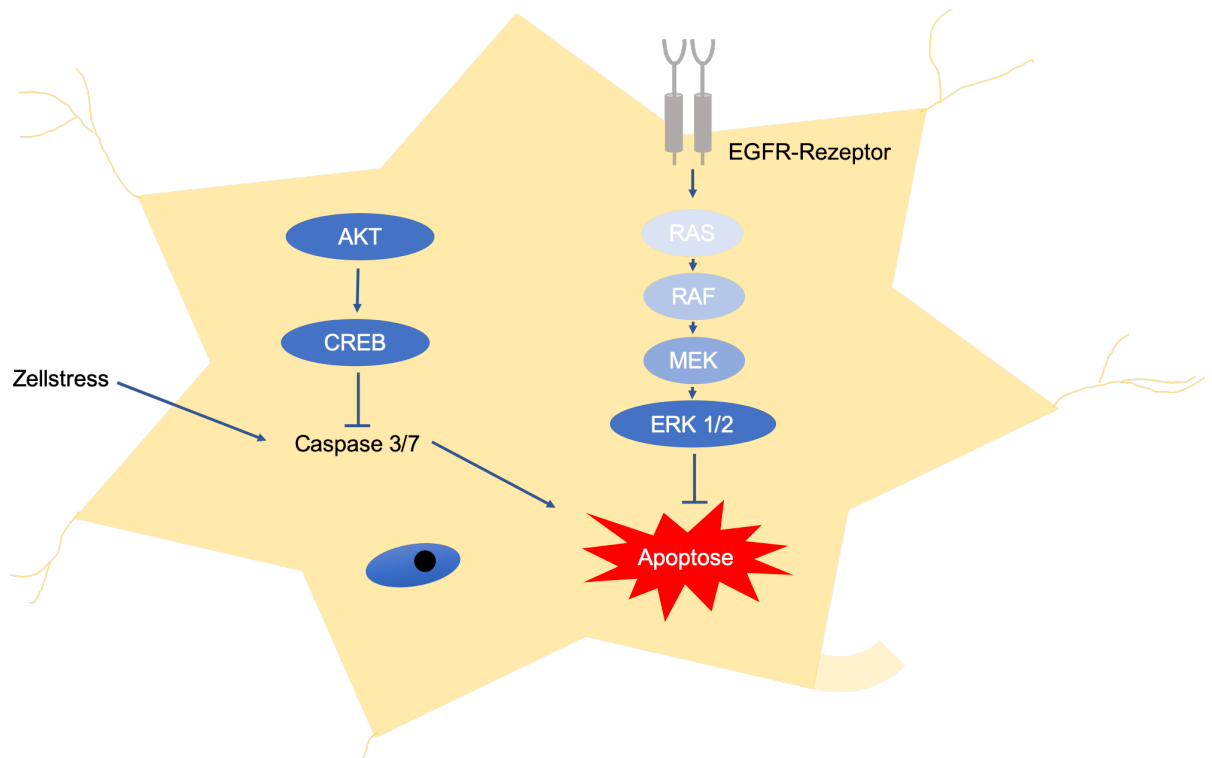


Abbildung 7: Antiapoptotische Signalwege
 Dargestellt ist der AKT-CREB-Signalweg (adaptiert nach Leisz et al. (3, 92)) und ERK-Signalweg (s. Text).

Der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg oder p44/22 MAPK (ERK1/2) Signalweg ist gut untersucht und spielt bei der Pathogenese vieler Tumoren eine zentrale Rolle (92-94), da er Proliferation, Differenzierung (92) und Antiapoptose – durch die Aktivitätsmodulierung apoptotischer Proteine wie BAD und BCL-2 - induzieren kann (94). Unter anderem ausgelöst durch Signale am EGFR-Rezeptor kann innerhalb dieses Signalwegs RAS aktiviert werden, welches bei Tumoren das am häufigsten mutierte Onkogen darstellt. Am Ende des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs stehen ERK 1 und 2. Diese bewirken neben der oben beschriebenen Funktion des Signalwegs auch selbst eine Verstärkung des Signalwegs, da sie die Expression von EGFR- Liganden fördern, sodass das Potential von Antiapoptose, aber auch von Entartung weiter ansteigt (92). Diese Eigenschaften qualifizieren ERK 1/2 neben AKT und CREB als Marker für Antiapoptose.

2 Zielstellung

Ziel der Arbeit war es, im *in vitro* Modell gezielt osmotische bzw. oxidative Stressbedingungen zu schaffen und zu beleuchten, in welchem Ausmaß die Zellen auf Schädigung mit Apoptose reagieren. Die Zellen sollten systematisch mit THCl, SBT, DBT und BFT behandelt werden. Im direktem Vergleich sollte sollte das neuroprotektive Potential von den genannten Substanzen quantifiziert und qualitativ untersucht werden, da bisher Daten für diese Anwendung in dieser Form nicht existieren.

Ferner sollen Auswirkungen von osmotischem sowie oxidativem Stress untersucht und miteinander vergleichbar gemacht werden. Möglich wären auch unterschiedlich effektive antiapoptotische Wirksamkeiten bei Nerven- und Schwann-Zellen. Das Modell wurde mit diesen beiden Zelltypen gewählt, um eine mögliche neurochirurgische Operationssituation abzubilden.

Aufgrund der in der Einleitung dargestellten Hinweise aus experimentellen Arbeiten darauf, dass Thiamin apoptosehemmend wirkt, erscheint die Anwendung in der chirurgischen Praxis naheliegend. Ob sich die bisherigen Erkenntnisse in die Neurochirurgie übertragen lassen, ist bisher unklar. Hierfür soll in der vorliegenden Studie ein grundlegendes Verständnis hergestellt werden, welches klinische Anwendung im Zusammenhang mit Operationen finden könnte.

In Hinblick auf diese Motivation der vorliegenden Studie stellten sich folgende Fragen:

- i. Ist das Thiamin gut verträglich *in vitro*? Beeinflusst es die Zellproliferationsgeschwindigkeit? Gibt es Hinweise für methodenbedingte Zytotoxizität, die durch das Thiamin ausgelöst wird?
- ii. Kann Thiamin den Zelltod der Zellen unter Stress quantitativ verringern? Wenn es Effekte gibt, wie deutlich sind diese?
 - a. Welche Unterschiede der Wirksamkeit zeichnen sich abhängig von der Wahl des Zelltyps ab?
 - b. Lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob Thiamin eher gegen osmotischen oder oxidativen Stress schützt? Bestätigt sich das Thiamin als antioxidativ wirksam?
- iii. Entfaltet Thiamin möglicherweise eine antiapoptotische Wirkung im vorliegenden Modell, die auf molekularer Ebene nachweisbar ist?
 - a. Verändert sich dabei die Menge antiapoptotisch wirksamer Proteine?
 - b. Ändert sich der Grad der Phosphorylierung dieser Proteine und sind die Proteine stärker aktiviert?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien, Chemikalien, Geräte

Materialien

Artikel	Hersteller, Firmensitz
Einmalspritzen 20 ml	B.Braun, Melsungen (Deutschland)
Kryogefäße 1,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht (Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Heinz Herenz, Hamburg (Deutschland)
Pasteur Glaspipetten	DWK Life Sciences (Kimble), Wertheim (Deutschland)
Petrischalen (60,1 cm ²)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)
Pipettenspitzen	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht (Deutschland)
Serologische Glaspipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Spritzenfilter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt AG, Nümbrecht (Deutschland)
Zellkulturtestplatte 24-Loch	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)
Zellkulturtestplatte 96-Loch	Sarstedt AG, Nümbrecht (Deutschland)
Zellkulturtestplatte 96-Loch schwarz	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt AG, Nümbrecht (Deutschland)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner, Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (Deutschland)

Medien und Substanzen für die Zellkultur und Versuche

Artikel	Hersteller, Firmensitz
0,5% Trypsin-EDTA-Lösung	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
DMEM mit Phenolrotindikator	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
DMEM-F12 mit Phenolrotindikator	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
FKS	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
L-Alanyl-Glutamin	Merck, Darmstadt (Deutschland)

PBS <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
Penicillin (10.000 U/ml) /Streptomycin (10.000 µg/ml)	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
<i>RPMI</i> mit Phenolrotindikator	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
<i>RPMI</i> ohne Phenolrotindikator	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
Ampuva Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg (Deutschland)
Benfothiamin	Tokyo Chemical Industry, Tokyo (Japan)
Dibenzoylthiamin	Combi-Blocks, San Diego (USA)
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Methanol	Merck, Darmstadt (Deutschland)
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Protease & Phosphatase-Inhibitor	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
Salzsäure, 32%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Sulbuthiamin	AmBeed, Harlington Heights (USA)
Thiaminhydrochlorid	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Triton X	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)

Komplettsysteme

Artikel	Hersteller, Firmensitz
Cell Proliferation Kit II (enthält XTT)	Roche, Basel (Schweiz)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Basel (Schweiz)
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)

Substanzen für SDS-PAGE und Western Blots

Artikel	Hersteller, Firmensitz
2-Propanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Acrylamid	Serva, Heidelberg (Deutschland)

APS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Benzonase Nuclease	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Gelkassetten	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
Glycerol	Reatec, Dübendorf (Schweiz)
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Nitrocellulose Blotting Membran 0,45 µmol/l	Amersham/ Cytiva, Marlborough (USA)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
Ponceau S	Merck, Darmstadt (Deutschland)
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Tween 20	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Western Blot- Detektionsreagenz	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)

Primäre Antikörper

Anti-GAPDH (Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
Anti-AKT (40D4, 2920S, Maus)	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
Anti-CREB (48H2, 9197S, Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
Anti-ERK1/2 (p44/42 MAPK, 9102S, Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
Anti-p-AKT (Ser473, D9E, 4060S, Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
Anti-p-CREB (Ser133, 87G3, 9198S, Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
Anti-p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, 9101S, Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)

Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
----------------	--

Anti-Maus Cell Signaling Technology, Danvers (USA)

Geräte

Artikel	Hersteller, Firmensitz
CDD-Kamera Image Quant LAS4000	GE Healthcare, Illinois (USA)
Fluoreszenz-Mikroskop	Keyence Deutschland GmbH , Neu-Isenburg (Deutschland)
CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen (Deutschland)
Kipp-/Rollenmischer	Phoenix Instrument/Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Lichtmikroskop	Helmut hund, Wetzlar (Deutschland)
Mikroplate-Reader infinite F200 pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
pH-Meter	Mettler-Toledo, Columbus (USA)
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Pipetus	Hirschmann, München (Deutschland)
Power Supply	GE Healthcare, Illinois (USA)
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
SDS-PAGE-Apparatur Mini Gel Tank	ThermoFisher Scientific, Gibco, Waltham (USA)
Sterilbank	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Schüttler	Scientific Industries
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel (Deutschland)
Blotter	SCI-PLAS, Cambridge (England)
Zentrifugen	Heraeus, Hanau (Deutschland)

Software

Artikel	Hersteller, Firmensitz
EndNoteX9.3.3	Clarivate Analytics, Philadelphia (USA)
Excel for Mac 2011	Microsoft, Redmont (USA)
ImageQuant TL	GE Healthcare, Illinois (USA)
Quantifizierungsprogramm	
Power Point for Mac 2011	Microsoft, Redmont (USA)
Word for Mac 2011	Microsoft, Redmont (USA)

3.2 Zellkulturen

3.2.1 Kultivierung der Zellen

Für alle Versuche wurden die immortalisierten Zelllinien Schwann-Zellen (SW10, CLR-2726, American Type Culture Collection, Manassas, USA) und neuronale Zellen (RN33B, CLR-2825, American Type Culture Collection, Manassas, USA) verwendet. Die Schwann-Zellen wurden in Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) kultiviert. Die neuronalen Zellen wurden in DMEM-F12 kultiviert. Zu allen Medien wurden 10% fetales Kälber Serum (FKS), 2 mmol/l L-Alanyl-Glutamin und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin zugesetzt. Vor Verwendung des FKS erfolgte zunächst eine Hitzeinaktivierung für eine Stunde bei 56 °C im Wasserbad. Die Inkubation wurde in Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm² bei 37 °C mit 5 % CO₂ durchgeführt. Sämtliche Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) statt.

3.2.2 Passage

Ab einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen passagiert (ca. alle 3-4 Tage). Das Medium wurde verworfen, die Zellen wurden mit 5 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 1-2 ml 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung versetzt. Dies führte zur proteolytischen Ablösung der Zellen. Nach vollständiger Ablösung wurde diese durch einen Überschuss FKS-haltigen Mediums gestoppt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und in neuem FKS-haltigen Medium resuspendiert.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Versuche wurden die Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Hierbei handelt es sich um einen Objektträger, der Flüssigkeit eines definierten Volumens aufnehmen kann (0,1 µl pro Großquadrat). Die durchschnittlich gezählte Zellzahl aus einem Großquadrat ergibt die Zellzahl $\times 10^4$ je Milliliter.

3.2.4 Zellkonservierung

Zur dauerhaften Konservierung wurden die Zellen nach o.g. Proteolyse zentrifugiert, in Einfriermedium (90 % FKS, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) aufgenommen und in Kryogefäßen bei -150 °C eingefroren. Zur Rekrutierung der eingefrorenen Zellen wurden diese aufgetaut und in 10 ml 37 °C warmes Medium gegeben, zentrifugiert, in neuem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben. 24 h später wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.3 Behandlung der Zellen

3.3.1 Vorbereitung der Zellen und Thiaminbehandlung

Für alle Experimente wurden mindestens drei unabhängige Replikate durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils mithilfe von Trypsin-EDTA von der Wachstumsfläche der Zellkulturflasche gelöst und in *Roswell Park Memorial Institute (RPMI)*-Medium mit 5 % FKS ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen einem definierten Stressprogramm ausgesetzt (Abbildung 8). Die Vorbehandlung erfolgte 4 Stunden vor Stressinduktion mit THCl (gelöst in *RPMI*), SBT (gelöst in DMSO), DBT (gelöst in DMSO), oder BFT (gelöst in Ethanol mit HCL) in folgenden Konzentrationen (Abbildung 8). Alle gelösten Substanzen wurden zuvor aliquotiert, lichtgeschützt bei -20° C gelagert und vor Gebrauch zentrifugiert sowie durchmischt. Die unbehandelten Kontrollzellen wurden mit entsprechender Konzentration des reinen Lösungsmittels (Vehikel) behandelt.

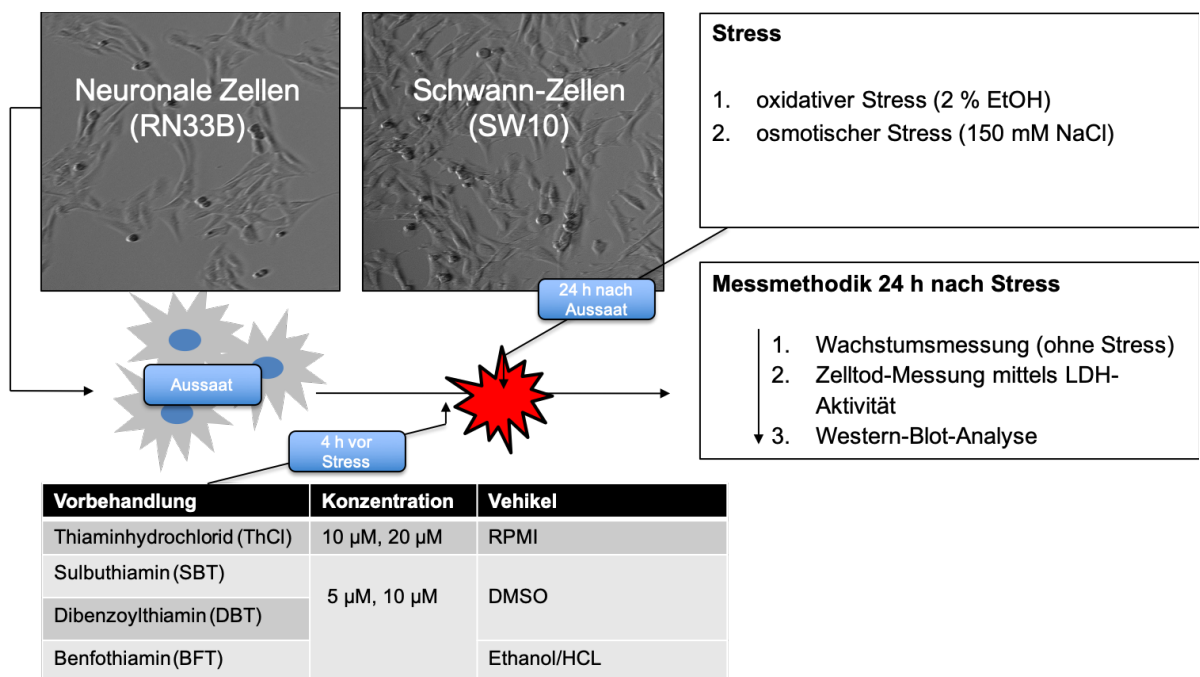


Abbildung 8: Grundaufbau der Hauptversuche

Versuchsprotokoll: 24 Stunden nach Aussaat wurden mit Thiaminderivaten oder reinen Vehikeln vorbehandelte Zellen mit oxidativem oder osmotischem Stress versetzt. Die Vorbehandlung wurde 4 h vor dem Stress durchgeführt. 24 h nach dem Stress erfolgte eine Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Konzentration, um quantitative Unterschiede des Zellüberlebens zu untersuchen, alternativ eine Western Blot-Analyse, um zellmolekulare Zusammenhänge zu analysieren.

3.3.2 Stressinduktion

Die Zellen wurden entweder mit osmotischem oder oxidativem Stress versetzt, nachdem sie 4 h zuvor Stunden mit Thiamin behandelt wurden. Die Kontrollzellen wurden keinem Stress ausgesetzt.

Der osmotische Stress wurde unter Zugabe von 150 mmol/l Natriumchlorid (NaCl) induziert (4). Zunächst wurde eine 1,5 mol/l NaCl-Lösung mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) hergestellt und steril gefiltert. Zugabe von frischem Medium ergab anschließend die Endkonzentration von 150 mmol/l. Der oxidative Stress wurde induziert, indem 2 % EtOH zugegeben wurde. In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass sich mithilfe von 1,6 – 2,0 % EtOH eine Zytotoxizität von etwa 50 % erreichen lässt (5).

Die Kontrollzellen wurden mit der gleichen Menge Aqua dest. behandelt.

3.4 Zellstressunabhängige Wachstumsmessung mittels XTT-Messung

5×10^3 Schwann-Zellen wurden in 100 μ l Medium auf 96-Loch-Platten ausgesät.

Alle Zellen wurden entweder mit DMEM (5 % FKS), RPMI (5 % FKS) oder RPMI (1 % FKS) inkubiert. Die Zellen wurden jeweils mit 10 μ mol/l oder mit 20 μ mol/l THCl vorbehandelt. Die Wachstumsmessung wurde nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Inkubation bei 37 °C mit 5 % CO₂ durchgeführt, wobei das *Cell Proliferation Kit II* verwendet wurde. Das Tetrazoliumsalz 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-hydroxid (XTT) (gelb) wird durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan (orange) reduziert, was einen Farbumschlag zur Folge hat. XTT und Elektronenkopplerreagenz wurden entsprechend den Herstellerangaben im Verhältnis 1:50 gemischt und nach Zugabe wurden die Zellen vier Stunden bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Absorptionsbestimmung mithilfe eines Plattenlesegeräts bei einer Wellenlänge von 492 nm durchgeführt.

Für die Berechnung der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit wurde jeweils das Zeitfenster mit der niedrigeren Verdopplungszeit betrachtet. Dafür wurde die Verdopplungszeit innerhalb von zwei Messzeitpunkten bestimmt und überprüft, ob ein exponentieller Anstieg des Wachstums der untersuchten Zellen zwischen 48 h - 72 h oder 72 - 96 h nach dem Einsäen vorlag. Die Messpunkte aus einem exemplarischen Replikat sind in

Abbildung 9 dargestellt. Die Verdopplungszeit ließ sich, wie hier gezeigt, ableiten durch Einsetzen des Absorptionswerts (A) der beiden Messpunkte nach 48 h und nach 72 h mithilfe der Formel:

$$\text{Verdopplungszeit in h} = \text{Ln}(2) \cdot (t_2 - t_1) / (A_2 - A_1)$$

In diesem Beispiel wurde die Verdopplungszeit also anhand der Werte nach 72 h und 96 h bestimmt, da die Verdopplungszeiten in diesem Zeitraum kleiner waren als die Verdopplungszeiten im Zeitraum nach 48 h und nach 72 h, wie die Gegenüberstellung der Durchschnittszeiten zeigt („Ø“ Abbildung 9).

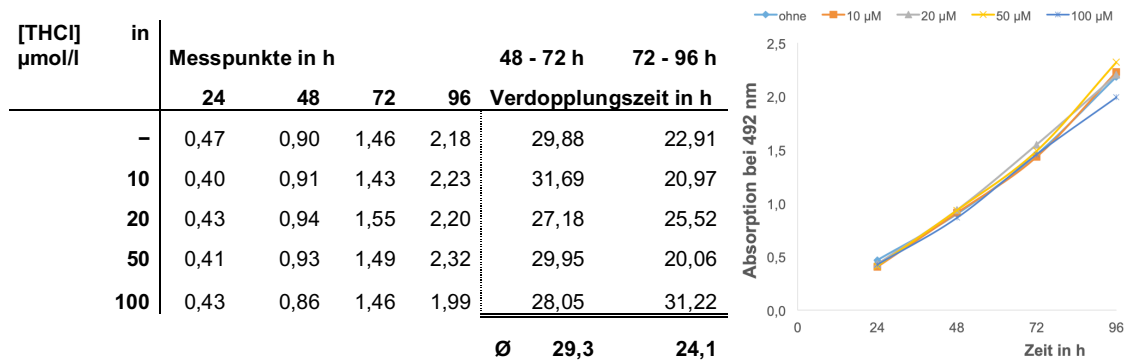


Abbildung 9: Beispiel einer Wachstumsmessung

Links dargestellt ist ein repräsentatives Replikat gemessener Absorptionen der Schwann-Zellen. Durchgeführt wurden die Messungen mit Zellen, die entweder nicht, oder mit 10, 20, 50 oder 100 µmol/l THCl behandelt wurden. Die Absorption stieg nach ein, zwei, drei oder vier Tagen für alle Zellen. Rechts ist der Zusammenhang grafisch dargestellt. Anschließend wurde die Verdopplungszeit im Zeitraum zwischen den Messpunkten nach 48 h und nach 72 h einerseits sowie nach 72 h und nach 96 h andererseits bestimmt (zwei Spalten in der Abbildungsmitte). Diese Werte wurden anschließend verrechnet mit den beiden weiteren Testwiederholungen (insgesamt 3 biologische Replikate). Es ergaben sich für jede Konzentration also Mittelwerte dieser Replikate, die in Abbildung 12 - Abbildung 14 grafisch dargestellt sind.

Aus den so bestimmten Verdopplungszeiten der drei Replikate wurden arithmetische Mittelwerte bestimmt und es ergaben sich mittlere Verdopplungszeiten (t_v , Abbildung 12 - Abbildung 14).

Dieser Versuch wurde nicht mit neuronalen Zellen wiederholt, da es sich hier um einen Vorversuch handelte, bei dem an den Schwann-Zellen stellvertretend eine fehlende Beeinflussung des Wachstums gezeigt werden konnte (siehe Ergebnisteil).

3.5 Ermittlung der Zytotoxizität mittels Messung der Laktatdehydrogenase

Schwann- und neuronale Zellen wurden in 24-Loch-Zellkulturtestplatten ausgesät (Schwann-Zellen 5×10^4 und neuronale Zellen 15×10^4 Zellen ml^{-1} und pro Loch, 1 ml je Loch) und anschließend mit 10 bzw. 20 µmol/l THCl, 5 bzw. 10 µmol/l DBT, 5 bzw. 10 µmol/l SBT oder 5 bzw. 10 µmol/l BFT vorbehandelt (Abbildung 8). Jede Konzentration wurde für jeden Zelltyp und für jeden Stresstyp (oxidativ und osmotisch) in dreifacher Wiederholung getestet.

24 h nach Stressinduktion wurden die Zellen auf Zelltodraten untersucht. Verwendet wurde hierfür das *Cytotoxicity Detection Kit*. Das Funktionsprinzip der Zytotoxizitätsmessung beruht auf der Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) durch avitale Zellen. Pyruvat wird durch freigesetzte LDH zu Laktat umgewandelt und aus Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)⁺ entsteht NADH. Dieses bewirkt die Umsetzung von Jodtetrazoliumchlorid (INT) zum Farbstoff Formazan (Abbildung 10).

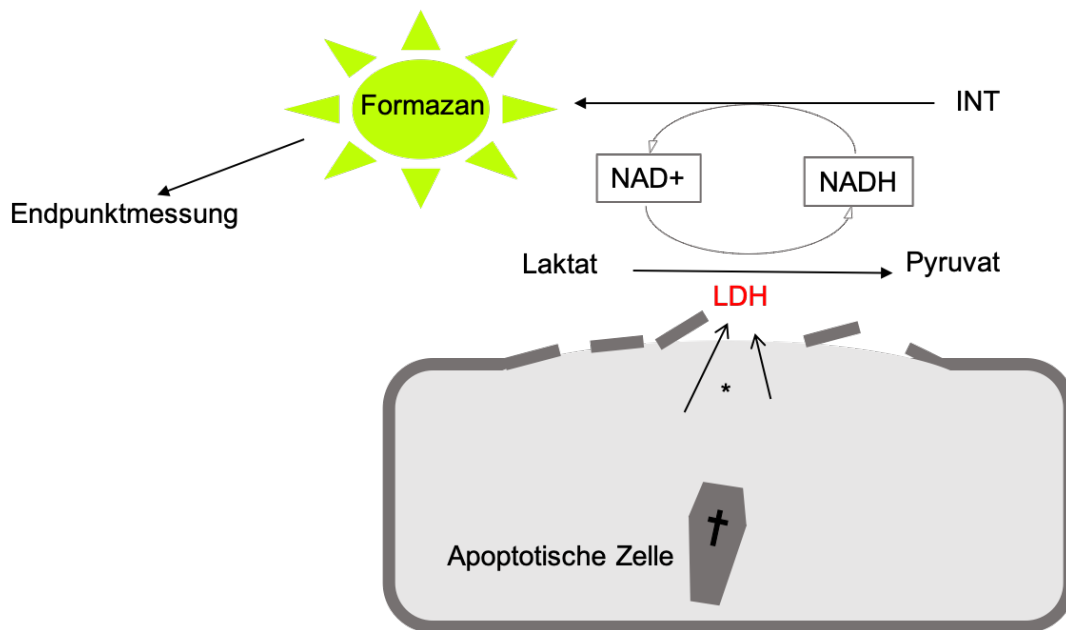


Abbildung 10: Prinzip der Zytotoxizitätsmessung

Prinzip der Zytotoxizitätsmessung nach Schädigung mit osmotischem oder oxidativem Stress. *LDH gelangt durch Zellschäden in das Umgebungsmedium (proportional zum Zelltod). Abbildung adaptiert nach Darstellung in der Anlage des Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Basel (Schweiz).

Unmittelbar vor jeder Messung wurde eine Lysekontrolle durchgeführt, indem Proben aller unterschiedlich gestressten Zellreihen mit 20 µl Triton X pro ml Medium lysiert wurden.

Anschließend wurden 100 µl des Zellüberstandes in Triplikaten auf eine 96-Loch-Zellkulturtestplatte übertragen. Für die Absorptionsbestimmung des Zellmediumüberstandes bei 492 nm Wellenlänge wurde der Tecan reader infinite F200 pro verwendet.

Die Sterberaten wurden dabei stets errechnet, indem die Messreihen auf die entsprechenden Lysekontrollen bezogen wurden, welche definitionsgemäß zu 100 % starben. Die im Triplikat vorliegenden Messreihen wurden anschließend mit dem Triplikat der jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppe mithilfe eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests verglichen.

3.6 Proteinanalyse

3.6.1 Proteinisolierung

Die Schwann-Zellen oder neuronalen Zellen wurden auf Zellkulturschalen mit einer Wachstumsfläche von 58 cm² ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % inkubiert. Anschließend wurden sie mit 10 µmol/l THCl, 5 µmol/l STH, 5 µmol/l DBT oder 5 µmol/l BTH vorbehandelt. Vier Stunden später wurden sie – wie oben beschrieben – osmotischem oder oxidativem Stress ausgesetzt. 24 h später wurden die Zellen zweimal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor versetzt. Anschließend konnten die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden. Diese wurden bei 4 °C fünf Minuten zentrifugiert und das Zellpellet anschließend zur weiteren Analyse bei -20 °C eingefroren.

Die Proben wurden zur Proteinkonzentrationsbestimmung auf Eis aufgetaut und mit je 0,25 µl Benzonase (240 Einheiten/µl) in PBS versetzt, was ein DNS-Verdau der Proben innerhalb von 30 Minuten zur Folge hatte. Anschließend wurde jede Probe mit 70 µl Laemmli-Puffer (Tabelle 1) ohne β-Mercaptoethanol versetzt und bei 95 °C 5 Minuten temperiert. Laemmli-Puffer enthält Sodiumdodecylsulfat (SDS), dessen negative Ladung die Eigenladung der Proteine überdeckt und somit eine gelelektrophoretische Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach molekularer Masse ermöglicht.

Tabelle 1: Zusammensetzung Laemmli-Puffer

TRIS HCl pH 6,8	125 mmol/l
Glycerol	20 %
SDS	4 %
Bromphenolblau	0,002 %
β-Mercaptoethanol	5 %

3.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Hierfür wurde das *Pierce® BCA Protein Assay Kit* verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Das Messverfahren beruht auf dem Prinzip, dass Proteine mit Cu²⁺-Ionen komplexieren und zu Cu⁺-Ionen reduzieren. Diese Kupferionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der photometrisch gemessen werden kann.

Es wurden die im Kit enthaltenen Kalibrierstandards mit definierten Konzentrationen zwischen 25 und 2000 µg/ml Rinderserumalbumins (BSA) hergestellt. Von diesen konnte die optische Dichte ermittelt werden.

Neben den BSA-Kalibrierstandards wurden die Proteinproben (Abschnitt 3.6.1) zentrifugiert, geschüttelt, jeweils 1:10 verdünnt in Triplikaten auf eine 96-Loch-Platte aufgebracht und mit 200 µl eines BCA-Substrates versetzt. Die Testplatte wurde anschließend bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und danach im Photometer bei 595 nm Wellenlänge gemessen.

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen optischen Dichte und der bekannten BSA-Konzentration ($R = 0,99$), so dass mittels des Anstiegs der Eichgeraden ($y = mx$) und der optischen Dichte der Proben die Konzentration errechnet werden kann. Dabei ist m je nach Eichgerade und Versuch unterschiedlich.

Aus dem Zusammenhang der zuvor bekannten BSA-Konzentrationen und der gemessenen optischen Dichte der BSA-Kalibrierstandards ließ sich eine Formel (Abbildung 11) generieren, die sich schließlich auch auf die Proteinproben anwenden ließ.

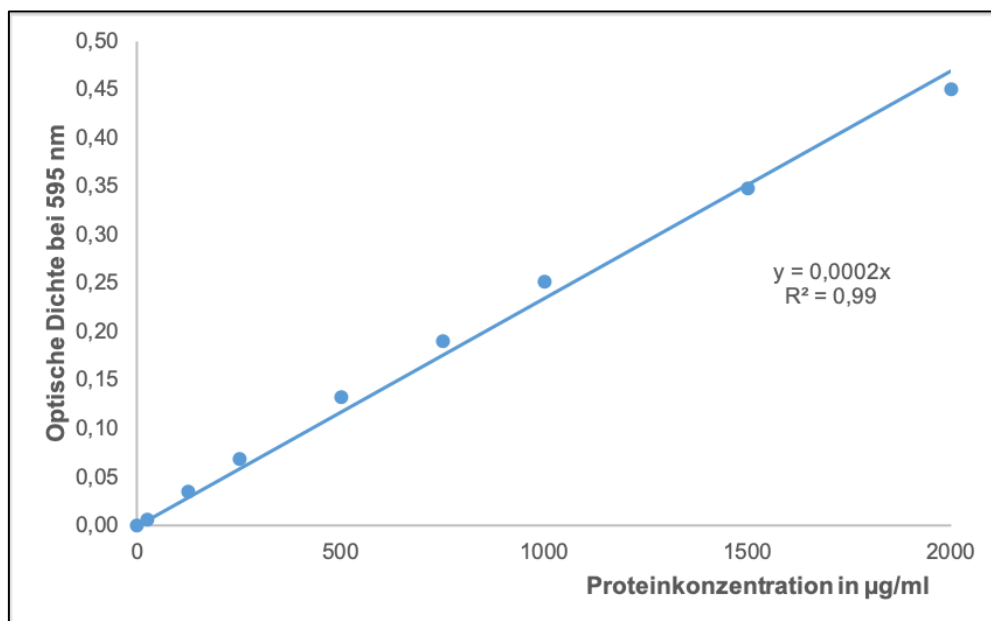


Abbildung 11: Repräsentatives Beispiel einer Eichgeraden
Die gemessene optische Dichte wird gegen die Konzentration des BCA aufgetragen.

Durch Einsetzen der optischen Dichte der Proteinproben konnte so die vorliegende Proteinkonzentration ermittelt werden.

Abschließend wurden die Proben mit 5 % β-Mercaptoethanol versetzt und 5 Minuten bei 95 °C temperiert. Dieser Schritt diente zur Aufspaltung der Disulfidbrücken.

3.6.3 SDS-PAGE

Zur Vorbereitung wurden Gele mit 10 % SDS-Polyacrylamid hergestellt (Tabelle 2). Ammoniumperoxidsulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurden zuletzt hinzugegeben. Sie dienen als Radikalstarter und bewirken die Polymerisierung des Gels.

Tabelle 2: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels

	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Wasser	4,8	2,4
40 % Acrylamid	2,5	0,5
1,5 mol/l Tris pH 8,8	2,5	-
0,5 mol/l Tris pH 6,8	-	1
10% SDS	0,1	0,04
10% APS	0,1	0,04
TEMED	0,004	0,006

Zuerst wurde das Trenngel in die Gelkassetten eingefüllt und mit einer Schicht 2-Propanol bedeckt, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern. Anschließend wurde das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen und Probenkämme für 10 Geltaschen eingesetzt. Nach Polymerisation konnten die fertigen Gelkassetten entweder sofort verwendet oder in feuchten Tüchern bei 4 °C gelagert werden.

Die Gelkassetten wurden in eine Gellaufkammer eingespannt und die Probenkämme entnommen. Anschließend wurde der Laufpuffer (Tabelle 3) eingefüllt und jede Spur des Gels mit 30 µg Proteinlysat beladen. Als Marker wurde der *Page Ruler Prestained Protein Ladder* verwendet. Die Fokussierung im Sammelgel erfolgte zunächst für 30 Minuten bei 55 V, dann für ca. eine Stunde bei 90 V und anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht im Trenngel für ca. zwei Stunden bei 120 V.

Tabelle 3: Zusammensetzung des TRIS-Glycin-Laufpuffers

TRIS	2,5 mmol/l
Glycin	19,2 mmol/l
SDS	0,01 %

3.6.4 Western Blot

Die Gekassetten wurden geöffnet und das Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht. Senkrecht zum Polyacrylamidgel wurde ein elektrisches Feld mit $0,9 \text{ mA/cm}^2$ angelegt. Die schon elektrophoretisch aufgetrennten Proteine besitzen durch die Denaturierung mittels SDS eine negative Nettoladung und migrieren auf die positiv geladene Membran, wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden werden. Zur Unterstützung der Migration wurden drei verschiedene Transferpuffer (Tabelle 4) verwendet, die jeweils Methanol enthalten, welches die Bindung zwischen SDS und Proteinen lockert. Dadurch werden die Proteine besser an die Membran gebunden. Es wurden je drei Filterpapiere mit den Transferpuffern getränkt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Transferpuffer

	pH-Wert	TRIS	6-Aminohexansäure	Methanol
Anodenlösung I	10,4	300 mmol/l,		20 %
Anodenlösung II	10,4	25 mmol/l		20 %
Kathodenlösung III	7,6		40 mmol/l	20 %

Das Blotting erfolgte für 90 min, danach wurde das Gel verworfen und die Nitrozellulosemembran zum Proteinnachweis mit Ponceau S gefärbt. Es folgte eine Blockierung der Membran für eine Stunde in 5 % Milchpulver, welches in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) mit Tween 20 (TBS-T) (Tabelle 5) gelöst wurde. Dieser Schritt dient der Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen.

Tabelle 5: Zusammensetzung des TBS-Puffers

TBS	NaCl	150 mmol/l
	TRIS HCl pH 8,0	10 mmol/l
Zur Herstellung von TBS-T zusätzlich	Tween 20	0,05 %

Anschließend wurde die Membran über 12 h mit den spezifischen Antikörpern AKT und p-AKT, CREB und p-AKT, ERK1/2 und p-ERK und GAPDH bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mithilfe eines Rollenmischers inkubiert. Die Antikörper wurden dabei je nach Herstellerangaben mit 5 % Milchpulver in TBS-T oder 5 % BSA in TBS-T gelöst (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vorbereitung der Antikörper gemäß Produkthanlage von Cell Signaling Technology, Danvers (USA)

	Bezeichnung	Konzentration	Gelöst in
Primäre Antikörper	Anti-GAPDH (Kaninchen)	1:1000	5 % BSA in TBS-T
	Anti-AKT (Maus)	1:2000	5 % Milchpulver in TBS-T
	Anti-CREB (Kaninchen)	1:1000	5 % BSA in TBS-T
	Anti-ERK1/2 (p44/p42)* (Kaninchen)	1:1000	5 % BSA in TBS-T
	Anti-p-AKT (Ser473) (Kaninchen)	1:2000	5 % BSA in TBS-T
	Anti-p-CREB (Ser133) (Kaninchen)	1:1000	5 % BSA in TBS-T
	Anti-p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204 und Thr185/187) (Kaninchen)	1:1000	5 % BSA in TBS-T
Sekundäre Antikörper	Anti-Kaninchen	1:1000	2 % Milchpulver in TBS-T
	Anti-Maus	1:1000	2 % Milchpulver in TBS-T
* ERK 1/2 sind laut Datenblatt der Firma Cell Signaling Technology, Danvers (USA), zwei Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) mit Molekulargewicht 44 und 42 kDa und werden beide durch MEK im p44/22 MAPK (ERK1/2) Signalweg stimuliert (Abbildung 30)			

Zur Vorbereitung der Entwicklung und Quantifizierung wurde nach 12 h der überschüssige Antikörper entfernt, indem 5 mal 5 Minuten mit TBS-T gewaschen wurde. Daraufhin wurde die Membran eine Stunde mit sekundärem Antikörper (Kaninchen oder Maus) in 2 % Milchpulver in TBS-T rollen gelassen. Im Anschluss wurde 3 mal 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und 2 mal 5 Minuten mit TBS, um Störungen zwischen der später verwendeten Meerrettichperoxidase und Tween 20 zu vermeiden. Die Detektion des Antikörpersignals wurde mittels Elektrochemilumineszenz-Substrat durchgeführt. Es wurde nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:1 angemischt und jeweils 1 ml pro Membran aufgebracht. Das Antikörpersignal wurde mithilfe einer Spezialkamera des *Image Quant 4000* (GE Healthcare, Illinois (USA)) detektiert. Anschließend erfolgte die semiquantitative Auswertung der Signale mit dem Programm *ImageQuant TL*.

Berechnung der Proteinmengen

Die Proben wurden entweder mit THCl, SBT, DBT, oder BFT behandelt und verschiedenen Stressbedingungen (ohne, osmotischer, oxidativer Stress) ausgesetzt. Für jede dieser Proben wurden die Banden der Antikörper (AKT, CREB, ERK1/2) in Triplikaten, also drei zugehörigen Banden, gemessen. Diese wurden jeweils mit dem Signal der entsprechenden Ladekontrolle (GAPDH) ins Verhältnis gesetzt, um - für diese Methode typische, durch ungenaue Beladung bedingte - Schwankungen ausgleichen zu können. Nach dieser Wertennormalisierung wurden arithmetische Mittelwerte der Thiaminproben (T) für AKT, CREB und ERK1/2 gebildet.

Mit folgender Formel wurden diese Mittelwerte mit den Lösungsmittelkontrollen (Lmk) un behandelter Zellen ins Verhältnis gesetzt, um die relativ durch Thiamin veränderte Proteinmenge des Gesamtproteins in % (G) zu ermitteln:

$$G = \frac{T}{Lmk} \times 100$$

Diese Werte sind als relative Proteinmengen in Prozent im Ergebnisteil tabellarisch aufgeführt. Es handelt sich dabei um ein Maß für den Effekt, den ein Thiaminderivat auf die Proteinmenge hat.

Die zugehörigen p-Werte wurden mithilfe eines zweiseitigen t-Tests errechnet, indem die Triplikate der behandelten Proben mit den zugehörigen Triplikaten der Lmk verglichen wurden. Die p-Werte vergleichen also Proteinmengen abhängig vom Vorhandensein von Thiamin.

Berechnung der Aktivierung antiapoptotischer Proteine

Das bereits beschriebene Verfahren (Normalisierung, arithmetische Mittelwerte) wurde für alle Proben auch für die phosphorylierten Proteine (p-AKT, p-CREB, p-ERK1/2) durchgeführt. Es konnte mit derselben Formel die relativ durch Thiamin veränderte Proteinmenge des phosphorylierten Proteins (P) bestimmt werden:

$$P = \frac{T}{Lmk} \times 100$$

Zur Berechnung der p-Werte der in Triplikaten vorliegenden A für p-AKT, p-CREB und p-ERK wurde auch hier wieder ein zweiseitiger t-Test durchgeführt, bei dem mit un behandelten Lmk verglichen wurde.

Da eine Phosphorylierung einem aktivierten Zustand der untersuchten Proteine entspricht, konnte über einen Vergleich der Proteinmengen von Gesamt- und phosphorylierten Proteinen eine Berechnung der Proteinaktivierung folgendermaßen bestimmt werden:

$$\text{Proteinaktivierung in \%} = \frac{|G - P|}{G} \times 100$$

Im Folgenden wird von Aktivierung der Proteine oder Proteinaktivierung in % gesprochen.

4 Ergebnisse

4.1 Kein Einfluss von Thiamin auf das reguläre Zellwachstum

Um zunächst festzustellen, ob Thiamin das Zellwachstum beschleunigen oder verlangsamen kann, wurde die Zellteilung mittels Absorption nach Behandlung mit Thiamin in unterschiedlichen Konzentrationen gemessen.

Die Wachstumsmessungen der Schwann-Zellen zeigten ein etwa logarithmisches Wachstum. Die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Replikate sind für die verschiedenen THCl-Konzentrationen grafisch gezeigt (Abbildung 12 - Abbildung 14). Es wurde eine direkte Gegenüberstellung der Messwertkurven visualisiert (Abbildung 14 Grafik rechts).

Die Schwann-Zellen benötigten für eine Verdopplung der Zellzahl insgesamt zwischen 29,4 h und 25,6 h (Abbildung 12 - Abbildung 14). Es war kein Zusammenhang zwischen den eingesetzten Thiaminkonzentrationen und dem Verlauf der Wachstumskurve erkennbar, was die t-Test-Berechnung und die Vergleichsübersicht zwischen den Wachstumskurven zeigt (Abbildung 14 rechts). Die unbehandelten Zellen hatten eine errechnete Verdopplungszeit von $t_v = 26,7$ h (Abbildung 12). Nach Behandlung mit 10 $\mu\text{mol/l}$ THCl kam es zu keiner Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit (Abbildung 12, $t_v = 26,8$ h, p (Vergleich mit Lmk) nach 72 h = 0,73).

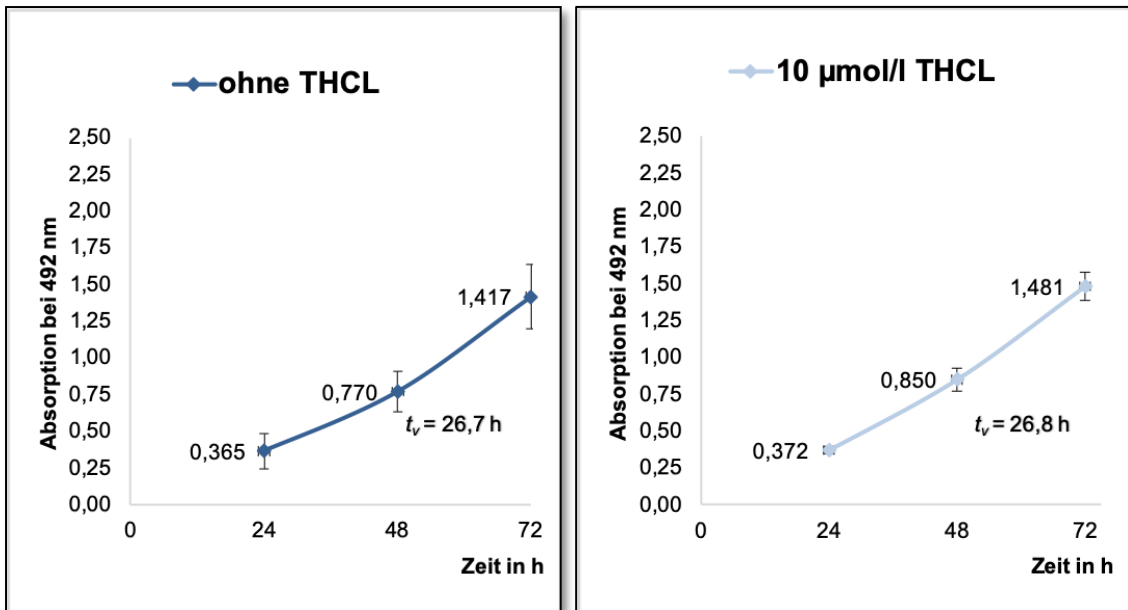


Abbildung 12: Wachstumsmessung ohne und mit 10 µmol/l Thiamin
Die Abbildung zeigt Schwann-Zellen ohne (links) und mit 10 µmol/l THCl (rechts). Abgebildet sind stets die Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen – diese werden durch die Standardabweichungen veranschaulicht.

Die mit 20 µmol/l THCl behandelten Zellen hatten eine etwas geringere Wachstumsgeschwindigkeit mit einer Verdopplungszeit von $t_v = 27,5$ h (Abbildung 13, p = 1,00).

Nach Verabreichung von 50 µmol/l THCl kam es zu einer Verdopplungszeit von $t_v = 25,6$ h (Abbildung 13, p = 0,68).

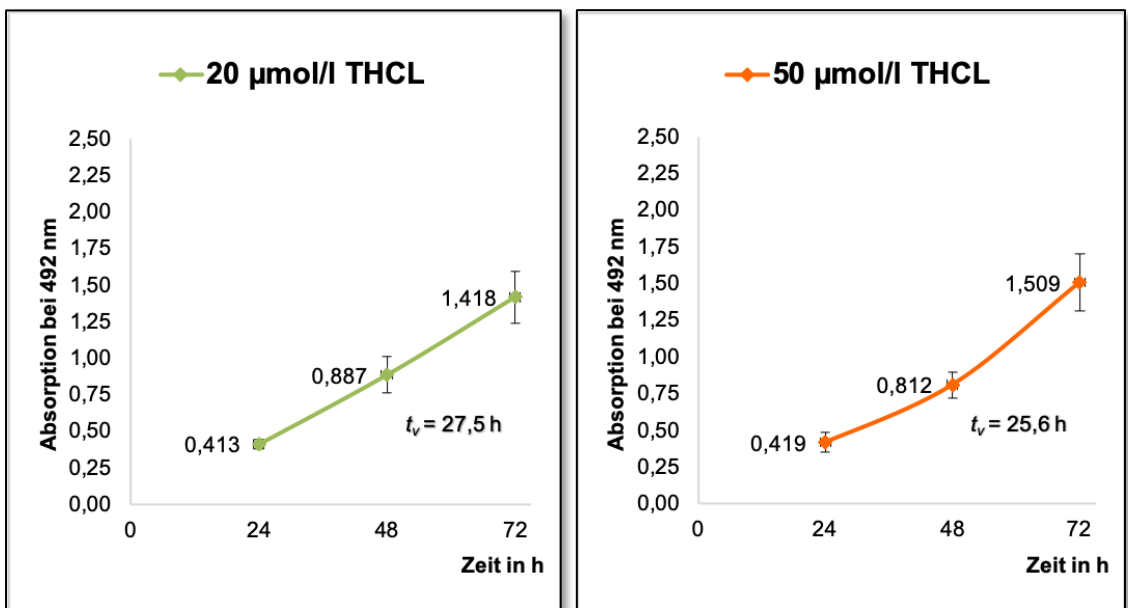


Abbildung 13: Wachstumsmessung mit 20 µmol/l und 50 µmol/l Thiamin
Die Abbildung zeigt Schwann-Zellen mit 20 µmol/l (links) und mit 50 µmol/l THCl (rechts).

Die Verdopplungszeit der mit 100 µmol/l THCl behandelten Zellen betrug $t_v = 29,4$ h (Abbildung 14, $p = 0,98$).

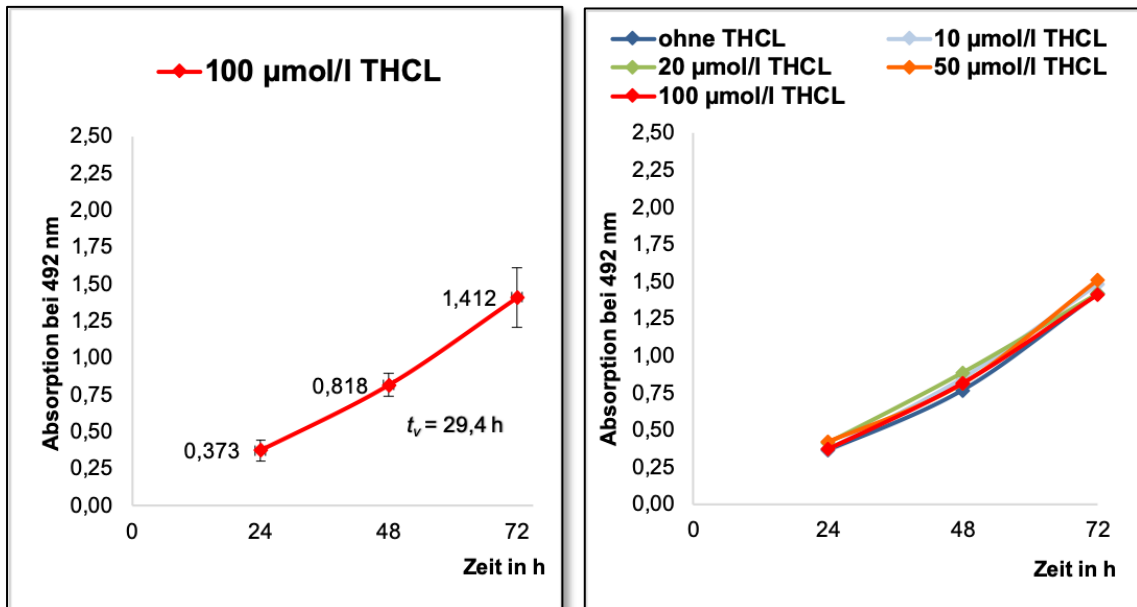


Abbildung 14: Wachstumsmessung mit 100 µM Thiamin und Direktvergleich der Wachstumskurven

Die Abbildung zeigt auf der linken Seite Schwann-Zellen, die mit 100 µmol/l THCl behandelt wurden. In der Grafik rechts wurden die Kurven der Wachstumsmessungen übereinandergelegt, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Es ergaben sich keine Hinweise für eine Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit durch Thiaminbehandlung.

Es gab also beim Vergleich der errechneten Verdopplungszeiten und beim direkten Vergleich der Absorptionswerte nach 72 h keine Hinweise darauf, dass Thiamin in verschiedener Konzentration einen Einfluss auf die entstandene Zellmasse und die Wachstumsgeschwindigkeit haben könnte.

4.2 Keine antiapoptotischen Effekte durch Thiaminderivate bei Schwann-Zellen

4.2.1 Keine Hinweise auf Zelltodreduktion durch THCl

Es ergaben sich unter osmotischem Stress durch den Einsatz von 10 µmol/l THCl (Abbildung 15) keine Hinweise für eine Veränderung der Zytotoxizität, denn es starben 26 % ($p = 0,97$) der so behandelten Zellen, während im Durchschnitt auch 26 % der unbehandelten Schwann-Zellen starben.

Wurde die Dosis auf 20 µmol/l THCl gesteigert, starben durch osmotischen Stress 21 % ($p = 0,60$) der Zellen (Abbildung 15).

Demgegenüber starben unter oxidativem Stress ohne weitere Intervention 27 % der Zellen (Abbildung 15). Wurde mit 10 µmol/l THCl behandelt, starben 26 % ($p = 0,83$). Bei höherer THCl-Konzentration von 20 µmol/l THCl, starben 27 % ($p = 0,96$) (Abbildung

15) In diesem Versuch gab es also keine eindeutigen Hinweise auf eine Beeinflussung des Zelltods durch THCl.

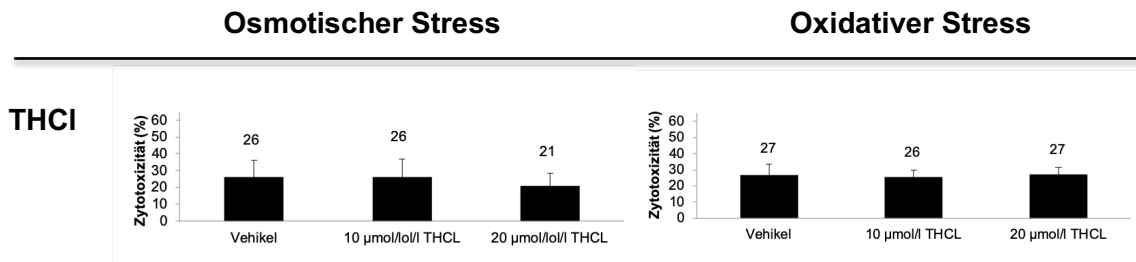


Abbildung 15: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen. Abgebildet sind die Auswirkungen auf die Zytotoxizität nach Vorbehandlung mit THCl bei Schwann-Zellen unter osmotischem (links) oder oxidativem Stress (rechts in der Abbildung). Es gab keine deutlichen Hinweise für einen Einfluss auf den Zelltod.

4.2.2 Kein Verhindern des Zelltods durch SBT

Es gab keine Hinweise darauf, dass SBT die Zytotoxizität unter osmotischem Stress reduzieren konnte (Abbildung 16). Ohne Behandlung starben 29 % der Zellen und mit 5 bzw. 10 µmol/l SBT starben 32 % ($p = 0,84$) bzw. 31 % ($p = 0,88$) der Zellen.

Unter oxidativem Stress hingegen starben ohne SBT 38 % der Schwann-Zellen und nach Behandlung mit 5 µmol/l SBT starben 36 % ($p = 0,90$). Wurde die SBT-Dosis auf 10 µmol/l erhöht, blieb eine Verbesserung des Resultates aus, denn es starben 38 % ($p = 0,99$) der Schwann-Zellen (Abbildung 16). Somit konnte hier kein protektiver Effekt des SBT gezeigt werden.

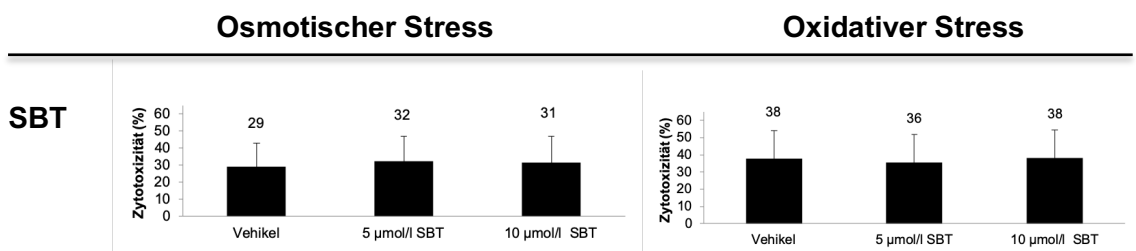


Abbildung 16: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen. Auswirkungen auf die Zytotoxizität nach Vorbehandlung mit SBT bei Schwann-Zellen unter osmotischem oder oxidativem Stress. Ein protektiver Effekt konnte hier nicht gezeigt werden.

4.2.3 Kein verbessertes Zellüberleben durch DBT

Bei Behandlung mit 5 µmol/l DBT und osmotischem Stress sank der Anteil apoptotischer Schwann-Zellen von 32 % auf 30 % ($p = 0,89$) und unter 10 µmol/l DBT starben 31 % ($p = 0,95$) der Zellen (Abbildung 17).

Auch unter oxidativem Stress gab es keine Hinweise für ein verbessertes Überleben der Schwann-Zellen durch DBT. Der Anteil apoptotischer Zellen stieg hier nach Behandlung mit 5 µmol/l DBT von 38 % auf 44 % ($p = 0,74$) und auf 46 % ($p = 0,63$) nach Behandlung

mit 10 µmol/l DBT (Abbildung 17). Demnach konnte DBT das Überleben der Zellen nicht verbessern, sondern verstärkte die Apoptose sogar leicht.

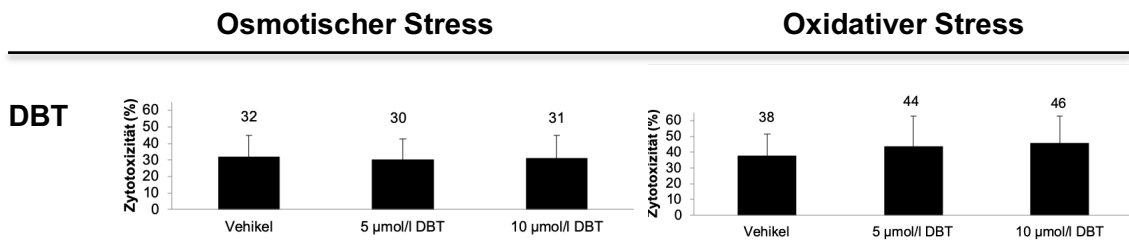


Abbildung 17: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen. Hier dargestellt sind die Auswirkungen auf die Zytotoxizität nach Vorbehandlung mit 5 bzw. 10 µmol/l DBT bei Schwann-Zellen unter osmotischem oder oxidativem Stress. DBT führte nicht zur Apoptosereduktion.

4.2.4 Keine Überlebensvorteile durch BFT

Die Behandlung der Zellen mit BFT führte zu keiner Reduktion der Zytotoxizität nach osmotischem Stress. Ohne Behandlung starben 27 % der gestressten Zellen und durch Zusatz von 5 µmol/l BFT blieb der Anteil bei 27 % ($p = 0,96$). Unter 10 µmol/l Thiamin BFT betrug der Anteil apoptotischer Zellen 28 % ($p = 0,99$) (Abbildung 18).

Unter oxidativem Stress starben ohne BFT 42 % der Zellen. Mit 5 µmol/l BFT wurde die Zytotoxizität auf 36 % ($p = 0,67$) gesenkt. 10 µmol/l BFT konnte nicht verhindern, dass 38 % ($p = 0,77$) der Schwann-Zellen starben (Abbildung 18).

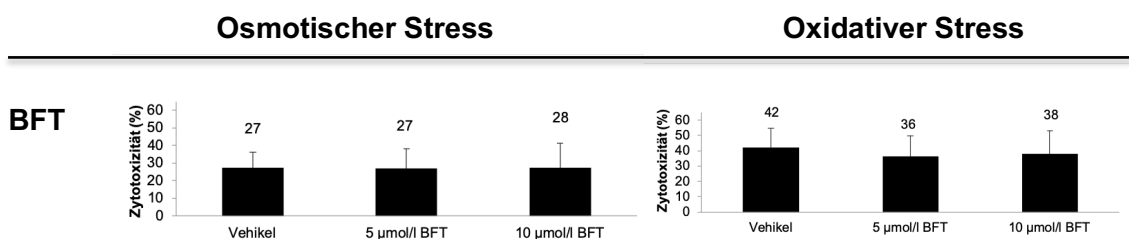


Abbildung 18: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei Schwann-Zellen. Es gab keine Hinweise auf positive Auswirkungen auf die Zytotoxizität nach Vorbehandlung mit 5 bzw. 10 µmol/l BFT bei Schwann-Zellen unter osmotischem oder oxidativem Stress.

4.3 Kein antiapoptotischer Effekt von Thiamin auf neuronale Zellen

4.3.1 Keine Verhinderung des Zelltods durch THCl bei neuronalen Zellen

Neuronale Zellen starben unter osmotischem Stress zu 47 %, während nach Gabe von 10 µmol/l THCl 52 % ($p = 0,85$) der Zellen apoptotisch wurden. Wurden die Zellen mit 20 µmol/l THCl versetzt, starben 53 % ($p = 0,84$) der Zellen (Abbildung 19).

Unter oxidativem Stress traten ohne Behandlung 45 % der Zellen in die Apoptose ein. Mit 10 µmol/l THCI betrug der Anteil der gestorbenen Zellen 46 % ($p = 0,93$) und mit 20 µmol/l THCI 51 % ($p = 0,75$) (Abbildung 19).

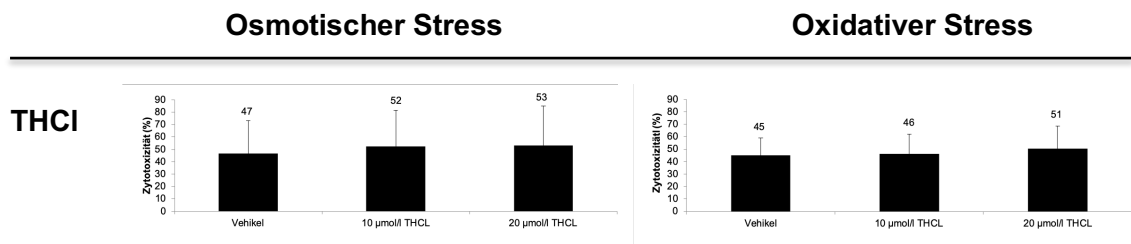


Abbildung 19: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen. Dargestellt ist das Ausbleiben der Antiapoptose unter osmotischem (links) oder oxidativem Stress (rechts in der Abbildung) nach Vorbehandlung mit 10 bzw. 20 µmol/l THCI.

4.3.2 Keine antiapoptotischen Effekte von SBT auf neuronale Zellen

Statt 52 % betrug der Anteil der Zellen, die durch osmotischen Stress starben, durch den Einsatz von 5 µmol/l bzw. 10 µmol/l SBT 46 % ($p = 0,85$) bzw. 52 % ($p = 1,00$) (Abbildung 20).

Oxidativ gestresste Zellen starben ohne Behandlung zu 52 %, trotz 5 µmol/l SBT gingen 54 % ($p = 0,89$) in die Apoptose ein und unter 10 µmol/l 58 % ($p = 0,74$) (Abbildung 20).

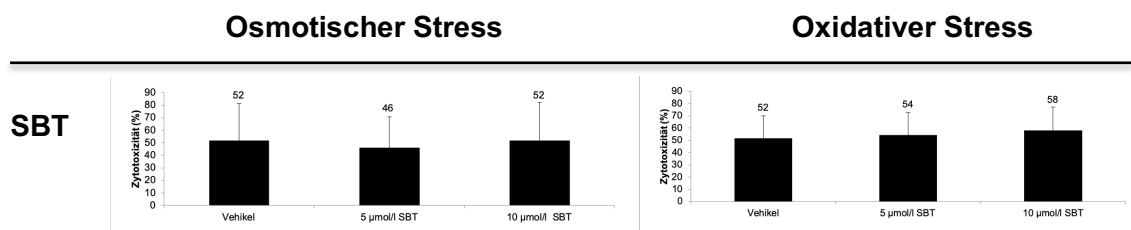


Abbildung 20: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen. Dargestellt ist das Ausbleiben der Antiapoptose unter osmotischem (links) oder oxidativem Stress (rechts in der Abbildung) nach Vorbehandlung mit 5 bzw. 10 µmol/l SBT.

4.3.3 Durch DBT kein Schutz neuronaler Zellen vor Apoptose

Es gab keine Hinweise darauf, dass DBT die Zytotoxizität durch osmotischen Stress reduzieren konnte. Ohne Behandlung starben 58 % der Zellen und mit 5 bzw. 10 µmol/l DBT starben 62 % ($p = 0,88$) bzw. 66 % ($p = 0,72$) der Zellen (Abbildung 21).

Unter oxidativem Stress konnte DBT den Zelltod nicht verhindern, sowohl ohne Behandlung, als auch unter 5 µmol/l DBT ($p = 0,85$) starben 56 % der neuronalen Zellen und unter 10 µmol/l DBT starben 65 % ($p = 0,62$) (Abbildung 21).

Osmotischer Stress

Oxidativer Stress

DBT

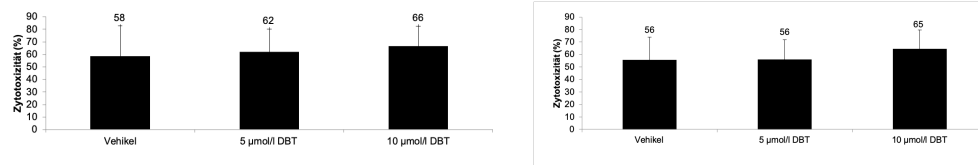


Abbildung 21: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen

In der Abbildung wird der Effekt von 5 bzw. 10 µmol/l DBT auf neuronale Zellen unter Stressbedingungen dargestellt. Eine Verbesserung des Zellüberlebens konnte nicht festgestellt werden.

4.3.4 Kein neuroprotektiver Effekt von BFT auf neuronale Zellen

Die unbehandelten Kontrollzellen gingen nach Zugabe von osmotischem Stress zu 67 % in die Apoptose über. Sowohl durch 5 µmol/l ($p = 0,85$), als auch durch 10 µmol/l BFT ($p = 0,89$) wurde im Mittel ein Anteil gestorbener neuronaler Zellen von 64 % gemessen (Abbildung 22).

Die Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt waren, starben ohne medikamentöse Beeinflussung zu 51 %. Wurde BFT in einer Dosierung von 5 µmol/l verabreicht, starben 55 % ($p = 0,85$) der neuronalen Zellen. Nach einer Steigerung auf 10 µmol/l BFT traten 57 % ($p = 0,78$) der Zellen in die Apoptose ein (Abbildung 22).

Es wird anhand der gemessenen Zytotoxizität deutlich, dass keine der getesteten Thiaminderivate eine eindeutige Reduktion des Zelltds von Schwann- oder neuronalen Zellen bewirken konnte.

Osmotischer Stress

Oxidativer Stress

BFT

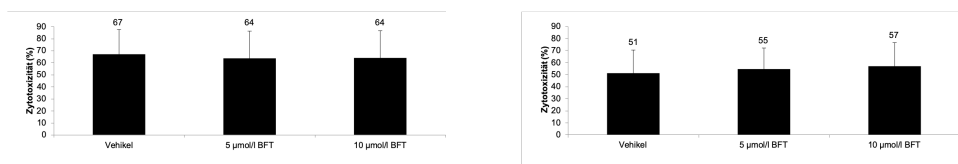


Abbildung 22: Zelltodmessung unter osmotischem und oxidativem Stress bei neuronalen Zellen Dargestellt ist das Ausbleiben der Antiapoptose unter osmotischem oder oxidativem Stress nach Vorbehandlung mit 5 bzw. 10 µmol/l BFT bei neuronalen Zellen.

4.4 Wirkungen von Thiamin auf antiapoptotische Proteine in Schwann-Zellen und neuronalen Zellen

Im Anschluss an die vorangegangenen Untersuchungen wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt, um antiapoptotische Wirkmechanismen zu untersuchen. Die mit Thiamin behandelten Zellen wurden stets mit unbehandelten Schwann- bzw. neuronalen Zellen (Vehikel) verglichen (Abbildung 23).

4.4.1 Steigerung antiapoptotischer Proteine bei Schwann-, kaum bei neuronalen Zellen durch THCI

Es gab Hinweise auf eine Steigerung antiapoptotisch wirksamer Proteine durch THCI. Diese Beobachtung trat ohne Stressbedingungen, aber auch unter osmotischem Stress bei Schwann-Zellen auf. Es kam jeweils zu einer anhand der Banden ablesbaren gesteigerten Gesamtmenge der Proteine AKT, CREB und ERK (Abbildung 23).

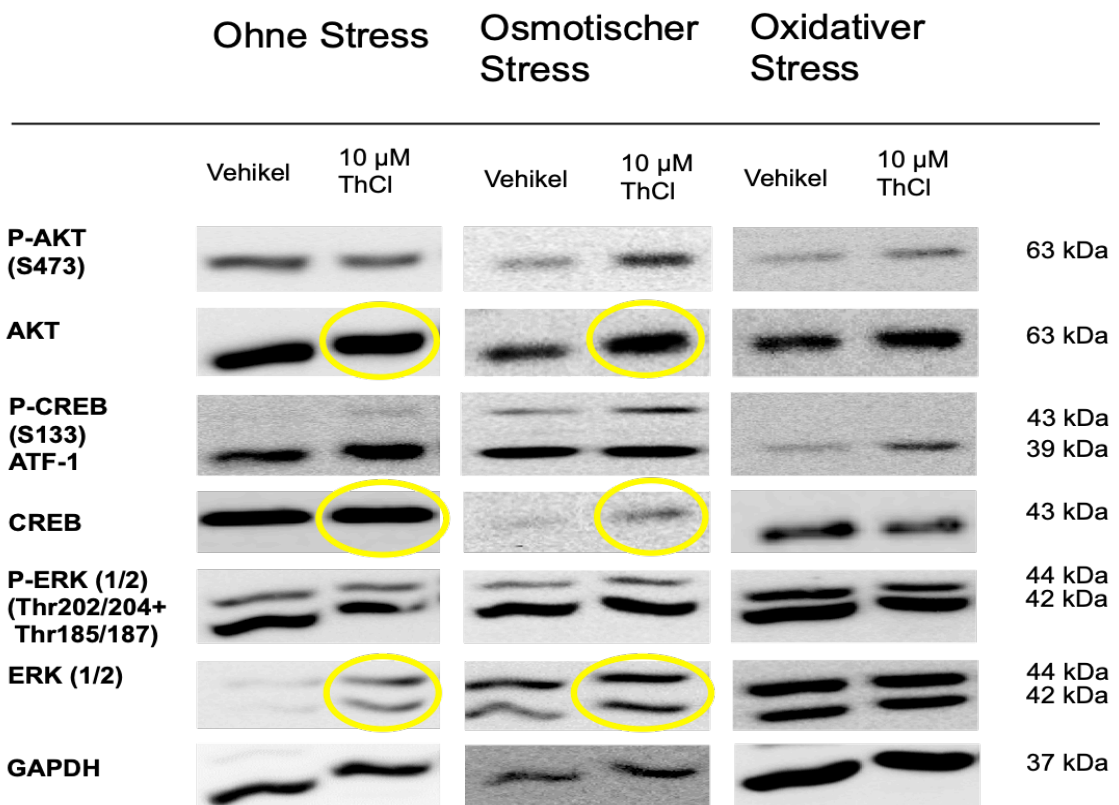


Abbildung 23: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von THCI bei Schwann-Zellen
Dargestellt sind Membranen von Schwann-Zellen unter verschiedenen Stressbedingungen im Western Blot. Die Schwann-Zellen wurden mit 10 μ mol/l THCI behandelt. Erkennbar ist hier ein verstärktes Auftreten der antiapoptotischen Proteine AKT, CREB und ERK ohne und unter osmotischem Stress (gelbe Markierung). GAPDH diente als Ladekontrolle. Abgebildet ist ein repräsentativer von drei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchsdurchläufen.

THCI zeigte hingegen bei neuronalen Zellen kaum Effekte. Sichtbar war hier eine erhöhte Menge CREB unter osmotischem Stress. Unter osmotischen

Stressbedingungen wurde eine verstärkte / gesteigerte Aktivierung von AKT (p-AKT) gemessen. Unter oxidativem Stress war ERK stärker aktiviert (p-ERK). Sonst waren die Proteine durch das THCl unverändert (Abbildung 24).

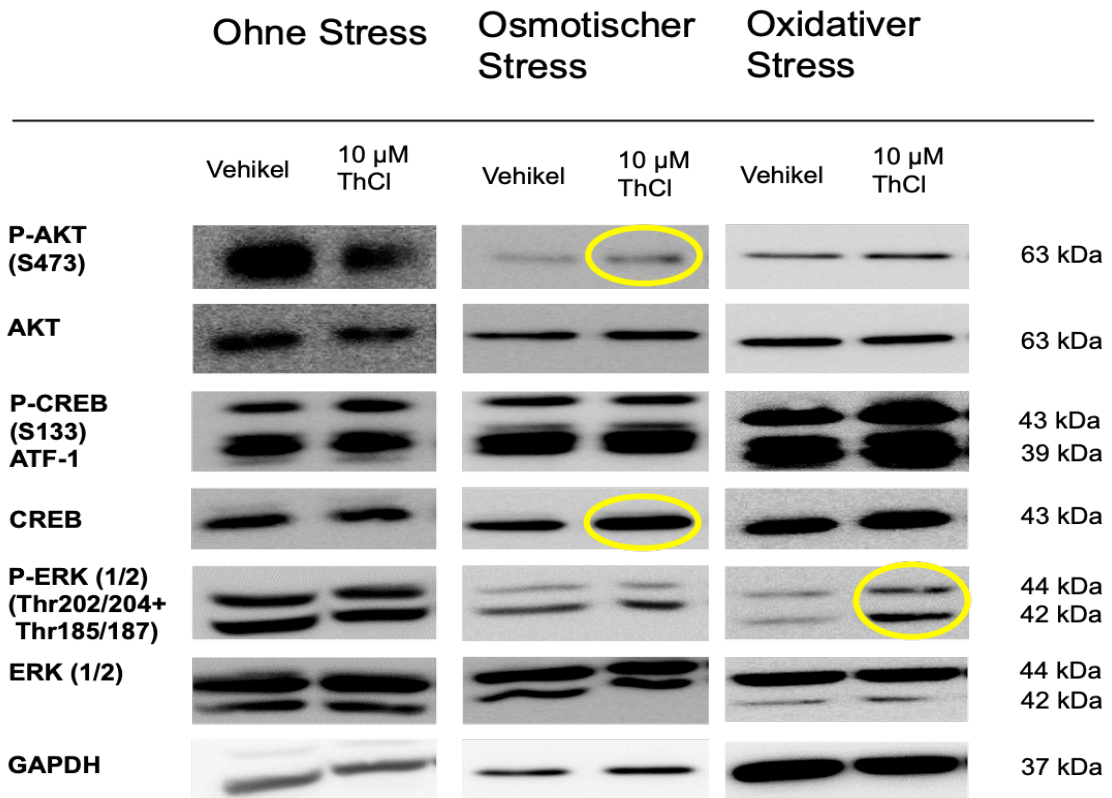


Abbildung 24: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von THCl bei neuronalen Zellen
Hier zu sehen sind neuronale Zellen (RN33B) unter verschiedenen Stressbedingungen im Western Blot. p-AKT, CREB, p-ERK waren erhöht (gelbe Markierung).

Nach Entwicklung der Membranen wurden die Flächen der Banden semiquantitativ vermessen. Die Werte sind relativ zu den unbehandelten Zellen angegeben, die definitionsgemäß 100 % AKT, CREB und ERK aufwiesen.

Es bestätigte sich entsprechend der vorangegangenen Bandenübersicht, dass unter stressfreien Bedingungen durch THCl in Schwann-Zellen vermehrt AKT nachweisbar war. Es wurden 119 % AKT ($p = 0,73$) gemessen. Es gab demnach eine Steigerung der AKT-Menge um 19 % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Lmk). Die Proteinaktivierung war um 29 % gesteigert.

Die THCl-Behandlung führte in Schwann-Zellen unter osmotischem Stress zu einer um 9 % ($p = 0,86$) gesteigerten Menge AKT im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine Proteinaktivierung (p-AKT) wurde nicht verstärkt gemessen.

Unter oxidativem Stress ergaben sich keine Hinweise auf Steigerung der Proteinmenge oder -aktivierung von AKT, stattdessen war 17 % ($p = 0,57$) weniger AKT nachweisbar (Tabelle 7).

Tabelle 7: THCl, Menge und Aktivierung von AKT für Schwann-Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk*	mit Thiamin*	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %**	Protein-Aktivierung in % ***
Schwann-Zellen, THCl	ohne	AKT	0,50	0,60	0,73	119	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	AKT	0,83	0,90	0,86	109	
	oxidativ (2 % EtOH)	AKT	1,04	0,86	0,57	83	
	ohne	p-AKT	0,35	0,54	0,41	154	+ 29
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-AKT	0,80	0,73	0,85	91	- 17
	oxidativ (2 % EtOH)	p-AKT	0,83	0,70	0,66	84	+ 1

* Die Lösungsmittelkontrolle (Lmk) ist der arithmetische Mittelwert aus den in Triplikaten vorliegenden semiquantitativen Messwerten, die zuvor auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert wurden

** Beschreibt die relative Menge des angegebenen Proteins innerhalb der mit Thiamin behandelten Zellen im Vergleich zu Lmk

*** Ein positiver Wert wird interpretiert im Sinne einer stärkeren Zunahme phosphorylierter bzw. aktivierter Proteine bezogen auf das Gesamtprotein durch Thiamin

Wurden hingegen die neuronalen Zellen mit THCl behandelt und osmotisch gestresst, wiesen diese eine um 2 % ($p = 0,97$) verstärkte AKT-Menge auf. Die Aktivierung von AKT konnte dabei um 22 % gesteigert werden (Tabelle 8).

Es gab Hinweise für eine erhöhte Menge von AKT bei oxidativ gestressten neuronalen Zellen, die Aktivierung konnte jedoch nicht gesteigert werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: THCl, Menge und Aktivierung von AKT für neuronale Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thiamin	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Proteinaktivierung in %
	Neuronale Zellen, THCl	ohne	AKT	0,48	0,45	0,84	93
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		AKT	0,87	0,88	0,97	102	
oxidativ (2 % EtOH)		AKT	0,44	0,57	0,65	130	
ohne		p-AKT	0,39	0,47	0,57	121	+ 30
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		p-AKT	0,39	0,48	0,67	124	+ 22
oxidativ (2 % EtOH)		p-AKT	0,29	0,35	0,68	120	- 8

Unter THCl und osmotischem Stress wiesen die Schwann-Zellen verglichen mit den Kontrollen ohne THCl eine unveränderte ($p = 1,00$) Menge von CREB auf, eine gesteigerte Aktivierung wurde nicht nachgewiesen (Tabelle 9).

Unter oxidativem Stress war keine Zunahme der Menge oder Aktivierung in Schwann-Zellen messbar, sondern eine Reduktion um 1 % ($p = 0,98$) (Tabelle 9).

Tabelle 9: THCl, Menge und Aktivierung von CREB für Schwann-Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thiamin	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Proteinaktivierung in %
	Schwann-Zellen, THCl	ohne	CREB	0,35	0,45	0,61	131
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		CREB	0,85	0,85	1,00	100	
oxidativ (2 % EtOH)		CREB	0,57	0,56	0,98	99	
ohne		p-CREB	0,47	0,40	0,73	86	- 34
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		p-CREB	0,48	0,42	0,79	88	- 12
oxidativ (2 % EtOH)		p-CREB	0,76	0,56	0,57	73	- 26

Bei neuronalen Zellen bewirkte THCl unter osmotischem Stress eine um 18 % ($p = 0,76$) gesteigerte CREB-Menge, und unter oxidativem Stress um 31 % ($p=0,54$) (Tabelle 10).

Tabelle 10: THCl, Menge und Aktivierung von CREB für neuronale Zellen

Neuro-nale Zellen, THCl	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-menge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	CREB	0,27	0,31	0,39	112	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	CREB	0,41	0,49	0,76	118	
	oxidativ (2 % EtOH)	CREB	0,41	0,53	0,54	131	
	ohne	p-CREB	0,59	0,68	0,80	116	- 41
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-CREB	0,49	0,58	0,70	119	+ 8
	oxidativ (2 % EtOH)	p-CREB	0,42	0,58	0,29	137	+ 5

Nach der Behandlung mit THCl und osmotischem Stress gab es Hinweise für eine veränderte Menge von ERK in Schwann-Zellen (Steigerung um 17 % für ERK p44 ($p = 0,82$) und um 5 % für ERK p42 ($p = 0,95$),

Unter oxidativem Stress bewirkte THCl in Schwann-Zellen eine Abnahme der Proteinmenge um 30 ($p=0,53$) bzw. 33 % ($p= 0,50$).

Hinweise für gesteigerte Aktivierung unter osmotischem Stress ließen sich nur unter oxidativem Stress finden (Tabelle 11).

Tabelle 11: THCl, Menge und Aktivierung von ERK für Schwann-Zellen

Schwann-Zellen, THCl	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-menge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	ERK p44	0,43	0,50	0,82	117	
		ERK p42	0,45	0,48	0,95	105	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	ERK p44	0,56	0,59	0,90	105	
		ERK p42	0,65	0,61	0,89	94	
	oxidativ (2 % EtOH)	ERK p44	0,79	0,55	0,53	70	
		ERK p42	0,76	0,51	0,50	67	
	ohne	p-ERK p44	0,34	0,38	0,85	111	- 5
		p-ERK p42	0,47	0,48	0,96	104	- 1
	osmotisch (150 mmol/l)	p-ERK p44	0,09	0,09	0,96	104	- 1

	NaCl)	p-ERK p42	0,15	0,14	0,95	94	-
	oxidativ (2 % EtOH)	p-ERK p44	0,54	0,41	0,42	77	+ 10
		p-ERK p42	0,70	0,62	0,72	88	+ 31

In neuronalen Zellen wurde durch THCI unter osmotischem Stress eine um 11 % ($p = 0,88$) bzw. 9 % ($p = 0,90$) gesteigerte Menge ERK gemessen, die Aktivität war um 9 bzw. 3 % gesteigert.

THCI veränderte bei oxidativ gestressten neuronalen Zellen die ERK Menge nicht wesentlich, die Aktivierung stieg um 17 % (ERK p44) bzw. 10 % (ERK p42) (Tabelle 12).

Tabelle 12: THCI, Menge und Aktivierung von ERK für neuronale Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thiamin	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Proteinaktivierung in %
Neuronale Zellen, THCI	ohne	ERK p44	0,41	0,38	0,75	94	
		ERK p42	0,31	0,29	0,83	93	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	ERK p44	0,58	0,68	0,88	111	
		ERK p42	0,41	0,45	0,90	109	
	oxidativ (2 % EtOH)	ERK p44	0,44	0,45	0,94	103	
		ERK p42	0,32	0,30	0,94	96	
	ohne	p-ERK p44	0,31	0,31	0,90	102	+ 9
		p-ERK p42	0,32	0,31	0,81	96	+ 3
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-ERK p44	0,36	0,43	0,83	118	+ 6
		p-ERK p42	0,39	0,45	0,84	116	+ 6
	oxidativ (2 % EtOH)	p-ERK p44	0,22	0,27	0,63	121	+ 17
		p-ERK p42	0,29	0,31	0,92	106	+ 10

4.4.2 Steigerung antiapoptotischer Proteine und deren Aktivität durch SBT unter osmotischem Stress

Unter osmotischem Stress führte die Behandlung mit 5 $\mu\text{mol/l}$ SBT bei Schwann-Zellen zu einer gesteigerten Gesamtmenge von CREB (Abbildung 25).

Bei neuronalen Zellen bewirkte SBT eine Zunahme der Gesamtmenge von AKT, CREB und ERK, sowie zu einer gesteigerten Aktivierung von AKT und ERK (Abbildung 26).

Unter oxidativem Stress kam es in der Übersicht bei beiden Zellreihen kaum zu Effekten.

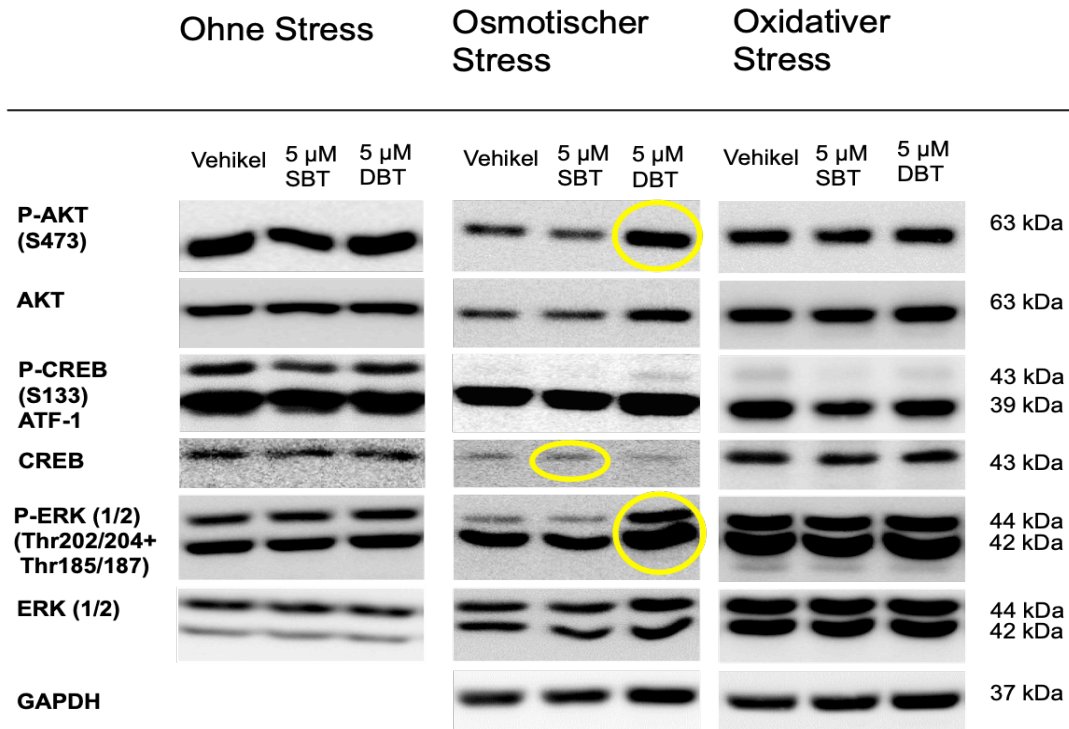


Abbildung 25: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von SBT und DBT bei Schwann-Zellen
Western Blot-Analyse unter Stressbedingungen von Schwann-Zellen, die mit 5 μ mol/l SBT und 5 μ mol/l DBT behandelt wurden. Unter osmotischem Stress erhöhte SBT die Menge von CREB, DBT konnte p-AKT und p-ERK erhöhen (gelbe Markierung).

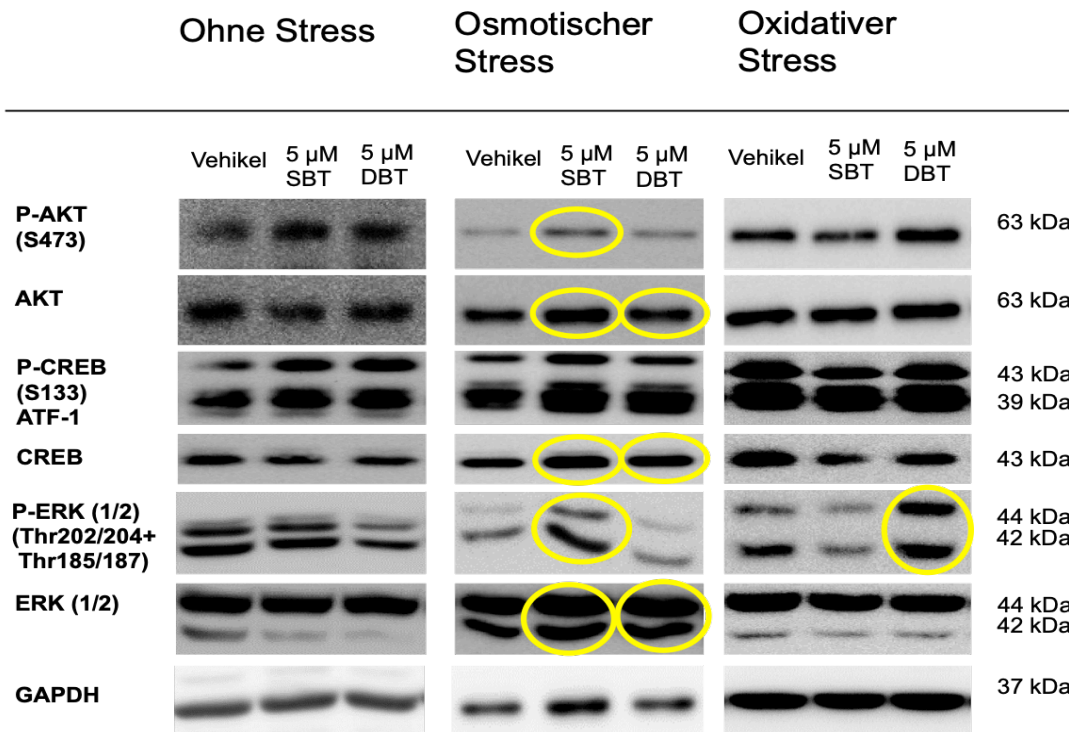


Abbildung 26: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von SBT und DBT bei neuronalen Zellen
Western Blot-Analyse unter Stressbedingungen von neuronalen Zellen, die mit 5 μ mol/l SBT und 5 μ mol/l DBT behandelt wurden. SBT und DBT beeinflussten antiapoptotische Proteine unter osmotischem Stress (gelbe Markierung). Zudem steigerte DBT die p-ERK Menge unter oxidativem Stress.

Nach Behandlung mit SBT unter osmotischem Stress zeigte die systematische Vermessung der Banden eine verringerte AKT-Proteinmenge gegenüber nicht mit SBT behandelten Schwann-Zellen, aber eine Steigerung der Aktivität um 18 %.

Wurde SBT unter oxidativem Stress bei Schwann-Zellen eingesetzt, ergaben sich Hinweise auf Verringerung der Proteinmenge und -aktivierung von AKT (Tabelle 13).

Tabelle 13: THCl, Menge und Aktivierung von AKT für Schwann-Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-menge in %	Protein-Aktivierung in %
	Schwann-Zellen, SBT	ohne	AKT	0,56	0,54	0,94	96
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		AKT	1,03	0,75	0,56	73	
oxidativ (2 % EtOH)		AKT	0,93	0,79	0,55	86	
ohne		p-AKT	0,44	0,43	0,94	97	+ 1
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		p-AKT	0,84	0,72	0,75	86	+ 18
oxidativ (2 % EtOH)		p-AKT	0,82	0,68	0,60	83	- 3

Neuronale Zellen, die mit SBT behandelt wurden, wiesen unter osmotischem Stress 2 % mehr AKT ($p = 0,94$) auf, dieses war um 8 % stärker aktiviert.

SBT führte unter oxidativem Stress zu einer Erhöhung der Menge von AKT um 13 % ($p = 0,79$). AKT war dabei um 5 % stärker aktiviert im Vergleich zu nicht mit SBT behandelten neuronalen Zellen (Tabelle 14).

Tabelle 14: SBT, Menge und Aktivierung von AKT für neuronale Zellen

Neuro-nale Zellen, SBT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-menge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	AKT	0,47	0,49	0,94	102	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	AKT	0,79	0,81	0,97	102	
	oxidativ (2 % EtOH)	AKT	0,54	0,61	0,79	113	
	ohne	p-AKT	0,43	0,45	0,91	104	+ 2
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-AKT	0,45	0,49	0,85	110	+ 8
	oxidativ (2 % EtOH)	p-AKT	0,28	0,34	0,58	119	+ 5

Unter Behandlung mit SBT und osmotischem Stress gab es Hinweise für eine um 31 % gesteigerte ($p = 0,72$) CREB-Menge in Schwann-Zellen, aber Hinweise auf eine reduzierte Proteinaktivierung.

Unter oxidativem Stress ergaben sich Hinweise auf Verringerung der Proteinmenge und -aktivierung von CREB (Tabelle 15).

Tabelle 15: SBT, Analyse der Menge und Aktivierung von CREB für Schwann-Zellen

Schwann-Zellen, SBT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-menge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	CREB	0,38	0,41	0,87	110	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	CREB	0,57	0,75	0,72	131	
	oxidativ (2 % EtOH)	CREB	0,58	0,57	0,96	98	
	ohne	p-CREB	0,42	0,39	0,91	93	- 15
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-CREB	0,42	0,49	0,79	117	- 11
	oxidativ (2 % EtOH)	p-CREB	0,68	0,56	0,71	83	- 15

SBT führte bei osmotisch gestressten neuronalen Zellen zu einer Zunahme von CREB um 6 % ($p = 0,89$). Hinweise für gesteigerte Aktivierung ergaben sich nicht.

Unter oxidativem Stress bewirkte SBT eine um 12 % ($p = 0,77$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen gesteigerte Menge von CREB, eine stärkere Aktivierung dieses Proteins ließ sich nicht beobachten (Tabelle 16).

Tabelle 16: SBT, Analyse der Menge und Aktivierung von CREB für neuronale Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Protein-Aktivierung in %
	Neuronale Zellen, SBT	ohne	CREB	0,32	0,28	0,21	87
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		CREB	0,45	0,47	0,89	106	
oxidativ (2 % EtOH)		CREB	0,46	0,52	0,77	112	
ohne		p-CREB	0,69	0,65	0,91	94	+ 8
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		p-CREB	0,60	0,56	0,86	92	- 13
oxidativ (2 % EtOH)		p-CREB	0,51	0,54	0,83	105	- 6

Die Schwann-Zellen zeigten unter osmotischem Stress keine Steigerung der Proteinmenge oder -aktivierung von ERK (Tabelle 17). Unter oxidativem Stress konnte keine Steigerung der Proteinmenge, aber der Aktivierung um 17 % (ERK p44) bzw 15 % (ERK p42) beobachtet werden (Tabelle 17).

Tabelle 17: SBT, Menge und Aktivierung von ERK für Schwann-Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Protein-Aktivierung in %
	Schwann-Zellen, SBT	ohne	ERK p44	0,47	0,50	0,90	106
ERK p42			0,47	0,48	0,98	101	
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		ERK p44	0,69	0,66	0,90	95	
		ERK p42	0,66	0,66	0,97	101	
oxidativ (2 % EtOH)		ERK p44	0,53	0,48	0,71	90	
		ERK p42	0,51	0,41	0,42	80	
ohne		p-ERK p44	0,39	0,39	0,99	99	- 7
		p-ERK p42	0,48	0,50	0,93	106	+ 5
		osmotisch (150 mmol/l)	p-ERK p44	0,09	0,07	0,76	79

	NaCl)	p-ERK p42	0,15	0,15	0,94	94	- 7
	oxidativ (2 % EtOH)	p-ERK p44	0,43	0,46	0,89	105	+ 17
		p-ERK p42	0,66	0,61	0,84	92	+ 15

Die Vermessung der Banden von neuronalen Zellen, die mit 5 µmol/l SBT behandelt wurden, ergab unter osmotischem Stress eine um 3 % (p = 0,96) gesteigerte ERK p44-Menge im Vergleich zu nicht mit SBT behandelten Zellen. Gleichzeitig war dieses Protein durch SBT um 5 % stärker aktiviert. ERK p42 wurde nicht vermehrt gemessen, die Aktivierung war jedoch um 11 % gesteigert.

Unter oxidativem Stress konnte SBT ebenfalls eine um 13 % (ERK p44, p = 0,57) und um 17 % (ERK p42, p = 0,68) erhöhte Proteinmenge bewirken. Unter diesen Bedingungen war die Aktivierung von ERK nicht erhöht (Tabelle 18).

Tabelle 18: SBT, Menge und Aktivierung von ERK für neuronale Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-Aktivierung in %	
						Proteinmenge in %	Protein-Aktivierung in %
Neuronale Zellen, SBT	ohne	ERK p44	0,35	0,34	0,81	98	
		ERK p42	0,25	0,25	1,00	100	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	ERK p44	0,58	0,60	0,96	103	
		ERK p42	0,44	0,43	0,97	98	
	oxidativ (2 % EtOH)	ERK p44	0,43	0,48	0,57	113	
		ERK p42	0,28	0,33	0,68	117	
	ohne	p-ERK p44	0,33	0,33	0,77	98	-
		p-ERK p42	0,31	0,30	0,68	95	- 5
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-ERK p44	0,40	0,43	0,91	108	+ 5
		p-ERK p42	0,43	0,50	0,84	114	+ 11
	oxidativ (2 % EtOH)	p-ERK p44	0,27	0,28	0,79	107	- 5
		p-ERK p42	0,30	0,32	0,89	105	- 5

4.4.3 Einfluss von DBT unter osmotischem Stress auf die Aktivierung antiapoptotischer Proteine

Unter osmotischem Stress bewirkte die Behandlung mit 10 µmol/l DBT im Vergleich zu nicht mit DBT behandelten Schwann-Zellen eine stärkere Aktivierung der antiapoptotischen Proteine AKT und ERK (Abbildung 25).

Neuronale Zellen zeigten unter osmotischem Stress eine Steigerung von AKT, CREB und ERK, sowie verstärkte Aktivierung von ERK unter oxidativem Stress (Abbildung 26).

Unter osmotischem Stress und DBT wurde eine um 41 % ($p = 0,34$) verringerte AKT-Proteinmenge gemessen und eine um 34 % im Vergleich zu nicht mit DBT behandelten Schwann-Zellen gesteigerte Aktivierung von AKT.

Auch unter oxidativem Stress wurde eine verringerte AKT-Proteinmenge gemessen und es zeigte sich eine im Vergleich zu nicht mit DBT behandelten Schwann-Zellen unveränderte Aktivierung von AKT (Tabelle 19).

Tabelle 19: DBT, Menge und Aktivierung von AKT für Schwann-Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thiamin	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Protein-Aktivierung in %
	Schwann-Zellen, DBT	ohne	AKT	0,56	0,54	0,93	96
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		AKT	1,03	0,61	0,34	59	
oxidativ (2 % EtOH)		AKT	0,93	0,76	0,53	81	
ohne		p-AKT	0,44	0,45	0,96	102	+ 6
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		p-AKT	0,84	0,66	0,56	79	+ 34
oxidativ (2 % EtOH)		p-AKT	0,82	0,67	0,60	81	-

Wurden die neuronalen Zellen osmotisch gestresst, wiesen sie durch DBT eine um 10 % ($p = 0,88$) gesteigerte Menge AKT auf. Eine gesteigerte Aktivität des Proteins konnte nicht festgestellt werden.

Unter oxidativem Stress hatte das DBT keine positiven Effekte (Tabelle 20).

Tabelle 20: DBT, Menge und Aktivierung von AKT für neuronale Zellen

Neuro-nale Zellen, DBT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-menge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	AKT	0,47	0,46	0,88	96	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	AKT	0,79	0,86	0,88	110	
	oxidativ (2 % EtOH)	AKT	0,54	0,53	0,99	99	
	ohne	p-AKT	0,43	0,40	0,79	93	- 3
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-AKT	0,45	0,46	0,95	103	- 6
	oxidativ (2 % EtOH)	p-AKT	0,28	0,27	0,89	97	- 2

Die Behandlung mit DBT bewirkte unter osmotischem Stress eine Zunahme der CREB-Proteinmenge um 17 % ($p = 0,81$) im Vergleich zur den nicht mit DBT behandelten Schwann-Zellen. Eine Zunahme der CREB-Aktivierung konnte nicht festgestellt werden. Unter oxidativem Stress ergaben sich keine Hinweise auf Steigerung der Proteinmenge oder -aktivierung von CREB (Tabelle 21).

Tabelle 21: DBT, Menge und Aktivierung von CREB für Schwann-Zellen

Schwann-Zellen, DBT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-menge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	CREB	0,38	0,41	0,87	110	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	CREB	0,57	0,67	0,81	117	
	oxidativ (2 % EtOH)	CREB	0,58	0,51	0,79	89	
	ohne	p-CREB	0,42	0,38	0,88	90	- 18
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-CREB	0,42	0,47	0,82	111	- 5
oxidativ (2 % EtOH)	p-CREB	0,68	0,52	0,62	77	- 13	

DBT hatte einen CREB-Anstieg um 4 % ($p = 0,92$) im Modell mit neuronalen Zellen und osmotischem Stress zur Folge. Es gab keine Hinweise auf eine gestiegene Aktivität.

Unter oxidativem Stress konnte keine gesteigerte Menge oder Aktivierung von CREB festgestellt werden (Tabelle 22)

Tabelle 22: DBT, Menge und Aktivierung von CREB für neuronale Zellen

Neuronale Zellen, DBT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thiamin	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	CREB	0,32	0,33	0,82	103	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	CREB	0,45	0,47	0,92	104	
	oxidativ (2 % EtOH)	CREB	0,46	0,43	0,82	93	
	ohne	p-CREB	0,69	0,64	0,89	93	- 10
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-CREB	0,60	0,56	0,88	94	- 10
	oxidativ (2 % EtOH)	p-CREB	0,51	0,46	0,37	90	- 3

DBT konnte unter osmotischem Stress die Proteinmenge von ERK nicht erhöhen und die gemessene Proteinaktivierung stieg um 22 % (ERK p44) bzw. 25 % (ERK p42) im Vergleich zu nicht mit DBT behandelten Schwann-Zellen.

Auch unter oxidativem Stress konnte DBT die Proteinmenge von ERK nicht erhöhen, aber die Proteinaktivierung stieg um 16 % (ERK p44) bzw. 9 % (Erk p42) im Vergleich zu nicht mit DBT behandelten Schwann-Zellen (Tabelle 23).

Tabelle 23: DBT, Menge und Aktivierung von ERK für Schwann-Zellen

Schwann-Zellen, DBT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thiamin	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	ERK p44	0,47	0,46	0,94	96	
		ERK p42	0,47	0,46	0,96	97	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	ERK p44	0,69	0,55	0,56	79	
		ERK p42	0,66	0,58	0,74	88	
	oxidativ (2 % EtOH)	ERK p44	0,53	0,46	0,63	86	
		ERK p42	0,51	0,43	0,60	85	
	ohne	p-ERK p44	0,39	0,37	0,91	94	- 2
		p-ERK p42	0,48	0,50	0,94	104	+ 7

	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-ERK p44	0,09	0,09	0,96	96		+ 22
		p-ERK p42	0,15	0,17	0,92	110		+ 25
	oxidativ (2 % EtOH)	p-ERK p44	0,43	0,43	1,00	100		+16
		p-ERK p42	0,66	0,61	0,84	93		+ 9

Durch DBT wurde die ERK-Menge neuronaler Zellen unter osmotischem Stress um 14 % (ERK p44, $p = 0,85$) bzw. um 3 % (ERK p42, $p = 0,97$) gesteigert. Die Aktivität der Proteine sank dabei um 3 % (ERK p44) bzw. stieg um 4 % (ERK p42).

Unter oxidativem Stress konnte kein positiver Effekt von DBT auf die ERK-Menge festgestellt werden. Die Aktivierung stieg um 13 % (ERK p44) bzw. 15 % (ERK p42) (Tabelle 24).

Tabelle 24: DBT, Menge und Aktivierung von ERK für neuronale Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia- min	p-Wert (n = 3)	Protein- menge in %	Protein- Aktivierung in %	
Neuro- nale Zellen, DBT	ohne	ERK p44	0,35	0,38	0,60	108		
		ERK p42	0,25	0,23	0,67	94		
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	ERK p44	0,58	0,66	0,85	114		
		ERK p42	0,44	0,45	0,97	103		
	oxidativ (2 % EtOH)	ERK p44	0,43	0,40	0,72	93		
		ERK p42	0,28	0,26	0,82	93		
	ohne	p-ERK p44	0,33	0,28	0,27	85		- 21
		p-ERK p42	0,31	0,27	0,32	87		- 7
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-ERK p44	0,40	0,44	0,88	111		- 3
		p-ERK p42	0,43	0,46	0,93	107		+ 4
	oxidativ (2 % EtOH)	p-ERK p44	0,27	0,28	0,77	105		+ 13
		p-ERK p42	0,30	0,32	0,85	107		+ 15

4.4.4 Steigerung antiapoptotischer Proteine unter BFT

BFT konnte CREB in Schwann-Zellen unter osmotischem Stress und die Aktivierung von AKT erhöhen. Unter oxidativem Stress war CREB erhöht und ERK stärker aktiviert (Abbildung 27).

Bei neuronalen Zellen, die osmotisch gestresst waren, bewirkte BFT eine gesteigerte Menge der antiapoptotischen Proteine AKT, CREB und ERK. Unter oxidativem Stress waren AKT und ERK verstärkt aktiviert (Abbildung 28).

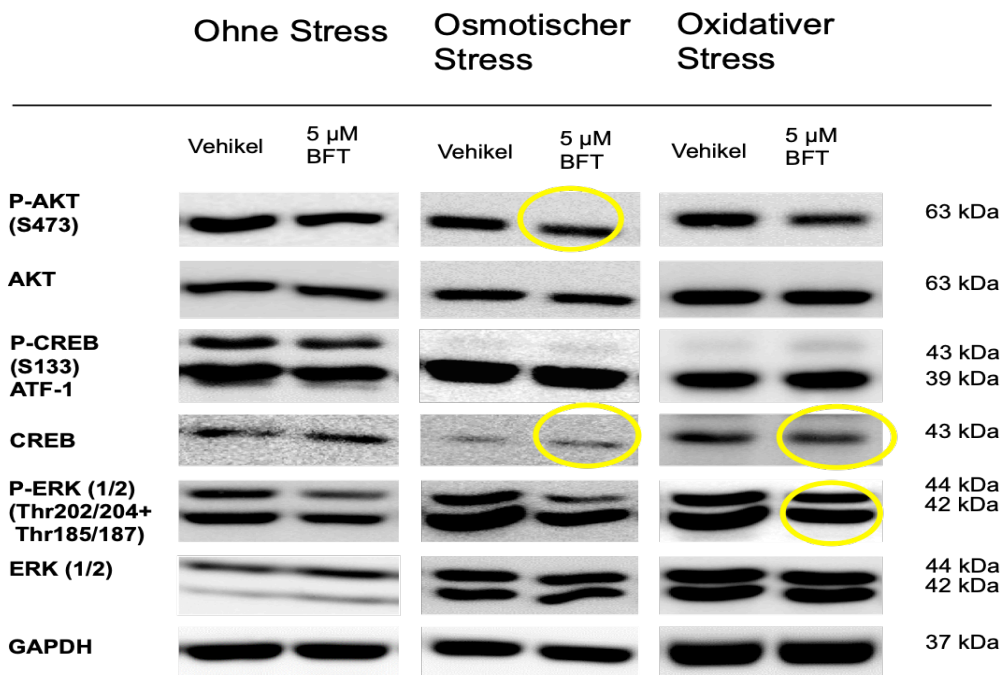


Abbildung 27: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von BFT bei Schwann-Zellen
Western Blot-Analyse unter Stressbedingungen von Schwann-Zellen, die mit 5 μ mol/l BFT behandelt wurden. BFT bewirkte eine Steigerung von p-AKT und CREB unter osmotischem Stress, sowie von CREB und p-ERK unter oxidativem Stress (gelbe Markierung).

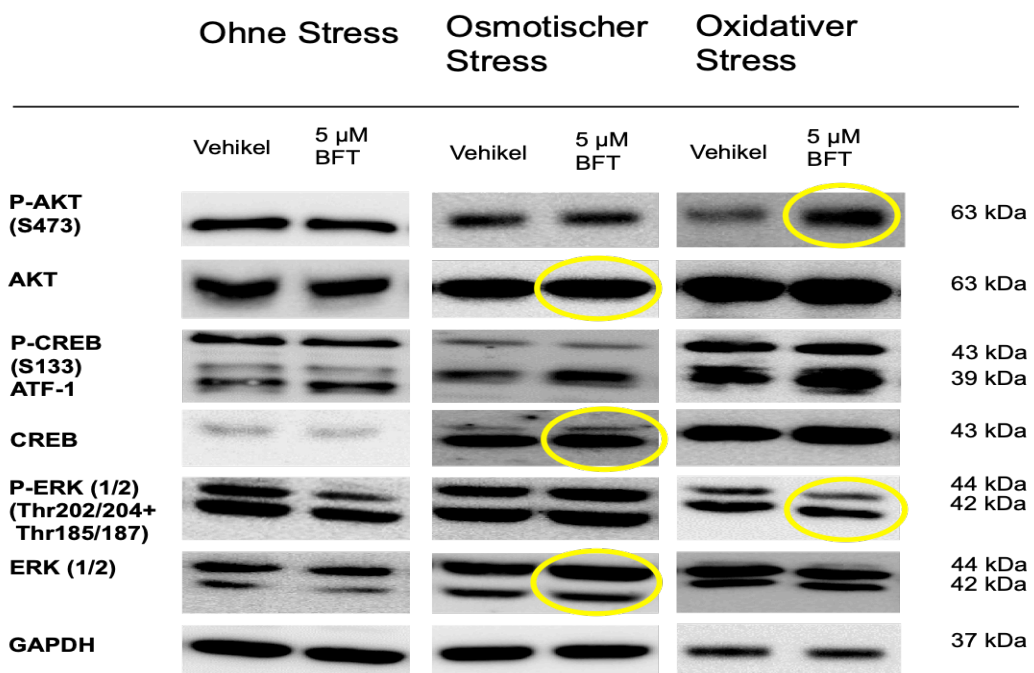


Abbildung 28: Antiapoptotische Proteine unter Einfluss von BFT bei neuronalen Zellen
Western Blot-Analyse unter Stressbedingungen von neuronalen Zellen, die mit 5 μ mol/l BFT behandelt wurden. Bei neuronalen Zellen hatte BFT unter osmotischem Stress eine Steigerung der antiapoptotischen Proteine AKT, CREB und ERK zur Folge. Unter oxidativem Stress steigerte BFT p-AKT und p-ERK (gelbe Markierung).

Die Behandlung mit BFT führte unter osmotischem Stress zu einer verringerten AKT-Proteinmenge und zu einer um 13 % verstärkten Aktivierung im Vergleich zu nicht mit BFT behandelten Schwann-Zellen.

Unter oxidativem Stress führte BFT zu einer um 2 % ($p = 0,97$) erhöhten AKT-Proteinmenge und es gab keine Hinweise auf eine gesteigerte Aktivierung (Tabelle 25).

Tabelle 25: BFT, Menge und Aktivierung von AKT für Schwann-Zellen

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thiamin	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Protein-Aktivierung in %
	Schwann-Zellen, BFT	ohne	AKT	0,53	0,54	0,97	102
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		AKT	0,83	0,74	0,78	88	
oxidativ (2 % EtOH)		AKT	0,93	0,95	0,97	102	
ohne		p-AKT	0,42	0,44	0,95	103	+ 1
osmotisch (150 mmol/l NaCl)		p-AKT	0,75	0,74	0,98	99	+ 13
oxidativ (2 % EtOH)		p-AKT	0,69	0,66	0,93	96	- 6

BFT hatte unter osmotischem Stress einen positiven Einfluss auf neuronale Zellen, die AKT Proteinmenge stieg um 19 % ($p = 0,76$) im Vergleich zu nicht mit BFT behandelten Kontrollen. Die Aktivität von AKT war nicht gesteigert.

Unter oxidativem Stress wurde AKT um 1 % ($p = 0,97$) vermehrt gemessen und die Aktivität stieg um 20 % (Tabelle 26).

Tabelle 26: BFT, Menge und Aktivierung von AKT für neuronale Zellen

Neuro-nale Zellen, BFT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-menge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	AKT	0,48	0,45	0,84	94	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	AKT	0,78	0,93	0,76	119	
	oxidativ (2 % EtOH)	AKT	0,48	0,49	0,97	101	
	ohne	p-AKT	0,49	0,37	0,31	75	- 20
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-AKT	0,48	0,50	0,95	103	- 13
	oxidativ (2 % EtOH)	p-AKT	0,26	0,32	0,57	121	+ 20

BFT konnte in osmotisch gestressten Schwann-Zellen eine Steigerung der CREB-Proteinmenge um 39 % ($p = 0,60$) bewirken. Es gab dabei Hinweise auf eine Erniedrigung der Aktivierung dieses Proteins um 30 % für Schwann-Zellen.

Auch unter oxidativem Stress bewirkte BFT eine Zunahme von CREB um 14 % ($p = 0,79$) in Schwann-Zellen, es ergab sich unter oxidativem Stress jedoch eine um 25 % reduzierte Aktivierung von CREB (Tabelle 27).

Tabelle 27: BFT, Menge und Aktivierung von CREB für Schwann-Zellen

Schwann-Zellen, BFT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia-min	p-Wert (n = 3)	Protein-menge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	CREB	0,40	0,41	0,95	103	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	CREB	0,47	0,64	0,60	139	
	oxidativ (2 % EtOH)	CREB	0,53	0,60	0,79	114	
	ohne	p-CREB	0,39	0,33	0,75	83	- 19
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-CREB	0,52	0,50	0,94	97	- 30
	oxidativ (2 % EtOH)	p-CREB	0,64	0,55	0,77	86	- 25

BFT konnte die CREB-Menge neuronaler Zellen nach osmotischem Stress um 8 % ($p = 0,80$) erhöhen. Die Aktivierung dieses Proteins sank dabei um 6 %.

Die CREB Menge neuronaler Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt waren, blieb durch BFT unverändert ($p = 0,99$). CREB war um 3 % stärker aktiviert (Tabelle 28).

Tabelle 28: BFT, Menge und Aktivierung von CREB für neuronale Zellen

Neuronale Zellen, BFT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thiamin	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	CREB	0,30	0,26	0,38	85	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	CREB	0,45	0,49	0,80	108	
	oxidativ (2 % EtOH)	CREB	0,41	0,41	0,99	100	
	ohne	p-CREB	0,69	0,63	0,86	92	+ 8
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-CREB	0,52	0,55	0,85	106	- 6
	oxidativ (2 % EtOH)	p-CREB	0,48	0,49	0,61	103	+ 3

Mit BFT behandelte und osmotisch gestresste Schwann-Zellen wiesen keine erhöhte ERK-Proteinmenge auf.

Die Zugabe von BFT bewirkte unter oxidativem Stress eine Erniedrigung von ERK p44 um 1 %, ($p = 0,98$) und Erhöhung von ERK p42 um 5 %, ($p = 0,87$). BFT steigerte die Aktivierung von ERK p44 um 9 % im Vergleich zu nicht mit BFT behandelten Kontrollen (Tabelle 29).

Tabelle 29: BFT, Menge und Aktivierung von ERK für Schwann-Zellen

Schwann-Zellen, BFT	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thiamin	p-Wert (n = 3)	Proteinmenge in %	Protein-Aktivierung in %
	ohne	ERK p44	0,45	0,50	0,82	112	
		ERK p42	0,45	0,45	0,98	102	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	ERK p44	0,51	0,48	0,85	94	
		ERK p42	0,57	0,57	0,99	100	
	oxidativ (2 % EtOH)	ERK p44	0,52	0,52	0,98	99	
		ERK p42	0,44	0,47	0,87	105	
	ohne	p-ERK p44	0,36	0,37	0,96	103	- 8
		p-ERK p42	0,49	0,52	0,90	108	+ 6

	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-ERK p44	0,10	0,09	0,86	86	- 9
		p-ERK p42	0,16	0,13	0,84	84	- 16
	oxidativ (2 % EtOH)	p-ERK p44	0,42	0,45	0,82	108	+ 9
		p-ERK p42	0,59	0,61	0,94	103	- 2

BFT bewirkte bei neuronalen Zellen unter osmotischem Stress einen Anstieg von ERK um 19 % ($p = 0,79$) bzw. 9 % ($p = 0,89$) im Vergleich zu den nicht mit BFT behandelten Kontrollen. Eine Aktivitätssteigerung konnte nicht festgestellt werden.

Unter oxidativem Stress führte BFT zu einer Reduktion der ERK-Menge, aber einer Aktivitätssteigerung um 6 % (ERK p44) (Tabelle 30).

Tabelle 30: BFT, Menge und Aktivierung von ERK für neuronale Zelle

	Stresstyp	Protein	Lmk	mit Thia- min	p-Wert (n = 3)	Protein- menge in %	Protein- Aktivierung in %
Neuro- nale Zellen, BFT	ohne	ERK p44	0,37	0,32	0,54	88	
		ERK p42	0,24	0,23	0,76	97	
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	ERK p44	0,57	0,67	0,79	119	
		ERK p42	0,43	0,47	0,89	109	
	oxidativ (2 % EtOH)	ERK p44	0,38	0,39	0,95	101	
		ERK p42	0,26	0,25	0,95	99	
	ohne	p-ERK p44	0,33	0,24	0,24	71	- 19
		p-ERK p42	0,31	0,26	0,33	84	- 13
	osmotisch (150 mmol/l NaCl)	p-ERK p44	0,38	0,41	0,91	108	- 9
		p-ERK p42	0,45	0,48	0,93	106	- 3
	oxidativ (2 % EtOH)	p-ERK p44	0,24	0,25	0,68	107	+ 6
		p-ERK p42	0,26	0,28	0,73	109	-

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 31 werden alle Ergebnisse vereinfacht zusammengefasst.

Tabelle 31: Zusammenfassung der Ergebnisse

Zelltyp	Derivat	Einfluss auf		Gesamtproteinmenge unter Stressbedingungen*			Aktivierung der Proteine unter Stressbedingungen**		
		Wachstum	Zelltod	Ohne	Osmotisch	Oxidativ	Ohne	Osmotisch	Oxidativ
Schwann-Zellen	THCI	-	-	■	■	■	■	■	■
	SBT	-	-	■	■	■	■	■	■
	DBT	-	-	■	■	■	■	■	■
	BFT	-	-	■	■	■	■	■	■
Neuronale Zellen	THCI	n. u.	-	■	■	■	■	■	■
	SBT	n. u.	-	■	■	■	■	■	■
	DBT	n. u.	-	■	■	■	■	■	■
	BFT	n. u.	-	■	■	■	■	■	■

* Legende:
■ = Keines der antiapoptotischen Proteine waren $\geq 10\%$ erhöht
■ = 1 von 3 der antiapoptotischen Proteine waren $\geq 10\%$ erhöht
■ = 2 oder 3 der antiapoptotischen Proteine waren $\geq 10\%$ erhöht

** Legende:
■ = Keines der antiapoptotischen Proteine waren $\geq 10\%$ stärker aktiviert
■ = 1 von 3 der antiapoptotischen Proteine waren $\geq 10\%$ stärker aktiviert
■ = 2 von 3 der antiapoptotischen Proteine waren $\geq 10\%$ stärker aktiviert

Symbole:
n. u. = Nicht untersucht
- = Keine Veränderung

5 Diskussion

Im Rahmen von Operationen kommt kann es zu Zellstress kommen (4, 5, 61). Folgen einer akuten Hirnschädigung sind neuroinflammatorische Prozesse (62) und Freisetzung verschiedener Metabolite, die zu osmotischem (4, 5) und oxidativem Stress führen (1, 2, 62-68). Im Rahmen dieser Stressformen können Zellen apoptotisch zugrunde gehen (95-97). Ausgehend von diesen Beobachtungen liegt die Hypothese nahe, dass Thiamin auch einen positiven Einfluss auf irreversiblen Gewebeschäden des NS im Rahmen einer neurochirurgischen Operation und damit verbundene Stressoren haben könnte. Im Rahmen vorangegangener Studien wurde osmotischer und oxidativer Stress bereits in ähnlicher Form eingesetzt (4, 5).

Ziel der vorliegenden Studie war zu untersuchen, inwieweit Thiamin und seine Derivate als potentiell neuroprotektive Substanzen infrage kommen, indem das Überleben von neuronalen und Schwann-Zellen unter Thiamingabe gemessen wurde. Zusätzlich sollte ein möglicher Einfluss des Thiamin auf das Wachstumsverhalten untersucht werden.

Zusammenfassend gab es keine eindeutigen Hinweise auf eine Beeinflussung der Zellproliferation durch Thiamin oder dessen Derivate - in gesunden Zellen und solchen, die keinem Zellstress ausgesetzt waren.

Nach Behandlung mit Zellstress und verschiedenen Thiaminderivaten wurde kein neuroprotektiver Effekt beobachtet. Bei Untersuchung der antiapoptotisch wirksamen Proteine zeichneten sich lediglich teilweise Steigerungen der intrazellulären Proteinmengen ab, sodass auf Grundlage dieser Studie den Substanzen keine antiapoptotische Wirkung nachgewiesen wurde. Ebenso wenig zeigte die Messung der Aktivitätsteigerung der antiapoptotischen Proteine eindeutige Ergebnisse.

5.1 Das Zellmodell

Das in dieser Studie gewählte Zellmodell bildet mit Schwann-Zellen und neuronalen Zellen einen Teil des menschlichen NS am Übergang vom ZNS zum PNS ab. Solche Übergangsregionen sind für die moderne Neurochirurgie von herausragender Bedeutung, so etwa im Rahmen der therapeutischen Operation des Vestibularisschwannoms. Das Vestibularisschwannom ist am Übergang vom zentralen zum peripheren NS lokalisiert, sodass während der Therapie sowohl neuronale als auch Schwann-Zellen geschädigt werden können. Eben diese Zellen wurden bereits in Studien verwendet, die ebenfalls das Ziel verfolgten, weitere neuroprotektive

Substanzen zu identifizieren. Im Zuge dieser Bemühungen wurden beispielsweise neuroprotektives Potential von Cumarinen gezeigt (98). Ebenfalls wurde auch eine antiapoptotische Wirkung des Kalziumkanalblockers Nimodipin an einem Zellmodell mit neuronalen (4) bzw. Astrozyten, Schwann-, und neuronalen Zellen nachgewiesen (3). Mit dem *in vitro*-Modell der zitierten Studien erwies sich Nimodipin als eine Substanz mit erheblichem neuroprotektiven Potential. Bei dieser Substanz konnte eine gesteigerte AKT- und CREB-Aktivierung nachgewiesen werden, wobei dies nicht quantifiziert wurde (3) (Abbildung 29).

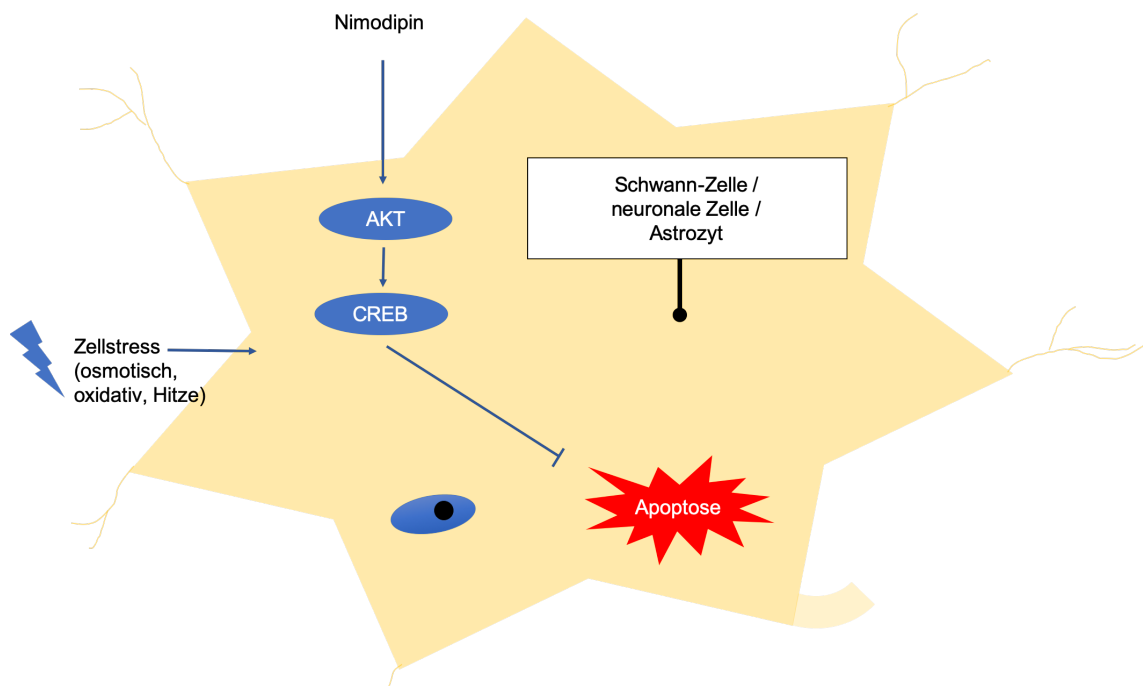


Abbildung 29: Antiapoptotische Wirkung von Nimodipin an Schwann-Zellen, neuronalen Zellen und Astrozyten
Nimodipin konnte die antiapoptotischen Proteine AKT und CREB steigern, sodass weniger Caspase 3/7 aktiv wurde und es zu weniger Apoptose kam. Abbildung adaptiert nach Leisz et al. (3).

Die vorliegende Studie orientiert sich an diesem Versuchsaufbau, was es mit dem Nimodipin vergleichbar macht. Die fragliche antiapoptotische Wirksamkeit des Thiamins kann hier in Relation zu anderen antiapoptotisch wirksamen Substanzen wie dem Nimodipin betrachtet werden. Naheliegender wäre, dass Patienten im Rahmen etwa einer Resektion des Vestibularisschwannoms profitieren könnten, wenn einen solchen Vergleich, die neuroprotektiv wirksamen Substanzen identifiziert werden könnten.

5.2 Gute Verträglichkeit des Thiamins *in vitro*

Im direkten Vergleich waren die Wachstumskurven annähernd deckungsgleich (Abbildung 14 rechts). Die errechneten Verdopplungszeiten t_d unterschieden sich in allen Konzentrationen geringfügig voneinander, nach Zugabe von 50 $\mu\text{mol/l}$ THCl proliferierten die Zellen geringfügig schneller und nach Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ THCl etwas langsamer. Insbesondere eine relevante Hemmung des Wachstums konnte nicht festgestellt werden.

Nach Anwendung des t-Tests konnte dem Thiamin kein nennenswerter Einfluss zugeordnet werden. Dies spricht am ehesten für ein unverändertes Wachstum trotz unterschiedlicher Thiaminkonzentrationen. Demnach ergeben sich keine Hinweise auf eine Beeinflussung des Zellwachstums, die Ergebnisse sprechen folglich dafür, dass nicht von einem grundsätzlichen Effekt des Thiamins auf das Zellwachstum der Schwann-Zellen ausgegangen werden kann. Zu dem Ergebnis, dass Thiamin nicht entscheidend das Zellwachstum beeinflusst, kommt auch eine frühere Übersichtsarbeit. Demnach ist Thiamin nicht als Wachstumsfaktor zu bezeichnen (6).

Die vorliegenden Ergebnisse lassen erstens die These zu, dass Thiamin auch in höheren Konzentrationen nicht zu toxischen Folgeschäden führt. Diese These deckt sich einerseits mit der in der Einleitung beschriebenen Einschätzung des Bundesinstitut für Risikobewertung (23), in der keine Höchstgrenzen für die orale Zufuhr von Thiamin festgelegt wurden, und andererseits mit einer Studie, die das Ausbleiben unerwünschter Wirkungen bei hohen Tagesdosen beschreibt (99). Die These wird dadurch zwar belegt, jedoch wurden die genannten Studien *in vivo* durchgeführt, sodass eine Vergleichbarkeit hier nur schwierig möglich ist. Allerdings wurden in der zuletzt zitierten Studie mit bis zu 8000 mg höhere Konzentrationen, als in der vorliegenden *in vitro* Studie eingesetzt. Damit erscheint es als unwahrscheinlich, dass hohe Thiaminkonzentrationen eine toxische Wirkung haben.

Eine andere Studie, die hingegen *in vitro* durchgeführt wurde, bestätigte, dass hohe Dosen Thiamin weder Zellzyklus noch Apoptose bei Brustkrebszellen beeinflussten (100). Diese Arbeit lässt sich jedoch eingeschränkt mit der vorliegenden Studie vergleichen, da es sich in der vorliegenden Studie nicht um Krebszellen handelt.

Es konnte festgestellt werden, dass sich die Schwann-Zellen trotz unterschiedlicher THCl-Konzentrationen in Bezug auf das Wachstum annähernd gleich verhielten. Dies steht entgegen einer Studie, in der sich die Zellproliferation durch Thiamin herabsetzen ließ. Die Proliferation wurde anhand enzymatischer und metabolischer Aktivitäten der

untersuchten Brustkrebszellen gemessen (100). Um dieses Ergebnis vergleichbar zu machen, könnten in Zukunft auch im vorliegenden Modell enzymatische oder metabolische Aktivitäten untersucht werden. Möglich wäre auch, dass dieser Effekt nur in Krebszellen beobachtet werden kann.

Auch eine Steigerung der Proliferation durch Thiamin konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Energiestoffwechsel der Zellen unabhängig vom zugesetzten THCl funktioniert. Die Deckung des Thiamin-Grundbedarfs ist die Grundlage für eine funktionierende ATP-Synthese und diese für Wachstum und Zellzyklus (11). Es wäre also möglich, dass eine prophylaktische Substituierung von Thiamin über den Grundbedarf hinaus keinen weiteren Vorteil im gesunden, nicht gestressten Gewebe hat.

Möglicherweise sind im Medium (*RPMI* mit 5 % FKS) bereits ausreichende Mengen des Vitamins enthalten, dies würde das unbeeinträchtigte Wachstum ohne THCl-Zusatz erklären. Reines *RPMI* enthält bereits 3 µmol/l THCl. In anderen Arbeiten wurde ein Thiaminmangel durch den Antagonisten Pyriithiamin herbeigeführt (55), in dessen Anwesenheit es zu ausgeprägten Zellschädigungen kam.

Die Tatsache, dass die Abwesenheit von Thiamin zu raschem Zelluntergang führt, scheint hinreichend belegt. Hier zu nennen wäre das klinische Erscheinungsbild beim Menschen in Form der Wernicke-Enzephalopathie (8, 49) einerseits und die in den Tierversuchen durch Thiaminmangel induzierten Hirnläsionen (45) andererseits. Versuchstiere, die einer thiaminarmen Diät ausgesetzt waren, entwickelten starke neurologische Symptome und starben innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums von 12 - 30 Tagen. Die kurzfristig auftretenden Pathologien sind dabei am ehesten als Folge eines Glukosehypometabolismus zu betrachten (7, 101).

Die große Geschwindigkeit der Nervenschädigung zeigt die Abhängigkeit des NSs von Thiamin und könnte zugleich ein Hinweis auf die kurze Speicherfähigkeit des Thiamins sein. Übergeordnet wurde auch gezeigt, dass der Thiaminmangel zu Dysfunktion von Synapsen und neuronale Schaltkreise führt (101).

5.3 Gleichbleibend stressbedingter Zelltod unter Thiamin

Die Hypothese, dass Thiamin den stressbedingten Zelltod von Schwann- und neuronalen Zellen quantitativ reduzieren konnte, konnte nicht belegt werden (Abbildung 30). Überraschenderweise war in den Zelltodversuchen kein relevanter Effekt aller untersuchten Thiaminderivate zu beobachten, was im Hinblick auf die Literatur nicht zu erwarten war. Der Zelltod konnte mit den eingesetzten Thiaminderivaten nicht verhindert

werden, die Messwerte ließen keine eindeutigen Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Zelltod und Einsatz des Thiaminderivats erkennen.

Die Messwerte wurden nicht für multiples Testen korrigiert (keine Bonferroni-Korrektur).

Es wurde gezeigt, dass Thiamin und BFT ein antiapoptotisches Potential haben und Neurodegeneration im Mausmodell entgegen wirkt (58). Ebenfalls gab es Hinweise, dass Thiamin nach traumatischen Läsionen die mitochondriale Funktion, und damit den Energiestoffwechsel, im Rattenmodell aufrecht erhält (60).

Da keine Antiapoptose im Vergleich zu unbehandelten Zellen eintrat, können die Resultate diese und die in der Einleitung beschriebenen Hinweise verschiedener Autoren auf antiapoptotische Mechanismen nicht stützen.

5.4 Weiterhin unklares Potential von Thiamin

Die Frage, wieso Thiamin entgegen der Erwartung den stressbedingten Zelltod nicht verhindern konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt. Es könnte davon ausgegangen werden, dass die Zellen nicht von Thiamin profitierten, da sie keinen grundlegenden Thiaminmangel erlitten. Einem nicht vorhandenen Thiaminmangel könnte so therapeutisch nicht begegnet werden. Unter dieser Prämisse hätte sich ein Effekt möglicherweise eher unter Erzeugung eines ausgeprägten Thiaminmangels ergeben. Ein solcher durch Pyriithiamin erzeugter Thiaminmangel bedingt verstärkt die Apoptose (72). Dieser Effekt kann durch Thiamingabe wieder umgekehrt werden (102). Es wäre in der vorliegenden Studie möglich gewesen, die Versuche mit Pyriithiamin zu ergänzen, und so möglicherweise einen Effekt eines künstlich erzeugten Thiaminmangels zu erreichen. Bislang unklar ist, inwieweit die betroffenen Zellen im Operationsgebiet einem Thiaminmangel ausgesetzt sind. Auch denkbar wäre ein durch Zellstress ausgelöster gesteigerter Thiaminverbrauch und in der Folge eine Mangelsituation. Eine Stressreaktion, welche die Zellen - zum Beispiel im Rahmen einer Operation oder der vorliegenden Studie - durchlaufen, ist sehr energieaufwändig, obgleich die Mechanismen noch nicht ganz verstanden worden sind (103). Es konnte bereits im Pflanzenmodell eine verstärkte Hochregulierung von Thiaminbiosynthesegenen 2-6 h nach osmotischer und oxidativer Stress gezeigt werden, die mit einer verstärkten Genexpression thiaminabhängiger Enzyme korrelierte (104). Dies wird als Hinweis dafür betrachtet, dass Thiamin an Anpassungsmechanismen von Pflanzen im Rahmen einer Stressreaktion beteiligt sein könnte (104).

Dazu könnte stoffwechselunabhängige Effekte wie eine mögliche antioxidative Wirkung des Thiamins zählen. Diese wurde bereits für BFT beschrieben (58). Hier wurde oxidativer Stress mittels Paraquat indiziert, ein Mechanismus für den Schutz vor oxidativem Stress konnte jedoch nicht identifiziert werden.

Es hat sich bereits gezeigt, dass ein Mangel an Thiamin oxidativen Stress hervorruft (7, 105). Auch konnte gezeigt werden, dass der programmierte Zelltod entscheidend durch oxidativen Stress bedingt sein und durch Antioxidantien entsprechend verhindert werden kann (96). Es konnte in vorliegender Studie kein zelltodreduzierender Effekt bei Vorliegen von oxidativem Stress festgestellt werden. Eher unter osmotischem Stress deuteten die vorliegenden Ergebnisse auf eine vereinzelte günstige Heraufregulierung der antiapoptotischen Proteine AKT, CREB und ERK hin.

Diese Effekte traten bei Schwann- und neuronalen Zellen und unter allen getesteten Substanzen auf. Meist waren aber einzelne Proteine nur punktuell, sehr gering und ohne ein erkennbares Muster erhöht, sodass über Aussagekraft oder Stichprobenzahl der Proteinmessung diskutiert werden kann. Dazu passt das Ausbleiben eines antiapoptotischen Effekts in der Zelltodmessung unter osmotischem Stress. Selbst bei verstärktem Auftreten antiapoptotischer Proteine deuteten die Messungen nicht auf eine tatsächliche Reduktion von Zelltod hin.

5.5 Weitere Erklärungsmodelle: Thiamin eher glykoprotektiv?

In einer *in vitro* Studie konnten Thiamin und BFT in Endothelzellen und Perizyten, die Stress durch eine hohe Glukosekonzentration ausgesetzt waren, die Apoptose reduzieren (10). Dies widerspricht nicht eindeutig den Ergebnissen der vorliegenden Studie, da sich die Methodik unterschied. Die Zellen wurden nicht mit oxidativem oder osmotischem Stress, sondern mit Glukose kultiviert und die Apoptose wurde mittels DNS-Fragmentierung bzw. Caspase-3-Aktivität gemessen. Angewendet wurden 50 bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ Thiamin bzw. BFT. In der vorliegenden Arbeit wurden niedrigere Konzentrationen eingesetzt.

Ein möglicher Ansatz, diese Ergebnisse zu vereinbaren, könnte die Eigenschaft des Thiamins sein, die nicht-enzymatische Glykierung durch Glukose zu verhindern und die sogenannten *Advanced Glycation Endproducts (AGEs)* zu reduzieren (106). Bekannt ist, dass diese Prozesse in der Pathogenese von Diabetes eine zentrale Rolle spielen (107, 108). So konnte gezeigt werden, dass Thiamin gegen diabetische Gefäßkomplikationen schützt, indem es einerseits durch Aktivierung der Transketolase zu einem verstärkten

Abbau von Vorstufen der AGEs sorgt (33) und andererseits antiapoptotische Mechanismen aktiviert (109).

In diesen Erkenntnissen liegt viel Hoffnung der zukünftigen Forschung zum Thema Thiamin und diabetische Mikroangiopathie. Es scheint damit, als ließe sich das Prinzip des protektiven Effekts aus der Diabetesforschung nicht einfach auf Strukturen wie neuronale oder Schwann-Zellen übertragen. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass auch Zellen des NS durch Glykierung geschädigt werden. AGEs sind auch an der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit beteiligt (107). Außerdem haben sie das Potential, die Antikörperreaktivität im Rahmen der Multiplen Sklerose zu steigern (110). Demnach könnte Thiamin möglicherweise über Verhinderung von Glykierungsprozessen auch einen günstigen Einfluss auf die Zellen des NS haben. Die Alzheimer-Krankheit wird zu den neurodegenerativen Erkrankungen gezählt (111). Laut einer Studie kann insbesondere BFT einer Neurodegeneration entgegen wirken (58).

Es sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, dies weiter zu belegen und Mechanismen aufzudecken.

Möglicherweise hätte das Thiamin eher einen langfristigen Effekt im Sinne einer Senkung von Risikofaktoren (AGEs) zur Folge, da sich die genannten degenerativen Erkrankungen über einen langen Zeitraum entwickeln und ein weiteres experimentelles Modell gewählt werden müsste.

5.6 Verstärktes Auftreten antiapoptotischer Proteine unter Thiamin

Im Vergleich der beiden Zellreihen untereinander zeigten sich die Effekte etwas deutlicher für neuronale Zellen als für Schwann-Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass neuronale Zellen einen besonders hohen Energiebedarf haben (112) und somit möglicherweise eher auf Änderungen des Thiaminspiegels reagieren. Wurden neuronale Zellen unter osmotischem Stress mit Thiamin behandelt, war den Vermessungen zufolge die Menge antiapoptotischer Proteine unter allen Thiaminderivaten verstärkt vertreten.

Es gab unter Betrachtung der Western-Blot-Ergebnisse Hinweise für eine erhöhte Menge antiapoptotischer Proteine, die eher unter osmotischem Stress als unter oxidativem Stress auftrat. THCl führte unter osmotischem Stress bei beiden Zellreihen zu einem gesteigerten Auftreten aller getesteten antiapoptotischen Proteine. In

Zusammenschau der Ergebnisse wiesen die Proteine eine partiell gesteigerte Aktivierung auf, denen jedoch keine Zelltodreduktion folgte (Abbildung 30).

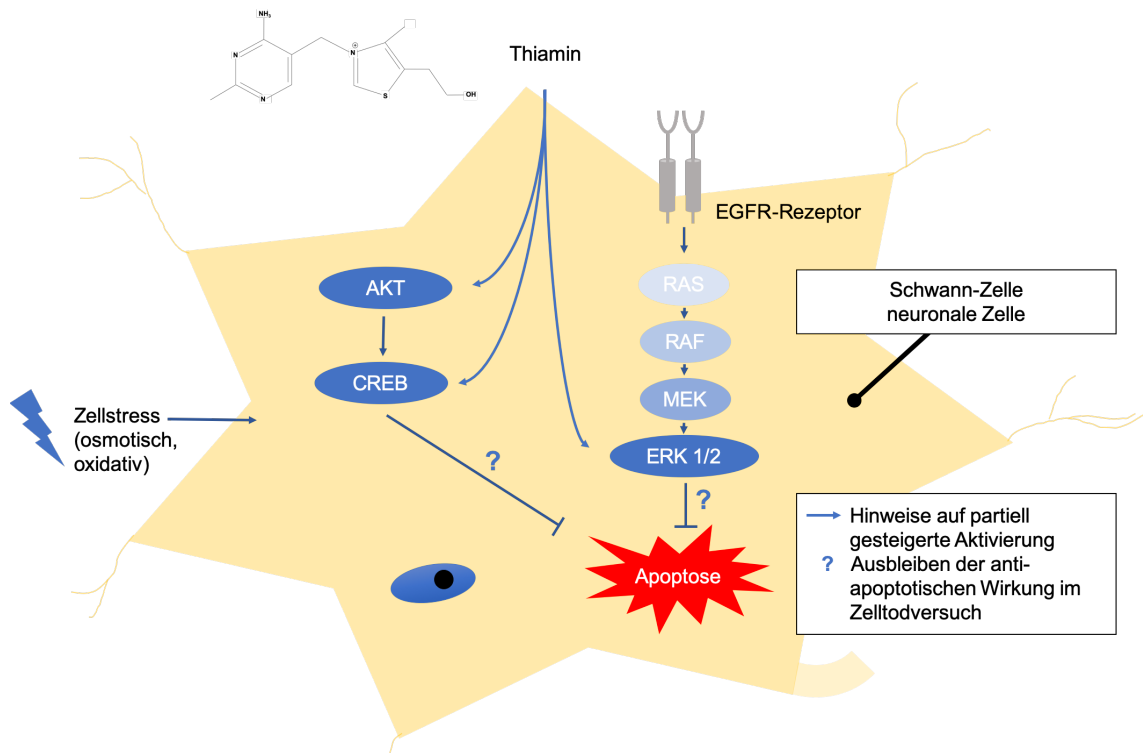


Abbildung 30: Antiapoptotische Wirkung von Thiaminderivaten bei neuronalen und Schwann-Zellen

Für die in vorliegender Studie untersuchten Thiaminderivate gab es unter osmotischem oder oxidativem Zellstress Hinweise auf partiell gesteigerte Menge und Aktivierung von AKT, CREB und ERK, nicht aber auf eine Reduktion von Zelltod. Abbildung adaptiert nach Leisz et al. (3).

Das verstärkte Auftreten von ERK, CREB und ERK unter osmotischem statt unter oxidativem Stress ließe sich als eine Möglichkeit der Mechanismen im Rahmen einer Anpassungsreaktion verstehen (104). Die Frage, ob dieser Mechanismus tatsächlich eher unter osmotischem als unter oxidativem Stress auftritt, lässt sich nicht sicher beantworten, hierzu bleiben weitere Studien abzuwarten.

Ein denkbarer Ansatz, die unterschiedliche Wirkung auf die verschiedenen Stressarten zu erklären, wäre, dass die Zellen nicht exakt gleich schnell mit dem Zelltod auf 2 % EtOH bzw. 150 mmol/l NaCl reagiert haben könnten. Wenn der Zelltod unter oxidativem Stress also in einer früheren Phase der Stressreaktion eingetreten wäre als nach osmotischem Stress, hätten die osmotisch gestressten Zellen vermutlich mehr Zeit gehabt, mit der Synthese antiapoptotischer Proteine zu reagieren. Zellen in anderen Studien brauchten 2-6 h, um sich an osmotischen und oxidativen Stress anzupassen (104). In diesem Zuge werden vermehrt Thiamin-abhängige Enzyme synthetisiert (104), die letztlich möglicherweise für die antiapoptotische Funktion des Thiamin mitverantwortlich sein könnten. Der Zellstress in vorliegendem Modell wird augenblicklich hinzugegeben. Wann in vorliegender Studie jedoch genau der Zeitpunkt

des Zelltods eintrat, lässt sich im Rahmen des gewählten Zellmodells nicht feststellen. Deutlich wird nur, wie viele Zellen 24 h nach Zellstress gestorben waren.

Die zunächst vielversprechenden Ergebnisse sind wenig aussagekräftig, denn die erhöhte Menge antiapoptotischer Proteine war bei allen Proben nur schwach ausgeprägt, zum Teil betrug der Unterschied nur 2 (neuronale Zellen, THCl, osmotischer Stress, AKT) bis maximal 39 (Schwann-Zellen, BFT, osmotischer Stress) Prozentpunkte. Für eindeutige Schlussfolgerungen bedürfte es hier deutlicherer Unterschiede. Bei genauerer Betrachtung fallen auch teils zu deutliche Schwankungen auf, was es weiter erschwert, eindeutige Aussagen aus den Ergebnissen abzuleiten. Eine Ursache hierfür konnte nicht identifiziert werden. Für die Berechnung der Messwerte unter SBT und DBT wurden dieselben Werte der Lmk verwendet, da beide Substanzen in DMSO gelöst wurden. Die Messwerte wurden jedoch wie auch in der Zelltodmessung nicht für multiples Testen korrigiert, da dies die Aussagekraft nicht wesentlich beeinflusst hätte.

Wurden die antiapoptotischen Proteine unter oxidativem Stress untersucht, war ein Großteil der antiapoptotischen Proteine sogar leicht erniedrigt, sodass hier eine positive Wirkung des Thiamins auf die antiapoptotischen Proteine angezweifelt werden kann. Eine andere Ursache der Proteinverminderung konnte nicht eruiert werden.

THCl erhöhte die Proteine unter osmotischem Stress bei allen Zellreihen nie mehr als 20 %. Unter oxidativem Stress bewirkte es sogar durchgehend eine Verringerung der Proteine, was nicht für eine antiapoptotische Wirksamkeit spricht.

SBT erhöhte nur CREB um 6 bzw. 31 % unter osmotischem Stress und ERK unter oxidativem Stress in neuronalen Zellen um 13 bzw. 17 % – sonst wichen die Proteinmengen kaum von der Kontrolle ab. DBT bewirkte zum Teil eine erhöhte Menge der Proteine, verursachte unter oxidativem Stress jedoch ebenfalls eine Verringerung aller untersuchter Proteine, obwohl Sambon et al. eine antioxidative Wirkung für DBT zeigen konnten (113). Mögliche Gründe könnten wie bereits diskutiert auch in der Art des Versuchsaufbaus liegen.

BFT steigerte die Menge unter osmotischem Stress vor allem in neuronalen Zellen – der größte Unterschied betrug dabei allerdings auch nur 19 % bei AKT und 39 % bei CREB bei recht hoher Verteilung der Werte.

Es muss somit festgestellt werden, dass keines der Thiaminderivate zu einer sehr eindeutigen Steigerung der antiapoptotischen Proteine AKT, CREB und ERK führte, eine steigernde Wirkung kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse für die erhoffte gesteigerte Aktivität der Proteine waren insgesamt noch weniger vielversprechend als die Quantifizierung der Gesamtproteine. So gab kaum Hinweise auf gesteigerte Phosphorylierungen von AKT, CREB oder ERK. Diese hätten eine gesteigerte antiapoptotische Aktivität zur Folge gehabt. Diese Beobachtung passt zu dem Ergebnis der vorliegenden Studie, dass Thiamin keine neuroprotektive Wirkung im Zelltodversuch entfalten konnte.

5.7 Allgemeine Limitationen der *in vitro* Methodik

Das Zellmodell bildet näherungsweise den lebenden Organismus ab, hat aber entsprechende Limitationen. In der vorliegenden Studie konnte die Pharmakodynamik des Thiamins nicht berücksichtigt werden. Dazu zählt sowohl das Prinzip enteraler Aufnahme einschließlich des *First-pass*-Effekts, als auch das Vorliegen einer Blut-Hirn-Schranke, sowie die Ausscheidung aus dem Organismus. Hierfür wäre ein *in vivo* Modell erforderlich.

Im Organismus kommt es physiologisch zu einem allmählichen Anstieg durch Einwärtstransport über die Thiamintransporter 1 und 2 (40). Zellen *in vivo* haben also die Möglichkeit, eine langsame Toleranz gegenüber dem Thiaminspiegel zu aufzubauen, während es im Zellmodell zu raschen Milieuveränderungen kommt. Im Zellmodell geschieht die Anflutung des Thiamins augenblicklich. Um eine potenziell toxische Wirkung im Rahmen dieser Dynamik auszuschließen, wurde das Wachstumsverhalten untersucht.

Einschränkend kommt hinzu, dass der augenblicklich maximale Thiaminspiegel *in vitro* über die Dauer des Versuchs hinweg vermutlich nicht konstant hoch bleibt. Durch die Aufnahme des Thiamins in die Zellen könnte der Thiamingehalt im Medium sinken, welcher aus praktischen Gründen nur bedingt erneuert werden kann. Um dem Problem des Thiaminverbrauchs, und damit dem Sinken des Wirkstoffspiegels entgegen zu wirken, wurde deshalb stets während der Versetzung mit oxidativer oder osmotischer Zellstresssubstanz ein Wechsel des Nährmediums durchgeführt, welches mit dem ursprünglichen Thiamingehalt versetzt wurde. Jeder Mediumwechsel stellt jedoch potentiellen zusätzlichen Stress dar, vorrangig durch mechanische Scherkräfte auf dem Boden der Zellkulturschale. Es wurde versucht, durch ein reproduzierbares Testverfahren einer Verzerrung entgegenzuwirken. Außerdem wurde während des gesamten Versuchsablaufs durch o. g. gleichzeitige Gabe von Stresssubstanz und Medium nur ein Mediumwechsel erforderlich. In diesem Zuge konnten nicht nur das Thiamin, sondern auch alle anderen benötigten und im Medium enthaltenen

Mikronährstoffe, wie beispielsweise Glucose, ergänzt werden. Im Organismus wäre hingegen eine konstantere Grundversorgung der Zellen gewährleistet gewesen.

In einer Studie mit einem ähnlichen Zellmodell wird bereits auf die Limitationen durch weitere schwierig abbildbare *in vivo*-Faktoren hingewiesen, wie die Immunantwort, die Zell – Zell – Interaktion und insbesondere die Interaktion mit anderen Zelltypen (3). Ein natürliches Gewebemilieu kann somit nur näherungsweise abgebildet werden.

Es könnte sinnvoll sein, Zellen verschiedenen Stressformen gleichzeitig auszusetzen, um eine Operationssituation besser nachzubilden. Ein Nachteil wäre dabei die fehlende Differenzierung, da untersucht werden sollte, auf welche Stressform Thiamin am ehesten einen neuroprotektiven Einfluss hat.

Eine Limitation der vorliegenden Studie ist, dass die gewählten Stressoren an Stelle von Apoptose auch zu Nekrosen führen (5). Um die Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose vornehmen zu können, wurde eine PI/Annexin-V-Färbung durchgeführt, in der unter dem Einfluss von oxidativem und osmotischem Stress mehr Nekrosen als Apoptosen festgestellt wurden (5). Diese Beobachtung lässt sich auch auf vorliegende Studie anwenden. Die LDH-Zytotoxizitätsmessung unterscheidet hier nicht zwischen Apoptose und Nekrose, da es sich in beiden Fällen um Zelltod handelt, bei dem LDH freigesetzt wird. Dies könnte eine Erklärung für mangelnde Effekte im Zelltodversuch gewesen sein.

Durch einen standardisierten Versuchsaufbau wurde versucht, Verzerrungen entgegenzuwirken. So wirkt sich eine Änderung der Apoptose auch auf den Zelltod aus, doch möglicherweise war die LDH-Messung hier als Methode nicht spezifisch genug. Möglicherweise könnten durch eine entsprechende Differenzierung aussagekräftigere Ergebnisse zustande kommen, da Thiamin als potentiell antiapoptotische Substanz möglicherweise keinen positiven Einfluss auf nekrotische Zellen nimmt.

Für das Stressmodell der vorliegenden Studie spricht die bereits erfolgreiche Anwendung eines ähnlichen Modells, mittels dessen durch das antiapoptotisch wirkende Nimodipin effektiv Zelltod verhindert werden konnte (3). Durch einen ähnlichen Aufbau des Studiendesigns (3) steigt seine Reliabilität.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Neurochirurgische Operationen, wie die Entfernung des Vestibularisschwannoms, stellen - auch für umliegendes, gesundes Gewebe - des zentralen und peripheren NS

eine erhebliche Stressbelastung dar. Durch Freisetzung zahlreicher Metabolite entsteht osmotischer und oxidativer Stress, der im vorliegenden Zellmodell Zelltod induzierte. Die Forschung ist deshalb darum bemüht, zahlreiche vielversprechende Substanzen mit potenziell antiapoptotischer Wirkung auf ihre Fähigkeit, Zelltod zu verhindern, zu untersuchen. In Bezug auf Schwann-Zellen, Astrozyten und neuronale Zellen gelang dies beispielsweise bereits beim Nimodipin (3). Für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Thiamin gibt es in der Literatur Hinweise auf eine günstige Beeinflussung traumatischer Hirnläsionen und neurodegenerativer Erkrankungen. Antiapoptotische Effekte konnten bereits belegt werden in experimentellen Studien mit Endothelzellen. In Bezug auf neuroprotektive Effekte in Bezug auf Zellen des NS ist die Studienlage bislang mangelhaft, andere Studienergebnisse wie zur günstigen Wirkung des Thiamins gegenüber traumatischen Hirnläsionen geben hier Anlass zur Hoffnung.

In der vorliegenden Arbeit wurden potentiell antiapoptotische Effekte des Thiamins auf Schwann-Zellen und neuronale Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen in immer gleicher Zahl ausgesät und in thiaminarmem Medium kultiviert.

Zunächst wurde ein Versuch ohne Stress durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Thiamin keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hatte.

In den folgenden Versuchen wurden die Zellen 24 h nach Aussaat mit osmotischem oder oxidativem Stress versetzt, was den Zelltod herbeiführte. 4 h vor der Stressbeibringung wurden die Zellen mit vier unterschiedlichen Thiaminderivaten vorbehandelt. 24 h nach Stress erfolgte die Auswertung. Thiamin hatte keinen günstigen Einfluss auf das Überleben der Zellen unter osmotischem oder oxidativem Stress.

Es wurden anschließend mithilfe eines Western Blots die antiapoptotischen Proteine AKT, CREB und ERK untersucht. Dies geschah anhand von Zellen, die in gleicher Weise oben genannten Versuchsaufbau durchlaufen hatten und entsprechend behandelt und mit Stress versetzt worden waren.

Die vorliegenden Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Thiamin zu einer tendentiellen Steigerung der intrazellulären antiapoptotischen Proteine AKT, CREB und ERK führte, während die Phosphorylierung und damit eigentliche Aktivierung der Proteine weitestgehend ausblieb. Die Steigerung der Proteinmenge fand eher unter osmotischem Stress als unter oxidativem Stress statt, dies kann jedoch durch unbekannte Einflussfaktoren, eine stärker neurotoxische Wirkung des oxidativen im Vergleich zum osmotischen Stress, oder durch zeitliche Unterschiede der oxidativen im Vergleich zur osmotischen Anpassungsreaktion bedingt sein.

Die Proteinsteigerung zeichnete sich eher bei neuronalen Zellen als bei Schwann-Zellen ab, was möglicherweise mit dem vergleichsweise höheren Energiebedarf der neuronalen Zellen zusammenhängen könnte.

Es müssten zukünftig weitere Anstrengungen unternommen werden, antiapoptotische Substanzen zu finden. Auf das Nimodipin können größere Hoffnungen gesetzt werden. Es lassen sich anhand der vorliegenden Daten keine Aussagen über die tatsächliche antiapoptotische Wirksamkeit des Thiamins ableiten, sodass sich aktuell keine Empfehlungen ergeben, die man für die klinische Anwendung, etwa im Rahmen einer Operation, einsetzen könnte.

In dieser Studie konnten die thiaminassoziierte Antiapoptose und entsprechende Mechanismen nicht gezeigt werden. Dennoch lohnt es sich, nicht zuletzt aufgrund vorangegangener vielversprechender Studienergebnisse, zum möglichen neuroprotektiven Einfluss dieser vielseitigen Substanz weitere Studien anzustellen, denn möglicherweise liegt ihr Potential noch im Dunkeln.

Möglicherweise sind weitere potentiell antiapoptotische Mechanismen des Thiamins noch nicht entschlüsselt, sodass weitere Studien abzuwarten sind. Ein wichtiger Ansatz ist die ein glykoprotektiver Effekt (33, 106), sowie eine Wirkung gegen Neurodegeneration (58).

Möchte man einen Ausblick auf die Anwendbarkeit auf Zellen des NS während einer Operation geben, kommen weitere Faktoren hinzu, die nicht gesondert untersucht worden sind. Dies sind besonders mechanischer Stress und Stress durch Licht bzw. Hitze (4, 5). Hier sind weitere Untersuchungen mit diesen Stresstypen notwendig. Nervenzellen sind im Rahmen einer Operation noch vielen weiteren potentiell schädigenden Einflüssen ausgesetzt.

Hierzu können beispielsweise auch Veränderungen des pH-Werts durch eine Verwendung chirurgischen Saug- und Füllmaterials wie Tabotamp® (Ethicon, Bridgewater, New Jersey, (USA)) zählen, welche zur Irritation der Hirnzellen bis hin zu Neurotoxizität führen können, wie neuere Untersuchungen zeigen (114). Diese oder ähnliche Stresstypen wurden nicht in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt und bieten Anlass für weitere Untersuchungen. Ebenfalls sollte zukünftige Forschung zu anderen antiapoptotisch wirksamen Substanzen, wie dem Nimodipin, intensiviert werden, um tiefere Erkenntnisse zur neuroprotektiven Wirksamkeit zu erlangen (5).

7 Literaturverzeichnis

1. Dong X-x, Wang Y, Qin Z-h. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009;30(4):379-87.
2. Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2010;24(4):495-509.
3. Leisz S, Simmermacher S, Prell J, Strauss C, Scheller C. Nimodipine-Dependent Protection of Schwann Cells, Astrocytes and Neuronal Cells from Osmotic, Oxidative and Heat Stress Is Associated with the Activation of AKT and CREB. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
4. Herzfeld E, Speh L, Strauss C, Scheller C. Nimodipine but Not Nifedipine Promotes Expression of Fatty Acid 2-Hydroxylase in a Surgical Stress Model Based on Neuro2a Cells. *Int J Mol Sci* 2017, 18, 964 [CrossRef] [PubMed].
5. Herzfeld E, Strauss C, Simmermacher S, Bork K, Horstkorte R, Dehghani F, et al. Investigation of the neuroprotective impact of nimodipine on Neuro2a cells by means of a surgery-like stress model. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):18453-65.
6. Bâ A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Mol Neurobiol*. 2008;28(7):923-31.
7. Jhala SS, Hazell AS. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: Consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochemistry International*. 2011;58(3):248-60.
8. Latt N, Dore G. Thiamine in the treatment of Wernicke encephalopathy in patients with alcohol use disorders. *Intern Med J*. 2014;44(9):911-5.
9. Tapias V, Jainuddin S, Ahuja M, Stack C, Elipenahli C, Vignisse J, et al. Benfotiamine treatment activates the Nrf2/ARE pathway and is neuroprotective in a transgenic mouse model of tauopathy. *Hum Mol Genet*. 2018;27(16):2874-92.
10. Beltramo E, Berrone E, Buttiglieri S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. *Diabetes Metab Res Rev*. 2004;20(4):330-6.
11. Frank LL. Thiamin in Clinical Practice. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2015;39(5):503-20.
12. Sambon M, Gorlova A, Demelenne A, Alhama-Riba J, Coumans B, Lakaye B, et al. Dibenzoylthiamine Has Powerful Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties in Cultured Cells and in Mouse Models of Stress and Neurodegeneration. *Biomedicines*. 2020;8(9):361.
13. Calderón-Ospina CA, Nava-Mesa MO. B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin. *CNS Neurosci Ther*. 2020;26(1):5-13.
14. Tittmann K. Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: redox reactions. *The FEBS journal*. 2009;276(9):2454-68.
15. Chandrakumar A, Bhardwaj A, t Jong GW. Review of thiamine deficiency disorders: Wernicke encephalopathy and Korsakoff psychosis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018;30(2):153-62.
16. Marcé-Grau A, Martí-Sánchez L, Baide-Mairena H, Ortigoza-Escobar JD, Pérez-Dueñas B. Genetic defects of thiamine transport and metabolism: A review of clinical

- phenotypes, genetics, and functional studies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2019;42(4):581-97.
17. Zeng Z, Huang Q, Mao L, Wu J, An S, Chen Z, et al. The Pyruvate Dehydrogenase Complex in Sepsis: Metabolic Regulation and Targeted Therapy. *Front Nutr*. 2021;8:783164.
 18. Mkrtchyan G, Aleshin V, Parkhomenko Y, Kaehne T, Luigi Di Salvo M, Parroni A, et al. Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-26.
 19. Butterworth RF. Thiamin deficiency and brain disorders. *Nutrition Research Reviews*. 2003;16(2):277-84.
 20. Kochetov G, Sevostyanova IA. Binding of the coenzyme and formation of the transketolase active center. *IUBMB Life*. 2005;57(7):491-7.
 21. Sambon M, Wins P, Bettendorff L. Neuroprotective Effects of Thiamine and Precursors with Higher Bioavailability: Focus on Benfotiamine and Dibenzoylthiamine. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11).
 22. Dannhardt G, Eger K. Thiamin. *Vitamin, Arzneistoff und Reagenz in der organischen Chemie. Pharmazie in unserer Zeit*. 1985;14(6):177-88.
 23. BfR SNd. Aktualisierte Höchstmengenvorschläge für Vitamine und Mineralstoffe in Nah- rungsergänzungsmitteln und angereicherten Lebensmitteln. www.bfr.bund.de. 2021.
 24. Natural S. HIGH-DOSE VITAMIN B1 THIAMINE cited 04/11/2022 [website]. [updated unknown. Available from: <https://www.sunday.de/en/vitamin-b1-thiamine-high-dose.html>.].
 25. Prof. Dr. med. Hans-Christoph Diener. *Vitaminpräparate bei Neuropathien ohne Nutzen - Presseinformation der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN)*. 2018
 26. Starling-Soares B, Carrera-Bastos P, Bettendorff L. Role of the Synthetic B1 Vitamin Sulbutiamine on Health. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2020;2020:9349063.
 27. Smart S. SuperSmart, Sulbutiamine 200 mg - 100 Vegetarian Capsules. unknown.
 28. Lõo H, Poirier MF, Ollat H, Elatki S. [Effects of sulbutiamine (Arcalion 200) on psycho-behavioral inhibition in major depressive episodes]. *Encephale*. 2000;26(2):70-5.
 29. Obrenovich ME, Shola D, Schroedel K, Agrahari A, Lonsdale D. The role of trace elements, thiamin(e) in autism and autistic spectrum disorder. *FBE*. 2015;7(2):263-77.
 30. Tylicki A, Łotowski Z, Siemieniuk M, Ratkiewicz A. Thiamine and selected thiamine antivitamin - biological activity and methods of synthesis. *Biosci Rep*. 2018;38(1):BSR20171148.
 31. Jonus HC, Byrnes CC, Kim J, Valle ML, Bartlett MG, Said HM, et al. Thiamine mimetics sulbutiamine and benfotiamine as a nutraceutical approach to anticancer therapy. *Biomed Pharmacother*. 2020;121:109648.
 32. Ollat H, Laurent B, Bakchine S, Michel BF, Touchon J, Dubois B. [Effects of the association of sulbutiamine with an acetylcholinesterase inhibitor in early stage and moderate Alzheimer disease]. *Encephale*. 2007;33(2):211-5.
 33. Raj V, Ojha S, Howarth FC, Belur PD, Subramanya SB. Therapeutic potential of benfotiamine and its molecular targets. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(10):3261-73.

34. Chemicals S. Dibenzoylthiamine 25 mg Catalog No.S5474 cited 04/11/2022 [Available from: <https://www.selleckchem.com/products/dibenzoyl-thiamine.html>.]
35. Schreeb KH, Freudenthaler S, Vormfelde SV, Gundert-Remy U, Gleiter CH. Comparative bioavailability of two vitamin B1 preparations: benfotiamine and thiamine mononitrate. *Eur J Clin Pharmacol*. 1997;52(4):319-20.
36. Max Rubner-Institut BfrEhuL. Nationale Verzehrsstudie II, Ergebnisbericht Teil 2. 2008.
37. Strohm D, Bechthold A, Isik N, Leschik-Bonnet E, Heseker H. Revised reference values for the intake of thiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), and niacin. *NFS Journal*. 2016;3:20-4.
38. EFSA Panel on Dietetic Products N, Allergies, Turck D, Bresson J-L, Burlingame B, Dean T, et al. Dietary reference values for thiamin. *EFSA Journal*. 2016;14(12):e04653.
39. Kunisawa J. Immunity and Nutrition: the Role of Vitamins. In: Ratcliffe MJH, editor. *Encyclopedia of Immunobiology*. Oxford: Academic Press; 2016. p. 120-6.
40. Scheller K. Neue tierexperimentelle Untersuchungen zur präventiven Wirkung von B-Vitaminen auf LKG-Spalten. 2014.
41. Hoyumpa AM, Jr., Middleton HM, 3rd, Wilson FA, Schenker S. Thiamine transport across the rat intestine. I. Normal characteristics. *Gastroenterology*. 1975;68(5 Pt 1):1218-27.
42. Hoyumpa AM, Jr., Strickland R, Sheehan JJ, Yarborough G, Nichols S. Dual system of intestinal thiamine transport in humans. *J Lab Clin Med*. 1982;99(5):701-8.
43. Dutta B, Huang W, Molero M, Kekuda R, Leibach FH, Devoe LD, et al. Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. *J Biol Chem*. 1999;274(45):31925-9.
44. Said HM, Balamurugan K, Subramanian VS, Marchant JS. Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(3):G491-8.
45. Suzuki K, Yamada K, Fukuhara Y, Tsuji A, Shibata K, Wakamatsu N. High-dose thiamine prevents brain lesions and prolongs survival of Slc19a3-deficient mice. *PLoS One*. 2017;12(6):e0180279.
46. Wooley JA. Characteristics of Thiamin and Its Relevance to the Management of Heart Failure. *Nutrition in Clinical Practice*. 2008;23(5):487-93.
47. Butterworth RF, Kril JJ, Harper CG. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993;17(5):1084-8.
48. Charness ME. Brain lesions in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993;17(1):2-11.
49. Niemann T, Erb S, Ott H. Kognitive Störungen, Gangataxie und Blickparese bei einem Patienten mit chronischem Alkoholabusus. *Praxis (16618157)*. 2010;99(5).
50. Sinha S, Kataria A, Kolla BP, Thusius N, Loukianova LL. Wernicke Encephalopathy—Clinical Pearls. *Mayo Clinic Proceedings*. 2019;94(6):1065-72.
51. CRUICKSHANK EK. Wernicke's encephalopathy. *QJM: An International Journal of Medicine*. 1950;19(4):327-38.
52. Patel S, Topiwala K, Hudson L. Wernicke's Encephalopathy. *Cureus*. 2018;10(8):e3187-e.

53. Roy M, Winkler C, Holtz M, te Wildt B, Becker J, Emrich H, et al. Diagnose: Wernicke-Enzephalopathie bei okulokutanem Albinismus. *Aktuelle Neurologie*. 2006;33(09):497-9.
54. Jesse S, Thal DR, Ludolph AC. Thiamine deficiency in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2015;86(10):1166-8.
55. Langlais PJ, Savage LM. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks that correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. *Behavioural Brain Research*. 1995;68(1):75-89.
56. Chapter 16 Corpora mamillaria. In: Swaab DF, editor. *Handbook of Clinical Neurology*. 79: Elsevier; 2003. p. 291-5.
57. Opitz B. Memory function and the hippocampus. *Front Neurol Neurosci*. 2014;34:51-9.
58. Vignisse J, Sambon M, Gorlova A, Pavlov D, Caron N, Malgrange B, et al. Thiamine and benfotiamine prevent stress-induced suppression of hippocampal neurogenesis in mice exposed to predation without affecting brain thiamine diphosphate levels. *Mol Cell Neurosci*. 2017;82:126-36.
59. Levin OS, Slizkova lu B. [The use of enerion in the treatment of asthenic disorders in patients after mild cranio-cerebral trauma]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2007;107(5):44-8.
60. Mkrtchyan GV, Üçal M, Müllebnner A, Dumitrescu S, Kames M, Moldzio R, et al. Thiamine preserves mitochondrial function in a rat model of traumatic brain injury, preventing inactivation of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2018;1859(9):925-31.
61. Smith M. Diffuse axonal injury in adults. *Trauma*. 2003;5(4):227-34.
62. Cardinal von Widdern J. Neuroprotektive Effekte und Modulation von glialer Inflammation durch abnormal Cannabidiol2020.
63. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2004;61(6):657-68.
64. Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the "golden bullet"? *Mol Med*. 2008;14(11-12):731-40.
65. Baracaldo-Santamaría D, Ariza-Salamanca DF, Corrales-Hernández MG, Pachón-Londoño MJ, Hernandez-Duarte I, Calderon-Ospina CA. Revisiting Excitotoxicity in Traumatic Brain Injury: From Bench to Bedside. *Pharmaceutics*. 2022;14(1).
66. Khatri N, Thakur M, Pareek V, Kumar S, Sharma S, Datusalia AK. Oxidative Stress: Major Threat in Traumatic Brain Injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2018;17(9):689-95.
67. Schilling T, Eder C. Stimulus-dependent requirement of ion channels for microglial NADPH oxidase-mediated production of reactive oxygen species. *Journal of Neuroimmunology*. 2010;225(1):190-4.
68. Clark LF, Kodadek T. The Immune System and Neuroinflammation as Potential Sources of Blood-Based Biomarkers for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*. 2016;7(5):520-7.
69. Teasdale GM, Graham DI. Craniocerebral trauma: protection and retrieval of the neuronal population after injury. *Neurosurgery*. 1998;43(4):723-37; discussion 37-8.

70. Gankam-Kengne F, Couturier BS, Soupart A, Brion JP, Decaux G. Osmotic Stress–Induced Defective Glial Proteostasis Contributes to Brain Demyelination after Hyponatremia Treatment. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;28(6):1802-13.
71. Mkrtchyan G, Graf A, Bettendorff L, Bunik V. Cellular thiamine status is coupled to function of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Neurochem Int*. 2016;101:66-75.
72. Chorny S, Parkhomenko J, Chorna N. Thiamine deficiency caused by thiamine antagonists triggers upregulation of apoptosis inducing factor gene expression and leads to caspase 3-mediated apoptosis in neuronally differentiated rat PC-12 cells. *Acta biochimica Polonica*. 2007;54:315-22.
73. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997;275(5300):661-5.
74. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis. *Cell*. 1997;88(4):435-7.
75. Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Molecular and Cellular Biology*. 1997;17(3):1595-606.
76. Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32377-9.
77. Pregi N, Belluscio LM, Berardino BG, Castillo DS, Cánepa ET. Oxidative stress-induced CREB upregulation promotes DNA damage repair prior to neuronal cell death protection. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017;425(1):9-24.
78. Walton MR, Dragunow M. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends in Neurosciences*. 2000;23(2):48-53.
79. Steven A, Seliger B. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget*. 2016;7(23):35454-65.
80. Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD. Apoptosis, Axonal Growth Defects, and Degeneration of Peripheral Neurons in Mice Lacking CREB. *Neuron*. 2002;34(3):371-85.
81. Yi J, Zhu M, Qiu F, Zhou Y, Shu P, Liu N, et al. TNFAIP1 mediates formaldehyde-induced neurotoxicity by inhibiting the Akt/CREB pathway in N2a cells. *Neurotoxicity Research*. 2020;38(1):184-98.
82. Huang H-k, Joazeiro CAP, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD, Hunter T. The Inhibitor of Apoptosis, cIAP2, Functions as a Ubiquitin-Protein Ligase and Promotes *in Vitro* Monoubiquitination of Caspases 3 and 7 *. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(35):26661-4.
83. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo j*. 1997;16(23):6914-25.
84. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, et al. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem*. 1998;273(14):7787-90.
85. Watters D, Waterhouse N. Proteolytic targets in cell death. *Apoptosis: Mechanisms and Role in Disease*. 1998:25-44.

86. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science*. 1997;278(5336):294-8.
87. Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273(25):15540-5.
88. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9357-60.
89. Park SH, Kim DS, Kim S, Lorz LR, Choi E, Lim HY, et al. Loliolide Presents Antiapoptosis and Antiscratching Effects in Human Keratinocytes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
90. Jia Y, Li Z, Liu C, Zhang J. Methane Medicine: A Rising Star Gas with Powerful Anti-Inflammation, Antioxidant, and Antiapoptosis Properties. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1912746.
91. Yoo JM, Lee BD, Sok DE, Ma JY, Kim MR. Neuroprotective action of N-acetyl serotonin in oxidative stress-induced apoptosis through the activation of both TrkB/CREB/BDNF pathway and Akt/Nrf2/Antioxidant enzyme in neuronal cells. *Redox Biol*. 2017;11:592-9.
92. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3291-310.
93. Imperial R, Toor OM, Hussain A, Subramanian J, Masood A. Comprehensive pancancer genomic analysis reveals (RTK)-RAS-RAF-MEK as a key dysregulated pathway in cancer: Its clinical implications. *Seminars in Cancer Biology*. 2019;54:14-28.
94. Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol*. 2003;22(3):469-80.
95. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*. 1994;15(1):7-10.
96. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000;7(3):153-63.
97. Dmitrieva NI, Michea LF, Rocha GM, Burg MB. Cell cycle delay and apoptosis in response to osmotic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2001;130(3):411-20.
98. Yan L, Jin Y, Pan J, He X, Zhong S, Zhang R, et al. 7,8-Dihydroxycoumarin Alleviates Synaptic Loss by Activated PI3K-Akt-CREB-BDNF Signaling in Alzheimer's Disease Model Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022.
99. Meador K, Loring D, Nichols M, Zamrini E, Rivner M, Posas H, et al. Preliminary findings of high-dose thiamine in dementia of Alzheimer's type. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 1993;6(4):222-9.
100. Liu X, Montissol S, Uber A, Ganley S, Grossestreuer AV, Berg K, et al. The Effects of Thiamine on Breast Cancer Cells. *Molecules*. 2018;23(6).
101. Yu Q, Liu H, Sang S, Chen L, Zhao Y, Wang Y, et al. Thiamine deficiency contributes to synapse and neural circuit defects. *Biological Research*. 2018;51(1):35.
102. Butterworth RF, Héroux M. Effect of pyriithiamine treatment and subsequent thiamine rehabilitation on regional cerebral amino acids and thiamine-dependent enzymes. *J Neurochem*. 1989;52(4):1079-84.

103. Riahi H, Brekermans C, Foriel S, Merklings SH, Lyons TA, Itskov PM, et al. The histone methyltransferase G9a regulates tolerance to oxidative stress–induced energy consumption. *PLOS Biology*. 2019;17(3):e2006146.
104. Rapala-Kozik M, Wolak N, Kujda M, Banas AK. The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMC plant biology*. 2012;12(1):1-14.
105. Hazell AS, Faim S, Wertheimer G, Silva VR, Marques CS. The impact of oxidative stress in thiamine deficiency: A multifactorial targeting issue. *Neurochemistry International*. 2013;62(5):796-802.
106. Booth AA, Khalifah RG, Hudson BG. Thiamine Pyrophosphate and Pyridoxamine Inhibit the Formation of Antigenic Advanced Glycation End-Products: Comparison with Aminoguanidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;220(1):113-9.
107. Booth AA, Khalifah RG, Todd P, Hudson BG. *In Vitro* Kinetic Studies of Formation of Antigenic Advanced Glycation End Products (AGEs): NOVEL INHIBITION OF POST-AMADORI GLYCATION PATHWAYS *. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(9):5430-7.
108. Jakuš V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*. 2004;53(2):131-42.
109. Katare RG, Caporali A, Oikawa A, Meloni M, Emanuelli C, Madeddu P. Vitamin B1 analog benfotiamine prevents diabetes-induced diastolic dysfunction and heart failure through Akt/Pim-1-mediated survival pathway. *Circ Heart Fail*. 2010;3(2):294-305.
110. Polykretis P. Advanced glycation end-products as potential triggering factors of self-reactivity against myelin antigens in Multiple Sclerosis. *Medical Hypotheses*. 2021;157:110702.
111. Li R, Deng M, Lin Y, Gao W, Liu B, Xia H. Genetically predicted circulating levels of glycine, glutamate, and serotonin in relation to the risks of three major neurodegenerative diseases: A Mendelian randomization analysis. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:938408.
112. Niven JE. Neuronal energy consumption: biophysics, efficiency and evolution. *Current Opinion in Neurobiology*. 2016;41:129-35.
113. Sambon M, Gorlova A, Demelene A, Alhama-Riba J, Coumans B, Lakaye B, et al. Dibenzoylthiamine Has Powerful Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties in Cultured Cells and in Mouse Models of Stress and Neurodegeneration. *Biomedicines*. 2020;8(9).
114. Leisz S, Trutschel ML, Mäder K, Scheller C, Strauss C, Simmermacher S. Tabotamp(®), Respectively, Surgicel(®), Increases the Cell Death of Neuronal and Glial Cells In Vitro. *Materials (Basel)*. 2020;13(11).

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Thesen der Dissertation:

**Antiapoptotische und neuroprotektive Wirkung von Thiaminderivaten
*in vitro***

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Paul Ohlmeier

geboren am 07.05.1996 in Göttingen

8 Thesen

1. Thiamin hat in den gewählten Konzentrationen keinen toxischen Effekt auf Schwann- und neuronale Zellen.
2. Thiamin beeinflusst die Zellproliferation von Schwann- und neuronalen Zellen nicht.
3. Thiamin hat keinen günstigen Einfluss auf das Überleben von Schwann- und neuronalen Zellen unter osmotischem oder oxidativem Stress, die Daten hierzu waren nicht signifikant.
4. Es gab Hinweise, dass Thiamin die intrazelluläre Menge der antiapoptotischen Proteine AKT, CREB und ERK tendenziell unter osmotischem Stress und vorwiegend in neuronalen Zellen steigerte, diese waren jedoch nicht sehr eindeutig.
5. Bisläng gibt es nicht ausreichende Hinweise, dass Thiamin einen positiven Einfluss auf Gewebeschäden im Rahmen einer neurochirurgischen Operation und damit verbundene Stressoren haben könnte.

Erklärungen

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christian Strauss, Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Universitätsklinik Halle (Saale) sowie meinem Betreuer Prof. Dr. med. Christian Scheller, Chefarzt der Klinik für Neurochirurgie und Wirbelsäulenchirurgie am Klinikum Magdeburg, für die Anregungen und die Betreuung meiner Dissertation.

Sehr dankbar bin ich insbesondere Frau Dr. rer. nat. Sandra Leisz, Laborleitung der Neurochirurgischen Klinik, für die herausragende Betreuung und die immer gute und konstruktive Zusammenarbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Justine Werner für die Hilfestellungen und Zusammenarbeit im Labor der Neurochirurgie.

Mein Dank gilt zudem Prof. Dr. Andreas Wienke für die stets freundliche und kompetente biometrische Beratung.

Auch möchte ich mich bedanken für die Unterstützung durch meine ehemaligen Kommiliton*innen Nathalie Auer und Christoph Walsleben, die mich mit ihrem Rat und Durchsicht der Arbeit sehr unterstützt haben.

Ich möchte mich besonders auch bei meinem Vater Prof. Dr. med. Martin Ohlmeier und meiner Mutter Ute Rosenhahn-Ohlmeier bedanken, die mich immer in meinem Vorhaben mit Rat und Tat unterstützt haben. Auch danken möchte ich meinen Großeltern Prof. Dr. med. Dipl. Psych. Dieter Ohlmeier und Dr. med. Rose-Marie Ohlmeier, die Vorbilder waren und sind.

Ebenso möchte ich meinen Großeltern Bärbel und Klaus Rosenhahn danken und meinen Brüdern Jakob, Emil und Moritz, die sich immer für meine Arbeit interessiert haben.

Schließlich möchte ich besonders auch meiner Freundin Selina Rehm danken, die mir auch in schwierigen Zeiten immer Kraft und Mut gegeben und mich stets unterstützt hat.