

**Die Bedeutung des *promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF)
Proteins,
ein Interaktionspartner des Prorenin/Renin-Rezeptors und
Angiotensin-AT2-Rezeptors,
in der Neuroprotektion**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades des Doktors

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Eingereicht am Fachbereich Chemie, Biologie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von

Kerstin Seidel

aus Ueckermünde

April 2010

Die Untersuchungen zur vorliegende Arbeit wurde von April 2005 bis September 2009 am Center for Cardiovascular Research/Institut für Pharmakologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Unger unter der Leitung von PD Dr. Heiko Funke-Kaiser angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Heiko Funke-Kaiser
2. Gutachter: Prof. Dr. V. Haucke

Tag der mündlichen Prüfung: 26. August 2010

**Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran,
dass plötzlich zwei Probleme existieren,
wo es vorher nur eines gegeben hat.**

Thorstein Bunde Veblen (1857 - 1929)

Für
„Meine Familie“

Der Schlaganfall ist eine der häufigsten und bedeutendsten vaskulären Erkrankungen weltweit und eine der häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Ein Ziel besteht daher in der Vorbeugung und Verbesserung von Therapiemöglichkeiten, wozu ein Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen von großer Bedeutung ist.

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt in der Pathophysiologie des Schlaganfalles eine entscheidende Rolle.

Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass Angiotensin-AT1-Rezeptor-Blocker (ARBs) zu einer Verbesserung neurologischer Auswirkungen nach Schlaganfall führen und dass dieser Effekt Angiotensin-AT2-Rezeptor (AT2R)-vermittelt ist.

Der Transkriptionsfaktor PLZF kann direkt mit dem AT2R interagieren und die Signaltransduktion dieses Rezeptors vermitteln. Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe die Signaltransduktionskaskade des Prorenin/Renin-Rezeptors ((P)RR) aufschlüsseln und demonstrieren, dass auch bei dieser die direkte Rekrutierung von PLZF an den (P)RR notwendig ist, um Zielgene - wie beispielsweise die in primären Neuronen anti-apoptisch wirkende Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) - zu aktivieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PLZF, der AT2R und (P)RR ubiquitär in verschiedenen Gehirnregionen der Ratte exprimiert werden. Außerdem konnte durch eine PLZF-Überexpression *in vitro* in einem Glutamat-induziertem Toxizitätsmodell neuroprotektive Effekte nachgewiesen werden. Weitere *in vitro*-Untersuchungen zeigten auf, dass PLZF die Expression neuroprotektiver Gene aktiviert und neurotoxischer Gene reprimiert. Im *in vivo*-Modell der fokalen zerebralen Ischämie wurde eine signifikante Verminderung des Transkriptionsfaktors auf mRNA- und Protein-Ebene in der ipsilateralen Gehirnhälfte beobachtet.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PLZF ein Regulator in pathophysiologischen Vorgängen bei der fokalen zerebralen Ischämie sein kann, basierend auf den beobachteten neuroprotektiven Effekt *in vitro* und der Regulation *in vivo*.

Stroke is one of the major medical burdens in industrialised countries. Animal experiments indicate that blockade of angiotensin AT1 receptors (AT1R) improves neurological outcome after cerebral ischemia. These protective effects are partially mediated by angiotensin AT2 receptors (AT2R). The transcription factor PLZF was identified as a direct adapter protein of the AT2R. Furthermore, our group was able to demonstrate that PLZF also directly binds and mediates the effects of the human (pro)renin receptor ((P)RR) which is involved in brain development. Therefore, we hypothesised that PLZF is involved in neuroprotection.

This work demonstrates PLZF and its receptors (P)RR and AT2R exhibit an ubiquitous expression pattern in different brain regions. Furthermore, PLZF is able to mediate neuroprotection *in vitro*. Consistently, PLZF is downregulated on the ipsilateral side in a stroke model *in vivo*. Further analyses indicate that PLZF *per se* can upregulate neuroprotective and downregulate neurodetrimental target genes. Finally, the functionality of (P)RR promoter polymorphisms regarding basal and PLZF-induced activity is demonstrated.

Taken together, the data indicate that the transcription factor PLZF could be a novel regulator in the pathophysiology of ischemic brain injury based on its neuroprotective role *in vitro* and its regulation *in vivo*.

Abkürzungen

| | |
|---------------|---|
| % | Prozent |
| ~ | etwa, rund |
| °C | Grad Celsius |
| μ(X) | My |
| α | alpha |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ACE | Angiotensin-Konversionsenzym |
| Ang | Angiotensin |
| AOGEN | Angiotensinogen |
| Aqua. bidest. | Aqua bidestillata |
| ARB | AT1R-Blocker |
| AT1R | Angiotensin-AT1-Rezeptor |
| AT2R | Angiotensin-AT2-Rezeptor |
| ATIP/ATBP | <i>AT2 receptor interacting protein /AT2R binding protein</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CDK | Zyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>) |
| cDNA | kopierte Desoxyribonukleinsäure |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle's medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| ECL | Enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykoltetraessigsäure |
| et al. | und anderer (<i>et alii</i>) |

| | |
|----------|--|
| FBS | Fetales Bovines Serum |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GPCR | G-Protein-gekoppelter 7-Transmembranrezeptor (<i>G protein-coupled receptor</i>) |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| IB | Immunoblot |
| IDV | <i>integrated density values</i> |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| kDa | Kilo Dalton |
| l | Liter |
| m | Masse |
| M | Molar |
| m(X) | milli |
| MCAO | Okklusion der mittleren cerebralen Arterie (<i>middle cerebral artery occlusion</i>) |
| min | Minute |
| mm | Millimeter |
| mRNA | <i>messenger</i> -Ribonukleinsäure |
| nm | Nanometer |
| OGD | Sauerstoff- und Glukose-Entzug (<i>oxygen glucose deprivation</i>) |
| p.A. | per Analysis |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>) |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-Kinase |
| PL | Phospholipasen |
| PLZF | promyelocytic leukemia zinc finger |
| pRb | Retinoblastoma-Protein |
| (P)RR | Prorenin/Renin-Rezeptor |
| PTEN | Phosphatase and tensin homolog |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RAS | Renin-Angiotensin-System |

| | |
|--------|---|
| RLA | relative Luziferaseaktivität |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RNasin | RNase-Inhibitor |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>) |
| rpm | Umdrehungszahl (<i>rounds per minute</i>) |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute - Zellkulturmedium |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion |
| sek | Sekunde |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of mean</i>) |
| TPA | Gewebsplasminogenaktivator (<i>tissue plasminogen factor</i>) |
| TM | Temperatur |
| U | Enzymeinheit (<i>unit</i>) |
| u. a. | unter anderem |
| v/v | Volume per volume |
| w/v | Weight per volume |
| z.B. | zum Beispiel |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Kapitel 1 Einleitung | 1 |
| 1.1. Klinik und Epidemiologie des Schlaganfalls (Apoplex) | 1 |
| 1.1.1. Klassifizierung des Schlaganfalls..... | 2 |
| 1.1.2. Schlaganfallmodelle | 3 |
| 1.1.3. Pathophysiologie des Schlaganfalls | 5 |
| 1.2. Hypertonie und Schlaganfall..... | 7 |
| 1.2.1. Das Renin-Angiotensin- System | 7 |
| 1.2.2. Das RAS und Zerebroprotektion bei Ischämie..... | 17 |
| 1.3. Der Transkriptionsfaktor Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) | 18 |
| 1.3.1. Gen- und Proteinstruktur | 18 |
| 1.3.2. Expression und zerebrale Bedeutung | 20 |
| 1.3.3. Funktion..... | 22 |
| Kapitel 2 Zielsetzung | 26 |
| Kapitel 3 Material und Methoden | 27 |
| 3.1. Geräte..... | 27 |
| 3.1.1. Allgemeine Geräte..... | 27 |
| 3.1.2. Geräte für die <i>in vivo</i> -Versuche..... | 27 |
| 3.1.3. Geräte für die Kultivierung von Zellen | 28 |
| 3.1.4. Geräte für die zellbiologischen und molekularbiologische Methoden..... | 28 |
| 3.1.5. Geräte für die proteinbiochemischen Methoden | 29 |
| 3.2. Materialien | 30 |
| 3.2.1. Materialien für die <i>in vivo</i> -Versuche..... | 30 |
| 3.2.2. Materialien für die zellbiologischen Methoden..... | 30 |
| 3.2.3. Materialien für die molekularbiologischen Methoden | 30 |
| 3.2.4. Materialien für die proteinbiochemische Methoden..... | 31 |
| 3.3. Chemikalien | 31 |
| 3.4. Kits und Marker | 34 |
| 3.5. Primer und Vektoren..... | 34 |
| 3.5.1. Primer | 34 |
| 3.5.2. Vektoren | 36 |
| 3.6. Enzyme und PCR-Reagenzien..... | 37 |
| 3.7. Medien, allgemeine Puffer und Lösungen..... | 37 |
| 3.8. Antikörper | 38 |

| | |
|--|-----|
| 3.9. Zelllinien und Tierstämme | 39 |
| 3.9.1. Zelllinien..... | 39 |
| 3.9.2. Tierstämme | 39 |
| 3.10. Methoden | 40 |
| 3.10.1. Methoden der <i>in vivo</i> -Versuche | 40 |
| 3.10.2. Zellbiologische Methoden | 42 |
| 3.10.3. Molekularbiologische Methoden | 45 |
| 3.10.4. Proteinbiochemische Methoden..... | 53 |
| 3.10.5. Statistische Auswertungen..... | 60 |
| Kapitel 4 Ergebnisse | 61 |
| 4.1. Expressionsanalyse der Komponenten des PLZF-AT2R-(P)RR-Signalweges | 61 |
| 4.2. Tierexperimentelle Untersuchungen in einem Schlaganfallmodell der Ratte | 65 |
| 4.2.1. Quantitativer Nachweis der mRNA-Expression von Genen des PLZF-AT2R-(P)RR-Signalweges im Rattenhirn nach MCAO | 65 |
| 4.2.2. Nachweis des PLZF-Proteins mittels <i>Western blot</i> im Rattenhirn nach MCAO..... | 67 |
| 4.2.3. Nachweis des PLZF-Proteins mittels <i>Western blot</i> im Rattenhirn nach MCAO und fraktionierter Proteinisolation..... | 70 |
| 4.3. <i>In vitro</i> -Untersuchungen zur Bedeutung von PLZF im neuronalen Kontext | 74 |
| 4.3.1. Etablierung einer stabil PLZF-überexprimierenden KELLY-Zelllinie | 74 |
| 4.3.2. Morphologie | 76 |
| 4.3.3. Untersuchungen zur Zellzahl, Proliferation und Apoptose | 77 |
| 4.3.4. Glutamat-Toxizität..... | 80 |
| 4.3.5. Untersuchung von PLZF-Zielgenen | 81 |
| 4.3.6. Promotoraktivitätsuntersuchungen | 82 |
| Kapitel 5 Diskussion | 87 |
| Kapitel 6 Literaturverzeichnis | 98 |
| Kapitel 7 Publikationen | 116 |
| Kapitel 8 Abbildungsverzeichnis | 117 |
| Kapitel 9 Tabellenverzeichnis | 119 |
| Kapitel 10 Danksagung | 120 |

Kapitel 1 Einleitung

1.1. Klinik und Epidemiologie des Schlaganfalls (Apoplex)

Der Schlaganfall ist eine der häufigsten und bedeutendsten vaskulären Erkrankungen. Weltweit steht das Krankheitsbild Schlaganfall an zweiter Stelle der Todesursachen¹ und ist die dritthäufigste Ursache für Behinderungen und vorzeitige Invalidität in Europa². Im Jahre 2003 starben in Deutschland 75.114 Menschen an einem Schlaganfall (Frauen 47.728, Männer 27.386); das Krankheitsbild stand somit an dritter Stelle in der Todesursachenstatistik³. Zur Zeit erkranken etwa 200.000 bis 250.000 Menschen pro Jahr an einem erstmaligen oder wiederholten Schlaganfall⁴, etwa eine Million Bundesbürger leben mit den Folgen dieser Erkrankung⁵. Für die Betroffenen und ihre Angehörigen bedeutet ein Schlaganfall weit reichende Belastungen, denn nur etwa 40 Prozent der Überlebenden weisen ein Jahr nach der Erkrankung keine Einschränkungen in den Aktivitäten des täglichen Lebens auf⁶. Der Schlaganfall kommt vornehmlich im höheren Lebensalter vor: Männer sind bei einem erstmaligen Schlaganfall im Durchschnitt etwa 70 Jahre, Frauen etwa 75 Jahre alt⁴. Das hohe Alter von Schlaganfall-Patienten ist insbesondere vor dem Hintergrund der steigenden Lebenserwartung unserer Gesellschaft u. a. durch eine verbesserte Prävention und medizinische Fortschritte⁷ von Bedeutung. Aufgrund der Zunahme des Anteils der älteren Bevölkerung wird bei gleich bleibenden oder nur leicht sinkenden Neuerkrankungsraten damit gerechnet, dass die Zahl der Menschen, die mit den Folgen dieser Erkrankung leben, in Zukunft weiter ansteigen wird⁸. Experten der WHO sprechen bereits vom Schlaganfall als der kommenden "Epidemie des 21. Jahrhunderts"⁹.

Der Begriff „Schlaganfall“ oder englisch „Stroke“ umfasst mehrere Krankheitsbilder mit unterschiedlicher Ursache und unterschiedlichem Erscheinungsbild. Die WHO Definition lautet: Krankheitsbilder, bei denen sich die klinischen Anzeichen einer fokalen oder globalen Störung zerebraler Funktionen rasch bemerkbar machen, mindestens 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen und offensichtlich auf nichts anderes als vaskuläre Ursachen zurückgeführt werden können¹⁰.

1.1.1. Klassifizierung des Schlaganfalls

Schlaganfälle beruhen auf akuten Durchblutungsstörungen des Gehirns. Gewöhnlich werden zerebrale hämorrhagische Infarkte (ca. 15 - 20 % aller Schlaganfälle), zerebrale ischämische Infarkte (ca. 80 - 85 %) und Subarachnoidalblutungen unterschieden.

1.1.1.1. Zerebral ischämischer Infarkt

Bei den zerebralen ischämischen Infarkten wird in eine fokale (Strömungsbehinderung oder Abbruch in den zuführenden Arterien) und eine globale Ischämie (durch Störungen des systemischen arteriellen Kreislaufs) unterteilt^{11, 12}.

Mit ca. 80 % bildet die fokale zerebrale Ischämie, deren Ursache thrombotische oder embolische Gefäßverschlüsse sind die häufigste Ursache des Schlaganfalls^{13, 14}.

1.1.1.2. Zerebral hämorrhagischer Infarkt

Bei den zerebralen hämorrhagischen Infarkten treten intrazerebrale Blutungen auf, die durch eine Ruptur der Gehirnarterien bzw. durch Verletzungen der kleinen Gefäße verursacht werden. Ein hämorrhagischer Infarkt kann auch durch Tumore und Gefäßmissbildungen bzw. durch Blutgerinnungsstörungen ausgelöst werden^{15, 16}.

Der hämorrhagische Schlaganfall tritt wesentlich seltener auf als der ischämische Infarkt, allerdings liegt die Mortalitätsrate erheblich höher, da durch die Masseneinblutungen öfter größere Hirnareale betroffen sind.

1.1.1.3. Subarachnoidalblutung

Die dritte Klasse beschreibt die Subarachnoidalblutungen. Bei diesem Typ des Schlaganfalls, der am seltensten (ca. 5 %) auftritt, kommt es zu Einblutungen in den Raum zwischen der Arachnoidea und der Hirnoberfläche. Ursachen für eine Subarachnoidalblutung sind in erster Linie genetisch bedingte Mikroaneurysmen oder

Angiopathien¹⁷. Auch durch Verletzungen im Schädelbereich kann es zu einer Subarachnoidalblutung kommen.

1.1.2. Schlaganfallmodelle

Um die bei einer fokalen zerebralen Ischämie stattfindenden pathophysiologischen Vorgänge zu untersuchen, wurden *in vivo*- und *in vitro*-Modelle des Schlaganfalls entwickelt.

1.1.2.1. *In vivo*-Modell

Derzeit sind verschiedene Modelle zur Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie in unterschiedlichen Tierarten bekannt.

Die transiente Okklusion der *Arteria (A.) cerebri media* (MCAO) ist eine weit verbreitete Methode, um im Tiermodell pathophysiologische Veränderungen nach fokaler zerebraler Ischämie zu untersuchen. Die Induktion fokaler Ischämien durch MCAO beruht auf einer Technik, die von Koizumi und Longa beschrieben wurde^{18, 19}. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt wird dabei durch Einführen und Verschieben eines Fadens durch die rechte *A. carotis communis* (CCA) und die rechte *A. carotis interna* (ICA) der Blutfluss in der *A. cerebri media* (MCA) unterbrochen und somit eine fokale Ischämie induziert.

Diese Methode bietet die Möglichkeit, den Faden nach Ablauf einer definierten Ischämiezeit zu entfernen und so eine Reperfusion einzuleiten.

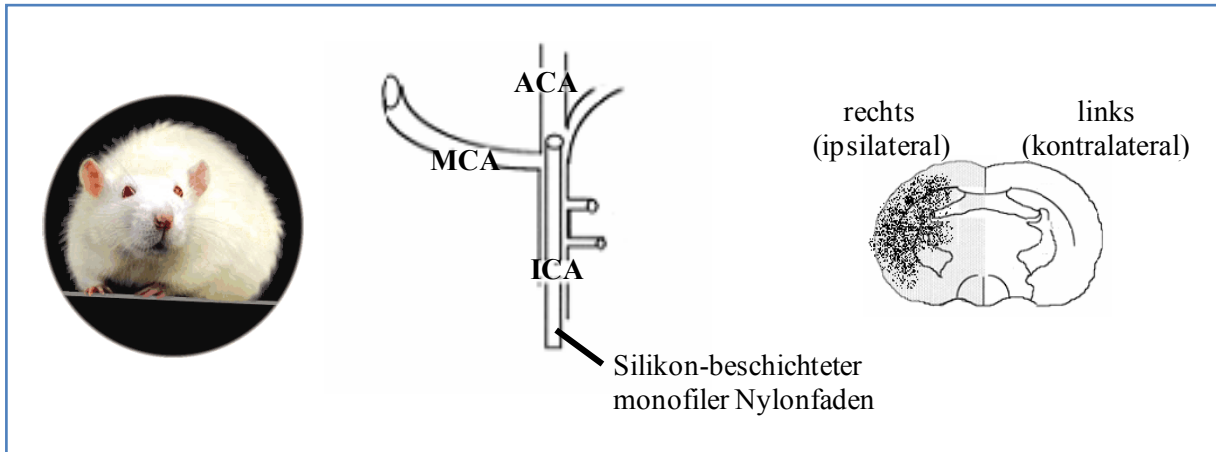


Abbildung 1: *In vivo*-Modell der MCAO in Ratten. Fokale zerebrale Ischämie induziert durch Okklusion der rechten *A. cerebri media*. Ein Silikon-beschichteter monofiler Nylonfaden wird vorsichtig durch die proximale *A. carotis externa* (ECA) in die *A. carotis interna* (ICA) geführt und letztendlich in die *A. cerebri anterior* (ACA) unter Verschluss der *A. cerebri media* (MCA). Nach 90 Minuten wird der Faden entfernt.

1.1.2.2. *In vitro*-Modell

Ein häufig verwendetes *in vitro*-Modell für die Simulation der Exitotoxizität (1. Phase) in der ischämischen Schadenskaskade ist der Glutamat-induzierte Zelltod. Es gibt Hinweise, dass Glutamat sowohl zum nekrotischen Zelltod, als auch zum verzögerten apoptotischen Zelltod führen kann. So kommt es unter Glutamatexposition bei einem Teil der Neuronen innerhalb kurzer Zeit zur Nekrose. Diese Zellen sind durch die charakteristischen, morphologischen Zeichen der Nekrose gekennzeichnet. Es kommt zu einer ballonartigen Schwellung des Zytoplasmas und zum raschen Zerfall der Zelle. Neurone, die nicht dem frühen nekrotischen Zelltod unterliegen, verfügen über ein intaktes Mitochondrienpotential und über genügend Energie. Sie versterben später am apoptotischen Zelltod, gekennzeichnet durch Chromatindegradation in große und kleine molekulare Fragmente und durch Formation von apoptotischen Körperchen.

Ein weiteres Modell, welches vorwiegend in der primären kortikalen neuronalen Zellkultur Anwendung findet, ist das von Goldberg et al. Ende der 80er Jahre entwickelte Verfahren des kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Entzuges (*oxygen glucose deprivation*, OGD)^{20, 21}. Kultivierte neuronale Zellen werden dabei transient in desoxygeniertem, glukosefreiem Medium inkubiert. Auf diese Weise wird *in vitro* der Mangel von Sauerstoff und Glukose im Gehirn bei einem ischämischen Schlaganfall simuliert.

1.1.3. Pathophysiologie des Schlaganfalls

Die Schädigung des Gehirns nach einer transienten oder permanenten fokalen Ischämie resultiert aus einer komplexen Kaskade pathophysiologischer Prozesse, die wenige Minuten bis Tage andauert und, wie in Abbildung 2 ersichtlich, aus den zeitlich determinierten Phasen Exitotoxizität, Periinfarktdepolarisation, Inflammation und Apoptose besteht.

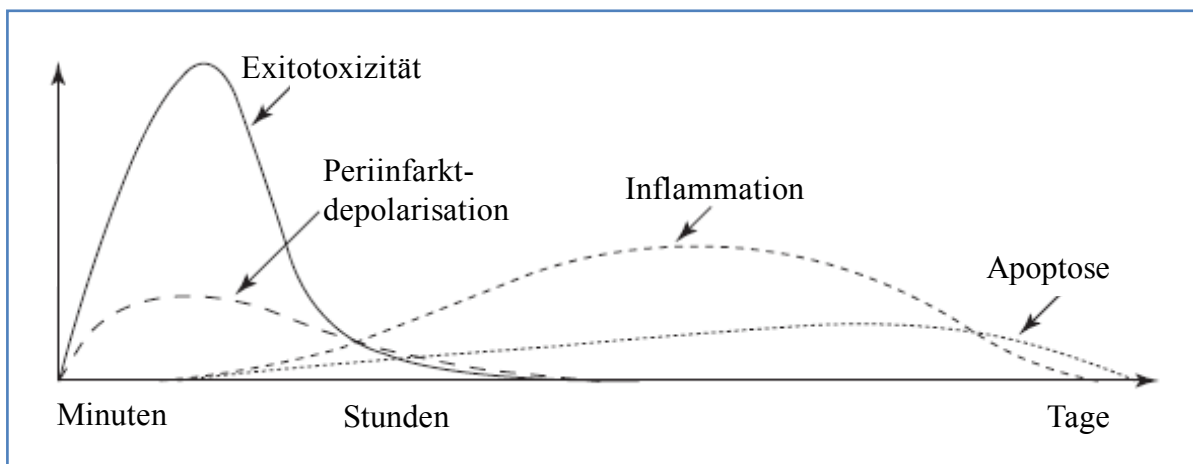


Abbildung 2: Ischämische Schadenskaskade adaptiert aus U. Dirnagl et al. (Trends Neuroscience, 1999)²².

Obwohl das menschliche Gehirn nur etwa 2 % des gesamten Körpergewichts ausmacht, ist es für ca. 20 % des Sauerstoffverbrauchs verantwortlich. Der relativ hohe Bedarf an Sauerstoff und Glukose wird zur ATP-Produktion für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials benötigt.

Aufgrund der Behinderung des Blutflusses beim Apoplex und der damit verbundenen Minderversorgung können die Zellen nicht mehr ausreichend ATP synthetisieren und es kommt zum Verlust des Membranpotentials und zur konsekutiven Depolarisation von Neuronen und Gliazellen²³. Somatodentritische, wie auch präsynaptische spannungsabhängige Kalziumkanäle werden aktiviert und exzitatorische Aminosäuren, v.a. Glutamat werden in den synaptischen Spalt freigesetzt, akkumulieren in pathophysiologisch hoher Konzentration durch den ebenfalls gestörten Glutamat-reuptake und aktivieren auch bei den umliegenden Neuronen ligandenabhängige NMDA-

Rezeptoren für metabotrope Natrium- und Kalziumkanäle. Die gesteigerte Aktivierung dieser Kanäle führt zum Anstieg intrazellulärer Natrium- und Chlorid-Ionenkonzentrationen, gefolgt von Wassereinstrom und der Entwicklung eines zytotoxischen, intrazellulären Ödems. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration ihrerseits führt zur Aktivierung einer Vielzahl von Enzymen, wie z.B. Kalpain, ATPasen, Phospholipasen (PL) und Endonukleasen^{24, 25}. Weiterhin kommt es durch die Generierung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoff-Derivaten zur Aktivierung der Expression proinflammatorischer Gene, sowie zur Schädigung von Zellmembran und Mitochondrien und schließlich zum Kaspase-vermittelten Zelltod.

Die Art des klinischen, neurologischen Defizits hängt vom Ort und von der Dauer der Ischämie ab. Die Akuttherapie des Schlaganfalls basiert auf dem sogenannten Konzept der ischämischen Penumbra²⁶.

Im Kerngebiet des Schlaganfalles tritt durch die Ischämie eine irreversible Schädigung von Neuronen und Gliazellen ein. Dieser Kern wird von einer minderdurchbluteten Zone, der Penumbra (Halbschatten) auch *tissue at risk* genannt, umgeben. Das Hirngewebe in der Penumbra ist aufgrund des erhaltenen Energiestoffwechsels noch für eine begrenzte Zeit überlebensfähig. Der Strukturstoffwechsel ist bei vermindertem Funktionsstoffwechsel intakt. In der Erhaltung der Zellen der Penumbra liegt der Ansatzpunkt für die akute Schlaganfalltherapie wie Thrombolyse und Neuroprotektion. Der Einsatz von thrombolytisch wirksamen Substanzen wie *tissue plasminogen factor* (TPA) ist nur in einem engen Zeitfenster möglich. Limitierend sind die möglichen Gefahren von zerebralen Blutungen und der Zeitraum der Anwendung, da TPA nur innerhalb der ersten drei Stunden nach thrombotischem oder embolischem Gefäßverschluss eingesetzt werden kann. Die Neuroprotektion ist ein Ansatz, der über eine pharmakologische Interaktion mit den pathophysiologischen Abläufen, die Konsequenzen der zerebralen Ischämie zu vermindern sucht. Für die Entwicklung potenter, neuroprotektiver Pharmaka ist jedoch ein besseres Verständnis der komplexen zellulären und molekularen Zusammenhänge notwendig. Nach einer Schädigung von Hirngewebe durch Trauma oder Ischämie konnte ein Anstieg der Expression Zellzyklus-assoziiierter Proteine beobachtet werden²⁷⁻³². Zellzyklus-Aktivierung in post-mitotischen Zellen wie Neuronen und Oligodendroglia induziert Kaspase-abhängige neuronale Apoptose³³ *in vitro* und *in vivo*³⁴⁻³⁸. Weiterhin konnte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo*-Modellen gezeigt werden, dass u. a. Zyklin D1,

Zyklin A, Zyklin-abhängige Kinase 2 (*cyclin-dependent kinase-CDK 2*) und CDK4 hochreguliert werden und das Retinoblastoma-Protein (pRb) phosphoryliert wird.

Neben der Entwicklung besserer und schneller wirksamer Pharmaka zur Therapie eines Schlaganfalles steht auch die Prävention im Vordergrund der Forschung. Durch die Bemühungen insbesondere durch die Behandlung des Risikofaktors „arterielle Hypertonie“ konnte die Inzidenz ischämischer Schlaganfälle reduziert werden³⁹.

1.2. Hypertonie und Schlaganfall

Der Schlaganfall zählt zu denjenigen Erkrankungen, die multifaktorelle Ursachen haben, wobei die Fülle an möglichen Risikofaktoren die Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen erheblich erschwert. Zu den Ursachen gehören neben der genetischen Prädisposition und Umwelteinflüssen (Luftverschmutzung, meteorologische Bedingungen, Lärm)⁴⁰ auch modifizierbarer Risikofaktoren wie Hypertonie, viszerale Adipositas, Diabetes mellitus u. a. das Risiko eines Schlaganfalles. Seit über 40 Jahren weiß man um den negativen Einfluss des arteriellen Bluthochdruckes auf kardio- und zerebrovaskuläre Morbidität und Mortalität. Der Bluthochdruck erwies sich als bedeutendster modifizierbarer Risikofaktor in der Primär- und Sekundärprävention zerebrovaskulärer Ereignisse⁴¹.

So tritt der Schlaganfall häufig als Folge von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der arteriellen Hypertonie, auf^{42, 43}.

1.2.1. Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein wichtiges Peptid-Hormon-System, welches in der Regulation von Blutdruck und Flüssigkeitshomeostase involviert ist^{44, 45}.

Dysregulationen in diesem System spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären und renalen Erkrankungen.

1.2.1.1. Das klassische RAS

Das im Jahre 1898 von Tigerstedt und Bergmann im Rohextrakt von Kaninchennieren entdeckte Enzym Renin katalysiert die Umsetzung von in der Leber gebildetem Angiotensinogen (AOPEN) zu Angiotensin I (Ang I)⁴⁶.

Renin, das in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet wird, ist eine monospezifische Aspartylprotease und spaltet spezifisch AOPEN unter Freisetzung von Ang I.

Renin wird als Präprorenin synthetisiert und nach Insertion in das endoplasmatische Retikulum zu Prorenin, der inaktiven Vorstufe von Renin, umgewandelt. Der Hauptanteil (75 %) des Prorenins wird konstitutiv sekretiert, während der Rest in den Granulas der juxtaglomerulären Zellen gespeichert wird⁴⁷. Neben Prorenin enthalten diese Granulas Cathepsin B und Prokonvertase 1. Diese Proteasen konvertieren im sauren pH-Wert Prorenin zu Renin unter proteolytischer Abspaltung des Prosegments^{48, 49}. Renin wird durch Exozytose in den Blutkreislauf freigesetzt. Stimulus für die Freisetzung sind ein niedriger Blutdruck und ein niedriger Natriumgehalt. Katecholamine via β -Adrenorezeptoren können ebenfalls zu einer vermehrten Renin-Freisetzung führen.

Ang II wird im Plasma und in verschiedenen Geweben aus dem inaktiven Dekapeptid Ang I durch proteolytische Abspaltung der zwei C-terminalen Aminosäuren His-Leu synthetisiert. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), eine Zink-Metalloproteinase, welche membrangebunden in den Gefäßendothelzellen, z.B. von Lunge, Leber, Niere und Milz lokalisiert ist. In Abbildung 3 ist die klassische Renin-Angiotensin-Kaskade schematisch dargestellt. ACE wurde erstmals im Jahre 1955 von Skeggs et. al aus dem Plasma von Pferden isoliert⁵⁰.

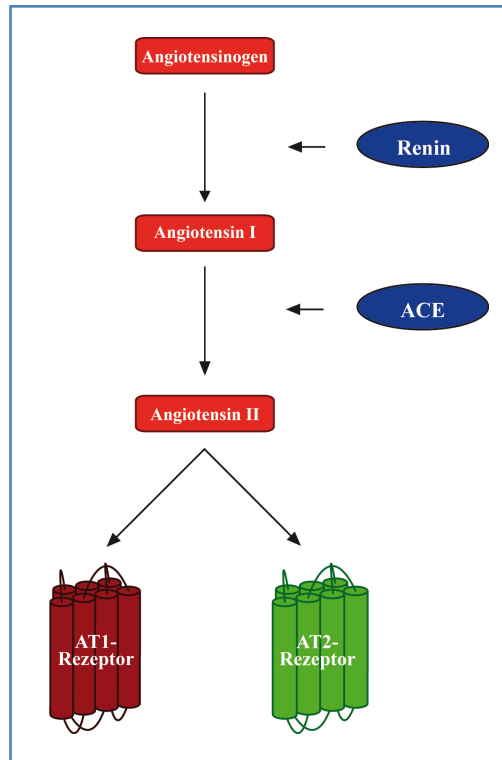


Abbildung 3: Klassische, vereinfachte Darstellung der Renin-Angiotensin-Kaskade.

In den letzten Jahren haben weitere Entdeckungen zum besseren Verständnis des RAS beigetragen. Zusätzlich zu den klassischen RAS-Komponenten wurden einige neue Komponenten entdeckt, Angiotensin 2-8 (Ang III), Angiotensin 3-8 (Ang IV), Angiotensin 1-9 (Ang (1-9)), Angiotensin 1-7 (Ang (1-7)), ACE2, Prorenin/Renin-Rezeptor ((P)RR oder RER), Mas-Rezeptor (MasR) und Angiotensin AT₄-Rezeptor (AT₄R) (Abbildung 3, Abbildung 6).

Ang II wird über die Aminopeptidase A (AP A) in Ang III abgebaut, welches über die Aminopeptidase B (AP B) in Ang IV umgewandelt wird. Ang IV bindet an einen eigenen Rezeptor, den AT₄R.

ACE2 ist ein homologes Enzym zu ACE, welches Ang I zu Ang (1-9) und Ang II zu Ang (1-7) degradiert^{51, 52}. Santos et al.^{53, 54} konnten zeigen, dass das *Mas* Proto-Onkogen als Rezeptor für Ang (1-7) fungiert. Weiterhin konnte ein Rezeptor beschrieben werden, welcher Prorenin und Renin bindet, der Prorenin/Renin-Rezeptor ((P)RR) genannt wird⁵⁵.

1.2.1.2. Die AT-Rezeptoren

Wie bereits erwähnt, entfaltet Ang II seine Wirkung hauptsächlich über zwei verschiedene Typen von AT-Rezeptoren, den AT1R und den AT2R. Beide Rezeptoren verfügen über eine ähnliche Affinität für Ang II und sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) mit sieben transmembranären Domänen (TMD), wobei der AT1- und AT2-Rezeptor eine Aminosäuresequenzhomologie von lediglich 34 % aufweisen^{44, 56} und der AT2R mit einem atypischen GPCR assoziiert ist. Unterschiede zwischen ihnen bestehen in Bezug auf ihre Expression in den verschiedenen Organen, die subtypspezifische Bindung von Liganden, die Signaltransduktionswege und die von diesen Rezeptoren vermittelten Wirkungen. Die Expression und physiologischen Effekte des AT1R und AT2R sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Expression und physiologische Effekte des AT1R und AT2R.

| | AT1R | AT2R |
|---------------------------------|---|---|
| Expression ⁴⁴ | Blutgefäße, Niere, Nebenniere, Herz, Leber, Gehirn und Lunge | starke Expression in fetalen Geweben, im adulten Organismus in einigen Hirnregionen, im Herzen, im Nebennierenmark, in Niere und in Geschlechtsorganen |
| Liganden ⁵⁷ | Affinität: Biphenylimidazole (Sartane) > Tetrahydroimidazolpyridine (PD-123319) | Affinität: Biphenylimidazole (Sartane) < Tetrahydroimidazolpyridine (PD-123319) |
| Effekte | Vasokonstriktion ⁴⁴ Zellproliferation ⁵⁸⁻⁶⁰ Hypertrophie des Myokards und Proliferation glatter Muskelzellen ⁶¹ Flüssigkeit- und Natriumretention ⁶² Bildung von Sauerstoff-Radikalen ^{63, 64} Endothelin-Sekretion ⁶⁵ | Vasodilatation ^{44, 66-69} Apoptose ^{70, 71} Anti-proliferative Effekte ^{58, 72} Regeneration im Gewebe ^{44, 73-75} NO- und cGMP-Synthese ^{44, 66-69, 76-78} Kollagensynthese ⁷⁹ |

1.2.1.2.1. Signaltransduktion des AT1-Rezeptors

Zur intrazellulären Signaltransduktion des AT1R gibt es inzwischen ausführliche Literatur^{44, 80}. Hier soll nur kurz auf die wichtigsten Signalwege eingegangen werden. Die Signaltransduktion des AT1R ist komplex und beinhaltet sowohl die für sieben-transmembranäre Rezeptoren typischen G-Protein-gekoppelten, wie auch verschiedene G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege. Die Bindung von Angiotensin II am AT1-Rezeptor führt zur Aktivierung einer „klassischen“ G-Protein-Kaskade mit

Gq/11-Stimulation und nachfolgender PLC-, PLD- und PLA2-Stimulation^{81, 82}. Die Aktivierung der Phospholipase C führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol⁸³. IP₃ ruft eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums hervor, welche seinerseits zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase C führt⁸⁴. Die durch PLD und PLA2 initiierte Kaskade endet in der Bildung von Fettsäuren, welche die Vorstufen zur Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen darstellen⁸⁵. Des Weiteren wurde gezeigt, dass über den AT1-Rezeptor Signalwege von Wachstumsfaktoren stimuliert werden, wie z.B. Tyrosin-Phosphorylierung und Phospholipase C- γ -Aktivierung, was zu einer Aktivierung u. a. von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), Janus-Kinasen (JAKs) und *signal transducers and activators of transcription* (STATs) führt^{44, 86, 87}. Schließlich führt die Bindung von Ang II an AT1R auch zur Stimulation von membrangebundenen NADH/NADPH-Oxidasen, was zur Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten (ROS) führt⁸⁸. Die Reduktion von NO durch ROS resultiert in einer Vasokonstriktion. Ferner fördern ROS auch die Oxidation von LDL und führen damit zu erhöhter Atherogenität⁸⁹, wie es die folgende Abbildung schematisch zeigt.

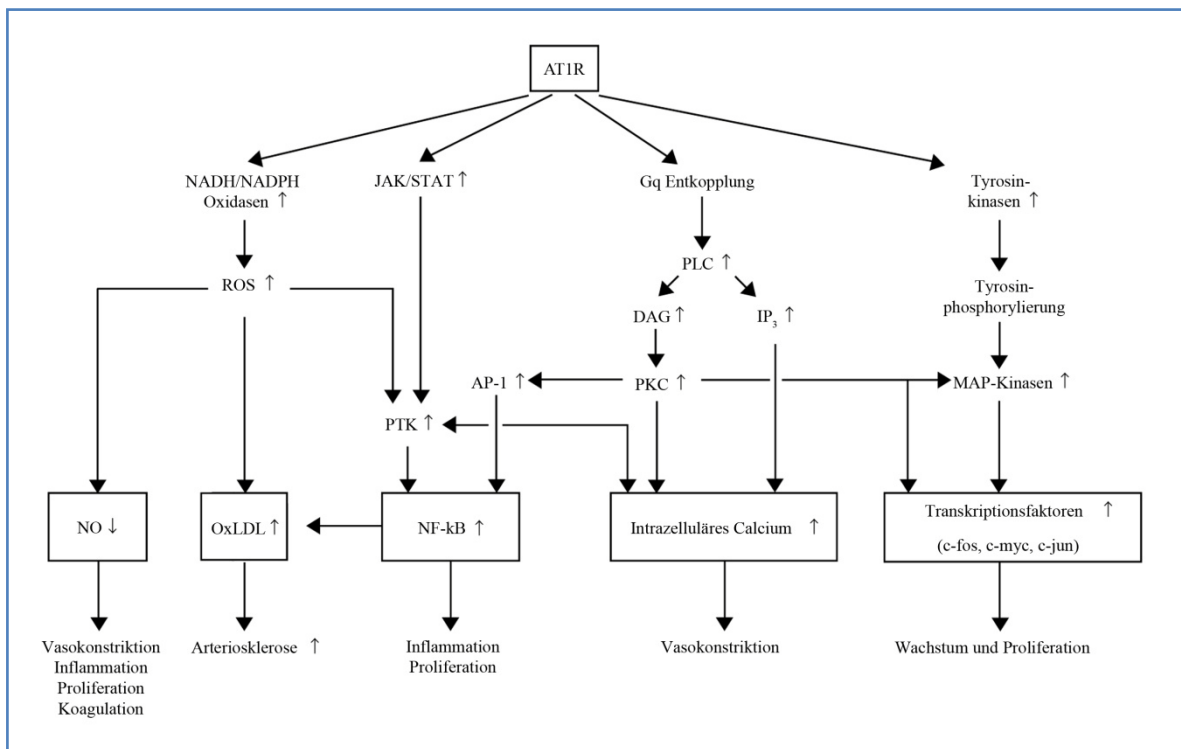


Abbildung 4: Die Signaltransduktion des AT1R (adaptiert aus Wagenaar et al. (Can. J Cardiol. 2002))⁹⁰.

1.2.1.2.2. Signaltransduktion des AT2-Rezeptors

Die Entschlüsselung des Signalweges des AT2R erwies sich als sehr viel komplizierter als die des AT1R. Es hat sich bei der Arbeit an Zellkulturen, die den AT2-Rezeptor exprimieren, gezeigt, dass die Kulturbedingungen die Expression des Rezeptors stark beeinflussen.

Nach Ang II-Bindung kommt es zu einer Entkopplung von G_i ⁹¹. Dies aktiviert die Serin/Threonin-Phosphatase 2A (PP2A) und Phospho-Tyrosin-Phosphatase (PTP), wodurch die Protein-Serin/Threonin und Protein-Thyrosin-Phosphorylierung reduziert wird. Dadurch wird die AT1R-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung supprimiert. Konsekutiv werden Zellwachstum und Proliferation vermindert⁷². Der AT2R kann weiterhin mit der Phosphatase SHP-1 physikalisch interagieren⁹². Im kardialen Kontext wurde der Transkriptionsfaktor PLZF (*promyelocytic zinc finger protein*) als direkter Interaktionspartner des AT2R beschrieben⁹³ und Nouet et al.⁹⁴ und Wruck et al.⁹⁵ konnten unabhängig voneinander einen weiteren direkten Interaktionspartner, das *AT2 receptor interacting protein /AT2R binding protein* (ATIP/ATBP) identifizieren. Rekrutierung von SHP-1 oder ATIP/ATBP vermittelt antiproliferative und antihypertrophische Effekte, während eine Rekrutierung von PLZF kardiale Hypertrophie fördert⁹⁶. Daneben führt die AT2R-Aktivierung über die intrazelluläre Bildung von Ceramid und ROS zur Stimulation von NF- κ B⁹⁷. In verschiedenen Tiermodellen kann gezeigt werden, dass AT2R-Bindung zur Aktivierung eines Bradykinin/NO-cGMP Weges führt, was eine Vasodilatation zur Folge hat^{98, 99}. Abbildung 5 zeigt eine schematische Übersicht der AT2R-Interaktionspartner und dessen Signaltransduktion. AT2R ist im Wesentlichen als Gegenspieler des AT1R zu verstehen.

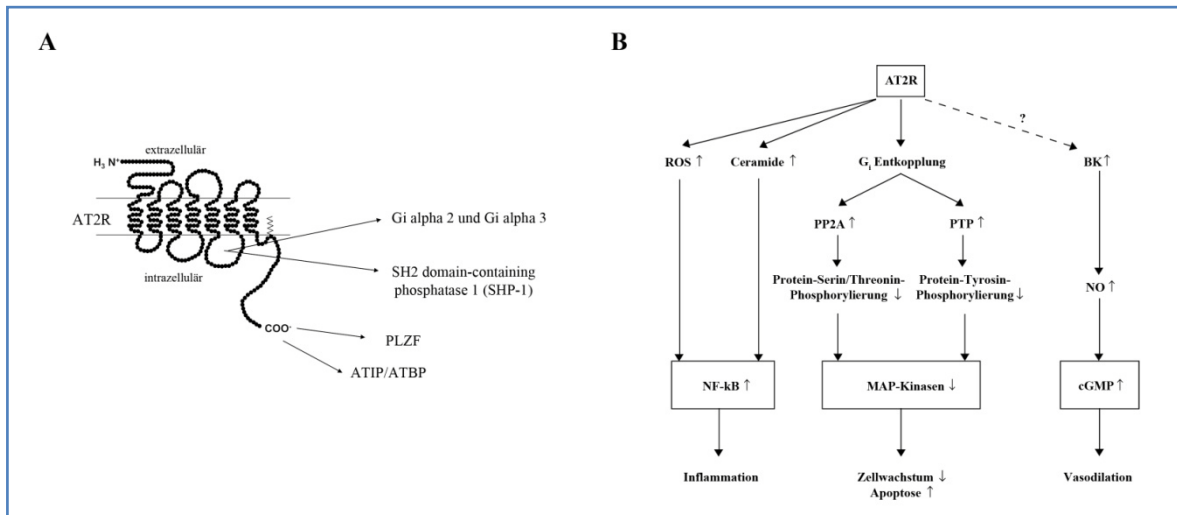


Abbildung 5: Übersicht AT2R-Interaktionspartner und AT2R-Signaltransduktion; B adaptiert aus Wagenaar et al. (Can. J Cardiol. 2002)⁹⁰.

1.2.1.3. Lokales RAS im Gehirn

Zu Beginn seiner Erforschung wurde das RAS zunächst als ausschließlich systemisch wirksames endokrines Enzym-Hormon-System betrachtet. Neben dem systemischen RAS, spielt die Existenz lokaler RAS eine entscheidende Rolle. Als extrinsisches lokales RAS wird die lokale Bildung von Ang II nach Aufnahme von Renin renalen Ursprunges in verschiedenen Geweben bezeichnet. Seine physiologische Relevanz ist allerdings umstritten. Das Konzept des intrinsischen lokalen RAS beinhaltet die lokale Produktion sämtlicher Komponenten des RAS. Die Expression von mRNA für Renin, Angiotensinogen und ACE konnte in verschiedenen Organen (Gehirn, Nebenniere, Gefäße) nachgewiesen werden¹⁰⁰.

Seit fast 20 Jahren ist bekannt, dass Organe lokale Ang II-generierende Systeme haben, die vom klassischen endokrinen RAS völlig unabhängig sind¹⁰¹. So konnten die Arbeitsgruppen um Detlev Ganten und Catalina Fischer-Ferraro im selben Jahrzehnt nachweisen, dass Angiotensin auch im Gehirn synthetisiert wird^{102, 103}. Die Verteilung von Angiotensin im Gehirn ist mittels immunhistochemischer und autoradiografischer Methoden determiniert worden.

Die Regionen, in denen sich Ang II-exprimierende Neurone in großer Menge befinden, sind das Subfornikalorgan, das *Organum vasculosum* der *Lamina terminalis* und die *Area postrema*. Aber auch in anderen Hirnregionen, wie beispielsweise im Hypothalamus, im

Thalamus und in der Amygdala finden sich Zellen, in denen Angiotensin II nachgewiesen werden konnte.

Obgleich das RAS des Gehirns unabhängig vom peripheren System reguliert scheint, können zirkulierende Komponenten des RAS das zentrale Nervensystem über Interaktionen mit AT-Rezeptoren, die in den zirkumventrikulären Organen lokalisiert sind, beeinflussen. Diese zirkumventrikulären Organe (z.B. *Area postrema*, Subfornikalorgan, *Organum vasculosum der Lamina terminalis* (OVLT)) besitzen eine reduzierte Blut-Hirn-Schranke und erlauben so die Penetration von Hormonen. So kann das periphere RAS an einigen Stellen mit dem RAS des Gehirns interagieren^{104, 105}.

Neben den klassischen Komponenten des RAS konnten auch Ang III, Ang IV, Ang (1-7), ACE2, Prorenin und der MasR in jüngsten Studien im Gehirn nachgewiesen werden¹⁰⁶, dessen Zusammenspiel in Abbildung 6 schematisch dargestellt ist.

Im Gehirn spielt Ang II neben den in Tabelle 1 erwähnten Effekten auch eine Rolle bei der Alzheimer Erkrankung, dem Schlaganfall, beim Lernen und dem Gedächtnis, bei Depressionen und emotionalem Stress¹⁰⁶.

Ang II hat Einfluss auf den Wasserhaushalt und den Elektrolyt-Spiegel. Wird beispielsweise Ang II intracerebroventrikulär (icv) injiziert, so kann bei Versuchstieren ein verstärktes Durstverhalten induziert werden¹⁰⁷. Ebenso bedingt eine icv-Injektion von Ang II in den dritten Ventrikel eine verstärkte Salzaufnahme¹⁰⁸. Eine icv-Injektion in die lateralen Ventrikel oder verschiedene Bereiche des Vorderhirnes verursacht einen Anstieg des Blutdruckes, welcher Vasopressin vermittelt ist¹⁰⁹. Der Mechanismus für die Vasopressin-Sekretion beinhaltet die Freisetzung von Noradrenalin aus Nervenendigungen und die Stimulation von post-synaptischen α -adrenergen Rezeptoren, welche in den Membranen von Vasopressin-synthetisierenden Neuronen lokalisiert sind¹¹⁰.

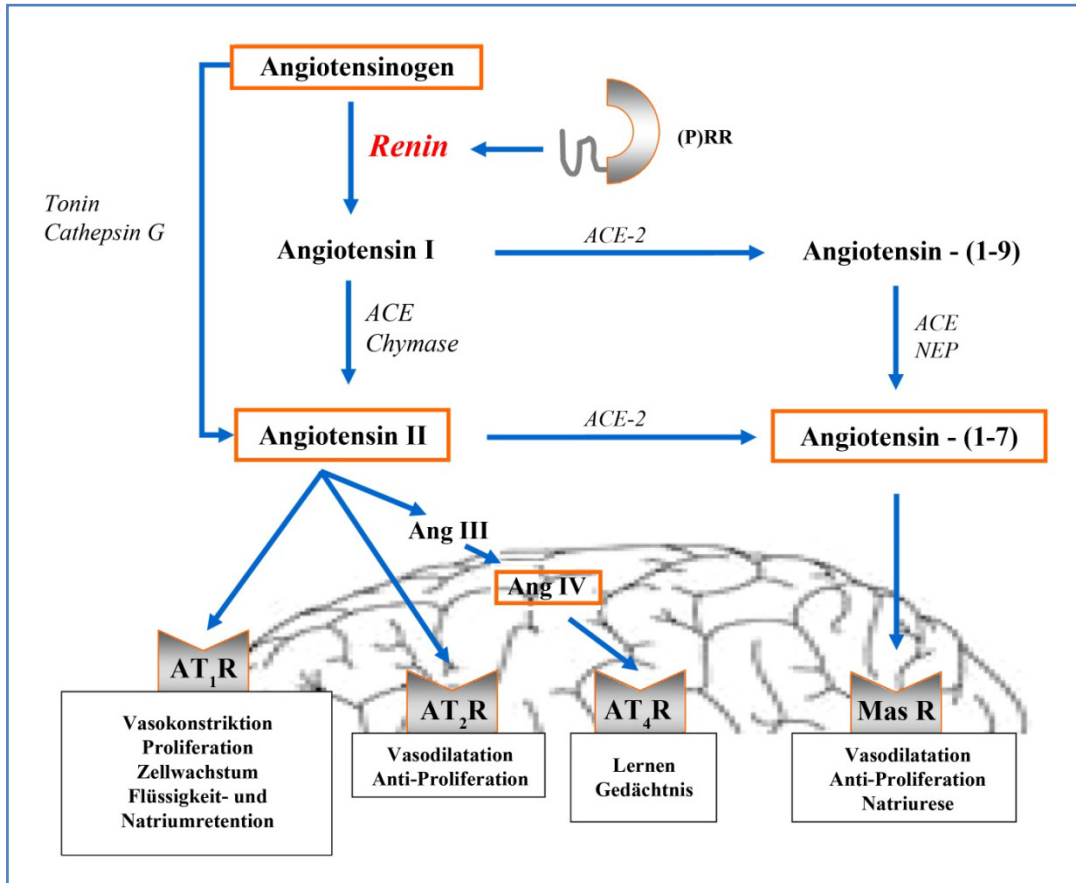


Abbildung 6: Zerebrales Renin-Angiotensin-System (adaptiert aus Phillips und Oliveira (J Mol. Med 2008))¹⁰⁶.

Bei Morbus Alzheimer konnten eine gesteigerte ACE-Aktivität und Veränderungen in anderen Komponenten des RAS beobachtet werden¹¹¹⁻¹¹⁴. Der positive Einfluss von ACE-Hemmern und AT₁R-Blockern (ARBs), nachgewiesen im Tiermodell und beim Menschen, zeigt, dass eine Reduktion der zerebralen RAS Aktivität von besonderer Bedeutung bei der Behandlung von Morbus Alzheimer ist. Eine verminderte Ang II-Konzentration führt zu einem Anstieg an Substanz P, einem Substrat des ACEs, welches die Aktivität von Neprilysin, einem bekannten Amyloid β abbauenden Enzym, steigert¹¹⁵. Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem zerebralen RAS und dem Gedächtnis sowie dem Lernverhalten nachweisen. Die Behandlung mit ARBs reduziert das Angstverhalten und verbessert das Lernen, das räumliche Gedächtnis und die motorischen Fähigkeiten bei älteren Ratten¹¹⁶⁻¹¹⁹. Werden geringe Mengen von Renin icv in das Gehirn injiziert bevor ein Lernexperiment an Ratten durchgeführt wurde, dann zeigten diese Tiere eine verschlechterte Lernleistung als Kontrolltiere. Wird ein ACE-

Hemmer vor einem Versuch gegeben, so zeigen diese Tiere ein verbessertes Lernverhalten, als die Kontrolltiere, die keinen ACE-Hemmer verabreicht bekamen. Eben solche Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn Antagonisten des AT1R verabreicht werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass AT1R an der lernvermindernden Wirkung von Angiotensin II beteiligt ist¹¹⁷. Bonini et al.¹¹⁶ konnten zeigen, dass eine intrahippocampale Infusion von Ang II Amnäsie in Ratten auslöst und dieser Effekt AT2R-vermittelt ist. Bei elektrophysiologischen Langzeitpotenzierungs-(LTP-)Versuchen konnte demonstriert werden, dass Ang II über AT1Rs, sowohl im Hippocampus wie auch in der Amygdala, eine Langzeitpotenzierung inhibiert.

1.2.2. Das RAS und Zerebroprotektion bei Ischämie

Das RAS spielt in der Pathophysiologie des Schlaganfalles eine entscheidende Rolle.

In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Studien (HOPE, PROGRESS, ACCESS, MOSES und ONTARGET)¹²⁰⁻¹²⁴ die spezifischen zerebroprotektiven Effekte unterschiedlicher Antihypertensivaklassen intensiv hinterfragt.

Es konnte im MCAO-Schlaganfallmodell der Ratte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung mit ARBs und ACE-Hemmern zu einer Reduktion des Infarkt volumens und zu einer Verbesserung der neurologischen Folgen kommt¹²⁵⁻¹³². Im Tierversuch konnte unter dem AT1-Rezeptorblocker Candesartan-Cilexetil eine Verbesserung der zerebralen Ischämietoleranz gezeigt werden^{127, 133, 134}. Weiterhin konnte in *in vivo*-Versuchen mit ARBs demonstriert werden, dass AT1R-Blockade nur bei vorhandenen AT2R das Infarkt volumen vermindert und neurologische Defizite verbessert^{135, 136}. Eine AT1R-Blockade in AT2R-*knockout*-Mäusen führte zu keiner Verbesserung der neurologischen Defizite nach MCAO.

Weiterhin konnte sowohl *in vivo*^{128, 136} als auch *in vitro*^{128, 135} gezeigt werden, dass die neuroprotektiven Effekt AT2R-vermittelt werden.

Der AT2R wird nach zerebraler Ischämie im Kortex stark hochreguliert und ist wohl an der Vermittlung von neurotrophen Effekten beteiligt¹³⁷⁻¹³⁹.

In diesem Zusammenhang sind auch die positiven neuroregenerativen Effekte des AT2R bei peripheren Nervenläsionen im Tiermodell⁷³ und bei einem N. opticus-Verletzungsmodell *in vivo*⁷⁴ von Interesse.

1.3. Der Transkriptionsfaktor Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF)

1.3.1. Gen- und Proteinstruktur

Das PLZF-Gen, auch als Zfp145 oder Zbtb16 bezeichnet, wurde erstmals bei der akuten promyelotischen Leukämie (APL) identifiziert, bei welcher PLZF in einer reziproken Translokation t(11;17)(q23;q21) in Fusion mit dem RAR α -Gen (RARA) vorliegt¹⁴⁰. Die genomische Sequenz und Struktur des PLZF-Gens wurden bereits 1999 von Zhang et al. beschrieben¹⁴¹. Das Gen besteht aus sechs Exonen und fünf Intronen und umfasst 201 kb. Die mRNA, mit einer Länge von ~8 kb, enthält eine ungewöhnlich lange 5'-nichttranslatierte Region (UTR) von 6 kb, die komplett im Exon 1 lokalisiert ist, eine ca. 2 kb lange kodierende Region und eine ca. 100 bp lange 3'-UTR. Exon 1 kodiert für die *poxvirus zinc finger* (POZ)-Domäne, die Repressor-Domänen 2 (RD2), eine prolin-reiche Region und einen Teil des ersten Zinkfingers.

Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, gibt es vier alternative Spleißvarianten der PLZF-mRNA, die zu fünf PLZF-Isoformen führen können. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Spleißvarianten liegen in der Länge von Exon 1. Es gibt Varianten ohne POZ-Domäne, mit unterschiedlichem Anteil an der prolin-reichen Region oder verschiedenen langen 5'-UTRs. Die alternative Spleißvariante (AS) I konnte in den meisten Geweben detektiert werden, die anderen AS im Magen, in den Testes und im Herzen. Während die Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Signale an den Exon-/Intron-Grenzen für die AS I bei Exon 1 und für die anderen Exons klassisch aufgebaut sind, sind die AS II, III und IV bei Exon 1 mit atypischen Spleißvarianten assoziiert.

Der Transkriptionsstart konnte bisher nicht identifiziert werden.

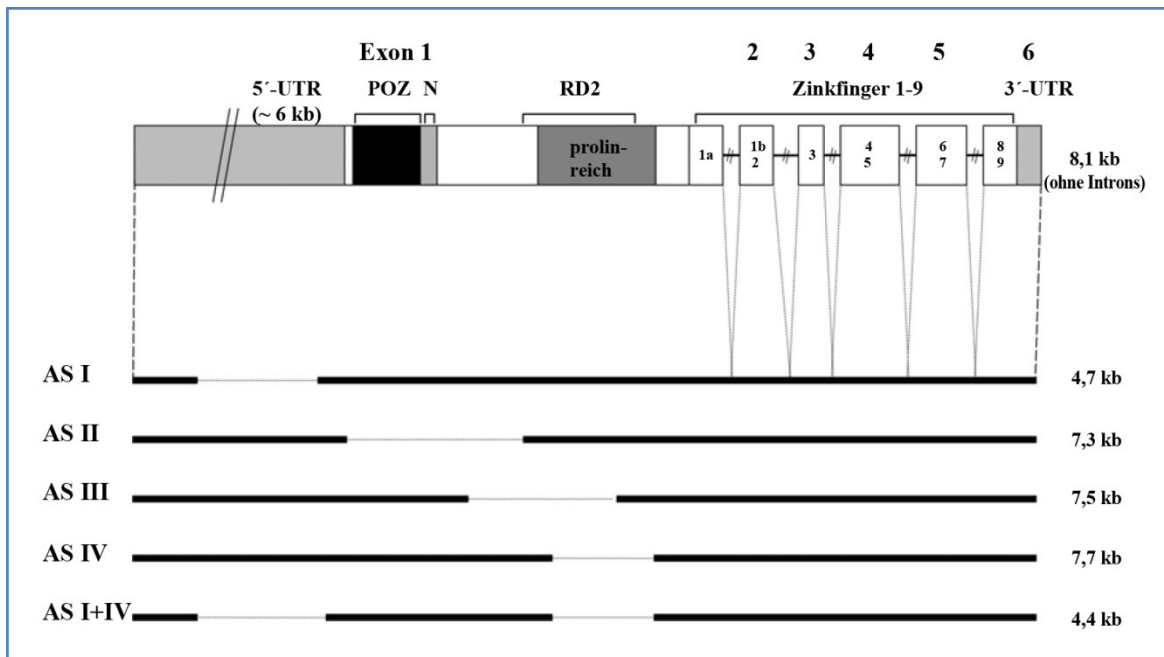


Abbildung 7: Darstellung von PLZF und alternativen Spleißvarianten nach J. Fahnenstich (adaptiert aus J. Fahnenstich et al. (Mol Hum Reprod. 2003))¹⁴².

Das Wildtyp PLZF-Gen kodiert für einen 673 Aminosäure großen Transkriptionsfaktor (TF) mit einem erwarteten Molekulargewicht von 74 kDa aus der Familie der *Krüppel-like* Zink-Finger Proteine mit neun Zink-Finger vom C₂H₂-Typ^{140, 143}. In Polyacrylamidgelen migriert das Protein mit einem Molekulargewicht von 80 bis 90 kDa¹⁴⁴.

Das PLZF-Protein beinhaltet sowohl eine N-terminal lokalisierte *bric-a-brac/tramtrack/broad complex* (BTB)/POZ-Domäne, als auch die Repressor Domäne 2 (RD2). Die BTB/POZ-Domäne ist eine Dimerisierungsdomäne und vermittelt die Bildung von Homodimeren¹⁴⁵.

Die RD2¹⁴⁶ ist in der Lage, *Eight-Twenty One* (ETO), einen nicht-DNA bindenden transkriptionellen Repressor, zu rekrutieren¹⁴⁷.

PLZF und ETO können Korepressoren wie SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid-hormon receptor*), N-CoR (*nuclear receptor co-repressor*), Sin3A und HDAC1 (*histon deacetylase 1*) rekrutieren und einen transkriptionellen Repressor-Komplex bilden¹⁴⁷⁻¹⁵³.

Durch verschiedene Versuchsansätze konnte eine Konsensussequenz für die Bindung von PLZF an DNA erschlossen werden. Diese Sequenz (GTACT/AGTAC) wird von vier C-terminal gelegenen Zinkfingern erkannt^{146, 154, 155}. Die N-terminalen Zinkfinger, so wird

vermutet, sind nicht an der DNA-Bindung beteiligt, sondern beeinflussen möglicherweise Protein/Protein-Wechselwirkungen¹⁵⁶.

Neben dem ca. 74 kDa großen PLZF-Protein (PLZFB-Isoform) wurden zwei weitere Protein-Isoformen mit einem Molekulargewicht von ca. 61 kDa (PLZFA)¹⁵⁷ und 45 kDa¹⁵⁸ in der Literatur beschrieben. Bei der PLZFA-Isoform fehlen die Aminosäuren 255 - 377 und bei der hepatischen 45 kDa-Isoform die BTB-Domäne. Die Bedeutung beider Isoformen ist noch nicht genauer charakterisiert.

1.3.2. Expression und zerebrale Bedeutung

Die Expression des PLZF ist am höchsten in undifferenzierten multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen und nimmt ab, je mehr die Zellen differenzieren¹⁵⁹.

Zudem konnte PLZF-mRNA auch in humanen Promyelozyten-Zelllinien (NB-4, KG-1 und HL-60) detektiert werden. Unter *all-trans* Retinolsäure-induzierter Differenzierung erfolgt eine Herabregulation von PLZF in HL-60 und NB-4 Zellen als Voraussetzung für eine Granulopoese¹⁴⁰. Im Unterschied dazu ist eine erhöhte PLZF-Expression während der Megakaryopoese notwendig für die Induktion der Thrombopoetin-Rezeptor Expression¹⁶⁰.

Bisher konnte das PLZF-Protein im Menschen nur in CD34⁺-Vorläuferzellen im Knochenmark in hohen Mengen nachgewiesen werden. Mittels Immunfluoreszenz-Methoden konnte gezeigt werden, dass es dort in punktuellen Ansammlungen (*nuclear bodies*) im Kern vorliegt und dass dies von der BTB/POZ-Domäne abhängig ist^{145, 159}.

Das PLZF-Protein spielt eine wichtige Rolle in der Organisation des Vorderhirns¹⁶¹ und der Segmentierung des Rautenhirns¹⁶². PLZF wird während der Mausentwicklung in einem extrem dynamischen Muster exprimiert, und Transkripte erscheinen in E 7,5 (Tag 7,5 nach Koitus und dem Auftreten einer Vaginalplaque) im anterioren Neuroepithelium. Bis E 10 erfolgt eine schnelle Ausbreitung ins gesamte Neuroektoderm. Während der mittleren und späten Gestation wird PLZF in begrenzten Regionen des sich entwickelnden Gehirns exprimiert. Im Vorderhirn konnte PLZF-mRNA im Epithalamus, im Hypothalamus entlang abgegrenzter longitudinaler Subdomänen und im anterioren Pretectum detektiert werden. Im Rautenhirn ist bis E 8,5 eine ubiquitäre Expression zu beobachten. In E 9,5 erfolgt in den Rhombomeren 3 und 5 eine Herabregulation der PLZF-Expression und ab E 10 ist PLZF-mRNA nur noch in den Zellen, welche die rhombomeren Grenzen bilden,

exprimiert. Dieser Zusammenhang der segmentierten Expression von PLZF ist in Abbildung 8 dargestellt.

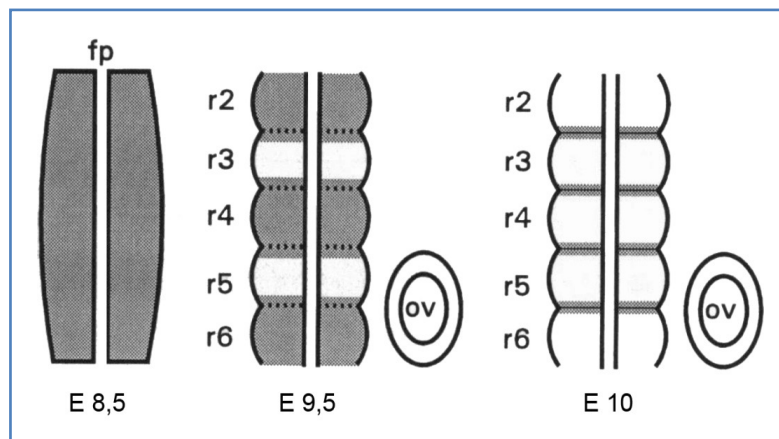


Abbildung 8: Zusammenfassung der segmentierten Expression von PLZF im Rautenhirn von Mausembryonen nach M. Cook et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 1995)¹⁶². In E 8,5 ist die PLZF-Expression ubiquitär, bei E 9,5 erfolgt eine Herabregulation in den Rhombomeren 3 und 5 und in E 10 ist nur noch in den Rhombomeregrenzen eine PLZF-Expression vorhanden. (ov = otic vesicle; fp = floor plate; r = rhombomere).

Homozygote PLZF-*knockout*-Mäuse (PLZF^{-/-}-Mäuse) zeigen muskuloskelettale Extremitätendefekte sowie eine gestörte Spermatogenese, weiterhin zeigte sich eine erhöhte Proliferations- und gesenkte Apoptoserate, was die Annahme unterstützt, dass PLZF als Wachstumsunterdrücker agiert¹⁶³. Die Arbeitsgruppe um Prof. Pandolfi konnte nach eigenen Angaben keine schwerwiegenden Störungen im Gehirn dieser Mäuse beobachten.

Auch das PLZF-Homolog des Huhns zeigt ein ähnliches segmentales Expressionsmuster im Rautenhirn. Aus dem hohen Grad der evolutionären Konservierung zwischen dem PLZF-Expressionsmuster während der Säugetier- und Vögel-ZNS-Entwicklung kann für PLZF eine wichtige Rolle bei der Segmentierung des Vertebratenrautenhirns vermutet werden¹⁶².

Neben der Expression im Gehirn wird PLZF auch in spezifischen Organen und Strukturen des Körpers, z.B. Nierenanlagen und Kiemenbögen, exprimiert¹⁶¹.

1.3.3. Funktion

Die Funktion des Transkriptionsfaktors PLZF ist sehr vielfältig. Er kann in Abhängigkeit des Zellkultur-Modells die Expression von Genen aktivieren, als auch reprimieren.

PLZF ist in der Lage, das Zellwachstum zu unterdrücken. In einer Vielzahl von Zellkultur-Modellen (32Dcl3, HL-60, U937) konnte gezeigt werden, dass die PLZF-Expression und Überexpression in einem Zellzyklus-Arrest der Zellen in der G1-Phase resultiert und letztendlich zur Apoptose führt¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. PLZF kann die myeloide Differenzierung auch vor Induktion der Apoptose regulieren. In 32D-Zellen blockiert PLZF die G-CSF und GM-CSF induzierte Differenzierung hämatopoetischer Zellen.

In seiner Funktion als transkriptioneller Repressor mit anti-proliferativer Wirkung bindet PLZF in den Promotoren von Zyklin A2^{146, 154} und c-myc¹⁶⁷ und inhibiert die Expression beider Gene. Durch eine gesteigerte Expression von Zyklin A2 und c-myc kann die Wachstumsunterdrückung wieder überwunden werden.

Weiterhin konnte ein PLZF-Bindungsmotiv im Promotor der Interleukin-3-Rezeptor (IL-3R-) α Untereinheit identifiziert werden¹⁵⁴. IL-3 ist in der frühen Phase der Zelldifferenzierung an der Hämatopoese beteiligt¹⁶⁸.

Eine Überexpression von PLZF in murinen hämatopoetischen Zelllinien führt zur reduzierten Expression der IL-3R- α Untereinheit und in IL-3-abhängigen Zellen (32Dcl3-Zellen) zum Zellzyklus-Arrest.

Nicht nur über direkte Bindung an die DNA und nachfolgende transkriptionelle Reprimierung kann PLZF wirken. Ward et al.¹⁶⁵ konnten in U937-Zellen zeigen, dass Monozyten-Differenzierung durch direkte Interaktion von PLZF über die BTB/POZ-Domäne mit dem Vitamin D3-Rezeptor (VDR) gehemmt werden kann. Hierbei bindet nicht PLZF an die DNA und reprimiert die Transkription, sondern der VDR, welcher an die DNA gebunden ist, wird gehemmt. Weiterhin konnte eine direkte Interaktion mit dem Retinoblastoma-Protein (pRb) beobachtet werden¹⁶⁹. Während der G0-Phase des Zellzyklus ist pRb nicht oder nur gering phosphoryliert. In seiner hypophosphorylierten Form inhibiert pRb Transkriptionsfaktoren der E2F/DP-Familie und verhindert hierdurch die Hochregulation von Genen, die z.B. für die Aktivierung der DNA-Synthese während der S-Phase benötigt werden. Um im Zellzyklus fortschreiten zu können, muss daher das Rb-Protein phosphoryliert und hierdurch funktionell inaktiviert werden. Treten die Zellen in den Zellzyklus ein wird pRb gegen Ende der G1-Phase durch Hyperphosphorylierung,

Übertragung von zehn oder mehr Phosphatgruppen auf pRb, inaktiviert und die Bindung an E2F gelöst, so dass E2F mit den Dimerisierungspartnern der DP (*differentiation regulated transcription factor*)-Familie¹⁷⁰ in Wechselwirkung treten und hierdurch biologisch aktive Transkriptionsfaktoren bilden kann^{171, 172}, wie es in Abbildung 9 schematisch dargestellt ist. Die Phosphorylierung des pRb wird durch den Zyklin D1-Cdk4-Komplex eingeleitet.

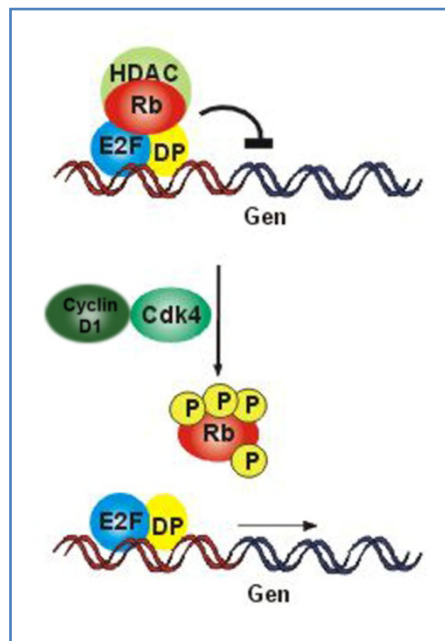


Abbildung 9: Interaktion von PLZF am G1/S-Phase-Übergang.

Bisher wurden acht E2F-Proteine identifiziert (E2F1-E2F8), die in Abbildung 10 zusammengefasst sind.

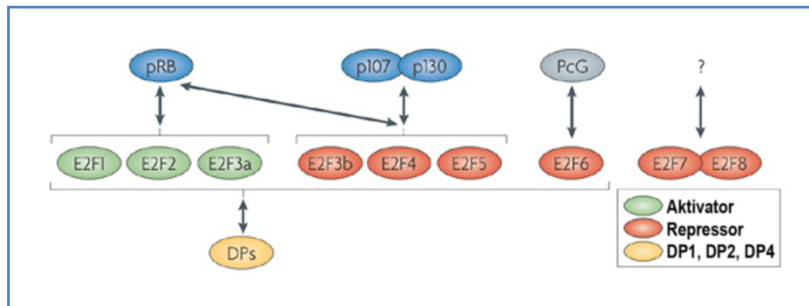


Abbildung 10: Übersicht über die Mitglieder der E2F-Familie und deren Interaktionspartner nach van den Heuvel und Dyson (Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 2008)¹⁷³.

Die Ko-Expression von PLZF und pRb führt zu einer verstärkten Repression von PLZF- und E2F/pRb-Zielgenen, wobei die PLZF/pRb-Interaktion unabhängig von der pRb-Hypophosphorylierung ist.

PLZF-Expression beeinflusst nicht nur das Zellwachstum, die Differenzierung und Apoptose myeloischer Zellen, sondern vermittelt in Abhängigkeit des Zellsystems auch anti-apoptotische Effekte sowie die Aktivierung der Expression von Genen^{93, 174}.

Parrado et al.¹⁷⁴ konnten in Jurkat-Zellen (T-Lymphozyten) zeigen, dass PLZF-Expression unter Zellstress durch Serumentzug, anti-apoptotische Wirkung aufweist und dass diese Wirkung durch Herabregulation des proapoptotischen Proteins BID erfolgt.

Im kardialen Kontext (H9C2-Zellen) führt Ang-Stimulation zu einer AT2R-vermittelten PLZF-Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern und zur Aktivierung der Expression der PI3-Kinase p85 α -Untereinheit sowie zur Stimulation der Proteinsynthese⁹³. Weiterhin wurde PLZF als Interaktionspartner des (P)RR identifiziert und eine Aktivierung des (P)RR durch Renin in H9C2-Zellen vermindert die Apoptose und erhöht die Zellzahl. Durch Behandlung mit einem PI3K-Inhibitor konnten diese Effekte teilweise und durch Hemmung von PLZF mittels siRNA vollständig aufgehoben werden¹⁷⁵.

Bei PLZF handelt es sich ferner um ein Phosphoprotein, das an Serin- und Threoninresten phosphoryliert werden kann. *In vitro* wurde dies durch *cdc2*¹⁵⁴, die ursprüngliche Bezeichnung für CDK1 in Wirbeltieren und Sprosshefe, und CDK2¹⁷⁶ gezeigt.

Neben der Phosphorylierung kann PLZF an den Lysinresten K242, K387 und K396 durch SUMO-1 und Ubiquitin posttranslational modifiziert werden. Eine weitere posttranslationale Modifikation ist die von Guidez et al.¹⁷⁷ beschriebene Azetylierung von Lysin-Resten C-terminaler C₂H₂-Zinkfinger-Motive.

Die erwähnten posttranslationalen Modifikationen regulieren die transkriptionelle Repressor-Aktivität und Stabilität des PLZF-Proteins.

Die CDK2-vermittelte Phosphorylierung von PLZF resultiert in einer Ubiquitinierung mit anschließender Degradation von PLZF, während eine Phosphorylierung durch *cdc2*¹⁵⁴ und eine Azetylierung¹⁷⁷ die Bindungsaffinität von PLZF an die DNA verstärkt.

Durch Arbeiten von Kang et al.¹⁷⁸ konnte gezeigt werden, dass eine posttranslationale Modifikation von PLZF am Lysinrest 242 (K242) durch SUMO-1 ebenfalls die DNA-Bindung positiv beeinflusst und die Expression von Zyklin A2, BID und c-myc reprimiert¹⁷⁹. In einer neueren Arbeit konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass K242 sowohl durch SUMO-1, als auch Ubiquitin modifiziert werden kann. Sumoylierung schützt vor Ubiquitinierung und damit verbundener Proteasom-abhängiger Degradation. Abschließend lässt sich feststellen, dass PLZF in Abhängigkeit des Zellkultur-Modelles und der damit verbundenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen als transkriptioneller Repressor¹⁶⁶ oder Aktivator⁹³ wirken kann.

Kapitel 2 Zielsetzung

Aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe geht hervor, dass im MCAO-Modell der Ratte eine Behandlung mit ARBs und ACE-Hemmern die neurologischen Defizite nach einem Schlaganfall vermindert werden^{128, 131} und diese Effekte AT2R-vermittelt scheinen.

Der Transkriptionsfaktor PLZF wurde im kardialen Kontext als direkter Interaktionspartner des AT2R⁹³ beschrieben und es konnte eine AT2R-vermittelte Translokation von PLZF aus dem Zytoplasma in den Zellkern beobachtet werden. Weiterhin konnte mittels eines *yeast two-hybrid screening* PLZF als Interaktionspartner des (P)RR identifiziert und diese Protein-Protein-Interaktion mittels Koimmunopräzipitation verifiziert werden¹⁷⁵.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, den Transkriptionsfaktor PLZF als Interaktionspartner des AT2R und (P)RR im *in vivo*-Modell der fokalen zerebralen Ischämie in Bezug auf seine potentielle neuroprotektive Rolle genauer zu charakterisieren. Weiterhin sollte in einem *in vitro*-Modell der Einfluss einer PLZF-Überexpression auf bekannte PLZF-Zielgene, das Proliferationsverhalten und die Glutamat-induzierte Toxizität untersucht werden.

Kapitel 3 Material und Methoden

3.1. Geräte

3.1.1. Allgemeine Geräte

| Geräte | Firma |
|------------------------------|--|
| Analysenwaage BL 310 | Sartorius, Göttingen, Deutschland (D) |
| Analysenwaage BL 150S | Sartorius, Göttingen, D |
| Magnetrührer RET basic C | IKA-Werke, Staufen, D |
| pH-Meter pH 211 | Hanna Instruments, Woonsocket, USA |
| pH-meter pH 340 | WTW, Weilheim, D |
| Pipettierhilfe pippetus-akku | Hirschmann, Eberstadt, D |
| Präzisionswaage SC2 | Sartorius, Göttingen, D |
| Schüttelgerät Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Bohema, USA |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg, D |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg, D |
| Zentrifuge Micro 20 | Hettich, Tuttlingen, D |
| Wasserbad WB14 | Memmert, Schwabach, D |
| Zentrifuge 5415R | Eppendorf, Hamburg, D |

3.1.2. Geräte für die *in vivo*-Versuche

| Geräte | Firma |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| <i>monitoring-System</i> 1025 | SA Instruments, Stony Brook, USA |

| | |
|--|---|
| PharmaScan 70/16 MRT-Gerät | Bruker Biospin, Ettlingen, D (Standort: NWFZ Berlin) |
| Analyze 5.0 Visualisations- und Analysen-Software | AnalyzeDirect, Overland Park, USA |
| PeriFlux System 5000 zur Laser-Doppler- basierten Durchflussmessung | Perimed, Järfälla, Schweden (SE) |
| Isofluran-Verdampfer | Völker, Kaltenkirchen, D |
| Radiometer ABL 555 zur Blutgasanalyse | Radiometer medical, Kopenhagen, Dänemark (DK) |

3.1.3. Geräte für die Kultivierung von Zellen

| Geräte | Firma |
|------------------------------|----------------------------|
| CO2-Inkubator HERACell 150 | Kendro, Langenselbold, D |
| Mikroskop DM IL | Leica, Wetzlar, D |
| Pipettierhilfe pippetus-akku | Hirschmann, Eberstadt, D |
| Sicherheitswerkbank Safe2010 | Heto-Holten, Allerød, DK |
| Vakuumsaugpumpe | KNF Neuberger, Freiburg, D |
| Wasserbad WB14 | Memmert, Schwabach, D |
| Zentrifuge 32R | Hettich, Tuttlingen, D |

3.1.4. Geräte für die zellbiologischen und molekularbiologische Methoden

| Geräte | Firma |
|---------------------------------|--|
| Elektrophoresekammer 250 EX | Whatman, Brentford, United Kingdom (UK) |
| Elektrophorese-System Midi/Maxi | Harnischmacher, Kassel, D |

| | |
|--------------------------------------|--|
| Gel-Dokumentations-System ChemiDoc | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Inkubationsschüttler Unitron | Infors HAT, Bottmingen, CH |
| Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer | PeqLab, Erlangen, D |
| <i>real-time</i> PCR-System Mx3000P | Stratagene, La Jolla, USA |
| PCR-Cycler iCycler | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg, D |
| Wallac1420 Multilabel Counter Victor | PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim, D |
| Zentrifuge 5415R | Eppendorf, Hamburg, D |

3.1.5. Geräte für die proteinbiochemischen Methoden

| Geräte | Firma |
|---|---------------------------------------|
| Fluoreszenzmikroskop DM IRE2 mit Software Openlab 3.1.7. | Leica, Wetzlar, D |
| Film-Entwicklungsautomat Curix 60 | Improvision, Coventry, UK |
| Horizontalschüttler HS 260 | Agfa, Köln, D |
| Mini-Protean 3 System für <i>Western blot</i> | IKA-Werke, Staufen, D |
| Naßblott-Kammer | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Netzteil Power Pack 200 | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Rollenmischgerät RM5 | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Rotator Stuart SB3 | Karl Hecht, Sondheim, D |
| Schüttelgerät Vortex-Genie 2 | Barloworld Scientific, Stone, UK |
| Spektrophotometer SmartSpec 3000 | Scientific Industries, Bohema, USA |
| Zentrifuge 5415R | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Ultraschall-Homogenisator Bandelin | Eppendorf, Hamburg, D |
| Sonoplus HD2070 | Bandelin, Berlin, D |

3.2. Materialien

3.2.1. Materialien für die *in vivo*-Versuche

| Materialien | Firma |
|--|-------------------------|
| Nahtmaterial Ethilon, nicht resorbierbar, monofil, 4-0 | Ethicon, Norderstedt, D |
| Nahtmaterial Prolene, nicht resorbierbar, monofil, 4-0 | Ethicon, Norderstedt, D |

3.2.2. Materialien für die zellbiologischen Methoden

| Materialien | Firma |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Lab-Tek ChamberSlides | Nunc, Wiesbaden, D |
| Filtereinheit FP30/0.2 CA-S | Whatman, Dassel, D |
| Spritzen Omnifix (versch. Größen) | Braun Melsungen, Melsungen, D |
| Kanülen Sterican (versch. Größen) | Braun Melsungen, Melsungen, D |
| <i>Cryotube</i> Kryoröhrchen | Nunc, Roskilde, DK |

3.2.3. Materialien für die molekularbiologischen Methoden

| Materialien | Firma |
|------------------------------|-------------------------------|
| 96-well Multiply PCR-Platten | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Klebefolie, optisch klar | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| PCR-Tubes und Caps | Biozym, Hessisch Oldendorf, D |
| Lab-Tek ChamberSlides | Nunc, Wiesbaden, D |

3.2.4. Materialien für die proteinbiochemische Methoden

| Materialien | Firma |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Hyperfilm ECL Chemilumineszenz-Film | GE Healthcare, München, D |
| Whatman Filterpapier | Whatman, Brentford, UK |
| Hybond-P <i>Blotting</i> -Membran | GE Healthcare, München, D |

3.3. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden „reinst“ oder in analytischer Qualität bezogen.

Der Begriff ddH₂O steht grundsätzlich für Aqua bidest. und wurde mittels einer Reinstwasseranlage der Firma MILLIPORE (Milli Q) aufbereitet und Ultra-Pure Wasser (steriles Aqua bidest.) wurde von der Firma Biochrom bezogen (Biochrom AG, Berlin, D).

| Chemikalien | Firma |
|-------------------------------|-----------------------|
| Acrylamid | Serva, Heidelberg, D |
| Agarose | Eurogentec, Köln, D |
| Albumin Fraktion V rein (BSA) | Sigma, Taufkirchen, D |
| Albuminstandard | Pierce, Bonn, D |
| Ammoniumpersulfat | Sigma, Taufkirchen, D |
| Ampicillin | Roth, Karlsruhe, D |
| Angiotensin II human | Sigma, Taufkirchen, D |
| BCA Protein Assay Reagenz A | Pierce, Bonn, D |
| BCA Protein Assay Reagenz B | Pierce, Bonn, D |
| Bromphenolblau | abgefüllt |
| Calciumchlorid (wasserfrei) | Merck, Darmstadt, D |
| Complete mini | Roche, Mannheim, D |
| Dimethylsulfoxid | Sigma, Taufkirchen, D |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma, Taufkirchen, D |

| | |
|---|--------------------------|
| ECL <i>Western Blotting Detection</i> Reagenz | Amersham, Freiburg, D |
| Ethanol 96 % und 100 % | Merck, Darmstadt, D |
| Ethidiumbromide | Roth, Karlsruhe, D |
| Ethylendiamintetraessigsäuredinatrium-Dihydrat (EDTA) | Sigma, Taufkirchen, D |
| Ethylenglykol-bis-(2-aminomethyl)-Tetraessigsäure (EGTA) | Sigma, Taufkirchen, D |
| Fetales Kälberserum | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Gene Juice Transfektions-Reagenz | Novagen, Darmstadt, D |
| L-Glutaminsäure (Natriumsalz) | Sigma, Taufkirchen, D |
| L-Glutamin | PAA, Marburg, D |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe, D |
| Glycin | Roth, Karlsruhe, D |
| Guanidinehydrochlorid | Sigma, Taufkirchen, D |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazin)ethansulfons (HEPES) | Merck, Darmstadt, D |
| HiPerFect Transfektions-Reagenz | Qiagen, Hilden, D |
| Isopropyl- β ,D-thiogalactoside (IPTG) | Roth, Karlsruhe, D |
| Isotone NaCl-Lsg. | Braun, Melsungen, D |
| Kaliumchlorid | Roth, Karlsruhe, D |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt, D |
| Kaliumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt, D |
| Kaliumhydroxid | Merck, Darmstadt, D |
| Kanamycin | Sigma, Taufkirchen, D |
| LB Medium (SOB) | Roth, Karlsruhe, D |
| LB Medium Lennox | Roth, Karlsruhe, D |
| Magnesiumchlorid-6-hydrat | Sigma, Taufkirchen, D |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma, Taufkirchen, D |
| Milchpulver | Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumazetat-Trihydrat | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumborhydrid | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt, D |

| | |
|---|--------------------------|
| Natriumcarbonat | Sigma, Taufkirchen, D |
| Natriumdeoxycycholesäure | Serva, Heidelberg, D |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumdodecylsulfat | Serva, Heidelberg, D |
| Natriumfluorid | Sigma, Taufkirchen, D |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumhydroxid | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumorthovanadat | Sigma, Taufkirchen, D |
| Natriumpyrophosphat | Sigma, Taufkirchen, D |
| Nonidet P 40 | Fluka, Taufkirchen, D |
| Orange G | Merck, Darmstadt, D |
| Paraformaldehyd | Sigma, Taufkirchen, D |
| Penicillin / Streptomycin | PAA, Marburg, D |
| Phosphat gepufferte Salz-Tabletten | Sigma, Taufkirchen, D |
| Poly-L-Lysin | Biochrom, Berlin, D |
| Ponceau S Lsg. | Fluka, Taufkirchen, D |
| <i>Restore Western Blot Stripping</i> Lsg. | Pierce, Bonn, D |
| Roti-Blue (Coomassie-Färbelsg., gebrauchsfertig) | Roth, Karlsruhe, D |
| N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin (TEMED) | Sigma, Taufkirchen, D |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl) | Roth, Karlsruhe, D |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma base) | Sigma, Taufkirchen, D |
| Triton X-100 | Sigma, Taufkirchen, D |
| Trizol Reagenz | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Trypanblau Lsg. 0,4 % | Sigma, Taufkirchen, D |
| Trypsin/ EDTA | Gibco, Karlsruhe, D |
| Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurat) | Sigma, Taufkirchen, D |
| X-Gal | Roth, Karlsruhe, D |
| Xylol | Merck, Darmstadt, D |

3.4. Kits und Marker

| Materialien | Firma |
|---|--------------------------------|
| Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| BCA Protein Assay Reagent Kit | Perbio Science, Piece, Bonn, D |
| Caspase-Glo 3/7 Assay | Promega, Mannheim, D |
| CellTiter-Glo Luminescent | Promega, Mannheim, D |
| Cell Viability Assay | Promega, Mannheim, D |
| Dual-Luziferase Reporter Assay | Promega, Mannheim, D |
| ECL <i>Western Blotting Detection</i> Reagenz | GE Healthcare, München, D |
| NucleoSpin Plasmid Quick Pure | Macherey-Nagel, Düren, D |
| NucleoSpin RNA II | Macherey-Nagel, Düren, D |
| Gene Ruler 100 bp DNA ladder | MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Gene Ruler 1 kb DNA ladder | MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| PageRuler Prestained Protein ladder | MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D |

3.5. Primer und Vektoren

3.5.1. Primer

Alle PCR-Primer (Tabelle 2 und Tabelle 3) wurden mit dem Programm Primer3 unter <https://biotools.umassmed.edu> entworfen, basierend auf Sequenzdaten des entsprechenden Gens unter www.ensembl.org oder www.pubmed.gov. Dabei wurden die Primersequenzen so gewählt, dass diese eine Exon-Exon-Grenze des Zielgens überspannen und dadurch sichergestellt wurde, dass nur in cDNA umgeschriebene mRNA ein Amplifikat der erwarteten Größe generiert. Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, D. bezogen.

Tabelle 2: Verzeichnis der verwendeten Primer zur Analyse humaner Transkripte.

| Gen/Laborcode | Sequenz | TM / Zyklen | Größe (bp) |
|---------------|-------------------------------------|----------------|---------------|
| 18S rRNA f | 5'-CCGCAGCTAGGAATAATGGAATA-3' | 60 | 108 |
| 18S rRNA r | 5'-TCTAGCGGCGCAATACGAAT-3' | 40 | |
| β-Aktin f | 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3' | 55 | 194 |
| β-Aktin r | 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' | 40 | |
| PLZF f | 5'-TAGGGTGCACACAGGTGAGA-3' | 60 | 129 |
| PLZF r | 5'-GTGCAGATGGTGCCTGGTA-3' | 40 | |
| AT2R f | 5'-AACATTACCAGCGGTCTTCAC-3' | 60 | 107 |
| AT2R r | 5'-ACCATCAGATAAGCATTAGATGCAATTCC-3' | 40 | |
| AT1R f | 5'-CATATTTGTCATGATTCCTACTT-3' | 55 | 465 |
| AT1R r | 5'-GCACAAACTGTAATATTGGTGT-3' | 40 | |
| (P)RR f | 5'-AAACAAGCGAAGAACCAGC-3' | 60 | 123 |
| (P)RR r | 5'-GGTGATAATCACAGCCAAGGC-3' | 40 | |
| PI3K p85 f | 5'-CGGATCTTGCAGAGCAGTTT-3' | 60 | 127 |
| PI3K p85 r | 5'-AGGTTGCTGGAGCTCTGTGT-3' | 40 | |
| BID f | 5'-CAGCAAAGTGGTTCCTC -3' | 60 | 222 |
| BID r | 5'-CCTCATGTTGTGGTCACA -3' | 40 | |
| Zyklin A2 f | 5'-TTATTGCTGGAGCTGCCT -3' | 60 | 224 |
| Zyklin A2 r | 5'-CTCTGGTGGGTTGAGGA -3' | 40 | |

f forward; r reverse; TM eingesetzte Annealingtemperatur

Tabelle 3: Verzeichnis der verwendeten Primer zur Analyse muriner (Rattus norvegicus) Transkripte.

| Gen/Laborcode | Sequenz | TM / Zyklen | Größe (bp) |
|---------------|-------------------------------|----------------|---------------|
| 18S rRNA f | 5'-CCGCAGCTAGGAATAATGGAATA-3' | 60 | 108 |
| 18S rRNA r | 5'-TCTAGCGGCGCAATACGAAT-3' | 40 | |
| β-Aktin f | 5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3' | 59,5 | 393 |
| β-Aktin r | 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3' | 40 | |

| | | | |
|-----------------|---------------------------------|----|-----|
| PLZF f | 5'-CTAGCGTCTCAGGAGGGATG-3' | 55 | 120 |
| PLZF r | 5'-GCTGCTCACCCTCTCCTCT-3' | 40 | |
| AT2R f | 5'-TCTGCTGGGATTGCCTTAAT-3' | 62 | 401 |
| AT2R r | 5'-TGGAGCCAAGTAATGGGAAC-3' | 40 | |
| AT2R f | 5'-AATCCCTGGCAAGCATCTTATGT-3' | 60 | 80 |
| AT2R r | 5'-CGGAAATAAAATGTTGGCAATG-3' | 40 | |
| AT1aR f | 5'-ACCAGGTCAAGTGGATTTTCG-3' | 55 | 405 |
| AT1aR r | 5'-TCAACCTCTACGCCAGTGTG-3' | 40 | |
| AT1bR f | 5'-GGTTCCCCACCAAATATTCA-3' | 55 | 398 |
| AT1bR r | 5'-TTTGGGCTAAGCAGCTCACT-3' | 40 | |
| (P)RR f | 5'-CTTGCTGTGGGCAACCTATT-3' | 60 | 122 |
| (P)RR r | 5'-GGAAGTGCATTCTCCAAAGG-3' | 40 | |
| PI3K p85 f | 5'-ATGGTTGGGAACGAAAACA-3' | 60 | 128 |
| PI3K p85 r | 5'-GCAATAGGTTCTCGGCTTTG-3' | 40 | |
| Interleukin-6 f | 5'-ATATGTTCTCAGGGAGATCTTGGAA-3' | 60 | 81 |
| Interleukin-6 r | 5'-AGTGCATCATCGCTGTTTCATACA-3' | 40 | |
| BID f | 5'-CGACGAGGTGAAGACATCCT-3' | 60 | 121 |
| BID r | 5'-AGACGTCACGGAGCAGAGAT-3' | 40 | |
| Zyklin D1 f | 5'-TGCAAATGGAAGTCTTCTG-3' | 60 | 125 |
| Zyklin D1 r | 5'-GCGGATGATCTGCTTGTCT-3' | 40 | |
| Zyklin A2 f | 5'-GTAAACAGCCTGCCTTCACC-3' | 60 | 115 |
| Zyklin A2 r | 5'-GAGACAGCGGCACTAAAAGC-3' | 40 | |

f forward; r reverse; TM eingesezte Annealingtemperatur

3.5.2. Vektoren

Das genutzte Expressionsplasmid pCEP4 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D) für die stabile Transfektion von KELLY-Zellen, welches für ein PLZF-HA-Fusionsprotein kodiert wurde freundlicherweise von Dr. Jennifer Schmitz überlassen; die Plasmide pGL3basic (Promega, Mannheim, D), (P)RR Promotor/pGL3basic und mut(P)RR Promotor/pGL3basic und der Renilla-Luziferase-Vektor (phRLnull) für die Luziferase

Reporter-Assays stammen von Sebastian Kirsch. Zur Identifikation wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt bzw. das Insert sequenziert.

3.6. Enzyme und PCR-Reagenzien

Die für die Experimente verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D) bezogen: *EcoRI* (10 U/ μ L)

| Reagenz | Firma |
|---|--|
| M-MLV RT RNase H Minus (200 U/ μ L) Superscript-II-Reverse Transcriptase | Promega GmbH, Mannheim, D Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D |
| RNasin (40 U/ μ L) | Promega GmbH, Mannheim, D |
| Taq-Polymerase (5 U/ μ L) | PAN, Aidenbach, D |
| dNTP-Mix | PAN, Aidenbach, D |

3.7. Medien, allgemeine Puffer und Lösungen

Die für die Zellkultur verwendeten Medien, das Ultra-Pure Water und 1x PBS wurden von Gibco (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D) bezogen.

3.8. Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Primäre Antikörper.

| Antikörper | Firma | Verdünnung |
|---|--|-----------------------|
| Mouse anti-PLZF (D-9) | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D | 1: 500 (IB) |
| Rabbit anti-PLZF (H-300) | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D | 1:500 (IB) |
| Rabbit anti-AT2R (H-143) | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D | 1:1000 (IB) |
| Rabbit anti-AT1R (C-18) | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D | 1:1000 (IB) |
| Rabbit anti-PI3K p85 | Cell Signalling, Frankfurt a. M., D | 1:1000 (IB) |
| Goat anti-ATP6IP2 (ab5959) | Abcam, Cambridge, UK | 1:500 (IB) |
| Mouse anti- Glyzerinaldehyd-3- Phosphatdehydrogenase | Calbiochem, Schwalbach, D | 1:100.000 (IB) |
| Rabbit anti -TFIID (TBP) (SI-1) | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D | 1:200 (IB) |
| Mouse anti-Calpain small subunit (28F3) | Calbiochem, Schwalbach, D | 1:2000 (IB) |

Tabelle 5: Verwendete Sekundäre Antikörper.

| Antikörper | Firma | Verdünnung |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Swine anti-rabbit-IgG HRP | Dako Diagnostica GmbH, Hamburg, D | 1:2000 (IB) |
| Goat anti-mouse-IgG HRP | Dako Diagnostica GmbH, Hamburg, D | 1:2000 (IB) |
| Rabbit anti-goat-IgG HRP | Dako Diagnostica GmbH, Hamburg, D | 1:1000 (IB) |

3.9. Zelllinien und Tierstämme

3.9.1. Zelllinien

Alle Zelllinien wurden von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig erworben.

3.9.2. Tierstämme

Rattus norvegicus

Harlan Winkelmann, Borchon,
D

3.10. Methoden

3.10.1. Methoden der *in vivo*-Versuche

Alle *in vivo*-Experimente wurden an ausgewachsenen männlichen Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 250 - 350 g durchgeführt.

Die Tiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité-Universitätsmedizin Berlin gehalten. Eine Klimaanlage sowie ein 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus sorgten für standardisierte Umweltbedingungen. In den Käfigen hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter.

Alle Tierexperimente und die Haltung wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Tierschutzes für Labortiere unter Aufsicht eines am Ort befindlichen Tierarztes durchgeführt. Die Tierversuche wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt.

3.10.1.1. Induktion des Schlaganfalls mittels *middle cerebral artery occlusion* (MCAO)

Die operativen Tätigkeiten wurden von Kristin Lucht und Christina Wengenmayer ausgeführt. Nach Narkotisieren der Tiere mit Isofluran und dem Lagern auf Heizmatten wurde die rechte *Arteria carotis communis* inklusive der beiden Hauptäste freigelegt. Nach Ligation der *Arteria carotis externa* erfolgt eine stumpfe Präparation der *Arteria carotis interna* bis zur *Bifurcatio carotidis* sowie eine Eröffnung der *Arteria carotis communis* mittels einer Mikroschere. In die eröffnete *Arteria carotis communis* wurde ein silikonbeschichteter monofiler Faden der Größe 4,0 ca. 1,8 mm nach kranial in die *Arteria carotis interna* geschoben und dort mittels einer lockeren Ligatur kurz oberhalb der *Bifurcatio carotidis* fixiert. Durch diesen in die *Arteria carotis interna* gelegten Faden ist ein Verschluss der *Arteria cerebri media* gewährleistet. Die Blutversorgung im Bereich der Versorgungsgebiete der *Arteria carotis externa* bleibt trotz der bestehenden Ligation durch Kollateralen gewährleistet, so dass der Verschluss über den gesamten Zeitraum der MCAO bestehen bleiben kann.

Nach 90 Minuten wurden der Faden in der *Arteria carotis interna* sowie die Ligaturen an der *Arteria carotis communis* und *Arteria carotis externa* wieder entfernt, so dass die Reperfusion der betreffenden Areale erfolgen konnte.

Bei den *sham*-(schein-)operierten Tieren erfolgte lediglich eine Präparation der Gefäße, wobei auf das Platzieren des Fadens in der *Arteria carotis interna* verzichtet wurde.

Bei den *sham-sham*-operierten Tieren erfolgte lediglich die Isofluran-Narkose und Freilegung der rechten *Arteria carotis communis* inklusive der beiden Hauptäste ohne Präparation der Gefäße und ohne das Platzieren des Fadens in der *Arteria carotis interna*.

Zur postoperativen Schmerzprophylaxe applizierte man den Tieren nach dem Eingriff Buprenorphin (0,2 mg/kg KG *s.c.*).

3.10.1.2. Kontrolle der *middle cerebral artery occlusion* (MCAO)

Zur Darstellung des intrazerebralen Schadens nach einer MCAO wurde mit Hilfe von Susanne Müller aus der Arbeitsgruppe Prof. Villringer, ein sich am Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum am Campus Charité Mitte befindlicher 7-Tesla-(7-T-)Kleintier-Magnetresonanztomograph verwendet.

Unter Verwendung einer T2-gewichteten, 2D Turbo-Spin-Echo Sequenz mit Fettunterdrückung wurden 35 axiale Schnitte mit einer jeweiligen Schnittdicke von 0,5 mm aufgenommen. Das Volumen der hyperintens erscheinenden, ödematösen Regionen wurde mittels der in der Auswerteeinheit integrierten Software (Analyze 5.0) kalkuliert.

3.10.1.3. Präparation des Gehirns für die molekularbiologischen, proteinbiochemischen und histologischen Untersuchungen

Im Anschluss an die MRT-Untersuchungen wurden die Tiere unter Isofluran-Narkose dekapitiert und die Gehirne freipräpariert. Mit Hilfe einer standardisierten Matrix (*rat brain slicer matrix*) der Firma Zivic Instruments (Pittsburgh, PA, USA) wurden aus dem Gehirn (Abbildung 11) drei Scheiben präpariert. Die 1. Scheibe wurde für die Histologie in Cryomol-Schalen mit Tissue-Tek-Einfriermedium auf Trockeneis eingefroren, die 2. und 3. Scheibe wurden für die molekularbiologischen und proteinbiochemischen

Untersuchungen jeweils ohne Einfriermedium in Cryomol-Schalen auf Trockeneis eingefroren.

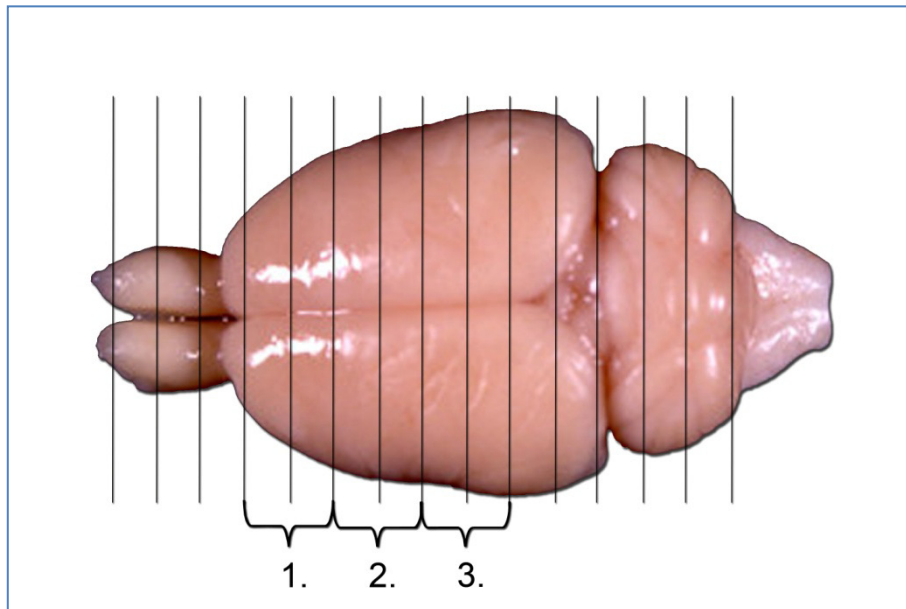


Abbildung 11: Darstellung der Präparation des Gehirnes in Scheiben mit Hilfe der standardisierten Matrix.

3.10.2. Zellbiologische Methoden

3.10.2.1. Kultivierung von Zellen

Alle Arbeiten mit Zellen erfolgten unter keimarmen Bedingungen in einer entsprechend ausgestatteten Sicherheitswerkbank.

Die Neuroblastoma-Zellen (KELLY-Zellen) sind adhären wachsende Zellen. Das für die Kultivierung verwendete Medium bestand aus RPMI 1640-Standardmedium, supplementiert mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Kultivierung erfolgte in Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt.

Bei einer Konfluenz von 90 % wurden die Zellen passagiert.

Die für die Expressionsanalyse (siehe 4.1.) verwendeten Neuroblastoma-Zellen (SK-N-SH, SK-N-AS und SH-Sy5y) und Glioblastoma-Zelllinien (U87-MG und U373-MG) sind adhären wachsende Zellen und wurden laut Angaben der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) kultiviert.

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Mycoplasmenkontaminationen untersucht.

Die primären neuronalen Zellen wurden aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. U. Dirnagl überlassen und nach deren Angaben kultiviert und die primären Gliazellen wurden von C. Neumann kultiviert und die tief gefrorenen Zellpellets zur Verfügung gestellt.

3.10.2.2. Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Eine Lagerung von Zellen ist über mehrere Monate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ möglich. Für die langfristige Lagerung können die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden. Die Kryokonservierung erfolgte in 10 % DMSO-haltigem FBS.

3.10.2.3. Transfektion

Als Transfektion wird in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Bei der Transfektion unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion).

3.10.2.3.1. Transiente Transfektion

3.10.2.3.1.1. *Luziferase-Reporter Assay*

Zur transienten Transfektion der KELLY-Zellen wurde Gene Juice Transfektions-Reagenz benutzt. In Vorversuchen wurde dieses Verfahren als effizient und schonend für KELLY-Zellen bestätigt. Die Anwendung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Auswertung erfolgt durch Bildung des folgenden Quotienten:

$$\text{RLA} = \frac{[(\text{Firefly Luziferase}_{\text{Konstrukt}} / \text{Renilla Luziferase}_{\text{pRL-null}})]}{[(\text{Firefly Luziferase}_{\text{pGL3basic}} / \text{Renilla Luziferase}_{\text{pRL-null}})]}$$

3.10.2.3.2. Stabile Transfektion

Zur stabilen Transfektion der KELLY-Zellen wurde Gene Juice Transfektions-Reagenz benutzt. Die eigentliche Transfektion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Zur Selektion transfizierter Zellen wurden die Zellen im weiteren Verlauf in Kulturmedium mit 250 µg/ml Hygromycin B kultiviert.

Die verwendete Hygromycin-Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt.

3.10.2.4. Glutamat-Toxizitätstest

Für die Glutamat-Toxizitätsversuche wurden die Zellen in 96-*well*-Zellkulturplatten für Proliferations-, Apoptose- und Lebendzellzahlbestimmung und in 6-*well*-Zellkulturplatten für RNA- und Proteinisolation mit einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen/cm² am Tag der Aussaat für 48 Stunden kultiviert.

Die Stimulation mit verschiedenen Glutamat-Konzentrationen (1 - 100 mM Glutamat in serumfreien Medium gelöst und verdünnt, unmittelbar vor Glutamatstimulation) erfolgte nach 24-stündiger Vorinkubation der Zellen in serumfreiem Kulturmedium.

Die Proliferations-, Apoptose- und Lebendzellzahlbestimmung erfolgte nach 24 Stunden, die RNA- und Proteinisolation 24 und 48 Stunden nach Glutamat-Stimulation.

3.10.2.5. Bestimmung der Proliferation, Apoptose und Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Apoptose (Caspase-Glo 3/7 Assay) und Lebendzellzahlbestimmung (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay) wurden die lumineszenz-basierten Tests der Firma Promega nach Herstellerangaben verwendet.

Für die Bestimmung der Proliferation wurde das Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) der Firma Roche Diagnostics verwendet und laut Herstellerangaben durchgeführt.

Die Lumineszenz wurde mit Hilfe des Wallac 1420 Multilabel Counter Victor, der Firma PerkinElmer gemessen.

3.10.2.6. Zellernte

Für die RNA- und Proteinisolation wurden die Zellen mittels Trypsin geerntet, das Zellpellet einmal mit 1x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und am Ende bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.10.3. Molekularbiologische Methoden

3.10.3.1. Isolation von RNA aus Zellen

Die Isolation der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Nucleo-Spin RNA II Kits gemäß den Angaben des Herstellers.

3.10.3.2. Isolation von RNA aus Geweben

Gesamt-RNA aus Geweben wurde mit Hilfe von TRIZOL (eiphasige Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat) nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert.

Das Gewebe aus den Rattenhirnen, welche tiefgefroren und in flüssigem Stickstoff zermörsert wurden, wurden mit 1 ml TRIZOL in einem Eppendorfgefäß mit einem Pistill homogenisiert und nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet.

3.10.3.3. Konzentrationsbestimmung und Kontrolle der RNA-Qualität

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe des Nanodrop-Spektralphotometers.

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten RNA wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt, das Verhältnis der Extinktionen berechnet und nur Proben mit einem Zahlenwert zwischen 1,8 und 2,2 verwendet. Ein kleineres oder größeres Verhältnis weist auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Salzurückständen hin, die die reverse Transkription in cDNA und die *real-time* PCR stören.

3.10.3.4. DNase-Verdau und Reverse Transkriptase-PCR

Um eventuelle Kontamination mit genomischer DNA, welche zu falsch positiven Ergebnissen in der nachfolgenden PCR führen können, auszuschließen, wurde vor der cDNA-Synthese zunächst ein DNase-Verdau nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die DNase-Behandlung einer Probe wurden im Allgemeinen 1 µg Gesamt-RNA verwendet.

Eine entsprechende Negativkontrolle (im folgenden RT(-) genannt), in deren Ansatz die reverse Transkriptase durch ein gleiches Volumen an Wasser ersetzt wurde, ist bei allen RT-Reaktionen mitgeführt worden und wurde ebenfalls den nachfolgenden PCR-Untersuchungen unterzogen.

3.10.3.5. Qualitative PCR (semiquantitative PCR)

Für die qualitative PCR wurden in speziellen PCR-Gefäßen die angeführten Bestandteile vorsichtig gemischt und anschließend in einem PCR-Cycler dem unten aufgeführten Reaktionszyklus unterzogen. Im Anschluss daran erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt angesetzt und mit Ultra-Pure Wasser auf 25 µl aufgefüllt:

| | |
|---------------------------|----------|
| 10x Reaktionspuffer | 2,5 µl |
| MgCl ₂ (50 mM) | 1 µl |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 µl |
| Sense Primer (10 µM) | 0,5 µl |
| Antisense Primer (10 µM) | 0,5 µl |
| Taq-Polymerase (5 U/µl) | 0,125 µl |
| cDNA (40 ng) | 1 µl |

Die 3-Schritt-PCR wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

| | | |
|------|--------|------------------------|
| 1 x | 5 min | 95 °C Denaturierung |
| 40 x | 30 sek | 94 °C Denaturierung |
| | 30 sek | X °C Primer-Annealing |
| | 30 sek | 72 °C Primer-Extension |
| 1 x | 10 min | 72 °C finale Extension |

Die Annealingtemperatur für die einzelnen Primer sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt.

3.10.3.6. Agarose Gelelektrophorese

Für die Untersuchung der PCR-Ansätze wurde ein 1,5 % Agarose-Gel in 1x TAE-Puffer angesetzt und mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt.

Nach dem Erkalten des Gels wurden die Proben dem PCR-Cycler entnommen, pro Ansatz mit 10fach Orange G-Probenpuffer versetzt und mit einem Volumen von 10 -15 µl/Tasche in die entsprechenden Taschen pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Molekulargewichtsmarker mit aufgetragen. Anschließend erfolgte die Elektrophorese in 1x TAE-Puffer bei 80 - 100 V für 45 - 60 min. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

10x Orange G-Probenpuffer

| | |
|--|--------|
| Orange G | 100 mg |
| Glycerin | 15 ml |
| Auf 50 ml mit ddH ₂ O auffüllen | |

50x Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer

| | |
|------------|-----------|
| Tris-HCl | 242 g/l |
| Eisessig | 57,1 ml/l |
| 0,5 M EDTA | 100 ml/l |
| pH 8,0 | |

3.10.3.7. Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht.

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.

Im einfachsten Falle erfolgt die Detektion mit SYBR Green I, einem Fluoreszenzfarbstoff, der nach Einlagerung in doppelsträngige DNA fluoresziert. Die Quantifizierung basiert auf der Software-gestützten Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes. Der Zyklus, in dem eine zu untersuchende Probe diesen berechneten Fluoreszenzschwellenwert signifikant überschreitet, wird als Schwellenwertzyklus („*threshold cycle*“=CT) der jeweiligen Probe zugewiesen. Der Schwellenwert wird umso eher erreicht, je mehr Zielsequenzen sich in der zu untersuchenden Probe befinden.

Der Farbstoff SYBR Green I ermöglicht keine Unterscheidung zwischen Produkt und eventuell auftretenden Nebenprodukten, wie Primerdimeren und unspezifischen Amplifikationsprodukten. Bei der Nutzung dieser *real-time* PCR-Nachweismethode wird deshalb im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse und/oder Agarose-Kontrollgelelektrophorese durchgeführt.

Die beiden Einzelstränge der farbstoffassoziierten DNA werden bei ansteigender Temperatur in Abhängigkeit zum Schmelzwert T_m des Doppelstranges mehr oder weniger stark voneinander getrennt. Dadurch wird der Farbstoff wieder freigesetzt, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Die Abnahme erreicht ihr Maximum, wenn beide Stränge vollständig voneinander getrennt werden. Bei der Schmelzkurvenanalyse trägt man die erste Ableitung der Fluoreszenzabnahme (ΔR_n) über der Temperatur auf. Spezifische Amplifikate führen zu einem Maximum für das Hauptprodukt, wohingegen weitere Maxima für unspezifische Nebenprodukte sprechen.

Die Reaktion wurde in speziellen 96-*well real-time* Platten durchgeführt. Dabei wurde für jeden Reaktionsansatz der Mastermix vorgelegt und die cDNA nachfolgend zugegeben. Nachfolgende Tabelle stellt die Zusammensetzung des 2x SYBR Green I *real-time* PCR Mastermixes dar.

Tabelle 6: Zusammensetzung des 2x SYBR Green I *real-time* PCR Mastermix.

| „Stammkomponenten“ | Zusammensetzung der „Stammkomponenten“ | Eingesetztes Volumen [µl] |
|--------------------|--|---------------------------|
| H ₂ O | | 10,225 |
| 10x PCR-Puffer | 100 mM Tris HCl 15 mM MgCl ₂ 500 mM KCl (pH 8,3) | 2,5 |
| MgCl ₂ | 50 mM | 2,5 |
| dNTPs | 10 mM pro Nukleotid | 0,5 |
| SYBR Green | 20 % DMSO in H ₂ O mit 10x SYBR (1:1000 Verdünnung der Lösung) | 2,5 |
| NP40/Tween 20 | 0,5 % NP40 (v/v) 0,5 % Tween 20 (v/v) | 0,25 |
| ROX | 200 µg/ml | 0,25 |

Der 2x SYBR Green I *real-time* PCR-Mastermix wurde in 10-ml Falconröhrchen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt angesetzt und mit Ultra-Pure Wasser auf 20 µl aufgefüllt:

2x SYBR Green I *real-time*

| | |
|--------------------------|----------|
| PCR Mastermix | 15 µl |
| Sense Primer (10 µM) | 0,6 µl |
| Antisense Primer (10 µM) | 0,6 µl |
| Taq-Polymerase (5 U/µl) | 0,075 µl |
| cDNA (4 ng/µl) | 10 µl |

Die 3-Schritt-PCR wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

| | | |
|------|--------|------------------------|
| 1 x | 5 min | 95 °C Denaturierung |
| 40 x | 15 sek | 95 °C Denaturierung |
| | 25 sek | 60 °C Primer-Annealing |
| | 30 sek | 72 °C Primer-Extension |
| 1 x | 15 sek | 95 °C |
| | 30 sek | 60 °C |
| | 30 sek | 95 °C |

Für gering exprimierte Gene wurde der Power SYBR Green I PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Die geläufigsten Methoden zur Analyse von *real-time* PCR-Daten sind die absolute und die relative Quantifizierung. Die absolute Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich des der Probe zugewiesenen Schwellenwertzyklus (CT) mit den ermittelten Schwellenwertzyklen der im gleichen Lauf parallel amplifizierten DNA-Standards (des gleichen Gens) bekannter Kopienzahl und mittels einer daraus abgeleiteten Korrelationsgeraden.

Bei der relativen Quantifizierung wird das PCR-Signal mit einer Referenz, wie z.B. einer unbehandelte Kontrolle oder unstimulierte Probe, verglichen.

Bisher gebräuchlich und in dieser Arbeit verwendet wurde die Benutzung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, um die relativen Veränderungen der Genexpression aus *real-time* PCR-Daten zu bestimmen.

3.10.3.8. Klonierung

Eine Klonierung ist die Einführung eines DNA-Fragmentes in einen Vektor, der die massenhafte Vermehrung dieser DNA ermöglicht.

Es gibt verschiedene Klonierungsvektoren, in die man DNA ligieren kann. Das einfachste System stellt das pGEM-T Easy System dar.

Bei der Transkription einer jeden eukaryontischen mRNA wird am 3'-Ende durch eine Vielzahl von RNA-Polymerasen II (Ausnahme z.B. ist die Pfu-Polymerase) ein Adeninnukleotid templateunabhängig angefügt. Daher kann man ein solches PCR Produkt zur Ligation recht einfach in einen Vektor einfügen, der einen komplementären T-Überhang besitzt. Der hier benutzte pGEM-T Easy-Vektor hat einen solchen Überhang.

3.10.3.8.1. Ligation

Die Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor erfolgte unter Verwendung von T4-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 16 °C über Nacht.

3.10.3.8.2. Herstellung kompetenter *E. coli*

Für die Transformation und Klonierung werden kompetente Bakterien des Stammes *E. coli* (XL1-blue) benötigt. Eine frische *E. coli*- (XL1-blue) Kolonie wurde in 10 ml LB-Medium ohne Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von der Übernachtskultur wurden 1 ml in 100 ml LB-Medium ohne Antibiotika in einen 500 ml-Kolben überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 - 0,6 bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 10 min bei 2500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet in 7,5 ml TSB-Medium resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 100 µl-Einheiten aliquotieren, in flüssigem Stickstoff tiefgefrieren und bei -80 °C lagern.

TSB-Medium

5 % DMSO v/v
10 mM MgSO₄
10 mM MgCl₂
10 % PEG 6000
in LB-Medium

3.10.3.8.3. Transformation

Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und das SOC-Medium bei 37 °C warmgestellt. 1 - 5 µl Ligationsansatz wurden mit Ultra-Pure Wasser auf 80 µl aufgefüllt und 20 µl 5x KCM-Puffer zugegeben und mit der Pipette vermischt. Danach 100 µl kompetente Zellen/Ansatz dazugeben und nochmals vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 20 - 30 min auf Eis, dann zum Hitzeschock für 2 min bei 42 °C inkubiert und für weitere 2 min auf Eis gestellt.

Anschließend den Ansatz in 1 ml warmen SOC-Medium aufnehmen und für 60 min bei 200 U/min und 37 °C schütteln.

Innerhalb der 60 min auf die zum Ausplattieren benötigten LB-Amp-Agarplatten 20 µl 100 mM IPTG und 30 µl 100 mM X-Gal ausstreichen und zum Trocknen unter die Sterilbank stellen.

An Ende der 60-minütigen Inkubation der Zellen wurden 200 µl Zellsuspension auf einer LB-Amp-Agarplatte ausplattiert, die restlichen 1 ml für 3 min bei 2500 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 50 µl Medium resuspendiert und ebenfalls auf eine LB-Amp-Agarplatte ausplattiert. Beide Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde je eine weiße Kolonie in 5 mL LB-Amp-Medium geimpft und über Nacht bei 200 U/min und 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert.

Aus der Übernacht-Kultur wurde mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Quick Pure-Kits nach Angaben des Herstellers das Plasmid präpariert.

Der Erfolg der Subklonierung wurde mittels eines Kontroll-Restriktionsverdaues mit EcoRI-Restriktionsenzym laut Herstellerangaben kontrolliert.

SOC-Medium

| | |
|-------------------------------|--------|
| 1M Glukose (steril filtriert) | 0,2 ml |
| SOB-Medium | 9,8 ml |

SOB-Medium

| | |
|---|----------|
| SOB-Fertigmedium steril autoklaviert | 30,7 g/l |
|---|----------|

5x KCM

| | |
|-------------------|--------|
| KCl | 500 mM |
| CaCl ₂ | 150 mM |
| MgCl ₂ | 250 mM |

LB-Amp-Platten

| | |
|------------------|--------|
| LB-Agar | 35 g/l |
| 400 µM Ampicilin | 1 ‰ * |

LB-Amp-Medium

| | |
|------------------|--------|
| LB-Medium | 20 g/l |
| 400 µM Ampicilin | 1 ‰ * |

* direkt vor Gebrauch zugeben

100 mM Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG)

23,8 g/l in ddH₂O

100 mM X-Gal

40 g/l in DMSO

3.10.4. Proteinbiochemische Methoden

3.10.4.1. Isolation von Proteinen aus Zellen und Gewebe

Für die Gesamt-Proteinisolation aus Gewebe und Zellen wurde für die Zellyse ein modifizierter radio-immuno-precipitation assay (RIPA)-Puffer verwendet.

Das Gewebe (Rattenhirn, tiefgefroren und in flüssigem Stickstoff zermörsert) oder Zellpellet (3.2.1.) wurde in einer geeigneten Menge RIPA-Lyse-Puffer in einem Eppendorfgefäß mit einem Pistill homogenisiert, die Proben 60 min auf Eis inkubiert und alle 10 min gevortext. Anschließend wurden die Proben für 10 sek à 5 Zyklen bei 35 % Power sonifiziert und für 30 - 60 min bei 13.200 U/min und 4 °C zentrifugiert, um die Proteine von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen.

Der Überstand wurde in ein neues vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt und entweder sofort weiter bearbeitet oder bei -20 °C gelagert.

1x RIPA-Lyse-Puffer

| | |
|--------------------|--------|
| Tris-HCl pH 8,0 | 10 mM |
| NaCl | 140 mM |
| Triton X-100 | 1 % |
| Natriumdeoxycholat | 0,1 % |
| SDS | 0,1 % |
| EDTA pH 7,4 | 1 mM |
| EGTA pH 8,0 | 0,5 mM |

Direkt vor Gebrauch:

| | |
|--|------|
| NaF | 1 mM |
| Na ₃ VO ₄ | 1 mM |
| 1 Tbl Protease-Inhibitor-Mix für 10 ml 1x RIPA-Lyse-Puffer | |

3.10.4.2. Fraktionierte Proteinisolation aus Zellen und Gewebe

Die Methode der fraktionierten Proteinisolation wurde zur Auftrennung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen verwendet.

Für die Gewebeaufarbeitung wurde dieses zunächst in 1x PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ mit Protease-Inhibitoren im Ultraturrax auf Eis bis keine größeren Stücke mehr vorhanden waren homogenisiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 850 x g und 4 °C. Der nur extrazelluläre Proteine enthaltene Überstand wurde in ein neues vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Für die fraktionierte Proteinisolation aus Zellen wurden diese in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Anfang wurden die Zellen mit 25 ml kaltem 1x PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und in 10 ml kaltem 1x PBS abgekratzt. Danach wurden die Zellen für 10 min bei 800 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand vollständig entfernt.

Nach dem nachfolgend aufgeführten Protokoll wurden sowohl Gewebeproben als auch Zellen aufgearbeitet.

Die Probe wurden in 1,5 ml kaltem Puffer P1 resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 56 µl 10 % NP-40 zu jeder Probe zugegeben, 10 sek gevortext und für 10 min bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthält, wurde vorsichtig abgenommen und bis zur Proteinbestimmung bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde nochmals mit 1 ml Puffer P1 gewaschen und der Überstand vollständig verworfen. Danach wurden die Proben mit 250 µl Puffer P2 überschichtet und für 90 min im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss an die 90-minütige Inkubation wurden die Proben für 10 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vollständig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und dieses erneut für 30 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand, der die nukleären Proteine enthält, vorsichtig abgenommen, in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß pipettiert und bis zur Proteinbestimmung bei -20 °C gelagert.

Puffer P1 (hypotonischer Puffer)

| | |
|---|--------|
| HEPES-KOH | 10 mM |
| KCl | 10 mM |
| EGTA | 0,1 mM |
| DTT | 1 mM |
| pH 7,9 | |
| 1 Tbl Protease-Inhibitor-Mix auf 10 ml Puffer | |

Puffer P2 (hypertonischer Puffer)

| | |
|---|--------|
| HEPES-KOH | 20 mM |
| Glycerin | 10 % |
| NaCl | 400 mM |
| EGTA | 1 mM |
| DTT | 1 mM |
| pH 7,9 | |
| 1 Tbl Protease-Inhibitor-Mix auf 10 ml Puffer | |

3.10.4.3. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden zwei verschiedene Methoden benutzt, da die unterschiedlichen Detergenzien, die während der Aufarbeitung der Zellen verwendet wurden, störende Einflüsse auf die Methoden zeigten. Die mit der RIPA-Lyse-Puffer Methode (3.10.3.1) isolierten Proteine wurden mit Hilfe des BCA-Assays quantifiziert. Die Proteinfractionen aus der fraktionierten Proteinisolation (3.10.3.2) wurden mit Hilfe des Lowry-Assays vermessen.

3.10.4.3.1. BCA-Assay

Der Gesamtproteingehalt wurde mittels BCA Protein Assay Reagenz Kit nach den Angaben des Herstellers quantifiziert. Alle Proben wurden doppelt vermessen und der Mittelwert als Gesamtproteinkonzentration der Untersuchung zugrunde gelegt.

Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen in den Proben wurde eine Standardreihe herangezogen. Vom Proteinstandard BSA wurden 7 Verdünnungen im Bereich von 0,125 - 2,0 mg/ml hergestellt. Der Proteingehalt wurde nach Zugabe der entsprechenden Reagenzien im Photometer bei 570 nm gemessen.

3.10.4.3.2. Lowry-Assay

Der DC Protein Assay nach der Methode von Lowry wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Proben wurden doppelt bestimmt und der Mittelwert als Gesamtproteinkonzentration der Untersuchung zugrunde gelegt.

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit Hilfe einer BSA-Proteinstandardreihe bestimmt.

Vom Proteinstandard BSA wurden für jeden Extraktionspuffer (P1 und P2) sieben Verdünnungen im Bereich von 0,125 - 2,0 mg/ml hergestellt. Der Proteingehalt wurde nach Zugabe der entsprechenden Reagenzien im Photometer bei 750 nm gemessen.

3.10.4.4. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine Methode, die zur Auftrennung von Proteingemischen verwendet wird. Hierbei werden durch Denaturierung mit DTT oder β -Mercaptoethanol die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zerstört und durch Zusatz von SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass diese eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben auf eine Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit 1x RIPA-Puffer eingestellt, mit 6x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) gemischt, bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min aufgekocht, anschließend kurz anzentrifugiert und bis zum Gellauf auf Eis gelagert.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 15 - 30 μg Protein pro Bahn und Probe auf ein 10 % SDS-Polyacrylamid-Minigel aufgetragen. Die Trennung erfolgte entweder für 90 min bei 120 V oder für 60 min bei 150 V bis die blaue Lauffront das Gelende erreichte.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

| | Trenngel 10 % | Sammelgel 4 % |
|------------------------|----------------------|----------------------|
| 1,5 M Trenngel-Puffer | 5 ml | - |
| 0,5 M Sammelgel-Puffer | - | 2,5 ml |
| 30 % Acrylamid-Lösung | 6,6 ml | 1,3 ml |
| 10 % SDS | 200 μl | 100 μl |
| 10 % APS | 100 μl | 100 μl |
| TEMED | 10 μl | 12 μl |
| ddH ₂ O | 8 ml | 6,1 ml |

6x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer)

| | |
|----------------------|---|
| 1 M Tris-Base pH 6,8 | 7 ml |
| SDS | 1 g |
| Glycerin | 3 ml |
| Dithioreithol | 0,93 g |
| Bromphenolblau | 60 μl (2 % (w/v) in Ethanol) |

1,5 M Trenngel-Puffer pH 8,8

18,15 g Tris-Base auf 100 ml ddH₂O
pH auf 8,8 mit HCl einstellen

0,5 M Sammelgel-Puffer pH 6,8

6,05 g Tris-Base auf 100 ml ddH₂O
pH auf 6,8 mit HCl einstellen

10 % SDS

10 g auf 100 ml ddH₂O

10 % APS

10 g auf 100 ml ddH₂O

1x Elektrophoresepuffer

| | |
|-----------|---------|
| Tris-Base | 25,9 mM |
| Glycin | 192 mM |
| SDS | 0,1 % |

3.10.4.5. Blotting und Visualisieren der Banden

Beim *Western blot* wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran (Nitrocellulose, Nylon oder PVDF (Polyvinylidendifluorid)). An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten; die Proteine sind nun aber für weitere Methoden zugänglich.

Die Proteinbanden können nun auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden.

Die Proteine wurden im Tank-Blotverfahren (Nassblot) auf Polyvinylidendifluoridmembranen (PVDF-Membran) geblottet und die zu untersuchenden Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Die PVDF-Membran wurden vor dem Blotten 5 min in Methanol equilibriert und anschließend in Blotpuffer gegeben. Die Blotapparatur wurde nach Herstellerangaben

zusammengebaut. Nach dem Blotten bei 100 V für 1 h wurde die Membran kurz in 1x TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde in 1x TBS-T + 5 % Magermilch bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper zu blockieren. Nach kurzem Spülen mit 1x TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C im Schüttler. Der Primärantikörper wurde nach Angaben der Hersteller in 1x TBS-T + BSA oder Milchpulver verdünnt (Tabelle 4). Im Anschluss an die Primärantikörper-Inkubation wurde die Membran 3 x 10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in 1x TBS-T + 2 % Milchpulver (Tabelle 5). Danach wurde die Membran wieder 3 x 10 min mit 1 x TBS-T gewaschen.

Im Anschluss daran wurde mithilfe des ECL *Western Blotting Detection* Reagenz ein Chemilumineszenz-Film gemäß den Angaben des Herstellers belichtet und entwickelt.

Für die Bestimmung der tatsächlichen Proteinmenge die geladen wurde, wurden die Membranen nach der Visualisierung der zu untersuchenden Proteine nach nachfolgendem Protokoll behandelt.

Die Membran wurde für 3 x 5 min mit 1x TBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Membranen in 15 ml *Restore Western Blot Stripping* Lösung für 30 - 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 3 x 5 min in 1x TBS-T gewaschen. Nach den Waschschritten wurde die Membran für 1 Stunde in 1x TBS-T + 5 % Milchpulver geblockt und wie bereits zuvor beschrieben mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Für die Überprüfung der geladenen Proteinkonzentration wurde GAPDH nachgewiesen.

Blotpuffer (Towbin-Puffer)

| | |
|-----------|---------|
| Tris-Base | 25,9 mM |
| Glycin | 192 mM |
| SDS | 0,05 % |
| Methanol | 20 % |

1x TBS-T

| | |
|-----------|--------|
| Tris-Base | 20 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Tween 20 | 0,1 % |
| pH 7,6 | |

3.10.5. Statistische Auswertungen

Für die statistische Auswertung wurden mehrere unabhängige Experimente zusammengefasst. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM; *standard error of the mean*). Unter Annahme einer Normalverteilung der Mittelwerte wurde für die statistische Auswertung der homoskedastisch, zweiseitige Student's t-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurden Tests mit $p < 0,05$ bezeichnet. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten kamen die Programme Excel 2003/2007 (Microsoft, Redmond, USA), SigmaStat3.1 (Systat, San Jose, USA) und SigmaPlot 10.0 (Systat, San Jose, USA) zur Anwendung.

Kapitel 4 Ergebnisse

4.1. Expressionsanalyse der Komponenten des PLZF-AT2R-(P)RR-Signalweges

In der vorliegenden Arbeit wurde initial mittels qualitativer RT-PCR die Genexpression (Abbildung 12, Tabelle 8) und mittels *Western blot* Analyse die Proteinexpression (Abbildung 13, Tabelle 8) von PLZF sowie anderer Komponenten des PLZF-AT2R-(P)RR-Signalweges in verschiedenen humanen Neuroblastoma-Zelllinien (KELLY, SK-N-SH, SK-N-AS und SH-Sy5y) und Glioblastoma-Zelllinien (U87-MG und U373-MG), in verschiedenen murinen Hirnarealen (frontaler Kortex, parietaler Kortex, Hippocampus, Hypothalamus, Striatum und Amygdala) und in murinen primären neuronalen und glialen Zellen untersucht. Dieser erste Teil der Arbeit diente dazu eine geeignete Zelllinie für die *in vitro*-Versuche zu identifizieren, die im weiteren Teil der Arbeit Gegenstand funktioneller Untersuchungen war. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob die Proteine des PLZF-AT2R-(P)RR-Signalweges exprimiert werden.

Um die Expression der Transkripte und Proteine nachweisen zu können, wurden die Zellen und Rattengehirne wie im Kapitel 3 beschrieben aufgearbeitet. Für die Expressionsanalyse der Zelllinien wurden drei verschiedene Passagen untersucht, bei den verschiedenen murinen Hirnarealen drei unterschiedliche Rattengehirne und bei den primären Neuronen und primären Gliazellen zwei unterschiedliche Präparationen.

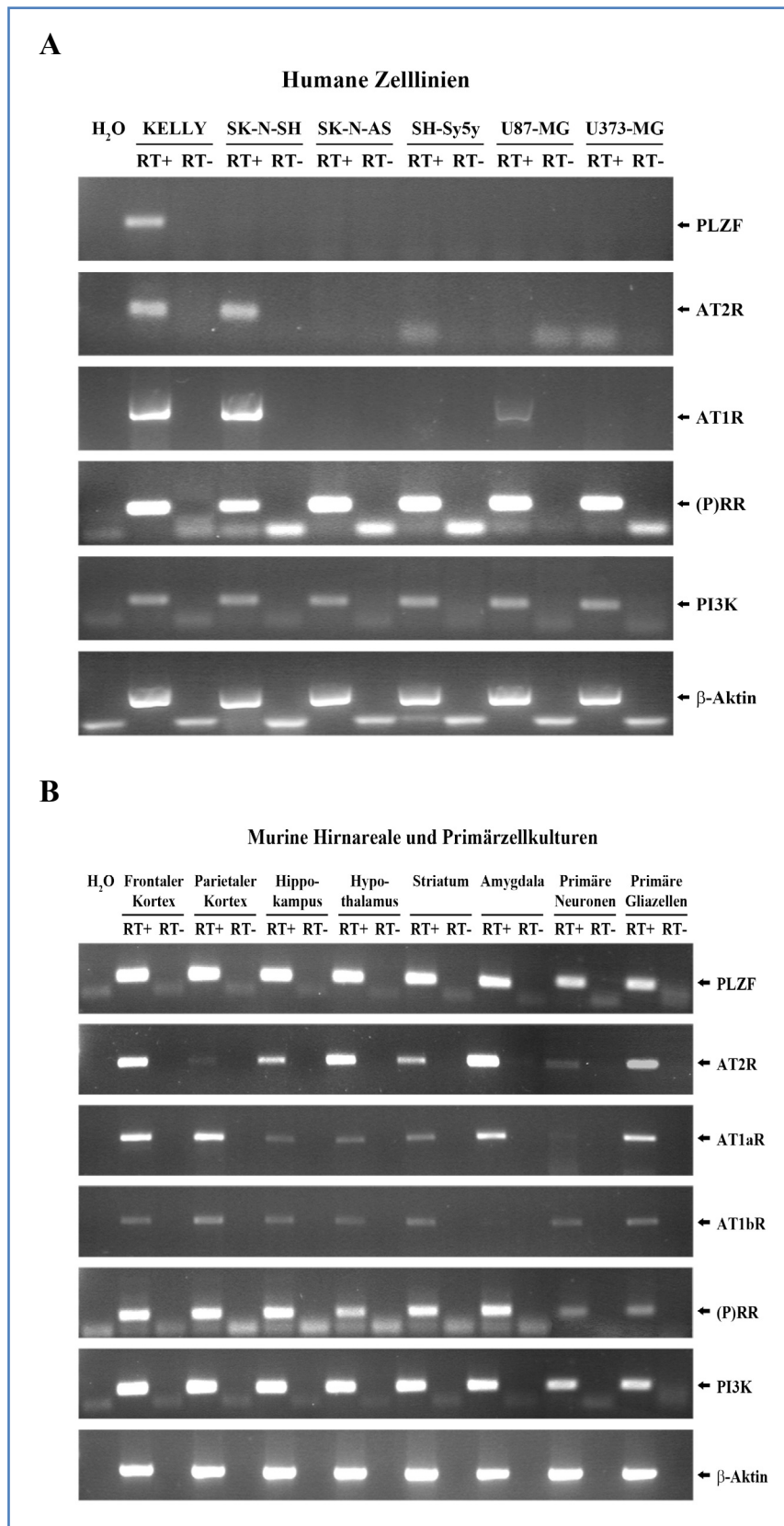


Abbildung 12: Darstellung der RT-PCR-Analyse der Expression von PLZF und anderer Komponenten des AT2R/(P)RR-PLZF-Signalweges in (A) verschiedenen humanen Zelllinien, (B) verschiedenen Hirnarealen des Rattenhirns und primärer muriner Neuronen und Gliazellen. Als PCR-Negativkontrolle wurde in dem PCR-Reaktionsmix die cDNA durch Wasser ersetzt (H₂O). Eine Reaktion ohne Zugabe der reversen Transkriptase (RT-) diente als Negativkontrolle für die cDNA-Synthesereaktion.

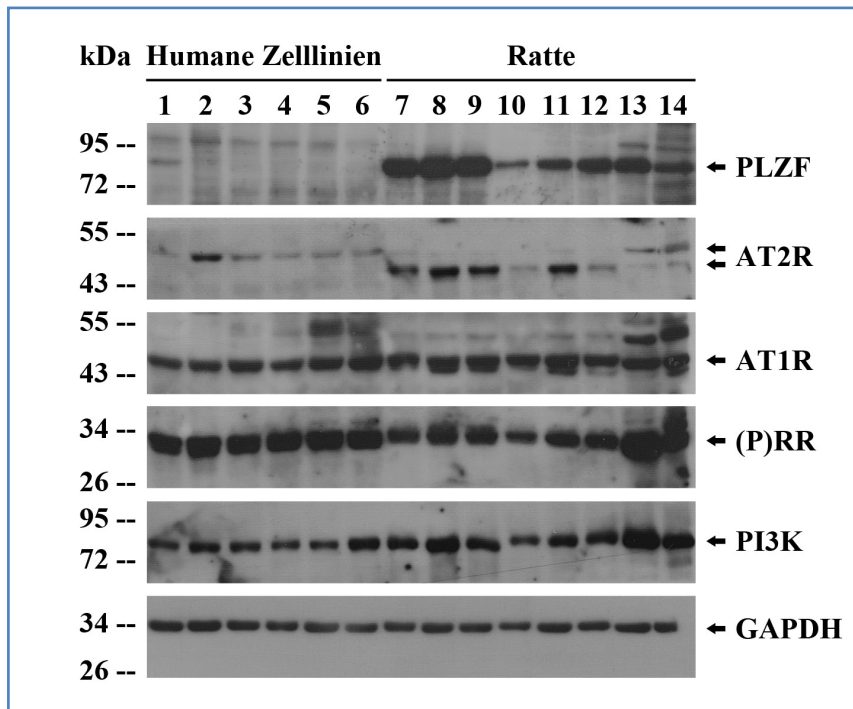


Abbildung 13: Darstellung des *Western blot* von Gesamtproteinlysaten humaner Zelllinien (1 – KELLY, 2 – SK-N-SH, 3 – SK-N-AS, 4 – SH-Sy5y, 5 – U87-MG, 6 – U373-MG) und muriner Proben (7 – Frontalkortex, 8 – Parietalkortex, 9 – Hippokampus, 10 – Hypothalamus, 11 – Striatum, 12 – Amygdala, 13 – primäre Neuronen, 14 – primäre Gliazellen), die Banden des PLZF- (80-90 kDa)¹⁸⁰, AT2R- (44-50 kDa)¹²⁸, AT1R- (44 kDa)¹²⁸, (P)RR- (39 kDa), PI3K-p85 α -Untereinheit (85 kDa)⁹³ und GAPDH-Proteins (36 kDa)¹⁸¹ sind gekennzeichnet.

Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung der Expressionsanalyse von PLZF und anderer Komponenten des AT2R/(P)RR-PLZF-Signalweges mittels RT-PCR und *Western blot*.

| | KELLY | SK-N-SH | SK-N-AS | SH-Sy5y | U87-MG | U373-MG | frontaler Kortex | parietaler Kortex | Hippocampus | Hypothalamus | Striatum | Amygdala | primäre neuronale Zellen | primäre gliale Zellen |
|------------------------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|------------------|-------------------|-------------|--------------|----------|----------|--------------------------|-----------------------|
| PLZF | mRNA | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Protein | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AT2R | mRNA | + | + | - | - | - | + | (+) | + | + | + | + | (+) | + |
| | Protein | (+) | + | (+) | (+) | (+) | + | + | + | (+) | + | (+) | (+) | (+) |
| AT1R (a/b) | mRNA | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | +/(+) | (+) | + |
| | Protein | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| (P)RR | mRNA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Protein | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PI3K-p85α-Untereinheit | mRNA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Protein | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| House-keeping | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Housekeeping: β -Aktin bei RT-PCR und GAPDH im *Western blot*, + = mRNA bzw. Protein nachweisbar; (+) = mRNA bzw. Protein schwach nachweisbar; +/(+) = AT1aR nachweisbar, AT1bR schwach nachweisbar; - = mRNA bzw. Protein nicht nachweisbar.

4.2. Tierexperimentelle Untersuchungen in einem Schlaganfallmodell der Ratte

4.2.1. Quantitativer Nachweis der mRNA-Expression von Genen des PLZF-AT2R-(P)RR-Signalweges im Rattenhirn nach MCAO

Um die Expression der Gene messen zu können, wurden die Ratten wie unter 3.10.1. beschrieben behandelt und die Präparation der RNA aus der Gehirnscheibe erfolgte wie in 3.10.3.2. beschrieben. Nach dem Umschreiben in cDNA wurde eine quantitative PCR mit gen-spezifischen Primern (Tabelle 3) unter gleichzeitiger β -Aktin-RNA-Expressionsbestimmung durchgeführt. In der Tabelle 9 und Tabelle 10 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen als Ausmaß der Zielgen-mRNA-Expression im Bezug auf die β -Aktin-RNA-Expression dargestellt.

Zur Kontrolle der MCAO wurde das Infarktvolume mittels Kleintier-MRT gemessen und nur Tiere mit einem ischämischen Infarkt sowie einem Infarktvolume größer als 50 mm³ für die Auswertung verwendet. Für die korrekte Präparation von ipsilateraler und kontralateraler Hirnhälfte sowie der erfolgreichen Apoplex-Induktion dienten Interleukin-6 (IL-6) als Inflammationsmarker und Zyklin D1 als interne Kontrolle (grau hinterlegt in Tabelle 9 und Tabelle 10). Dabei konnte eine signifikant, erhöhte Expression von IL-6- und Zyklin D1-mRNA 24 sowie 48 Stunden nach MCAO auf der ipsilateralen Hirnseite MCAO-operierter Ratten nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Kontrolluntersuchungen wurde die PLZF-mRNA-Expression und mRNA-Expression bekannter PLZF-Zielgene bestimmt. Die Untersuchungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hirnhälfte bei schein-schein- und schein-operierten Tieren. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach MCAO konnte eine signifikante Verminderung der mRNA von PLZF, (P)RR und der PI3K-p85 α -Untereinheit beobachtet werden. Für die BID- und Zyklin A2-mRNA Expression wurde bei den MCAO-operierten Tieren 24 und 48 Stunden nach MCAO eine signifikante Heraufregulation in der ipsilateralen Hirnhälfte im Vergleich zur kontralateralen Hirnhälfte und den schein-schein- und schein-operierten Tieren nachgewiesen.

Tabelle 9: Übersicht über die relative Gen-mRNA-Expressionen 24 Stunden nach MCAO.

| | Schein-Schein-OP | | Schein-OP | | MCAO | | |
|------------------|------------------|---------------|--------------|---------------|----------------|---------------|---------|
| | ipsilateral | kontralateral | ipsilateral | kontralateral | ipsilateral | kontralateral | p |
| IL-6 | 104,0 ± 25,0 | 108,9 ± 18,9 | 123,2 ± 16,1 | 123,0 ± 12,6 | 3555,4 ± 581,9 | 291,2 ± 84,2 | < 0,001 |
| Zyklin D1 | 76,7 ± 11,1 | 85,5 ± 15,8 | 63,3 ± 10,3 | 69,1 ± 7,4 | 207,4 ± 22,7 | 90,4 ± 9,2 | < 0,001 |
| PLZF | 100,9 ± 4,6 | 106,9 ± 11,1 | 85,6 ± 8,9 | 87,1 ± 9,1 | 71,3 ± 6,0 | 90,8 ± 3,8 | 0,019 |
| AT2R | 81,8 ± 16,4 | 93,3 ± 12,2 | 29,9 ± 9,1 | 40,8 ± 14,3 | 27,5 ± 12,0 | 27,8 ± 10,5 | n.s. |
| (P)RR | 96,8 ± 10,7 | 108,1 ± 5,8 | 87,8 ± 5,8 | 96,9 ± 5,2 | 81,9 ± 7,2 | 105,8 ± 6,8 | 0,04 |
| PI3K-p85α | 101,5 ± 8,5 | 112,5 ± 7,8 | 104,9 ± 9,4 | 115,1 ± 5,7 | 114,9 ± 5,4 | 149,4 ± 12,3 | 0,04 |
| BID | 114,3 ± 5,1 | 109,8 ± 4,8 | 88,5 ± 4,8 | 88,8 ± 7,2 | 170,8 ± 17,0 | 130,0 ± 9,3 | 0,05 |
| Zyklin A2 | 87,7 ± 5,4 | 86,0 ± 4,8 | 76,3 ± 13,4 | 81,8 ± 18,0 | 178,0 ± 24,4 | 103,6 ± 8,6 | <0,05 |

Dargestellt in Prozent ± SEM, normalisiert auf β-Aktin mRNA-Expression. Anzahl der Schein-Schein-OP Tiere n = 4, Anzahl der Schein-OP Tiere n = 5 und Anzahl der Tiere mit MCAO-Eingriff n = 6; statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test.

Tabelle 10: Übersicht über die relative Gen-mRNA-Expressionen 48 Stunden nach MCAO.

| | Schein-Schein-OP | | Schein-OP | | MCAO | | |
|------------------|------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| | ipsilateral | kontralateral | ipsilateral | kontralateral | ipsilateral | kontralateral | p |
| IL-6 | 67,8 ± 7,9 | 55,9 ± 6,6 | 151,2 ± 8,3 | 174,8 ± 13,4 | 493,2 ± 125,0 | 68,4 ± 8,2 | < 0,001 |
| Zyklin D1 | 93,1 ± 12,4 | 69,4 ± 4,6 | 53,0 ± 4,5 | 54,7 ± 10,0 | 543,4 ± 89,9 | 81,8 ± 7,6 | < 0,001 |
| PLZF | 43,0 ± 4,3 | 39,8 ± 4,5 | 111,2 ± 18,8 | 118,9 ± 21,4 | 48,4 ± 8,2 | 64,0 ± 4,9 | n.s. |
| AT2R | 35,1 ± 19,4 | 30,3 ± 19,5 | 29,3 ± 8,9 | 38,8 ± 14,9 | 18,8 ± 3,9 | 34,4 ± 10,1 | n.s. |
| (P)RR | 52,6 ± 3,9 | 40,7 ± 3,8 | 48,5 ± 2,1 | 57,2 ± 5,5 | 33,0 ± 3,5 | 40,1 ± 4,2 | n.s. |
| PI3K-p85α | 107,5 ± 9,6 | 83,1 ± 6,5 | 75,7 ± 9,3 | 88,0 ± 13,5 | 107,7 ± 18,5 | 98,9 ± 4,9 | n.s. |
| BID | 97,9 ± 13,3 | 82,7 ± 11,6 | 84,7 ± 11,1 | 77,0 ± 9,8 | 258,3 ± 17,6 | 100,9 ± 8,0 | < 0,001 |
| Zyklin A2 | 82,9 ± 9,0 | 72,2 ± 7,1 | 46,1 ± 6,9 | 44,6 ± 8,1 | 1052,2 ± 79,5 | 91,8 ± 11,0 | < 0,001 |

Dargestellt in Prozent ± SEM, normalisiert auf β-Aktin mRNA-Expression. Anzahl der Schein-Schein-OP Tiere n = 4, Anzahl der Schein-OP Tiere n = 5 und Anzahl der Tiere mit MCAO-Eingriff n = 6; statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test.

4.2.2. Nachweis des PLZF-Proteins mittels *Western blot* im Rattenhirn nach MCAO

Analog zu den Untersuchungen zur PLZF-mRNA-Expression wurden die Tiere wie in Abschnitt 3.10.1. beschriebenen behandelt. Die gewonnenen Proteinproben wurden mittels der unter 3.10.4. beschriebenen Methoden aufbereitet, elektrophoretisch getrennt und mit Antikörpern gegen das PLZF- und AT2R-Protein sowie gegen das ubiquitär in tierischen Zellen vorkommende Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) inkubiert und entsprechend detektiert.

Die GAPDH-Bande dient hierbei als Ladekontrolle, um Inhomogenitäten bei der Proteinbeladung zu detektieren und zu normalisieren.

Im Anschluss an die Detektion der Proteinbanden wurden diese mittels spezieller Software (ImageJ, National Institut of Health, USA) densitometrisch ausgewertet und der Quotient aus der Pixelintensität des PLZF-Proteins und des GAPDH-Proteins graphisch dargestellt.

In der Abbildung 14A und Abbildung 15A ist die ausschnittsweise Darstellung der *Western blot* Filme des PLZF-, AT2R- und GAPDH-Proteins zu erkennen und in den Abbildung 14B,C und Abbildung 15B,C die densitometrischen Auswertungen der PLZF- und AT2R-Expression. In den MCAO-operierten Tieren konnte 24 Stunden nach MCAO-Eingriff kein Unterschied in der PLZF- und AT2R-Expression zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hirnhälfte beobachtet werden, jedoch eine signifikante Reduktion von PLZF im Vergleich ipsilateraler und kontralateraler Hirnseite von Schein-Schein-OP zu MCAO-behandelten Ratten. Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MCAO-Eingriff wurde eine signifikante Reduktion des PLZF-Proteins auf der ipsilateralen Seite der MCAO behandelten Tiere im Vergleich zu der ipsilateralen Seite der Schein-Schein- und Schein-OP Tiere nachgewiesen und eine signifikante Reduktion im Vergleich der ipsilateralen Seite zu der kontralateralen Seite der MCAO-Tiere *per se*. Für das AT2R-Protein wurde eine signifikante Reduktion auf der ipsilateralen Seite der MCAO-behandelten Tiere im Vergleich zu der ipsilateralen Seite der Schein-OP Tiere nachgewiesen und eine Verminderung ($p = 0,06$) im Vergleich ipsilaterale Hirnhälfte und kontralaterale Hirnhälfte in den MCAO-behandelten Ratten. Zusätzlich zu der erwarteten PLZF-Bande bei 80-90 kDa wurde in den Proteinproben, welche aus der ipsilateralen Hirnseite der MCAO-operierten Tiere isoliert wurden, zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine zusätzliche Bande bei ca. 72 kDa detektiert.

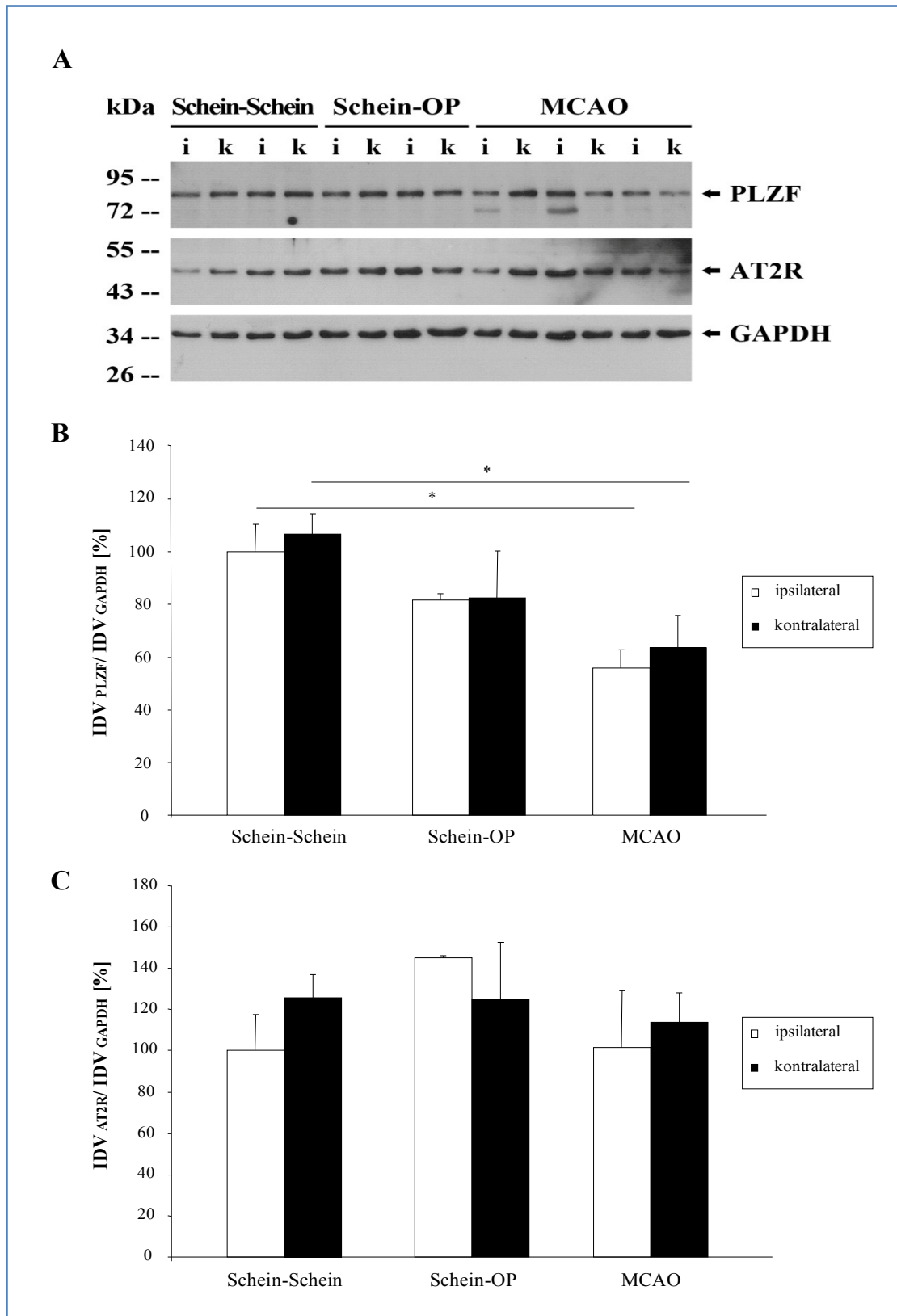


Abbildung 14: (A) Ausschnittsweise Darstellung des *Western blot* von Gesamtproteinlysaten aus der ipsilateralen (i) und kontralateralen (k) Hirnhälfte 24 Stunden nach Schein-Schein-, Schein-OP und MCAO-Eingriff; dargestellt sind die Banden des PLZF- (80-90 kDa), AT2R- (44-50 kDa) und GAPDH-Proteins (36 kDa). (B) graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung des PLZF-Proteins und (C) AT2R-Proteins 24 Stunden nach Schein-Schein-, Schein-OP und MCAO-Eingriff; Anzahl der Schein-Schein-OP Tiere n = 4, Anzahl der Schein-OP Tiere n = 2 und Anzahl der Tiere mit MCAO-Eingriff n = 4; statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test, * p < 0,05.

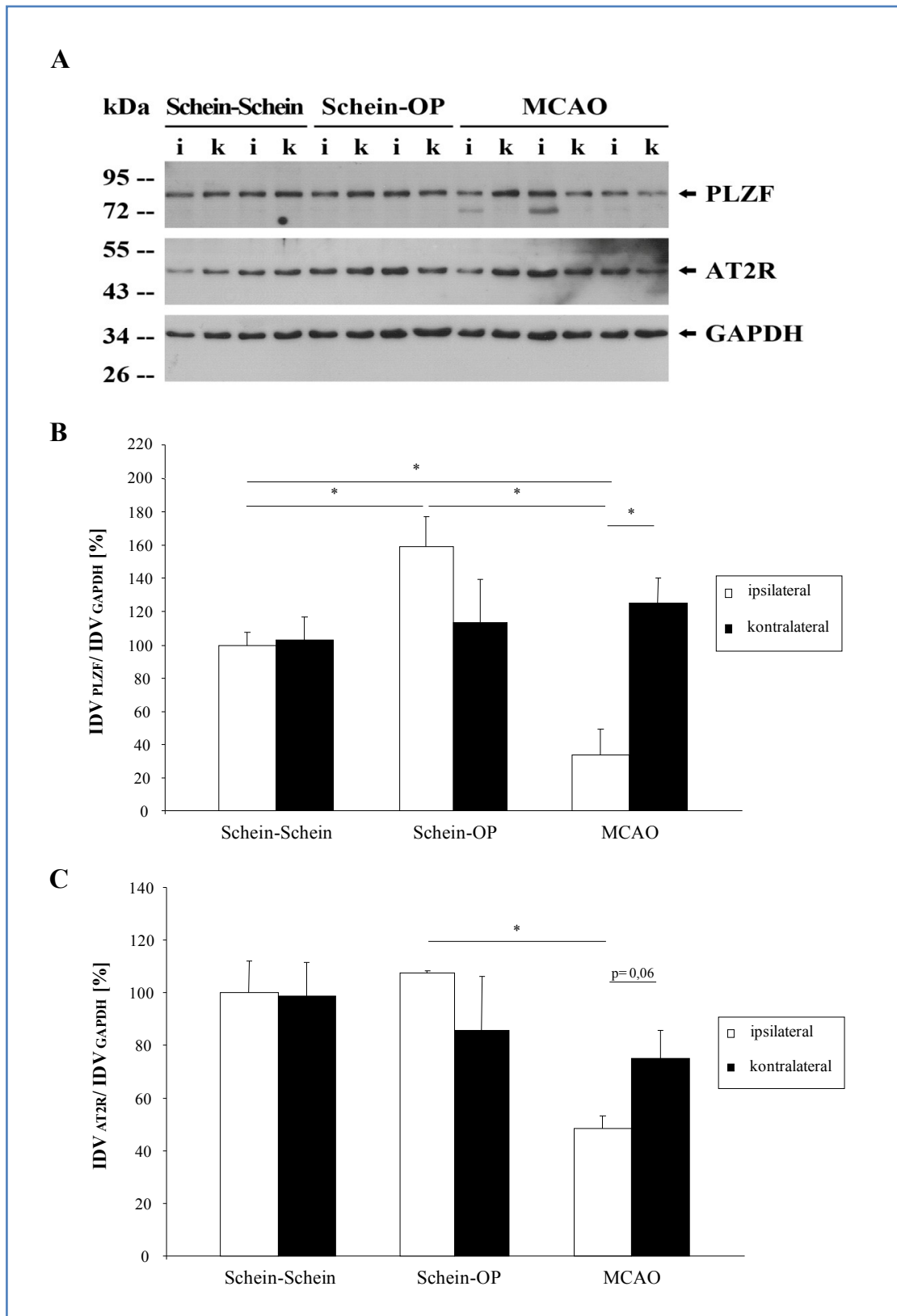


Abbildung 15: (A) Ausschnittsweise Darstellung des *Western blot* von Gesamtproteinlysaten aus der ipsilateralen (i) und kontralateralen (k) Hirnhälfte 48 Stunden nach Schein-Schein-, Schein-OP und MCAO-Eingriff; dargestellt sind die Banden des PLZF- (80-90 kDa), AT2R- (44-50 kDa) und GAPDH-Proteins (36 kDa). (B) graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung des PLZF-Proteins und (C) AT2R-Proteins 48 Stunden nach Schein-Schein-, Schein-OP und MCAO-Eingriff; Anzahl der Schein-Schein-OP Tiere n = 4, Anzahl der Schein-OP Tiere n = 2 und Anzahl der Tiere mit MCAO-Eingriff n = 4; statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test, * p < 0,05.

4.2.3. Nachweis des PLZF-Proteins mittels *Western blot* im Rattenhirn nach MCAO und fraktionierter Proteinisolation

Zusätzlich zu den in Abschnitt 4.2.1. durchgeführten Versuchen mit Gesamtproteinlysaten wurden Tiere wie unter 3.10.1. beschrieben behandelt, das entnommene Hirngewebe ebenfalls nach ipsilateraler und kontralateraler Hirnhälfte separiert und von beiden Seiten eine fraktionierte Proteinisolation wie im Abschnitt 3.10.4.2. beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mit Antikörpern gegen das PLZF-Protein sowie gegen das ubiquitär in tierischen Zellen vorkommende Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) inkubiert und entsprechend detektiert.

In der Abbildung 16 und Abbildung 17 ist zu erkennen, dass bezüglich der PLZF-Proteinexpression in der ipsilateralen Hirnhälfte ein hochsignifikanter Unterschied 24 Stunden und 48 Stunden nach MCAO in der nukleären Fraktion zwischen Schein-OP und MCAO-Eingriff besteht jedoch kein signifikanter Unterschied in der zytoplasmatischen Fraktion. In der kontralateralen Hirnhälfte konnte kein signifikanter Unterschied in der nukleären Fraktion zwischen schein-operierten und MCAO-operierten Tieren 24 und 48 Stunden nach MCAO beobachten werden. In der zytoplasmatischen Fraktion ist zum Zeitpunkt 24 Stunden nach MCAO kein Unterschied nachweisbar, jedoch zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MCAO eine verminderte PLZF-Expression in den schein-operierten Tieren im Vergleich zu den MCAO-behandelten Ratten.

Tabelle 11 und Tabelle 12 stellen eine Zusammenfassung der Abbildung 16 und Abbildung 17 dar.

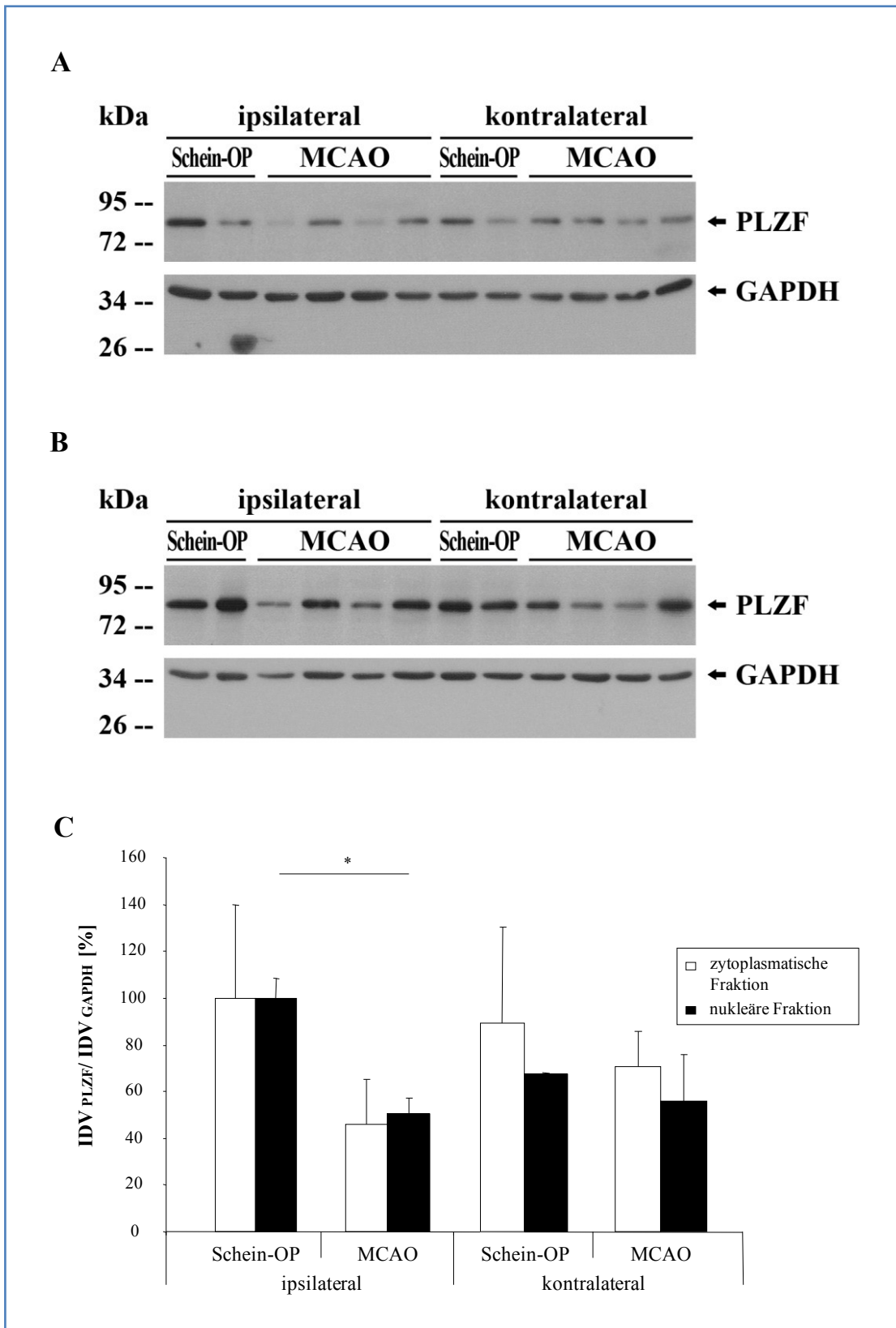


Abbildung 16: Darstellung des *Western blot* von (A) zytoplasmatischen und (B) nukleären Proteinen aus der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte 24 Stunden nach Schein-OP und MCAO-Eingriff; dargestellt sind die Banden des PLZF- (80-90 kDa) und GAPDH-Proteins (36 kDa). (C) Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung des PLZF-Proteins in Prozent; standardisiert auf GAPDH und normalisiert auf ipsilateral Schein-OP. Anzahl der Schein-OP Tiere n = 2 und Anzahl der Tiere mit MCAO-Eingriff n = 4; statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test, * p < 0,05.

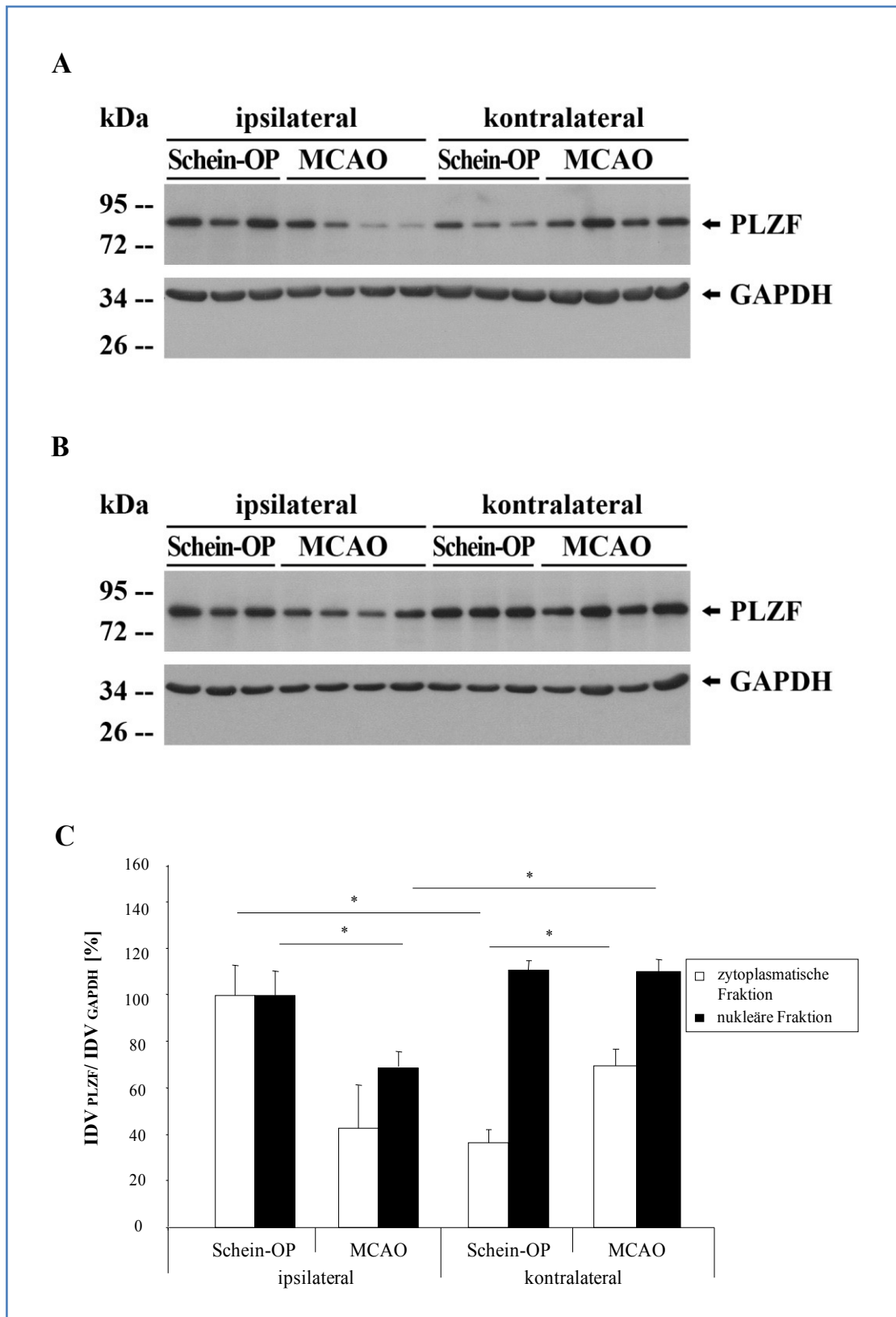


Abbildung 17: Darstellung des *Western blot* (A) von zytoplasmatischen und (B) nukleären Proteinen aus der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte 48 Stunden nach Schein-OP und MCAO-Eingriff; dargestellt sind die Banden des PLZF- (80-90 kDa) und GAPDH-Proteins (36 kDa), (C) Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung des PLZF-Proteins in Prozent; standardisiert auf GAPDH und normalisiert auf ipsilateral Schein-OP. Anzahl der Schein-OP Tiere n = 3 und Anzahl der Tiere mit MCAO-Eingriff n = 4; statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test, * p < 0,05.

Tabelle 11: Übersicht über die relative PLZF-Protein Expression 24 Stunden nach MCAO.

| 24 h nach MCAO | Schein-OP | | MCAO | |
|---------------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | ipsilateral | kontralateral | ipsilateral | kontralateral |
| nukleäre Fraktion | 100 ± 8,4 | 67,5 ± 0,5 | 50,6 ± 6,7 | 56,0 ± 19,9 |
| zytoplasmatische Fraktion | 100 ± 39,9 | 89,4 ± 41,3 | 45,9 ± 19,3 | 71,1 ± 14,7 |

Dargestellt in $IDV_{PLZF} / IDV_{GAPDH} \pm SEM$, normalisiert auf ipsilateral Schein-OP. Anzahl der Schein-OP Tiere $n = 2/3$ und Anzahl der Tiere mit MCAO-Eingriff $n = 4$; statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test.

Tabelle 12: Übersicht über die relative PLZF-Protein Expression 48 Stunden nach MCAO.

| 48 h nach MCAO | Schein-OP | | MCAO | |
|---------------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | ipsilateral | kontralateral | ipsilateral | kontralateral |
| nukleäre Fraktion | 100 ± 10,9 | 111,2 ± 4,1 | 68,9 ± 6,7 | 110,2 ± 5,5 |
| zytoplasmatische Fraktion | 100 ± 13,3 | 36,5 ± 5,9 | 42,8 ± 18,5 | 69,8 ± 7,5 |

Dargestellt in $IDV_{PLZF} / IDV_{GAPDH} \pm SEM$, normalisiert auf ipsilateral Schein-OP. Anzahl der Schein-OP Tiere $n = 2/3$ und Anzahl der Tiere mit MCAO-Eingriff $n = 4$; statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test.

4.3. *In vitro*-Untersuchungen zur Bedeutung von PLZF im neuronalen Kontext

4.3.1. Etablierung einer stabil PLZF-überexprimierenden KELLY-Zelllinie

Für die *in vitro*-Untersuchungen zur Bedeutung von PLZF wurde zunächst eine stabile PLZF-überexprimierende KELLY-Zelllinie generiert. Hierfür wurde in den episomalen Expressionsvektor pCEP4 (Abbildung 18) die gesamte cDNA für das humane PLZF-Gen als Insert kloniert und dieser mittels Lipofektion (Genejuice) in die KELLY-Zellen transfiziert. Als Kontrolle für die funktionellen Untersuchungen wurde der Expressionsvektor pCEP4 ohne Insert nach der gleichen Methode transfiziert.

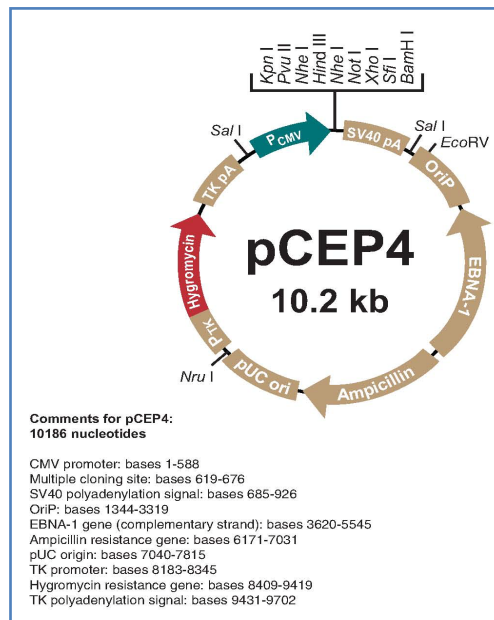


Abbildung 18: Vektorkarte des episomalen Expressionsvektors pCEP4.

Die Isolation stabil-transfizierter Klone erfolgte durch Kultivierung der Zellen in Kulturmedium mit 250 µg/ml Hygromycin B als Selektionsmarker. Die Überexpression von PLZF wurde durch *real-time* PCR und *Western blot* nachgewiesen.

Wie in Abbildung 19 dargestellt konnte eine signifikante Überexpression von PLZF-mRNA in den mit dem pCEP4-PLZF-Vektor transfizierten KELLY-Zellen im Vergleich zum Wildtyp und pCEP4-Leervektor transfizierten Zellen detektiert werden.

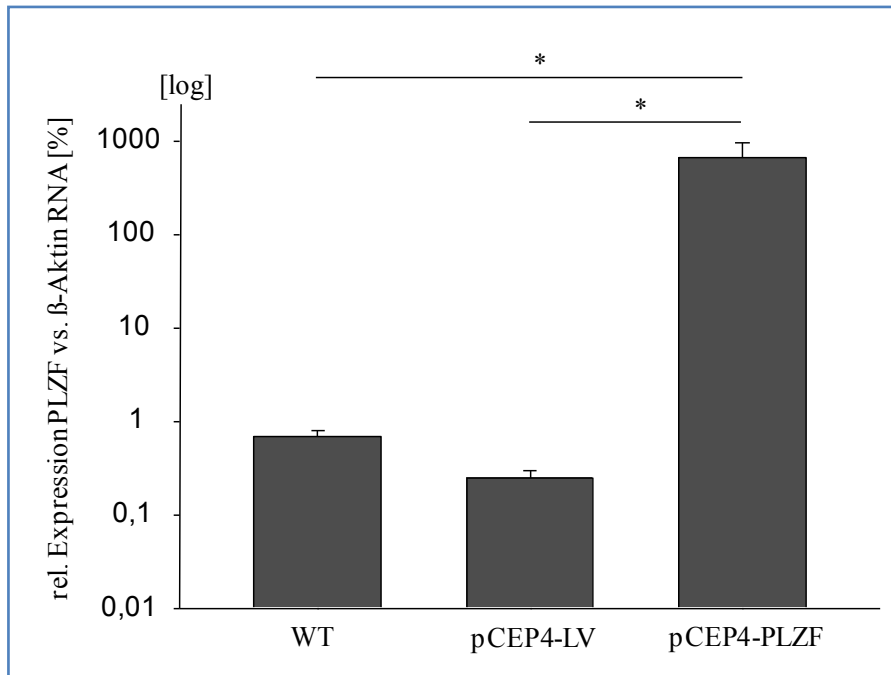


Abbildung 19: Graphische Darstellung der relativen PLZF-mRNA-Expression von KELLY-Zellen. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte \pm SEM in Prozent der auf β -Aktin normalisierten Expressionswerte in Bezug zu KELLY-WT. $n = 4$ (zwei unabhängig generierte stabile Linien mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten; jede Messung in technischen Triplikaten). KELLY-Wildtyp (WT), KELLY-pCEP4-Leervektor (pCEP4-LV), KELLY-pCEP4-PLZF-HA (pCEP4-PLZF), * $p < 0,001$.

Für die Untersuchung der Überexpression von PLZF auf Proteinebene mittels *Western blot* wurde eine fraktionierte Proteinisolierung für die Trennung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen durchgeführt. Diese Trennung diente der Kontrolle, ob das exogene (mittels pCEP4-PLZF-Vektor transfizierte) PLZF in der Lage ist, aus dem Zytoplasma durch die Kernporen in den Kern zu translozieren. Wie in Abbildung 20 dargestellt, konnte sowohl eine erhöhte Expression von PLZF auf Proteinebene, als auch eine Lokalisation im Zytoplasma (Z) und Kern (K) nachgewiesen werden. Als Kontrolle für die Fraktionierung diente der Nachweis des zytoplasmatischen Proteins Calpain und des nukleären Proteins TFIID/TBP.

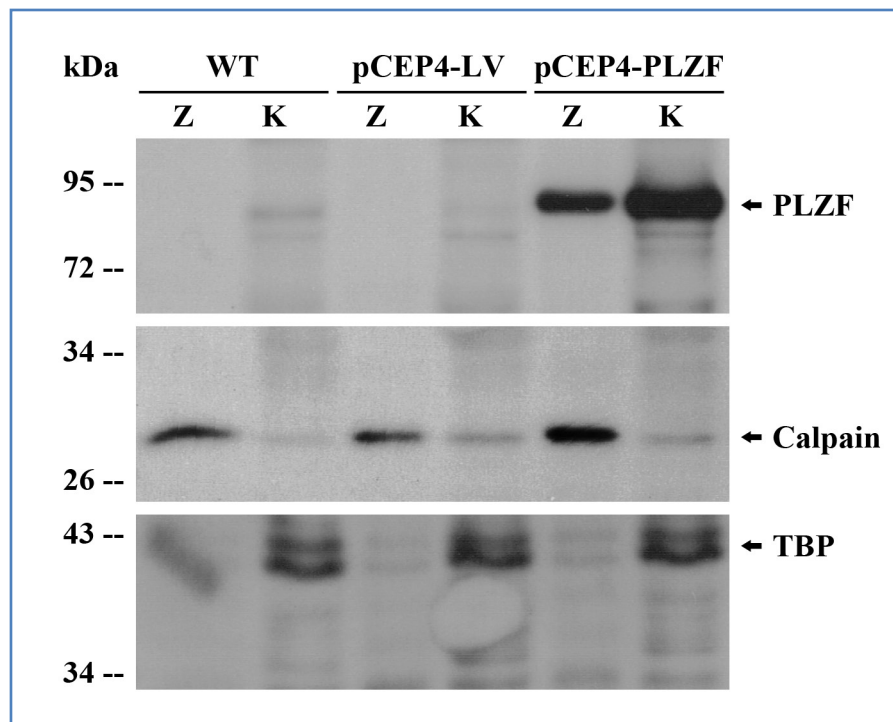


Abbildung 20: Darstellung des *Western blot* von zytoplasmatischen Proteinen (Z) und Kernproteinen (K) aus einer fraktionierten Proteinisolation von KELLY-Zellen. Gezeigt sind die Banden des PLZF- (80-90 kDa), Calpain- (30 kDa) und TFIID/TBP-Proteins (39 kDa)¹⁸². KELLY-Wildtyp (WT), KELLY-pCEP4-Leervektor (pCEP4-LV), KELLY-pCEP4-PLZF-HA (pCEP4-PLZF).

4.3.2. Morphologie

Unter Standardbedingungen zeigten KELLY-Zellen eine spindelförmige Morphologie mit pseudopodienartigen Ausläufern. Die 20-30 μm großen Zellen wuchsen in lockeren Verbänden. Das Zytoplasma war Vakuolen-arm, die Kerne waren groß und Nukleoli-reich und die Zellmembran gleichmäßig (Abbildung 21A). Die pCEP4-Leervektor transfizierten Zellen zeigten eine identische Morphologie wie die KELLY-Wildtyp-Zellen (Abbildung 21B). Im Vergleich zu den Wildtyp- und Leervektor-transfizierten Zellen erschienen die PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen pleomorph. Neben wenigen spindelförmigen Zellen mit pseudopodienartigen Ausläufern waren auch runde bis ovale Zellen mit starker Granulation zu beobachten (Abbildung 21C).

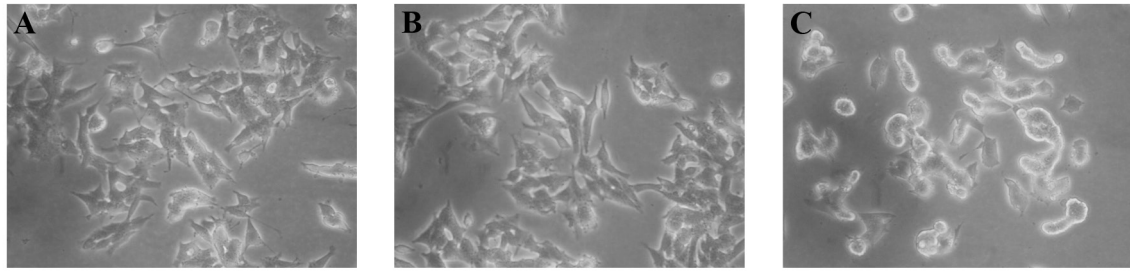


Abbildung 21: Morphologie von KELLY-Zellen. (A) Wildtyp-Zellen im Kulturmedium ohne Selektionsantibiotikum, (B) pCEP4-Leervektor transfizierte Zellen im Selektionsmedium, (C) PLZF-überexprimierende Zellen (pCEP4-PLZF-HA) im Selektionsmedium.

4.3.3. Untersuchungen zur Zellzahl, Proliferation und Apoptose

Der Transkriptionsfaktor PLZF ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, in der Lage, das Zellwachstum zu unterdrücken und in Abhängigkeit des Zellkultur-Modelles, Apoptose zu induzieren.

Um den Einfluss von PLZF auf die Zellzahl, Proliferation und Apoptose von KELLY-Zellen zu untersuchen, wurden $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² der KELLY-Wildtyp-Zellen, KELLY-Leervektor-Zellen und PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen in einer 96-well Platte für fünf Tage unter Standardbedingungen kultiviert. 12 bis 18 Stunden nach Aussaat und am Tag fünf in Kultur wurde die Zellzahl indirekt mittels CellTiterGlo-Assay der Firma Promega untersucht. Hierbei diente der 12 bis 18 Stundenwert zur Kontrolle für die Aussaat der gleichen Anzahl von Zellen, um den Einfluss unterschiedlicher initialer Zellzahlen auf Proliferation und Apoptose ausschließen zu können. Am Tag fünf in Kultur wurde die Proliferations- und Apoptoserate wie unter 3.10.2.5. beschrieben bestimmt.

Es konnte anhand der Messung des ATP-Gehaltes in einer Luziferasereaktion als Maß für die Anzahl lebender Zellen, wie in Abbildung 22 dargestellt, beobachtet werden, dass bei Aussaat gleicher Zellzahlen am Tag fünf signifikant weniger PLZF-überexprimierende Zellen im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen gemessen wurden.

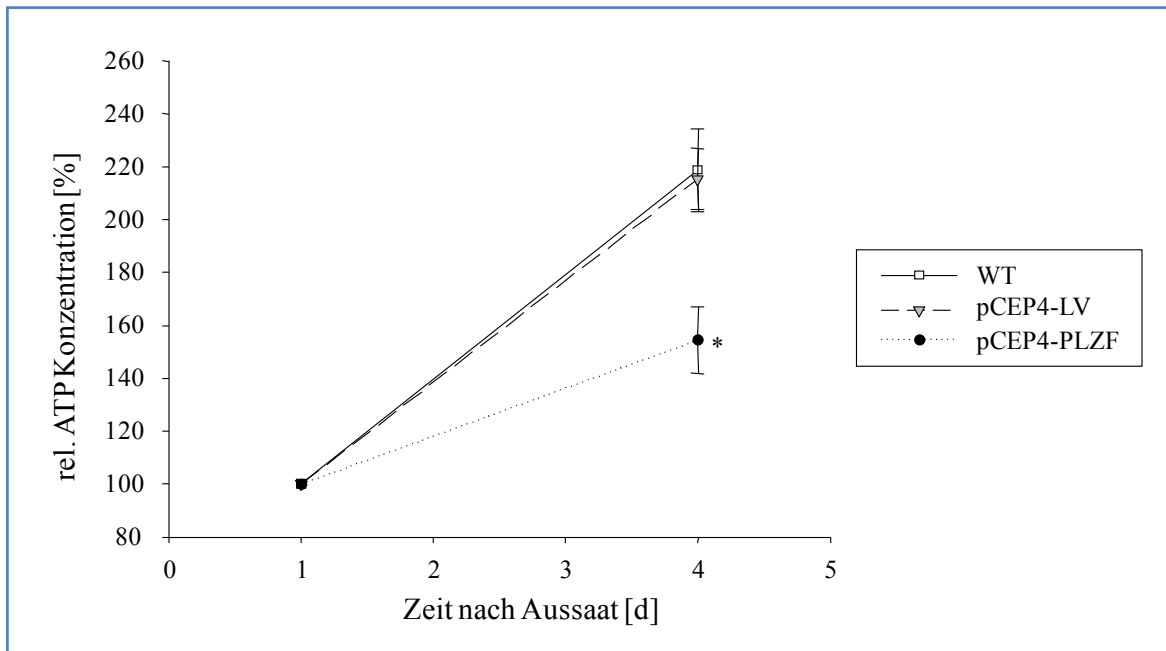


Abbildung 22: Graphische Darstellung der relativen ATP-Konzentration von KELLY-Zellen. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte \pm SEM in Prozent normalisiert auf Tag 1 nach Aussaat. $n = 4$ (zwei unabhängig generierte stabile Linien mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten). KELLY-Wildtyp (WT), KELLY-pCEP4-Leervektor (pCEP4-LV), KELLY-pCEP4-PLZF-HA (pCEP4-PLZF),* $p < 0,05$ WT, pCEP4-LV vs. pCEP4-PLZF.

Es konnte in den PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen eine Verminderung der Zellzahl um den Faktor 1,4 (Abbildung 23A) und eine um den Faktor 1,2 verminderte Proliferationsrate (Abbildung 23C) im Vergleich zu den KELLY-Wildtyp-Zellen und Leervektor-transfizierten Zellen beobachtet werden. Die Auswertung der Apoptoserate (Abbildung 23B) ergab in den Leervektor-transfizierten Zellen eine zweifach höhere Kaspase 3/7-Aktivität, als in den KELLY-pCEP4-PLZF transfizierten Zellen.

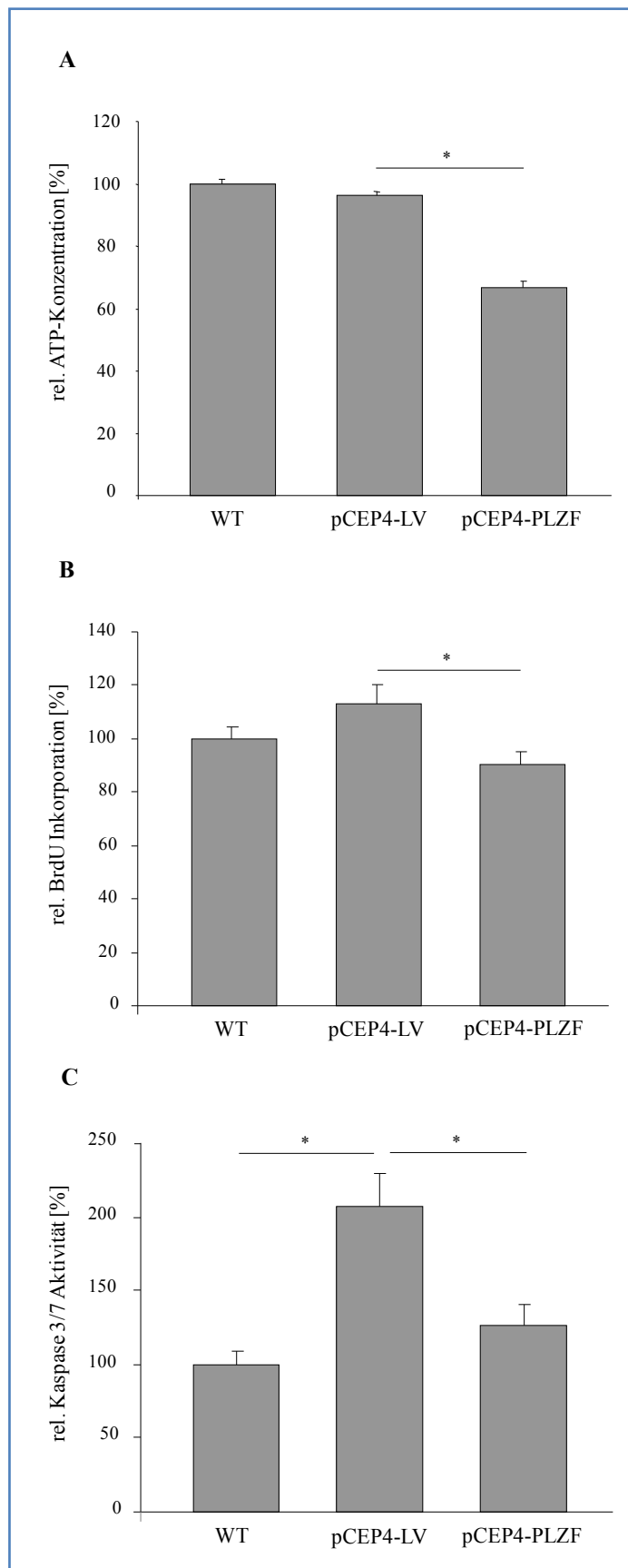


Abbildung 23: Graphische Darstellung der relativen ATP Konzentration als Maß für die Zellzahl(A), der relativen BrdU-Inkorporation als Maß für die Proliferation (B) und der relativen Kaspase 3/7-Aktivität als Maß für die Apoptose (C) von KELLY-Wildtyp (WT), KELLY-pCEP4-Leervektor (pCEP4-LV) und KELLY-pCEP4-PLZF-HA (pCEP4-PLZF) am Tag 5 in Kultur. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte \pm SEM in Prozent in Bezug auf KELLY-WT. (A) n=4; (B) n=4; (C) n=2 mit jeweils 6 technischen Replikaten, * $p < 0,05$.

4.3.4. Glutamat-Toxizität

Ein häufig verwendetes exzitotoxisches *in vitro*-Modell ist der Glutamat-induzierte Zelltod. Um den Einfluss von Glutamat auf die KELLY-Zellen zu untersuchen, wurden $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² der KELLY-Wildtyp-Zellen, KELLY-Leervektor-Zellen und PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen in einer 96-well Platte für 48 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert und dann für 24 Stunden in FBS-freiem Medium weiterkultiviert. Nach einer sich anschließenden 24-stündigen Glutamatbehandlung mit unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen (10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM und 100 mM Glutamat) wurde die Zellzahl indirekt mittels CellTiterGlo-Assay der Firma Promega bestimmt. Aus dem Verhältnis der Lumineszenz von unbehandelten zu behandelten Zellen wurde die prozentuale Überlebensrate ermittelt. Wie in Abbildung 24 dargestellt, konnte beobachtet werden, dass bei einer Glutamatkonzentration von 100 mM die pCEP4-PLZF-transfizierten KELLY-Zellen eine signifikant höhere Überlebensrate aufweisen als die pCEP4-Leervektor transfizierten KELLY-Zellen. Bei den geringeren Glutamatkonzentrationen konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

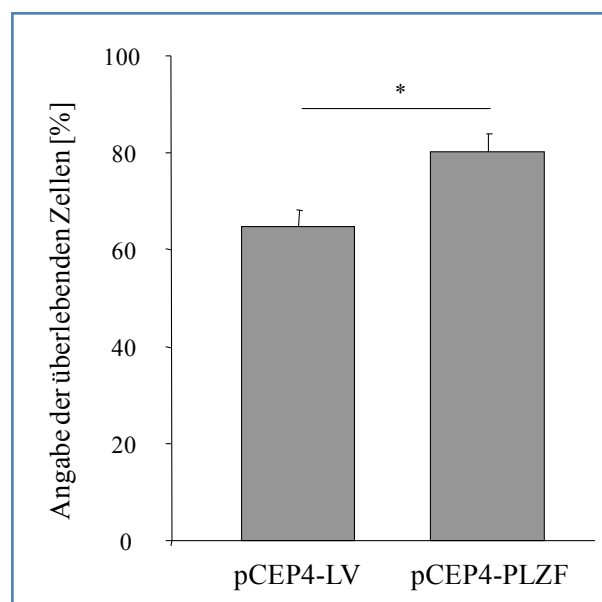


Abbildung 24: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von KELLY-Zellen 24 Stunden nach Behandlung mit 100 mM Glutamat. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte \pm SEM in Prozent normalisiert auf unbehandelte Zellen. $n = 4$ (zwei unabhängig generierte stabile Linien mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten). KELLY-pCEP4-Leervektor (pCEP4-LV), KELLY-pCEP4-PLZF-HA (pCEP4-PLZF), * $p < 0,05$ pCEP4-LV vs. pCEP4-PLZF.

4.3.5. Untersuchung von PLZF-Zielgenen

Zur Analyse des Einflusses einer Überexpression des Transkriptionsfaktors PLZF in der humanen Neuroblastoma-Zelllinie KELLY auf bereits bekannte Zielgene wurde eine quantitative *real-time* PCR durchgeführt. Wie in Abbildung 25 dargestellt, konnte ein signifikanter Anstieg für die Expression der AT2R-mRNA und Zyklin A2-mRNA nachgewiesen werden. Die weiteren untersuchten bekannten Zielgene von PLZF ((P)RR, PI3K-p85 α -Untereinheit und BID) zeigten keine signifikante Veränderung in ihrer Expression.

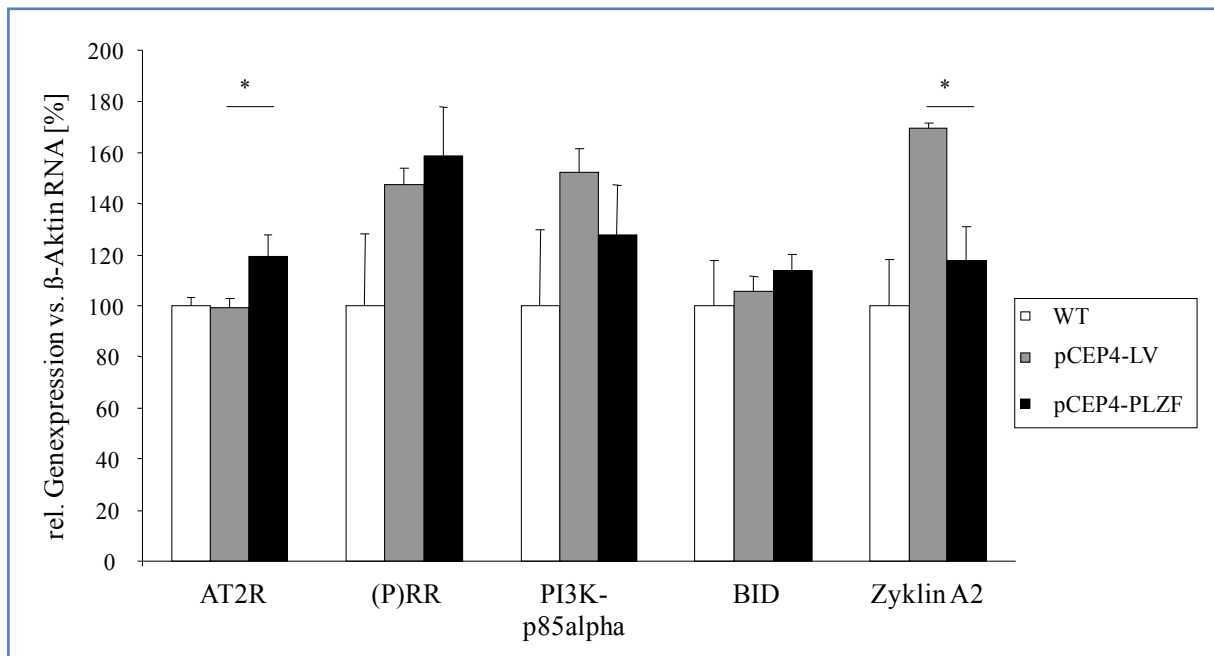


Abbildung 25: Graphische Darstellung der relativen Gen-mRNA Expression von KELLY-Zellen. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte \pm SEM in Prozent der auf β -Aktin normalisierten Expressionswert in Bezug zu KELLY-WT. KELLY-Wildtyp (WT), KELLY-pCEP4-Leervektor (pCEP4-LV), KELLY-pCEP4-PLZF-HA (pCEP4-PLZF), * $p < 0,05$ pCEP4-LV vs. pCEP4-PLZF.

4.3.6. Promotoraktivitätsuntersuchungen

4.2.6.1. AT2R-Promotor

Aus dem Abschnitt 4.3.5. zur Untersuchung des Einflusses einer PLZF-Überexpression auf die Expression bekannter Zielgene des Transkriptionsfaktors geht hervor, dass die AT2R-mRNA in den stabil-transfizierten KELLY-Zellen signifikant erhöht ist.

Die Nukleotidsequenz des AT2R-Promotors und der AT2R-Gensequenz von Exon 1, Intron 1 und Exon 2 (Abbildung 26) weist laut MatInspector-Analyse¹⁸³ zwei PLZF-bindende Motive auf (rot hinterlegt).

```

atagcttgaatagcacctaccatatgctaggcatgattttaggcactttaacatattagctcatttaatttccattagcttattaaaattc
actctacgatgtagtaatttatatcattctcctttctcagatgagaaactgagacatgaagaagtaaaactggccaaggtcagaa
agtaagtggtagagctgggtttgtaaagccaggtagttggatccagaggctatttactaaccagtgtctatattgcctctctatfaa
ttgatgataaataactcaccaggttcggcacataacatttattgtagctagtattactaccatcacctgttcttctcttctcattt
cactcttctctctgctggattggtgtgtagttattgccccactgccacaagagacagcagcaacagtgatctaggttgaatagctc
gaatccctcttctcattatgtgctttgatttaaacacaaatgatcacagacatgaaaggagactaaacctcttttggctgtgtaa
ttatattctgcaatctccaacctccagcaacaagccaaacaaaactgcgcaagcaaggagaaaatftagaagtggtagacttc
gtaaattctcaccattctttaataaacagggttaaaaatttcagaaaagtaataaggtgtgaaagctgatgaacaagaatttctac
aataaattctctagctctactcactaatttctattagaatgccaatatcaggaaaaaggaagagaaaattctgtaataaactatatt
tctaccaagtaagccactgactcaaaattctctagcacatttggaaacttcattttttgttgagattattgaatgagdggttatga
gagacagtgagaatttcagattaatgtttgcagacaaaaaaaacctctctggaagctggcaagggttcataagtcagccctaga:
atgtaggttgaaggctcccagtggaacagacaaacataataagaaggaaccagagatctggtgcttaccgtccagcgtctga
gaacgagtaagcacagaaltcaagcattctgcagcctgaatttgaaggaagtatgaacaatttatataaacttggaaagtag:
catacattaaatgaaaatattttatggatgaactctgttttctgtgttaaacctgtatttgcaaaactcctgaattattagctgctgt
tcttacaggagtgttttagcactaagcaagctgattatgataactgctttaaactcaacaacca
    
```

Abbildung 26: Nukleotidsequenz des AT2R-Promotors mit Exon 1, Intron 1 und Exon 2. Die Sequenz korrespondiert mit der GenBank accession Nr. GI:51477555. Rot: PLZF-bindende Motive; Gelb: Exon 1 des humanen AT2R; Hellblau: Exon 2; Grün: der von Reinemund et al.¹⁸⁴ beschriebene Transkriptionsstartpunkt; Fett und unterstrichen: TATA box. Die zwei von Warnecke et al.¹⁸⁵ identifizierten Startpunkte sind Fett und umrahmt dargestellt.

Die für die Promotoraktivitätsuntersuchungen verwendeten AT2R-Promotorkonstrukte wurden bereits bei Reinemund et al.¹⁸⁴ beschrieben.

Das [-1316]-Konstrukt beinhaltet beide PLZF-bindende Motive, die [-148]-, [-216]- und [-1100]-Konstrukte beinhalten ein PLZF-bindendes Motiv.

Um den Einfluss von PLZF auf die Promotoraktivität des AT2Rs zu untersuchen, wurden $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² auf eine 24-well Platte für 48 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden wie unter 3.10.2.3.1. beschrieben transfiziert und die Promotoraktivität 48 Stunden nach Transfektion gemessen. Für die KELLY-Wildtyp-Zellen wurden die Promotoraktivitäten der einzelnen AT2R-Promotorkonstrukte bereits beschrieben¹⁸⁴ und in dieser Arbeit konnte die Bedeutung der Exon 1-Intron 1-Region auf die Genregulation des AT2R bestätigt werden (Daten nicht dargestellt). Eine PLZF-Überexpression zeigte keinen Einfluss auf die Promotoraktivität der verwendeten AT2R-Promotorkonstrukte in KELLY-Zellen (Abbildung 27).

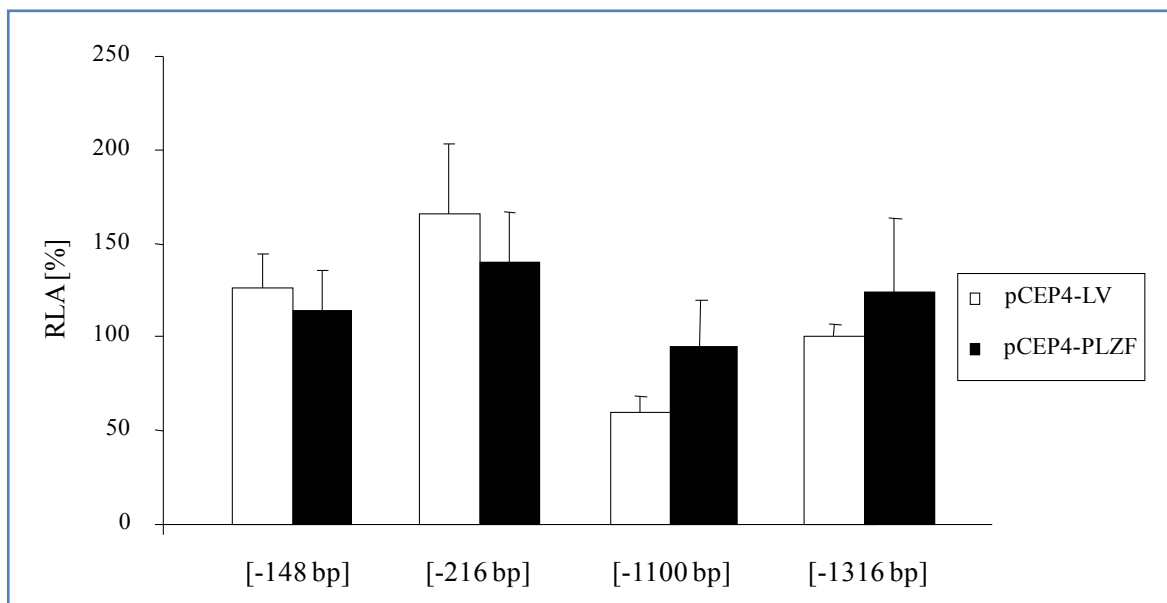


Abbildung 27: Graphische Darstellung der relativen Luziferaseaktivität (RLA) von KELLY-Zellen. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte \pm SEM in Prozent, normalisiert auf das AT2R-[-1316]-Konstrukt in KELLY-Wildtyp-Zellen (KELLY-WT).

4.2.6.2. (P)RR-Promotor und (P)RR-Polymorphismen

Durch vorrangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor PLZF als Suppressor auf den (P)RR-Wildtyp-Promotor in

der embryonalen Nierenzelllinie HEK293 und in H9c2-Zellen (Kardiomyoblasten der Ratte) wirkt. Weiterhin wurden in Bezug auf den (P)RR-Promotor zwei *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in der Literatur¹⁸⁶ beschrieben. Ein SNP an Position -884(A>G) (gelb markiert) und einer an Position -991(G>A) (violett markiert) realtiv zum Translationsstartpunkt (Abbildung 28).

```

cttaactacagtttcaactggaacaatctccccatctctatccttgatatgaatcattccacittcaaggatcatcagctggggcgtcat
tttctacctacagacgctatagtgtgcccttcttgcctcacatcataggcaaaagactatgaactgcgggagggaggagcctggctca
attactatgtctagcctcatacatctcataaacacctgcccagattggaaactgagtgaatggacaaattaagtaattaactttct
gtcccatgactcctttagattgaaagtctttggaggtagagttgccagacttagcgaatcaaaatagataccagttatattgaatt
tcagataaccagtaactcttttaataacaagtatgtccataaattaattgcgacataataacaataatcgttgtttacatgaattcaaat
taactggggcgcctgtattttatctggcaccactatgtggaaggcaggggttcccgttgcgcctggcttcttcccagtaggtgctcggc
gtctgtatactgttagagcgaaaccccaaccagccccgctttcacagctggcgtccgtagccggggcggaggcacacgaccaggaa
agacagacaccctggttgagaccgtcgtcgcgactggcagaaagatctgcactcgggagggcaccctcaccctggggctccggg
accctcgactagctccatcaccattccgactaccgacctacgtccacctctgacctgcatcaccgaccggggggcgggactg
cccgacttttcaatcgtcctaccattggtagaactctccatccgttacttaagtcccgcctatcaggctgctcctccaggttacgtcc
cttccgtaggccgcggcgtaaactggtgattggtggagaaagcggcagctgtcccagcgggaagcgcagaagggacgggaccggg
agcctggagcagtcggagcgcgtcacctcctcacgctgcggctgtcggcgtgtcccggcccggtccgtgtcggcccgagctg
tgccggccggcggcaccatg
    
```

Abbildung 28: Nukleotidsequenz des (P)RR-Promotors. Die Sequenz korrespondiert mit der GenBank accession GI:37546587. Rot: PLZF-bindende Motive; Grün: Transskriptionsstartpunkt; Violett: SNP an Position -991(G>A) Gelb: SNP an Position -884(A>G).

Um festzustellen, inwieweit die SNPs Einfluss auf die Promotoraktivität in KELLY-Wildtyp-Zellen und PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen haben, wurden $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² auf eine 24-well Platte für 48 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden wie unter 3.10.2.3.1. beschrieben mit dem (P)RR-Wildtyp-Promotor oder den SNP-Promotorkonstrukten transfiziert und die Promotoraktivität 48 Stunden nach Transfektion gemessen.

Hierbei zeigte sich, dass der SNP an Position -884(A>G) zu einer signifikanten Aktivierung des (P)RR-Promotors in KELLY-Wildtyp-Zellen führte und der

Nukleotidaustausch an Position -991(G>A) keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hat (Abbildung 29).

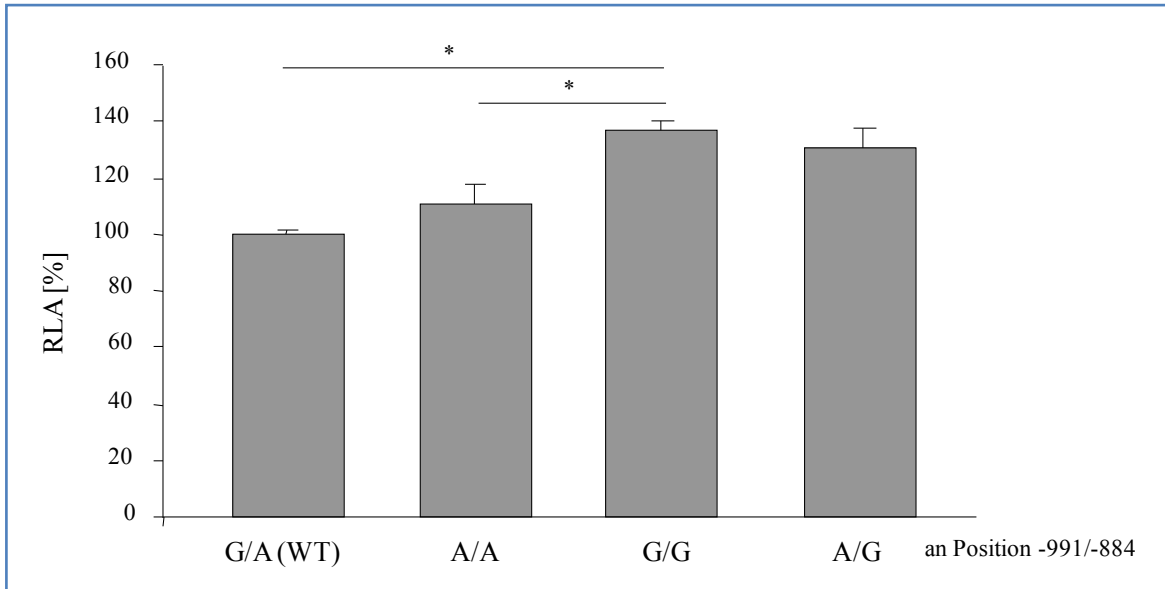


Abbildung 29: Graphische Darstellung der relativen Luziferaseaktivität (RLA) von KELLY-Wildtyp-Zellen. Dargestellt in Prozent, normalisiert auf (P)RR-Wildtyp-Promotor (G/A (WT)), * $p < 0,05$.

PLZF-Überexpression führte zu einer signifikanten Zunahme der Promotoraktivität der weniger häufig auftretenden Haplotypen. Es konnte jedoch keine Veränderung in der Promotoraktivität des (P)RR-Wildtyp-Promotors beobachtet werden. Im Unterschied zu den KELLY-Wildtyp-Zellen konnte in den KELLY-Leervektorkontrollen keine Aktivierung des (P)RR-Promotors mit dem SNP an Position -884(A>G) nachgewiesen werden (Abbildung 30).

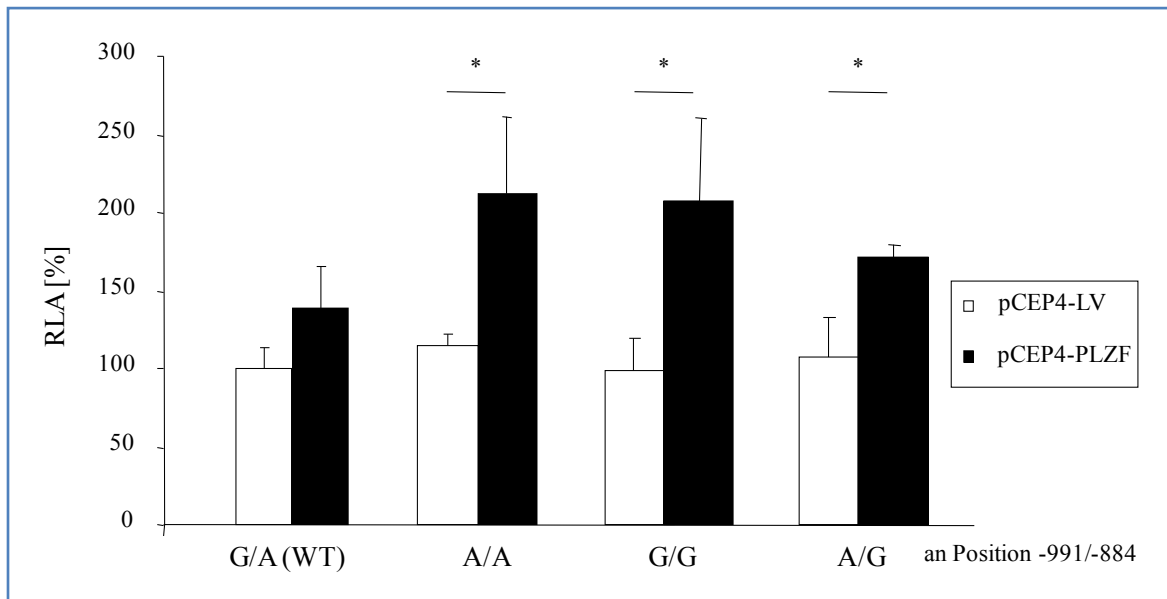


Abbildung 30: Graphische Darstellung der relativen Luziferaseaktivität (RLA) von KELLY-Zellen. Dargestellt in Prozent, normalisiert auf (P)RR-Wildtyp-Promotor (G/A (WT)) in KELLY-pCEP4-Leervektor, * $p < 0,05$ pCEP4-LV vs. pCEP4-PLZF.

Kapitel 5 Diskussion

Der Schlaganfall ist eine der häufigsten und bedeutendsten Erkrankungen, steht weltweit an zweiter Stelle der Todesursachen¹ und tritt häufig als Folge von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der arteriellen Hypertonie, auf^{42, 43}. Das Renin-Angiotensin-System (RAS) stellt ein wichtiges System des Körpers zur Regulation des Blutdruckes, der Flüssigkeitshomöostase und des *tissue remodelling* dar.

Vor wenigen Jahren wurde der Transkriptionsfaktor *promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF) als weitere Komponente im RAS identifiziert. PLZF kann als direkter Interaktionspartner die Signaltransduktion des AT2R⁹³, sowie des (P)RR¹⁷⁵ vermitteln. Beide Rezeptoren sind in die Differenzierung^{187, 188} und das Überleben^{128, 189} neuronaler Zellen involviert.

Studien zur Expression und Funktion von PLZF fokussierten sich bisher auf die fötale Entwicklung und Hämatopoese sowie überwiegend auf das Fusionsprotein PLZF-RAR, über die Expression und Bedeutung in der Pathophysiologie adulter neuronaler Zellen ist nahezu nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Transkriptionsfaktors PLZF in einem Glutamat-induziertem Toxizitätsmodell *in vitro* und *in vivo* im Schlaganfallmodell der Ratte untersucht werden.

5.1. Expressionsanalysen

Für die Untersuchung der Expression von PLZF und um eine geeignete Zelllinie für die *in vitro*-Experimente zu finden, wurden zunächst verschiedene humane Neuroblastoma- und Glioblastoma-Zelllinien, primäre embryonale Neuronen und postnatale gliale Zellen aus Rattenhirnen und einzelne Bereiche adulter Rattenhirne analysiert.

In den murinen Hirnbereichen (Frontalkortex, Parietalkortex, Hippocampus, Hypothalamus, Striatum und Amygdala) konnte sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene eine Expression der untersuchten Komponenten des PLZF-AT2R-(P)RR-Signalweges nachgewiesen werden. Im Unterschied zu einer ubiquitären Expression von PLZF im Rattenhirn, exprimieren nur die humane Neuroblastoma-Zelllinie KELLY und die primären murinen Zellen PLZF. Alle weiteren untersuchten Komponenten des

PLZF-AT2R-(P)RR-Signalweges waren ebenfalls auf mRNA- und Proteinebene in den KELLY-Zellen nachweisbar.

Die offensichtliche Expression des AT1R und AT2R in verschiedenen humanen Zelllinien in der Abwesenheit einer nachweisbaren mRNA-Expression (Tabelle 1) könnte folgendermaßen erklärt werden. Es hat sich bei der Arbeit an Zellkulturen, die den AT2-Rezeptor exprimieren, gezeigt, dass die Kulturbedingungen die Expression des Rezeptors stark beeinflussen^{190, 191}. So ist die Rezeptordichte in proliferierenden Zellen nur sehr gering, kommen die Zellen aber in ein konfluentes Stadium, so wird die Expression des Rezeptors aktiviert und die Rezeptordichte nimmt rapide zu¹⁹². Bei einigen Zelllinien ist sie auch von der Passagenzahl der Zellen abhängig¹⁹³. Weitere Erklärungen für die Diskrepanz zwischen dem Nachweis einer Proteinexpression ohne nachweisbare mRNA-Expression wären eine geringe Stabilität der mRNA oder eine mögliche Unspezifität der Antikörper. Die letzteren Argumente lassen sich auch für den AT1R anführen. Es konnte ebenfalls ein Unterschied im Molekulargewicht der detektierten AT2R-Proteinbanden zwischen humanen Zelllinien und murinen Gewebeproben beobachtet werden, die auf die unterschiedliche Herkunft des Proteinmaterials zurückzuführen sind. Es scheint unter Zellkulturbedingungen zu einer Veränderung der posttranslationalen Modifikation des AT2R-Proteins zu kommen, da in den Proteinextrakten der ursprünglich aus Ratten isolierten Neuronen und Gliazellen und unter Zellkulturbedingungen weiter kultivierter Zellen, sowohl die AT2R-Proteinbande auf Höhe der Gewebeproben, als auch auf Höhe der Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Servant et al.^{194, 195} haben gezeigt, dass das Molekulargewicht des AT2R in Abhängigkeit seines Glykosylierungsgrades stark differiert.

5.2. *In vivo*-Untersuchungen

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors PLZF *in vivo* zu untersuchen und zu analysieren, wurde für diese Arbeit ein etabliertes Modell für die Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie verwendet. Dazu wurden Ratten einem als *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) bezeichneten Eingriff unterzogen. Mittels MRT konnten die Folgen der Ischämie dargestellt und die erfolgreiche Induktion kontrolliert werden. Für die Auswertung wurden nur Tiere mit einem eindeutig ischämischen Hirninfarkt analysiert. Um den zeitlichen

Einfluss auf die Expression von mRNA und Proteinen nach einer MCAO detaillierter untersuchen zu können, wurde eine Gruppe der Tiere zum Zeitpunkt 24 Stunden und eine andere Gruppe zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MCAO mittels MRT untersucht, wobei auch Proben für die sich anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen gewonnen wurden. Wie unsere Validierung durch Makroskopie und MRT zeigten, beschränkte sich der induzierte Schlaganfall bei dieser Methode auf nur eine Hirnhälfte (ipsilateral), während die andere Hirnhälfte (kontralateral) kein ischämisches Gewebe aufwies. Die Trennung von ipsilateraler und kontralateraler Hirnhälfte war erforderlich, um eine Vermischung von ischämischem und gesundem Gewebe zu verhindern. Die Notwendigkeit zur Einteilung der Gruppen in schein-schein-, schein- und MCAO-behandelte Tiere ergibt sich aus der Operationstechnik. Wie unter 3.10.1. beschrieben, wird bei der MCAO-OP die *Arteria carotis communis* (ACC) und die *Arteria carotis externa* (ACE) ligiert und durch eine Eröffnung der ACC ein Monofilament in die *Arteria carotis interna* (ACI) eingeführt. Bei der Schein-OP erfolgt ebenfalls die Ligation der Gefäße ohne Eröffnung der ACC und ohne Einbringung des Fadens, während bei den schein-schein-operierten Tieren auch auf die Ligation der Gefäße verzichtet wurde. Der Vergleich zwischen Schein-Schein- und Schein-OP sollte den möglichen Einfluss der Ligationen berücksichtigen.

Eine molekularbiologische Methode zur Kontrolle für die Induktion der fokalen zerebralen Ischämie und zur Kontrolle der Beschränkung des Infarktes auf nur eine Hirnhälfte ist der Nachweis einer vermehrten Expression von Interleukin (IL)-6^{196, 197} sowie Zyklin D1¹⁹⁸. Wie in der Einleitung beschrieben, konnte nach einer Schädigung von Hirngewebe durch Trauma oder Ischämie eine Zellzyklus-Aktivierung beobachtet werden. Diese Aktivierung resultiert unter anderem aus einer vermehrten Expression Zellzyklus-assoziiierter Proteine, wie z.B. Zyklin D1 und CDK2. Das kann in post-mitotischen, ausdifferenzierten Neuronen den Zelltod induzieren¹⁹⁸⁻²⁰⁰.

Wie durch *real-time* PCR Versuche gezeigt werden konnte (Tabelle 9, Tabelle 10), führt die Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie nach 24 und 48 Stunden auf der ipsilateralen Hirnseite der MCAO-behandelten Tiere zu einer signifikant vermehrten mRNA-Expression der Kontrollgene Zyklin D1 und IL-6, sowie auch von Zyklin A2, einem der wenigen bis heute bekannten Zielgene des in dieser Arbeit im Mittelpunkt der Untersuchungen stehenden Transkriptionsfaktors PLZF. Ein weiteres PLZF-Zielgen, das

pro-apoptotische Protein BID¹⁷⁴ wird genau wie Zyklin A2 auf mRNA-Ebene signifikant hochreguliert.

Die *real-time* PCR Analyse des Transkriptionsfaktors *per se* zeigte zum Zeitpunkt 24 Stunden nach MCAO in der ipsilateralen Hirnseite von MCAO-behandelten Tieren im Vergleich zur kontralateralen Seite und im Vergleich zu schein-schein- und schein-operierten Ratten eine signifikante Herunterregulation von PLZF auf mRNA-Ebene. Auf Proteinebene war die signifikant verminderte ipsilaterale PLZF-Expression im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre nach 48 Stunden zu beobachten (Abbildung 15). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen ipsi- und kontralateraler Hirnseite 24 und 48 Stunden nach MCAO in den schein-schein- und schein-operierten Tieren beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung für die stark verminderte Expression des PLZF-Proteins zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MCAO liefert die Arbeit von Costoya et al.¹⁷⁶. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass CDK2, welches nach Schädigung von Hirngewebe aufgrund einer Ischämie vermehrt exprimiert wird²⁰⁰, PLZF phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zur Ubiquitinierung und anschließenden Degradierung des Transkriptionsfaktors.

Die Funktion eines Transkriptionsfaktors als transkriptioneller Aktivator oder Repressor ist nicht ausschließlich von der Expression, sondern vor allem von der zellulären Lokalisation abhängig. Zur Untersuchung der PLZF-Lokalisation wurden jeweils von der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre von schein- und MCAO-operierten Ratten eine fraktionierte Proteinisolation zur Trennung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen durchgeführt.

Bei der Analyse der PLZF-Expression aus Gesamtproteinlysaten konnte 24 Stunden nach OP kein Unterschied in den beiden Tiergruppen beobachtet werden (Abbildung 14). Interessanterweise wurde jedoch eine verminderte Expression von PLZF in der nukleären Proteinfraction der ipsilateralen Hirnseite von MCAO-operierten Ratten im Vergleich zu schein-operierten Tieren nachgewiesen. In der kontralateralen Hirnseite wurde 24 Stunden nach MCAO kein Unterschied zwischen schein- und MCAO-behandelte Ratten nachgewiesen. Es wurden auch keine Unterschiede zwischen zytoplasmatischer Fraktion und nukleärer Fraktion im Vergleich zwischen der ipsilateralen Seite und kontralateralen Seite beobachtet. Nach 48 Stunden konnte ebenfalls eine verminderte Expression von PLZF in der nukleären Proteinfraction der ipsilateralen Hirnseite von MCAO-operierten

Ratten im Vergleich zu schein-operierten Tieren und eine verminderte PLZF-Expression in der nukleären Fraktion auf der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich zur kontralateralen Seite nachgewiesen werden. Überraschenderweise wurden auch Unterschiede in der Expression des zytoplasmatisch lokalisierten Transkriptionsfaktors auf der kontralateralen Seite zwischen Schein-OP und MCAO und zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre bei den schein-operierten Ratten beobachtet (Abbildung 17). Die Ergebnisse der fraktionierten Proteinisolation sind jedoch kritisch zu betrachten, da Unterschiede auf der kontralateralen Seite zwischen schein- und MCAO-operierten Tieren nachweisbar waren und die Effektivität mit der zytoplasmatische und nukleäre Proteine isoliert wurden unterschiedlich sein kann.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die MCAO-OP zu einer verminderten PLZF-Expression in der ischämischen Hirnseite, jedoch zu keiner Veränderung in der subzellulären Lokalisation führt.

In allen *Western blots*, in denen Gesamtprotein analysiert wurde (Abbildung 14, Abbildung 15), konnte eine zusätzliche Bande in den Proteinproben, welche aus der ipsilateralen Hirnseite MCAO-behandelter Tiere isoliert wurden, detektiert werden. Vergleicht man die Laufhöhe der vorherrschenden 74 kDa PLZF-Bande mit der zusätzlich auftretenden Bande in der Gelelektrophorese, könnte es sich dabei wahrscheinlich um die bereits in der Einleitung erwähnte 61 kDa große PLZFA-Isoform handeln¹⁵⁷, die bis jetzt aber nur theoretisch für das humane PLZF-Protein beschrieben worden ist. Diese Isoform entsteht laut UniProt-Datenbank¹⁵⁷ durch alternatives Spleißen im Exon 1 der PLZF-mRNA, wodurch ein verkürztes PLZF-Protein gebildet wird, bei dem die Aminosäuren 255-377 fehlen. Ein Vergleich der Proteinsequenz des humanen PLZF mit der aus der Spezies *Rattus norvegicus* ergibt eine 96 % Übereinstimmung.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der zusätzlichen Bande um eine PLZFA-Isoform bei der Ratte handeln könnte, wurde die mRNA, welche aus den ipsilateralen Hemisphären von schein-schein-, schein- und MCAO-behandelten Ratten isoliert wurden, mittels RT-PCR-Analyse untersucht. Für die PCR wurden spezifische, die mRNA-Sequenz von AS 255-377 flankierende Oligonukleotide (Primer) verwendet. Die gewählten Primer ergaben im Falle des 74 kDa PLZF-Proteins ein ~500 bp großes Fragment und für die PLZFA-Isoform ein 125 bp großes Fragment. Überraschenderweise konnte in allen 3 Tiergruppen nur das längere ~500 bp PCR-Fragment detektiert werden. Die spezifisch, nur auf der ipsilateralen Hirnseite MCAO-behandelter Tiere begrenzt auftretende Bande blieb somit weiter

unidentifiziert. Dies bedarf weiterer Klärung, z.B. durch RT-PCR-Analyse der gesamten PLZF-mRNA Sequenz und zusätzlich durch proteomanalytische Verfahren wie z.B. 2D-Gelelektrophorese mit anschließender Massenspektrometrie. Die Möglichkeiten einer Veränderung in der posttranslationalen Modifikation oder eines Degradationsproduktes von PLZF aufgrund apoptotischer Prozesse sollte ebenfalls mitberücksichtigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der PLZF-Expression auch die Expression des AT2R untersucht, da Senbonmatsu et al.⁹³ diesen Rezeptor als ein Adaptorprotein des Transkriptionsfaktors PLZF identifiziert haben. In verschiedenen Arbeiten konnte nach Induktion einer zerebralen Ischämie im Tiermodell eine Hochregulation des AT2R^{138, 139} und nach Blockierung des AT1R eine Verbesserung der neurologischen Schäden^{126-129, 133, 136} beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde keine erhöhte Expression der AT2R-mRNA und/oder des AT2R-Proteins beobachtet. Im Gegensatz zu den anderen Arbeiten wurde 48 Stunden nach MCAO eine verminderte AT2R-mRNA detektiert (Abbildung 15). Auf Proteinebene war eine signifikante Herabregulation im Vergleich der ipsilateralen Hirnhälfte von Schein-OP Tieren zu MCAO-behandelten Tieren nachweisbar, und eine nicht-signifikante ($p = 0,06$) verminderte Expression wurde im Vergleich der ipsilateralen Seite zu der kontralateralen Seite MCAO-behandelter Tiere beobachtet. Diese Unterschiede verglichen mit anderen Arbeiten lassen sich mit der Art der Okklusion und den Zeitpunkten und untersuchten Hirnbereichen begründen. Bei Zhy et al.¹³⁹ erfolgte die Induktion der Ischämie über eine permanente Okklusion und bei Makino et al.¹³⁸ konnte eine gesteigerte Expression der AT2R-mRNA im Kortex und Hippocampus zum Zeitpunkt 3 Stunden, aber nicht 24 Stunden nach MCAO beobachtet werden.

Vergleicht man diese *in vivo*-Ergebnisse mit der eingangs dieser Arbeit aufgestellten Hypothese, dass der Transkriptionsfaktor PLZF neuroprotektive Effekte vermittelt, so wird man feststellen, dass PLZF wahrscheinlich der schädigenden Aktivierung von Zyklinen und dem sich daraus resultierenden neuronalen Zelltod entgegenwirken kann und dass dieser protektive Mechanismus während der Ischämie inaktiviert ist aufgrund der signifikant verminderten PLZF-Expression auf Proteinebene. Hinsichtlich des neuroprotektiven Effektes von PLZF sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, beispielsweise eine Behandlung mit ARBs, welche die neurologischen Schäden verringern. Inwieweit diese Behandlung die PLZF-Expression im *in vivo*-Modell beeinflusst und wie sich die Behandlung mit Dexamethason auswirkt, da in einer früheren Arbeit²⁰¹ gezeigt

wurde, dass Dexamethason in der Brustkrebszelllinie T47D/A1-2 die PLZF-Expression stimuliert, ist in weiteren Untersuchungen zu klären. Weiterhin sollten das Infarkt volumen und die neurologischen Defizite nach MCAO in PLZF^{-/-} Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren untersucht werden.

5.3. *In vitro*-Untersuchungen

Die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor PLZF nach MCAO vermindert exprimiert wird, was die Notwendigkeit unterstreicht, eine gesteigerte Expression von PLZF im neuronalen Kontext zu untersuchen, um die Hypothese einer PLZF-vermittelten Neuroprotektion prüfen zu können.

Im Anschluss an die unter 4.1. und 5.1. beschriebenen Expressionsanalysen wurde eine stabil PLZF-überexprimierende KELLY-Zelllinie generiert. Hierfür wurde der vollständige Leserahmen des PLZF (GenBank GI:31543978) in den Expressionsvektor pCEP4^{202, 203} subkloniert. Der Vektor (Abbildung 18) enthält ein Hygromycin B-Resistenzgen zur Selektion der transfizierten Zellen und ist ein episomal replizierender Vektor für die Genexpression in eukaryontischen Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promoters, dafür über OriP/EBNA1 (origin of replication) als Episom repliziert werden kann. Die Entscheidung KELLY-Zellen für die stabile Überexpression zu verwenden, lässt sich wie folgt begründen. KELLY-Zellen exprimieren *per se* den Transkriptionsfaktor PLZF auf mRNA- und Proteinebene, woraus geschlussfolgert wurde, dass auch alle bzw. die meisten Adapterproteine und im PLZF-Signalweg involvierte Proteine in dieser Zelllinie exprimiert werden. Als Kontrolle für die Experimente wurde eine KELLY-Zelllinie, in welche nur der pCEP4-Vektor ohne PLZF-*insert* transfiziert wurde verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei stabil PLZF-überexprimierende KELLY-Zelllinien generiert und die Überexpression im Verlauf mittels *real-time* PCR und *Western blot* kontrolliert (Abbildung 19). Da es sich bei PLZF um einen Transkriptionsfaktor handelt, ist nicht alleine die Überexpression von entscheidender Bedeutung, sondern auch die zelluläre Lokalisation. Bisher ist das PLZF-Protein nach Transfektion in Zelllinien nur mittels Immunfluoreszenz in distinkten punktuellen Ansammlungen im Zellkern nachgewiesen worden¹⁵⁹. In der hier vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe einer fraktionierten Proteinisolation und sich anschließender *Western blot* Analyse gezeigt werden, dass das

überexprimierte PLZF-Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachweisbar ist (Abbildung 20).

Es ist bekannt, dass in einer Vielzahl von Zellkulturmodellen eine PLZF-Expression und Überexpression zu einer Unterdrückung des Zellwachstums führt und diese anti-proliferative Wirkung mit der Bindung an den Zyklin A2-Promotor^{146, 154, 166} und der Repression des Zyklin A2-Genes in Zusammenhang steht bei gleichzeitigem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase und daraus resultierender Apoptose¹⁶⁴. Weiterhin scheint PLZF ein wichtiger Modulator von Differenzierungsvorgängen in verschiedenen Geweben und Zelltypen zu sein, wie z.B. im Gehirn, in den Extremitätenanlagen oder den blutbildenden Zellen^{140, 161-163}. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine PLZF-Überexpression die Differenzierung und Proliferation von KELLY-Zellen beeinflusst, jedoch keine Apoptose induziert (Abbildung 23). Die unter Standardbedingungen spindelförmige Morphologie mit pseudopodienartigen Ausläufern der KELLY-Zellen veränderte sich unter PLZF-Überexpression in eine überwiegende runde bis ovale Zellform, die der von undifferenzierten Zellen ähnelt (Abbildung 21). Die signifikante Verminderung der Zellzahl in den PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen im Vergleich zu den Leervektorkontrollzellen und untransfizierten KELLY-Zellen ist fast ausschließlich auf eine verminderte Proliferation zurückzuführen. Es konnte keine gesteigerte Kaspase 3/7-Aktivität in den PLZF-transfizierten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten KELLY-Zellen beobachtet werden. Überraschenderweise wurde in den Leervektorkontrollzellen, welche in Zellzahl und der Proliferationsrate den untransfizierten KELLY-Zellen gleichen, eine gesteigerte Aktivität der Kaspasen 3 und 7 nachgewiesen. Eine gesteigerte Kaspase 3/7-Aktivität bedeutet nicht gleichzeitig auch den Zelltod. Letzteres ist durch Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen zum Thema nicht-apoptotische Funktion von Kaspasen wie z.B. Proliferation^{204, 205} und Differenzierung²⁰⁶⁻²⁰⁸ zu erklären. So beobachteten Hashimoto et al.²⁰⁵ eine Aktivierung verschiedener Kaspasen, unter anderem auch der Kaspase 7 von der späten G1- bis zur M-Phase in HepG2-Zellen. Eine Inhibierung von Kaspase 7 durch siRNA führt in diesen Zellen zu einem Zellzyklus-Arrest in der Mitose und Hemmung der Proliferation. Es ist bekannt, dass Kaspase 3-abhängige Differenzierung von neuronalen Stammzellen auf der Aktivierung von spezifischen Kinasen wie der p21-aktivierten Kinase1 (PAK1)²⁰⁷ beruht und das für die terminale Differenzierung von Muskelzellen ein Fehlen von Kaspase 3 zu einer verminderten p21-Expression führt²⁰⁹.

Weiterführende Untersuchungen der stabil PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen befassten sich mit dem Expressionsprofil bisher bekannter Kandidatenzielgene von PLZF (Abbildung 25). Es handelt sich dabei um das schon erwähnte Zyklin A2 - eine wichtige Komponente der Zellzyklusmaschinerie -, BID - ein pro-apoptotisches Protein -, den (P)RR und AT2R und das Gen, welches für die p85 α -Untereinheit der PI3-Kinase kodiert^{93, 166, 174, 175}. Die *real-time*-Analyse ergab eine signifikant verminderte Zyklin A2-mRNA und eine gesteigerte AT2R-mRNA Expression in den PLZF-überexprimierenden Zellen. Das Ergebnis der Zyklin A2-Analyse ist erklärend für die verminderte Zellzahl und Proliferation. Promotoranalysen des AT2Rs, welcher neuroprotektive¹³¹ und anti-proliferative⁵⁸ Effekte vermittelt, ergaben entsprechend MatInspector¹⁸³ zwei PLZF-bindende Motive und somit eine mögliche Erklärung für die Aktivierung der AT2R-Expression durch PLZF (Abbildung 26). In Reporter-genversuchen mit unterschiedlichen AT2R-Promotorkonstrukten, die bereits durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben worden sind¹⁸⁴, konnte jedoch für kein Konstrukt eine signifikante Aktivierung des AT2R-Promotors durch eine PLZF-Überexpression beobachtet werden (Abbildung 27). Der Nachweis einer vermehrten AT2R-mRNA ohne Aktivierung des AT2R-Promotors könnte in der Regulation der mRNA-Stabilität begründet sein oder aber auf komplexere Effekte im Chromatinkontext hinweisen. Zur Klärung dieser Frage bietet sich die Durchführung eines *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) an, um die Bindung des Transkriptionsfaktors PLZF an die zwei PLZF-bindenden Motive innerhalb des AT2R-Promotors genauer zu untersuchen. Vorarbeiten für dieses Experiment wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits mit der Generierung von Kernextrakten aus PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen und Oligonukleotiden für die beiden PLZF-Bindungsmotive realisiert. Hinsichtlich der Expression des (P)RR und der p85 α -Untereinheit der PI3-Kinase weisen vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe darauf hin, dass eine transiente Kotransfektion von PLZF und (P)RR in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 eine Repression des (P)RR-Gens und eine Aktivierung des Gens, welches für die p85 α -Untereinheit der PI3-Kinase kodiert, vermittelt¹⁷⁵. In KELLY-Zellen konnte keine Repression der (P)RR-mRNA und keine Aktivierung der mRNA-Expression der p85 α -Untereinheit der PI3-Kinase durch PLZF-Überexpression beobachtet werden (Abbildung 25). Auch auf die Promotoraktivität des (P)RR-Wildtyp-Promotors hat in stabil PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen keinen Einfluss. Interessanterweise konnte in Reporter-genversuchen mit verschiedenen u. a. in der

Literatur¹⁸⁶ beschriebenen *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) des (P)RR gezeigt werden, dass in KELLY-Wildtyp-Zellen das seltenere G-Allel an Position -884 relativ zum Translationsstartpunkt zu einer signifikanten Aktivierung des (P)RR-Promotors führt (Abbildung 29) und dieser SNP in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit mit Hypertonie bei männlichen Japanern assoziiert ist¹⁸⁶. In der Arbeit von Hirose et al.¹⁸⁶ wurde gezeigt, dass das -884G-Allel mit einem signifikant höheren systolischen und diastolischen 24 Stunden-Blutdruck verbunden ist. In den PLZF-transfizierten Zellen erfolgt in allen Haplotypen außer beim Wildtyp eine Aktivierung des (P)RR-Promotors (Abbildung 30). Ob und in welchem Ausmaß diese Polymorphismen, insbesondere derjenige an Position -884(A>G), eine Bedeutung in der Neuroprotektion haben, muss in weiteren Studien analysiert werden.

Zur Untermauerung der Hypothese, dass PLZF einen neuroprotektiven Effekt besitzt, wurde *in vitro* in einem Glutamat-induzierten Toxizitätsmodell die Überlebensrate von PLZF-überexprimierenden KELLY-Zellen und Leervektorkontrollen bestimmt (Abbildung 24).

Die normale extrazelluläre Glutamatkonzentration liegt im mikromolaren Bereich (1-3 μM), während intrazellulär millimolare Konzentrationen (10-100 mM)²¹⁰ vorliegen. Eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration ist neurotoxisch und führt zum Untergang von Neuronen²¹¹⁻²¹³. Dies wird als Exzitotoxizität bezeichnet und stellt wie in der Einleitung beschrieben die erste Phase der ischämischen Schadenskaskade dar²². In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine signifikant höhere Zellzahl in den PLZF-transfizierten Zellen nach Inkubation mit 100 mM Glutamat beobachtet wurde. Bei der Verwendung von geringeren Glutamatkonzentrationen (10-75 mM) zeigte eine PLZF-Überexpression keine neuroprotektiven Effekte. Generell ist die Verwendung von Krebszellen für Experimente zur Untersuchung des Zellzyklus und Neuroprotektion problematisch, da bei diesen Zellen wichtige Regulationsproteine zum Teil nicht funktionell exprimiert werden und sie auch in ihren Signalwegen sehr stark verändert sind. Somit sollten die Ergebnisse aus den *in vitro*-Versuchen, durchgeführt in der KELLY-Zelllinie, in neuronalen und glialen Primärzellen, die in ihren Signalwegen nicht verändert sind, verifiziert werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor PLZF ein möglicher Regulator in pathophysiologischen Vorgängen

bei der fokalen zerebralen Ischämie *in vivo* ist, da PLZF *in vitro* in einem glutamat-induzierten Toxizitätsmodell neuroprotektiven Effekte vermittelt.

Kapitel 6 Literaturverzeichnis

- (1) Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997 May 3;349(9061):1269-76.
- (2) Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997 May 24;349(9064):1498-504.
- (3) StBA-Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2005 für die Bundesrepublik Deutschland. 2005.
- (4) Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU. [Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2002 December;70(12):657-62.
- (5) Wiesner G, Grimm J., Bittner E. Schlaganfall: Prävalenz, Inzidenz, Trend, Ost-West-Vergleich. Erste Ergebnisse Aus Dem Bundes-Gesundheitssurvey 1998. *Gesundheitswesen* 1999;79-84.
- (6) Ward A, Payne KA, Caro JJ, Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL. Care needs and economic consequences after acute ischemic stroke: the Erlangen Stroke Project. *Eur J Neurol* 2005 April;12(4):264-7.
- (7) Rothwell PM, Coull AJ, Giles MF, Howard SC, Silver LE, Bull LM, Gutnikov SA, Edwards P, Mant D, Sackley CM, Farmer A, Sandercock PA, Dennis MS, Warlow CP, Bamford JM, Anslow P. Change in stroke incidence, mortality, case-fatality, severity, and risk factors in Oxfordshire, UK from 1981 to 2004 (Oxford Vascular Study). *Lancet* 2004 June 12;363(9425):1925-33.
- (8) Bonita R, Mendis S, Truelsen T, Bogousslavsky J, Toole J, Yatsu F. The global stroke initiative. *Lancet Neurol* 2004 July;3(7):391-3.
- (9) Bonita R. The Coming Epidemic. *Lancet* 1998;352 (Supplement 4).
- (10) Aho K, Harmsen P, Hatano S, Marquardsen J, Smirnov VE, Strasser T. Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study. *Bull World Health Organ* 1980;58(1):113-30.
- (11) Patt S & Homepage of Prof.S.Patt. Vorlesungsskript, Friedrich Schiller Universität Jena <https://www.med.uni-jena.de/patho/patt/vorl3/vorl.htm>. 2005.
Ref Type: Internet Communication
- (12) Zwiener U, Ludin H-P, Petsche H. *Neuropathophysiologie*. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1990.
- (13) FISHER M. Occlusion of the internal carotid artery. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 1951 March;65(3):346-77.

- (14) Victor M, Ropper AH. *Principles of Neurology*. New York: 2001.
- (15) Greenberg SM, Rebeck GW, Vonsattel JP, Gomez-Isla T, Hyman BT. Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1995 August;38(2):254-9.
- (16) Greenberg SM, Vonsattel JP, Segal AZ, Chiu RI, Clatworthy AE, Liao A, Hyman BT, Rebeck GW. Association of apolipoprotein E epsilon2 and vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 1998 April;50(4):961-5.
- (17) Alberts MJ, Davis JP, Graffagnino C, McClenny C, DeLong D, Granger C, Herbstreith MH, Boteva K, Marchuk DA, Roses AD. Endoglin gene polymorphism as a risk factor for sporadic intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol* 1997 May;41(5):683-6.
- (18) Koizumi S, Togo T, Hamada Y, Sadahiro M. [A technique for the enlargement of the small aortic annulus during valve replacement]. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1986 October;34(10):1790-4.
- (19) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989 January;20(1):84-91.
- (20) Goldberg MP, Choi DW. Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose. *Stroke* 1990 November;21(11 Suppl):III75-III77.
- (21) Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 1993 August;13(8):3510-24.
- (22) Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999 September;22(9):391-7.
- (23) Katsura K, Kristian T, Siesjo BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 1994 November;22(4):991-6.
- (24) Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 1997 December 26;91(7):917-25.
- (25) Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1997 November 1;17(21):8178-86.
- (26) Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 1981 November;12(6):723-5.
- (27) Cernak I, Stoica B, Byrnes KR, Di GS, Faden AI. Role of the cell cycle in the pathobiology of central nervous system trauma. *Cell Cycle* 2005 September;4(9):1286-93.

- (28) Di GS, Knobloch SM, Brandoli C, Aden SA, Hoffman EP, Faden AI. Gene profiling in spinal cord injury shows role of cell cycle in neuronal death. *Ann Neurol* 2003 April;53(4):454-68.
- (29) Greene LA, Biswas SC, Liu DX. Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell Death Differ* 2004 January;11(1):49-60.
- (30) Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Itoyama Y. DNA fragmentation precedes aberrant expression of cell cycle-related protein in rat brain after MCA occlusion. *Neurol Res* 1999 October;21(7):695-8.
- (31) Kato H, Takahashi A, Itoyama Y. Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull* 2003 May 15;60(3):215-21.
- (32) Kaya SS, Mahmood A, Li Y, Yavuz E, Goksel M, Chopp M. Apoptosis and expression of p53 response proteins and cyclin D1 after cortical impact in rat brain. *Brain Res* 1999 February 6;818(1):23-33.
- (33) Kruman II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest FJ, Emokpae R, Jr., Gorospe M, Mattson MP. Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 2004 February 19;41(4):549-61.
- (34) Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003 April;27(2):267-82.
- (35) Otsuka Y, Tanaka T, Uchida D, Noguchi Y, Saeki N, Saito Y, Tatsuno I. Roles of cyclin-dependent kinase 4 and p53 in neuronal cell death induced by doxorubicin on cerebellar granule neurons in mouse. *Neurosci Lett* 2004 July 29;365(3):180-5.
- (36) Park DS, Obeidat A, Giovanni A, Greene LA. Cell cycle regulators in neuronal death evoked by excitotoxic stress: implications for neurodegeneration and its treatment. *Neurobiol Aging* 2000 November;21(6):771-81.
- (37) Strazza M, Luddi A, Brogi A, Carbone M, Riccio M, Santi S, Melli M, Costantino-Ceccarini E. Activation of cell cycle regulatory proteins in the apoptosis of terminally differentiated oligodendrocytes. *Neurochem Res* 2004 May;29(5):923-31.
- (38) Wen Y, Yang S, Liu R, Brun-Zinkernagel AM, Koulen P, Simpkins JW. Transient cerebral ischemia induces aberrant neuronal cell cycle re-entry and Alzheimer's disease-like tauopathy in female rats. *J Biol Chem* 2004 May 21;279(21):22684-92.
- (39) Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet* 2001 September 29;358(9287):1033-41.
- (40) Willich SN, Löwel H, Mey W, Trautner C. Regionale Unterschiede der Herz-Kreislauf-Mortalität in Deutschland. *Dt Arztebl* 1999;96(8):A483-8.

- (41) Mortality after 10 1/2 years for hypertensive participants in the multiple risk factor intervention trial. *Circulation* 1999;100:354-60.
- (42) MacMahon S. Blood pressure reduction and the prevention of stroke. *J Hypertens Suppl* 1991 December;9(7):S7-S10.
- (43) Staessen JA, Kuznetsova T, Stolarz K. Hypertension prevalence and stroke mortality across populations. *JAMA* 2003 May 14;289(18):2420-2.
- (44) de Gasparo M., Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000 September;52(3):415-72.
- (45) Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003 June;144(6):2179-83.
- (46) Piepho RW, Beal J. An overview of antihypertensive therapy in the 20th century. *J Clin Pharmacol* 2000 September;40(9):967-77.
- (47) Danser AH, Batenburg WW, van Esch JH, Krop M. Prorenin anno 2008. *J Mol Med* 2008 June;86(6):655-8.
- (48) Reudelhuber TL, Ramla D, Chiu L, Mercure C, Seidah NG. Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. *Kidney Int* 1994 December;46(6):1522-4.
- (49) Neves FA, Duncan KG, Baxter JD. Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension* 1996 March;27(3 Pt 2):514-7.
- (50) SKEGGS LT, Jr., KAHN JR, SHUMWAY NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 1956 March 1;103(3):295-9.
- (51) Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000 September 1;87(5):E1-E9.
- (52) Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000 October 27;275(43):33238-43.
- (53) Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de B, I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 July 8;100(14):8258-63.
- (54) Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007 March;16(2):122-8.

- (55) Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002 June;109(11):1417-27.
- (56) Berk BC. Angiotensin type 2 receptor (AT2R): a challenging twin. *Sci STKE* 2003 May 6;2003(181):E16.
- (57) Brechler V, Jones PW, Levens NR, de GM, Bottari SP. Agonistic and antagonistic properties of angiotensin analogs at the AT2 receptor in PC12W cells. *Regul Pept* 1993 March 19;44(2):207-13.
- (58) Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995 February;95(2):651-7.
- (59) Paquet JL, Baudouin-Legros M, Brunelle G, Meyer P. Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1990 June;8(6):565-72.
- (60) Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 1990 August;259(2 Pt 2):H610-H618.
- (61) Paradis P, li-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 January 18;97(2):931-6.
- (62) Burns KD, Li N. The role of angiotensin II-stimulated renal tubular transport in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003 April;5(2):165-71.
- (63) Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, Mangmool S, Urayama K, Nagamatsu Y, Takagahara S, Turner JH, Kozasa T, Kobayashi H, Sato Y, Kawanishi T, Inoue R, Nagao T, Kurose H. G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2005 May 6;280(18):18434-41.
- (64) Grieve DJ, Byrne JA, Siva A, Layland J, Johar S, Cave AC, Shah AM. Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 2006 February 21;47(4):817-26.
- (65) Ferri C, Desideri G, Baldoncini R, Bellini C, Valenti M, Santucci A, De MG. Angiotensin II increases the release of endothelin-1 from human cultured endothelial cells but does not regulate its circulating levels. *Clin Sci (Lond)* 1999 March;96(3):261-70.
- (66) Millatt LJ, bdel-Rahman EM, Siragy HM. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept* 1999 May 31;81(1-3):1-10.
- (67) Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* 1998 December 14;83(12):1182-91.

- (68) Katada J, Majima M. AT₂ receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br J Pharmacol* 2002 June;136(4):484-91.
- (69) Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999 February;33(2):613-21.
- (70) Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 January 9;93(1):156-60.
- (71) Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997 December;81(6):970-6.
- (72) Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 November 7;92(23):10663-7.
- (73) Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT₂ receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J* 2003 November;17(14):2094-6.
- (74) Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 1998 August 17;188(4):661-70.
- (75) Gallinat S, Yu M, Dorst A, Unger T, Herdegen T. Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT₂ and AT₁ receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Brain Res Mol Brain Res* 1998 June 1;57(1):111-22.
- (76) Zhao Y, Biermann T, Luther C, Unger T, Culman J, Gohlke P. Contribution of bradykinin and nitric oxide to AT₂ receptor-mediated differentiation in PC12 W cells. *J Neurochem* 2003 May;85(3):759-67.
- (77) Kurisu S, Ozono R, Oshima T, Kambe M, Ishida T, Sugino H, Matsuura H, Chayama K, Teranishi Y, Iba O, Amano K, Matsubara H. Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension* 2003 January;41(1):99-107.
- (78) Gohlke P, Pees C, Unger T. AT₂ receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* 1998 January;31(1 Pt 2):349-55.
- (79) Mifune M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Miyazaki H, Saruta T. Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2000 November;36(5):845-50.

- (80) Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 2003;12(2):70-88.
- (81) Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000 December;52(4):639-72.
- (82) Sim MK, Lim SL. Angiotensin AT1 receptor subtypes in the rabbit pulmonary artery. A ligand binding study. *Receptors Channels* 1998;5(6):323-9.
- (83) Adams JW, Brown JH. G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart. *Oncogene* 2001 March 26;20(13):1626-34.
- (84) Balla T, Varnai P, Tian Y, Smith RD. Signaling events activated by angiotensin II receptors: what goes before and after the calcium signals. *Endocr Res* 1998 August;24(3-4):335-44.
- (85) Lucius R, Gallinat S, Busche S, Rosenstiel P, Unger T. Beyond blood pressure: new roles for angiotensin II. *Cell Mol Life Sci* 1999 December;56(11-12):1008-19.
- (86) Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 2001 May;100(5):481-92.
- (87) Mascareno E, Siddiqui MA. The role of Jak/STAT signaling in heart tissue renin-angiotensin system. *Mol Cell Biochem* 2000 September;212(1-2):171-5.
- (88) Zhang H, Schmeisser A, Garlich CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, Daniel WG. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 1999 October;44(1):215-22.
- (89) Keidar S, Kaplan M, Hoffman A, Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1995 June;115(2):201-15.
- (90) Wagenaar LJ, Voors AA, Buikema H, van Gilst WH. Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can J Cardiol* 2002 December;18(12):1331-9.
- (91) Zhang J, Pratt RE. The AT2 receptor selectively associates with G α 2 and G α 3 in the rat fetus. *J Biol Chem* 1996 June 21;271(25):15026-33.
- (92) Feng YH, Sun Y, Douglas JG. G β γ -independent constitutive association of G α s with SHP-1 and angiotensin II receptor AT2 is essential in AT2-mediated ITIM-independent activation of SHP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 September 17;99(19):12049-54.
- (93) Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price E Jr, Roberts RL, Imboden H, Fitzgerald TG, Gaffney FA, Inagami T. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J* 2003 December 15;22(24):6471-82.

- (94) Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di BM, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud PO, Nahmias C. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* 2004 July 9;279(28):28989-97.
- (95) Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Schefe JH, Kruse ML, Stoll M, Unger T. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 January;25(1):57-64.
- (96) Funke-Kaiser H, Steckelings UM, Unger T. In: Guiseppe Mancia, editor. *Angiotensin II Receptor Antagonists in Perspective*. United Kingdom: Taylor & Francis (London)/Informa UK Limited (Milton Park, Abingdon, Oxon); 2006. p. 31-46.
- (97) Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001 May;10(3):321-9.
- (98) Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest* 1997 April 15;99(8):1926-35.
- (99) Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats. *J Clin Invest* 1996 April 15;97(8):1978-82.
- (100) Roskamm H, Neumann F-J, Kalusche D, Bestehorn H-P. 2004.
Ref Type: Art Work
- (101) Jin M, Wilhelm MJ, Lang RE, Unger T, Lindpaintner K, Ganten D. Endogenous tissue renin-angiotensin systems. From molecular biology to therapy. *Am J Med* 1988 March 11;84(3A):28-36.
- (102) Ganten D, Minnich JL, Granger P, Hayduk K, Brecht HM, Barbeau A, Boucher R, Genest J. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science* 1971 July 2;173(991):64-5.
- (103) Fischer-Ferraro C, Nahmod VE, Goldstein DJ, Finkielman S. Angiotensin and renin in rat and dog brain. *J Exp Med* 1971 February 1;133(2):353-61.
- (104) Phillips MI, Summers C. Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept* 1998 November 30;78(1-3):1-11.
- (105) Buggy J, Fisher AE, Hoffman WE, Johnson AK, Phillips MI. Subfornical Organ: A Dipsogenic Site of Action of Angiotension II. *Science* 1978 July 28;201(4353):380-1.
- (106) Phillips MI, de Oliveira EM. Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med* 2008 June;86(6):715-22.

- (107) Hohle S, Spitznagel H, Rascher W, Culman J, Unger T. Angiotensin AT1 receptor-mediated vasopressin release and drinking are potentiated by an AT2 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1995 March 14;275(3):277-82.
- (108) Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 1998 July;78(3):583-686.
- (109) Unger T, Becker H, Petty M, Demmert G, Schneider B, Ganten D, Lang RE. Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious rats. Implications for cardiovascular adaptation to behavioral responses. *Circ Res* 1985 April;56(4):563-75.
- (110) Culman J, Hohle S, Qadri F, Edling O, Blume A, Lebrun C, Unger T. Angiotensin as neuromodulator/neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis. *Clin Exp Hypertens* 1995 January;17(1-2):281-93.
- (111) Forette F, Seux ML, Staessen JA, Thijs L, Birkenhager WH, Babarskiene MR, Babeanu S, Bossini A, Gil-Extremera B, Girerd X, Laks T, Lilov E, Moissejev V, Tuomilehto J, Vanhanen H, Webster J, Yodfat Y, Fagard R. Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet* 1998 October 24;352(9137):1347-51.
- (112) Hanon O, Seux ML, Lenoir H, Rigaud AS, Forette F. Prevention of dementia and cerebroprotection with antihypertensive drugs. *Curr Hypertens Rep* 2004 June;6(3):201-7.
- (113) Ohrui T, Tomita N, Sato-Nakagawa T, Matsui T, Maruyama M, Niwa K, Arai H, Sasaki H. Effects of brain-penetrating ACE inhibitors on Alzheimer disease progression. *Neurology* 2004 October 12;63(7):1324-5.
- (114) Ohrui T, Matsui T, Yamaya M, Arai H, Ebihara S, Maruyama M, Sasaki H. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and incidence of Alzheimer's disease in Japan. *J Am Geriatr Soc* 2004 April;52(4):649-50.
- (115) Kehoe PG, Wilcock GK. Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *Lancet Neurol* 2007 April;6(4):373-8.
- (116) Bonini JS, Bevilaqua LR, Zinn CG, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm Behav* 2006 August;50(2):308-13.
- (117) DeNoble VJ, DeNoble KF, Spencer KR, Chiu AT, Wong PC, Timmermans PB. Non-peptide angiotensin II receptor antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitor: effect on a renin-induced deficit of a passive avoidance response in rats. *Brain Res* 1991 October 11;561(2):230-5.
- (118) Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci* 2005 July;29(3):427-35.

- (119) Kerr DS, Bevilaqua LR, Bonini JS, Rossato JI, Kohler CA, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology (Berl)* 2005 May;179(3):529-35.
- (120) Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P, Anderson C. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008 April 10;358(15):1547-59.
- (121) McQueen MJ, Lonn E, Gerstein HC, Bosch J, Yusuf S. The HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) Study and its consequences. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2005;240:143-56.
- (122) Schrader J, Luders S, Kulschewski A, Hammersen F, Plate K, Berger J, Zidek W, Dominiak P, Diener HC. Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared with Nitrendipine for Secondary Prevention: principal results of a prospective randomized controlled study (MOSES). *Stroke* 2005 June;36(6):1218-26.
- (123) Schrader J, Luders S, Kulschewski A, Berger J, Zidek W, Treib J, Einhaupl K, Diener HC, Dominiak P. The ACCESS Study: evaluation of Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. *Stroke* 2003 July;34(7):1699-703.
- (124) Ninomiya T, Donnan G, Anderson N, Bladin C, Chambers B, Gordon G, Sharpe N, Chalmers J, Woodward M, Neal B. Effects of the end point adjudication process on the results of the Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study (PROGRESS). *Stroke* 2009 June;40(6):2111-5.
- (125) Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger T. The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT(1)-receptor blockers. *J Hum Hypertens* 2002 August;16 Suppl 3:S64-S70.
- (126) Dai WJ, Funk A, Herdegen T, Unger T, Culman J. Blockade of central angiotensin AT(1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke* 1999 November;30(11):2391-8.
- (127) Groth W, Blume A, Gohlke P, Unger T, Culman J. Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J Hypertens* 2003 November;21(11):2175-82.
- (128) Li J, Culman J, Hortnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U, Unger T. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J* 2005 April;19(6):617-9.
- (129) Lou M, Blume A, Zhao Y, Gohlke P, Deuschl G, Herdegen T, Culman J. Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004 May;24(5):536-47.

- (130) Stier CT, Jr., Adler LA, Levine S, Chander PN. Stroke prevention by losartan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 1993 April;11(3):S37-S42.
- (131) Thone-Reineke C, Steckelings UM, Unger T. Angiotensin receptor blockers and cerebral protection in stroke. *J Hypertens Suppl* 2006 March;24(1):S115-S121.
- (132) von LN, Camargo MJ, Campbell WG, Jr., Mueller FB, Timmermans PB, Sealey JE, Laragh JH. Angiotensin II receptor antagonist delays renal damage and stroke in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 1992 September;10(9):949-57.
- (133) Krikov M, Thone-Reineke C, Muller S, Villringer A, Unger T. Candesartan but not ramipril pretreatment improves outcome after stroke and stimulates neurotrophin BDNF/TrkB system in rats. *J Hypertens* 2008 March;26(3):544-52.
- (134) Schmerbach K, Scheffe JH, Krikov M, Muller S, Villringer A, Kintscher U, Unger T, Thone-Reineke C. Comparison between single and combined treatment with candesartan and pioglitazone following transient focal ischemia in rat brain. *Brain Res* 2008 May 7;1208:225-33.
- (135) Grammatopoulos T, Morris K, Ferguson P, Weyhenmeyer J. Angiotensin protects cortical neurons from hypoxic-induced apoptosis via the angiotensin type 2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 2002 March 28;99(2):114-24.
- (136) Iwai M, Liu HW, Chen R, Ide A, Okamoto S, Hata R, Sakanaka M, Shiuchi T, Horiuchi M. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation* 2004 August 17;110(7):843-8.
- (137) Kagiya T, Kagiya S, Phillips MI. Expression of angiotensin type 1 and 2 receptors in brain after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Regul Pept* 2003 February 28;110(3):241-7.
- (138) Makino I, Shibata K, Ohgami Y, Fujiwara M, Furukawa T. Transient upregulation of the AT2 receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain. *Neuropeptides* 1996 December;30(6):596-601.
- (139) Zhu YZ, Chimon GN, Zhu YC, Lu Q, Li B, Hu HZ, Yap EH, Lee HS, Wong PT. Expression of angiotensin II AT2 receptor in the acute phase of stroke in rats. *Neuroreport* 2000 April 27;11(6):1191-4.
- (140) Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S, Zelent A. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J* 1993 March;12(3):1161-7.
- (141) Zhang T, Xiong H, Kan LX, Zhang CK, Jiao XF, Fu G, Zhang QH, Lu L, Tong JH, Gu BW, Yu M, Liu JX, Licht J, Waxman S, Zelent A, Chen E, Chen SJ. Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 September 28;96(20):11422-7.

- (142) Fahnenstich J, Nandy A, Milde-Langosch K, Schneider-Merck T, Walther N, Gellersen B. Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) is a glucocorticoid- and progesterone-induced transcription factor in human endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod* 2003 October;9(10):611-23.
- (143) Chowdhury K, Deutsch U, Gruss P. A multigene family encoding several "finger" structures is present and differentially active in mammalian genomes. *Cell* 1987 March 13;48(5):771-8.
- (144) Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999 May 15;93(10):3167-215.
- (145) Dong S, Zhu J, Reid A, Strutt P, Guidez F, Zhong HJ, Wang ZY, Licht J, Waxman S, Chomienne C, Chen Z, Zelent A, Chen SJ. Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor-alpha fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 April 16;93(8):3624-9.
- (146) Li JY, English MA, Ball HJ, Yeyati PL, Waxman S, Licht JD. Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem* 1997 September 5;272(36):22447-55.
- (147) Melnick AM, Westendorf JJ, Polinger A, Carlile GW, Arai S, Ball HJ, Lutterbach B, Hiebert SW, Licht JD. The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 2000 March;20(6):2075-86.
- (148) David G, Alland L, Hong SH, Wong CW, DePinho RA, Dejean A. Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene* 1998 May 14;16(19):2549-56.
- (149) Grignani F, De MS, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998 February 19;391(6669):815-8.
- (150) Guidez F, Ivins S, Zhu J, Soderstrom M, Waxman S, Zelent A. Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RARalpha underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1998 April 15;91(8):2634-42.
- (151) Hong SH, David G, Wong CW, Dejean A, Privalsky ML. SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 August 19;94(17):9028-33.

- (152) Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH, Jr., Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998 February 19;391(6669):811-4.
- (153) Wong CW, Privalsky ML. Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J Biol Chem* 1998 October 16;273(42):27695-702.
- (154) Ball HJ, Melnick A, Shaknovich R, Kohanski RA, Licht JD. The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. *Nucleic Acids Res* 1999 October 15;27(20):4106-13.
- (155) Sitterlin D, Tiollais P, Transy C. The RAR alpha-PLZF chimera associated with Acute Promyelocytic Leukemia has retained a sequence-specific DNA-binding domain. *Oncogene* 1997 March 6;14(9):1067-74.
- (156) Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001 October 29;20(49):7186-203.
- (157) UniProt Database. 2010.
Ref Type: Internet Communication
- (158) Ko JH, Son W, Bae GY, Kang JH, Oh W, Yoo OJ. A new hepatocytic isoform of PLZF lacking the BTB domain interacts with ATP7B, the Wilson disease protein, and positively regulates ERK signal transduction. *J Cell Biochem* 2006 October 15;99(3):719-34.
- (159) Reid A, Gould A, Brand N, Cook M, Strutt P, Li J, Licht J, Waxman S, Krumlauf R, Zelent A. Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* 1995 December 15;86(12):4544-52.
- (160) Labbaye C, Quaranta MT, Pagliuca A, Militi S, Licht JD, Testa U, Peschle C. PLZF induces megakaryocytic development, activates Tpo receptor expression and interacts with GATA1 protein. *Oncogene* 2002 September 26;21(43):6669-79.
- (161) Avantaggiato V, Pandolfi PP, Ruthardt M, Hawe N, Acampora D, Pelicci PG, Simeone A. Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J Neurosci* 1995 July;15(7 Pt 1):4927-42.
- (162) Cook M, Gould A, Brand N, Davies J, Strutt P, Shaknovich R, Licht J, Waxman S, Chen Z, Gluecksohn-Waelsch S, . Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 March 14;92(6):2249-53.
- (163) Barna M, Hawe N, Niswander L, Pandolfi PP. Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet* 2000 June;25(2):166-72.

- (164) Shaknovich R, Yeyati PL, Ivins S, Melnick A, Lempert C, Waxman S, Zelent A, Licht JD. The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1998 September;18(9):5533-45.
- (165) Ward JO, McConnell MJ, Carlile GW, Pandolfi PP, Licht JD, Freedman LP. The acute promyelocytic leukemia-associated protein, promyelocytic leukemia zinc finger, regulates 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced monocytic differentiation of U937 cells through a physical interaction with vitamin D(3) receptor. *Blood* 2001 December 1;98(12):3290-300.
- (166) Yeyati PL, Shaknovich R, Boterashvili S, Li J, Ball HJ, Waxman S, Nason-Burchenal K, Dmitrovsky E, Zelent A, Licht JD. Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* 1999 January 28;18(4):925-34.
- (167) McConnell MJ, Chevallier N, Berkofsky-Fessler W, Giltane JM, Malani RB, Staudt LM, Licht JD. Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol Cell Biol* 2003 December;23(24):9375-88.
- (168) Mangi MH, Newland AC. Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions. *Cytokines Cell Mol Ther* 1999 June;5(2):87-95.
- (169) Petrie K, Guidez F, Zhu J, Howell L, Owen G, Chew YP, Parks S, Waxman S, Licht J, Mitnacht S, Zelent A. Retinoblastoma protein and the leukemia-associated PLZF transcription factor interact to repress target gene promoters. *Oncogene* 2008 September 4;27(39):5260-6.
- (170) Yamasaki L. Balancing proliferation and apoptosis in vivo: the Goldilocks theory of E2F/DP action. *Biochim Biophys Acta* 1999 March 25;1423(2):M9-15.
- (171) Johnson DG, Schneider-Broussard R. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci* 1998 April 27;3:d447-d448.
- (172) Kaelin WG, Jr. Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 1999 November;21(11):950-8.
- (173) van den HS, Dyson NJ. Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 September;9(9):713-24.
- (174) Parrado A, Robledo M, Moya-Quiles MR, Marin LA, Chomienne C, Padua RA, varez-Lopez MR. The promyelocytic leukemia zinc finger protein down-regulates apoptosis and expression of the proapoptotic BID protein in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 February 17;101(7):1898-903.
- (175) Schefe JH, Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs RM, Pandolfi PP, Ruiz P, Unger T, Funke-Kaiser H. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ Res* 2006 December 8;99(12):1355-66.

- (176) Costoya JA, Hobbs RM, Pandolfi PP. Cyclin-dependent kinase antagonizes promyelocytic leukemia zinc-finger through phosphorylation. *Oncogene* 2008 June 19;27(27):3789-96.
- (177) Guidez F, Howell L, Isalan M, Cebrat M, Alani RM, Ivins S, Hormaeche I, McConnell MJ, Pierce S, Cole PA, Licht J, Zelent A. Histone acetyltransferase activity of p300 is required for transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 2005 July;25(13):5552-66.
- (178) Kang SI, Chang WJ, Cho SG, Kim IY. Modification of promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) by SUMO-1 conjugation regulates its transcriptional repressor activity. *J Biol Chem* 2003 December 19;278(51):51479-83.
- (179) Chao TT, Chang CC, Shih HM. SUMO modification modulates the transrepression activity of PLZF. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 June 29;358(2):475-82.
- (180) Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D, Inoue H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. *Oncogene* 2007 January 18;26(3):339-48.
- (181) Thone-Reineke C, Neumann C, Namsolleck P, Schmerbach K, Krikov M, Scheffe JH, Lucht K, Hortnagl H, Godes M, Muller S, Rumschussel K, Funke-Kaiser H, Villringer A, Steckelings UM, Unger T. The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, dramatically improves survival, increases glutamate uptake and induces neurotrophins in stroke. *J Hypertens* 2008 December;26(12):2426-35.
- (182) Berry FB, Mirzayans F, Walter MA. Regulation of FOXC1 stability and transcriptional activity by an epidermal growth factor-activated mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *J Biol Chem* 2006 April 14;281(15):10098-104.
- (183) Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005 July 1;21(13):2933-42.
- (184) Reinemund J, Seidel K, Steckelings UM, Zaade D, Klare S, Rompe F, Katerbaum M, Schacherl J, Li Y, Menk M, Scheffe JH, Goldin-Lang P, Szabo C, Olah G, Unger T, Funke-Kaiser H. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) transcriptionally regulates angiotensin AT2 receptor (AT2R) and AT2R binding protein (ATBP) genes. *Biochem Pharmacol* 2009 June 15;77(12):1795-805.
- (185) Warnecke C, Willich T, Holzmeister J, Bottari SP, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Efficient transcription of the human angiotensin II type 2 receptor gene requires intronic sequence elements. *Biochem J* 1999 May 15;340 (Pt 1):17-24.
- (186) Hirose T, Hashimoto M, Totsune K, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Sugimoto K, Katsuya T, Ohkubo T, Hashimoto J, Rakugi H, Takahashi K, Imai Y. Association of (pro)renin receptor gene polymorphism with blood pressure in Japanese men: the Ohasama study. *Am J Hypertens* 2009 March;22(3):294-9.

- (187) Contrepas A, Walker J, Koulakoff A, Franek KJ, Qadri F, Giaume C, Corvol P, Schwartz CE, Nguyen G. A role of the (pro)renin receptor in neuronal cell differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 August;297(2):R250-R257.
- (188) Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol* 1996 August 30;122(1):59-67.
- (189) Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 August 31;101(35):12792-7.
- (190) Dudley DT, Summerfelt RM. Regulated expression of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells. *Regul Pept* 1993 March 19;44(2):199-206.
- (191) Ichiki T, Kambayashi Y, Inagami T. Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type-2 receptor in R3T3 cells. *Circ Res* 1995 December;77(6):1070-6.
- (192) Horiuchi M, Koike G, Yamada T, Mukoyama M, Nakajima M, Dzau VJ. The growth-dependent expression of angiotensin II type 2 receptor is regulated by transcription factors interferon regulatory factor-1 and -2. *J Biol Chem* 1995 August 25;270(34):20225-30.
- (193) Chang B, Myatt L, Cui XL. Loss of proliferative capacity in a retroviral immortalized human uterine smooth muscle cell line derived from leiomyoma is restored by hTERT overexpression. *Reprod Sci* 2009 November;16(11):1062-71.
- (194) Servant G, Dudley DT, Escher E, Guillemette G. The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of N-glycosylation. *Mol Pharmacol* 1994 June;45(6):1112-8.
- (195) Servant G, Dudley DT, Escher E, Guillemette G. Analysis of the role of N-glycosylation in cell-surface expression and binding properties of angiotensin II type-2 receptor of rat pheochromocytoma cells. *Biochem J* 1996 January 1;313 (Pt 1):297-304.
- (196) Basic K, V, Simundic AM, Nikolac N, Topic E, Demarin V. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early neurological deficit and stroke outcome. *Clin Biochem* 2008 November;41(16-17):1330-4.
- (197) Patzer A, Zhao Y, Stock I, Gohlke P, Herdegen T, Culman J. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPARgamma) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci* 2008 November;28(9):1786-94.
- (198) Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von HR, Bruck W, Hortnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle

- machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* 2001 July 15;21(14):5045-53.
- (199) Jang SW, Liu X, Fu H, Rees H, Yepes M, Levey A, Ye K. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. *J Biol Chem* 2009 September 4;284(36):24512-25.
- (200) Rashidian J, Iyirhiaro GO, Park DS. Cell cycle machinery and stroke. *Biochim Biophys Acta* 2007 April;1772(4):484-93.
- (201) Wan Y, Nordeen SK. Overlapping but distinct gene regulation profiles by glucocorticoids and progestins in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2002 June;16(6):1204-14.
- (202) Yates JL, Warren N, Sugden B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 1985 February 28;313(6005):812-5.
- (203) Sugden B, Marsh K, Yates J. A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol* 1985 February;5(2):410-3.
- (204) Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 1999 December 20;190(12):1891-6.
- (205) Hashimoto T, Yamauchi L, Hunter T, Kikkawa U, Kamada S. Possible involvement of caspase-7 in cell cycle progression at mitosis. *Genes Cells* 2008 June;13(6):609-21.
- (206) Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 August 20;99(17):11025-30.
- (207) Fernando P, Brunette S, Megeney LA. Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *FASEB J* 2005 October;19(12):1671-3.
- (208) Sordet O, Rebe C, Plenchette S, Zermati Y, Hermine O, Vainchenker W, Garrido C, Solary E, Dubrez-Daloz L. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 2002 December 15;100(13):4446-53.
- (209) Larsen BD, Rampalli S, Burns LE, Brunette S, Dilworth FJ, Megeney LA. Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 March 2;107(9):4230-5.
- (210) Storm-Mathisen J, Danbolt NC, Rothe F, Torp R, Zhang N, Aas JE, Kanner BI, Langmoen I, Ottersen OP. Ultrastructural immunocytochemical observations on the localization, metabolism and transport of glutamate in normal and ischemic brain tissue. *Prog Brain Res* 1992;94:225-41.

- (211) Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969 May 9;164(880):719-21.
- (212) Mukhin A, Fan L, Faden AI. Activation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 contributes to post-traumatic neuronal injury. *J Neurosci* 1996 October 1;16(19):6012-20.
- (213) Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992 November;23(9):1261-76.

Kapitel 7 Publikationen

Publikationen:

Li J, Culman J, Hörtnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, **Seidel K**, Dirnagl U, Unger T. (2005)
Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury.
FASEB J.; 19:617-619.

Harms C, Albrecht K, Harms U, **Seidel K**, Hauck L, Baldinger T, Hübner D, Kronenberg G, An J, Ruscher K, Meisel A, Dirnagl U, von Harsdorf R, Endres M, Hörtnagl H. (2007)
Phosphatidylinositol 3-Akt-kinase-dependent phosphorylation of p21(Waf1/Cip1) as a novel mechanism of neuroprotection by glucocorticoids.
J Neurosci.; 27:4562-4571.

Reinemund J, **Seidel K**, Steckelings UM, Zaade D, Klare S, Rompe F, Katerbaum M, Schacherl J, Li Y, Menk M, Scheffe JH, Goldin-Lang P, Szabo C, Olah G, Unger T, Funke-Kaiser H. (2009)
Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) transcriptionally regulates angiotensin AT2 receptor (AT2R) and AT2R binding protein (ATBP) genes.
Biochem Pharmacol.; 77:1795-1805.

Posterpräsentationen:

Kerstin Seidel, Jan H. Scheffe, Kristin Lucht, Christa Thöne-Reineke, Thomas Unger, Heiko Funke-Kaiser
The role of the promyelotic leukemia zinc finger (PLZF) protein in angiotensin AT2 receptor (AT2R) mediated neuroprotection.
31. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V., Bochum

Kerstin Seidel, Jan H. Scheffe, Kristin Lucht, Kristin Schmerbach, Christa Thöne-Reineke, Thomas Unger, Heiko Funke-Kaiser
Role of the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein, a binding protein for the (pro)renin and the angiotensin AT2 receptor, in neuroprotection.
Hypertension 2008, Berlin

Kapitel 8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: <i>In vivo</i> - Modell der MCAO in Ratten. | 4 |
| Abbildung 2: Ischämische Schadenskaskade | 5 |
| Abbildung 3: Klassische, vereinfachte Darstellung der Renin-Angiotensin-Kaskade..... | 9 |
| Abbildung 4: Die Signaltransduktion des AT1R. | 12 |
| Abbildung 5: Übersicht AT2R-Interaktionspartner und AT2R-Signaltransduktion. | 14 |
| Abbildung 6: Zerebrales Renin-Angiotensin-System. | 16 |
| Abbildung 7: Darstellung von PLZF und alternativen Spleißvarianten..... | 19 |
| Abbildung 8: Zusammenfassung der segmentierten Expression von PLZF im Rautenhirn von Mausembryonen. | 21 |
| Abbildung 9: Interaktion von PLZF am G1/S-Phase-Übergang..... | 23 |
| Abbildung 10: Übersicht über die Mitglieder der E2F-Familie und deren Interaktionspartner..... | 24 |
| Abbildung 11: Darstellung der Präparation des Gehirnes in Scheiben mit Hilfe der standardisierten Matrix. | 42 |
| Abbildung 12: Darstellung der RT-PCR-Analyse der Expression von PLZF und anderer Komponenten des AT2R/(P)RR-PLZF-Signalweges..... | 62 |
| Abbildung 13: Darstellung des <i>Western blot</i> von Gesamtproteinlysaten von PLZF und anderer Komponenten des AT2R/(P)RR-PLZF-Signalweges..... | 63 |
| Abbildung 14: Ausschnittsweise Darstellung des <i>Western blot</i> von Gesamtproteinlysaten aus der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte zum Zeitpunkt 24 Stunden nach MCAO..... | 68 |
| Abbildung 15: Ausschnittsweise Darstellung des <i>Western blot</i> von Gesamtproteinlysaten aus der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MCAO..... | 69 |
| Abbildung 16: Darstellung des <i>Western blot</i> von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen aus der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte zum Zeitpunkt 24 Stunden nach MCAO..... | 71 |
| Abbildung 17: Darstellung des <i>Western blot</i> von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen aus der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MCAO..... | 72 |
| Abbildung 18: Vektorkarte des episomalen Expressionsvektors pCEP4..... | 74 |
| Abbildung 19: Graphische Darstellung der relativen PLZF-mRNA-Expression von KELLY-Zellen..... | 75 |
| Abbildung 20: Darstellung des <i>Western blot</i> von zytoplasmatischen Proteinen und Kernproteinen aus einer fraktionierten Proteinisolation von KELLY-Zellen. | 76 |
| Abbildung 21: Morphologie von KELLY-Zellen. | 77 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 22: Graphische Darstellung der relativen ATP-Konzentration von KELLY-Zellen..... | 78 |
| Abbildung 23: Graphische Darstellung der relativen ATP Konzentration, der relativen BrdU-Inkorporation und der relativen Kaspase 3/7-Aktivität von KELLY-Zellen. | 79 |
| Abbildung 24: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von KELLY-Zellen | 80 |
| Abbildung 25: Graphische Darstellung der relativen Gen-mRNA Expression von KELLY-Zellen..... | 81 |
| Abbildung 26: Nukleotidsequenz des AT2R-Promotors..... | 82 |
| Abbildung 27: Graphische Darstellung der relativen Luziferaseaktivität von KELLY-Zellen mit AT2R-Promotorkonstrukten. | 83 |
| Abbildung 28: Nukleotidsequenz des (P)RR-Promotors. | 84 |
| Abbildung 29: Graphische Darstellung der relativen Luziferaseaktivität von KELLY-Wildtyp-Zellen nach Transfektion mit (P)RR-Promotorkonstrukten..... | 85 |
| Abbildung 30: Graphische Darstellung der relativen Luziferaseaktivität von transfizierten KELLY-Zellen nach Transfektion mit (P)RR-Promotorkonstrukten..... | 86 |

Kapitel 9 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Expression und physiologische Effekte des AT1R und AT2R | 11 |
| Tabelle 2: Verzeichnis der verwendeten Primer zur Analyse humaner Transkripte. | 35 |
| Tabelle 3: Verzeichnis der verwendeten Primer zur Analyse muriner Transkripte..... | 35 |
| Tabelle 4: Verwendete Primäre Antikörper..... | 38 |
| Tabelle 5: Verwendete Sekundäre Antikörper..... | 39 |
| Tabelle 6: Zusammensetzung des 2x SYBR Green I <i>real-time</i> PCR Mastermix. | 49 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels..... | 57 |
| Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung der Expressionsanalyse von PLZF und anderer Komponenten des AT2R/(P)RR-PLZF-Signalweges mittels RT-PCR und <i>Western blot</i> | 64 |
| Tabelle 9: Übersicht über die relative Gen-mRNA-Expressionen 24 Stunden nach MCAO. | 66 |
| Tabelle 10: Übersicht über die relative Gen-mRNA-Expressionen 48 Stunden nach MCAO. | 66 |
| Tabelle 11: Übersicht über die relative PLZF-Protein Expression 24 Stunden nach MCAO und fraktionierter Proteinisolation..... | 73 |
| Tabelle 12: Übersicht über die relative PLZF-Protein Expression 48 Stunden nach MCAO und fraktionierter Proteinisolation..... | 73 |

Kapitel 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ein paar spezielle Worte an einige Menschen richten, die mich auf meinem Weg begleitet und auch unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Unger für sein entgegengebrachtes Vertrauen bei der Überlassung und Durchführung dieses Projektes und seine exzellente Betreuung bedanken.

Meinem direkten Betreuer Herrn PD Dr. Heiko Funke-Kaiser möchte ich herzlich danken für seine Hilfsbereitschaft, sein Engagement sowie für die informativen und fachlichen Diskussionen und die Bereitschaft, seine Erfahrungen mit mir zu teilen.

Herrn Prof. Dr. Volker Haucke möchte ich herzlich danken für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu verfassen.

Desweiteren möchte ich mich namentlich bei Manuela Sommerfeld und Kristin Lucht für die große Hilfsbereitschaft, das angenehme freundschaftliche Arbeitsklima und die schöne Zeit auch außerhalb des CCRs während dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und der Familie meines Freundes für die jahrelange tatkräftige Unterstützung auf meinem akademischen Weg.

Mein letzter, aber dennoch wichtigster Dank gilt meinem Freund Erik für die endlose Geduld und liebevolle Unterstützung, für seine fachliche Kompetenz und Hilfe in all den Jahren.