

Aus der Klinik für Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuroprotektion durch spezifische Induktion des  
Transkriptionsfaktors HIF-1

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Margarethe Roßmanith

aus Kirchdorf a. d. Amper

Gutachter/in:    1. Prof. Dr. med. A. Meisel  
                         2. Priv.-Doz. Dr. med. vet. U. Lindauer  
                         3. Prof. Dr. W. Paschen

Datum der Promotion: 09.09.2011

---

## Inhaltsverzeichnis

### Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Anglizismen ..... VII

## 1 Einleitung ..... 1

1.1	Schlaganfall .....	1
1.2	Zerebrale Ischämie .....	2
1.2.1	Globale zerebrale Ischämie .....	2
1.2.2	Fokale zerebrale Ischämie – ischämischer Schlaganfall .....	3
1.2.3	Pathophysiologie der zerebralen Ischämie .....	4
1.2.3.1	Exzitotoxizität .....	5
1.2.3.2	Periinfarktdepolarisation .....	5
1.2.3.3	Entzündung und Apoptose .....	6
1.2.4	Schlaganfallmodelle .....	6
1.3	Ischämietoleranz – Präkonditionierung .....	7
1.3.1	Ischämietoleranz der frühen Phase - Klassische Präkonditionierung .....	8
1.3.2	Ischämietoleranz der verzögerten Phase .....	8
1.3.3	Mediatoren der ischämischen Präkonditionierung .....	9
1.4	HIF-1 – der zentrale molekulare Sauerstoffsensor im Gehirn .....	11
1.4.1	Struktur und Funktion von HIF-1 .....	11
1.4.2	Regulation von HIF-1 durch Sauerstoff .....	13
1.4.3	Sauerstoff-unabhängige Regulation .....	16
1.4.4	Regulation von HIF-1 $\alpha$ durch NODD- und CODD-Domänen (N und C terminale Sequenz der oxygen dependent degradation domain) .....	17
1.5	Hypothesen .....	17
1.6	Aufgabenstellung .....	18

## 2 Material ..... 19

2.1	Bakterien, Vektoren .....	19
2.2	DNA-Größenstandards, Nukleotide .....	19
2.3	Enzyme .....	19

---

2.4 Kits.....	20
2.5 Chemikalien .....	20
2.6 Medien und Lösungen .....	22
2.6.1 Allgemeine Puffer und Stammlösungen.....	22
2.6.2 Zellkulturmedien .....	23
2.6.3 Nährmedien.....	24
2.7 Software.....	25
2.8 Verbrauchsmaterialien .....	25
2.9 Geräte.....	26
2.10 Tiere .....	27
<b>3 Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.1 Herstellung der NODD- und CODD-Fusionsproteine.....	28
3.1.1 Ausgangsmaterialien .....	28
3.1.2 Amplifizierung der NODD- bzw. CODD-Domänen durch PCR .....	29
3.1.3 Restriktionsenzymverdau mit <i>SacI</i> und <i>Bam</i> HI .....	31
3.1.4 Gelextraktion mittels QIAQuick Gel Extraction Kit .....	32
3.1.5 Dephosphorylierung der linearisierten pEGFP-Vektoren .....	33
3.1.6 Ligation der NODD- bzw. CODD-Domänen in pEGFP Vektoren .....	33
3.1.7 Elektroporation der Plasmide in <i>E.coli</i> .....	33
3.1.8 Anzucht der Klone .....	34
3.1.9 PCR als Kontrolle der Transformation .....	34
3.1.10 DNA Isolierung aus <i>E.coli</i> .....	35
3.1.11 DNA-Sequenzierung.....	35
3.2 Primäre neuronale Zellkultur.....	37
3.2.1 Vorbereitung der Zellkulturplatten und primäre neuronale Zellkultur .....	37
3.2.2 Transfektion primärer Cortexneuronen.....	38
3.2.3 Kotransfektion und Kokultivierung primärer Cortexneuronen .....	40
3.2.4 Kombiniertes Sauerstoff-Glukose Entzug (OGD).....	42
3.2.5 Evaluierung der Zellschädigung .....	42
3.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie.....	42
3.2.5.2 Thiazolblau (MTT)-Metabolismus .....	42

---

<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
4.1 Herstellung der NODD- bzw. CODD-Fusionsproteine.....	44
4.2 Etablierung der Nucleofector™ Technologie in primären Cortexneuronen .....	47
4.2.1 Vergleich verschiedener Transfektionsprogramme.....	48
4.2.2 Variationen der Zellmenge.....	50
4.2.2.1 Variation der Aussaatdichte .....	50
4.2.2.2 Variation der Zellmenge pro Transfektionsansatz.....	51
4.2.3 Variation der Plasmid-DNA Menge .....	52
4.2.4 Einfluss der verwendeten Zellkulturmedien .....	53
4.2.5 Vergleich der verwendeten Vektoren .....	54
4.3 Kotransfektion und Kokultivierung mit GFP und DsRed.....	58
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	60
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>62</b>
5.1 Transfektion primärer Cortexneuronen .....	62
5.2 Elektroporation zur Transfektion primärer Cortexneuronen .....	64
5.3 Problematik der Transfektion primärer Cortexneuronen .....	65
5.3.1 Primäre Cortexneuronen und Transfektionseffizienz .....	66
5.3.2 Einfluss der Plasmid-DNA auf die Transfektionseffizienz .....	67
5.3.3 Wirken Fusionsproteine in primären Cortexneuronen toxisch? .....	68
5.4 Kokultivierung und Kotransfektion mit eGFP und DsRed .....	69
5.5 Auswirkungen von Hypoxie auf die Genregulation .....	70
5.6 HIF-1 induziert Neuroprotektion in primären Neuronen .....	73
5.6.1 Neuroprotektion durch Induktion von HIF-1 Zielgenen .....	74
5.6.2 Neuroprotektion durch Inhibitoren der HIF-1 Prolylhydroxylasen .....	75
5.6.2.1 Neuroprotektion durch Transfektion der NODD/CODD-Domänen..	76
5.7 HIF-1 wirkt nicht neuroprotektiv .....	78
5.8 HIF-1 - ein sinnvoller therapeutischer Ansatzpunkt?.....	79
5.8.1 Inhibitoren der HIF-Prolylhydroxylasen.....	79
5.8.2 Präkonditionierung als therapeutischer Ansatzpunkt.....	81
5.8.3 Applikation von HIF-1 Zielproteinen.....	82

---

5.9 Potentielle Gefahren einer HIF-1 Induktion.....	83
5.10 Ausblick .....	84
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>107</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>108</b>

---

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Anglizismen

ADM	Adrenomedullin
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Aktivator-Protein
ARNT	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-nukleärer-Translokator
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2 associated X protein Pro-apoptotisches Gen der Bcl-2 Familie
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2 Prototyp eines anti-apoptotisches Gen der Mitochondrienmembran
Bcl-x <sub>L</sub>	B-cell lymphoma-extra large Anti-apoptotisches Gen der Bcl-2 Familie
bHLH	Basic-helix-loop-helix
BNIP 3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 Mitglied der BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein (BNIP) Familie
bp	Basenpaare
CA	cornu ammonis
c-DNA	zu einem Trankriptionsprodukt (mRNA) komplementäre DNA
COX-2	Cyclooxygenase 2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFO	Desferroxamin
d-H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
div	day in vitro Tag in vitro
DNA	deoxyribonucleic acid Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure

---

Dsred	<i>Discosoma sp.</i> red fluorescent protein
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EPO	Erythropoietin
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GLUT	Glukosetransporter
HER	hypoxia response element Hypoxieantwortelement
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1
HK	Hexokinase
HO-1	Hämoxygenase 1
IAP-2	Inhibitors of apoptosis protein-2
IGF	insulin growth factor Insulin-Wachstumsfaktor
IGFBP	insulin growth factor binding protein Insulin-Wachstumsfaktor-Bindungsprotein
iNOS	inducible nitric oxide synthase induzierbare Stickoxid Synthetase
Insert	Insertierte DNA-Sequenz
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
MCAO	middle cerebral arteria occlusion Arteria cerebri media Verschluss
MCS	Multiple Cloning Site
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse-Transkriptase
mRNA	messenger RNA
MT	Mutante
MW	Mediumwechsel



---

NGF	nerve growth factor Nervenwachstumsfaktor
NMED	Neurobasales Medium
NO	Stickoxid
NOS-2	Nitric oxide synthase Stickoxidsynthetase
ODDD	oxygen dependent degradation domain Sauerstoff-abhängige-Degradierungs-Domäne
OGD	oxygen-glucose deprivation Sauerstoff-Glukose Entzug
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	phosphat buffered saline phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction Polymerase Kettenreaktion
PHD	prolyl hydroxylase domain containing protein Prolylhydroxylasedomäne enthaltendes Protein
PK	Pyruvatkinase
Primer	Startoligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
pVHL	Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein
RNA	ribonucleic acid Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RBX 1	RING-H <sub>2</sub> Protein Ring-Box 1
rt-PA	recombinant tissue plasminogen activator gentechnisch hergestellte Alteplase
TAD	Transaktivierungs-Domäne
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin

---

Tf	Transferrin
TF	Transkriptionsfaktoren
TfR	Transferrinrezeptor
TGF	transforming growth factor Transformationswachstumsfaktor
TIA	transitorische ischämische Attacke
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan
UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor Vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor
WT	Wildtyp

## **1 Einleitung**

### **1.1 Schlaganfall**

Der Schlaganfall zählt zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland, in der deutschen Todesursachenstatistik belegt er mit 3,3% Platz fünf (Statistisches Bundesamt, 2007). Schlaganfall ist die häufigste Ursache dauerhafter Behinderung. Knapp ein Drittel der Patienten, die einen Schlaganfall überleben, bleiben schwer behindert. Trotz eingehender neurologischer Rehabilitation sind sie berufs- und erwerbsunfähig, damit ist der Schlaganfall in den westlichen Industrieländern die aus medizinisch-ökonomischer Sicht teuerste Krankheit (Berlit, 2000). Da die Zahl der Neuerkrankungen mit zunehmendem Lebensalter drastisch ansteigt, ist bei derzeit sinkender Mortalität und der Veränderung der gesellschaftlichen Altersstruktur mit einer Zunahme der Schlaganfall-Prävalenz und Inzidenz bis zum Jahr 2020 bei beiden Geschlechtern zu rechnen (Struijs et al., 2005). Im Jahr 2050 wird die Mortalität durch Schlaganfall bei Frauen in der Altersgruppe der über 85 jährigen um 30% höher sein als bei Männern (Reeves et al., 2008).

Ein Schlaganfall kann durch eine Blutung als sogenannter hämorrhagischer Infarkt (15% der Fälle), oder durch ein Sistieren der Blut- und damit Sauerstoffversorgung im Gehirn entstehen. Dieser wird als ischämischer Infarkt bezeichnet und umfasst 85% der Schlaganfälle.

Die kausal wirkende Therapie des akuten ischämischen Infarkts ist die systemische Thrombolyse mit der bis 4,5 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome begonnen werden muss (gemäß aktualisierten Leitlinien der deutschen Schlaganfall-Gesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 05.2009). Diese Therapie kann jedoch aufgrund des kurzen Zeitfensters und weiteren Ausschlusskriterien nur bei vergleichsweise wenigen Patienten durchgeführt werden. Alle anderen Schlaganfallpatienten können durch eine sogenannte Basistherapie, d.h. eine Optimierung des Blutdrucks, des Blutzuckers, der Körpertemperatur und durch Komplikationsprävention bzw. -Therapie unterstützend behandelt werden (Warlow et al, 2003). Frühe Sekundärprävention und der frühzeitige Beginn von begleitender Physio- und Ergotherapie sowie Logopädie verbessern die Prognose der Patienten.

Um zu neuen Möglichkeiten der neuroprotektiven und regenerativen Therapien des Schlaganfalls zu gelangen, konzentriert sich die Schlaganfallforschung auf die ablaufenden pathophysiologischen Schadens- und Regenerationsmechanismen, welche der zerebralen Ischämie zugrunde liegen.

## **1.2 Zerebrale Ischämie**

Das Gehirn wird ständig von 15% des Herzminutenvolumens durchströmt und ist auf kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff und Glukose angewiesen. Es verbraucht 20% des gesamten Sauerstoffbedarfs des Körpers. Unter Ruhebedingungen wird der Energiebedarf des Gehirns ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung gewonnen. Bei einer Unterbrechung der Substratzufuhr aufgrund von Minderdurchblutung erleidet das Gehirn innerhalb weniger Minuten reversible funktionelle, oder irreversible strukturelle ischämische Schäden, da durch anaerobe Glykolyse nicht genügend Energie zur Versorgung des Gehirns produziert werden kann und das Gehirnparenchym fast keine Sauerstoff- und Glukosevorräte besitzt. Es gibt zwei unterschiedliche Formen der zerebralen Ischämie, die sich durch die Art der Gewebsschäden und durch ihre Ursachen unterscheiden: die globale zerebrale Ischämie und die fokale zerebrale Ischämie. Beide Formen der Ischämie können sowohl permanent als auch transient auftreten. Globale Ischämie tritt bei Patienten auf, die nach einem Herzstillstand erfolgreich reanimiert wurden. Fokale zerebrale Ischämie wird durch regionale Gefäßverschlüsse verursacht.

Sowohl Ischämie als auch Hypoxie des Gehirns sind potentiell lebensbedrohliche Notfälle, die Reaktionen des Organismus auf zellulärer und systemischer Ebene erfordern.

### **1.2.1 Globale zerebrale Ischämie**

Bei einer globalen zerebralen Ischämie ist die Blutzufuhr zum gesamten Gehirn eingeschränkt. Die häufigste Ursache hierfür ist der schwere kardiogene Schock bzw. Herzstillstand (Hossmann, 2001). Die komplette Unterbrechung des Blutflusses führt innerhalb von Sekunden zu Bewusstlosigkeit und nach 30-40 Sekunden zum Sistieren der hirnelektrischen Aktivität. Ist die Blutzufuhr für mehr als zehn Minuten unterbrochen, folgt in der Regel der Hirntod des Patienten (Safar, 1993). Die

extreme Abhängigkeit von ununterbrochener Substratzufuhr und dem Abtransport der Stoffwechselprodukte verlangt, dass die Gehirndurchblutung in sehr engen Grenzen konstant gehalten wird. Die 'kritische Sauerstoffkonzentration des Gewebes', die bestimmt, wann ein Gewebe hypoxisch wird, hängt von gewebsspezifischen Faktoren wie Sauerstoffbedarf, Sauerstoffverfügbarkeit und aeroben Kapazitäten ab. Der Abfall des Blutflusses bei einer globalen zerebralen Ischämie verursacht einen Gewebsschaden, dessen Ausmaß von der Ischämieschwelle der Zellen und der jeweiligen Gehirnregion abhängt. Dieses Phänomen wird verzögerte selektive Vulnerabilität genannt (Pulsinelli, 1985). Der Zelltod tritt zwei bis sieben Tage nach erfolgter Reperfusion auf. Bei der Ratte, welche als Modellorganismus gilt, werden als erstes die sehr empfindlichen CA-1 (cornu ammonis)-Neuronen im Ammonshorn des Hippocampus geschädigt, die bereits nach fünf Minuten globaler Ischämie sterben (Schmidt-Kastner und Freund, 1991). Durch die fortschreitende Entwicklung auf dem Gebiet der Intensiv- und Notfallmedizin überleben immer mehr Menschen einen Herzstillstand und müssen danach mit den Folgen der globalen Ischämie, wie Lähmungen, kognitiven oder sprachlichen Defiziten zurechtkommen (Plum, 1991; Gustafson et al, 1992).

### **1.2.2 Fokale zerebrale Ischämie – ischämischer Schlaganfall**

Als ischämischer Schlaganfall wird ein akutes fokal-neurologisches Defizit aufgrund einer umschriebenen Durchblutungsstörung des Gehirns bezeichnet. Ist der Durchfluss einer Hirnarterie durch einen Thrombus oder Embolus unterbrochen oder behindert, führt dies zu permanenten oder vorübergehenden fokalen Perfusionsausfällen. Um diese Art des Schlaganfalls von einem hämorrhagischen Infarkt abzugrenzen wird der Begriff 'ischämischer Schlaganfall' verwendet. Risikofaktoren des ischämischen Schlaganfalls sind insbesondere arterielle Hypertonie, koronare Herzerkrankung, Rauchen und Diabetes mellitus (Gorelick, 1995). Der Zelltod bei fokaler zerebraler Ischämie betrifft alle Zelltypen (Neuronen, Glia, Endothelzellen, glatte Muskelzellen) des ischämischen Areals und tritt akut auf, d.h. innerhalb von Stunden bis maximal einem Tag nach dem ischämischen Ereignis (Garcia, 1992).

### 1.2.3 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Da das Gehirngewebe einen hohen Bedarf an Sauerstoff und Glukose hat, kommt es nach einer Perfusionsunterbrechung innerhalb von Minuten zu einem Substratmangel und zur Ansammlung toxischer Stoffe. Die daraus folgenden Energieverluste führen zum Zusammenbrechen der Membranpotentiale, zum Sistieren der Stoffwechselprozesse und innerhalb von Minuten zur akuten Nekrose von Zellen und Gewebe im Infarktkern (Meisel et al., 2005). Die rasche Dekompensation der Energiezufuhr ist für die 'schlagartig' auftretende neurologische Symptomatik der zerebralen Ischämie verantwortlich (Hossmann, 2001). Durch die metabolischen Veränderungen läuft im Gehirn eine pathophysiologische Stoffwechselkaskade ab, deren vier hauptsächliche Schadensmechanismen Exzitotoxizität, Perinfarktdepolarisation, Entzündung und programmierter Zelltod (Apoptose) nacheinander ablaufen (Dirnagl et al., 1999). Abhängig von der Dauer und dem Ausmaß des Perfusionsausfalls kann es neben funktionellen Schäden auch zu strukturellen Schäden kommen.

Besondere Bedeutung in der Erklärung der pathophysiologischen Zusammenhänge der zerebralen Ischämie hat das dynamische Konzept der Penumbra erlangt. Die Penumbra (aus dem Lateinischen *paenes* und *umbra* Halbschatten) bezeichnet eine Art Grenzzone, die sich um das Infarktgebiet herum ausbildet. Diese ist unter anderem vom Ausmaß der regionalen Durchblutungsminderung, dem Ort des Gefäßverschlusses, dem Status der Kollateralenblutgefäße und der Dauer des Perfusionsdefizits abhängig. In der Penumbra ist die Perfusion auf 20-50% des normalen Blutflusses abgesunken, so dass der Funktionsstoffwechsel gestört ist, jedoch noch keine irreversiblen strukturellen Schäden eintreten (Hossmann, 1994; Tamura et al., 1981). Aufgrund der erhaltenen Restperfusion durch Kollateralgefäße wird in diesem Gebiet die akute Zerstörung der zellulären Integrität verhindert. Durch eine rechtzeitige Therapie kann der Funktionsverlust in der Penumbra reduziert werden. Unterschreitet der zerebrale Blutfluss jedoch die Ischämieschwelle, kommt es zum nekrotischen Funktions- und Strukturverlust wie im Infarktzentrum selbst. Bei einem länger andauerndem Sauerstoffmangel wird in der Penumbra die Energiegewinnung vom aeroben Zitronensäurezyklus auf anaerobe Glykolyse (Pasteur Effekt) umgestellt. Die mit dem anaeroben Stoffwechsel einhergehende

Azidose bedingt eine Schwellung des Hirngewebes und ist so mitverantwortlich für das Entstehen eines Hirnödems. Das Ödem und die daraus resultierende Stoffwechselfkaskade führen zu strukturellen Organschäden.

### **1.2.3.1 Exzitotoxizität**

Durch den verminderten Transport von Nährstoffen insbesondere von Sauerstoff und Glukose kommt es zu Energiedefiziten, die zum Verlust des Membranpotentials und zur Depolarisation der Neuronen führen (Katsura et al., 1994).

Diese Depolarisation aktiviert spannungsabhängige Kalziumkanäle und führt zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und zur Ansammlung exzitotoxischer Transmitter im extrazellulären Raum. Durch Ansammlung dieser Transmitter insbesondere von Glutamat, kommt es zur Störung des Ionengleichgewichts und zum Diffusionsausgleich durch Wasser. Das passiv in die Zellen einströmende Wasser führt zum Ödem und osmotischer Zellyse und trägt zur Entstehung eines zytotoxischen Hirnödems bei. Dies stört die Perfusion der umgebenden Region, steigert den Hirndruck, komprimiert die Hirngefäße und kann zur Herniation führen (Dirnagl et al., 1999).

Durch die Überladung mit Kalzium, Natriumionen und Adenosindiphosphat (ADP) in den ischämischen Zellen kommt es zur unspezifischen Induktion von vielen Enzymsystemen, die unter anderem in der Bildung freier Sauerstoffradikale endet (Lo et al., 2003). Diese reagieren mit einer Vielzahl zellulärer Bestandteile und fördern so die Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose) sowie inflammatorischer Reaktionen und tragen schließlich zum Untergang des Hirngewebes bei (Dirnagl et al., 1999).

### **1.2.3.2 Periinfarktdepolarisation**

Durch die exzitotoxische bzw. anoxische Depolarisation der Zellen erhöhen sich zunächst im Infarktkern die extrazelluläre Konzentration von Kalium und Glutamat. Diese diffundieren in die Penumbra und lösen dort exzitotoxische Depolarisationen weiterer Neuronen und Glia aus, welche wiederum Kalium und Glutamat ausschütten. Dies führt zu einem Fortschreiten der Depolarisationswelle vom ischämischen Herd und wird als Periinfarktdepolarisation bezeichnet (Nedergaard und Hansen, 1993; Back et al., 1994). Solche repetitiven Periinfarktdepolarisationen

finden mehrmals pro Stunde statt und halten für mindestens sechs bis acht Stunden an. Mit steigender Zahl von Depolarisation und Repolarisation wächst auch der Infarktschaden durch weiteren Energieverbrauch und metabolischen Stress (Hossmann, 1996).

### 1.2.3.3 Entzündung und Apoptose

In Folge der Perfusionsminderung kommt es innerhalb von Stunden zu einer inflammatorischen Reaktion. Aktivierte Leukozyten, Neuronen und Gliazellen produzieren Zytokine und Chemokine wie den Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 und -6. Weiterhin kommt es zur Expression von verschiedenen Enzymen, wie z.B. der Cyclooxygenase-2 (COX-2), die entscheidend in der inflammatorischen Phase und der Schädigung des ischämischen Gewebes sind (Dirnagl et al., 1999).

Innerhalb von Tagen bis Wochen nach transienter globaler Ischämie lässt sich in der Penumbra einer fokalen zerebralen Ischämie Apoptose als vorherrschender Schadensmechanismus nachweisen. Im Infarktkern hingegen kommt es meist zum schnellen neuronalen bzw. glialen Zelltod, der Nekrose. Durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration, freie Sauerstoffradikale, Glutamat und DNA-Schäden kommt es zur Zerstörung der Mitochondrienmembran und zur Aktivierung von verschiedenen Proteasen, den sogenannten Caspasen. Die Caspasen nehmen eine zentrale Stellung in der Vermittlung der Apoptose ein (Lo et al., 2003).

Vermutlich bestimmt das molare Verhältnis von pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Genfamilie, ob Zellen einen apoptotischen Stimulus überleben oder nicht (Yin et al. 1995). Über komplexe Kaskaden kommt es sowohl zur Induktion von Genen, welche die Apoptose unterdrücken (z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, IAP-2) und somit Neuronen vor einem verzögerten Zelltod schützen, als auch von solchen, welche die Apoptose fördern (z.B. Bax, BNIP 3, p53). Durch Auslösung der Apoptose können Zellen noch Tage nach der Ischämie und Reperfusion sterben (Farlie et al., 1995; Garcia et al., 1995).

### 1.2.4 Schlaganfallmodelle

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, zerebralen Sauerstoffmangel im Modell zu simulieren. Eines der gängigsten *in vivo* Modelle ist die operative Okklusion der



extra- oder intrakraniellen Arterien. Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie konnten u.a. bei Ratten (Brint et al., 1988; Zea Longa et al., 1998) und Mäusen (Huang et al., 1998; Endres et al., 1998) etabliert werden. Eines der häufig eingesetzten Modelle in diesem Bereich ist das Filamentmodell der Maus, bei welchem zum Gefäßverschluss ein Faden in die Arteria cerebri media eingebracht und nach erfolgter Okklusion wieder entfernt wird (Kuroyangi et al., 1994).

Im Bereich der Zellkultur wurde von Choi und Kollegen Anfang der 1990er Jahre das Verfahren des kombinierten Sauerstoff-Glukose Entzugs (oxygen-glucose deprivation, OGD) entwickelt (Goldberg und Choi 1990, 1993). Kortikale neuronale Zellkulturen werden dabei vorübergehend in desoxygeniertem, glukosefreiem Medium inkubiert. So wird *in vitro* ein ischämischer Schlaganfall simuliert, bei dem sowohl Sauerstoff- als auch Glukosemangel im Gehirn herrschen. Das ursprüngliche Modell wurde mittlerweile erweitert und modifiziert (Bruer et al., 1997; Ruscher et al., 1998; Kalda et al., 1998).

### 1.3 Ischämietoleranz – Präkonditionierung

Ischämietoleranz oder ischämische Präkonditionierung sind zwei synonym verwendete Begriffe, die eingeführt wurden den folgenden beobachteten Mechanismus am Gehirn zu beschreiben: Ein kurzer metabolischer, ischämischer oder physikalischer Stimulus kann das Gehirn vor einem darauffolgenden länger dauernden ischämischen Ereignis schützen. Ohne die ischämische Präkonditionierung wäre die zweite Ischämie tödlich (Chen und Simon, 1997).

In Analogie zu den von Janoff bereits 1964 eingeführten Begriffen *Präkonditionierung* und *Toleranz* wurde das Phänomen, welches 1986 durch Schurr et al. auch in Gehirngewebe *in vitro* beschrieben wurde, als ischämische Präkonditionierung bezeichnet. Die ischämische Präkonditionierung kann durch verschiedene Stimuli induziert werden: mittels fokaler und globaler zerebraler Ischämie (Kitagawa et al., 1990; Stagliano et al., 1999), Entzündung (Zimmermann et al., 2001), Hypothermie oder Hyperthermie (Chopp et al., 1989; Nishio et al., 2000) sowie durch Hemmung von Stoffwechselprozessen und freien Sauerstoffradikalen (Wiegand et al., 1999). Studien mit Patienten, die vor einem Schlaganfall eine transitorische ischämische Attacke (TIA) erlitten haben, konnten Hinweise darauf

geben, dass ischämische Präkonditionierung auch bei Menschen existiert (Weih et al., 1999).

Nach Stimulation kann die Ischämietoleranz in zwei Zeitfenstern beobachtet werden: in einer frühen und einer verzögerten Phase.

### **1.3.1 Ischämietoleranz der frühen Phase - Klassische Präkonditionierung**

Das erste Zeitfenster, welches als sogenannte klassische Präkonditionierung bezeichnet wird, kann innerhalb von Minuten bis zu wenigen Stunden nach dem Stimulus beobachtet werden. Das zweite Zeitfenster, welches als verzögerte Präkonditionierung bezeichnet wird, hat ihr Maximum zwei bis vier Tage nach dem ischämischen Insult (Kitagawa et al., 1990). Die frühen Signalwege der klassischen und der verzögerten Präkonditionierung sind wahrscheinlich ähnlich, jedoch läuft die frühe Phase unabhängig von der Proteinsynthese ab.

### **1.3.2 Ischämietoleranz der verzögerten Phase**

Bei der verzögerten Präkonditionierung ist eine *de-novo* Proteinsynthese und somit eine Genexpressionsänderung beteiligt. Dabei kann vermutet werden, dass neuroprotektive Proteine vermehrt und potentiell schädliche Proteine vermindert exprimiert werden. Die Ischämietoleranz der verzögerten Phase ist in drei Phasen einteilbar: die Induktions-, Transduktions- und Effektorphase. Während der Induktionsphase entstehen Stoffwechselprodukte, die als Antwort auf das ischämische Ereignis gebildet werden. Diese werden als Trigger bezeichnet und versetzen die Zelle in „Alarmbereitschaft“, um Abwehrmechanismen des Organs zu aktivieren. Als bekannte Trigger gelten Glutamat, Adenosin, Stickoxid, freie Radikale des Sauerstoffs und verschiedene Rezeptoren (Kato et al., 1992; Grabb und Choi, 1999; Schumann P. et al., 1998; Wiegand et al., 1999; Gonzalez-Zulueta et al., 2000). In der zweiten Phase der Präkonditionierung wird das Signal in eine physiologische Antwort übersetzt, was als Transduktion bezeichnet wird. Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, parakrine und autokrine Mediatoren und *immediate early genes* sind in dieser Phase Ausschlag gebend (Shamloo et al., 1999). Diese können direkt oder indirekt Transkriptionsfaktoren, wie z.B. den nuklearen-Faktor-kappa-B (NFκB) (Blondeau et al., 2001), den hypoxia-inducible factor bzw. Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 (HIF-1) (Bergeron et al., 2000) und

Mitglieder der Activator Protein-1 (AP-1) Familie aktivieren (Kapinya et al., 2000). In der dritten Phase (Effektorphase) kommt es zwei bis fünf Tage nach Stimulierung zur Expression von Molekülen, welche unmittelbar protektiv wirken, wie anti-inflammatorische, anti-apoptotische oder anti-oxidative Proteine (Barone et al., 1998). Diese Mechanismen sind die molekulare Basis der ischämischen Präkonditionierung. Ein kausaler Zusammenhang zwischen Proteinexpression und ischämischer Toleranz ist bisher noch nicht gesichert, aber für die vermehrte Expression von HIF-1 und dessen Zielgene postuliert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass globale zerebrale Ischämie das Gehirn von neugeborenen und erwachsenen Nagetieren schützt und HIF-1 vermehrt nachgewiesen werden kann (Bergeron et al., 1999; Bernaudin et al., 2002; Prass et al., 2003). Auch im *in vitro* Modell konnte gezeigt werden, dass durch kombinierten Sauerstoff-Glukose Entzug die HIF-1 Expression ansteigt und dieser Transkriptionsfaktor eine zentrale Bedeutung bei der Realisierung genetischer Informationen im Zusammenhang mit ischämischer Präkonditionierung hat (Ruscher et al., 1998).

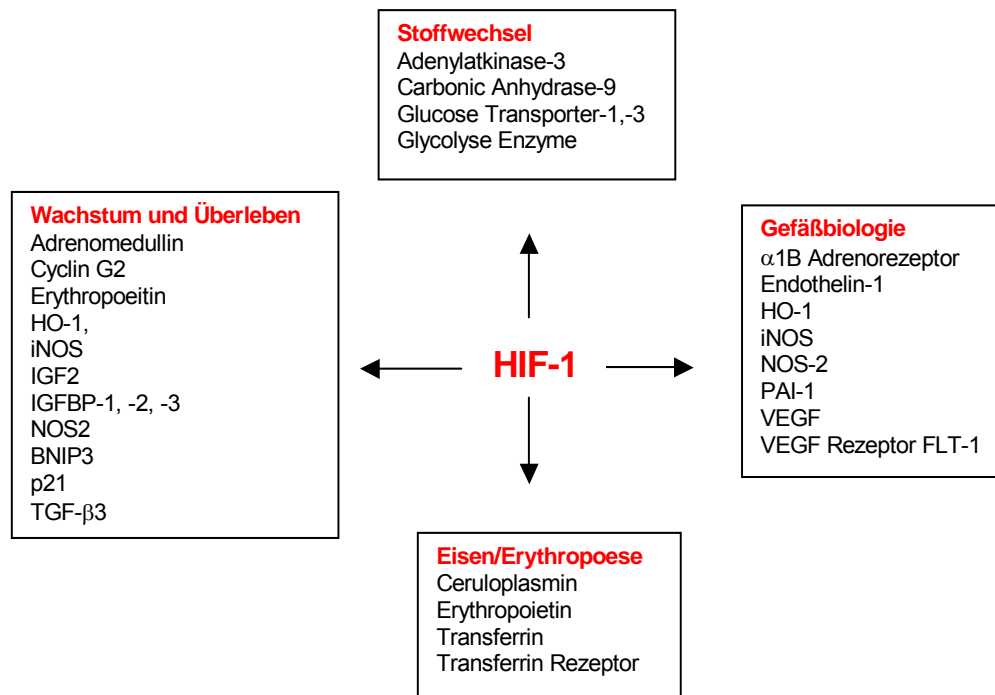
### 1.3.3 Mediatoren der ischämischen Präkonditionierung

Viele Signalkaskaden der ischämischen Präkonditionierung, die den Organismus an Sauerstoff-Mangelzustände anpassen, werden auf transkriptioneller Ebene durch HIF-1 geregelt (Wang et al., 1995b). Entsprechend der Theorie der ischämischen Toleranz werden protektive Gene infolge der Präkonditionierung hochreguliert und schadensinduzierende Gene inaktiviert.

HIF-1 wurde vor mehr als 30 Jahren im Zusammenhang mit dem Hormon Erythropoietin (EPO) entdeckt. Dieses Hormon unterliegt der hypoxieinduzierten Transkription und wird bei Sauerstoffmangel vermehrt von den Nieren gebildet, stimuliert die Erythrozytenproliferation und erhöht damit die Sauerstofftransportkapazität im Blut (Goldberg et al., 1988; Semenza et al., 1991).

HIF-1 ist einer der zentralen Sensoren für Sauerstoffmangel und kann u.a. Gene aktivieren, die dazu dienen Sauerstoff-Transport zu verbessern, Glykolyse zu aktivieren, Stoffwechselprozesse an reduzierten Sauerstoffgehalt anzupassen und Gefäßneubildung zu fördern. Dies geschieht u.a. mit Hilfe der Genexpression des vascular endothelial growth factor, bzw. Vaskulo-endotheliale Wachstumsfaktor

(VEGF), Erythropoietin (EPO), Glukosetransporter (GLUT-1, -3), Phosphofruktokinase, oder Laktatdehydrogenase (siehe hierzu Abbildung 1) (Jones et al., 2001; Bernaudin et al., 2002; Prass et al., 2003; Sakanga et al., 1998).



Semenza, 2001

**Abb. 1:** Auswahl an Genen, die durch den Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) reguliert werden, aufgeteilt nach ihrer Funktion im Organismus. Abkürzungen der einzelnen Gene siehe Abkürzungsverzeichnis.

Derzeit sind über 70 Gene bekannt, die neben EPO durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 aktiviert werden, wobei möglicherweise noch weitere hinzu kommen (Wenger et al., 2005). HIF-1 wurde in allen Spezies der Vielzeller entdeckt, von *Caenorhabditis elegans* bis zum *Homo sapiens*, was ein wichtiges Argument für die zentrale Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-1 in der Evolution von Vielzellern darstellt (Semenza, 2004). HIF-1 defiziente Mäuse versterben schon embryonal an Neuralrohrdefekten, Mangel an Blutgefäßen und kardiovaskulären Fehlbildungen. Dies verdeutlicht, dass Gene, welche durch diesen Transkriptionsfaktor aktiviert werden, von essentieller Bedeutung sind (Iyer et al., 1998; Semenza, 2000).

Sauerstoffmangel (Hypoxie) kann entweder chronischer oder akuter Art sein. Bei akutem Sauerstoffmangel (Sekunden bis Minuten) kommt es zu Änderungen des Redoxzustandes oder der Phosphorylierung bereits existierender Proteine und damit

zu einer Aktivitätsänderung. Bei chronischem Sauerstoffmangel kommt es zu einer Änderung der Genexpression. Für diese Expressionsänderung ist auf molekularer Ebene der Transkriptionsfaktor HIF-1 zuständig (als Review: Hirota und Semenza, 2005).

#### **1.4 HIF-1 – der zentrale molekulare Sauerstoffsensor im Gehirn**

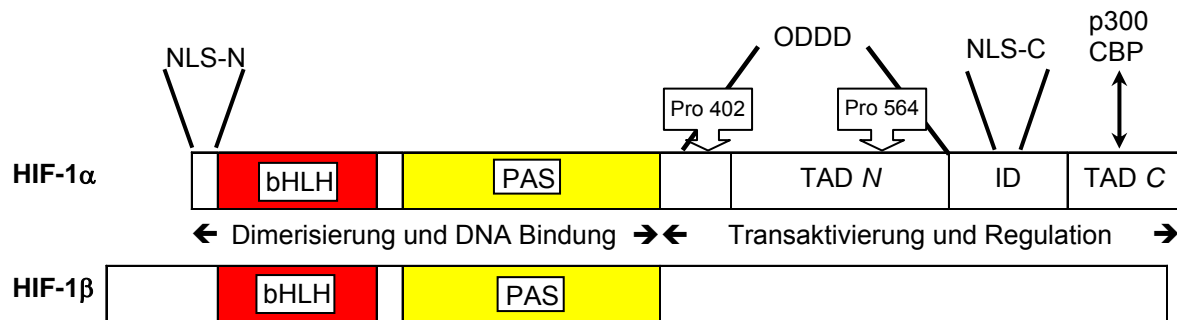
Um den funktionellen und strukturellen Stoffwechsel des Gehirns aufrecht zu erhalten, ist eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und Glukose nötig. Neben der Fähigkeit des Gehirns, durch Autoregulation dem niedrigen Blutfluss bei Hypoxie entgegen zu wirken (Siesjö, 1978), ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 für die Adaptation an reduzierte Sauerstoffkonzentrationen im Gehirn von Bedeutung.

Bei adulten Ratten wurde HIF-1 in allen Teilen des Gehirns in Neuronen gefunden (Bergeron et al., 1999). Bei neugeborenen Ratten hingegen konnte HIF-1 hauptsächlich in der Hippocampus Region und im zerebralen Cortex nachgewiesen werden (Bergeron et al., 2000). Studien zu fokaler oder globaler Ischämie, neonataler Hypoxie, bzw. Ischämie konnten zeigen, dass es zu einer Genexpressionsänderung durch HIF-1 kommt (Sharp und Bernaudin, 2004; Chavez und LaManna, 2002). Mit der Expression der Zielgene EPO (Sakanga et al., 1998) und VEGF (Jin et al., 2000) konnten bereits indirekt die neuroprotektiven und Hypoxie regulierenden Eigenschaften von HIF-1 bestätigt werden. Da HIF-1 nicht unmittelbar nach einer Ischämie in hohem Maße in Neuronen exprimiert wird, vermutet man, dass ein kumulativer Effekt einer mäßigen Ischämie oder Hypoxie nötig ist, um die HIF-1 Genexpression zu aktivieren (Kietzmann et al., 2001).

##### **1.4.1 Struktur und Funktion von HIF-1**

HIF-1 ist ein Heterodimer aus einer 120 kDa schweren  $\alpha$  Untereinheit und einer 91-94 kDa schweren  $\beta$  Untereinheit (Wang et al., 1995a; Wang und Semenza 1995b). Der Transkriptionsfaktor besteht aus einer *basic helix-loop-helix* (bHLH) Struktur und ist aus der Familie der PER-ARNT-SIM (PAS) Transkriptionsfaktoren. Die bHLH befindet sich am Amino (N)-terminalen Ende von HIF-1 $\alpha$  und ist für die Bindung der DNA an hypoxia-response elements bzw. Hypoxie Antwortelementen (HREs) in Promotoren Sauerstoff-abhängiger Gene zuständig.

Beide Untereinheiten von HIF-1 besitzen jeweils eine PAS-Domäne, welche zur Heterodimerisierung zwischen den beiden Untereinheiten und zur DNA-Bindung notwendig sind (Jiang et al., 1996a). Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau von HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ .



**Abb. 2:** Struktur von HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1). Dargestellt sind die beiden Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  mit jeweils einer basic-helix-loop-helix (bHLH) und einer Per-Arnt-Sim (PAS) Domäne; außerdem die carboxy- und aminoterminalen Transaktivierungs-Domänen (TAD C und TAD N), die oxygen dependent degradation domain (ODDD), das carboxy- und aminoterminal nucleare localization signal (NLS) und die transcriptional inhibitor domain (ID). Transkriptions Koaktivatoren wie CBP und p300 interagieren mit der TAD C-Region. Hervorgehoben sind die beiden spezifischen Prolinreste Pro 402 und Pro 564 (modifiziert nach Semenza, 2000).

HIF-1 $\beta$  ist ein konstitutiv exprimiertes Protein, welches ursprünglich als Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-nukleärer Translokator (ARNT) identifiziert wurde. HIF-1 $\beta$  reagiert zwar nicht wie HIF-1 $\alpha$  auf Änderungen im Sauerstoffgehalt, ist jedoch essentiell für die Funktion von HIF-1 (Wang et al., 1995a). HIF-1 $\alpha$  wird ständig gebildet, jedoch bei normaler Sauerstoffkonzentration sofort wieder abgebaut und ist deshalb in normoxischen Zellen kaum detektierbar. Die Anzahl der HIF-1 $\alpha$  Moleküle steigt exponentiell in Zellen, die einer Sauerstoffkonzentration von unter sechs Prozent ausgesetzt sind (Jiang et al., 1996b).

Am carboxyterminalen Ende von HIF-1 $\alpha$  befinden sich notwendige Informationen für Transaktivierung und Regulation in den sogenannten Transaktivierungs-Domänen (TADs). Diese werden über post-translationale Hydroxylierung und Phosphorylierung reguliert. Zur Aktivierung der Transkription interagieren diese Transaktivierungs-Domänen (TADs) mit Koaktivatoren wie dem CRE Bindungsprotein CBP/p300 (CREB, cyclic-AMP-response element binding protein), dem Steroid-Rezeptor-Koaktivator SRC-1 oder dem transcriptional intermediary factor TIF2 (Carrero et al.,

2000). Die TAD-N befindet sich zwischen Aminosäure 531-575 und überlappt so mit der ODD-Domäne, die zwischen Aminosäure 401 und 603 liegt. Die TAD-C liegt zwischen Aminosäure 786 und 826 (siehe hierzu Abbildung 2) (Jiang et al., 1997; Pugh et al., 1997).

Die oxygen dependent degradation domain bzw. die Sauerstoff-abhängige-Degradierungs-Domäne (ODDD) ist für den Sauerstoff-abhängigen Abbau von HIF-1 $\alpha$  zuständig (Wenger, 2002). Innerhalb der ODDD sind zwei Prolin Aminosäuren, die in der humanen HIF-1 $\alpha$  Untereinheit die Position 402 (Masson und Willam, 2001) und 564 haben (Jaakkola et al., 2001; Ivan et al., 2001) besonders wichtig für die Regulation von HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  hat außerdem C- und N- ständige Nuclear-localisation-signals, welche dem Protein eine selbständige Translokation in den Zellkern ermöglichen (Fatyol et al., 2001).

Ergänzend soll erwähnt werden, dass von HIF-1 $\alpha$  Isoformen existieren. Von der  $\alpha$  Untereinheit des Menschen, der Ratte und der Maus konnten zwei weitere Isoformen kloniert werden: HIF-2 $\alpha$  (Hogenesch et al., 1997; Kietzmann et al., 2001) und HIF-3 $\alpha$ , die aber im Gegensatz zu HIF-1 $\alpha$  einem begrenzten Expressionsmuster unterliegen (Gu et al., 1998; Kietzmann et al., 2001).

#### 1.4.2 Regulation von HIF-1 durch Sauerstoff

HIF-1 $\alpha$  und  $\beta$  werden kontinuierlich gebildet, wobei die HIF-1 $\alpha$  Einheit nur während Hypoxie stabil bleibt und damit präzise durch die zelluläre Sauerstoff-Konzentration reguliert wird (Salceda und Caro, 1997). Der Transkriptions-Komplex aus HIF-1 $\alpha$  und  $\beta$  kann sich während Normoxie nicht ausbilden, da HIF-1 $\alpha$  eine Halbwertszeit von weniger als fünf Minuten hat (Huang et al., 1998) und unter Normoxie ubiquitiniert d.h. gekennzeichnet wird für den proteasomalen Abbau. Für diesen Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg ist der 202 Aminosäuren lange ODDD Abschnitt der HIF-1 $\alpha$  Kette zuständig (Huang et al., 1998; Sutter et al., 2000). Zwei von einander unabhängige Prolinreste: Prolinrest 402, der sich im C- terminalen Teil (CDDD, Aminosäure 548-582) und Prolinrest 564, der sich im N-terminalen Teil (NODD, Aminosäure 343-417) der ODDD befindet. Diese beiden Prolinreste werden dazu Sauerstoff-abhängig hydroxyliert, (Masson et al., 2001) von sogenannten prolyl-hydroxylase domain containing proteins (PHDs) (Jaakkola et al., 2001; Epstein

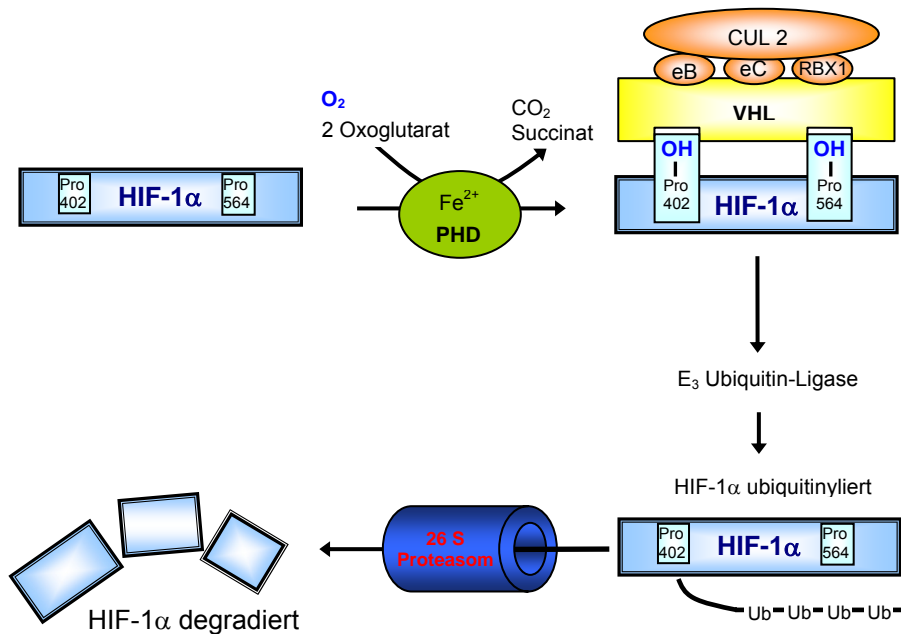
et al., 2001; Ivan et al., 2001), die zu der großen Familie der 2-Oxoglutarat abhängigen Oxygenasen gehören. Diese hydroxylieren HIF-1 $\alpha$  im Zytoplasma und im Zellkern mit Hilfe des essentiellen Kofaktors Eisen und den beiden Kosubstraten 2-Oxoglutarat und Sauerstoff (als Review: Hegg und Que, 1997; Schofield und Zhang, 1999). Ascorbinsäure ist notwendig, um die schnelle Inaktivierung der beteiligten Enzyme durch Eigenoxidation zu verhindern (Ivan et al., 2002). Da Sauerstoff als essentielles Kosubstrat für die Aktivität der PHDs limitierend wirkt, liegt hier die molekulare Basis für die Regulation von HIF-1 $\alpha$  durch die zelluläre Sauerstoffkonzentration (Semenza, 2001; Epstein et al., 2001). Die PHDs übertragen zur Hydroxylierung ein Sauerstoffatom auf die beiden Prolin-Reste 402 und 564. Diese Prolin-Reste befinden sich in einer L-X-X-L-A-P Aminosäure-Sequenz (wobei L für Leucin, A für Alanin, P für Prolin und X für eine beliebige Aminosäure steht) (Mole et al., 2001; Masson et al., 2001; Min et al., 2002). Ein weiteres Sauerstoffatom reagiert mit 2-Oxoglutarat zu Succinat und Kohlendioxid. Das katalytische Zentrum enthält Fe (II) Ionen, die durch zwei Histidine und einen Aspartat-Rest koordiniert sind (siehe hierzu Abbildung 3).

Die Hydroxylierung löst eine Konformationsänderung aus, woraufhin das von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein (pVHL) an HIF-1 $\alpha$  binden kann (Epstein et al., 2001; Masson et al., 2001). Das von Hippel-Lindau Protein ist die Erkennungsregion des Multiprotein E3 Ubiquitin Ligase Komplexes (VHLE3). Um HIF-1 $\alpha$  proteasomal abzubauen, müssen noch weitere Faktoren wie Elongin B und C (Kibel et al., 1995), Cullin 2 (Pause et al., 1997) und RBX 1 (RING-H2 Protein Ring-Box 1) (Iwai et al., 1999) an pVHL binden. Gemeinsam mit pVHL wird dieser Zusammenschluss als VHLE3 Multiprotein E3 Ubiquitin Ligase Komplex bezeichnet (als Review: Kondo und Kaelin, 2001). Die durch diesen Komplex ausgelöste Ubiquitinierung markiert HIF-1 $\alpha$  für den Abbau durch das 26S-Proteasom (Maxwell et al., 1999). Dieser Ubiquitin-Proteasom Abbau ist in der gesamten Tierwelt wiederzufinden (bei Nematoden, Fischen und Menschen) und gilt als evolutionsbiologisch stark konserviert (Bruick und McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Nikinmaa et al., 2004).

Verliert pVHL seine Funktion, z.B. im klarzelligen Nierenkarzinom, kommt es zu einer ständigen Überexpression von HIF-1 $\alpha$  und auch von Zielgenen wie VEGF, die den vascular endothelial growth factor encodieren, was zu einer

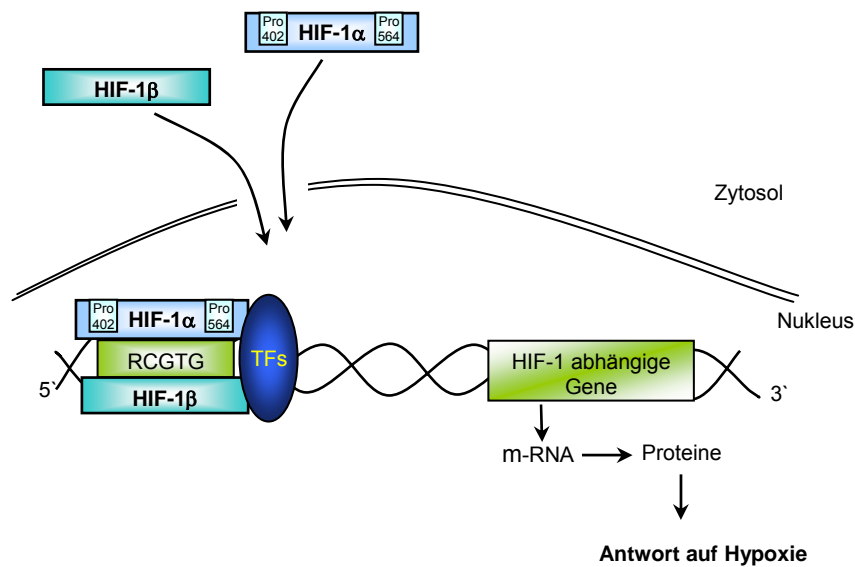


Hypervaskularisierung des Tumorgewebes führt (Elson et al., 2001; Iliopoulos et al., 1996).



**Abb. 3:** HIF-1 $\alpha$  Abbau unter Normoxie. HIF-1 $\alpha$  wird durch PHDs (prolyl-hydroxylase domain containing proteins) mit Hilfe der Kofaktoren Sauerstoff, Eisen und Oxoglutarat hydroxyliert. Bindung des VHL (von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein) und weiteren Faktoren wie eB (Elongin B); eC (Elongin C), CUL 2 (Cullin 2) und RBX 1 (RING-H2 Protein Ring-Box 1) zur Formation des E<sub>3</sub> Ubiquitin-Ligase Komplexes. HIF-1 $\alpha$  wird ubiquitinyliert (Ub) und durch das 26S-Proteasom abgebaut.

Während Hypoxie findet diese Hydroxylierung nicht statt, da den PHDs der Kofaktor Sauerstoff fehlt. *In vitro* steigt die HIF-1 $\alpha$  Menge exponentiell an, wenn die Sauerstoffkonzentration unter 6% sinkt (Jiang et al., 1996b). HIF-1 $\alpha$  wird bei Sauerstoffmangel phosphoryliert und kann so mit HIF-1 $\beta$  heterodimerisieren und in den Zellkern eintreten (siehe hierzu Abbildung 4). Dort bindet HIF-1 an die DNA-Bindestelle 5'-RCGTG-3' im hypoxia-response-element (HRE) der Promotor-Region von Sauerstoff-abhängigen Zielgenen, wodurch die Transkription dieser Gene reguliert bzw. modifiziert wird (Ratcliffe et al., 1998). HIF-1 bildet gemeinsam mit Koaktivatoren und basalen Transkriptionsfaktoren einen Transkriptions-Initiationskomplex, der die mRNA Expression initiiert und die Proteinexpression veranlasst (Camenisch et al., 2001).



**Abb. 4:** HIF-1 Regulation unter Hypoxie. HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  heterodimerisieren und gelangen vom Zytosol in den Zellkern. Dort binden sie an die DNA Bindungsstelle RCGTG im hypoxia-response-element (HRE) und initiieren mit anderen Transkriptionsfaktoren (TFs) die Transkription von HIF-1 abhängigen Genen.

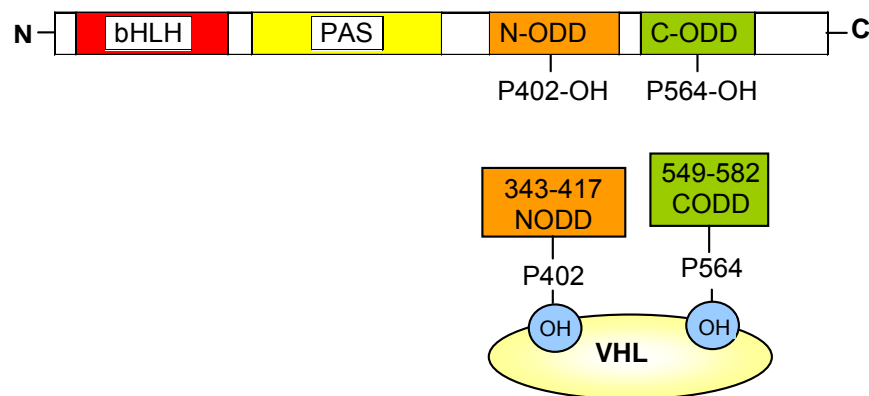
### 1.4.3 Sauerstoff-unabhängige Regulation

Die HIF-1 Stabilisierung ist nicht die einzige Möglichkeit, die Aktivierung von HIF-1 und seinen Zielgenen zu beeinflussen. Die HIF-1 Aktivierungskaskade mit post-translationaler Proteinphosphorylierung, nukleärer Translokation, ARNT Heterodimerisierung, DNA Bindung und Rekrutierung von allgemeinen und gewebsspezifischen Transkriptionsfaktoren und Aktivierung von Zielgenen kann auf unterschiedliche Art und Weise unterbrochen werden, da diese durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise durch Kobalt, Nickel, Wachstumsfaktoren, verschiedene Zytokine sowie Insulin-like Growth factor 1 und 2 (IGF-1, -2), Insulin, Epidermal Growth Factor  $\alpha$ , Angiotensin II, Thrombin, Platelet-Derived Growth Factor, Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Stickoxid (NO) kontrolliert werden (Huang et al., 2003; Bergeron et al., 1999). HIF-1 kann auch durch Laktat, Pyruvat und Oxalacetat unabhängig von Sauerstoffmangel stimuliert werden (Lu et al., 2002; Dalgard et al., 2004).

#### 1.4.4 Regulation von HIF-1 $\alpha$ durch NODD- und CODD-Domänen (N und C terminale Sequenz der oxygen dependent degradation domain)

Eine weitere Möglichkeit, HIF-1 Sauerstoff-unabhängig zu aktivieren, besteht darin, den Abbau der HIF-1 $\alpha$  Kette durch Zugabe von DNA-Sequenzen zu stoppen, welche die ODDD der HIF-1 $\alpha$  Kette imitieren.

Willam und Masson setzten 2002 in ihren Versuchen die Expression der NODD- (Aminosäure 343-417 der ODDD) und CODD-Domänen (Aminosäure 548-582 der ODDD) ein, um damit auch während Normoxie den Abbau von HIF-1 zu verhindern. Dabei konkurrieren die ODDD-Peptide mit der ODDD der HIF-1 $\alpha$  Kette als sogenannte *decoys* (eine Art Ablenkungsmanöver), um die Interaktion der ODDD mit dem von Hippel-Lindau Protein zu verhindern. Bei ausreichender Menge an NODD- bzw. CODD-Domänen kommt die Bindung des von Hippel-Lindau Proteins und HIF-1 $\alpha$  nicht zustande. So wird HIF-1 $\alpha$  auch unter Normoxie stabilisiert und es können HIF-1 abhängige Gene induziert werden (Willam et al., 2002).



**Abb. 5:** Vorgeschlagenes Modell von Willam et al., 2002 zur HIF-1 $\alpha$  von Hippel-Lindau (VHL) Interaktion. NODD- und CODD-Domänen verhindern die HIF-1 $\alpha$ -VHL Bindung und damit den weiteren HIF-1 $\alpha$  Abbau, indem sie kompetitiv HIF-1 $\alpha$  von der Prolylhydroxylierung und/oder der Bindung mit dem von Hippel-Lindau Protein verdrängen.

## 1.5 Hypothesen

Die folgenden hierarchisch geordneten Hypothesen sollen in der vorliegenden Arbeit geprüft werden:

1. Die Induktion von HIF-1 induziert einen protektiven Zustand in Neuronen und ist damit hinreichend für einen verbesserten zellulären Schutz gegenüber Hypoxie.
2. Die Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$  Kette induziert über die Aktivierung von HIF-1 protektive Gene, die hinreichend für einen gesteigerten Hypoxieschutz in Neuronen sind.
3. Die Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$  Kette wird durch neuronale Überexpression der NODD- bzw. CODD-Domänen erreicht (vgl. 1.4.4).

## 1.6 Aufgabenstellung

Zur Überprüfung der oben genannten Hypothesen wird die primäre kortikale Neuronenkultur der Ratte sowie das OGD-Modell (Oxygen-Glucose-Deprivation) als *in vitro* Modell der Ischämie verwendet. Die Expression der NODD- bzw. CODD-Domäne wird durch Transfektion der Neuronen erreicht. Da die Transfektionsrate von Neuronen unter 50% liegt, sollen zur Identifizierung der erfolgreich transfizierten Neuronen Fluoreszenzproteine verwendet werden. Diese wurden einerseits als eGFP-NODD- bzw. CODD-Fusionsproteine und andererseits als Kotransfektion von eGFP und NODD- bzw. CODD-Vektoren in die Neuronen eingebracht. Die Fluoreszenzmarkierung erlaubt die Beurteilung der Vitalität transfizierter Neuronen vor und nach zellulärem Stress.

---

## 2 Material

### 2.1 Bakterien, Vektoren

<i>E.coli</i> TG1 One Shot™	Invitrogen one shot, Karlsruhe
pEGFP-C1-3, pEGFP-N1-3	BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA
pDRIVE-CAG Vektor	Invivogen, San Diego, CA, USA

### 2.2 DNA-Größenstandards, Nukleotide

1kb DNA-Größenstandard	Gibco BRL, Eggenstein
Oligonukleotide	Boehringer, Mannheim

### 2.3 Enzyme

AmpliTaq® DNA Polymerase	Perkin Elmer, Vatterstetten
Phosphatase, alkalische (CIP)	Boehringer, Mannheim
T <sub>4</sub> -Ligase	Promega, Madison, WI, USA

Restriktionsendonukleasen:

<i>Bam</i> HI (G/GATTC)	NEB, Beverly, MA, USA
<i>Sac</i> II (CCGC/GG)	NEB, Beverly, MA, USA

## 2.4 Kits

Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Light-Cycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Invitrogen Topo TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIA Quick Gel Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIA Quick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rat Neuron Nucleofactor™ Kit	Amaxa Biosystems, Köln
Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Freiburg

## 2.5 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Life-Technologies Gibco BRL, Eggenstein
Bacto-Hefeextrakt	Life-Technologies Gibco BRL, Eggenstein
Bacto-Trypton	Life-Technologies Gibco BRL, Eggenstein
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, MO, USA
BSA (bovine serum albumin)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma, St. Louis, MO, USA

---

dNTP-Lösungen	Pharmacia Biotech, Freiburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Biochrom, Berlin
Hydrochinon	Sigma, St. Louis, MO, USA
Insulin	Biochrom, Berlin
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Fluka Biochemika, Buchs, CH
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Perkin Elmer, Vatterstetten
MMLV-Puffer	Life-Technologies Gibco BRL, Eggenstein
MMLV-RT	Life-Technologies Gibco BRL, Eggenstein
Na <sub>2</sub> EDTA	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin

---

Poly-L-Lysin	Biochrom, Berlin
Polyethylenglycol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Rnasin® RNase Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris Base	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom, Berlin

## 2.6 Medien und Lösungen

### 2.6.1 Allgemeine Puffer und Stammlösungen

BSS <sub>0</sub> -Lösung	50 ml 10 x BSS <sub>0</sub> -Lösung ( <i>modified Hank's salt solution</i> ), 0,9 ml CaCl <sub>2</sub> (1M), 13,1 ml NaHCO <sub>3</sub> (1M), 166,5 µl Glycin (30mM), 5 ml HEPES (1M), dH <sub>2</sub> O ad 500 ml
Ethidiumbromid	10 mg/ml Ethidiumbromid in dH <sub>2</sub> O
DEPC-Wasser	Zugabe von 1 ml DEPC pro Liter dH <sub>2</sub> O, Inkubation für 12 Stunden bei Raumtemperatur, autoklaviert
Gelladepuffer	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin in dH <sub>2</sub> O
Kollagen-Medium	25 ml FKS Gold, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml 1M HEPES, 5 ml Kollagen G
PLL-Lösung	5 ml Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml), PBS ad 100 ml
½ PLL-Lösung	10 ml PLL / 390 ml PBS (Inkubation über 12 Stunden)
TE-Puffer	10 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0



---

Tetrazoliumsals, MTT	Tetrazoliumsals (Sigma) wurde als Stammlösung einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS aufgelöst, steril filtriert und bei $-20^{\circ}\text{C}$ gelagert, verwendete Endkonzentration: 0,5 mg/ml
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	SDS 10% in $\text{H}_2\text{O}$ aufgelöst und KCl mit Endkonzentration 0,01 M zugesetzt
TBE	54 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), $\text{dH}_2\text{O}$ ad 1 l

### 2.6.2 Zellkulturmedien

B-27 Supplement	Gibco BRL, Eggenstein
Cytosin-Arabinosid	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Fetales Kälber Serum (FKS)	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Kollagen G	Biochrom, Berlin
Minimal Essential Medium (MEM)	Biochrom, Berlin
Neurobasalmedium (NBM)	Gibco BRL, Eggenstein
Nucleofector Lösung <sup>TM</sup>	2,25 ml Nucleofector Lösung <sup>TM</sup> mit 0,5 ml Supplement gemäß Angaben des Herstellers gemischt
Phosphate buffered saline mit $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ (PBS)	Biochrom, Berlin
Phosphate buffered saline ohne $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ (PBS)	Biochrom, Berlin

---

Trypsin/EDTA-Lösung Mit PBS ohne  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  10 x Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin) 1:10 verdünnen

### 2.6.3 Nährmedien

LB-Medium 10 g Bacto-Trypton, 10 g Bacto-Hefeextrakt, 5 g NaCl,  $\text{dH}_2\text{O}$  ad 1 l, pH 7,0 einstellen, autoklavieren

LB-Agar Zugabe von 15 g Agar pro Liter LB-Medium vor dem Autoklavieren

NBM + B27 10 ml B27 Supplement, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 1,25 ml L-Glutamin

N-Medium/Dissoziationsmedium modifiziertes Eagle Medium mit 10% FKS, 10°mM HEPES, 44 mM Glukose, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 100°IE Insulin/l

Wachstumsmedium NBM-A Medium, 10 ml B-27 Zusatz, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 1,25 ml L-Glutamin, NBM ad 500 ml

Startermedium NBM-A Medium, 10 ml B-27 Zusatz, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 1,25 ml L-Glutamin, 500  $\mu\text{l}$  25 mM Glutamat, NBM ad 500 ml

Transfektionsmedium DMEM high Glucose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamax

Konditioniertes Medium Nach Standard präparierte Neuronen in 6-well Platten mit DMEM bzw. NBM-A aussäen, jeden 3. Tag davon Medium abnehmen, sammeln, abzentrifugieren und bei  $-80^\circ\text{C}$  einfrieren

LB-Kanamycin-Selektionsmedium LB-Medium autoklavieren und abkühlen

---

	lassen auf 55°C, Zugabe von Kanamycin-Stammlösung (Endkonzentration 50 µg/ml)
SOC-Medium	20 g Bacto Trypton, 5 g Bacto Hefeextrakt, 10 mM NaCl, autoklavieren 2,5 mM KCL, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glukose, dH <sub>2</sub> O ad 1 l

## 2.7 Software

BLASTn	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a> , ermöglicht die Untersuchung einer Sequenz nach ihrer Homologie mit bereits bekannten Sequenzen
Typhoon 8600 V 1.0	Amersham Biosciences, Freiburg
LightCycler Software V 3.5.3	Roche Diagnostics, Mannheim
ALFwin Sequenz Analyser v2.11	Amersham Biosciences, Freiburg

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten	Bio-Rad Laboratories, München
Medienflaschen	Falcon, Heidelberg
Petrischalen	Falcon, Heidelberg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1, 5, 2, 15 ml	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
6-, 12-, 24-well Zellkulturplatten	BD Biosciences, Heidelberg
48-well Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden

## 2.9 Geräte

Anarobierkammer	Concept 400, IUL, Königswinter
Autoklav	Faster, Berlin
Brutschrank	B5060 EC-CO <sub>2</sub> , Haereus, München
Digitalkamera	Leica DC 200, Heerbrueg, Schweiz
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, Laboratories, München
Elektroporationsapparat	Micro Pulser, BioRad, Richmond, CA, USA
ELISA-Photometer Dynatech MR5000	Dynatech, Denkendorf
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Heerbrueg, Schweiz
Gewebshomogenisator	Falcon, Heidelberg
Inkubator 20°C bis 95°C	Nuaire TS Autoflow CO <sub>2</sub> Water Jacketed Incubator, Plymouth, MN, USA
Kühlzentrifuge 30 RF mit Swing-out Rotor	Hettich, Tuttlingen
Lichtmikroskope	Leica Zoom 2000, Leitz, Wetzlar
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Objektive	L 10x/0,22 PH1, Heerbrueg Schweiz L 20x/0,30 PH 1, Heerbrueg Schweiz L 40x/0,50 PH 2, Heerbrueg Schweiz
Okular	10x/18 Leica, Heerbrueg Schweiz
PCR-Express Thermal Cycler	Hybaid Limited, Ashford, Middlessex, UK
Photometer	Biophotometer, Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäßschüttler	5432, Eppendorf, Hamburg

---

Schüttelinkubator	Johanna Otto, Hechingen Sigma, St. Louis, MO, USA
Sequenzierautomat	Alf Express™, Pharmacia Biotech, Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilbank	ZKB 4-6, Haereus, München
Thermocycler	Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	5410, Eppendorf, Hamburg
Typhoon Scanner	Variable Mode imager, Typhoon 8600, molecular dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Biosciences, Freiburg
Ultrazentrifuge	Sigma 3K30, St. Louis, MO, USA
Waage	Eppendorf, Hamburg

### **2.10 Tiere**

Trächtige weibliche Wistar Ratten am Embryonaltag 17/18 aus dem zentralen Versuchstierlabor, Charité Campus Mitte, BRD; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin.

### 3 Methoden

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden verwendet, zum einen molekularbiologische Methoden wie PCR (Polymerase Kettenreaktion), Restriktionsenzymverdau und Konstruktion von Fusionsproteinen, die im ersten Abschnitt besprochen werden. Zum anderen *in vitro* Methoden, wie die Transfektion primärer Cortexneuronen der Ratte mittels Elektroporation, die im zweiten Abschnitt dieses Methodenteils behandelt werden.

#### 3.1 Herstellung der NODD- und CODD-Fusionsproteine

In diesem Abschnitt wird das Verfahren zur Herstellung der NODD- und CODD-Fusionsproteine erläutert.

##### 3.1.1 Ausgangsmaterialien

Als Ausgangsmaterialien dieser Arbeit dienten zwei DNA-Domänen, die Aminosäureabschnitten der ODDD aus der HIF-1 $\alpha$  Kette entsprechen. Ein als NODD bezeichneter Abschnitt entspricht dem N-terminalen Teil der ODDD und enthält den Prolinrest P402. Der als CODD (C-terminaler Teil der ODDD) bezeichnete Abschnitt enthält den Prolinrest P564 (siehe 1.4.1). Innerhalb der HIF-1 $\alpha$  Kette stellen die beiden Prolinreste der ODD-Domänen wichtige Zielregionen für den Abbau von HIF-1 $\alpha$  über den Proteasom-Ubiquitin-Weg dar.

Beide DNA-Domänen und ihre zugehörigen Mutanten (P402A-NODD und P564G-CODD, siehe hierzu auch Tabelle 1) als Kontrollen, wurden von Herrn Dr. Carsten Willam (Nephrologie und internistische Notfallmedizin, Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt. Diese vier DNA-Domänen werden im Weiteren vereinfacht als NODD- und CODD-Domänen bezeichnet und sollen die beiden zugehörigen Mutanten mit einschließen.

HIF-1 $\alpha$ Abschnitt	NODD-Domäne		CODD-Domäne	
	Wildtyp	Mutante	Wildtyp	Mutante
	pEGFP-C3-NODD WT	pEGFP-C3-NODD MT - P402A	pEGFP-C3-CODD WT	pEGFP-C3-CODD MT – P564G
<b>m-RNA- Position</b>	1029-1251	1029-1251	1645-1746	1645-1746
<b>Aminosäure-Sequenz</b>	343-417	343-417	548-582	548-582
<b>Länge</b>	222 Bp	222 Bp	102 Bp	102 Bp
<b>Mutation</b>	Nein	Ja	Nein	Ja
<b>Aminosäure-Position</b>		402		564
<b>Art der Mutation</b>		Prolin (CCA) → Alanin (GCA)		Prolin (CCC) → Glycin (GGC)

Tab. 1: NODD- und CODD-Domäne Wildtyp und Mutanten mRNA und Aminosäuren im Vergleich.

Die Positionen der m-RNA der HIF-1 $\alpha$  Sequenz sind der Datenbank des National Center For Biotechnology Information (NCBI) des National Institutes of Health (NIH) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) entnommen und haben die Eintragsnummer: gi|32879894|gb|BT009776.1| (Homo sapiens hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) mRNA, complete cds Length=2481).

### 3.1.2 Amplifizierung der NODD- bzw. CODD-Domänen durch PCR

Diese DNA-Domänen waren in einen pshooter/myc/nuc Plasmid-Vektor der Firma Invitrogen zwischen einer SacI- und einer AscI-Schnittstelle einkloniert. Zur Vervielfältigung der NODD- und CODD-Domänen wurde eine Polymerase Chain Reaction bzw. Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit den unten beschriebenen spezifischen Primern verwendet. Um die DNA-Domäne in den pEGFP-Vektor zu klonieren wurde eine BamHI-Schnittstelle benötigt. Diese wurde durch einen AscI-Linker-Primer, d.h. eine produktspezifische Primersequenz angefügt.

Sowohl für die NODD- als auch für die CODD-Domäne wurde folgender *forward* Primer in der PCR verwendet:

pShootermyc 3NLS-FWD (Invitrogen):                    5'- GAA CCC ACT GCT TAC TGG -3'

Als *reverse* Primer wurden verwendet:

NOOD-Ascl Linker-Primer: 5'- TAG ATC CGG TGG ATC CCG GGC  
GCG CCG TCG TTG C -3'

CODD-Ascl Linker-Primer: 5'- TAG ATC CGG TGG ATC CCG GGC  
GCG CCT GGT GAC -3'

Unterstrichen ist jeweils die *Bam*HI- Schnittstelle.

Die PCR ist eine Methode, bei der spezifische DNA-Sequenzen mit Hilfe der DNA-Polymerase eines thermophilen Bakteriums exponentiell vervielfältigt werden.

Dazu wird im ersten Schritt der DNA-Doppelstrang durch Hitze denaturiert (*Denaturation*). An ausgesuchte Anfangs- und Schlussabschnitte der Sequenz legen sich anschließend komplementäre Oligonukleotide als sogenannte Primer an. Dies geschieht bei einer ihnen angepassten optimalen Temperatur (hier 51°C) und wird als *Annealing* bezeichnet. Durch Zugabe des hitzestabilen Enzyms Taq-Polymerase und einem Mix aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) werden nun beide Einzelstränge mit komplementären Nukleotiden vervollständigt, wodurch zwei neue Doppelstränge (*Extension*) als Kopie entstehen. Diese Reaktionsschritte wiederholen sich. Selbst kleine Ausgangsmengen an Genmaterial werden so exponentiell vervielfältigt. In diesem Fall erfolgte nach insgesamt 35 Zyklen ein terminaler Elongationsschritt bei 72°C mit dem alle bereits begonnenen Syntheseprodukte vervollständigt werden sollten.

Standardmäßig wurde von einem 50 µl Ansatz für die PCR ausgegangen, der sich wie folgt zusammensetzt:

Reagenz	Menge in µl
DNA	1,00
10x Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	5,00
dNTP-Mix (ohne MgCl <sub>2</sub> )	4,00
Polymerase (Taq)	0,50
Primer pShootermyc 3NLS-FWD (160) pmol/µl)	0,35
Primer NOOD/CODD Ascl-Linker (100) pmol/µl) je	0,50
H <sub>2</sub> O	33,50
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,00
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50,00</b>



**Reaktionsbedingungen:**

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 35 Zyklen
Primer Anlagerung	51°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Terminale Elongation	72°C	10 min	
Stop	4°C		

Zur Visualisierung des amplifizierten DNA-Fragments wurden jeweils 10 µl des Ansatzes mit Gelladepuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 1% Agarosegel (Roth) mit 1x TBE Puffer (0,89 M Borsäure, 0,89 M Tris, und 2 mM EDTA) aufgetrennt. Der TBE Puffer wurde auch als Laufpuffer verwendet. Die Größe der Fragmente konnte durch Vergleich mit einem DNA-Größenstandard (Gibco) ermittelt werden. Die horizontale Gelelektrophorese erfolgte für 45 Minuten bei 80 V.

Um die amplifizierte DNA dem weiteren Verfahren zugänglich zu machen, wurden anschließend störende Salze, verbliebene Enzyme, Primer und Nukleotide entfernt. Dazu wurde das *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen verwendet. Das Prinzip dieses System besteht darin, die DNA zunächst an Kieselerdemembran zu binden, Verunreinigungen abzuwaschen und die DNA daraufhin wieder zu eluieren. Gemäß dem Arbeitsprotokoll des Herstellers wurde mit Hilfe der mitgelieferten Säule und den Puffern die DNA von Reagenzien und kurzen DNA-Sequenzen (Primerdimere) gereinigt. Als Zwischenprodukt entstanden gereinigte NODD- bzw. CODD-Amplifikate.

**3.1.3 Restriktionsenzymverdau mit *SacI* und *Bam*HI**

Um Fusionsproteine der NODD- bzw. CODD-Domänen mit dem fluoreszierenden Farbstoff eGFP (enhanced Green fluorescent protein) herzustellen, wurden die amplifizierten NODD- und CODD-Domänen aus dem pCMV/myc/nuc-Vektor der pShooter-Vektorserie in Vektoren der pEGFP Serie (Bioscience, Clontech) umkloniert. Dazu wurden der pCMV/myc/nuc-Vektor sowie die NODD- und CODD-Domänen durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *Sac*II und *Bam*HI für die Ligation vorbereitet.

Reaktionsmix für den NODD- bzw CODD-Domänen Verdau:

Reagenz	Menge in $\mu\text{l}$
NODD/CODD-Domänen je	30,00
SacII	5,00
BamHI	1,00
<i>Bam</i> HI Puffer	6,00
BSA 100 x	0,60
H <sub>2</sub> O	17,40
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>60,00</b>

Folgender Restriktionsansatz wurde für die pEGFP-Vektoren verwendet:

Reagenz	Menge in $\mu\text{l}$
pEGFP-Vektoren	2,00
SacII	2,00
BamHI	1,00
<i>Bam</i> HI-Puffer	3,00
BSA 100 x	0,30
H <sub>2</sub> O	21,70
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>30,00</b>

Beide Ansätze wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem 2% Agarosegel in der Elektrophoresekammer aufgetrennt, ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* gereinigt.

### 3.1.4 Gelextraktion mittels QIAQuick Gel Extraction Kit

Der gesamte Reaktionsansatz des Enzymverdau der NODD- bzw CODD-Domänen wurde nach ausreichender Auftrennung der DNA-Banden unter UV-Licht beurteilt. Der Anteil der DNA, der durch die Restriktionsenzyme herausgeschnitten worden ist, wurde mit dem Skalpell aus dem Gel herausgelöst. Um DNA-Schäden und Degradation durch UV-Licht und Exonukleasen zu verhindern, wurde beim Schneiden des Gels auf sauberes und zügiges Arbeiten geachtet. Das herausgelöste Gelstück wurde in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben, gewogen und die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Purification Kits* der Firma Qiagen gemäss Protokoll der Herstellers aus dem Gel extrahiert und gereinigt.

### 3.1.5 Dephosphorylierung der linearisierten pEGFP-Vektoren

Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, welches Phosphatreste an beiden 5'-Enden der Plasmid-DNA entfernt. Eine Rezirkulierung des Vektors ohne Insert in der Ligationsreaktion wird damit verhindert. Je 3 µl eines Gemisches aus Puffer (10 x CIP-Puffer), Phosphatase (CIP-Phosphatase, Boehringer) und Wasser wurde mit 25 µl des Ansatzes der gespaltenen pEGFP Vektoren (je 1 µg) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die dephosphorylierten Vektoren wurden auf ein 2% Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (vgl. 3.1.4) gereinigt.

### 3.1.6 Ligation der NODD- bzw. CODD-Domänen in pEGFP Vektoren

Zum Zusammenfügen der pEGFP Vektoren und der NODD- bzw. CODD-Domänen wurde folgende Ligationsreaktion durchgeführt:

Reagenz	Menge in µl
NODD/CODD-Sequenzen	4,00
Linearisierte Vektoren	1,00
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase	1,00
10 x Puffer T <sub>4</sub> -Ligase	1,00
H <sub>2</sub> O	3,00
<b>Menge</b>	<b>10,00</b>

Dieser Mix wurde für eine Stunde bei 16°C inkubiert. Neben dem Ligationsansatz wurden Kontrollreaktionen angesetzt, um z.B. die Religation des Vektors zu überprüfen. Anschließend wurden diese Konstrukte mit Hilfe der Elektroporationsmethode in *E.coli* transformiert.

### 3.1.7 Elektroporation der Plasmide in *E.coli*

Die Verwendung kurzer elektrischer Impulse zum Einbringen von DNA in Bakterien wird als Elektroporation, bzw. Elektrotransfektion bezeichnet (Neumann et al., 1982; Chu et al., 1987). Bei dieser Methode wird durch das Anlegen eines elektrischen Impuls die Permeabilität der Bakterienmembran kurzfristig so erhöht, dass selbst größere exogene DNA-Moleküle in die Zellen eindringen können. Für die Elektroporation wurde der *Micro Pulser Electroporator* (Bio Rad) mit 0,1 cm Küvetten verwendet und eine Spannung von 2,5 mV angelegt. Die Küvetten wurden zuvor bei -20°C gekühlt. 2 µl

des Ligations-Reaktionsansatzes wurden entsprechend den Angaben des Herstellers zu *one shot elektrokompetenten E.coli* (Invitrogen) in ein Eppendorfgefäß gegeben, durch vorsichtiges Schnipsen gemischt und blasenfrei in eine Küvette pipettiert. Nach der erfolgten Elektroporation wurde raumtemperiertes SOC-Medium (Herstellung siehe 2.6.3) zugegeben und alles in ein steriles, luftdurchlässiges 12 ml Röhrchen pipettiert und für eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert (225 rpm). Jeweils 50 bzw. 100 µl der Zellsuspension wurden auf LB-Kanamycin-Selektionsmedium ausplattiert.

### 3.1.8 Anzucht der Klone

Nach der Transformation wurden die LB-Platten für 12-16 Stunden inkubiert. Zur Einzelanzucht wurden Kolonien gepickt und in 3 ml 2x YT Medium, welches mit 0,5 mg Kanamycin versetzt worden war, im Schüttelinkubator für 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die Ausbeute weiter zu vergrößern, wurden 200 µl des ursprünglichen Anzuchtmediums in 100 ml LB-Agar (mit 5 mg Kanamycin versetzt) überführt, und für weitere 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Dabei war es wichtig, dass die Kultur ständig geschüttelt wurde (300 rpm), um das Medium ausreichend zu oxygenieren.

### 3.1.9 PCR als Kontrolle der Transformation

Um sicher zu stellen, dass es zum korrekten Einbau der NODD- bzw. CODD-Domänen in die pEGFP-Vektoren gekommen war, wurden die Kolonien durch eine Kontroll-PCR und anschließende Sequenzierung überprüft. Jeweils die Hälfte einer geernteten Kolonie wurde für eine Kontroll-PCR verwendet.

Reaktionsmix:

Reagenz	Menge in µl
10x Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	5,00
dNTP-Mix (je 2,5 µM)	4,00
Polymerase (Taq)	0,50
Primer EGFP C1-3 fwd (100 pmol/µl)	1,00
Primer EGFP C1-3 rev (100 pmol/µl)	1,00
H <sub>2</sub> O	34,50
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4,00
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50,00</b>

Folgende Primer wurden für die Kontroll-PCR verwendet:

pEGFP fwd: 5`- GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG -3`  
pEGFP rev: 5`- CTC TAC AAA TGT GGT ATG GCT G -3`

Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primer Anlagerung	64°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Terminale Elongation	72°C	10 min	
Stop	4°C		

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Gelelektrophorese ausgewertet. Als Vorbereitungsschritt für die Sequenzierung und die später folgende Transfektion in primäre Neuronen wurden die pEGFP-Vektoren gereinigt.

### 3.1.10 DNA Isolierung aus *E.coli*

Zur Isolierung der DNA aus den pEGFP Vektoren wurde das *Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit* verwendet. Dadurch sollten Endotoxine (Lipopolysaccharide) entfernt werden, da diese die Transfektions- und Überlebensrate in primären neuronalen Zellen stark reduzieren. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde die Bakteriensuspension zunächst zentrifugiert und mit unterschiedlichen Puffern versetzt. Diese enthielten zum einen RNasen zum Verdau der RNA. Zum anderen enthielten sie SDS, was Proteinbestandteile aus der Zellmembran herauslöst und somit zur Lyse und Freisetzung der Plasmid-DNA führte. Nach weiteren Waschschritten, Filterungen und Zentrifugationen wurde die DNA-Suspension mit Hilfe von Isopropanol und Ethanol gefällt und in 500 µl TE-Puffer gelöst. Die gereinigten NODD- bzw. CODD-pEGFP Plasmide wurden anschließend sequenziert.

### 3.1.11 DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der verwendeten Sequenzierungsmethode beruht auf der Didesoxymethode von Sanger et al., 1977 und ist dem Prinzip einer PCR ähnlich. Anhand von DNA-Matrizen werden in einer zyklischen, enzymatischen Reaktion DNA-

Fragmente hergestellt. Reaktionskomponenten sind Nukleotide, eine thermostabile DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, amplifizierte DNA und Primer. Anders als bei der PCR sind nicht nur Nukleotide (dNTPs), sondern auch Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) vorhanden, nach deren Einbau die Strangsynthese aufgrund der fehlenden 3'-OH Gruppe abbricht. Da bei jeder Synthese der Zufall entscheidet, ob ein normales (dNTP) oder ein modifiziertes Nukleotid (ddNTP) eingebaut wird, entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die jeweils mit der Primersequenz beginnen und mit einem ddNTP enden. An die Sequenzierungsprimer ist ein Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gebunden, der bei einer nachfolgenden, automatischen Sequenz-Gelelektrophorese mit Laserlicht angeregt und durch eine CCD-Kamera detektiert wird. Die detektierten Lichtsignale werden gespeichert und ausgewertet.

Die gereinigten NODD/CODD-pEGFP Plasmide wurden entsprechend dem oben genannten Prinzip mit dem *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* (Amersham) und mit Hilfe eines Sequenzierungsautomaten *Alf EXpress* (Pharmacia Biotech) sequenziert. Als Sequenzierungsprimer wurden die bereits oben erwähnten pEGFP-Primer (*fwd/rev*) verwendet, die mit Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert worden waren.

Sequenzierungs-PCR Mastermix:

Reagenz	Menge in $\mu\text{l}$
Plasmid-DNA	1,00
H <sub>2</sub> O	11,00
Sequenzierungsprimer Cy5 (5 $\mu\text{M}$ )	1,00
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>13,00</b>

3  $\mu\text{l}$  des Mastermix wurden mit je 3  $\mu\text{l}$  Basen/Polymerase Mix aus dem Amersham Sequencing-Kit vermischt. Der Basen-Mix enthält jeweils ein bestimmtes Verhältnis an dNTPs und ddNTPs. Die Ansätze wurden in einem Thermal Cycler (Hybaid) bei folgendem Programm inkubiert:

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	} 23 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primer Anlagerung	66°C	30 sec	
Elongation	72°C	60 sec	
Terminale Elongation	72°C	5 min	
Stop	4°C		

Das Reaktionsgemisch wurde nach Ablauf des Programms zentrifugiert und mit 6  $\mu$ l der Amersham Sequencing-Stoplösung versetzt und gemischt. Die Stop-Lösung enthält Formamid, EDTA und Methylenblau. Jeweils 10  $\mu$ l des mit Stop-Lösung versetzten Reaktionsgemisches wurde in dazu vorgesehene Öffnungen eines zuvor hergestellten 6% Acrylamidgels gegeben und aufgetrennt.

Für 75 ml Acrylamidgel wurde verwendet:

5 x TBE-Puffer	15,00 ml
46,7% Harnstofflösung (8 M)	37,50 ml
30% Acrylamidlösung	15,00 ml
H <sub>2</sub> O	7,00 ml

Dieses Gemisch wurde 10 Minuten entgast und direkt vor dem Gießen des Gels mit 37,5  $\mu$ l TEMED und 375 ml APS-Lösung ergänzt, um die Polymerisierung zu starten.

Nach einer Stunde Vorlaufzeit, in der das Gel auf eine Temperatur von 55°C erwärmt wurde, erfolgte in dem Acrylamidgel eine Elektrophorese bei 800 V, 30 W, 55 mA und 55°C für ca. 900 Minuten. Hierzu wurden die beiden Wannen des Alf Sequenzierautomat mit je 1 Liter 0,5 x TBE-Puffer gefüllt, und der ALFwin Sequence Analyser v2.11 gestartet. Die Auswertung der Sequenz erfolgte automatisch durch den ALF-Sequencer und die zugehörige Software. Bei Bestätigung des korrekten Einbaus der Plasmid-DNA durch die Sequenzierung, wurde die Plasmid-DNA für die Transfektion weiter verwendet.

## **3.2 Primäre neuronale Zellkultur**

Die Konstrukte wurden anschließend in primären Cortextneuronen der Ratte untersucht. Die Zusammensetzung sämtlicher hierfür benötigter Medien und Lösungen sind in Kapitel 2.6 aufgelistet.

### **3.2.1 Vorbereitung der Zellkulturplatten und primäre neuronale Zellkultur**

Für die Zellkulturexperimente wurden 24- (BD Falcon™), bzw. 48-well Zellkulturplatten (Nunc) verwendet. Um den Zellen eine bessere Haftung am Boden der Zellkulturplatten zu ermöglichen, wurden die Vertiefungen mit Poly-L Lysin (PLL) beschichtet und bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert. Danach wurden die Platten mit PBS gewaschen, mit Kollagenmedium beschichtet und für eine weitere Stunde bei 37°C

inkubiert. Die Platten wurden noch zweimal mit PBS gespült und dann mit Startermedium versehen. Später wurden die Neuronen darin ausgesät.

Die Neuronen wurden nach einer modifizierten Methode von Brewer et al. (1997) präpariert. Zwischen dem 16. und 18. Gestationstag trächtige Ratten wurden mit Fluothane narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet (genehmigt durch das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin). Anschließend wurden die Embryonen unter keimarmen Bedingungen aus dem Uterus entnommen. Ihnen wurden unter sterilen Bedingungen und mikroskopischer Kontrolle die Gehirne herauspräpariert und diese von den Meningen getrennt. Der zerebrale Cortex wurde in Neurobasal Medium<sup>TM</sup> unter Zusatz von B27 freipräpariert. Die Cortices wurden in ein Reagenzglas überführt und mit PBS gespült und anschließend für 15 Minuten mit einer EDTA/Trypsinlösung bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Um das Trypsin zu inaktivieren wurden die Zellen zweimal mit PBS und einmal mit Dissoziationsmedium gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe in Dissoziationsmedium mit einer Pasteurpipette gelöst und bei Raumtemperatur für 2 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge) um Erythrozyten und Zellbruchstücke zu sedimentieren. Das Zellpellet wurde in frischem Startermedium resuspendiert. Die Zellzahl des Gewebes wurde mittels der Trypan-Blau Methode ermittelt und die Zellen transfiziert.

### 3.2.2 Transfektion primärer Cortexneuronen

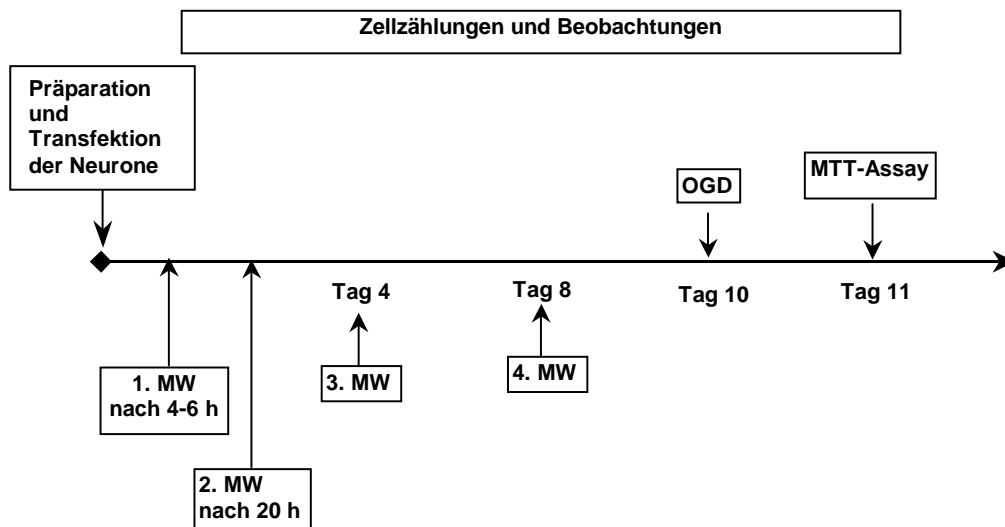
Die Transfektion wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen *Nucleofector<sup>TM</sup> technology kits* von Amaxa durchgeführt. Die benötigte Gesamtzellmenge wurde, um das Startermedium von den Zellen zu trennen, mit 720 rpm (Hettich-Zentrifuge) 5 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde das gewonnene Zellpellet in der *Nucleofector*-Lösung für Ratten-Neuronen resuspendiert und zu je  $3 \times 10^6$  Zellen zu 100 µl aliquotiert. Alle folgenden Schritte wurden für jedes Aliquot einzeln durchgeführt.

Zu jedem Aliquot wurde gereinigte Plasmid-DNA der pEGFP Vektoren mit den jeweiligen NODD- bzw. CODD-Domänen in einer Konzentration von 1-10 µg in 1-5 µl TE-Puffer zugegeben und gemischt. Als Positiv-Kontrolle diente der pEGFP-C1 bzw. -N1 Vektor. Die DNA-Zellmischung wurde in eine vom Hersteller mitgelieferte Küvette überführt, und eine Elektroporation im *Nucleofector<sup>TM</sup>* mit einem Programm (O-03,



---

G13) für primäre Rattenneuronen durchgeführt. Sofort nach Beendigung des Programms wurde 500 µl Transfektionsmedium zugegeben und die Suspension vorsichtig mit einer Pasteurpipette in ein Eppendorfgefäß zurückpipettiert. Nach der Transfektion aller Aliquots, wurden die Zellen in einer Dichte von 250.000–300.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Nach 4-6 Stunden wurde das komplette Medium mit der Pasteurpipette abgesaugt und gegen konditioniertes Transfektionsmedium (2/3 konditioniert, 1/3 frisch) ausgetauscht. Um konditioniertes Medium herzustellen, wurde jeden dritten Tag Medium aus primären neuronalen Zellkulturen abgenommen, zusammengeführt, abzentrifugiert (3500 rpm/10 min/4°C) und bis zu dessen Verwendung bei –80°C aufbewahrt. Das konditionierte Medium diente zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen in der Zellkultur. Ungefähr 20 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein zweiter Mediumwechsel mit konditioniertem Startermedium (2/3 konditioniert, 1/3 frisch). Alle 4 Tage wurde 1/3 des Mediums durch frisches Wachstumsmedium ersetzt. In den ersten 9-10 Tagen nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops im Hinblick auf ihre Vitalität beobachtet und fotodokumentiert.



**Abb.6:** Transfektionsversuch dargestellt im zeitlichen Ablauf. Dabei bedeutet MW Mediumwechsel, OGD Sauerstoff-Glukose Deprivations Versuch und MTT-Assay Thiazolblau Metabolismus. Der Wechsel des Mediums erfolgte am ersten, vierten und achten Tag *in vitro* (vgl. 3.2.2).

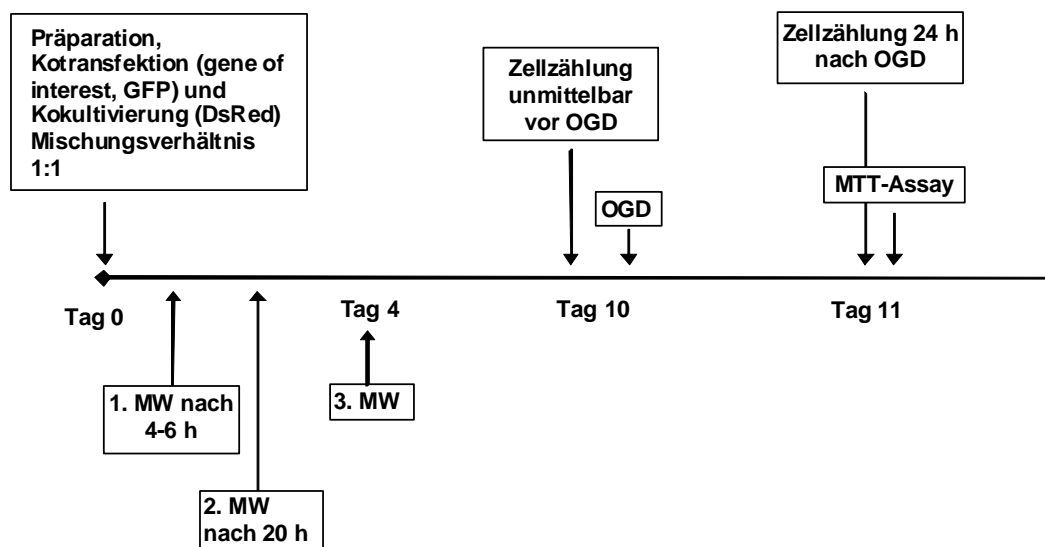
### 3.2.3 Kotransfektion und Kokultivierung primärer Cortexneuronen

Basierend auf der Amaxa Nucleofection™ Technologie entwickelte Phillip Mergenthaler eine erweiterte Methode zur Transfektion von primären Cortexneuronen der Ratte. Diese beruht auch auf dem Prinzip der Elektroporation, verzichtet jedoch auf die Fusion von spezifischen Genen mit dem Markerprotein eGFP. Bei der sogenannten Kotransfektion wird ein Vektor, welcher das zu untersuchende spezifische Gen trägt, zusammen mit einem Vektor, welcher die GFP-Sequenz encodiert, gleichzeitig in primäre Neuronen transfiziert. Durch die gemeinsame Elektroporation der beiden Vektoren kommt es in einem transfizierten Neuron sowohl zur Expression des fluoreszierenden Proteins, als auch zur Expression des spezifischen Gens. Um putativ neuroprotektive Gene zu untersuchen wurde neben der Kotransfektion Kokultivierung durchgeführt. Dazu wurden primäre Neuronen mit 2 unterschiedlichen Fluoreszenzprotein encodierenden Plasmiden transfiziert und im Mischungsverhältnis 1:1 miteinander kultiviert. Um beide Kulturen voneinander zu unterscheiden verwendeten wir ein rot fluoreszierendes Protein (DsRed, *Discosoma sp. red fluorescent protein*) und ein grün fluoreszierendes Protein (GFP). Die verwendeten Vektoren bestanden aus dem leicht veränderten Grundgerüst des pDRIVE-CAG

Vektors. Durch den Vergleich der unter gleichen Bedingungen transfizierten Neuronen konnten unabhängig von den Einflüssen der Transfektion die Auswirkungen des spezifischen Gens auf die Überlebensraten der Zellen beobachtet werden.

Die mit rotem und grünem Farbstoff transfizierten Zellen wurden mit Hilfe unterschiedlicher Filter des Fluoreszenzmikroskops beobachtet, ausgezählt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Nach zehn Tagen *in vitro* erfolgte ein knapp dreistündiges OGD-Experiment. Unmittelbar vor dem Sauerstoff-Glukose Entzugsversuch wurden die lebenden roten und die lebenden grünen Zellen ausgezählt. 24 Stunden nach dem OGD-Experiment wurde die Zählung wiederholt, um die Auswirkungen des Sauerstoff-Glukose Entzugs auf die Vitalität der transfizierten Zellen festzustellen. Die mit Dsred markierten Zellen dienten dabei als Vergleichsmaß für die Überlebensrate transfizierter Zellen nach einem OGD-Experiment. Durch das Auszählen der fluoreszierenden Zellen konnten die Auswirkungen des OGD-Experiments weitaus exakter ermittelt werden als durch einen LDH- oder einen MTT-Test.

Das in Abbildung 7 dargestellte Schema zeigt den Versuchsablauf einer Kotransfektion und Kokultivierung



**Abb.7:** Schematischer Versuchsverlauf der Kotransfektion von primären Cortexneuronen mit GFP und dem spezifischen zu untersuchenden Gen (gene of interest) und der Kokultivierung mit DsRed.

### 3.2.4 Kombinerter Sauerstoff-Glukose Entzug (OGD)

Die Durchführung des OGD-Versuchs ist an die Ausbildung von Glutamatrezeptoren auf der Oberfläche von Neuronen gebunden. Da diese erst ab dem 9. Tag *in vitro* auf der Oberfläche der Neuronen exprimiert werden, ergab sich der lange Versuchszeitrahmen von über zehn Tagen. Am 10. Tag nach der Transfektion wurde das Medium unmittelbar vor Beginn des kombinierten Sauerstoff-Glukose Entzugs bzw. *Oxygen-glucose deprivation* (OGD)-Experiment entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Bei einem im Durchschnitt drei Stunden lang dauernden OGD-Experiment wurden die Zellen mit einer Glukose-freien Salzlösung (BSS<sub>0</sub>) versehen in eine Anaerobierkammer überführt, die von einem Gasgemisch aus 85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> durchströmt wurde und in der ein Sauerstoffpartialdruck von 0 mmHg herrschte. Unmittelbar nach Versuchsende wurde das Zellmedium gewechselt. Das neue Medium bestand zur Hälfte aus dem alten Wachstumsmedium und zur anderen Hälfte aus frischem Wachstumsmedium. Bei normoxischen (95% Luft und 5% CO<sub>2</sub>) Bedingungen wurden die Kulturen erneut für weitere 24 Stunden kultiviert. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Neuronen für die Zeitdauer des OGD-Experiments unter normoxischen Bedingungen in BSS<sub>20</sub> Lösung kultiviert.

### 3.2.5 Evaluierung der Zellschädigung

#### 3.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Unmittelbar vor und 24 Stunden nach einem Sauerstoff-Glukose-Entzug wurden Zellen nach einem standardisierten Schema unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMIL) gezählt und fotografiert. Beim Zählen der Neuronen wurden jeweils die lebenden transfizierten Zellen pro Gesichtsfeld bzw. well gezählt und die lebenden nicht-transfizierten Zellen desselben Bereichs im Phasenkontrast. Die Mittelwerte dieser beiden Zählungen wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. So konnte die Entwicklung des zellulären Schadens parallel zu quantitativen Tests wie z.B. dem MTT-Test evaluiert werden.

#### 3.2.5.2 Thiazolblau (MTT)-Metabolismus

Zur Feststellung des zellulären Schadens diente der MTT-Test. Der Test basiert auf der chemischen Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) zu lilafarbenen Formazankristallen mittels

---

mitochondrieller Dehydrogenasen aus metabolisch aktiven Zellen. Spektrometrisch wurde die Absorption des entstandenen Formazans bei einer Wellenlänge von 550-600 nm bestimmt, bei der MTT nicht absorbiert. Da die Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, wird durch die Umwandlung von MTT die Vitalität der Zellen gemessen (Mosmann et al., 1983).

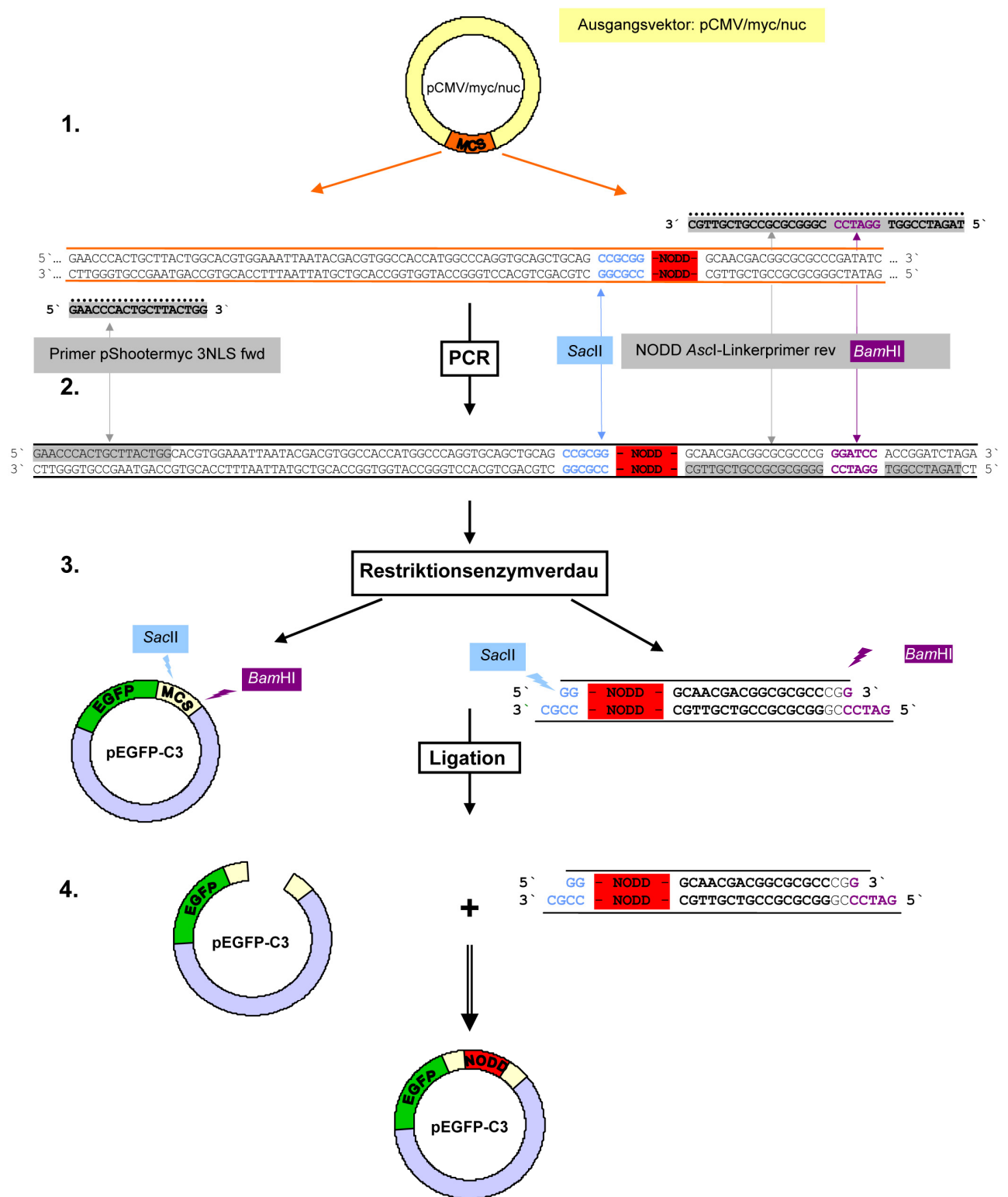
Im Experiment wurde 24 Stunden nach der OGD den Zellen MTT Lösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 35-40 Minuten bei 36,5°C wurde die Reaktion mit Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) gestoppt und die Zellkulturplatten anschließend 24 Stunden lang bei 36,5°C erneut inkubiert. Die Detektion des Zellschadens erfolgte photometrisch im ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm.

## 4 Ergebnisse

Die NODD- und CODD-Domänen, als mögliche neuroprotektive Gene, wurden zur Visualisierung mit dem Fluoreszenzprotein eGFP zu Fusionsproteinen verbunden. Zur Transfektion in primären Cortexneuronen der Ratte verwendeten wir die Nucleofector™ Technologie von Amaxa als eine spezifizierte Elektroporationsmethode. Diese wurde nach Etablierung bei stabil niedriger Transfektionsrate der primären Cortexneuronen modifiziert und weiter entwickelt zu einer Kotransfektions- und Kokultivierungsstrategie mit zwei verschiedenen Fluoreszenzproteinen. Mit dieser Strategie konnten wir mittels Sauerstoff-Glukose Deprivationsversuchen eine Ischämie *in vitro* simulieren und zeigen, dass CODD- und wahrscheinlich auch NODD-Domänen neuroprotektive Eigenschaften aufweisen.

### 4.1 Herstellung der NODD- bzw. CODD-Fusionsproteine

Mit dem Ziel, Fusionsproteine von eGFP und den NODD- bzw. CODD-Domänen zu konstruieren, wurden die NODD- bzw. CODD-Domänen mittels Restriktionsenzymverdau aus dem CMV betriebenen Ausgangsvektor pCMV/myc/nuc herausgelöst und C-terminal in die Vektoren pEGFP-C3 bzw. N-terminal in die pEGFP-N2 Vektoren ligiert. Die einzelnen Teilschritte sind dem folgenden Schema am Beispiel der Umklonierung der NODD-Domäne in den pEGFP-C3 Vektor zu entnehmen.



**Abb. 8:** Schema zur Umklonierung der NODD-Domäne aus dem pCMV/myc/nuc-Vektor in den pEGFP-C3 Vektor

1. Einfügen der *Bam*HI -Schnittstelle mit Hilfe eines *Asc*I-Linkerprimers

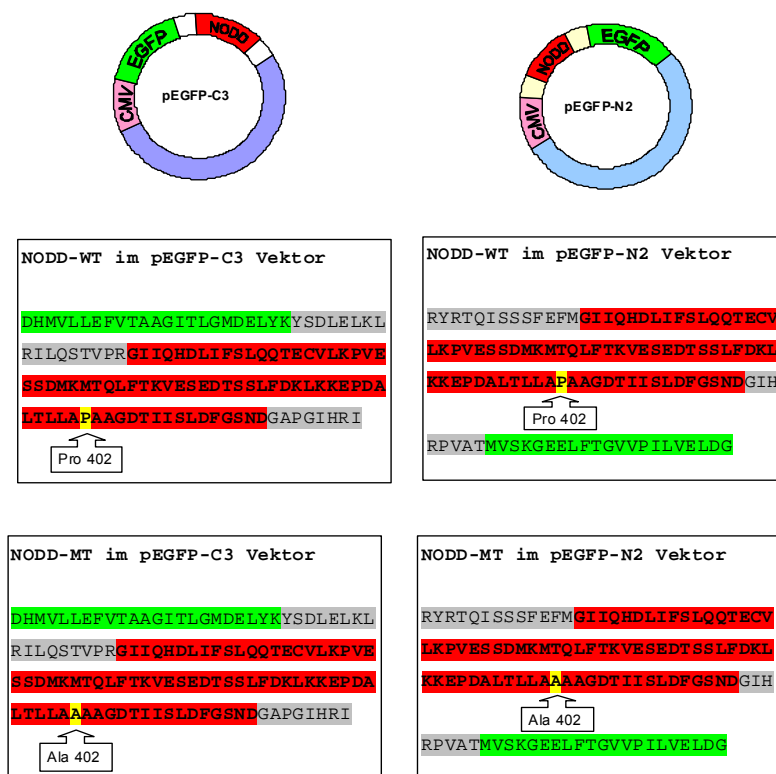
2. Amplifizierung mittels PCR

3. Restriktionsenzymverdau der NODD-Domäne und des pEGFP-C3 Vektors durch *Sac*II und *Bam*HI

4. Ligation des Vektors mit der NODD-Domäne

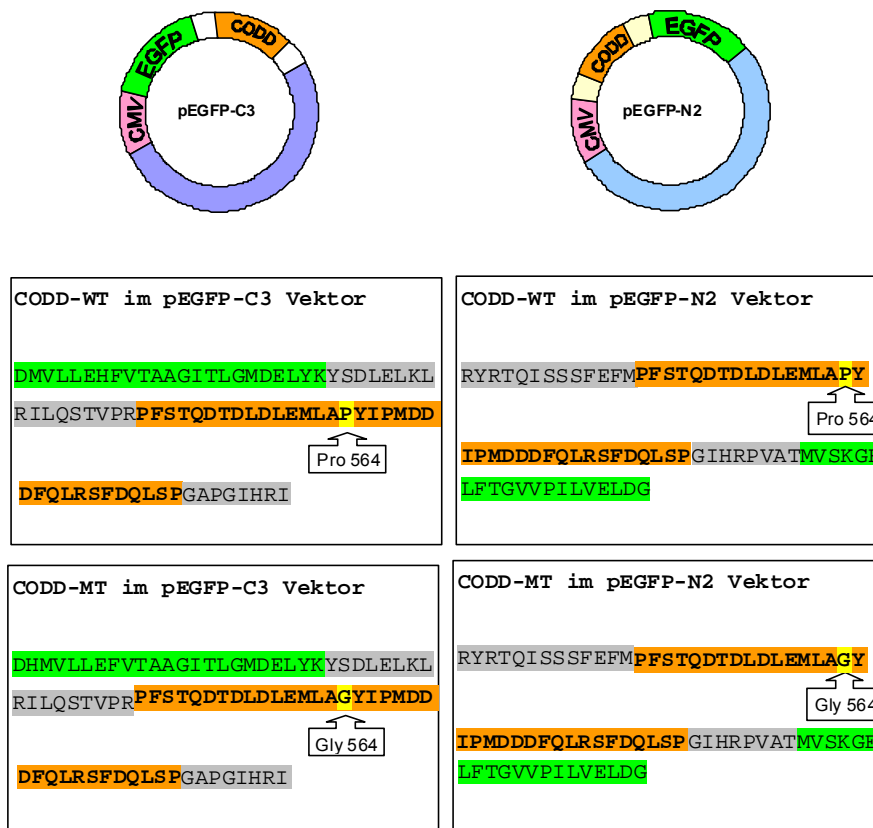
MCS: Multiple Cloning Site, EGFP: enhanced green fluorescent protein, PCR: Polymerasekettenreaktion

Um zu zeigen, dass die NODD- bzw. CODD-Domänen korrekt in die Plasmide inkloniert worden waren, wurden diese sequenziert (vgl. 3.1.11). Die Sequenzierung diente der Überprüfung der Konstruktion und zeigte, dass die inklonierten Sequenzen im *open reading frame* (im gleichen Leserahmen) mit eGFP im pEGFP-C3 bzw. -N2 Vektor eingebaut worden waren. Die Sequenzen konnten nun mittels der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) des *National Institutes of Health* (NIH) im Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) durch einen sogenannten Blast mit den Sequenzen einer nicht redundanten Datenbank verglichen werden. Durch die Übersetzung der DNA- in die Aminosäure-Sequenz konnten auch die Mutanten der CODD- bzw. NODD-Domänen, welche jeweils eine Punktmutation an einem spezifischen Prolinrest aufweisen (P402A-NODD und P564G-CODD), von den in dieser Arbeit als Wildtyp-Domänen bezeichneten Sequenzen unterschieden werden. Siehe hierzu Abbildungen 9 und 10.



**Abb. 9:** Darstellung der Aminosäuresequenzen der NODD-Wildtyp und Mutanten Domäne im pEGFP-C3, bzw. pEGFP-N2 Vektor. Die eGFP codierende Sequenz ist grün hinterlegt, die Multiple Cloning Site (MCS) der jeweiligen Vektoren ist grau hinterlegt und die NODD-Domäne ist rot markiert. Die gelb hinterlegten Aminosäuren kennzeichnen den spezifischen Prolinrest 402 (Pro 402), bzw. die Mutation zu Alanin 402 (Ala 402).





**Abb. 10:** Darstellung der Aminosäuresequenzen der CODD-Wildtyp und Mutanten Domäne im pEGFP-C3, bzw. pEGFP-N2 Vektor. Die eGFP codierende Sequenz ist grün hinterlegt, die Multiple Cloning Site (MCS) der jeweiligen Vektoren ist in der Sequenz grau hinterlegt und die CODD-Domäne ist orange markiert. Die gelb hinterlegten Aminosäuren kennzeichnen den spezifischen Prolinrest 564 (Pro 564) bzw. die Mutation zu Glycin 564 (Gly 564).

#### 4.2 Etablierung der Nucleofector™ Technologie in primären Cortexneuronen

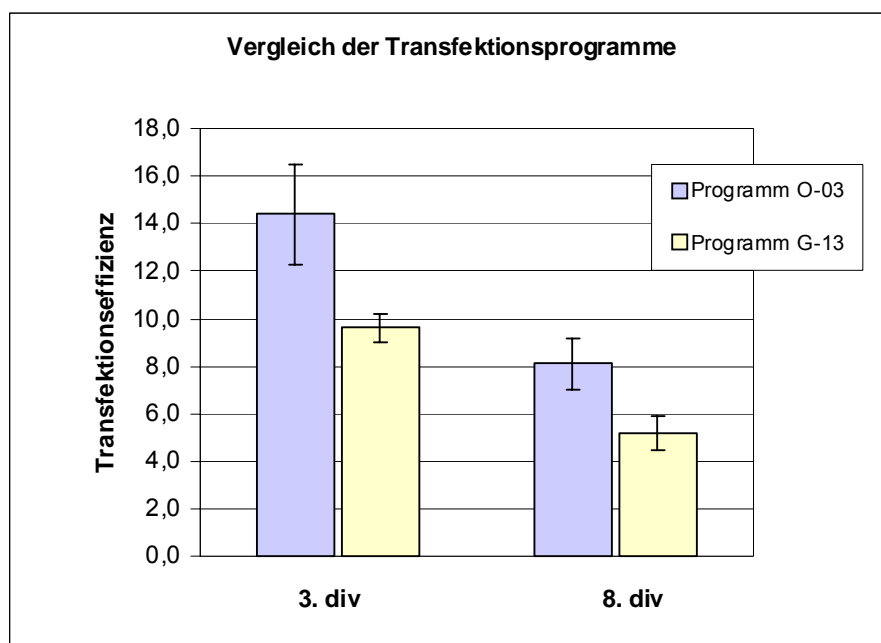
Bei der Beurteilung der Transfektionen von verschiedenen Zellkulturexperimenten ist es wichtig, die Transfektionseffizienz zu kennen. Unter der Transfektionseffizienz versteht man die Rate der eGFP exprimierenden und damit in diesem Fall grün fluoreszierenden lebenden Zellen zu den lebenden nicht transfizierten, das heisst nicht fluoreszierenden Zellen. Die Unterscheidung kann mit Hilfe eines Fluoreszenz- bzw. Lichtmikroskops vorgenommen werden.

Die *Nucleofector™* Technologie von Amaxa (vgl. 3.2.2) war zu Beginn der durchgeführten Experimente neu entwickelt worden und musste mit Hilfe der empfohlenen pEGFP-C1 bzw. -N1 Vektoren für die Verwendung von primären

Cortexneuronen und OGD-Experimente etabliert werden (Gresch et al., 2004). Das Nucleofection Kit besteht aus einer auf den Zelltyp abgestimmten Kombination aus spezifischer Transfektionslösung und spezifischem elektrischen Stromimpuls. Diese beiden Parameter wurden bei der Etablierung der Transfektionsmethode nicht verändert. Alle weiteren Faktoren, die Einfluss auf die Transfektionseffizienz nehmen konnten, wie z.B. die Anzahl der Neuronen oder die Menge an Plasmid-DNA pro Transfektion, wurden im Verlauf optimiert. Ziel dieser Optimierung war es, die Reaktionsbedingungen zu finden, bei der nach zehn Tagen *in vitro* stabile Transfektionsraten und reproduzierbare Messergebnisse erzielt werden konnten.

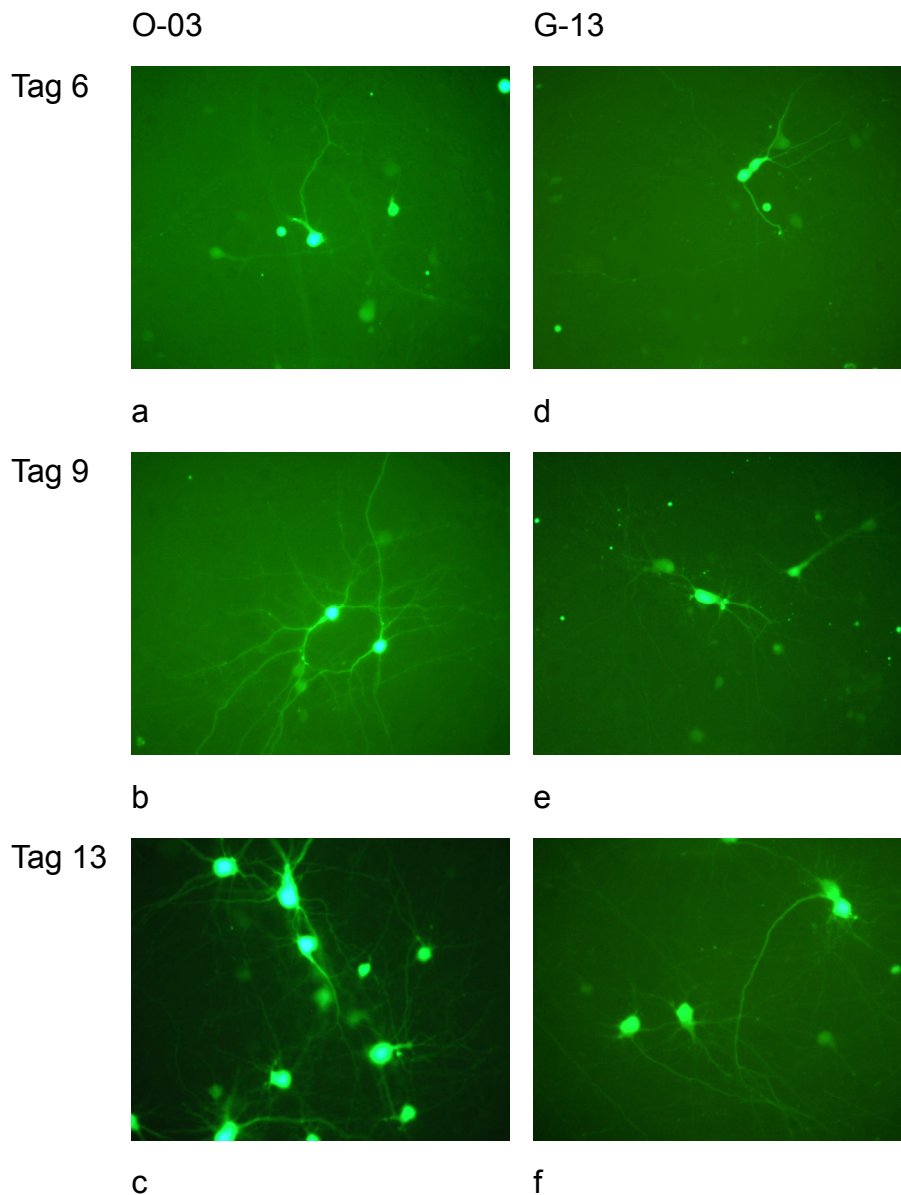
#### 4.2.1 Vergleich verschiedener Transfektionsprogramme

Die beiden von Amaxa für primäre Cortexneuronen der Ratte empfohlenen Transfektionsprogramme G-13 und O-03 unterscheiden sich bezüglich ihrer Stromimpulslänge und -intensität. Um herauszufinden, wie sie sich auf die Transfektionseffizienz der primären Rattenneuronen auswirken und welches Programm für unseren Versuchsaufbau besser geeignet war, wurden die beiden Programme miteinander verglichen.



**Abb. 11:** Transfektionseffizienz primärer Cortexneuronen transfiziert mit unterschiedlichen Transfektionsprogrammen. Pro Transfektionsansatz wurden jeweils 2,5 µg pEGFP-C1 Vektor und  $3 \times 10^6$  primäre Cortexneuronen verwendet. Am 3. und am 8. Tag *in vitro* (3. div, bzw. 8. div) wurden Neuronen in 6 Gesichtsfeldern und 3 unterschiedlichen wells bei 400 facher Vergrößerung ausgezählt.

Die Zellzählungen am dritten und achten Tag *in vitro* ergab eine höhere Transfektionsrate bei Verwendung des Programms O-03 (vgl. Abb. 11).



**Abb. 12:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von primären transfizierten Cortexneuronen am Tag 6, 9 und 13 *in vitro*. Transfektionsprogramme O-03 und G-13 im Vergleich. Tag 6 (a, d), 9 (b, e), und 13 (c, f) *in vitro*. Transfektionsprogramm O-03 (a, b, c), Transfektionsprogramm G-13 (d, e, f). Transfektionsbedingungen: 6  $\mu\text{g}$  pEGFP-N1 Vektor,  $3 \times 10^6$  Zellen/Transfektionsansatz, 100 fache Vergrößerung.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 12 zeigen, dass Neuronen, welche mit dem Programm O-03 transfiziert wurden, vitaler erscheinen und ein ausgeprägteres Netzwerk bilden als Neuronen, bei denen das Programm G-13

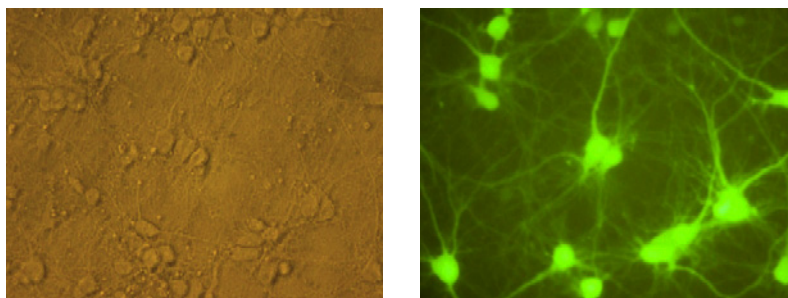
verwendet wurde. Aufgrund dieser Erfahrung wurde im Weiteren das Transfektionsprogramm O-03 verwendet.

#### 4.2.2 Variationen der Zellmenge

Die Neuronenanzahl wurde an 2 verschiedenen Ansatzpunkten variiert: zum einen wurden unterschiedliche Aussaatdichten in der Zellkultur und zum anderen unterschiedliche Zellmengen pro Transfektionsansatz verwendet.

##### 4.2.2.1 Variation der Aussaatdichte

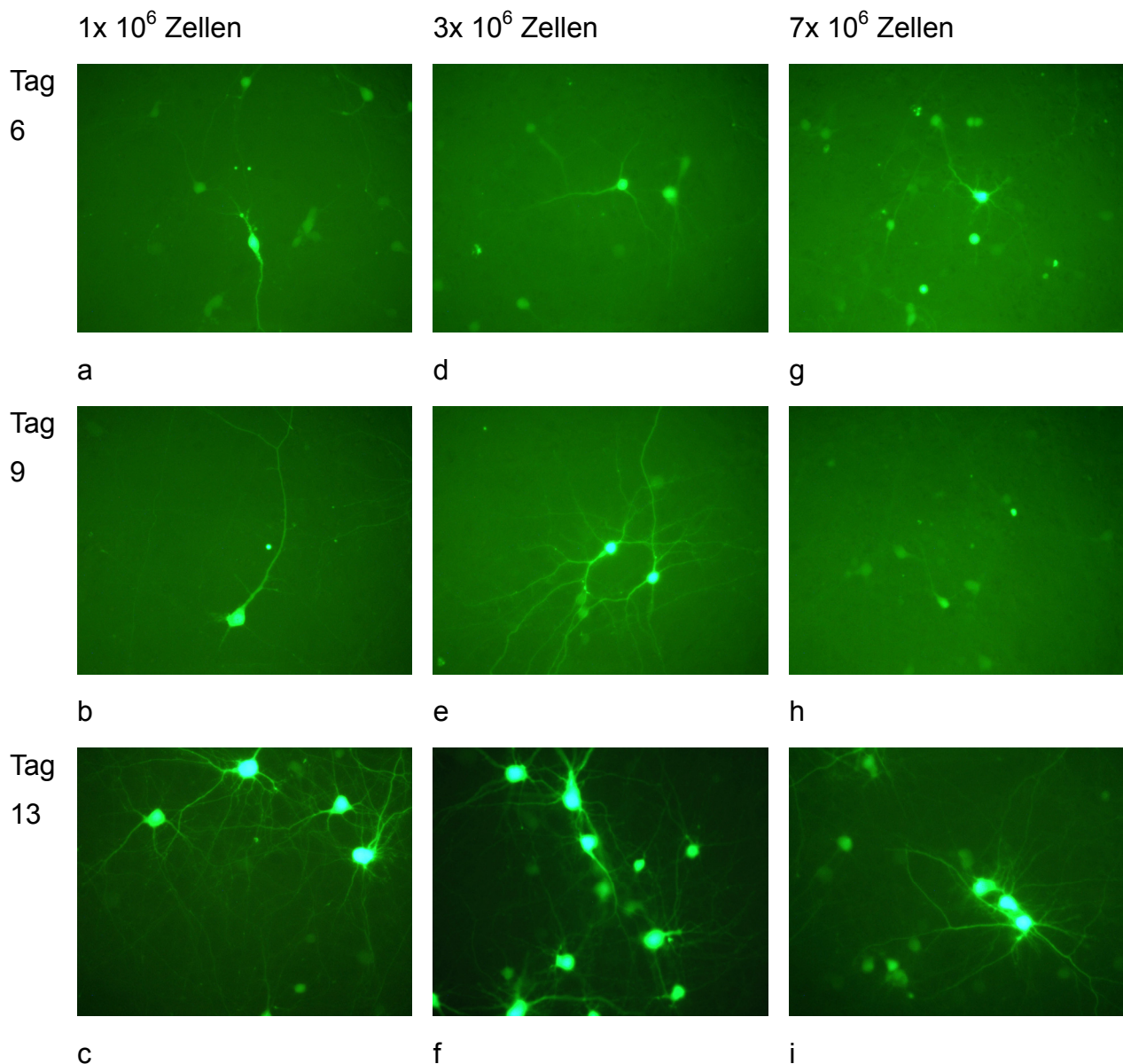
Wie durch Transfektionsversuche von Mertz et al. 2002 bereits beschrieben wurde, sterben durch Anwendung elektrischer Impulse und folgenden Manipulationen viele Zellen. Unsere Konsequenz daraus war, dass wir doppelt so viele Neuronen ausgesät haben als bei neuronaler Zellkultur ohne Transfektion (Mertz et al., 2002). Eine hohe Aussaatdichte stellte einen wichtigen Parameter für gute Transfektionseffizienzen und Überlebensraten der Neuronen dar (vgl. Martinez und Hollenbeck, 2003). Die primären Cortexneuronen wurden in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen pro  $100\mu\text{l}$  Transfektionslösung aufgenommen und in unterschiedlichen Aussaatdichten aufgetragen. Es zeigte sich, dass sich eine Aussaatdichte von 300.000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  zur Durchführung des OGD-Versuchs am zehnten Tag *in vitro* eignete. Abbildung 13 zeigt Bilder von Zellen in der optimalen Aussaatdichte von 300.000 Zellen/ $\text{cm}^2$ .



**Abb. 13:** Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme primärer Cortexneuronen am 10. Tag *in vitro* in einer Aussaatdichte von 300.000/ $\text{cm}^2$ , transfiziert mit dem pEGFP-C1 Vektor, 100- bzw. 400-fache Vergrößerung.

#### 4.2.2.2 Variation der Zellmenge pro Transfektionsansatz

Mit dem Ziel, Plasmid-DNA in möglichst hoher Konzentration in primäre Cortexneuronen zu transfizieren, wurde sukzessive die verwendete Zellmenge gesteigert. Für die vorliegenden Experimente erwiesen sich  $3 \times 10^6$  Zellen pro Transfektionsansatz als optimal.

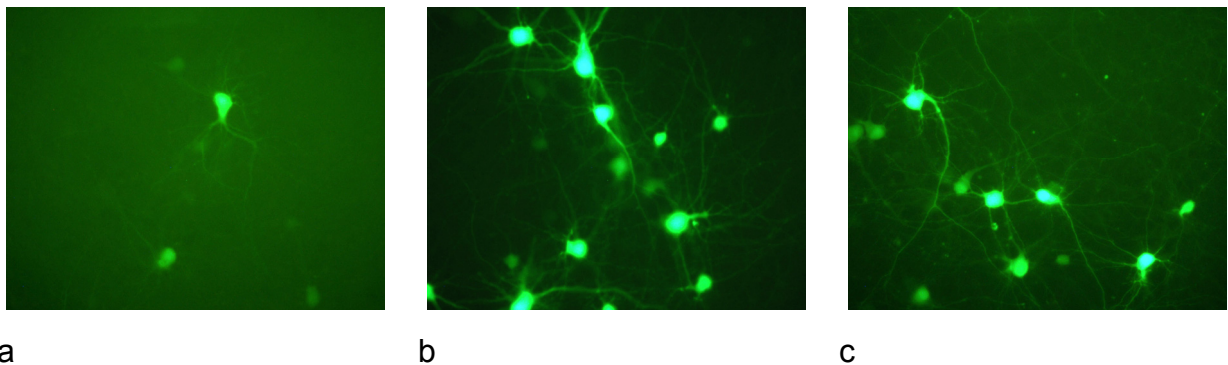


**Abb. 14:** Variation der Zellmenge pro Transfektionsansatz. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von primären Cortexneuronen am 6., (a, d, g) 9. (b, e, h) und 13. Tag (c, f, i) *in vitro*. Mit jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen (a-c),  $3 \times 10^6$  Zellen (d-f) und  $7 \times 10^6$  Zellen (g-i). 100 fache Vergrößerung.

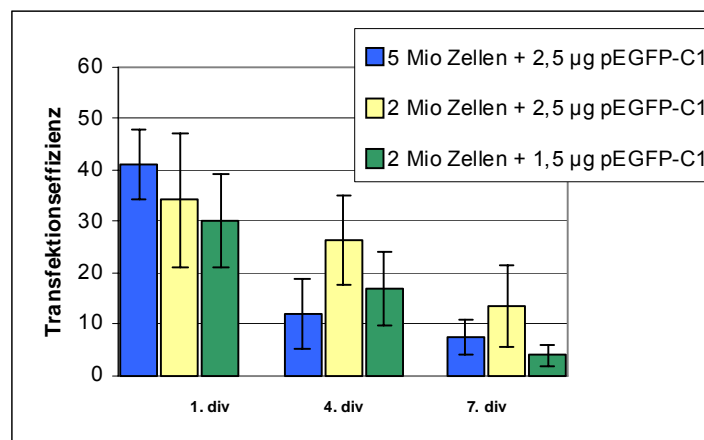


### 4.2.3 Variation der Plasmid-DNA Menge

Neben der Zellmenge pro Transfektionsansatz (Konzentration) und der Ausplattierungsdichte der primären Cortexneuronen ist der zweite wichtige Einflussfaktor der Transfektionseffizienz die Plasmid-DNA. Nicht nur die Menge an DNA, sondern auch ihre Reinheit war von großer Bedeutung für die Transfektion. Da Verunreinigungen der Plasmide mit Endotoxinen die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen, wurde die DNA Endotoxin-frei aufgereinigt (Tim et al., 2005). Zur Etablierung wurden DNA Mengen zwischen 1,5 µg und 18 µg pro Transfektionsansatz getestet, die entsprechend den Angaben des Herstellers Amaxa in höchstens 5 µl TE-Puffer gelöst waren. In den vorliegenden Versuchen etablierte sich 1,2 µg/µl als optimale Plasmid-DNA Konzentration. Siehe hierzu auch Abbildung 15. Bei diesen Ansätzen wurden unterschiedliche Plasmid-DNA Mengen verwendet.



**Abb. 15:** Variation der Plasmid-DNA Menge (pEGFP N1 Vektor). Transfektion primärer Cortexneuronen mit a) 1 µg, b) 6 µg und c) 10 µg. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen am 13. Tag *in vitro*. 100-fache Vergrößerung.



**Abb.16:** Kombiniertes Etablierungsversuch: Transfektionseffizienzen von primären Cortexneuronen unter Variation der Plasmid-DNA Menge (pEGFP-C1 Vektoren) und Zellmenge pro Transfektionsansatz. Auszählung von jeweils 10 Gesichtsfeldern und 3 wells am Tag 1, 4 und 7 *in vitro* (1.div, 4. div, 7. div).

Wie in Abbildung 16 dargestellt, wurde bei diesem Etablierungsversuch die eingesetzte Zellzahl und die Menge der verwendeten pEGFP Vektoren variiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Überlebensraten der primären Cortexneuronen durch die Kombination von eingesetzter Plasmid-DNA und Zellmenge beeinflusst werden. Über sieben Tage betrachtet erzielte die Kombination von  $2 \times 10^6$  Zellen und 2,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA die höchste Transfektionseffizienz. Die Kombination aus  $5 \times 10^6$  Zellen und 2,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA konnte am 1. Tag *in vitro* mit über 40% die höchsten Transfektionseffizienz erzielen, erwies sich jedoch über den längeren Zeitraum als instabil.

#### 4.2.4 Einfluss der verwendeten Zellkulturmedien

Um das Überleben der Zellen zu verbessern, die Entwicklung eines neuronalen Netzwerks zu fördern und eine möglichst reine Neuronenkultur zu erzeugen, wurden verschiedene Medien, Mischungsverhältnisse und diverse Kombinationen von Medienwechseln getestet. Die drei verwendeten Medien DMEM, NBM und NBM-A (vgl. 2.6.2 und 2.6.3) unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung an Salzen, essentiellen Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, Nährstoffen, Vitaminen, Antioxidantien, Enzymen und anderen Zusatzstoffen. Der wichtigste Unterschied zwischen DMEM und den Neurobasal-Medien (NBM und NBM-A) ist der Zusatzstoff fetales Kälber-Serum (FKS), der nur im DMEM enthalten ist. Durch das Serum in der Kultur wird die Proliferation glialer Zellen gefördert. In Kulturen, die nur NB-Medium enthalten, wird das Wachstum von Gliazellen hingegen fast vollständig unterdrückt (Brewer et al., 1993) und nach 14 Tagen *in vitro* beträgt der Anteil an Astroglia bei isolierter Verwendung von NB-Medium weniger als 10% (Lautenschlager et al., 2000).

In den Versuchen stellte sich heraus, dass transfizierte Zellen bessere Überlebensraten zeigten, wenn eine Kombination aus serumhaltigen und serumfreien Medien verwendet wurde. Beim ersten Mediumwechsel wurde das Startermedium gegen serumhaltiges Medium ausgetauscht (siehe auch Tabelle 2), welches die Entwicklung von Astroglia fördert. Durch einen Wechsel 15 Stunden später zu serumfreiem Medium wurde die Entwicklung jedoch limitiert und durch diese optimale Kombination der verschiedenen Medien eine nahezu homogene Neuronenkultur und gleichzeitig gute Überlebensraten

der transfizierten Neuronen erreicht. Durch die Verwendung eines konditionierten Mediums, das bereits für mehrere Tage zur Kultivierung von primären Cortexneuronen genutzt worden war (vgl. 2.6.3), konnte die Überlebensrate der transfizierten Neuronen zusätzlich verbessert werden.

Verschiedene Medien und deren Wechsel in verschiedenen Kombinationen wurden in weiteren Versuchen getestet, von denen eine Versuchsreihe in folgender Tabelle dargestellt ist.

Aussaatmedium	DMEM			
<b>1. Mediumwechsel</b>	kond. DMEM		kond. NBM-A	kond. NBM
<b>2. Mediumwechsel</b>	kond. NBM-A	kond. NBM	-	-
<b>3 + 4. Mediumwechsel</b>	NBM-A + B-27 (50% frisch 50% kond.)			
<b>Transfektionseffizienz (5. div)</b>	28,1%	26,6%	22,7%	22,7%

**Tab. 2:** Medienkombinationen und Auswirkungen auf die Transfektionseffizienz am 5. Tag *in vitro* (5. div)

Die primären Cortexneuronen wurden zunächst in DMEM ausgesät.

Bereits 24 Stunden nach der Transfektion zeigten die Zellen, deren Medium beim ersten Wechsel gegen konditioniertes DMEM ausgetauscht wurde, eine gute Differenzierung und im weiteren Verlauf des Versuchs eine bessere Vitalität und Netzwerkbildung als die Zellen, die konditioniertes NBM bzw. NBM-A (serumfreies Medium) erhalten hatten. Zwischen den Zellen, die in NBM bzw. NBM-A kultiviert wurden, konnten keine wesentlichen Unterschiede im Zellbild und in der Transfektionseffizienz beobachtet werden. Die höchsten Transfektionseffizienzen zeigten die Zellen, welche beim ersten Mediumwechsel konditioniertes DMEM und beim zweiten Mediumwechsel konditioniertes NBM-A erhalten hatten. Diese Kombination wurde für alle weiteren Transfektionsversuche verwendet.

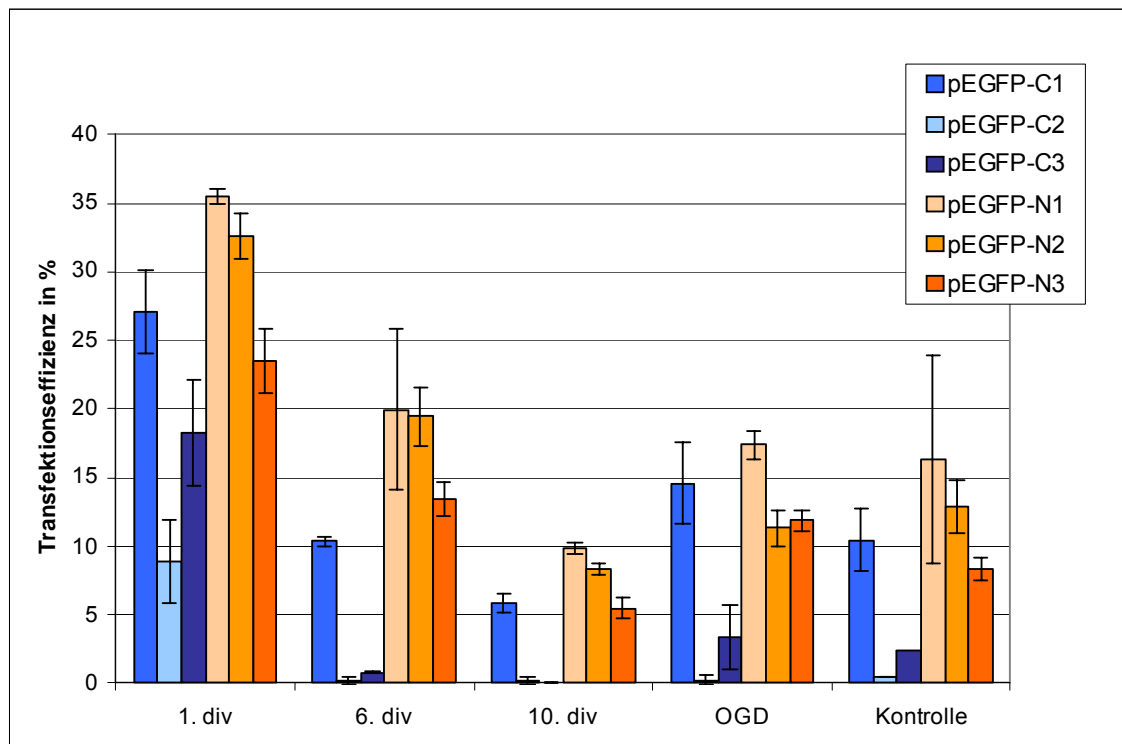
#### 4.2.5 Vergleich der verwendeten Vektoren

Durch Optimierung der Zellzahl, der Menge an Plasmid-DNA und der Medienwahl konnten an den ersten Tagen nach Transfektion Transfektionsraten von mehr als 30% erreicht werden. Bis zum neunten bzw. zehnten Tag *in vitro* starben jedoch so viele



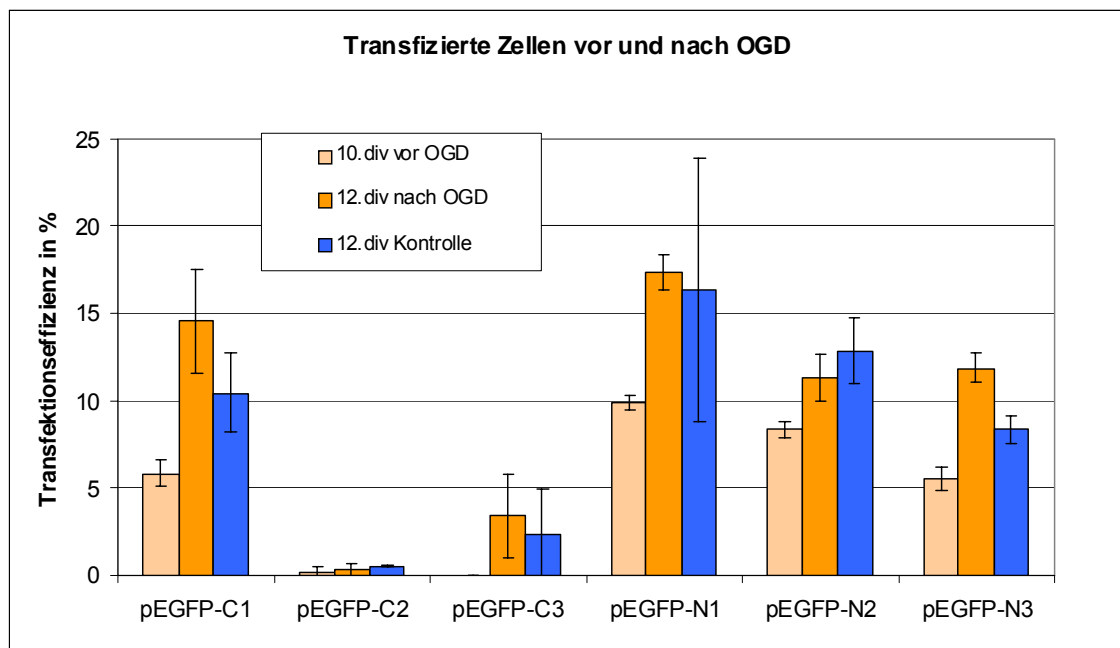
Zellen, dass sich mit der geringen Anzahl an lebenden transfizierten Zellen kein aussagekräftiger OGD-Versuch mehr durchführen ließ. Abgesehen von der Apoptose, die sowohl transfizierte als auch nicht-transfizierte Neurone betraf, war die Sterberate der transfizierten Zellen weitaus höher als die der nicht-transfizierten Zellen. Zur Klärung dieses Zellverlusts wurden verschiedene Versuchsbedingungen im Ausschlussverfahren überprüft. Um herauszufinden, ob die verwendeten Plasmid-Vektoren einen negativen Einfluss auf das Überleben der primären Neuronen hatten, wurde eine Transfektion sämtlicher Leervektoren der pEGFP-C1-3 und pEGFP-N1-3 Reihe durchgeführt. Da der Unterschied zwischen den pEGFP-Vektoren der C- bzw. N-Reihe in der Anordnung der eGFP-codierenden Sequenz liegt und die pEGFP-Vektoren der C-1-3 bzw. N-1-3 sich nur durch wenige DNA Basen in der Multiple Cloning Site unterscheiden (siehe hierzu auch Abb. 9 und 10), schien dieser Einflussfaktor zunächst eher unwahrscheinlich. Die stark divergierenden Überlebensraten der Leervektoren zeigten jedoch, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit der Neuronen wesentlich von der Wahl des pEGFP-Vektors abhängt.

Im Versuch wurden alle pEGFP-Vektoren unter gleichen Bedingungen kultiviert und über einen Zeitraum von zwölf Tagen beobachtet. Die Neuronen wurden digitalisiert und am Tag eins, sechs, zehn und zwölf gezählt und beurteilt. Am zehnten Tag *in vitro* wurde mit der Hälfte der Neuronen ein OGD-Versuch durchgeführt. Als Kontrolle wurde die andere Hälfte der Neuronen in einen normoxischen Inkubator gegeben und mit einer BSS<sub>20</sub>-Lösung versehen. Die lebenden transfizierten Zellen wurden zu den lebenden nicht-transfizierten Zellen des ersten Tags *in vitro* ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse des Versuchs sind der Abbildung 17 zu entnehmen. Am ersten Tag *in vitro* ergaben sich bereits für die einzelnen Vektoren unterschiedliche Transfektionseffizienzen. Sie zeigten eine Varianz von 35% für den N1-Vektor und 8% für den C2-Vektor. Die Rate der lebenden fluoreszierenden Zellen nahm bei allen Vektoren bis zum OGD-Versuch am zehnten Tag *in vitro* stetig ab. Insgesamt hatten alle Zellen, welche mit den pEGFP Vektoren der C-Reihe transfiziert worden waren, eine wesentlich schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Neuronen, bei denen Vektoren der N-Reihe verwendet wurden. Am Ende des Zeitraums dieses Etablierungsversuchs (am zwölften Tag *in vitro*) wiesen Neuronen, die mit dem N1-Vektor transfiziert worden waren, die höchste Überlebensrate auf.



**Abb. 17:** Transfektion von primären Cortexneuronen mit den pEGFP-Vektoren C1-3 und N1-3. Darstellung der Transfektionseffizienzen am Tag 1, 6, 10 und 12 *in vitro* (1.-10. div, OGD und Kontrolle). Kontrollierter OGD-Versuch am 10. Tag *in vitro*. Unter OGD und Kontrolle sind Transfektionseffizienzen des 12. Tages *in vitro* aufgeführt. Ausgezählt wurden jeweils 12 Gesichtsfelder pro Transfektionsansatz. 2 voneinander unabhängige Experimente.

In Abbildung 18 wurden die Verhältnisse am zehnten und zwölften Tag *in vitro* (vor und 48 Stunden nach OGD) in Abhängigkeit vom jeweiligen pEGFP-Vektor miteinander verglichen. Der Graphik ist zu entnehmen, dass bei allen Vektoren die Überlebensrate am Tag zehn *in vitro* am niedrigsten war. Am zwölften Tag *in vitro* stiegen die Überlebensraten sowohl bei den Neuronen, mit denen ein OGD-Versuch durchgeführt wurde, als auch bei den Neuronen, die mit der BSS<sub>20</sub>-Lösung versetzt wurden, nochmals an. Es ist möglich, dass dieser „scheinbare Anstieg“ der Überlebensraten durch den CMV betriebenen Promotor der pEGFP-Vektoren verursacht wurde. Der CMV-Promotor kann unter zellulärem Stress, insbesondere bei Transfektion und unter OGD-Bedingungen, einen Expressionsanstieg der Proteine auslösen (Kawabata et al., 2004).



**Abb. 18:** Transfektion von primären Cortexneuronen mit den pEGFP-Vektoren C1-3 und N1-3. Darstellung der Transfektionseffizienzen am Tag 10 und 12 *in vitro*. Kontrollierter OGD-Versuch am 10. Tag *in vitro*. Ausgezählt wurden jeweils 12 Gesichtsfelder pro Transfektionsansatz. 2 voneinander unabhängige Experimente.

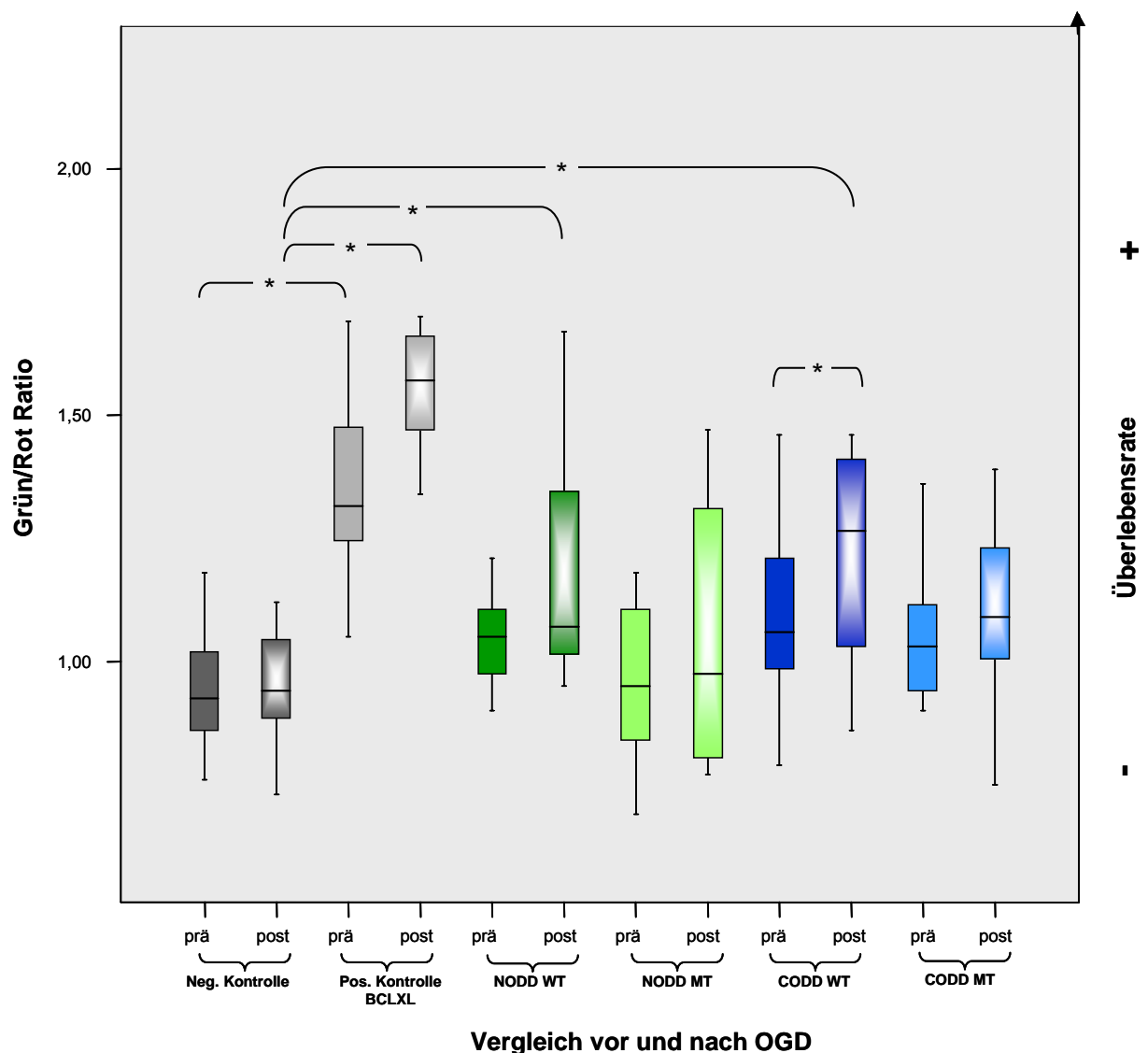
Als Resultat dieser Etablierungsreihe konnte festgehalten werden, dass Vektoren der pEGFP-C Reihe sich weitaus schlechter für den vorliegenden Versuchsablauf eignen als die Vektoren der N-Reihe. Da sowohl die N- als auch die C-Reihe von einem CMV-Promotor betrieben wird, der ein anzunehmender Grund für das erneute Ansteigen der Transfektionsrate am Tag 12 ist, wurde von diesem CMV betriebenen Vektor auf einen  $\beta$ -Actin Promotor betriebenen pDRIVE-CAG Vektor gewechselt. Die niedrigen Transfektionsraten bereits vor dem OGD-Versuch, schränkte die Aussagekraft dieser Experimente stark ein. Dies und die fraglich toxischen Einflüsse der Fusionsproteine veranlassten uns die Transfektionsstrategie zu verändern. Um die Fusion der NODD- und CODD-Domänen mit den Fluoreszenzproteinen zu umgehen, etablierten wir eine Kotransfektionsmethode, bei der das zu untersuchende Gen und das Fluoreszenzprotein-enkodierende Gen jeweils in einen eigenen Vektor inkloniert wurde und gemeinsam in Neuronen transfiziert wurde. Um transfizierte Neuronen nicht weiter mit nicht-transfizierten Neuronen vergleichen zu müssen, erweiterten wir den Kotransfektionsansatz um den Kokultivierungsansatz. (Bemerkung: diese Methode wurde von Philipp Mergenthaler im Rahmen seiner Doktorarbeit entwickelt und durch mich in meiner Arbeit eingesetzt)

### 4.3 Kotransfektion und Kokultivierung mit GFP und DsRed

Durch die Methode der Kokultivierung und Kotransfektion konnten gezielt die Auswirkungen der transfizierten Gene dargestellt werden. Neuronen, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzproteinen transfiziert und in identischen Bedingungen kultiviert worden waren, wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Bei der Transfektion von Hippocampus-Neuronen mit einer Mischung aus eGFP und DsRed Plasmiden, kam es 24 Stunden nach der Transfektion in 88% zur Koinzidenz von grüner und roter Fluoreszenz in den transfizierten Zellen. Es konnte somit effiziente Ko-Expression der Gene gezeigt werden (Dityateva et al., 2003). Ähnliche Ko-Expressionsraten der beiden Markerproteine von ca. 90% konnten auch in Etablierungsversuchen der Methode erzielt werden.

In Graphik 19 ist die Überlebensrate von transfizierten primären Cortexneuronen als Verhältnis von grün- zu rot-fluoreszierenden Zellen am Tag 10 bzw. 11 *in vitro* kurz vor und 24 Stunden nach einem OGD-Experiment dargestellt. Als Negativkontrolle dienten primäre Cortexneuronen, die jeweils mit einem GFP- und DsRed-Vektor transfiziert und miteinander kultiviert worden waren. Als Positivkontrolle wurde das als neuroprotektiv bekannte Bcl-x<sub>L</sub>-Gen gemeinsam mit einem GFP-encodierenden Vektor in primäre Cortexneuronen transfiziert und mit DsRed-encodierenden Neuronen kokultiviert. Die zu untersuchenden NODD- und CODD-Domänen wurden jeweils in der Wildtyp- und Mutantenversion gemeinsam mit GFP transfiziert und mit DsRed kokultiviert. Zur Auswertung der ausgezählten grün- und rot-fluoreszierenden Neuronen wurden die Transfektionsraten zueinander ins Verhältnis gesetzt (grün/rot Ratio). Durch statistische Auswertung und Anwendung eines post-hoc LSD Test (LSD steht für least significant difference) wurde diese Graphik erstellt.



**Abb. 19:** Darstellung von Kokultivierungs- und Kotransfektionsversuchen von primären Cortexneuronen mit DsRed und GFP vor (prä) und nach (post) OGD-Experiment (Sauerstoff-Glucose Entzug).

Dargestellt sind die Überlebensraten aufgeführt als Grün/Rot Ratio von transfizierten primären Cortexneuronen mit verschiedenen Vektoren. Folgende Kotransfektionen bzw. Transfektionen wurden zur Kokultivierung mit DsRed im pDRIVE CAG Vektor verwendet: Negativkontrolle (Neg. Kontrolle): GFP; Positivkontrolle (Pos. Kontrolle): , GFP und Bcl-x<sub>L</sub>; NODD WT: GFP und NODD-Wildtyp Domäne; NODD MT: GFP und NODD-Mutanten Domäne; CODD WT: GFP und CODD-Wildtyp Domäne, CODD MT: GFP und CODD-Mutanten Domäne. 4 voneinander unabhängige Versuche, Tag 10 bzw. 11 *in vitro*, kurz vor und 24 h nach einem im Durchschnitt 2h 45min langen OGD-Versuch.

Das Gen Bcl-x<sub>L</sub> als bekanntes anti-apoptisches Gen verbesserte bereits vor einem Sauerstoff-Glucose Entzug die Überlebensratio der Neuronen signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle. Nach einem OGD-Versuch verschob sich das Verhältnis zwischen grün und rot fluoreszierenden Zellen signifikant auf die Seite der grünen Zellen, welche mit Bcl-x<sub>L</sub> kotransfiziert worden waren. Neuronen haben durch die erfolgreiche

Transfektion mit Bcl-x<sub>L</sub> und dessen Expression einen Überlebensvorteil gegenüber Zellen, welche nur mit DsRed transfiziert wurden. Die Neuronen, welche mit der NODD-Wildtyp Domäne transfiziert worden waren, wiesen gegenüber der Negativkontrolle nach dem OGD-Versuch einen signifikanten Anstieg der grün/rot Ratio auf. Nach dem OGD-Experiment verschob sich die Ratio in Richtung der grün fluoreszierenden Neuronen, dieser Anstieg der grün fluoreszierenden Zellen, welche mit der NODD Wildtyp Domäne kotransfiziert wurden, war jedoch in dieser statistischen Auswertung knapp nicht signifikant ( $p=0,059$ ). Die transfizierten Neuronen mit der NODD Mutanten Domäne wiesen kein signifikant verbessertes neuronales Überleben vor und nach einem Sauerstoff-Glukose Entzug auf. Die mit der CODD-Wildtyp Domäne transfizierten Zellen zeigten eine signifikant verbesserte Überlebensrate nach einem OGD-Versuch. Auch im Vergleich zur grün/rot Ratio der Negativkontrolle war die Überlebensratio signifikant im Vergleich zur CODD-Wildtyp Domäne. Die transfizierten Neuronen mit der CODD-Mutanten Domäne, welche sich nur in einer Punktmutation am spezifischen Prolinrest P564 von der Wildtyp Domäne unterscheidet, differierten weder vor einem OGD-Versuch noch nachher in der Überlebensrate signifikant von der Negativkontrolle. Der Nachweis der verbesserten Überlebensrate von Neuronen, welche mit den CODD-Wildtyp Domänen transfiziert wurden, erwies sich somit als spezifisch.

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Obwohl Elektroporation als eine erfolgversprechende Transfektionsmethode gilt, gibt es bis jetzt relativ wenige Publikationen, die diese Methode bei primären Cortexneuronen erfolgreich angewendet haben. Die Transfektionsmethode basierend auf der Nucleofection Technologie™ von Amaxa konnte nach Etablierung modifiziert und erweitert werden. Als optimale Transfektionsbedingungen ergaben sich für den relativ langen Versuchsverlauf von 11 Tagen eine Zellmenge von  $3 \times 10^6$  Neuronen pro Transfektionsansatz, die mit  $6\mu\text{g}$  Plasmid-DNA transfiziert und in einer Aussaatdichte von ca.  $3 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}$  kultiviert wurden. Zur Kultivierung der Zellen eigneten sich besonders Nährmedien, welche bereits in vorbereitenden Versuchen als Nährmedien von Neuronen verwendet worden waren (sog. konditionierte Medien). Mit der erweiterten und modifizierten Methode der Kokultivierung und Kotransfektion konnte

---

eine stabile Transfektionsstrategie etabliert werden, welche eine Untersuchung von putativ neuroprotektiven Genen im *in vitro* Modellversuch des ischämischen Schlaganfalls ermöglichte (Sauerstoff-Glukose Deprivationsversuch). Es konnte gezeigt werden, dass durch Transfektion der CODD- und wahrscheinlich auch der NODD-Domänen Neuroprotektion von primären Cortexneuronen erzielt werden kann. Diese beiden Domänen enthalten jeweils Gene, welche den sauerstoffregulierenden Abschnitt mit den spezifischen Prolinresten 402 und 564 von HIF-1 $\alpha$  encodieren. Durch eine Überexpression der 34 Aminosäuren encodierenden CODD-Domäne, welche den spezifischen Prolinrest 564 enthält konnte im vorliegenden Versuch eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate von primären Cortexneuronen der Ratte erreicht werden. Die 74 Aminosäuren encodierende NODD-Domäne, welche den spezifischen Prolinrest 402 enthält, konnte ebenso das Überleben der transfizierten Zellen verbessern, jedoch nicht signifikant gegenüber der initialen Überlebensratio. Dieser neuroprotektive Effekt war spezifisch, da mit den durch Punktmutation an den beiden spezifischen Prolinresten veränderten NODD- bzw. CODD-Mutanten keine Verbesserung der Überlebensratio erreicht werden konnte.

## 5 Diskussion

In der Diskussion wird zunächst die verwendete Methode, die Transfektion von primären Cortexneuronen mittels Elektroporation und anschliessend der Transkriptionsfaktor HIF-1 und dessen potentiellen neuroprotektiven Eigenschaften diskutiert.

### 5.1 Transfektion primärer Cortexneuronen

Zur Transfektion postmitotischer Zellen gibt es verschiedene Möglichkeiten, die sich durch ihre Vorgehensweise und ihre Transfektionseffizienzen unterscheiden. Aufgrund der spezifischen Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden sollte zu den Versuchsbedingungen individuell die passende Transfektionsmethode gewählt werden (Slack und Miller, 1996). Neben viralen Transfektionsmethoden existieren sogenannte nicht-virale Transfektionsmethoden, die sich in chemische, physikalische und elektrische Methoden weiter unterteilen lassen. Zusammenfassend siehe hierzu Tabelle 3 und 4 mit einem Überblick zu den Transfektionsmöglichkeiten primärer Neuronen.

Von den oben genannten Transfektionsmethoden werden mit Hilfe viraler Vektoren die höchsten Transfektionsraten von über 90% erzielt. Die seit Mitte der 1980er Jahren angewandte Methode profitiert von der Eigenschaft der Viren, ihre DNA bzw. RNA in Wirtszellen einzubringen und dort zu exprimieren (als Review: Washbourne und McAllister, 2002). Virale Transfektion ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* anwendbar (Geller et al, 1988). Die hohen Transfektionsraten müssen jedoch gegenüber der potentiellen Toxizität für die verwendeten Neuronen, die bestehende Größenbegrenzung der zu transfizierenden DNA-Sequenz, die potentiellen Sicherheitsrisiken für das Personal und der zeit- und kostenintensiven Herstellung eines rekombinanten viralen Vektors abgewogen werden (Ehrenguber et al., 2001). Außerdem ist zu bedenken, dass bei der Verwendung von viralen Vektoren metabolische Prozesse, wie beispielsweise die Proteinprozessierung gestört werden können (Wu et al., 1998; Nilsson et al., 1998).



Rekombinante virale Vektoren						
	HSV	AdV	AAV	Lenti	Vaccinia	Sindbis/SFV
<b>Effizienz</b>	hoch	mäßig für Neuronen, hoch für Glia	hoch	Hoch	hoch	am höchsten
<b>Expression</b>	hoch	niedrig	hoch	Hoch	hoch	hoch
<b>Beginn der Expression</b>	Stunden	Tage	Wochen	Tage	Stunden	Stunden
<b>Verhältnis Neuronen/Glia</b>	hoch	niedrig	hoch	Niedrig	niedrig	hoch
<b>Gezielte Expression</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Einzelneuron</b>	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
<b>Integration</b>	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein
<b>Insert Größengrenzung</b>	< 30 kb	< 7,5 kb	< 5 kb	< 8 kb	< 30 kb	< 6,5 kb
<b>Anwendung</b>						
<b>Dissoziierte Neuronen</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Gewebsschnitt in vivo</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Toxizität/Zelltod</b>	hoch	hoch bei hohen Titern	minimal	minimal	hoch bei Säugetieren	hoch nach 24 h <i>in vitro</i> , 3-5 d Gewebsschnitt, 48-72 h <i>in vivo</i>

**Tab. 3:** Übersicht über die Transfektionsmöglichkeiten postmitotischer Neuronen. HSV: Herpes-Simplex-Virus, AdV: Adenovirus, AAV: Adeno-assoziiertes Virus, Lenti: Lenti-Virus, Vaccinia: Vaccinia-Virus, SFV: Semliki Forest Virus, Modifiziert nach Washbourne und McAllister, 2002.

Nicht-virale Methoden haben eine weitaus niedrigere Transfektionseffizienz (Craig, 1998), sind aber weniger toxisch und einfacher zu handhaben und die Größe des Plasmids ist nicht wie bei der viralen Transfektion limitierend (Alisky et al., 2000; Ehrengruber et al., 2001). Von den nicht-viralen Transfektionsmethoden konnte sich die Elektroporation gegenüber der Calciumphosphat/DNA Koprezipitation, der Verwendung von Liposomen (Lipofektion) und physikalischen Methoden, wie dem ballistischen Gentransfer (Biolistics) oder der Mikroinjektion durchsetzen. Diese Methoden können potentiell toxische Wirkungen auf Neuronen haben und erzielen lediglich Transfektionsraten unter 20% (Washbourne und McAllister, 2002; Berry et al., 2001).

<b>Nicht-virale Transfektions Methoden</b>					
	<b>Ca-Phos</b>	<b>Lipofektion</b>	<b>Mikroinjektion</b>	<b>Biolistics</b>	<b>Elektroporation</b>
<b>Effizienz</b>	niedrig	Niedrig	niedrig	niedrig-mittel	hoch
<b>Expression</b>	mäßig	Mäßig	hoch	mäßig	hoch
<b>Beginn der Expression</b>	Stunden	Stunden	Stunden	Stunden	Stunden
<b>Verhältnis Neuronen/Glia</b>	~1	~1	~1	~1	~1
<b>Gezielte Expression</b>	Nein	Nein	Ja	möglich	Ja
<b>Einzelneuron</b>	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja
<b>Integration</b>	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
<b>Insert Größenbegrenzung</b>	keine	Keine	keine	keine	keine
<b>Anwendung</b>					
<b>Dissoziierte Neuronen</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Gewebsschnitt in vivo</b>	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja
	Nein	Ja	Embryos Oozyten	Nein	Ja
<b>Toxizität/Zelltod</b>	minimal	Variabel	variabel	minimal	minimal

**Tab. 4:** Übersicht über die Transfektionsmöglichkeiten postmitotischer Neuronen. Ca-Phos: Calcium-Phosphat Kopräzipitation. Modifiziert nach Washbourne und McAllister, 2002.

## 5.2 Elektroporation zur Transfektion primärer Cortexneuronen

Die postmitotischen primären Neuronen sind schwierig zu transfizieren. Im Gegensatz zur Transfektion stabiler Zelllinien können postmitotische Zellen auch nicht selektiv vermehrt werden. Viele Methoden, die routinemäßig bei primären nicht-neuronalen Zellkulturen verwendet werden, sind ineffektiv, toxisch oder beides zugleich, wenn sie in neuronaler Zellkultur eingesetzt werden (Martinez und Hollenbeck, 2003).

Die Elektroporation ist eine nicht-virale Transfektionsmethode, die durch stetige Verbesserung der Transfektionsmaterialien und Technik in den letzten 20 Jahren höhere Transfektionsraten als andere nicht-virale Transfektionsmethoden erzielt hat (Gehl et al., 2003). Sie erweist sich als eine schnelle, leicht anwendbare, effektive und sehr gut reproduzierbare Transfektionsmethode primärer Neuronen (Mertz et al., 2002). Vorteile dieser Methode sind die gut kontrollierbaren Versuchsbedingungen bei der Anwendung in neuronaler Zellkultur und die Flexibilität bzw. Vielseitigkeit der Methode. Es können sowohl einzelne Zellen als auch

komplette Gewebsschnitte mit einzelnen oder verschiedenen Konstrukten mittels Elektroporation transfiziert werden (Teruel et al., 1999).

Die exakten biophysikalischen Abläufe der Elektroporation sind noch unbekannt, es gilt aber als wahrscheinlich, dass sich durch das angelegte elektrische Feld das Membranpotential der Zellen so stark erhöht, dass sich vorübergehend metastabile Poren bzw. Kanäle unterschiedlichen Durchmessers in der Membran ausbilden (als Review: Inoue und Krumlauf, 2001). Durch diese Poren dringen während der durchlässigen Phase exogene, geladene Makromoleküle mit passendem Durchmesser wie DNA, RNA oder auch Farbstoffe mittels Elektrophorese in den Intrazellularraum (Sukharev et al., 1992). Sind die Öffnungen in der Membran jedoch zu groß, kommt es zu einem irreversiblen Zusammenbruch des Membranpotentials und damit zum Zelltod. Die Kanäle in der Membran können sich innerhalb von 0,5  $\mu$ s – 3 ms ausbilden (Chang, 1992; Hibino et al., 1993). Das Wiederverschließen der Poren und die Rückkehr zum ursprünglichen Zustand ist hingegen ein langsamerer Prozess, der Sekunden bis Minuten dauern kann (Steinhardt et al., 1994). Die Stimulationsparameter der Elektroporation müssen so gewählt werden, dass die feine Linie zwischen Formation vorübergehender Poren in der Zellmembran und der damit einhergehenden DNA-Elektrophorese und den zerstörerischen Effekten eines starken elektrischen Feldes auf der anderen Seite nicht überschritten wird (Ho und Mittal, 1996; Neumann et al., 1998).

Die Nucleofector™ Technologie von Amaxa basiert auf der Elektroporationsmethode und ist durch den Zusatz gekennzeichnet, dass Genmaterial direkt in den Zellkern eindringen kann (Gresch et al., 2004). Dadurch können auch postmitotische Zellen und schwer transfizierbare Zelllinien effizient transfiziert werden. Die Nucleofection Technologie besteht aus der Kombination einer auf den jeweiligen Zelltyp abgestimmten Transfektionslösung und einem spezifischen elektrischen Impuls. Derzeit gibt es keine vergleichbare Methode, um polyanionische Makromoleküle direkt in den Nukleus einzubringen (Gresch et al., 2004).

### **5.3 Problematik der Transfektion primärer Cortexneuronen**

Obwohl Elektroporation eine übliche, vielseitige und leicht anwendbare Methode ist, gibt es nur wenige Berichte über erfolgreiche Elektroporation von Neuronen. Die

Transfektion der primären Cortexneuronen mit Hilfe der Nucleofector™ Technologie erzielte in den ersten Tagen vergleichsweise höhere Transfektionsraten als andere nicht-virale Transfektionsmethoden (Kaech et al., 1996; Ango et al., 1999; Blichenberg et al., 1999), konnte in der vorliegenden Versuchsreihe mit den pEGFP-Vektoren jedoch keine stabilen Transfektionsraten über den Versuchszeitraum von 10 Tagen erzielen. Die Rate der lebenden transfizierten Neuronen ging trotz Optimierung der Nucleofektionsmethode soweit zurück, dass am zehnten Tag *in vitro* die Durchführung eines aussagekräftigen OGD-Versuchs ohne Modifizierung der Methode kaum möglich war.

Es gibt mehrere Einflussfaktoren bzw. mögliche Ursachen, die die im Verlauf relativ abnehmende Transfektionseffizienz begründen können: zum einen die primären Cortexneuronen selbst, die als postmitotische Zellen schwerer zu transfizieren sind als mitotische Zellen (Martinez und Hollenbeck, 2003). Die Transfektion selbst ist möglicherweise neurotoxisch. Desweiteren könnten die Fusionsproteine, welche aus dem Fluoreszenzprotein eGFP und den NODD- bzw CODD-Domänen bestehen, negative Auswirkungen auf die Überlebensrate der primären Cortexneuronen haben. Als weiterer wichtiger Einflussfaktor ist die Plasmid-DNA bzw. sind die pEGFP Vektoren zu nennen, die einen Sequenz-abhängigen Effekt auf die Transfektionsrate haben können. Diese drei Einflussfaktoren wurden untersucht und werden im Folgenden diskutiert.

### **5.3.1 Primäre Cortexneuronen und Transfektionseffizienz**

Neuronen sind die funktionelle Basis des Nervensystems und spielen eine essentielle Rolle im komplexen Kommunikationssystem des Nervensystems. Der Gentransfer in Neuronen gilt als eine wichtige Methode, die Funktionen von Zielgenen zu analysieren und zu manipulieren, um so zu neuen therapeutischen Herangehensweisen zu gelangen (Gimenezey, 2001).

Es sind mehrere Gründe zu nennen, warum es schwieriger ist Neuronen mittels Elektroporation zu transfizieren als andere Zellen. Neuronen zeigen nach einer Elektroporation geringere Überlebensraten als Zellen kleineren Durchmessers, da die Erholungsfähigkeit der Zellen vom Zelldurchmesser abhängig ist (Potter, 1993). Da Neuronen wesentlich größer sind als die meisten nicht-neuronalen Zellen stellt dies

einen Grund für die niedrigeren Überlebensraten dar. Im Folgenden können Neuronen deshalb die transfizierten Gene nicht so effizient exprimieren. Neuronen sind postmitotische Zellen, was ebenfalls zur Erklärung der niedrigeren Transfektionsrate hinzugezogen werden kann. Bei mitotischen Zellen haben Plasmide in jedem Zellzyklus die Chance zum Nukleus zu gelangen, in postmitotischen Zellen kann das Plasmid nur durch Zellkernporen den Kern erreichen. Aufgrund der Tatsache, dass Neuronen postmitotische Zellen sind, können sie nicht durch andere stabile Zelllinien ersetzt werden und stellen somit eine diffizile Ausgangsbedingung dar (Davidson et al., 2004). Was auch zur Erklärung der niedrigen Transfektionsraten primärer Neuronen beitragen kann sind Vermutungen, dass ein Prozentsatz von mehr als 20% der Neuronen nicht mittels Elektroporation transfiziert werden kann, da diese einer Elektroporation nicht zugänglich sind (Morales et al., 2000; Colicos et al., 2001; Dityateva et al., 2003).

Die erzielten Transfektionseffizienzen der vorliegenden Experimente, als qualitatives und quantitatives Maß einer Transfektion, sind nicht direkt mit Transfektionseffizienzen der Literatur zu vergleichen, da meist andere Vektoren, Mess- oder Transfektionsmethoden verwendet wurden oder lediglich Transfektionsraten der ersten Tage nach Durchführung der Transfektion in den Publikationen genannt werden. In Transfektionsversuchen, welche auch die Nucleofector™ Technologie von Amaxa verwendet haben, konnte von Gresch et al., 2004 beispielsweise am dritten Tag *in vitro* eine Transfektionseffizienz von über 60% erreicht werden. Wie sich die Transfektionseffizienz jedoch in den folgenden Tagen entwickelt, geht aus der Veröffentlichung nicht hervor.

### 5.3.2 Einfluss der Plasmid-DNA auf die Transfektionseffizienz

Durch den Transfektionsversuch sämtlicher Vektoren der pEGFP Reihe (siehe hierzu Abbildung 17 und 18) wurde ersichtlich, dass bereits durch Transfektion der Vektoren ohne DNA-Domänen die Rate der lebenden transfizierten Zellen erheblich abnahm. Dies warf die Frage auf, ob die Vektoren der pEGFP Reihe toxisch oder schädlich für primäre Rattenneuronen sind und ob die Ursache in der Plasmid-DNA Sequenz und einem daraus hervorgehenden toxischen Protein zu suchen ist, da zwischen den Vektoren der N- und der pEGFP-C Reihe signifikante Unterschiede bestanden. Diese Vektoren unterschieden sich weder durch die durchgeführte

Plasmidreinigung noch andere qualitätsbeeinträchtigende Vorbereitungsmaßnahmen. Sie sind bis auf geringe Sequenzunterschiede in der Multiple Cloning Site und der Anordnung der Vektorbestandteile identisch (siehe hierzu auch Abbildung 9 und 10). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass zwischen dem Aufbau des Vektorgrundgerüsts bzw. der Multiple Cloning Site oder den daraus hervorgehenden Proteinen und der Sterberate der Neuronen ein Zusammenhang bestehen muss.

Mit dem pEGFP N3-Vektor, der im Transfektionsversuch der pEGFP-Vektoren (vgl. Abb. 17 bzw. 18) noch relativ hohe Transfektionsraten erzielen konnte, wurde von Tim et al., 2005 bei einer Zelllinie von Makrophagen, die auch wie primäre Neuronen als schwer transfizierbar gelten, keinerlei eGFP Expression erreicht. Durch Kontrollversuche konnte nachgewiesen werden, dass nicht etwa die eGFP Expression die Toxizität verursachte, sondern dass die Zugabe der Plasmid-DNA zu diesem signifikanten Zelltod führte. Wurde statt Plasmid-DNA mRNA verwendet konnten 60-75% der Zellen erfolgreich transfiziert werden (Tim et al., 2005).

Eine mögliche Erklärung der zuerst abnehmenden und dann scheinbar wieder zunehmenden Überlebensraten der mit den pEGFP-Vektoren transfiziert Neuronen, ist die Aktivierung des CMV-Promotors durch oxidativen Stress am zehnten Tag *in vitro*, die zu einer Hochregulierung der Proteinexpression führt (Kawabata et al., 2004). Im Verlauf dieses Experiments wurde aus diesem Grund der CAG Vektor verwendet.

### 5.3.3 Wirken Fusionsproteine in primären Cortexneuronen toxisch?

Mit der Isolierung des green fluorescent protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* wurde ein biolumineszentes Fluoreszenzprotein gefunden, welches einen exzellenten Marker der Protein Lokalisierung und der Genexpression in verschiedenen biologischen Systemen darstellt. In den letzten zehn Jahren ist GFP zu einem der meist angewandten Fluoreszenzproteine in der Biochemie und Molekularbiologie geworden. Das Gen von GFP wird dazu *in frame*, d.h. im gleichen Leserahmen mit dem Gen, das die Sequenz des zu untersuchenden Proteins trägt, fusioniert. Als Ergebnis entsteht ein Fusionsprotein, welches seine normale Funktion und Lokalisation behält und zusätzlich leuchtet. Die Anzahl der beschriebenen

erfolgreichen Fusionen ist groß, aber da die Fehlschläge beinahe nie publiziert werden, ist es schwierig die gesamte Erfolgsrate abzuschätzen (Tsien, 1998).

GFP-Fusionsproteine erwiesen sich in Untersuchungen von Misteli und Spector, 1997 generell als geringgradig toxisch, wurden jedoch die Auswirkungen der Fusionsproteine speziell auf einzelne Zellbestandteile beurteilt, konnten im Nukleus mehr toxische Nebeneffekte durch Fusionsproteine festgestellt werden als im Zytoskelett. So kann die Toxizität der Fusionsproteine in postmitotischen Zellen nicht abschließend ausgeschlossen werden (Misteli und Spector, 1997).

#### **5.4 Kokultivierung und Kotransfektion mit eGFP und DsRed**

Durch Kotransfektion und gleichzeitige Kokultivierung von primären Cortexneuronen, konnten Auswirkungen der Fluoreszenzproteine und Auswirkungen der putativ neuroprotektiven Gene auf transfizierte Neuronenpopulation untersucht werden.

Unsere aufgestellte Arbeitshypothese, dass Neuronen durch Transfektion von HIF-1 stabilisierenden Genen unter Stressbedingungen besser geschützt sind und eine höhere Überlebensrate aufweisen, als Neuronen denen keine HIF-1 stabilisierenden Gene transfiziert wurden, konnte durch diese Arbeit zum Teil bestätigt werden.

Das anti-apoptotische Gen Bcl-x<sub>L</sub>, mit dem die Methode der Kokultivierung und Kotransfektion etabliert wurde, zeigte in den vorliegenden Versuchen sowohl vor als auch nach einem Sauerstoff-Glukose Entzug signifikant neuroprotektive Eigenschaften.

Die Überlebensraten von kotransfizierten Neuronen mit NODD- und CODD-Wildtyp Domänen zeigten auch vor dem OGD-Experiment bessere Überlebensraten im Vergleich zu Neuronen, die keine zusätzlichen Gene transfiziert bekamen, jedoch war die Auswirkung nicht signifikant. Nach dem OGD-Experiment zeigte sich für die CODD-Wildtyp Domäne ein signifikant protektiver Effekt. Der Effekt ist für die NODD-Wildtyp Domäne auch vorhanden, jedoch ist dieser in dieser Auswertung ganz knapp nicht mehr signifikant. Es handelt sich bei dem neuroprotektiven Effekt um einen spezifischen Effekt, da sowohl durch die Kotransfektion der NODD- als auch der CODD-Mutanten Domäne keine signifikanten Änderungen der

Überlebensrate erreicht werden und nur die kotransfizierten Neuronen eine Verbesserung der Überlebensrate aufweisen, nicht jedoch die kokultivierten.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich somit spezifische neuroprotektive Eigenschaften der NODD- und CODD-Wildtyp Domänen ableiten. Damit ist unsere Arbeitshypothese 3 bestätigt: durch eine neuronale Überexpression der NODD- und CODD-Wildtyp Domänen kommt es zu Neuroprotektion.

Die vorliegenden Ergebnisse sind ein weiterer indirekter Hinweis auf die neuroprotektiven Eigenschaften von HIF-1 und es bestätigt die dominante Regulation von HIF-1 $\alpha$  über die sauerstoffabhängigen PHDs. Die von Willam et al., 2002 bereits vermutete Interaktion der NODD- und CODD-Domänen mit den PHDs konnte durch die vorliegenden Versuche indirekt bestätigt werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Neuroprotektion durch den sauerstoffregulierten Transkriptionsfaktor HIF-1 erreicht wurde. Durch die Überexpression der NODD- bzw. CODD-Domänen wurde der Abbau von HIF-1 $\alpha$  über die vermutete kompetitive Verdrängung am von Hippel-Lindau Protein oder an den PHDs verhindert. HIF-1 kann somit vermehrt dimerisieren und HIF-1 abhängige Gene können vermehrt exprimiert werden.

Die von HIF-1 abhängige Genregulationen und die resultierenden möglichen neuroprotektiven Eigenschaften stellen im Bereich der Hypoxie und den therapeutischen Chancen der zerebralen Ischämie eine zentrale Fragestellung dar.

## **5.5 Auswirkungen von Hypoxie auf die Genregulation**

Nicht nur bei Schlaganfällen, sondern auch bei Traumata, neurodegenerativen Erkrankungen, vaskulären Fehlbildungen und Neoplasien kommt es zu Hypoxie im Gehirn (Acker und Acker, 2004). Die Expression der Gene, welche nach einer Hypoxie hochreguliert werden, sind zu 89% HIF-1 abhängig (Greijer et al., 2005). Es ist vom Ausmaß und der Dauer einer Hypoxie abhängig, ob sich Zellen anpassen können und somit überleben, oder ob Zellen aufgrund von Sauerstoff- und Substratmangel apoptotisch werden. HIF-1 spielt hierbei eine wichtige Schlüsselrolle und kann gemeinsam mit mehreren anderen Faktoren entweder Apoptose initiieren

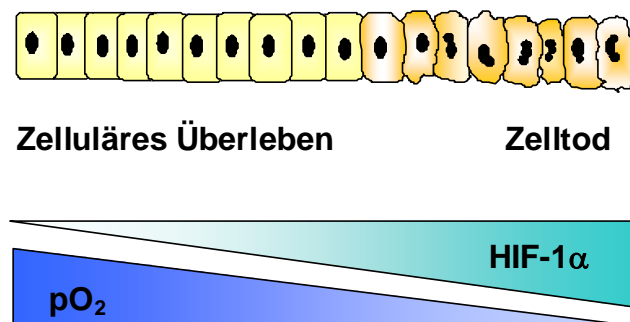


oder anti-apoptotisch wirken und Zellproliferation stimulieren (Chang et al., 2007, Chen et al., 2008, Helton et al., 2005, Baranova et al., 2007).

Bei milder, subletaler Hypoxie kommen verschiedene Energiesparmechanismen in der Zelle zum Tragen: Reduzierung der Transkription und Translation, verstärkte anaerobe Energiegewinnung durch Glykolyse, Verbesserung des Energie- und Sauerstofftransports, Förderung der Angiogenese, Vasodilatation und Erythropoese durch vermehrte Expression der HIF-1 Zielgene wie beispielsweise VEGF, Erythropoietin und Glukosetransporter (als Review: Gorr et al., 2006; Greijer et al., 2005, Chen et al., 2008).

Während die meisten Studien von einer insgesamt positiven Funktion von HIF-1 unter chronisch hypoxischen Bedingungen ausgehen, gibt es Hinweise darauf, dass eine akute Hochregulation von HIF-1 auch als Signal für schweren hypoxischen Zellschaden dienen kann (Semenza, 1999).

Bei starker Hypoxie oder Anoxie (Sauerstoffgehalt < 0,5%) kann HIF-1 Apoptose induzieren. Zur Veranschaulichung der Auswirkungen des Sauerstoffpartialdrucks und der HIF-1 Induktion dient Abbildung 20.



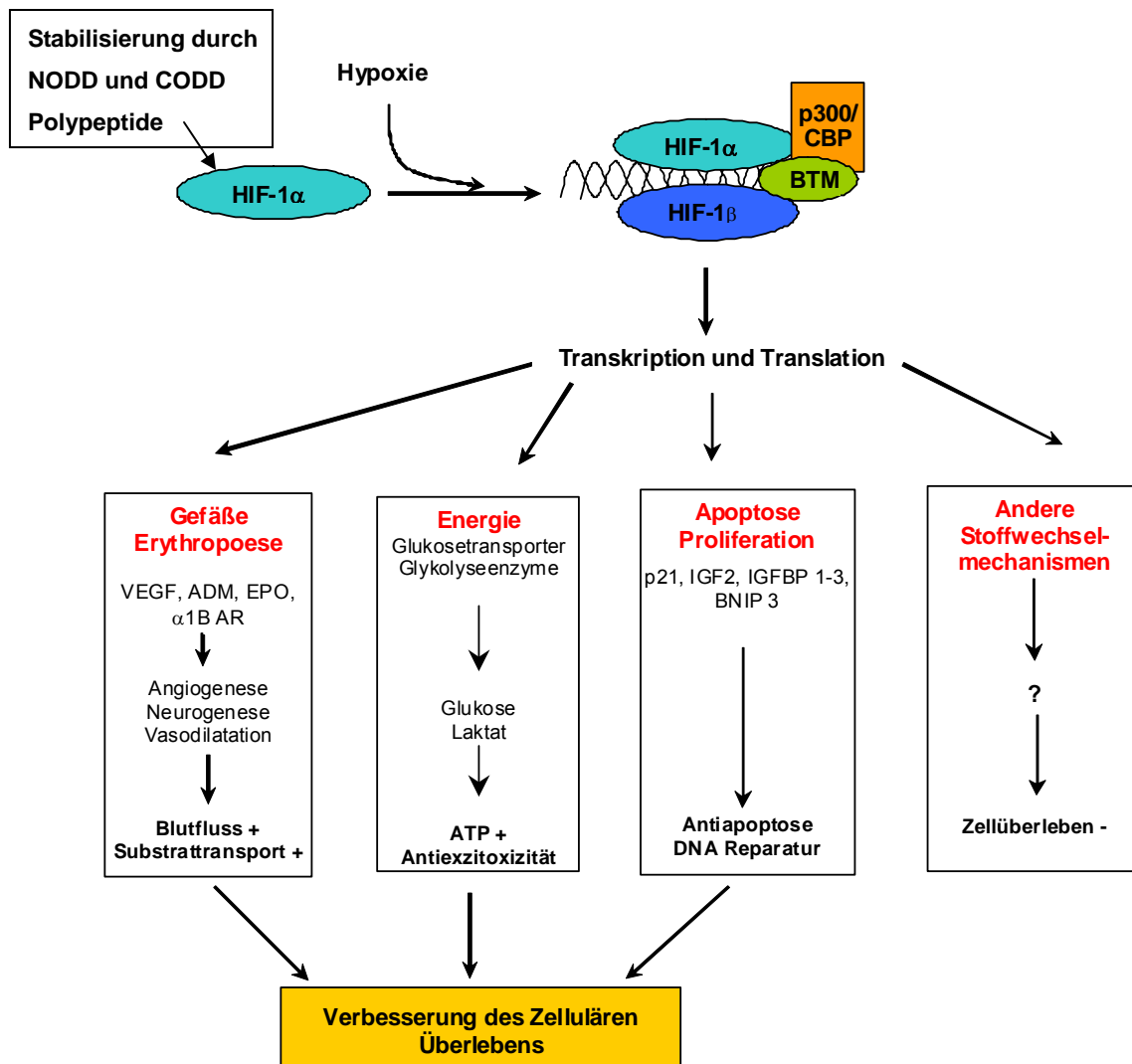
**Abb. 20:** Die Doppel-Rolle von HIF bei der Regulation von Zelltod und zellulärem Überleben ist vom Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) und der Proteinmenge von HIF-1 $\alpha$  abhängig (modifiziert nach Acker und Acker, 2004).

Dies geschieht zum einen in Zusammenhang mit dem Tumor Suppressor Gen p53 und zum anderen mit Hilfe von proapoptotischen Genen. Siehe hierzu auch Abbildung 21. Hypoxie induziert das Tumor Suppressor Gen p53, das wichtige Apoptose kontrollierende Element in Tumoren. HIF-1 $\alpha$  stabilisiert p53 und trägt so zur Apoptose bei (An et al., 1998, Haltermann et al., 1999) und darüber hinaus verhindert p53 die von HIF stimulierte Transkription (Blagosklonny et al., 1998).

Durch starke Hypoxie werden auch pro-apoptotische Proteine, wie Bax, Noxa, Puma, oder BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3) induziert und durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert. HIF-1 und die folgende Regulation wird so mit dem verzögertem neuronalen Zelltod assoziiert und nicht mit einer Neuroprotektion (Schmidt-Kastner et al., 2004). Die Expressionssteigerung des proapoptotischen Mitglieds der Bcl-2 Familie, dem Bcl-2 Bindungs-Protein BNIP3 das durch Hypoxie stark induziert wird und den anti-apoptotischen Effekt von Bcl-2 unterbindet, spielt möglicherweise eine erhebliche Rolle im pathologischen Fortschreiten der Hypoxie-vermittelten Apoptose nach ischämischen und nekrotischen Ereignissen (Bruick, 2000; Greijer und van der Wall, 2004, Althaus et al., 2006).

Die Rolle von HIF-1 als Regulator des Sauerstoffgleichgewichts ist unbestritten, welche Funktion HIF-1 im Zusammenhang mit der Pathophysiologie des Schlaganfalls hat, ist noch nicht ausreichend erforscht (Dirnagl et al., 2009). Es bleibt auch weiterhin unklar, ob die pro-apoptotischen oder die anti-apoptotischen Eigenschaften von HIF-1 bei fokaler Ischämie überwiegen.

Welche Faktoren, Kofaktoren oder welcher Mechanismus darüber entscheidet, welche Gene in bestimmten Zellen bei Hypoxie aktiviert werden und ob diese Genprodukte zu Anpassung oder Apoptose führen, ist noch unbekannt. Es wird vermutet, dass bei der Entscheidung des weiteren Schicksals der Zelle der Zelltyp (Vangeison et al., 2008), die Dauer der Hypoxie (Haltermann und Federoff, 1999) und die Art und Weise des Stimulus von Bedeutung ist (Aminova et al., 2005). Als Überblick der Auswirkungen einer HIF-1 Induktion dient Abbildung 21.



**Abb. 21:** Induktion der HIF-1 Zielgene durch Hypoxie. HIF-1 $\alpha$  ist stabil und dimerisiert mit HIF-1 $\beta$ . Das Dimer bindet gemeinsam mit p300/CBP (CREB (cyclic AMP-response element-binding protein) und BTM (basal transcription machinery) an HREs (hypoxia response elements) in HIF-1 Zielgenen. Dadurch wird die Transkription und Translation von verschiedenen Genen, wie z.B. dem VEGF (vascular endothelial growth factor), EPO (Erythropoietin), IGF2 (Insulin-like growth factor 2) oder  $\alpha$ 1B AR ( $\alpha$ 1B adrenerger Rezeptor) gefördert (Auswahl). Nicht alle diese Zielgene verbessern das zelluläre Überleben. Abbildung modifiziert nach Sharp et al., 2004.

## 5.6 HIF-1 induziert Neuroprotektion in primären Neuronen

Durch Experimente mit HIF-1 *knock-out* Mäusen konnte gezeigt werden, dass HIF-1 eine zentrale Rolle in der Embryogenese spielt, da ein vollkommenes Fehlen von HIF-1 $\alpha$  bereits vor der Geburt zum Tod der Embryonen führt (Semenza, 2000). Als Todesursache ist die mangelhafte Entwicklung von Blutgefäßen im Gehirn zu nennen (Iyer et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 wirkt aber nicht nur während der Embryonalentwicklung neuroprotektiv, sondern auch bei adulten Tieren

(Bernaudin et al., 2002). Baranova et al. konnten 2007 in einem *in vivo* Experiment mit neuronalen HIF-1 defizienten Mäusen im Modellversuch einer transienten Ischämie zeigen, dass die Aktivierung von HIF-1 einen protektiven Effekt zu haben scheint, da bei den HIF-1 defizienten Mäusen der Zellschaden grösser und die Überlebensraten geringer waren (Baranova et al., 2007).

Erstens führt die Stimulation von HIF-1 zur Induktion von Genen wie EPO, VEGF etc., welche das Überleben der Zellen verbessern und neuroprotektive Effekte haben (Bergeron et al., 2000, Digicaylioglu und Lipton, 2001, Sharp et al., 2004, Stenzel-Poore et al., 2003, Ferriero, 2005). Zweitens kann Präkonditionierung nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch chemische Aktivatoren oder unspezifische Inhibitoren der PHD über eine vermehrte HIF-1 Ausschüttung zu Neuroprotektion führen (Bergeron et al., 2000). Drittens induziert HIF-1 Angiogenese und Glykolyse und verbessert damit die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, welche wichtig ist für das zelluläre Überleben während Hypoxie (Bergeron et al., 2000).

### **5.6.1 Neuroprotektion durch Induktion von HIF-1 Zielgenen**

Durch einen präkonditionierenden Stimulus oder Induktor von HIF-1 kommt es zu einer Genexpressionsänderung. Hunderte von Genen werden vermehrt oder vermindert exprimiert (Bernaudin et al., 2002, Stenzel-Poore et al., 2003, Tang et al., 2006). Die Genexpression ist vom Ausmass der Hypoxie abhängig und differiert zwischen schädigender Ischämie und Präkonditionierung. Es wird angenommen, dass Präkonditionierung die Expression von Genen ändert, welche den Stoffwechsel, die Immunantwort, die Ionenkanalaktivität und die Blutgerinnung beeinflussen. Diese Expressionsänderung schwächt die Effekte der Ischämie ab (Stenzel-Poore et al., 2003) und fördert das zelluläre Überleben (Stenzel-Poore et al., 2007).

Im Tiermodell konnte Bernaudin et al., 2002 als erster einen Schutz durch hypoxische Präkonditionierung bei permanenter fokaler zerebraler Ischämie des adulten Gehirns nachweisen. Darüber hinaus konnte er zeigen, dass diese Toleranz in Zusammenhang mit einer Änderungen der HIF-1 Expression und dessen Zielgenen EPO und VEGF steht. Auch wenn der Nachweis des direkten Effekts der Zielgene auf die Toleranzinduktion noch nicht erbracht werden konnte, liefert die

gesteigerte Genexpression zum Zeitpunkt des Auftretens der Toleranz ein indirektes Argument, das für die Beteiligung von HIF-1 und dessen Zielgenen VEGF und EPO an dem Phänomen der Präkonditionierung spricht (Bernaudin et al., 2002).

Für EPO, dem essentiellen Mediator der Präkonditionierung im Gehirn, konnte gezeigt werden, dass er neuronalen Zelltod verhindert, der durch oxidativen Stress *in vitro* entstanden ist (Ruscher et al., 2002; Prass et al., 2003). EPO kann auch die Erholung nach Schlaganfall oder Rückenmarksverletzungen *in vivo* verbessern (Bernaudin et al., 1999; Sakanaka et al., 1998). Aus dem Bereich der Vaskulogenese werden die Zielgene Hämoxxygenase-1 und VEGF sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch HIF-1 induziert. VEGF führt unter anderem über Neovaskularisierung und Vasodilatation zu einer Zunahme des zerebralen Blutflusses (Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Kourembanas, 2002) und wirkt über diesen Mechanismus neuroprotektiv (Xu et al., 1998). Darüber hinaus sind auch direkte neuroprotektive (Jin et al., 2000), neurotrophische und antiinflammatorische Eigenschaften dieser Enzyme beschrieben worden (Chen et al., 2000; Sun et al., 2003).

### 5.6.2 Neuroprotektion durch Inhibitoren der HIF-1 Prolylhydroxylasen

Inhibitoren der Prolylhydroxylasen induzierten sowohl in Zellkultur als auch in *in vivo* Versuchen HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung und nachfolgende Zielgenexpression (Warnecke et al., 2003, Demougeot et al., 2004). Der Transkriptionsfaktor kann durch chemische Substanzen wie DFO (Desferrioxamin), 3,4-Dihydroxybenzoesäure oder Kobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>) aktiviert werden und so das Gehirn mittels *de novo* Proteinsynthese vor fokaler zerebraler Ischämie schützen (Demougeot et al., 2004, Van Hoecke et al., 2005, Siddiq et al., 2005, Freret et al., 2006). Bei neonatalen Ratten konnte im *in vivo* Versuch durch intraperitoneale Injektion von Kobaltchlorid oder DFO 24 Stunden vor Hypoxie ein Schutz des Gehirns von 75 bzw. 56% erreicht werden (Bergeron et al., 2000). In einem *in vitro* OGD-Versuch konnte durch die Vorbehandlung mit DFO das Überleben der neuronalen Hippocampuszellen verbessert werden, dieser Effekt konnte durch Transfektion eines anti-HIF-1 wieder aufgehoben werden (Ferriero, 2005). Der Hochregulation von HIF-1 und einigen Zielgenen durch einen präkonditionierenden Trigger wird dabei ein messbarer Schutz vor ischämischen Ereignissen im Gehirn zugewiesen. Baranova et al., 2007

konnten zeigen, dass die pharmakologische Hemmung von HIF-1 Prolylhydroxylasen zu einem grossen Teil HIF-1 abhängig ist, da bei HIF-1 defizienten Mäusen deren protektiver Effekt signifikant abgeschwächt war.

Hierdurch konnte die Position von HIF-1 im Bereich der ischämischen Päkonditionierung gefestigt werden und gezeigt werden, dass HIF-1 nicht nur durch Hypoxie reguliert wird (Jones und Bergeron, 2001; Ruscher et al., 2002; Prass et al., 2002; Bernaudin et al., 2002).

#### **5.6.2.1 Neuroprotektion durch Transfektion der NODD/CODD-Domänen**

HIF-1 $\alpha$  wird unter normoxischen Bedingungen kontinuierlich durch den von Hippel-Lindau E3 Ligase Komplex (VHLE3) für den sauerstoffabhängigen Abbau markiert und proteasomal abgebaut. Dadurch wird die Bildung des aktiven HIF-1 Transkriptionskomplexes verhindert. Die sauerstoffabhängige Hydroxylierung von zwei spezifischen Prolinresten der ODDD der HIF-1 $\alpha$  Kette stellt die notwendige Markierung für den VHLE3 dar. In einer Arbeit von Willam et al. 2002 konnte gezeigt werden, dass zwei Polypeptide, die in ihrer Struktur den Teilen der ODDD von HIF-1 $\alpha$  mit den spezifischen Prolinresten ähneln (NODD- und CODD-Domänen), HIF-1 stabilisieren konnten und eine vermehrte Expression der HIF-1 Zielgene bedingen (Masson et al., 2001; Willam et al., 2002). Die einzeln und gemeinsam in Neuronen transfizierten NODD- und CODD-Domänen blockierten die Abbaukaskade von HIF-1 und die endogene HIF-1 $\alpha$  Kette konnte somit auch unter normoxischen Bedingungen stabilisiert werden, indem die Hydroxylierung, die folgende Ubiquitinierung und der proteasomale Abbau verhindert wurden. Mit Hilfe eingebrachter Punktmutationen an den spezifischen Prolin-Aminosäuren 402 und 564 konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von HIF-1 $\alpha$  gezielt beeinflussbar ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass HIF-1 $\alpha$  zwei und nur zwei Zielregionen für die VHLE3-abhängige Ubiquitinierung besitzt (Willam et al., 2002). Die Ergebnisse von dieser und weiteren Forschungsgruppen lieferten somit einen wichtigen Hinweis, dass Inhibitoren der PHDs neuroprotektiv sind (Ratan et al., 2004).

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde jeweils nur eine der beiden NODD- und CODD-Domänen mit jeweils einem spezifischen Prolinrest in primäre Cortexneuronen transfiziert, um die Auswirkungen einer Einzel-Transfektion zu

untersuchen. Durch eine neuronale Überexpression der NODD- und CODD-Wildtyp Domänen kam es zu einer Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$  Kette und damit zur Induktion protektiver Gene. Die durch Punktmutation an den spezifischen Prolinresten veränderten Kontrollpolypeptide hatten keinen Einfluss auf das Überleben der Neuronen. Aus diesen Ergebnissen lassen sich somit nicht nur neuroprotektive sondern auch spezifische Eigenschaften der NODD und CODD Wildtyp Domänen ableiten und unsere detaillierte Arbeitshypothese bestätigen.

Die vorliegenden Ergebnisse dieses *in vitro* OGD-Experiment sind ein weiterer indirekter Hinweis auf die neuroprotektiven Eigenschaften von HIF-1 und es bestätigt die spezifische Regulation des HIF-1 $\alpha$  Abbaus über zwei Prolinreste. Die von Willam et al., 2002 bereits vermutete Interaktion der NODD- und CODD-Domänen mit pVHL bzw. den PHDs konnte durch die vorliegenden Versuche indirekt bestätigt werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Neuroprotektion durch den sauerstoffregulierten Transkriptionsfaktor HIF-1 erreicht wurde. Durch die Überexpression der NODD- bzw. CODD-Domänen wurde der Abbau von HIF-1 $\alpha$  über die vermutete kompetitive Verdrängung am von Hippel-Lindau Protein oder an den PHDs verhindert. HIF-1 $\alpha$  konnte somit in grösser Anzahl mit HIF-1 $\beta$  dimerisieren und HIF-1 abhängige Gene konnten vermehrt exprimiert werden.

Willam konnte 2002 sowohl für die NODD- als auch für CODD-Domäne gemeinsam und einzeln einen protektiven Effekt nachweisen. In Studien zur Struktur des HIF-1 $\alpha$ -pVHL Interaktions-Komplexes von Min et al., 2002 und Hon et al., 2002 wurde jedoch nur ein spezifischer Prolinrest (P 564) als regulierende Bindungsstelle für den sauerstoffregulierten Abbau durch das pVHL beschrieben. Dies könnte eine mögliche Erklärung der signifikant verbesserten Überlebensrate, der mit der CODD-Domäne transfizierten Neuronen (P 564) und die verbesserte, jedoch nicht signifikante Überlebensrate der mit der NODD-Domäne (P 402) transfizierten Neuronen darstellen. Im Vergleich mit den am spezifischen Prolinrest mutierten Kontrollen waren jedoch sowohl die CODD- als auch NODD-Domäne signifikant protektiv.

## 5.7 HIF-1 wirkt nicht neuroprotektiv

Neben den Studien, die einer Präkonditionierung und der damit einhergehenden HIF-1 Induktion neuroprotektive Effekte zuschreiben, gibt es Forschungsgruppen, die einen pro-apoptischen Effekt von HIF-1 nachweisen (Chang et al., 2007, Chen et al., 2007, Helton et al., 2005, Baranova et al., 2007).

Helton et al. konnte 2005 zeigen, dass nicht die Anwesenheit von HIF-1 neuroprotektiv wirkt, sondern die Abwesenheit von HIF-1 $\alpha$  den hypoxisch bedingten Schaden reduziert. In der *in vivo* Studie, welche die Auswirkungen von akuter Hypoxie im adulten Gehirn untersucht, waren Mäuse mit gehirnspezifischer HIF-1 $\alpha$  Deletion während akuter Ischämie geschützter als HIF-1 $\alpha$  Wildtyp Mäuse. In den verwendeten Hypoxiemodellen zeigten HIF-1 $\alpha$  defiziente Mäuse signifikant weniger neuronalen Zellverlust und geringere Expression apoptotischer Gene nach Hypoxie als die Kontrollmäuse. Es wurde vermutet, dass dieser Schutz durch den Wegfall von HIF-1 als zentralen pro-apoptischen Stimulus erreicht wurde (Helton et al., 2005).

Diese Theorie konnte auch in Experimenten mit embryonalen Stammzellen von Mäusen bestätigt werden. HIF-1 $\alpha$  Wildtypzellen zeigten während Hypoxie und Hypoglykämie geringere Proliferationsraten und mehr Apoptose als HIF-1 $\alpha$  defiziente embryonale Zellen (Carmeliet et al., 1998). Auch in Studien mit neonatalen Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung der HIF-1 Aktivität kortikale Neuronen vor verzögertem Zelltod nach OGD geschützt wurden (Haltermann et al., 1999). Diese Ergebnisse stimmen mit der Hypothese überein, dass eine Interaktion von p53 und HIF-1 $\alpha$  nach ischämischen Ereignissen neuronalen Zelltod fördert (Acker und Acker, 2004).

In *in vivo* Experimenten mit neonatalen Ratten konnte Chen et al., 2008 zeigen, dass eine Hemmung von HIF-1 $\alpha$  neuroprotektiv wirkt. Die neuroprotektiven Effekte wurden assoziiert mit dem Erhalt der Bluthirnschranke und der daraus resultierenden Reduktion des Gehirnödems und der Verringerung des neuronalen Zelltod. Der Langzeiteffekt blieb bis zu 2 Wochen erhalten und zeigte weniger Gewebsverlust und Gehirnatrophie.



## 5.8 HIF-1 - ein sinnvoller therapeutischer Ansatzpunkt?

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist Knotenpunkt von vielen zellulären Signaltransduktionswegen der hypoxischen Antwort. Überwiegend werden ihm neuroprotektive Effekte unter anderem im Zusammenhang mit ischämischer Präkonditionierung zugeordnet. Die vorliegende Arbeit bestätigt diesen Effekt mit einem spezifischen Ansatz. Damit kann HIF-1 als attraktiver Kandidat für therapeutische Ansätze angesehen werden (Vincent et al., 2000; Elson et al., 2001):

Erstens kann HIF-1 über das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung auch im menschlichen Gehirn induziert werden, (Weih et al., 1999; Moncayo et al., 2002; Dirnagl et al., 2003) woraus sich mögliche Ansatzpunkte für eine klinische Anwendung ergeben.

Zweitens könnte der Abbau von HIF-1 $\alpha$  durch kleine „Molekül-Medikamente“, beispielsweise in Form von Inhibitoren der PHDs oder einem als HIF-1 inhibierendem Faktor (FIH-1) bezeichneten Protein, verhindert werden und so über die Stabilisierung von HIF-1 die Expression von neuroprotektiven Genen fördern (Ratan et al., 2004, Mahon et al., 2001).

Drittens existieren bereits klinisch bewährte Medikamente, die auf dem Konzept der ischämischen Präkonditionierung basieren wie Erythropoietin oder Desferroxamin (Prass et al., 2002).

Ob mit dem aktuellen Wissensstand die funktionierenden therapeutischen Strategien aus den Tiermodellen auf den Menschen übertragen werden können, ist noch nicht abschliessend geklärt. Aufgrund der größeren Komplexität der Schadensprozesse beim Menschen kann die klinische Anwendung scheitern (Del Zoppa, 1995; Grotta, 1995). Die therapeutischen Zugangsmöglichkeiten von HIF-1 sind jedoch auch aufgrund der Komplexität des Sauerstoff-Sensorensystems schwer überschaubar (Dirnagl et al., 2009).

### 5.8.1 Inhibitoren der HIF-Prolylhydroxylasen

Es gibt drei Prolylhydroxylasen (PHD 1-3), die den Sauerstoff-abhängigen Abbau der HIF- $\alpha$  Ketten regulieren. Diese drei verschiedenen PHDs unterscheiden sich in ihrer zellulären Verteilung und in ihrer Expression nach hypoxischen Ereignissen. Die

Inhibierung von PHD1 und 3 führt nicht zur Ansammlung von HIF-1 $\alpha$ , wohingegen die Inaktivierung von PHD 2 zur Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  führt (Jones et al., 2006; Berra et al., 2003). Um die im Gehirn vorherrschende PHD 2 möglichst spezifisch zu inhibieren und so für die Schlaganfalltherapie optimal zu nutzen, ist es wichtig, Substanzen zu entwickeln, welche die HIF-Prolylhydroxylasen selektiv inhibieren und nicht die gesamte Gruppe der 2-Oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen (Maxwell und Ratcliffe, 2002; Willam et al., 2002; Jones et al., 2006).

Es konnte sowohl durch *in vitro* als auch *in vivo* Experimente gezeigt werden, dass Inhibitoren der Prolylhydroxylasen HIF-1 stabilisieren und dadurch neuroprotektiv wirken (Jaakkola et al., 2001; Siddiq et al., 2005). Durch die Hemmung des essentiellen Kofaktors Eisen bzw. des Kosubstrats 2-Oxoglutarat der PHDs kann der Abbau von HIF-1 $\alpha$  auch während Normoxie verhindert werden. Etablierte Aktivatoren von HIF-1 sind beispielsweise Eisenchelatoren wie Desferroxamin, die eine signifikante Induktion von HIF-1 und dessen Zielgenen in Neuronen bewirken und diese vor oxidativem Stress schützen (Zaman et al., 1999). Ob Eisenchelatoren aber als therapeutische Substanzen geeignet sind, ist bislang unklar, da Eisen als Kofaktor für viele wichtige zellulären Funktionen, wie beispielsweise der oxidativen Phosphorylierung und dem Arachidonsäurezyklus, benötigt wird (Goswami et al., 2002).

Auch PHD-Inhibitoren in Form von Peptiden, die Aminosäureabschnitte der ODDDs von HIF-1 $\alpha$  gleichen, konnten HIF während Normoxie stabilisieren, HIF-1 abhängige Genexpression aktivieren und komplexe physiologische Systeme wie Glukoseaufnahme oder Angiogenese induzieren (Willam et al., 2002; Siddiq et al., 2005). Vorteil einer solchen HIF-Stabilisierung gegenüber Gentherapie ist die einfachere Anwendung, Nachteile sind die lediglich lokale Wirkung und die Instabilität der Peptide (Willam et al., 2002).

Es ist noch ungeklärt, welche der PHD-Inhibitoren, die alle an verschiedenen Punkten der HIF-1 Kaskade ansetzen, sich für die Behandlung von Schlaganfällen am besten eignen und wann der optimale Zeitpunkt der therapeutischen Intervention ist. Ob HIF-1 Prolylhydroxylasen Inhibitoren aufgrund der Genexpression präventiv verabreicht werden müssen oder ob eine Gabe auch nach einem Schlaganfall möglich ist, ist momentan noch nicht zu beantworten (Siddiq et al., 2005).

### 5.8.2 Präkonditionierung als therapeutischer Ansatzpunkt

Präkonditionierung ist nicht nur eine attraktive experimentelle Strategie, endogene schützende oder regenerative Mechanismen zu studieren, es könnte auch bei Patienten, bei denen ischämische Ereignisse vorhersehbar sind, wie beispielsweise Hochrisikopatienten vor chirurgischen Eingriffen oder bei Patienten mit Subarachnoidalblutung oder transitorisch ischämischer Attacke (TIA) therapeutisch eingesetzt werden. Bei Patienten, die eine geplante Koronarbypassoperation oder Endarterektomie der Carotiden bekommen sollen, könnten von der therapeutischen Präkonditionierung profitieren, da es bei diesen Eingriffen zu Komplikationen wie Schlaganfällen oder kognitiven Defiziten kommen kann (Gottesmann et al., 2006, de Borst et al., 2001, Stenzel-Poore et al., 2003; Ratan et al., 2004). Die therapeutische Anwendung könnte bei Patienten, die eine Subarachnoidalblutung haben, hilfreich sein, da 20-30% der Patienten wenige Tage nach dem initialen Ereignis verzögerte neuronale ischämische Defizite assoziiert mit Vasospasmen bekommen können (Kassel et al., 1985). Auch Patienten, die eine transitorisch ischämische Attacke erleiden, könnten von Präkonditionierung ggf. profitieren, da sich bei bis zu 10% dieser Patienten innerhalb eines Monats ein Schlaganfall ereignet (Johnston et al., 2000).

Die Daten von zwei retrospektiven Schlaganfallstudien zeigen, dass bei Patienten, die vor einem Schlaganfall eine TIA erlitten hatten, das Ausmass des Schlaganfalls geringer war und der klinische Zustand besser, als bei den Patienten ohne vorangehendes Ereignis (Weih et al., 1999, Moncayo et al., 2000). Eine kleine prospektive Studie zeigte, dass bei gleicher Grösse und Perfusionsdefizit Patienten, die vorab eine TIA durchlaufen haben, kleinere initiale Diffusionsschäden, ein kleineres resultierendes Infarktvolumen und weniger neurologische Defizite hatten, als die Gruppe, die kein vorangehendes Ereignis hatten. (Wegener et al., 2004).

Zusammen mit anderen klinischen Hinweisen (Sitzer et al., 2004, Castillo et al., 2003), lassen diese Beobachtungen rückschliessen, dass es im menschlichen Gehirn endogene Präkonditionierungsmechanismen gibt, die durch TIA's aktiviert werden. Es gibt jedoch andere retrospektive Studien, die zeigen konnten, dass es keinen Zusammenhang zwischen vorangehender TIA und Verringerung des Schlaganfallausmasses gibt (Johnston et al., 2004, Della Morte et al., 2008).

Deshalb bleibt weiterhin unklar, ob das klinische Ereignis einer TIA neuroprotektiv wirkt und mit einer Verringerung des Gehirnschadens bei nachfolgendem Schlaganfall assoziiert werden kann.

Der Vorteil der Präkonditionierungsstrategie als therapeutische Intervention ist, dass es die zerstörerischen Mechanismen zum frühest möglichen Zeitpunkt antagonisiert, da es dem schädigenden Ereignis vorausgeht.

Die Möglichkeiten, ischämische Toleranz zu induzieren, sind nicht von der Art des Schadens abhängig, was eine wichtige Voraussetzung für die klinische Anwendung dieser Technik ist. Präkonditionierung kann das Gehirn entweder sofort nach der Stimulation (klassische Präkonditionierung) oder mit einer Verzögerung von ein bis drei Tagen (verzögerte Präkonditionierung) schützen. Egal zu welchem Zeitpunkt der Schutz einsetzt, hält er nicht länger als wenige Tage an.

Das Wissen über ischämische Präkonditionierung ist noch lückenhaft. Es ist deshalb schwierig, Ergebnisse aus Laborversuchen auf den Menschen zu übertragen (Dirnagl et al., 2003). Probleme, die sich bei der Einführung von klinischen Therapiekonzepten ergeben, sind das inkomplette Verständnis der Wechselwirkungen der Genaktivierungskaskade, die bislang ineffektive und nur vorübergehende Transfektion und die Diskrepanz zwischen experimentellen Studien und Klinik, die sich mit den optimierten Therapiebedingungen und der exakteren Kontrollierbarkeit aller physiologischen Faktoren in Experimenten begründen lässt.

Es werden im Moment viele klinische Studien durchgeführt, welche die Sicherheit und Wirksamkeit von Präkonditionierungsstrategien im Bezug auf den neuronalen Schutz vor absehbaren Gehirnschäden untersuchen (Ehrenreich et al., 2002, Kobayashi et al., 2008; Emsley et al., 2005 und weitere noch nicht veröffentlichte Studien, siehe ENOS Trial Investigators, 2006, <http://www.controlled-trials.com/ISRCTN98544942> (accessed Feb 13, 2009); NCT00626574. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00626574> (accessed 13 Feb, 2009).

### **5.8.3 Applikation von HIF-1 Zielproteinen**

HIF-1 Zielproteine könnten von Nutzen in der Schlaganfalltherapie sein. Die Gabe von Erythropoietin beispielsweise reduziert bei Patienten mit akutem zerebralem oder myokardialem Infarkt die Ischämie-induzierte Apoptose und verbessert in

klinischen Studien das Outcome der Patienten nach einem Schlaganfall (Ehrenreich et al., 2009; Cai et al., 2003; Erbayraktar et al., 2003). Die intrazerebrale Gabe von Erythropoietin schützt das Gehirn vor permanenter fokaler zerebraler Ischämie durch einen direkten Effekt auf Neuronen (Bernaudin et al., 1999).

Eine Gabe von VEGF, dem zweiten wichtigen HIF-1 Zielgen, nach (Jin et al., 2000) oder auch vor (Hayashi et al., 1998; Zhang et al., 2000; Sun et al., 2003) einem schädigenden hypoxischen Ereignis schützt das Gehirn und seine Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass VEGF Wachstum von Neuronen, Astroglia und neuronalen Stammzellen fördert, sowohl in adulten Ratten *in vivo* als auch in kortikalen Zellkulturen (Nakatomi et al., 2002; Jin et al., 2002). Die Applikation von VEGF fördert jedoch lediglich die Proliferation von Endothelzellen ohne Formation von richtigen Gefäßstrukturen, wohingegen die Anwendung von stabilisiertem HIF-1 $\alpha$  zur Bildung eines kapillären Netzwerks und Proliferation von Gefäßen führte (Pajusola et al., 2005).

## 5.9 Potentielle Gefahren einer HIF-1 Induktion

Durch HIF-1 wird nicht nur die Expression von neuroprotektiven Genen sondern auch von proapoptotischen Genen induziert. Deshalb ist es wichtig bei der Evaluierung von HIF-1 als therapeutische Substanz darauf zu achten, dass der Nettoeffekt der HIF-Aktivierung von Nutzen für den Organismus ist (Ratan et al., 2004).

HIF-1 ist ein globaler Regulator der Sauerstoff-Homöostase (Iyer et al., 1998) und reguliert einen Anteil von mehr als 5% des menschlichen Genoms (Semenza, 2004). Die Auswirkungen einer HIF-1 $\alpha$  Aktivierung variieren von Zelle zu Zelle und haben Auswirkungen auf Stoffwechsel, Proliferation, Differenzierung und Zelltod. Im Hinblick auf diese Komplexität kann ein Eingreifen in die Sauerstoff-Sensoren eher eine Störung sein und relativ unerwartete (unerwünschte) Auswirkungen haben oder mit nicht beabsichtigten Nebenwirkungen enden (Maxwell und Ratcliff, 2002; Semenza et al., 2004).

Durch den Einfluss von HIF auf Tumorwachstum und Apoptose wird befürchtet, dass eine Langzeitaktivierung aufgrund der proneoplastischen Aktivität von HIF-1

schädliche Folgen haben könnte (Maxwell et al., 2001). Obwohl diese Prozesse möglicherweise auf noch weitere Ereignisse neben der HIF-1 Aktivierung angewiesen sind und sich auf einen längeren Zeitraum erstrecken als beispielsweise für die therapeutische Neovaskularisierung benötigt wird, bestehen Bedenken bezüglich einer langfristigen therapeutischen Anwendung (Willam et al., 2002).

Bei der klinischen Anwendung der Präkonditionierung ist zu beachten, dass der therapeutische Rahmen der Präkonditionierung eng ist und der präkonditionierende Stimulus so titriert werden muss, dass er einen Effekt auslöst, jedoch unterhalb der schädigenden Schwelle bleibt. Dies ist nicht nur schwierig, sondern auch kaum möglich (Dirnagl et al., 2003, Prass et al., 2003). Die meisten Präkonditionierungsstudien laufen über einen Zeitraum von ca. einer Woche, in der das Maximum des Schadens oftmals noch nicht erreicht wurde und so die Aussagekraft der Studien in Frage gestellt werden kann.

Wahrscheinlich ist es sicherer und einfacher Effektoren der Präkonditionierung anstatt die Präkonditionierung oder präkonditionierende Stimuli als endogene Schutzmassnahmen für das Gehirn zu verwenden. Es müssen weitere Studien gemacht werden, bevor Präkonditionierung in der Klinik zur Anwendung kommen kann (Dirnagl et al., 2009).

### **5.10 Ausblick**

Noch viele Aspekte bezüglich HIF-1 und dessen Auswirkungen auf den Organismus bleiben offen, z.B. inwiefern Gene oder Transkriptionsfaktoren bei der Suche nach Entwicklungsmöglichkeiten neuer Medikamente in der Schlaganfalltherapie helfen können. Ob es besser ist, einen Transkriptionsfaktor wie HIF-1 einzusetzen, der viele Modulationsmöglichkeiten besitzt, oder ein nachgeschaltetes Gen wie EPO zu verwenden, das wahrscheinlich weniger Modulationsmöglichkeiten, aber möglicherweise auch weniger Nebenwirkungen hat, bleibt unklar. Welche Rolle die PHD-Inhibitoren spielen könnten, die eine spezifische HIF-1 $\alpha$  Aktivierung auslösen können, bleibt ebenso offen wie die Frage, ob Neuroprotektion durch ischämische Präkonditionierung als längerfristiger Effekt möglich ist. Durch eine einmalige

Stimulierung sind die Effekte der ischämischen Präkonditionierung bislang maximal eine Woche nachzuweisen (Barone et al., 1998).

Auch unter dem Gesichtspunkt betrachtet, dass viele der beobachteten Genexpressionsänderungen im Gehirn nicht komplett von HIF-1 $\alpha$  allein abhängig sind, ist es schwierig, eine Aussage über die therapeutischen Anwendungen von HIF-1 zu treffen (Wiesener et al., 1998, 2003; Brusselmans et al., 2003; Hu et al., 2003).

Unter physiologischen Bedingungen können durch die Hochregulation von HIF-1 Anpassungs- und Überlebensmechanismen der Zelle aktiviert werden, die unter pathologischen Bedingungen z.B. bei neurodegenerativen Krankheiten oder Tumoren aus dem Ruder geraten und gegenteilige Effekte erzielen können. Aufgrund der Tatsache, dass HIF-1 zwei gegenläufige Signalkaskaden steuert und sowohl zelluläres Überleben als auch Zelltod reguliert, sollten therapeutische Strategien vorsichtig angewendet werden.

Da noch viele Fragen bezüglich HIF und dessen Auswirkungen auf den Organismus offen bleiben, sollte großes Interesse in die weitere Forschung des Transkriptionsfaktors HIF-1 und die Entwicklung einer klinisch applizierbaren Form der ischämischen Toleranz gelegt werden. Nach den hoffnungsvollen Ergebnissen dieser Arbeit bezüglich einer Neuroprotektion durch NODD- bzw. CODD-Peptide, könnten diese beispielsweise mittels viraler Vektoren im Tiermodell des Schlaganfalls eingesetzt und so der therapeutische Nutzen weiter untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Neuronale Ischämie ist eine der Haupttodesursachen in der westlichen Zivilisation, für die trotz anhaltender Forschung noch keine kausale Therapie möglich ist. In der pathophysiologischen Kaskade, die sich bei einem Schlaganfall ereignet, sind mehrere Schadensmechanismen auf unterschiedlichen zellulären Ebenen beteiligt.

Der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1), ist essentieller Knotenpunkt zellulärer Signalkaskaden zur Anpassung von Zellen und Gewebe an Hypoxie bzw. Ischämie und einer der Schlüsselfaktoren in der Vermittlung ischämischer Präkonditionierung.

Ischämische Präkonditionierung oder ischämische Toleranz ist ein körpereigener Schutzmechanismus. Dieser Schutzmechanismus bewirkt, dass milde, subletale Ischämie das Gehirn vor einem nachfolgenden ansonsten tödlich verlaufenden ischämischen Ereignis schützt. Milde Hypoxie alleine verursacht keinen Zellschaden, aktiviert aber Genexpressions-Kaskaden, die durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert werden.

Es handelt sich hierbei um einen Transkriptionsfaktor, welcher während Sauerstoffmangel (Hypoxie) aktiv ist. HIF-1 reguliert die Expression von zahlreichen Genen, die für die Anpassung an niedrige Energie- und Sauerstoffkonzentrationen verantwortlich sind. Beispiele für diese Gene sind das Erythropoietin (EPO), der vaskulo-endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), mehrere glykolytische Enzyme und Glukose-Transporter.

Der Transkriptionsfaktor besteht aus zwei Untereinheiten: einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit und einer nur bei Hypoxie stabilen  $\alpha$ -Untereinheit. Während Normoxie hydroxylieren sauerstoffabhängige Prolylhydroxylasen (PHDs) zwei spezifische Aminosäuren (Prolin 402 und 564) innerhalb der ODDD (oxygen-dependent-degradation domain) der HIF-1 $\alpha$  Kette. Das ermöglicht die Bindung des von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Proteins an die HIF-1 $\alpha$  Untereinheit und initiiert den proteasomalen Abbau.

Ist die Sauerstoffkonzentration erniedrigt, findet keine Prolylhydroxylierung statt und die stabile HIF-1 $\alpha$  Kette kann mit der HIF-1 $\beta$  Kette dimerisieren und im Zellkern die Transkription der Sauerstoff-regulierten Gene veranlassen.



Ziel dieser Arbeit war es, HIF-1 $\alpha$  mit Hilfe von PHD-Inhibitoren in Form von NODD- und CODD-Domänen zu stabilisieren und durch Überexpression von HIF-1 abhängigen Genen Neuroprotektion zu induzieren. NODD- bzw. CODD-Domänen sind DNA-Stränge, die den N- (NODD) bzw. C-terminalen (CODD) Abschnitten der HIF-1 $\alpha$  Kette gleichen. Diese Domänen werden anstelle der endogenen HIF-1 $\alpha$  Untereinheit von den PHDs hydroxyliert oder vom von Hippel-Lindau Protein gebunden. Die endogene HIF-1 $\alpha$  Kette wird dadurch stabilisiert und die Induktion von HIF-1 gefördert.

In den Experimenten dieser Arbeit wurden die NODD- bzw. CODD-Domänen mittels Plasmidkonstrukten und Elektroporation in primäre Cortexneuronen der Ratte transfiziert und zerebrale Ischämie im Sauerstoff-Glukose-Deprivationsversuch (OGD) *in vitro* simuliert. Durch Kotransfektion der NODD- bzw. CODD-Domänen mit green fluorescent protein (GFP) und Kokultivierung der primären Neuronen mit einem zweiten transfizierten Fluoreszenzprotein *Discosoma sp. red fluorescent protein* (DsRed) wurde die Beurteilung der Transfektionseffizienz und der zellulären Vitalität ermöglicht.

Durch die Ergebnisse konnte die Frage, ob eine Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$  Untereinheit durch neuronale Überexpression der NODD- bzw. CODD-Domänen erreicht werden kann, beantwortet werden. Die transfizierten CODD- und NODD-Domänen konnten die Überlebensrate von primären Cortexneuronen der Ratte nach einem OGD-Experiment signifikant verbessern. Dieser Effekt erwies sich als spezifisch und signifikant gegenüber der Negativkontrolle und gegenüber der durch Punktmutation am spezifischen Prolinrest veränderten CODD- bzw. NODD-Domänen.

Es lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Transfektion eines DNA-Abschnitts, welches einen spezifischen Prolinrest encodiert, den sauerstoffabhängigen Abbau von HIF-1 $\alpha$  hinreichend inhibieren kann und dass die daraus hervorgehende HIF-1 Aktivierung protektive Gene induziert, die einen gesteigerten Hypoxieschutz in Neuronen hervorruft.

In der Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten im Bereich der zerebralen Ischämie wird versucht, ischämische Präkonditionierung und die damit verbundene

---

Neuroprotektion medikamentös zu simulieren. Ob dabei die Applikation von molekularen PHD-Inhibitoren wie beispielsweise CODD- oder NODD-Domänen zum Einsatz kommen könnten, bedarf weiterer Untersuchungen.

Da eine HIF-1 Induktion weitreichende Auswirkungen auf den Organismus hat, die bei weitem noch nicht bis in die Tiefe erforscht sind und neben neuroprotektiven Eigenschaften auch proapoptische Auswirkungen zeigen können, bleibt offen, ob eine HIF-1 Induktion einen geeigneten therapeutischen Zugang in der Therapie der zerebralen Ischämie darstellt.

Es ist weitere Forschung notwendig, um die Ergebnisse der vielversprechenden Zellkulturexperimente und Tierversuche mittels einer klinisch applizierbaren Form von HIF-1 und den weitaus komplexeren pathophysiologischen Signalkaskaden der zerebralen Ischämie beim Menschen anwenden zu können.

---

**Literaturverzeichnis**

- Acker T, Acker H (2004) Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *J Exp Biol* 207: 3171-3188
- Alisky JM, Hughes SM, Sauter SL, et al., (2000) Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport* 11: 2669-2673
- Althaus J, Bernaudin M, Petit E, et al. (2006) Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) protein following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Int* 48: 678-695
- Aminova LR, Chavez JC, Lee J, et al. (2005) Prosurvival and prodeath effects of hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in a murine hippocampal cell line. *J Biol Chem* 280: 3996-4003
- An WG, Kanekal M, Simon MC et al. (1998) Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Nature* 392: 405-408
- Ango F, Albani-Torregrossa S, Joly C, et al. (1999) A simple method to transfer plasmid DNA into neuronal primary cultures: functional expression of the mGlu5 receptor in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 38: 793-803
- Back T, Kohno K, Hossmann KA et al. (1994) Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 12-19
- Baranova O, Miranda LF, Pichiule P, et al. (2007) Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 27: 6320-32.
- Barone FC, White RF, Spera PA, et al. (1998) Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* 29: 1937-1950

- Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, et al. (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol* 48: 285-296
- Bergeron M, Yu AY, Solway KE, et al. (1999) Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischemia in rat brain. *Eur J Neurosci* 11: 4159-4170
- Berlit P (2000) Schlaganfall. *Nervenarzt* 71: 231-237
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. (1999) A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 643-651
- Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, et al. (2002) Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem* 277: 39728-39738
- Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E, Sharp FR (2002) Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem* 277: 39728–38.
- Berra E, Benizri E, Ginouvès A, et al. (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J* 22: 4082-4090
- Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, et al. (1998) p53 inhibits hypoxia-inducible factor–stimulated transcription. *J Biol Chem* 273: 11995-11998
- Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, et al. (2001) Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci* 21: 4668-4677
- Brewer GJ (1995) Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 42: 674-683
- Brewer GJ (1997) Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods* 71: 143-155

- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B-27 supplemented Neurobasal a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35: 567-576
- Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W, et al. (1988). Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 8(4): 474-485
- Bruer U, Weih MK, Isaev NK, et al. (1997) Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 414: 117-121
- Bruick RK (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci* 97: 9082-9087
- Bruick RK, McKnight SL (2001) Building better vasculature. *Genes Dev* 15: 2497-2502
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, et al. (2003) Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108: 79-85
- Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH (2001) Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflugers Arch* 443: 240-249
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. (1998) Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394: 485-490
- Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, et al. (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 20: 402-415
- Castillo J, Moro MaA, Blanco M, et al. (2003) The release of tumor necrosis factor-alpha is associated with ischemic tolerance in human stroke. *Ann Neurol* 54: 811-19.
- Chavez JC, LaManna JC (2002) Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1. *J Neurosci* 22: 8922-8931

- Chen J, Simon R (1997) Ischemic tolerance in the brain. *Neurology* 48: 306-311
- Chen K, Gunter K, Maines MD (2000) Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *J Neurochem* 75:304-313
- Chopp M, Chen H, Ho KL, et al. (1989) Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology* 39: 1396-1398
- Chu G, Hayakawa H, Berg P (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res* 15: 1311-1326
- Craig AM (1998) Transfecting cultured neurons. In *Culturing Nerve Cells*, edn 2. Banker G, Goslin K, Cambridge MA; MIT Press 1998: 79-111
- Dalgard CL, Lu H, Mohyeldin A, Verma A (2004) Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors. *Biochem J* 380: 419-424
- Davidson JT, Harel S, Arboleda VA, et al. (2004) Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces microRNA-like effects before mRNA degradation. *J Neurosci* 24(45): 10040-10046
- de Borst GJ, Moll FL, van de Pavoordt HD, et al. (2001) Stroke from carotid endarterectomy: when and how to reduce perioperative stroke rate? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 21: 484–89.
- Della Morte D, Abete P, Gallucci F, et al. (2008) Transient ischemic attack before nonlacunar ischemic stroke in the elderly. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 17: 257–62.
- Digicaylioglu M, Lipton SA (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 412: 641-647
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397
- Dirnagl U, Meisel A: Zerebrale Ischämie. Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.): In *Handbuch der molekularen Medizin, Band 5 Erkrankungen des Zentralnervensystems*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1999), S. 510-533

- Does remote ischaemic preconditioning reduce heart and cerebral damage following carotid endarterectomy? A randomised controlled trial. ISRCTN98544942. <http://www.controlled-trials.com/ISRCTN98544942> (Lesedatum 26.06.2009).
- Ehrengruber MU, Hennou S, Büeler H, et al. (2001) Gene transfer into neurons from hippocampal slices: comparison of recombinant Semiliki Forest Virus, adenovirus, adeno-associated virus, lentivirus, and measles virus. *Mol Cell Neurosci* 17: 855-871
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. (2002) Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 8(8):495-505
- Ehrenreich H, et al. (2009) Recombinant Human Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 40(12):-e647-56
- Elson DA, Thurston G, Huang LE, et al. (2001) Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev* 15: 2520-2532
- Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, et al. (2005) A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 1366–72.
- Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, et al. (1998) Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 238-247
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-54
- Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, et al. (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6741-6746
- Farlie PG, Dringen R, Rees SM, Kannourakis G, Bernard O (1995) bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4397-4401

- Fatylol K, Szalay AA (2001) The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and inhibits HIF-1-mediated transcription. *J Biol Chem* 276: 28421-28429
- Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25
- Ferriero DM (2005) Protecting neurons. *Epilepsia* 46 (Suppl 7) 45-51
- Garcia JH (1992) The evolution of brain infarcts. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 387-393
- Garcia JH, Liu KF, Relton JK (1995) Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *Am J Pathol* 147: 1477-1486
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6: 995-1001
- Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF (1988) Regulation of the Erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242: 1412-1415
- Goldberg MP, Choi DW (1990) Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose. *Stroke* 21: 11175-11177
- Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell cultures: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J. Neurosci* 13: 3510-3524
- Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, et al. (2000) Requirement for nitric oxide activation of p21 (ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 436-441
- Gorelick PB (1995) Stroke prevention. *Arch Neurol* 52: 347-355
- Gorr TA, Gassmann M, Wappner P (2006) Sensing and responding to hypoxia via HIF in model invertebrates. *J Insect Physiol.* 52(4):349-64
- Gottesman RF, Wityk RJ. (2006) Brain injury from cardiac bypass procedures. *Semin Neurol* 26: 432-39.
- Grabb MC, Choi DW (1999) Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *J Neurosci* 19: 1657-1662



- Greijer AE, van der Groep P, Kemming D, et al. (2005) Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol* 206: 291-304
- Greijer AE, van der Wall E (2004) The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 57: 1009-1014
- Gresch O, Engel FB, Nesic D, et al. (2004) New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methodes* 33: 151-163
- Grotta J (1995) Why do all drugs work in animals but none in stroke patients? 2. neuroprotective therapy. *J Intern Med* 237: 89-94
- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 519-561
- Gustafson I, Edgren E, Hulting J (1992) Brain-oriented intensive care after resuscitation from cardiac arrest. *Resuscitation* 24: 245-261
- Halterman MW, Federoff HJ (1999) HIF-1alpha and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia. *Exp Neurol* 159: 65-72
- Halterman MW, Miller CC, Federoff HJ (1999) Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J Neurosci* 19: 6818-6824
- Hayashi T, Abe K, Itoyama Y (1998) Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 887-895
- Hegg EL, Que L (1997) The 2-His-1-carboxylate facial triad – an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur J Biochem* 250: 625-629
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994
- Helton R, Cui J, Scheel JR, et al. (2005) Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage. *J Neurosci* 25: 4099-4107

- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030
- Hirota K und Semenza GL (2005) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 610-616
- Ho SY, Mittal GS (1996) Electroporation of cell membranes: a review. *Crit Rev Biotechnol* 16: 349-362
- Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, et al. (1997) Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272: 8581-8593
- Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36: 557-565
- Hossmann KA (1996) Perinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8: 195-208
- Hossmann KA: Experimentelle Pathophysiologie zerebraler Durchblutungsstörungen. In Hartmann A, Heiss WD (Hrsg.): *Der Schlaganfall, Steinkopf Verlag Darmstadt* (2001), S. 89-99
- Huang LE, Bunn HF (2003) Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem* 278: 19575-19578
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7987-7992
- Inoue T, Krumlauf R (2001) An impuls to the brain - using in vivo electroporation. *Nat Neurosci* 4: 1156-1158
- Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, et al. (2002) Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13459-13464
- Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. (2001) HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292: 464-468

- Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, et al. (1999) Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12436-12441
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, et al. (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev* 12: 149-162
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472
- Janoff A (1964) Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int Anesthesiol Clin* 2: 251-259
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996a) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271: 17771-17778
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH (1996b) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol* 271: C1172-C1180
- Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, et al. (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 272:19253-19260
- Jin KL, Mao XO, Greenberg DA (2000) Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10242-10247
- Jin KL, Zhu Y, Sun Y, et al. (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11946-11950
- Johnston SC (2004) Ischemic preconditioning from transient ischemic attacks? Data from the Northern California TIA Study. *Stroke* 35: 2680–82.
- Johnston SC, Gress DR, Browner WS, Sidney S (2000) Short-term prognosis after emergency department diagnosis of TIA. *JAMA* 284: 2901–06.

- Kaech S , Kim JB, Cariola M, Ralston E (1996) Improved lipidmediated gene transfer into primary cultures of hippocampal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 35: 344-348
- Kalda, Eriste E, Vassiljev V, Zharkovsky A (1998) Medium transitory oxygenglucose deprivation induced both apoptosis and necrosis in cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 240: 21-24
- Kapinya K, Penzel R, Sommer C, Kiessling M (2000) Temporary changes of the AP-1 transcription factor binding activity in the gerbil hippocampus after transient global ischemia, and ischemic tolerance induction. *Brain Res* 872: 282-293
- Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K (1992) MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 139: 118-121
- Katsura K, Kristian T, Siesjo BK (1994) Energy metabolism, ion homeostasis and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22: 991-996
- Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG Jr (1995) Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 269: 1444-1446
- Kietzmann T, Knabe W, Schmidt-Kastner R (2001) Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251: 170-178
- Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M et al. (1990) 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528: 21-24
- Kobayashi A, Czlonkowska A, Grabska K, et al. (2008) Efficacy of nitric oxide in stroke—a randomized trial. Characteristics of patients recruited in Poland. *Neurol Neurochir Pol* 42: 99–104.
- Kondo K, Kaelin WG Jr. (2001) The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res*. 264(1):117-25
- Kourembanas S (2002) Hypoxia and carbon monoxide in the vasculature. *Antioxid Redox Signal* 4: 291-299

- Lautenschlager M, Onufriev MV, Gulyaeva NV, et al. (2000) Role of nitric oxide in the ethylcholine aziridinium model of delayed apoptotic neurodegeneration in vivo and in vitro. *Neuroscience* 97: 383-393
- Li J, Post M, Volk R, et al (2000) PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 6: 49-55
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4: 399-415
- Lu H, Forbes RA, Verma A (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277: 23111-23115
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15: 2675-2686
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliff PJ (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20: 5197-5206
- Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliff PJ (2001) Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11: 293-299
- Maxwell PH, Ratcliff PJ (2002) Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 13: 29-37
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271-275
- Meisel A, Prass K, Wolf T, Dirnagl U. Pathophysiology of stroke, in Meyers RA (Hrsg): *Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine*, Wiley, 2005: 115-147
- Mertz DK, Weisheit G, Schilling K, Lüers GH (2002) Electroporation of primary neural cultures: a simple method for directed gene transfer in vitro. *Histochem Cell Biol* 118: 501-506

- Min JH, Yang H, Ivan M, et al. (2002) Structure of an HIF-1 $\alpha$ -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296: 1886-1889
- Misteli T, Spector DL (1997) Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol* 15: 961-1004
- Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life* 52: 43-47
- Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, et al. (2000) Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 54: 2089-2094
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110: 429-441
- Nedergaard M und Hansen AJ (1993) Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 568-574
- Neumann E, Kakorin S, Toensing K (1998) Membrane electroporation and electromechanical deformation of vesicles and cells. *Faraday Discuss*: 111-125
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1: 841-845
- Nikinmaa M, Pursiheimo S, Soitamo AJ (2004) Redox state regulates HIF-1 $\alpha$  and its DNA binding and phosphorylation in salmonid cells. *Journal of Cell Science* 117: 3201-3206
- Nilsson M, von Bonsdorff CH, Weclawicz K, Cohen J, Svensson L (1998) Assembly of viroplasm and virus-like particles of rotavirus by a Semliki Forest virus replicon. *Virology* 242: 255-265
- Nishio S, Yunoki M, Chen ZF, Anzivino MJ, Lee KS (2000) Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning. *J Neurosurg* 93: 845-851

- 
- Pajusola K, Künnapuu J, Vuorikoski S, et al. (2005) Stabilized HIF-1alpha is superior to VEGF for angiogenesis in skeletal muscle via adeno-associated virus gene transfer. *FASEB J* 19: 1365-1367
- Pause A, Lee S, Worrell RA, et al. (1997) The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2156-2161
- Plum F (1991) Vulnerability of the brain and heart after cardiac arrest. *N Engl J Med* 324: 1278-1280
- Potter H (1993) Application of electroporation in recombinant DNA technology. *Methods Enzymol* 217: 461-478
- Prass K, Ruscher K, Karsch M, et al. (2002) Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 520-525
- Prass K, Scharff A, Ruscher K, et al. (2003) Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* 34: 1981-1986
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1: definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272: 11205-11214
- Pulsinelli WA (1985) Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res* 63: 29-37
- Ran R, Xu H, Lu A, Bernaudin M, Sharp FR (2005) Hypoxia preconditioning in the brain. *Dev Neurosci* 27: 87-92
- Ratan RR, Siddiq A, Aminova L, et al. (2004) Translation of ischemic preconditioning to the patient: prolyl hydroxylase inhibition and hypoxia inducible factor-1 as novel targets for stroke therapy. *Stroke* 35: 2687-2689
- Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW (1998) Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* 201: 1153-1162

- Reeves MJ, Bushnell CD, Howard G, et al (2008) Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. *Lancet Neurol* 7: 915-926
- Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. (2002) Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* 22: 10291-10301
- Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, et al. (1998) Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 254: 117-120
- Safar P (1993) Cerebral resuscitation after cardiac arrest: research initiatives and futur directions. *Ann Emerg Med* 22: 324-349
- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. (1998) In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4635-4640
- Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272: 22642-22647
- Schmidt-Kastner R, Freund TF (1991) Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40: 599-636
- Schofield CJ, Zhang Z (1999) Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 9: 722-731
- Schumann P, Prass K, Wiegand F, et al. (1998) Oxygen free radicals and ischaemic preconditioning in the brain: Preliminary data and a hypothesis. In: Ito U, Klatzo I (Hrsg.) *Maturation phenomenon in cerebral ischemia III*. Springer Verlag Heidelberg New York, 95-103.
- Schurr A, Reid KH, Tseng MT, West C, Rigor BM (1986) Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Res* 374: 244-248



- Semenza GL (1999) Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Ann Rev Cell Dev Biol* 15: 551-578
- Semenza GL (2000) Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest* 106: 809-812
- Semenza GL (2001) Hypoxia-inducible factor 1: Control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatric Research* 49: 614-617
- Semenza GL (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 19: 176-182
- Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5680-5684
- Shamloo M, Rytter A, Wieloch T (1999) Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience* 93: 81-88
- Sharp FR, Bernaudin M (2004) HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* 5: 437-448
- Siesjö BK (1987) *Brain Energy Metabolism*. John Wiley & Sons, Chichester
- Sitzer M, Foerch C, Neumann-Haefelin T, et al. (2004) Transient ischaemic attack preceding anterior circulation infarction is independently associated with favourable outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 75: 659-60.
- Slack RS und Miller FD (1996) Viral vectors for modulating gene expression in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 6: 576-583
- Stagliano NE, Pérez-Pinzón MA, Moskowitz MA, Huang PL (1999) Focal ischemic preconditioning induce rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 757-761
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden (2007): Statistisches Jahrbuch, <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt.psml> (Lesedatum 24.06.2009)

- Stenzel-Poore MP, Stevens SL, King JS, Simon RP (2007) Preconditioning reprograms the response to ischemic injury and primes the emergence of unique endogenous neuroprotective phenotypes: a speculative synthesis. *Stroke* 38: 680-85
- Stenzel-Poore MP, Stevens SL, Xiong Z, et al. (2003) Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet* 362: 1028–37.
- Struijs JN, van Genugten ML, Evers SM (2005) Modeling the future burden of stroke in The Netherlands: impact of aging, smoking, and hypertension. *Stroke* 36: 1648-1655
- Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YuA (1992) Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* 65: 409-413
- Sun Y, Jin K, Xie L, et al. (2003) VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111: 1843-1851
- Sutter CH, Laughner E, Semenza GL (2000) Hypoxia-inducible factor-1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 4748-4753
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) Focal cerebral ischemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [<sup>14</sup>C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 61-69
- Tang Y, Pacary E, Freret T, et al. (2006) Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiol Dis* 21: 18–28.
- The ENOS Trial Investigators. Glycerol trinitrate vs. control, and continuing vs. stopping temporarily prior antihypertensive therapy, in acute stroke: rationale and design of the Efficacy of Nitric Oxide in Stroke (ENOS) trial (ISRCTN99414122). *Int J Stroke* 2006; 1: 245–49.

- Treating patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage (SAH) with epoetin alfa (EPO). NCT00626574. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00626574> (Lesedatum 26.06.2009).
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544
- Vangeison G, Carr D, Federoff HJ, Rempe DA (2008) The good, the bad and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 alpha in neurons and astrocytes. *J Neurosci* 28 (8): 1988-1993
- Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, et al. (2000) Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* 102: 2255-2261
- Wang GL and Semenza GL (1995b) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270: 1230-1237
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995a) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510-5514
- Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P (2003) Stroke. *Lancet* 362: 1211-1224
- Washbourne P, McAllister AK (2002) Techniques for gene transfer into neurons. *Current Opinion in Neurobiology* 12: 566-573
- Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, et al. (2004) Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 35: 616–21.
- Weih M, Kallenberg K, Bergk A, et al. (1999) Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* 30: 1851-1854
- Wenger RH (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* 16:1151-1162
- Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 306: re 12 review

- Wiegand F, Liao W, Busch C, et al. (1999) Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1229-1237
- Willam C, Masson N, Tian YM, et al. (2002) Peptide blockade of HIFalpha degradation modulates cellular metabolism and angiogenesis. *Proc Natl AcadSci USA* 99: 10423-10428
- Wu P, Phillips MI, Bui J, Terwilliger EF, et al. (1998) Adeno-associated virus vector-mediated transgene integration into neurons and other nondividing cell targets. *J Virol* 72: 5919-5926
- Xu F, Severinghaus JW (1998) Rat brain VEGF expression in alveolar hypoxia: possible role in high-altitude cerebral edema. *J Appl Physiol* 85: 53-57
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ (1995) Heterodimerization with Bax is required for Bcl-2 to repress cell death. *Curr Top Microbiol Immunol* 194: 331-338
- Zaman K, Ryu H, Hall D, et al. (1999) Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21 (waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci* 19: 9821-9830
- Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1998) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke* 20: 84-91
- Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. (2000) VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 106: 829-838

## **Anhang**

### **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. U. Dirnagl für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine Unterstützung sowie die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten in der Experimentellen Neurologie. Herrn Prof. A. Meisel möchte ich ganz herzlich für die ausgezeichnete Betreuung während der Arbeit und die persönliche Unterstützung danken. Er war mir stets eine große Hilfe bei fachlichen Fragen, inhaltlicher Diskussion und Problemen. In vielfacher Weise war die Zeit wissenschaftlicher Arbeit unter seiner Anleitung für mich eine große Bereicherung.

Für die kompetente Einführung in die molekularbiologischen Techniken und ihre Geduld bei experimentellen Problemen gilt mein Dank Frau C. Muselmann. Bei Frau Dr. D. Freyer möchte ich mich ganz herzlich für die Einführung und die Betreuung in der Zellkultur danken. Ebenso möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden insbesondere bei Herrn P. Mergenthaler für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken. Das ganze Team im Labor der Experimentellen Neurologie hat durch die kollegiale und entspannte Art eine sehr gute Arbeitsatmosphäre geschaffen. Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit im Studium und beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben. Gewidmet ist diese Arbeit meinem Vater.

**Erklärung**

„Ich, Margarethe Roßmanith, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neuroprotektion durch spezifische Induktion des Transkriptionsfaktors HIF-1“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift