

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

DISSERTATION

Regulation und Bedeutung von *Origin recognition complex subunit 1 (Orc1)* für den Zelltod isolierter Neurone nach kombiniertem Sauerstoff- und Glukoseentzug, einem Zellkulturmodell des ischämischen Schlaganfalls

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Denise Hübner

aus Tongeren/Belgien

Datum der Promotion: 09.09.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt	1
1.1. Abstrakt (deutsch)	1
1.2. Abstract (english)	1
2. Einleitung	3
2.1. Der Zellzyklus	3
2.2. Der ORC Komplex	5
2.2.1. Das ORC1 Protein	6
2.3. Apoptose und Nekrose	7
2.3.1. Die Rolle von E2F1 in der Apoptose	8
2.4. Schlaganfall	8
2.4.1. Zelluläre Prozesse nach zerebraler Ischämie/Hypoxie	9
2.5. Neuronaler Zellzyklus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen	10
2.5.1. Der aberrante Zellzykluseintritt nach neuronaler Schädigung	12
2.6. Zielsetzung	13
3. Material und Methoden	15
3.1. Material	15
3.1.1. Stämme und Zelllinien	15
Bakterienstämme	15
Zelllinien	15
3.1.2. Lösungen	15
3.1.3. Chemikalien	17
3.1.4. Geräte und Ausrüstung	18
3.1.5. Enzyme und Reagenzsysteme	19
3.1.6. PCR Primer und miR-shRNAs	20
3.1.7. Antikörper	22
3.1.8. Vektoren	22
3.1.9. Software	23
3.2. Methoden	23
3.2.1. Zellkultur	23
3.1.3. Molekularbiologische Methoden	25
3.1.4. Zellbiologische Methoden	31
4. Ergebnisse	33
4.1. Neuronale <i>Orc1</i> Expression	33
4.1.1. <i>Orc1</i> Expression in embryonalem und adultem Gewebe	33
4.1.2. <i>Orc1-6</i> Expression in kortikalen Neuronen	34
4.1.3. <i>Orc1</i> Expression in kortikalen Neuronen nach OGD	34

4.1.4. <i>Orc1</i> Promotorregulation in kortikalen Neuronen nach OGD	36
4.2. <i>Orc1</i> Promotorregulation durch die E2F-Transkriptionsfaktoren	38
4.2.1. E2F4-abhängige <i>Orc1</i> Promotorregulation im HT22 Zellmodell	38
4.3. E2F4-abhängige <i>Orc1</i> Promotorregulation in Neuronen nach Ischämie/Hypoxie	40
4.3.1. Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren in kortikalen Neuronen	40
4.3.2. Charakterisierung der <i>E2f4</i> miR-shRNA	41
4.3.3. Durch <i>E2f4</i> miR-shRNA beeinflusste <i>Orc1</i> Expression in kortikalen Neuronen nach OGD	42
4.4. Verhinderung der <i>Orc1</i> Expression schützt vor neuronalem Zelltod nach Ischämie/Hypoxie	43
4.4.1. Charakterisierung der <i>Orc1</i> miR-shRNA	43
4.4.2. Einfluss von ORC1 auf das Überleben von kortikalen Neuronen nach OGD	45
5. Diskussion	50
5.1. Neuronale <i>Orc1</i> Reexpression nach OGD	50
5.2. <i>Orc1</i> ist ein E2F4-reguliertes Zielgen nach OGD	54
5.3. Blockade der <i>Orc1</i> Reexpression nach OGD ist neuroprotektiv	55
5.4. Ausblick	57
6. Zusammenfassung	59
7. Anhang	60
7.1. Literatur	60
7.2. Verzeichnisse	66
7.2.1. Abbildungsverzeichnis	66
7.2.2. Tabellenverzeichnis	67
7.2.3. Abkürzungsverzeichnis	67
7.3. Publikationen	70
7.4. Eidesstattliche Erklärung	70
7.5. Lebenslauf	72

1. Abstrakt

1.1. Abstrakt (deutsch)

Der *origin recognition complex* ORC, bestehend aus den Untereinheiten ORC1-ORC6, leitet als Prä-Initiationskomplex in proliferierenden Zellen die Synthese-Phase der DNA ein (S-Phase). Die Assemblierung von ORC1 an den Kernkomplex - bestehend aus ORC2-5 - wird zellzyklusabhängig reguliert. ORC1 gilt als regulatorische Untereinheit des Komplexes und vermittelt dessen Bindung zum Chromatin. Somit ist es essentiell für die Initiation der S-Phase. *Orc1* selbst wird zellzyklusabhängig durch die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie reguliert.

In differenzierten Neuronen wird *Orc1* im Gegensatz zu den Untereinheiten *Orc2-6* unter physiologischen Bedingungen sehr gering exprimiert. Der reprimierende Transkriptionsfaktor E2F4 scheint in solchen muren Nervenzellen unter anderem durch eine Zellteilungsblockade eine Funktion in der Aufrechterhaltung des differenzierten Status zu haben. Neurone werden daher als post-mitotisch bezeichnet. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie z.B. nach zerebraler Ischämie/Hypoxie hat ein aberranter Zellzykluseintritt den neuronalen Zelltod zur Folge.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von ORC1 und dessen transkriptionelle Regulation durch den E2F4-Repressorkomplex im Kontext des neuronalen Zelltodes im Zellkulturmodell für die zerebrale Ischämie untersucht.

In Zellkultur (*in vitro*) wurde der Schaden durch einen transienten Sauerstoff- und Glukoseentzug (oxygen glucose deprivation: OGD) modelliert. *Orc1* wurde nach OGD in Neuronen transkriptionell aktiviert. Dabei war die Regulation abhängig von einem Verlust des reprimierenden Transkriptionsfaktors E2F4 am *Orc1* Promotor. Wurde die *Orc1* Expression nach kombinierten Sauerstoff- und Glukoseentzug durch lentiviral vermittelte RNA Interferenz mit *Orc1* in Neuronen gehemmt, schützte dies vor neuronalem Zelltod.

ORC1 ist als Schlüsselprotein und dessen Regulation durch den reprimierenden Transkriptionsfaktor E2F4 als ein molekularer Mechanismus zur Initiation neuronalen Zelltods nach OGD identifiziert worden.

1.2. Abstract (english)

In proliferating cells the origin recognition complex ORC, that is comprised of the subunits ORC1-ORC6, serves as a pre-initiation complex to induce DNA synthesis (S-phase). ORC1 assembly to the ORC core complex (subunits ORC2-5) regulates the ORC in a cell cycle

dependent manner. ORC1 assembly is required to mediate binding to chromatin and is the rate limiting step for the initiation of S-phase. *Orc1* is identified as a target gene of the cell cycle controlling E2F transcription factor family.

ORC1 is virtually absent in mature neurons under physiological conditions in contrast to the constitutively expressed subunits ORC2-6. The repressive transcriptionfactor E2F4 seems to take part in the inhibition of cell cycle progression and maintains the differentiated state of neurons. Thus, neurons are entitled post-mitotic. Aberrant cell cycle reentry after brain ischemia or other pathophysiological conditions is implicated in neuronal cell death.

In this study the role of ORC1 and its regulation by the repressive E2F4 complex in neuronal cell death after brain ischemia is explored.

Orc1 was transcriptionally upregulated after hypoxic damage, which was induced by combined oxygen glucose deprivation (OGD) of mouse primary cortical neurons. *Orc1* was regulated by the repressive transcriptionfactor E2F4. Inhibition of *Orc1* de novo transcription by neuronal-specific RNA interference with *Orc1* protected neurons against cell death induced by OGD.

This study identified ORC1 as a novel rate limiting factor und its regulation through E2F4 as a molecular mechanism involved in neuronal cell death after oxygen glucose deprivation.

2. Einleitung

In dieser Arbeit wurde in einem Kandidatenansatz das Protein ORC1 in der Regulation des neuronalen Zelltodes nach Ischämie/Hypoxie untersucht. Dazu wurde das *in vitro* Modell des Schlaganfalls, der kombinierte Sauerstoff- und Glukoseentzug, verwendet, um eine ischämisch/hypoxische Schädigung in primären, kortikalen Neuronen aus Mäusen zu simulieren. Es wurden spezifische Untersuchungsmethoden angewandt, um den molekularen Mechanismus der *Orc1* Regulation in Neuronen zu analysieren. Die Bedeutung von ORC1 für neuronale Vulnerabilität wurde durch neuronale spezifische Intervention mit der Methode der RNA Interferenz, welche zur Reduktion des ORC1 Proteins führt, getestet. Im Fokus der Experimente stand die Frage, ob mit ORC1 ein Schlüsselprotein in der Regulation der neuronalen Zelltod-Signalkaskade nach kombiniertem Sauerstoff- und Glukoseentzug existiert.

2.1. Der Zellzyklus

Die Proliferation von eukaryoten Zellen wird von äußeren Wachstumsfaktoren über Signalkaskaden innerhalb der Zelle bis zur Regulation von zellzyklustreibenden Faktoren und Genen gesteuert. Dies führt zu einer Replikation der DNA, Verdopplung des Chromosomensatzes und Zellteilung. Dieser Prozess kann in Phasen eingeteilt werden, wobei jede Phase ihrerseits reguliert und kontrolliert wird.

Die Replikation der zelleigenen DNA findet in der Synthese-Phase (S-Phase), die Verdopplung des Chromosomensatzes und die Zellteilung in der Mitose (M-Phase) statt. Bei einer Zellart, die sich in 20-24 Stunden verdoppelt, entfallen 10-12 Stunden auf die S -Phase und ca. 1 Stunde auf die M-Phase ¹¹⁷. Die Zwischenzeiten werden als *Gap*-Phasen - G1 und G2 - bezeichnet. Haben Zellen einmal den sogenannten Restriktionspunkt in der G1-Phase passiert, durchlaufen sie den kompletten Zyklus. Zellen, die sich nicht teilen, ruhen in G0. Quieszente Zellen können auf bestimmte Stimuli wieder in den Zellzyklus eintreten. Terminal differenzierte Zellen gelten als nicht mehr zur Replikation und Zellteilung fähig.

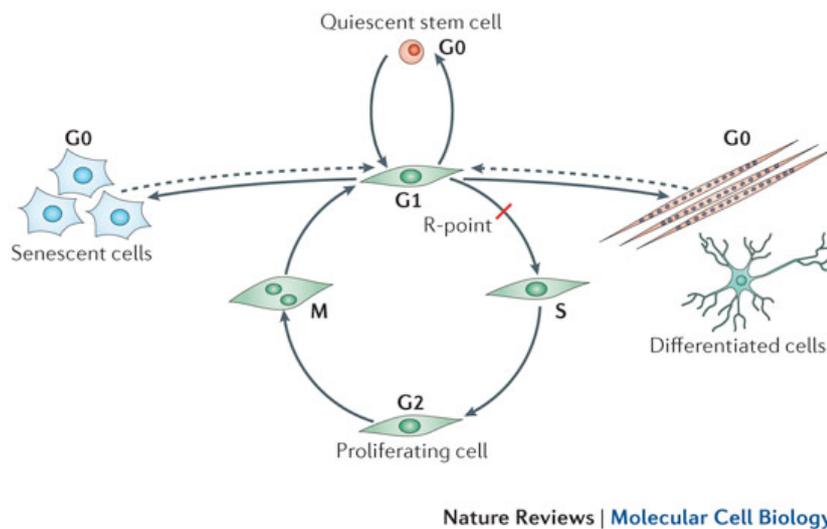


Abb. 1.1: Schema Zellzyklus: Quieszente Zellen in G0 können auf mitogene Stimuli in die G1-Phase des Zellzyklus eintreten. Bei Überschreiten des Restriktionspunktes (R-point) wird der Zellzyklusdurchlauf fortgesetzt. Es folgt die Replikation in der S-Phase. In der G2-Phase werden Vorbereitungen zur Mitose in der M-Phase getroffen. Aus Nature Reviews June 2013 Vol 14 No 6

Zellen arretieren, wenn während des Zellzyklusdurchlaufs an Kontrollpunkten, den sogenannten *checkpoints*, ein Fehler identifiziert wird¹. Es existieren drei dieser *checkpoints*: der G1- (=restriction checkpoint), der G2/M- (=DNA damage checkpoint) und der Metaphase-*checkpoint* (=spindle checkpoint). Somit erhält die Zelle Zeit, um Reparaturmechanismen zu aktivieren. Wird der Fehler nicht behoben, kann die Zelle den programmierten Zelltod - die Apoptose - einleiten, um einer unkontrollierten Proliferation zu entgehen².

Zum Eintritt in den Zellzyklus werden Inhibitoren des Zellzyklus, die sogenannten zyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (CKI) phosphoryliert und dadurch zum proteosomalen Abbau markiert³. Die CKIs können in die Gruppe der Ink4 (inhibitors of CDK4) mit p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} und p19^{Ink4d} und der CIP/KIP- Proteine mit p21^{CIP/WAF}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} eingeteilt werden⁴. Nach Abbau der CKIs werden zyclin-abhängige Kinasen (CDK) nicht mehr gehemmt und deren Substrate können phosphoryliert werden. In der G1-Phase agieren CDK2, CDK4 und CDK6 zusammen mit den D-Typ Zyclinen. Diese CDK/D-Zyclin Komplexe phosphorylieren das Retinoblastoma Protein RB⁵. RB gehört mit p130 und p107 zu den Pocket Proteinen. Es bindet an eine Klasse von Transkriptionsfaktoren - die E2F (elongation factor) - Transkriptionsfaktoren E2F1, E2F2 und E2F3a - und hemmt diese über Bindung und Blockierung ihrer Transaktivierungsdomäne⁶.

Wird RB hyperphosphoryliert, löst es sich von E2F ab und dessen Hemmung durch RB wird aufgehoben. E2F1-E2F3a im Heterodimer mit dem Co-Faktor DP (dimerization protein) gelten als Aktivatoren des Zellzyklus, die den G1/S- und auch G2/M-Übergang regulieren⁷.

Des Weiteren werden epigenetische Modifikatoren (z.B. Histondeacetylasen) rekrutiert und verändern den sogenannten Histon Code, der die Genexpression moduliert ⁶. So können sie die Proliferation von Zellen über die Regulation von Zielgenen wie z.B. den Zyklinen, *cell division cycle 6* (CDC6) und DNA-Polymerase vorantreiben ⁸.

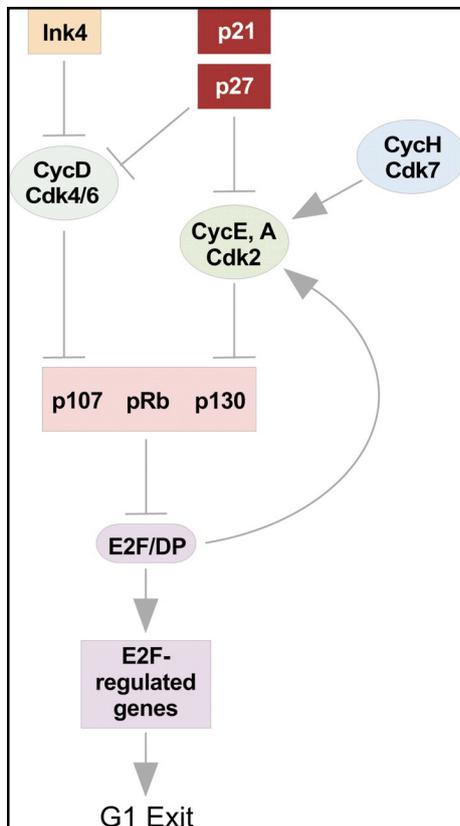


Abb. 1.2.: RB - E2F-Signalweg: Die Pocketproteine RB, p130 und p107 werden über Phosphorylierung durch CDK/Zyclin-Komplexe in ihrer Bindung an die E2F-Transkriptionsfaktoren gehemmt. Die E2F-Faktoren sind somit in der Lage den G1/ S-Übergang durch Transaktivierung der Zielgene einzuleiten. Durch die INK4 und CIP/KIP Proteine können die Zyclin/CDK Komplexe und somit der Zellzykluseintritt gehemmt werden.

Aus *Physiological Reviews* 1 April 2007 Vol. 87 no. 2

E2F3b, E2F4 und E2F5 gelten als Repressoren von Zielgenen ⁹. Vor allem E2F4 - zusammen mit p130 und DP1 - ist dafür bekannt in quieszenten und differenzierten Zellen sowie in G0/G1 die Regulation von Genen als Repressorkomplex zu steuern ¹⁰.

E2F6, E2F7 und E2F8 sind ebenfalls Repressoren, besitzen jedoch keine Pocket Protein Bindungsstelle und bewerkstelligen ihre Repression über Rekrutierung von Co-Repressorkomplexen ¹¹.

2.2. Der ORC Komplex

Der *origin recognition complex* (ORC) ist maßgeblich an der Initiation der Replikation der DNA zu Beginn der S-Phase beteiligt. Der ORC Komplex setzt sich aus einem Kernkomplex, bestehend aus den Untereinheiten ORC2-5, und den peripheren Untereinheiten ORC1 und ORC6 zusammen. Eukaryote, proliferierende Zellen exprimieren jede dieser Untereinheiten. Zur Formierung des funktionellen Komplexes lagern sich ORC1 und ORC6 an den Kernkomplex an, wobei ORC1 als regulatorische Untereinheit gilt und über post-

translationale Modifikationen von ORC1 sein Bindungsverhalten an den Kernkomplex und sein Abbau reguliert werden¹²⁻¹⁴.

Die Formierung eines aktiven prä-replikativen Komplexes mit Bindung an den *origins of replication* geschieht während des M/G1-Überganges. Von dort aus findet bidirektional die Replikation statt. Der Prozess der DNA-Bindung ist ATP-abhängig und wird über die ATPase Funktion von ORC1 gesteuert¹⁵. Der prä-replikative Komplex dient an den *origins* als Landefläche für Proteine wie CDC6, den Helikasekomplex *mini chromosome maintenance complex* (MCM2-7) und schließlich *cell division cycle 45* (CDC45) mit der DNA -Polymerase α , die zur Duplikation der DNA in der S-Phase benötigt werden¹⁵. Die Tatsache, dass die Replikation der DNA unter physiologischen Bedingungen nur einmal in einem Zyklus stattfindet, wird über zwei Mechanismen gesichert: Zum einen ist die Initiation der Replikation ein stufenweiser Prozess, der die konsekutive Anlagerung einiger Proteine erfordert, zum anderen wird der Komplex in der S-Phase über Ubiquitinylierung und nachfolgendem Abbau von ORC1 deaktiviert.

Der ORC Komplex ist ursprünglich in seiner Funktion als Initiator der Replikation entdeckt worden, zusätzlich ist er in Zellzyklusprozesse in der Mitose sowie in die Regulation der Genexpression über Formierung von Heterochromatin involviert¹⁶⁻¹⁸.

2.2.1. Das ORC1 Protein

ORC1 ist die größte der sechs Untereinheiten des ORC.

Im Menschen und bei Ratten führt eine autosomal rezessive *Orc1* Mutation (aber auch *Orc4*, *Orc6*, *cdc6* Mutation, u.a.) zum Meier-Gorlin-Syndrom, welches mit Wachstumsretardierung, Skelettanomalien, Mikrozephalie und fazialen Dysmorphien assoziiert ist¹⁹.

Codiert wird *Orc1* auf 17 Exons auf Chromosom 4 und besteht aus 840 Aminosäuren. Es existieren fünf Spleißvarianten, wobei eine Spleißvariante, codiert auf 17 Exons, exprimiert werden kann, welche keine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) besitzt und somit nicht in den Zellkern transportiert werden kann²⁰. Die Expression von *Orc1* in proliferierenden Zellen wird über die zellzyklusaktivierenden E2F-Transkriptionsfaktoren gesteuert²¹.

ORC1 besitzt eine Bromoadjacent (BAH)-Domäne, eine ATPase-Domäne und eine CDC6-Bindungsdomäne. Die BAH-Domäne von ORC1 vermittelt die Bindung zum Chromatin, so dass über die Rekrutierung von chromatinmodellierenden Proteinen die Chromatinstruktur verändert und eine Expression der in diesem Bereich liegenden Gene verhindert werden kann. Dies wird als *silencing* bezeichnet^{22,23}. Dazu können ORC1 sowie ORC3 das Protein *heterochromatin protein 1a* (HP1a) rekrutieren²⁴.

Wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben, ist ORC1 die regulatorische Domäne des ORC. Die Assoziation von ORC1 an den Komplex und somit die Funktion des ORC wird über zellzyklusabhängige Modifikationen von ORC1 reguliert. In G2/M wird ORC1 durch die

wie die Caspase 3 proteolytisch aktiviert. Die Substrate der Effektorcaspasen sind die Lamine, das Aktinskelett und ein DNAase-hemmendes Protein.

Der intrinsische Weg wird über die Freisetzung von Apoptose-induzierenden Proteinen wie AIF (apoptosis inducible factor), dATP und Cytochrom C aus den Mitochondrien eingeleitet. Diese Aktivierung ermöglicht die Formierung eines Komplexes, das sogenannte Apoptosom, das aus Cytochrom C, dATP, APAF1 (apoptotic protease-activating factor1) und der pro-Caspase 9 besteht^{27,28}. Dadurch werden ebenfalls Effektorcaspasen aktiviert. Diese beiden Wege können sich zudem gegenseitig aktivieren.

Das p53 Protein, das aufgrund seiner Rolle in der Einleitung von Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose als Tumorsupressorgen identifiziert wurde, spielt in der Regulation von unzähligen Genen eine Rolle, die in diese Prozesse involviert sind²⁹.

Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen schwellen nekrotische Zellen an, die Zellmembran wird aufgelöst und zyttoplasmatische Proteine und Zellbestandteile werden freigesetzt. Dadurch wird im umliegenden Gewebe eine Entzündungsreaktion ausgelöst³⁰.

Zwischen diesen beiden Arten des Zelltodes kann es fließende Übergänge geben, die z.B. vom Ausmaß der Schädigung oder dem schädigenden Agens abhängig sind.

2.3.1. Die Rolle von E2F1 in der Apoptose

Der Transkriptionsfaktor E2F1 ist neben seiner Funktion in proliferierenden Zellen den G1/S-Übergang einzuleiten auch in der Lage, Apoptose zu induzieren. Die Apoptoseinduktion durch E2F1 geschieht vor allem nach Schädigung der zelleigenen DNA. E2F1 akkumuliert und wird von ATM (ataxia telangiectasia mutated) phosphoryliert und von p300/CBP acetyliert³¹. RB wird ebenfalls acetyliert und löst sich dabei von E2F1. Somit wird E2F1 stabilisiert, transkriptionell aktiv und treibt die Expression pro-apoptotischer Faktoren wie den Caspasen 3,7,8 und 9, APAF1 und p53³². Das nach DNA Schädigung pro-apoptotische und nicht zellzyklustreibende Zielgene exprimiert werden, hängt mit Protein-Protein Interaktionen - u.a. mit p53 - von E2F1 zusammen^{33,34}.

2.4. Schlaganfall

Die klinische und die laborexperimentelle Forschung im Bereich des Schlaganfalls haben aufgrund der hohen Lebenszeitprävalenz für einen Schlaganfall (in Deutschland: 2,9% der 40-97 jährigen) und nachfolgender Behinderung der Patienten einen hohen Stellenwert¹¹⁸. Ein Schlaganfallereignis stellt die dritthäufigste Todesursache in Industrienationen und den häufigsten Grund für permanente Behinderungen dar³⁵.

Ein ischämischer - mit thrombotischem oder thrombembolischem Verschluss eines hirnersorgenden Gefäßes - oder hämorrhagischer Schlaganfall geht mit der Minderversorgung von Hirngewebe einher. Nervenzellen stellen bezüglich dieser Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen die sensitivsten Zellen dar. Bereits innerhalb von Minuten nach Auftreten einer Minderversorgung degenerieren Neurone. Dabei unterscheidet sich die Art des Zellsterbens vom Ausmaß der Schädigung und wird im Kern-Penumbra Modell beschrieben. Zellen, die sich im Kern der Schädigung befinden, gehen zuerst durch Nekrose unter. In der Penumbra existieren Neurone, die überleben oder aber Apoptose begehen³⁶. Bei einem Blutfluss von ungefähr 0.15 ml/g/min können die Neurone in der Penumbra das Membranpotential noch aufrechterhalten, jedoch sind die kortikal evozierten Potentiale beeinträchtigt. Sinkt der Blutfluss auf 0,06-0,10 ml/g/min ab, korreliert dies mit Infarzierung des Gewebes³⁷.

Die Neurone in der Penumbra, die metabolisch unterversorgt und elektrophysiologisch inaktiv sind, jedoch nicht einem definitivem Prozess des Zelluntergangs zugeordnet sind, können durch Interventionsmaßnahmen nach einem Schlaganfall gerettet werden. Diese sind Ziel therapeutischer Maßnahmen.

Wie die klinischen Studien der aktuell leitliniengerechten Therapie nach ischämischen Hirninfarkt zeigen, ist für das *Outcome* der Patienten die Zeit bis zur Thrombolyse und/oder endovaskulären Thrombektomie relevant^{38,39}. Somit existiert für die intravenöse Thrombolysetherapie mit rtPA ein Zeitfenster von bis zu 4,5 Stunden nach Auftreten der Symptome^{40,41}. Eine begleitende medikamentöse Therapie zum Schutz der Neuronen steht derzeit nicht zur Verfügung.

2.4.1. Zelluläre Prozesse nach zerebraler Ischämie/Hypoxie

Die Schädigungsmechanismen während eines Schlaganfallereignisses sind komplex und wurden von Dirnagl et. al in dem folgenden Diagramm vereinfacht dargestellt⁴²:

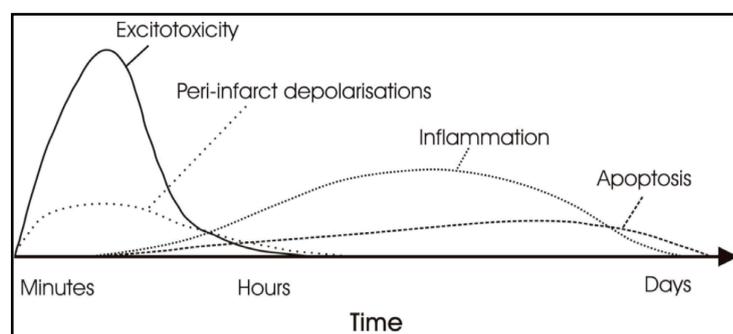


Abb.1.4.: Zeitlicher Verlauf der pathophysiologischen Ereignisse nach ischämischer/hypoxischer Schädigung. Innerhalb von Minuten findet die Exzitotoxizität gefolgt von einer Peri-

Infarktdepolarisation statt. Von Minuten bis Tagen setzen eine Entzündungsreaktion und die Apoptose ein. Aus Trends in Neurosciences 22, 391-397 (1999) ⁴²

Nach Minderung der Blutversorgung und somit einem Mangel an Sauerstoff und Glukose, findet die Exzitotoxizität über Ausschüttung von Neurotransmittern wie Glutamat statt ⁴³. Glutamat bewirkt eine Aktivierung von Glutamatrezeptoren vor allem von NMDA-(N-Methyl-Aspartat), aber auch KA-(Kainat) und AMPA-(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) Rezeptoren, welche ihre Calcium- und Kaliumpermeabilität erhöhen. Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran, Caspaseaktivierung und Freisetzung von freien Sauerstoff- und Stickstoffradikalen ^{44,45}.

Zusätzlich ist das Mitochondrium durch die fehlende Nährstoffversorgung und durch reaktive Sauerstoffradikale (reactive oxygen species: ROS) nicht mehr in der Lage, die Calciumhomöostase und den Energiehaushalt mit ATP-Produktion zu regulieren ⁴⁶.

Die Apoptose kann sekundär durch p53- und E2F1-medierte Caspaseaktivierung eingeleitet werden ^{47,48}.

Ionenveränderungen und der Sauerstoffmangel führen zu einer sogenannten Periinfarktdepolarisation bestimmter Neurone in der Periinfarktregion. Dieser Prozess beeinflusst das Ausmaß des Schadensareals ³⁷.

Stunden nach einem Schlaganfall setzen eine Entzündungsreaktion mit Einbeziehung immunologischer Zellen und die Apoptose ein. Diese Apoptose wird - wie bereits beschrieben - über den intrinsischen Weg und durch an der Entzündungsreaktion beteiligte Proteine - wie TNF - über den extrinsischen Weg eingeleitet ⁴⁹.

2.5. Neuronaler Zellzyklus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Terminal differenzierte, mature Neurone haben sich aus neuronalen Vorläuferzellen entwickelt. Im adulten Gehirn findet die Neurogenese in zwei Regionen statt. In der subgranulären Zone des Gyrus dentatus des Hippokampus und der subventrikulären Zone des Seitenventrikels gehen durch asymmetrische Teilung eine neurale Stammzelle und eine neuronale Vorläuferzelle hervor, die zum Neuron reifen kann ⁵⁰. Neuronale Vorläuferzellen befinden sich zunächst als neuroepitheliale Zellen in der ventrikulären Zone ⁵¹. Nach der Mitose wandern einige in Richtung Ventrikel, wo sie dann zu Neuronen oder Gliazellen reifen. Die Lokalisation des Kerns der proliferierenden Vorläuferzelle korreliert mit ihrem

Zellzyklusstand. So befinden sich Kerne der Zellen in S-Phase in der äußeren Zone und Kerne mitotischer Zellen an der Oberfläche zum Ventrikel hin ⁵².

Während dieses Entwicklungsprozesses ist die Expression von Zellzyklusfaktoren sowie Apoptosefaktoren unabdingbar ^{53,54}. Sowohl die Vermehrung, die Differenzierung als auch die Migration sind durch Zellzyklusfaktoren reguliert ⁵⁵.

Für die Neurogenese, die in eine Proliferations- und eine Differenzierungsphase eingeteilt werden kann, scheint eine Verlängerung der G1-Phase und ein Ausstieg aus dem Zellzyklus nötig zu sein ⁵⁶. Dabei wurde der zellzyklusinhibierende Faktor p27 aus der CIP/KIP Familie der CKIs als Regulator in der Differenzierung und Migration von kortikalen Neuronen identifiziert ⁵⁷.

Aus Studien an Mäusen während der Entwicklung von Embryonaltag E11 bis zum Postnataltag P0 ist bekannt, dass während der Differenzierung neuronaler Zellen die Transkription proliferativer Faktoren wie *Cdk2*, *Cdk4*, *Mcm2*, *Orc2l* sowie von Transkriptionsfaktoren wie *FoxM1* und *MycBP* reduziert wird ⁵⁸.

Die E2F-Transkriptionsfaktoren scheinen ebenfalls Einfluss auf die Entwicklung von Neuronen zu haben ⁵⁹. So wurde die Expression von *E2f1*, *E2f2* und *E2f5* in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen nachgewiesen. Während der Differenzierung gehen diese verloren ⁶⁰. *E2f1 knock out* Mäuse zeigen eine beeinträchtigte Neurogenese ⁶¹.

E2F4 hingegen scheint bei der neuronalen Differenzierung und Aufrechterhaltung dieses Status von Bedeutung zu sein ⁶². *E2f4 knock out* Mäuse weisen ein kleineres Telenzephalon und eine beeinträchtigte Erneuerung von neuronalen Vorläuferzellen auf ⁶³.

Differenzierte Neurone sind bezüglich ihres Expressionsprofils ständigen dynamischen Veränderungen unterworfen. Diese werden durch interne Aktivitätsmuster, Änderungen der Plastizität an Synapsen und Konnektivität zwischen Hirnarealen oder äußere Stressfaktoren beeinflusst.

Unter physiologischen Bedingungen wurde für Proteine, die in der Funktion als zellzyklusregulierende Proteine bekannt sind, in ausdifferenzierten Neuronen eine neuronal spezifische Funktion außerhalb der Zellzyklusregulierung gefunden.

So wurde der E2F3/RB Komplex als Regulator der tangentialen Migration für Interneurone identifiziert ⁵⁵.

Nach der Differenzierung finden in Neuronen Prozesse wie Auswachsen des Axons und der Dendriten statt. Die synaptischen Verbindungen sind modulierbar, was als synaptische Plastizität bezeichnet wird. Der *Anaphase Promoting Complex (APC)*, der in proliferierenden Zellen durch seine Funktion als E3-Ubiquitin Ligase den Austritt aus der Mitose einleitet, besitzt in den Synapsen von Neuronen mehrere Funktionen: So reguliert er die Anzahl synaptischer Boutons und die Signalweiterleitung an glutamatergen neuromuskulären und an GABAergen Synapsen ⁶⁴⁻⁶⁶.

Die Proteine des ORC, davon jedoch nur ORC2 -6, lassen sich ebenfalls in den Synapsen nachweisen. Aus Studien mit hippocampalen Neuronen ist das ORC3 Protein für die dendritische *Spine*-Dichte und das Auswachsen von Dendriten nötig. Für ORC6 ist eine Bindung zum Aktin-Zytoskelett in Neuronen nachgewiesen ⁶⁷. Die genauere Funktion der ORC-Proteine in differenzierten Neuronen bleibt zu untersuchen.

2.5.1. Der aberrante Zellzykluseintritt nach neuronaler Schädigung

Pathophysiologische Stimuli führen in Neuronen zur Aktivierung von Signalkaskaden, in denen zellzyklusregulierende Proteine involviert sind.

Zur Untersuchung der zerebralen Ischämie/Hypoxie *in vivo* wird das Tiermodell der *middle cerebral artery occlusion* (MCAo) in der Maus oder auch Ratte eingesetzt. Dabei wird die Art. Cerebri media für 30 oder 60 Minuten mit einem Faden verschlossen und wieder eröffnet. Somit wird bei 30-minütigem, transientem Verschluss eine ischämische Parenchymnekrose mit relativ selektiver Schädigung der Projektionsneurone im lateralen Striatum erreicht, bei der die Gliazellen weitestgehend ausgespart bleiben. Bei einer Verschlusszeit von 60 Minuten wird eine Pannekrose unter Einbeziehung des Kortex modelliert. Der längere Verschluss simuliert dabei einen großen Territorialinfarkt, der einem malignen Mediainfarkt beim Menschen gleichen könnte. Zellzyklusfaktoren beeinflussen im Mausmodell der zerebralen Ischämie/Hypoxie den Grad der Schädigung. So weisen *E2f1 knock out* Mäuse ein vermindertes geschädigtes Areal nach MCAo im Vergleich zu Kontrolltieren auf ^{68,69}. In Ratten konnte gezeigt werden, dass adenoviral eingebrachtes E2F4 die Neurone vor neuronalem Zelltod im Modell der transienten globalen Hypoxie schützt ⁷⁰.

Ein Modell des ischämischen Schlaganfalls in Zellkulturen ist der kombinierte Sauerstoff- und Glukoseentzug (oxygen glucose deprivation: OGD). Dabei werden primären, kortikalen Neuronen in Kultur in einer Hypoxiekammer Sauerstoff und Glukose für eine definierte Zeit entzogen. Zu gewünschten Zeiten nach Reoxygenierung kann man die Komponenten der Schadenskaskade nach Hypoxie analysieren ⁷¹.

Aus diesen Modellstudien der zerebralen Ischämie/Hypoxie und Studien zur Alzheimer Forschung kennt man das Phänomen des aberranten Zellzykluseintritts von degenerierenden Neuronen nach pathophysiologischen Stimuli ⁷².

So werden in Neuronen nach ischämischer Schädigung die CKIs p16 und p27 abgebaut und Zellzyklusfaktoren wie *Zyklin D1* und *Cdk4* werden vermehrt exprimiert oder aktiviert ⁷³. Hemmt man die Induktion von *Zyklin D1/Cdk4* kann neuronaler Zelltod verhindert werden ^{74,75}.

Zahlreiche Studien mit unterschiedlichen Schädigungsparadigmen untersuchten, inwieweit die Neurone den Zellzyklus durchlaufen. Zur Untersuchung von Zellen in der S-Phase wird das Thymidinanalogon Bromodeoxyuridin (BrDU) als Marker für die DNA-Synthese genutzt,

wobei die Inkorporation von BrDU auch im Rahmen der DNA-Reparatur erfolgen kann⁷⁶. Zur BrDU-Inkorporation in Neuronen nach ischämischer Schädigung liegen diskrepante Ergebnisse vor. In den meisten Studien fand sich nach Schädigung in nur sehr wenigen, postmitotischen neuronalen, apoptotischen Zellen ein BrDU Signal⁷⁷⁻⁷⁹. So war 72h nach MCAo in <0.1% der sterbenden Zellen (markiert durch *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*: TUNEL+) ein BrDU Signal zu finden⁸⁰. Daraus ergab sich aber auch, dass >99% der TUNEL+ Neuronen keine BrDU Inkorporation aufwiesen. Wen et. al beschreiben „zahlreiche“ BrDU-positive Zellen. 79 % der BrDU-positiven Zellen wiesen 24 h nach MCAo ein TUNEL-Signal auf. Davon waren „einige“ zusätzlich MAP2 positiv⁸¹. MAP2 ist ein Marker für einen postmitotischen neuronalen Phänotyp.

Die DNA-Synthese nach neuronaler Schädigung scheint einzutreten, aber ein seltenes Ereignis zu sein. Diskutiert wird, dass sie auf sterbende neuronale Vorläuferzellen zurückzuführen ist^{79,80}. Insgesamt zeigen die Studien, dass durch eine Hochregulation von zellzyklustreibenden Faktoren - mit oder ohne vorherigen Eintritt in die S-Phase - die Apoptose eingeleitet wird. Vermutlich ist dabei die Aktivierung des G1/S-Phase *checkpoint* verantwortlich⁸².

Ein interessanter Aspekt bezüglich der neuronalen Zellzyklusregulation ist, dass nach ischämischer Schädigung selektiv die Neurogenese induziert wird. Es wurde gezeigt, dass neuronale Vorläuferzellen aus der subventrikulären Zone in das geschädigte Gebiet einwandern können und auch ortsansässige neuronale Progenitorzellen in der Zone 1 des Neocortex nach MCAo zur Neurogenese angeregt werden^{83,84}. Die Einwanderung der Vorläuferzellen scheint zudem von funktioneller Bedeutung. Denn die Hemmung von neuronalen Progenitorzellen nach einem Schlaganfall hat negative Auswirkungen auf das Lernen nach einem Insult⁸⁵.

Der aberrante Zellzykluseintritt mit Reaktivierung von Zellzyklusfaktoren in Neuronen ist einerseits grundlegend für neuronale und weitergehend funktionelle Regeneration, andererseits - und in diese Richtung gehen die meisten Forschungsergebnisse - führt diese Zellzyklusreaktivierung in postmitotischen Neuronen zum Zelltod. Welche Faktoren an der Entscheidung zwischen Regeneration und Degeneration entscheidend beteiligt sind, ist bislang nicht geklärt.

2.6. Zielsetzung

Postmitotische Neurone werden unter physiologischen Bedingungen an einem Wiedereintritt in den Zellzyklus gehindert und befinden sich daher in der G0-Phase. Nach einer hypoxischen Schädigung oder einer fokalen Ischämie weisen Neurone eine Regulation der CKIs und der Zyklin/CDK Komplexe auf. Ein tatsächlicher Übergang in die S-Phase,

verbunden mit der Inkorporation des Thymidin-Analogs BrDU, scheint jedoch ein in seiner Bedeutung ungeklärtes und seltenes Phänomen des aberranten Zellzykluseintrittes zu sein. Nicht genau geklärt ist somit, ob die DNA Synthese und der konsekutive Zelltod nur in einer neuronalen Subpopulation zu finden ist, wohingegen eine andere Subpopulation zwar nach Reaktivierung von Zellzyklusfaktoren, jedoch ohne vorherige DNA Synthese stirbt. Weiterhin stellt sich die Frage, ob die intrinsischen Zelltodinduktoren- wie Zyklin D1, E2F1- und die extrinsischen Zelltodinduktoren - wie Glutamat - gleicherweise über die gemeinsame Endstrecke des Zellzykluseintrittes zum neuronalen Zelltod führen.

Da vor dem Eintritt in die S-Phase die Assemblierung des ORC Komplexes stattfindet, jedoch ORC1 das einzige Protein dieses Komplexes ist, welches unter physiologischen Bedingungen in Neuronen kaum exprimiert wird, wird ORC1 in einem Kandidatenansatz genauer untersucht und es stellten sich folgende Kernfragen:

- 1: Ist die ORC1 Expression im pathophysiologischen Kontext des Schlaganfalls in Neuronen verändert?
2. Ist ORC1 in Neuronen über die E2F-Transkriptionsfaktoren reguliert?
3. Ist die Anwesenheit von ORC1 in Neuronen protektiv -im Sinne der neuronalen Regeneration- oder lethal im Sinne einer Apoptose/Nekroseinduktion?

In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Frage, ob der Weg des Zellzykluseintrittes obligat für neuronales Zellsterben ist und ob ein Schlüsselprotein als Regulator in der neuronalen Zelltod-Signalkaskade existiert.

Durch neuronal spezifische Untersuchungsansätze wurde hier die Rolle von ORC1 in der neuronalen Schadenskaskade nach kombiniertem Sauerstoff – und Glukoseentzug (OGD) charakterisiert.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterienstämme

Tab.1: Bakterien

Top10 (Invitrogen)	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-McrBC) ϕ 80lacZdM15 Δ lacX74 recA1D139 Δ (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) end A1upG	Stbl3 (Invitrogen)	F- mcrB mrr hsdS20 (rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str) xyl-5 λ -
-----------------------	---	-----------------------	--

Zelllinien

Tab.2: Zelllinien

Hek293FT	humane embryonale Nierenzelllinie; stabil transfiziert mit SV40	HT22	murine Hippokampuszelllinie
----------	---	------	-----------------------------

3.1.2. Lösungen

Zellkultur

BSS0 Puffer	143 mmol/L Na, 5.5 mmol/L K, 1.8 mmol/L Ca ₂ , 1.8 mmol/L Mg ₂ , 125 mmol/L Cl, 26 mmol/L HCO ₃ , 1 mmol/L PO ₄ , and 0.8 mmol/L SO ₄ , pH 7.4 in H ₂ O
Kollagen Medium	10% FCS, 100 IU/ml Penicillin/ Streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mg/ml Collagen in DMEM
Hek293FT Kulturmedium	10% FCS Gold, 1% MEM, 1 mM Glutamine, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 500 μ g/ml Geneticin in DMEM
- für Virusproduktion	Hek293FT Kultur Medium, 100 mM Pyruvate
HT22 Kulturmedium	10% FCS, 100 IU/ml Penicillin/ Streptomycin in DMEM
Neurobasal Medium	NBM mit B27 Supplement, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mmol/L L-Glutamine
Starter Medium	NBM mit B27 supplement, 25 mM Glutamate
1x PLL Lösung	0.1 mg/ml Poly-L-Lysine in PBS

Biochemie

Blocklösung	5% Milchpulver in TBST
Zellyse Puffer	10 mM Hepes pH 7.5, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 10 mM NaF, 0,1 mM Na-ortho-Vanadat, 1% NP40, 1 Proteaseinhibitortablette (Roche)
Zellyse Puffer (Chromatin)	25 mM Hepes, pH 7.8, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1% NP-40, 0,5 mM PMSF, 1 Proteaseinhibitortablette (Roche)
5x Zellyse Puffer (Luziferase)	25 mM Tris Phosphat pH 7,8, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 10% Glycerin, 1% Triton
Luziferase-Assay Reagenz	20mM Tricin pH 7,8, 1,07 mM $(MgCO_3)4Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$, 2,67 $MgSO_4$, 0,1mM DTT, 33,3 μ g Coenzym A, 530 μ M ATP, in 10ml werden 7mg des lyophilisierten Luziferins gelöst; Lagerung bei -70°C
LB (Luria Bertani) Medium	1% Tryptone, 1% Hefeextrakt, 1% NaCl in H_2O
LB Agarose Platten	1% Trypton, 1% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1.5% Agar in H_2O
Verdünnungspuffer	20 mM Tris-HCL pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X, 0,1% Na-deoxycholat, 0,1% SDS, 0,5 mM PMSF, 1 Proteaseinhibitortablette
LiCl- Waschpuffer	20 mM Tris-HCL pH 8, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0,5% Na-deoxycholat, 0,5% NP-40, 0,5 mM PMSF, 1 Proteaseinhibitortablette
Lyse Puffer	100 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2% SDS
Kernlyse Puffer	500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM NaF, 10% glycerol, 0.2% NP40, 5 mM $MgCl_2$, 1 Proteaseinhibitortablette
Kernlyse Puffer (Chromatin)	50 mM Hepes pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X, 0,1% Na-deoxycholat, 0,1% SDS, 0,5 mM PMSF, 1 Proteaseinhibitortablette (Roche)
PBS	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 6,4 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
Ripa Puffer (Lyse Puffer)	3 mM Na-ortho-Vanadat, 50 mM Tris-HCL pH 7,5, 250 mM NaCl, 0.5% NP40, 5 mM EDTA pH 8,0, 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 1 Proteaseinhibitortablette
Lämmli Probenpuffer (4x)	25% Glycerol; 5% SDS; 200 mM Tris; 0.002% Bromphenolblau; 10% 2-Mercaptoethanol; pH 6,8
Semi-dry Transfer Puffer	1x SDS Laufpuffer, 10% Methanol
SDS Laufpuffer (10x)	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS in H_2O
SOC Medium	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glukose, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $MgCl_2$
TAE Puffer	40 mM Tris; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA; pH 8
TE Puffer	10 mM Tris, 0,1mM EDTA

Tris buffered saline (TBS) 20 mM Tris/HCl pH 6,8

TBST 1x TBS, 0,05% v/v Tween

3.1.3. Chemikalien

Agarose	(Eurogentec, Belgium)
Ampicillin	(Serva, Heidelberg)
Blasticidin	(Invitrogen, USA)
Bovine serum albumin (BSA)	(Sigma, Steinheim)
Bromphenolblau	(Sigma, Steinheim)
B27	(Gibco, USA)
Calciumchlorid	(Roth, Karlsruhe)
Chloroform (99,9%)	(Roth, Karlsruhe)
Collagen	(Biochrom AG, Berlin)
DMEM	(Biochrom AG, Berlin)
(Dulbeccos modified Eagles Medium)	
DMEM mit stabilem Glutamin	(Biochrom AG, Berlin)
DNA-Ladepuffer	(Fermentas, USA)
DNA-Ladder (1kb plus)	(Invitrogen, USA)
Donkey Serum	(Millipore, USA)
Dual color precision plus Protein Standard	(BIO-RAD, USA)
Ethylenediamintetraessigsäure	(Roth, Karlsruhe)
Ethanol (99.9%)	(Roth, Karlsruhe)
Ethidiumbromid	(Sigma, Steinheim)
Fetal calf Serum (FCS)	(Biochrom AG, Berlin)
Formaldehyde (37 %)	(Roth, Karlsruhe)
Geneticin	(PAA, Cölbe)
Glutamat	(Sigma, Steinheim)
Glycerol	(Roth, Karlsruhe)
Glycin	(Roth, Karlsruhe)
D-(+)-Glucose	(Sigma, Germany)
Hydrogen chlorid	(Roth, Karlsruhe)
Hepes	(PAA, Cölbe)
Isopropanol (99,9%)	(Roth, Karlsruhe)
L-Glutamin	(Biochrom AG, Berlin)

Methanol	(Roth, Karlsruhe)
MEM (not essential amino acids)	(Gibco, USA)
Milchpulver	(Roth, Karlsruhe)
Nicotinamide adenine dinucleotide,	(Sigma, Steinheim)
Neurobasal Medium	(Gibco, USA)
Nonidet P40 (NP-40)	(Roche Diagnostics, Mannheim)
Optimem	(Gibco)
Page ruler pre-stained Protein Leiter	(Fermentas, USA)
Paraformaldehyd (PFA)	(Merck, Darmstadt)
Phenyl-methane-sulfonyl Fluorid	(Sigma, Steinheim)
Penicillin/ Streptomycin	(PAA, Cölbe)
Poly-L-Lysin	(Biochrom AG, Berlin)
Polyvinylidene-Fluoride Membran	(Roth, Karlsruhe)
Precast Polyacrylamide Gels 4-20%	(Lonza, USA)
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	(Invitrogen, USA)
Propidium-iodid	(Sigma, Steinheim)
Protease Inhibitor Tabletten	(Roche Diagnostics, Mannheim)
Proteinase K	(Quiagen, Hilden)
Pyruvat	(Sigma, Steinheim)
Protein A Sepharose Beads	(GE Healthcare, England)
Sodium Chlorid	(Roth, Karlsruhe)
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	(Roth, Karlsruhe)
Sodium Fluorid	(Roth, Karlsruhe)
Sodium ortho Vanadate	(Sigma, Steinheim)
Sodium Pyruvat	(Gibco, USA)
TEMED	(Sigma, Steinheim)
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	(Roth, Karlsruhe)
Triton X-100	(Roth, Karlsruhe)
Trizol Reagenz	(Invitrogen, USA)
Trypsin-EDTA (0.05%)	(Biochrom AG, Berlin)
Trypton	(Serva, Heidelberg)
Tween 20	(Roth, Karlsruhe)
Ultra pures Wasser	(Biochrom AG, Berlin)
Hefeextrakt	(Roth, Karlsruhe)

3.1.4. Geräte und Ausrüstung

ABI PRISM 7000 Detection System	(Applied Biosystems, USA)
Biofuge Fresco Zentrifuge	(Heraeus, Hanau)
BioDoc Analyser	(Biometra, Göttingen)
Blotting Kammer	(BioRad, München)
Agagel Maxi	(Biometra, Göttingen)
Gelelektrophoresekammer	(BioRad, München)
FACScalibur	(Becton Dickinson)
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	(Roth, Karlsruhe)
Fusion Multiwell-Plattenlesegerät	(PerkinElmer, USA)
FUSION Chemolumineszenz System	(VWR, Darmstadt)
Hera Cell 240 Inkubator	(Heraeus, Hanau)
Hera Safe Zellkulturbank	(Heraeus, Hanau)
Julabo Wasserbad SW 22	(Julabo, Seelbach)
Mastercycler RealPlex PCR Maschine	(Eppendorf, Hamburg)
Nanodrop® ND-1000 Spectro- photometer	(Montchanin, USA)
S-250/450D Digital Sonifier Cell Disruptor	(Branson, USA)
OGD chamber 'IN VIVO2 300'	(Ruskin, UK)
Olympus IX81 Mikroskop	(Olympus, Hamburg)
Olympus Cell ^M Imaging Software	(Olympus, Hamburg)
pH Meter	(VWR, Darmstadt)
Tischzentrifuge 5417R	(Eppendorf, Hamburg)
UltraTurrax	(Janke & Kunkel, Staufen)
Vortex Genie 2	(Bohemia, USA)

3.1.5. Enzyme und Reagenzsysteme

Restriktionsendonukleasen, 10xPuffer, 100x BSA	(New England Biolabs)
T4 DNA Ligase, 10x T4 Ligase Puffer	(New England Biolabs)
Bradford Protein Assay	(BIO-RAD, USA)
CalPhos TM Mammalian Transfection Kit	(Clontech, USA)
ECL Plus Western Blotting Detection	(GE Health Care, München)
Invisorb® Spin Tissue RNA Mini Kit	(Invitek, USA)
Peg-iT® Virus Precipitation Kit	(System Bioscience, USA)
Platinum SYBR® Green qPCR Super- Mix-UDG	(Invitrogen, USA)

Qiagen Maxi Kits	(Quiagen, Hilden)
QIAGEN plasmid Mini purification Kit	(Quiagen, Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	(Quiagen, Hilden)
Superscript II reverse transcriptase Kit	(Invitrogen, USA)
ViraPower™ Lentiviral Expression Systems	(Invitrogen, USA)
CellTiterGlo® cellviability Kit	(Promega, Mannheim)

3.1.6. PCR Primer und miR-shRNAs

Alle Oligonucleotide wurden von MWG synthetisiert. Die folgenden *small microRNA-embedded hairpin RNA* (miR-shRNA) Oligonucleotide wurden mit dem BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen) konstruiert und von MWG hergestellt.

Tab.3: PCR Primer

β-actin_forward	5'-GAAATCGTGCGTGACATCAAAG-3'
β-actin_reverse	5'-TGTAGTTTCATGGATGCCACAG-3'
Orc1_forward	5'-CAGCTAGTGCGCTGGAAGA-3'
Orc1_reverse	5'-TTGGAATTCCTGCTCTCGAC-3'
Orc2_forward	5'-TCATGTTGTCATCAACGGCTA-3'
Orc2_reverse	5'-AGGACATCTTCAGTTATAGAGTTCAGG-3'
Orc3_forward	5'-CCTGCTGATCAACCTCGTC-3'
Orc3_reverse	5'-TGCATCCATTTTCTCAGCAG-3'
Orc4_forward	5'-ACACCCATTTATGACTTCAGCA-3'
Orc4_reverse	5'-CAGATTTCCAAGACTGACAGACC-3'
Orc5_forward	5'-CCATTTGTCTTATATTTCCCTGACTAT-3'
Orc5_reverse	5'-GCGTAAAAATCCGCTGAATACT-3'
Orc6_forward	5'-GATCGACTGTGTAAGCAGTTAGAAA-3'
Orc6_reverse	5'-TGGCTTCTTTCTTTTCAGTGC-3'
E2F4_forward	5'-CTGGACCAGCACAAGGTGT-3'
E2F4_reverse	5'-GGCAAGGAGGGTATCTCCA-3'
GAPDH_forward	5'TGACCACAGTCCATGCCATC -3'
GAPDH_reverse	5'GACGGACACATTGGGGGTAG-3'
ChIP Orc1Prom_forward	5'-GGTTAGTGGCGCGAAAAGT-3'
ChIP Orc1Prom_reverse	5'-TCCCAGCTCTCAGCTGACTAA-3'
ChIP γ-actinProm_forward	5'-GCTTTGCTGGTGACTACGC-3'
ChIP γ-actinProm_reverse	5'-TCACCCACGTACGAGTCTTTC-3'
Sequ_miR-shRNA_forward	5'-CGAGAAGCGCGATCACATGG-3'

Tab.4: miR-shRNAs

ORC1_1	330
5'- GCTGAGAGACAGGAATCTCAAGGAAGTTTTGGCCACTGACTGACTTCCTTGATTCTGTCTCT -3'	
5'- CCTGAGAGACAGGAATCAAGGAAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTTCCTTGAGATTCTGTCTCTC -3'	
ORC1_2	714
5'- TGCTGATTAGCAGGAGTCTGGTGAAAGTTTTGGCCACTGACTGACTTTCCACTCCTGCTAAT -3'	
5'- CCTGATTAGCAGGAGTGGTGAAAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTTCACCAGACTCCTGCTAATC -3'	
Orc1_3	Chain: Gensynthese enthält zwei miR-shRNA
5- TGCTGAACACGTAGTCCCAGCTCTCAGTTTTGGCCACTGACTGACTGAGAGCTGACTACGT	
GTTCCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCAGATCTCTGGAGGCTTGCTGAAGG	
CTGTATGCTGAGAGACAGGAATCTCAAGGAAGTTTTGGCCACTGACTGACTTCCTTGATTCTGTCTCTCAGG	
ACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCCCGGGCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTAT	
GCTGTGAACAGGGCCAATGATGGTCGTTTTGGCCACTGACTGACGACCATCAGGCCCTGTTCA -3'	
5- CCTGTGAACAGGCCTGATGGTCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGACCATCATTGGCCCTGTT	
CACAGCATACAGCCTTCAGCAAGCCTCCAGCCCCGGGGCCATTTGTTCCATGTGAGTGCTAGTAACAGGCC	
TTGTGTCCTGAGAGACAGGAATCAAGGAAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTTCCTTGAGATTCTGTCTCTCAG	
CATAAGCCTTCAGCAAGCCTCCAGAGATCTGGCCATTTGTTCCATGTGAGTGCTAGTAACAGGCCTTGTGT	
CCTGAACACGTAGTCAGCTCTCAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTGAGAGCTGGGACTACGTGTTTC -3'	
E2F4_1	159
5'- TGCTGTGCAAGAGCGACACGAACTTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAAGTTCGTGCTCTTGCA -3'	
5'- CCTGTGCAAGAGCGACGAACTTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCAAGTTCGTGCTGCTCTTGCA -3'	
E2F4_2	874
5'- TGCTGACTCACTGCAATCTCAGATGTGTTTTGGCCACTGACTGACACATCTGATTGCAGTGAGT -3'	
5'- CCTGACTCACTGCAATCAGATGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACACATCTGAGATTGCAGTGAGTC -3'	
E2F4_3	Chain: Gensynthese enthält zwei miR-shRNA
5'- TGCTGTGCAAGAGCGACACGAACTTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAAGTTCGTGCTCTTGCA	
GGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGT	
ATGCTGACTCACTGCAATCTCAGATGTGTTTTGGCCACTGACTGACACATCTGATTGCAGTGAGT -3'	
5'- CCTGACTCACTGCAATCAGATGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACACATCTGAGATTGCAGTGAGTC	
AGCATACAGCCTTCAGCAAGCCTCCAGGATCTGGGCCATTTGTTCCATGTGAGTGCTAGTAACAGGCCTTGT	
GTCCTGTGCAAGAGCGACGAACTTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCAAGTTCGTGCTGCTCTTGCA -3'	
Scrambled miR-shRNA	
5'-TGCTGAAATGTAAGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT-3'	
5'-CCTGAAATGTAAGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACCTTTC -3'	
LacZmiR-shRNA (aus pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-mi-lacZ; Invitrogen)	
5'-TGCTGAAATCGCTGATTTGTGTAGTCGTTTTGGCCACTGACTGACGACTACACATCAGCGATTTTCAGG-3'	
5'-CCTGAAATCGCTGATGTGTAGTCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGACTACACAAATCAGCGATTTTCAGCA -3'	

3.1.7. Antikörper

Tab.5: Antikörper

Primär-antikörper	Verdünnung für Immunoblotting/ Immunfluoreszenz	origin	Firma
ORC1	1:500	rat anti-ORC1 7A7	(Cell signalling, USA)
E2F4	1:500	rabbit anti-E2F4 sc-1082X rabbit anti-E2F4 sc-866	(Santa Cruz Biotechnology, USA)
E2F1	1:500	rabbit anti E2F1 sc-193X (C20)	(Santa Cruz Biotechnology, USA)
GAPDH	1:75000	mouse anti-GAPDH 6C5	(Chemicon, USA)
HDAC	1:500	rabbit anti-HDAC sc-7872	(Santa Cruz Biotechnology, USA)
V5	1:5000	Mouse anti-V5 R960-25	(Invitrogen, USA)
mCherry	1:1000	Rat anti-RFP 5F8	(Chromotek, Martinsried)
Sekundär antikörper			
Anti-mouse conjugated to HRP	1:2500		(GE healthcare, England)
Anti-rabbit conjugated to HRP	1:2500		(GE healthcare, England)
Anti-rat conjugated to HRP	1:10000		(GE healthcare, England)

3.1.8. Vektoren

Tab.6: Vektoren

1. pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR	(Invitrogen)
2. psPAX2	(Addgene 12260)
3. pMD2.G	(Addgene 12259)
4. pFSy(1.1)GW	(Addgene 27232)
5. pFSy(1.1)GW mit EmGFP-miR-shRNA aus Vektor 1+4	
6. pLenti6/UbC/DEST™	(Invitrogen)
7. pENTR mCherry	
8. pCMV Sport6 Orc1 IRAVp968B0122D; Acc.-No.: BC015073	(Bio Source)
9. pLenti6/Orc1mCherry/DEST aus Vektor 6+8+9	
10. pFSY(1.1)GW E2F4-V5-DEST aus Vektor 4+Gensynthese E2F4 V5	
11. pFSY(1.1)GW Orc1 PromLUCT2AEGFP aus Vektor 4+Gensynthese Flex+Orc1 Prom	

3.1.9. Software

Microsoft Word/ Excel/ Power Point 2003/2013, Graph Pad Prism 5, Adobe Photoshop CS/CS3, SigmaStat, CellQuest, Cell M Olympus.

3.2 Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Zelllinien

Die in dieser Arbeit beschriebenen Zellen wurden in Adhäsionskultur in Zellkulturschalen (Durchmesser 6, 10, 15 cm) und 6, 24 bzw. 96 well-Platten der Firma TPP in den beschriebenen Medien unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂-Luftgemisch, 95% Luftfeuchte) kultiviert. Die hippokampale Zelllinie HT22 erhielt Kulturmedium basierend auf DMEM /10% FCS (weitere Zusammensetzung siehe Material). Um die Zellen in ihrem Wachstum zu synchronisieren wurden sie für 28 h in serumfreiem Medium gehalten und arretierten dann in der G₀-Phase des Zellzyklus. Nach Serumzugabe traten sie gemeinsam in den Zellzyklus ein. Die Hek293FT Zelllinie wurde in DMEM-basiertem Kulturmedium (weitere Zusammensetzung siehe Material) kultiviert und zur Produktion von Lentiviren wurde dieses Medium mit 100 mM Pyruvat versetzt.

3.2.1.2. Transiente Transfektion mit Calcium-Phosphat

Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 80% konfluent. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde mit entsprechender Menge 2,5 M CaCl₂ versetzt und mit sterilen ddH₂O auf 500 µl aufgefüllt. Nun legt man in ein Falconröhrchen 2xHBS vor, erzeugt mit einer Glaspipette Blasen, wobei man gleichzeitig den DNA-Mix tropfenweise hinzupipettiert. Es sollte ein weißliches Präzipitat sichtbar werden. Diese Lösung wurde auf das Zellmedium getropft und durch leichtes Schwenken der Kulturschale verteilt. Etwa 18 h später wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben.

3.2.1.2. Transiente Transfektion mit Lipofectamin®2000

Die transiente Transfektion mit Lipofectamin®2000 erfolgte nach dem Protokoll von Invitrogen. Somit wurden kortikale Neurone in Kultur auf einer 24 well Platte mit frischem Neurobasal Medium versetzt und das konditionierte Medium wurde aufbewahrt. Ein zuvor hergestelltes Gemisch aus 4 µg DNA und 8 µl Lipofectamin wurde zugegeben. Nach 45-minütiger Inkubation wird das Medium abgenommen und die Neurone mit dem konditionierten Medium versehen. 6 h nach Transfektion erfolgte die Analyse.

3.2.1.3. Produktion von Lentiviren der 3. Generation

Zur Produktion von neurotrophen Lentiviren wurde das System der 3. Generation verwendet^{86,87}. Durch Transduktion der Zellen mit den Lentiviren ist es möglich ein Gen oder eine miR-shRNA in den Zielzellen überzuexprimieren. Die Arbeit mit Lentiviren erfolgte unter S2 Sicherheitsbedingungen.

Um eine ca. 70-80% konfluente 175 mm² Zellkulturschale von Hek293 FT Zellen in 25 ml Medium zu transfizieren wurden 17,5 µg des Expressionsvektors mit den die viralen Hüll- und Verpackungsproteinen codierenden Vektoren (12,5 µg psPAX2, 7,5 µg pMD2.G) gemischt und nach dem oben erläuterten Verfahren mit Ca-Phosphat transfiziert. Das Gemisch wurde nach ca. 18 h abgenommen und die Zellen mit frischem Medium versetzt. Der virale Überstand wurde nach 2 und 3 Tagen abgenommen und zusammengeführt. Nach Entfernen der groben Zellreste durch Zentrifugation wurde die Viruslösung durch einen 0,45 µm PVDF Filter gegeben und mit dem Peg-iT®-System nach Herstellerangaben präzipitiert und in 50 µl PBS aufgenommen. Damit wurde das Virus auf das etwa 100fache konzentriert. Die Lagerung erfolgte in Kryoröhrchen bei -80°C.

3.2.1.4. Titration der Lentiviren

Da der Titer der Lentiviren schwanken kann, erfolgte von jeder hergestellten Viruscharge eine Titration.

Dazu wurden primäre kortikale Neurone an Tag 3 *in vitro* (kultiviert in 24 well Platten) mit einer Verdünnungsreihe des Lentivirus von 1 bis 1:10000 in PBS infiziert. Am nachfolgenden Tag wurden die Zellen mit ihrem vor der Infektion gesammelten Medium versetzt. An Tag 7 *in vitro* erfolgte die Analyse der Infektionsrate. Dazu wurde der prozentuale Anteil der infizierten Zellen, welche nun das Reporterprotein EGFP exprimierten, für 5 Regionen (ROI: region of interest) durch Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Die Analyse erfolgte mit einem inversen Mikroskop IX81 von Olympus und zugehöriger Cell M Software. Über die Verdünnungsreihe konnte der Virustiter bestimmt werden. Dieser wurde in TU (transduction unit)/ml angegeben. Bei einer *multiplicity of infection* (MOI) von 5 waren mehr als 95% der Zielzellen infiziert. Um mit unterschiedlichen Viren gleiche Infektionsraten zu erzielen, gaben somit die MOI und der Virustiter die zur Infektion der Zielzellen benötigte Menge vor.

3.1.2.5. Herstellung von primären kortikalen Neuronen aus C57BL/6N Mäusen

Jeder Umgang mit Tieren erfolgte nach den Tierschutzleitlinien mit der Genehmigungsnummer T0046/07 des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LaGeSo). E16 Embryonen wurden zur Herstellung der neuronalen Kulturen verwendet. Dazu wurden trächtige C57BL/6N Mäuse mit Isofluran in tiefe Narkose versetzt, mittels Genickbruch

getötet und die Embryonen durch Kaiserschnitt entnommen. Die Isolierung erfolgte nach modifiziertem Protokoll von Lautenschlager et al. Der zerebrale Kortex wurde herauspräpariert und die Neurone aufgearbeitet. Die Zellkulturplatten wurden nach dem Protokoll mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet, um die Adhäsion der Neurone zu gewährleisten. $1,3 \times 10^6$ Neurone wurden in 1,5 ml Starter Medium in 6 well Platten unter Standardbedingungen kultiviert, nach 4 und 7 Tagen *in vitro* zur Hälfte mit frischem Medium versetzt und nach 10 Tagen für Versuche eingesetzt.

3.1.2.6. Infektion der kortikalen Neurone

An Tag 3 *in vitro* wurden die Neurone nach Anzahl und Virustiter mit der entsprechenden Menge des Lentivirus versetzt. Bis zum Beginn der Schädigung im Experiment an Kulturtag 10 wurden die Zellen wie oben erläutert mit frischem Medium versehen.

3.2.1.7. Oxygen-glucose-deprivation (OGD): *In vitro* Modell des Schlaganfalls

Die muren Neurone wurden in einer Hypoxiekammer ($< 0,2\% \text{ O}_2$, $5\% \text{ CO}_2$, $95\% \text{ N}_2$, $> 90\%$ Luftfeuchtigkeit, $37 \text{ }^\circ\text{C}$) mit PBS gewaschen und in glukosefreiem BSSo Medium je nach gewünschtem Zellschaden für eine bestimmte Zeit (2 - 2,5 h) gehalten. Danach wurden sie mit ihrem in der Zwischenzeit präservierten Kulturmedium (zur Hälfte gemischt mit frischem NBM Medium) versetzt und im Brutschrank bis zum Zeitpunkt der Beendigung des Experiments kultiviert. Somit fand eine Reoxygenierung und Glukosezuführung statt⁷¹.

3.1.3. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1. PCR und Agarosegelelektrophorese

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction) ist ein Verfahren zur selektiven Amplifizierung und Modifikation von DNA-Abschnitten definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. Die Zielsequenz wurde hierbei durch die Wahl der Oligonukleotide als Primer festgelegt, die als Startpunkte für die Polymerase-Kettenreaktion dienen⁸⁸. Die amplifizierte DNA wurde zu analytischen oder präparatorischen Zwecken über 1,0-1,6% (w/v) Agarosegele in 1xTAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel der DNA-Fragmente umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Die DNA Proben wurden dazu mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel, welches Ethidiumbromid enthält aufgetragen. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann unter UV Licht sichtbar gemacht werden. Daneben wurde ein DNA-Standard aufgetragen, um die Größe der DNA-Fragmente nach Auftrennung im Gel durch Anlegen einer Spannung von 100 V zu vergleichen. Nach ca 30-60-minütiger Auftrennungszeit konnten die DNA-Banden unter UV Licht mit dem BioDoc Imaging System analysiert werden.

3.2.2.2. RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung

Isolation von RNA aus Geweben mit dem Invisorb® Spin Tissue RNA Mini Kit

Die Gewebe wurden aus den getöteten Mäusen (embryonal E 16, Muttertiere) isoliert und nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Die Homogenisierung erfolgte mittels Rotor-Stator-Homogenisierer.

Isolation von RNA aus Zellen in Kultur mit Trizol® Reagenz

Nach Waschen der Zellen mit PBS wurde Trizol Reagenz (500 µl/6 well) auf die Zellkultur zugegeben und diese mit einem Schaber abgelöst. Dadurch wurden die Zellen aufgeschlossen ohne die RNA zu zerstören. Diese Suspension wurde mit einer Phenol-Guanidine-Thiocyanate Lösung gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die RNA mittels Chloroformzugabe isoliert. Diese Phase erhielt man nach Zentrifugation. Die Fällung der RNA erfolgte mit Isopropanol, welches für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die RNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation pelletiert und das Pellet mit 75%-igem Ethanol gewaschen.

Die nach der jeweiligen Methode extrahierte RNA wurde in RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration mittels Spektralphotometer bei 280 nm bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zur cDNA Herstellung wurde das SuperScript® II Reverse Transcriptase Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. 2,5 µg RNA wurden mit einem Random Primer Mix (100 µM) und 10 mM dNTPs versetzt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe eines Master Mixes aus: 5x *first strand buffer*, 0,1 M DTT und 40 U RNAsin. Nach 10 min bei 25°C wurden 200 Units der Reversen Transkriptase zugegeben und die Umschreibung in cDNA wurde für 50 min bei 37°C vollzogen. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 70°C. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Reverse Transkriptase. Die synthetisierte cDNA konnte bei -20°C gelagert werden.

3.2.2.3. Platinum® SYBR® Green basierte quantitative Real-time PCR

Diese PCR Methode wurde verwendet um quantitativ Expressionsmuster in Zielzellen oder qualitativ Promotorsequenzen zu untersuchen.

Entweder diente cDNA aus der Reversen Transkription der RNA oder DNA aus der Chromatinisolation als Template zur Real-time PCR

Die Template-DNA wurde nach Herstellerangaben mit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG versetzt. Darin enthalten ist eine Taq-DNA Polymerase, der in die DNA interkalierende Farbstoff SYBR Green (Absorption 494 nm, Emission 521 nm), dNTPs und eine Uracil-DNA Glycosylase, um DNA Kontamination zu reduzieren. Der passive Referenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-rhodamin, Emission bei 602 nm [orange]) konnte dem Mastermix zugesetzt werden, um Pipettierfehler auszugleichen.

Die im Kapitel zuvor aufgeführten Primer (herausgegeben durch die Datenbank: Universal Probe Finder von Roche) wurden verwendet. Als Referenzgen diente GAPDH. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die PCR –Reaktionsgefäße wurden von Applied Biosciences bezogen. Die Proben wurden einmalig für 2 min bei 50°C und 10 min bei 95°C inkubiert. Danach erfolgten 40 Zyklen mit 15 s Denaturierung bei 95°C, 40 s Annealing und Elongation bei 60°C zur Vervielfältigung der DNA (ABI Prism 7000).

Am Ende jedes Zyklus erfolgte die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe der Applied Biosystems *Sequence Detection* oder der *Mastercycler RealPlex Software*. Pro Probe (Ziel- und Referenzgen) wurden

Crossing point (Ct)-Werte ermittelt. Sie geben den PCR-Zyklus an, bei dem eine definierte Fluoreszenzschwelle in der exponentiellen Phase der cDNA-Synthese überschritten wurde. Datenquantifizierung und Auswertung erfolgten mit Hilfe von Applied Biosystems *Sequence Detection* oder der *Mastercycle RealPlex Software* und Microsoft Excel unter Verwendung der komparativen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)⁸⁹.

3.2.2.5. Klonierung und Herstellung der Genexpressionsvektoren

Die Klonierung der lentiviralen Expressionsplasmide einerseits mit den miR-shRNAs für ORC1, E2F4, LacZ, scrambled als auch der Überexpression von Orc1 mCherry und E2F4 V5 erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen von NEB und erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Expression der miR-shRNA konnte upiquitär über den pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE Vektor durch den murinen Phosphoglycerate-kinase 1 Promotor oder – wie in den folgenden Experimenten - neuronenspezifisch über den Synapsin Promotor in dem Plasmid 27232 von Addgene erfolgen⁹⁰.

Die miR-shRNA wurde von der Firma Invitrogen synthetisiert und konnte nach Oligonukleotidanealing in das Plasmid pcDNA6.2TM-GW/EmGFP-miR kloniert werden. Durch Restriktionsverdau wurde die miR-shRNA Sequenz mit dem Reporter EmGFP und dem WPRE herausgeschnitten. Das WPRE dient zur Stabilisierung der miR-shRNA nach Expression. Nun konnte die komplette Sequenz in einen lentiviralen, zuvor verdauten Zielvektor mit T4 DNA Ligase eingebracht werden. Dieser Ligationsansatz wurde mittels Hitzeschock-Transformation in chemisch kompetente Stbl3 E.coli Bakterien eingebracht. Diese Bakterien reduzieren die homologe Rekombination der in den lentiviralen Vektoren vorkommenden *long terminal repeats*. Die transformationskompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 1µg des zu transformierenden Plasmids wurden mit 150 µl Bakteriensuspension 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte 1 min bei 42°C im Heizblock. Nach Zugabe von 750 µl vorgewärmten LB Medium ohne Antibiotikum wurden die Bakterien 30-45 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Es wurden 150 µl der

transformierten Bakteriensuspension auf Agarplatten ausgestrichen und unter Antibiotikaselektion (Ampicillin 100 µg/ml, Blastidicin 100 µg/ml) in Kolonien angezüchtet. Die DNA aus diesen wurde mittels QIAGEN Plasmid Mini Purification Kit isoliert. Nach einem Kontrollverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Banden, konnte das richtige Plasmid identifiziert werden.

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels Agarose-Gel. Es schloss sich eine Sequenzierungsreaktion, die von MWG durchgeführt wurde, an. Das Plasmid mit der korrekten Sequenz wurde erneut in Bakterien eingebracht und diese Suspension unter Antibiotikaselektion in 250 ml LB Flüssigmedium auf eine optische Dichte zwischen 0,4 und 0,6 (gemessen bei 600 nm) hochgezogen.

3.2.2.6. Proteinisolierung, -bestimmung und Immunoblotting

Proteinisolierung

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten wurden die Zellen mehrmals mit kaltem PBS gewaschen, abgeschabt und pelletiert. Das Zellpellet wurde in Zelllysepuffer (TNN oder RIPA) mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation erhält man die Proteine im Lysat.

Fraktionierte Proteinisolierung

Zur separaten Analyse von zellkern- und zytoplasmalokalisierten Proteinen wurde die fraktionierte Proteinisolierung herangezogen. Dazu werden Zellen von einem 6 well in 100 µl Zelllysepuffer abgeschabt, darin 15 min auf Eis mit intermittierendem vortexen inkubiert und für weitere 5 min NP-40 hinzugeben. Nach Abzentrifugation der bei 13000 rpm für 1 min, pelletiert sich die Kernfraktion. Der Überstand enthält die zytoplasmatischen Proteine. Das Pellet wurde in 10 µl Kernlysepuffer mit vortexen resuspendiert und durch Sonifizierung für 1 min aufgespalten. Nach Abzentrifugation erhält man die Proteine des Zellkerns im Überstand. Die Lysate wurden bei -80°C aufbewahrt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Dazu wurden 2-3 µl des Zelllysats mit 100 µl 150 mM NaCl und 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und die Extinktion der Ansätze in Duplikaten bei 595 nm im Photometer bestimmt. Der Coomassie-Farbstoff bindet an Aminosäuren und so wurde sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschoben, was man zur Messung nutzt.

Die Extinktion einer BSA-Verdünnungsreihe wurde parallel gemessen und somit die absolute Proteinkonzentration des Lysats anhand einer BSA-Eichgerade bestimmt⁹¹.

Immunoblotting

Ca 30 µg Proteine im Lysat wurden 5 min bei 95°C in 4x Lämmli-Puffer denaturiert und auf ein Polyacrylamidgel (SDS Page von der Firma Lonza) aufgetragen. Das Gel befindet sich in

der *Wet Blot*- Elektrophoresekammer von BioRad in 1x Laufpuffer oder in einer *Semi Dry* - Elektrophoresekammer. Daneben wurde ein Proteinstandard aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Übertragen der Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran

Dazu macht man sich ebenfalls die elektrische Ladung der Proteine zu Nutze und nach dem Schichten von Gel und PVDF Membran und Anlegen einer Spannung wurden diese unter 1 mA/cm^2 Kühlung auf die Membran übertragen⁹².

Nachweis von Proteinen auf der Membran - Immunoblotting

Nach Blocken der Membran mit 3% Milchpulver TBST und mehrmaligem Waschen wurde die Membran über Nacht mit den jeweiligen Primärantikörpern in 3% Milchpulver TBST inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in TBST erfolgt die Zugabe des Sekundärantikörpers gekoppelt an HRP (horse raddish peroxidase) für 2 h bei Raumtemperatur. Nach Waschen mit PBS wurde die Membran mit dem Luminol- enthaltendem Substrat (ECL) inkubiert und die durch Oxidation des Luminols entstehende Lichtemission mittels Autoradiographiefilm detektiert. Die Auswertung erfolgte im FUSION Chemolumineszenz System.

3.2.2.7. Chromatinimmunpräzipitation

Chromatininsolierung

Diese Methode wurde verwendet um die Bindung bestimmter Proteine an bestimmten DNA Abschnitten nachzuweisen. Dies erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Talianidis⁹³. Dazu wurden an die DNA-assoziierte Proteine durch Formaldehyd an der DNA fixiert und mittels Antikörpern gegen die Proteine DNA isoliert. Über PCR wurden ausgewählte DNA Bereiche nachgewiesen. Als Kontrolle für eine unspezifische Antikörperbindung dient IgG. Zur Verknüpfung der chromatin-assoziierten Proteine an das Chromatin wurde 37%-iges Formaldehyd mit finaler Konzentration von 1% für 10 min in das Medium und bei RT leicht schüttelnd inkubiert. Um das Quervernetzung zu stoppen gibt man 1 M Glycin in finaler Konzentration von 0,125 M für 5 min zu. Auf Eis wurden die Platten zweimal mit ausreichend PBS gewaschen, die Zellen in PBS von der Platte abgeschabt und durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen wurden in Zellysepuffer lysiert und nach Zentrifugation erhält man die Zellkerne, welche für 10 min auf Eis mit Kernlysepuffer aufgespalten wurden. Das Chromatin befindet sich nun im Überstand.

Durch Sonifizierung mit 8-maliger Beschallung für 10 s bei 30% Amplitude wurde das Chromatin auf eine Größe von 200-1000 bp gebracht. Danach wurde die Probe bei 4°C 10 min bei 16400 rpm zentrifugiert und der Überstand, der das Chromatin enthält, in ein Eppendorfgesäß überführt.

Um die Größe zu überprüfen nimmt man 50 µl dieses Überstandes, gibt 2 µl 5 M NaCl zu, überschichtet den Ansatz mit Mineralöl und inkubiert über Nacht bei 65°C um die Proteine

von dem Chromatin zu lösen. Diese wurden dann bei einer 2-stündigen Proteinase K-Behandlung mit 40 µg bei 55°C verdaut. Nach Auftragen auf ein 1,2%-iges Agarosegel kann nun die Größe anhand eines DNA Standards abgeschätzt werden.

Das Chromatin wurde 1:10 in IP-Verdünnungspuffer aufgenommen, um das SDS zu verdünnen, das bei der darauf folgenden Zugabe von Antikörpern für deren Bindung an die assoziierten Proteine hinderlich ist. Es wurden Aliquots von 2 ml hergestellt, die zuerst in Flüssigstickstoff und dann bei -80°C aufbewahrt wurden.

Immunpräzipitation

Das verdünnte Chromatin wurde vor Zugabe der Antikörper mit geblockter Protein-A-Sepharose abgesättigt. Durch Zentrifugation wurden die Sepharose-Beads entfernt. Nun kann der gegen das Zielprotein gewünschte Antikörper bzw. IgG als Kontrolle für unspezifische Bindung an Proteine über Nacht hinzugegeben werden. Dabei wurden 2 µg pro 1 Millionen Zellen verwendet.

Es entstehen Antikörper-Protein-Chromatin-Komplexe, welche durch Zugabe von 60 µl geblockter Protein-A-Sepharose für eine Stunde bei 4°C rotierend gebunden werden können. Nach 7-maligem Waschen der Beads mit 1ml LiCl-Puffer wurden die Protein-Chromatin-Komplexe von den Beads mit Elutionspuffer abgelöst. Dieses Eluat kann bei -20°C gelagert werden. Zur Aufhebung der Vernetzung der Proteine an das Chromatin wurde der Überstand mit 10 µl 5 M NaCl und 1 µl RNase A versetzt, mit Mineralöl überschichtet und über Nacht bei 65°C leicht schüttelnd inkubiert.

Nach Zugabe von 20 µg Proteinase K für 2 Stunden bei 55°C wurde das Chromatin durch Phenol-Chloroform-Extraktion von den möglicherweise nicht verdauten Proteinen befreit und die DNA danach mit einem PCR *Purification-Kit* aufgereinigt. Danach wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. 1% Inputchromatin wurde ebenfalls in Elutions-Puffer aufgenommen.

3.2.2.8. Luziferase Assay

Der Luziferase Assay wurde zur indirekten Untersuchung von Promotoraktivatoren- und Repressoren über die Luziferaseaktivität verwendet. Die Luziferase stellt in diesem System ein Reporterprotein dar, das extern in ein Gemisch hinzugegeben oder als Gen in einem Vektor in Zellen eingebracht werden kann. Zur Untersuchung der Orc1 Promotoraktivität wurde zuvor einem Vektor, der das Luziferase-Gen unter der Kontrolle des Orc1 Promotors enthielt, in HT22 Zellen transfiziert. Alternativ wurden kortikale Neurone infiziert. Das Protokoll wurde von Promega übernommen. Zur Zellyse wird zu einem 24 well 100 µl Zellysepuffer zugegeben und auf einem Schüttler im Dunkeln für 20 min inkubiert. Dieses Lysat kann bei -20°C gelagert werden. Zu 20 µl des Lysates werden kurz vor der Messung

100 µl Luziferase Assay Reagenz automatisiert im Luminometer zugegeben und 2-3 s geschüttelt.

3.2.2.10. Lactat-dehydrogenase Assay

Um das Überleben von Zellen nach einem schädigenden Ereignis zu charakterisieren, macht man sich zu Nutze, dass nach einem Schaden LDH aus dem Zytosol der Zellen in den Überstand abgeben wird. Die Enzymaktivität des freigesetzten LDH korreliert dabei mit dem Zellschaden. Die LDH-Aktivität wurde bestimmt, indem dem Überstand der Katalysator Pyruvat zugegeben wurde. Das Pyruvat wurde von LDH zu Lactat reduziert und gleichzeitig zugegebenes NADH₂ in äquimolarer Menge wird oxidiert. Die Absorption der Lösung wurde bei 340 nm in einer Zeitfolge gemessen und spiegelt die LDH-Aktivität wieder.

In einer 96 well Platte wurden 50 µl des Zellüberstandes mit 200 µl NADH₂ versetzt und direkt vor der Messung die Reaktion mit der Zugabe von 10 µl Pyruvat gestartet. Die Absorption bei 340 nm wurde in einem Plattenlesegerät bestimmt.

3.1.4. Zellbiologische Methoden

3.2.3.1. Propidiumiodidfärbung

Primäre Neuronenkulturen wurden auf mit PLL beschichteten Coverslips kultiviert. Vor der Fixierung mit 3,7% Formaldehyd für 15 min wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach 3-maligem Waschen erfolgte die Inkubation in Permeabilisierungslösung für 30 min. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre Antikörper für 30 min zugegeben. Nach waschen mit PBS und deionisiertem Wasser erfolgte die Propidiumiodidfärbung zur Quantifizierung von toten Zellen. Diese markiert tote Zellen, da der Farbstoff durch die beim Sterben permeabilisierte Zellmembran durchdringen kann. Dort interkaliert er mit der DNA und kann im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 536 nm (Emission 617 nm) sichtbar gemacht werden. Zur Analyse wurden 20 µg/ml Propidiumiodid in das Zellmedium gegeben. Die DAPI-Kernfärbung und Einbettung erfolgte mit ProLong Gold Antifade.

Tote und lebende Zellen wurden in zufällig ausgewählten Sichtfeldern (high power fields) ausgezählt und prozentual dargestellt.

3.2.3.2. FACS-Analyse

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation wurde mittels Durchflußzytometrie der DNA-Gehalt sowie die Größe der einzelnen Zellen bestimmt und somit auf den Zellzyklusstatus zurückgeschlossen⁹⁴.

Dazu wurden die Zellen zunächst von der Kulturschale durch Trypsinbehandlung gelöst, in ca. 10 ml Medium aufgenommen und bei 1200 rpm 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Dieses wurde bis auf ca. 100 µl abgenommen, worin die Zellen resuspendiert wurden. Zur Fixierung wurde unter vortexen tropfenweise langsam 1 ml eiskaltes 80%iges Ethanol hinzugegeben. Die Zellen wurden 24 h bei 4°C gelagert. Dann konnten sie bis zur weiteren Verwendung einige Zeit bei -20°C aufbewahrt werden.

Zur Messung wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, einmal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und in 500 µl 38 mM Na-Citrat resuspendiert. Dazu wurden 25 µl RNase A gegeben, was 1,5 h bei 37°C inkubiert wurde. Direkt vor der Messung wurden die Zellen mit 15 µl Propidiumjodid versetzt, was in die DNA interkaliert und somit detektiert werden kann. Mit einem FACScalibur wurden die Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms Cellquest Pro.

4. Ergebnisse

4.1. Neuronale *Orc1* Expression

4.1.1. *Orc1* Expression in embryonalem und adultem Gewebe

Zur Untersuchung des Vorkommens von *Orc1* in murinen, neuronalen Gewebe wurde aus Embryonen E16 und deren Muttertieren Gewebe präpariert und daraus die RNA isoliert. Die Expressionsanalyse erfolgte über quantitative Real-time PCR auf *Orc1*. Als Referenz diente β -Aktin. Untersucht wurden das Kleinhirn, der Cortex und der Bulbus olfactorius. Als Vergleich zu diesen Proben diente die embryonale Leber, in der sich aufgrund der Hämatopoese proliferierende Zellen befinden.

Zur embryonalen Leber wiesen die cerebralen Gewebe eine deutlich niedrigere Expression von *Orc1* auf. Im adulten Bulbus olfactorius ließ sich die höchste *Orc1* Expression aus den cerebralen Geweben detektieren. Diese war statistisch signifikant höher als im embryonalen Bulbus olfactorius. Im Kleinhirn und Cortex hingegen fand sich in den embryonalen Geweben mehr *Orc1* mRNA als in den zugehörigen adulten Geweben.

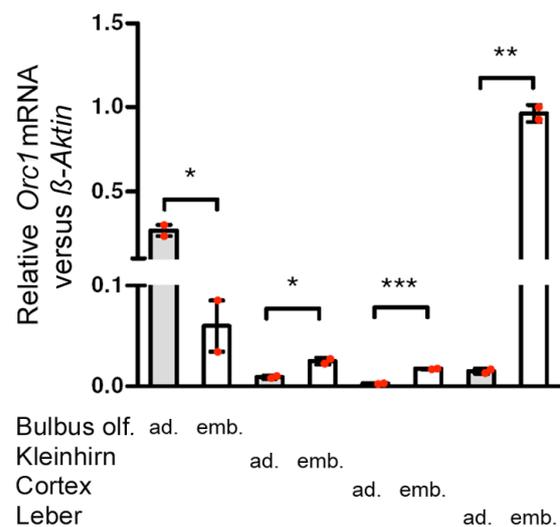


Abb.4.1.: Expressionslevel von *Orc1* in neuronalen Geweben.

Die mRNA wurde aus den Geweben isoliert. Über quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) wurde die *Orc1* Expression gemessen und auf β -Aktin normalisiert. Adultes (ad.) und embryonales (emb.) Gewebe des Bulbus olfactorius, Kleinhirn, Cortex und als Positivkontrolle der embryonalen Leber wurden auf *Orc1* mRNA analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte paarweise mit Mann-Whitney-U-Test. Daten sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

4.1.2. *Orc1-6* Expression in kortikalen Neuronen

Die Expression der sechs Untereinheiten des *origin recognition complex* (ORC) *Orc1-6* wurde mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Dazu wurde mRNA aus maturaen kortikalen Neuronen in Kultur isoliert. β -Aktin diente als Referenz. Es zeigte sich, dass *Orc1* im Vergleich zu den anderen Untereinheiten in kortikalen Neuronen kaum exprimiert wird, wohingegen *Orc3* den höchsten Expressionslevel aufwies.

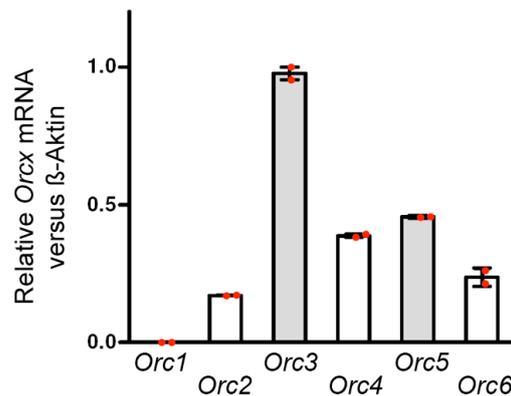


Abb.4.2.: Die Expression von *Orc1-6* in kortikalen Neuronen.

Die mRNA wurde aus maturaen kortikalen Neuronen (11 Tage *in vitro*) isoliert und über quantitative Real-time PCR auf das Vorkommen der mRNA von *Orc1-6* untersucht. Die mRNA der einzelnen Gene wurde auf den internen Standard β -Aktin normalisiert. Die Darstellung erfolgte zum Verhältnis auf die *Orc3* Expression. Die Daten sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

4.1.3. *Orc1* Expression in kortikalen Neuronen nach OGD

Aus der Literatur ist bekannt, dass Nervenzellen unter schädigenden Einflüssen einen aberranten Zellzykluseintritt vollziehen, der meist mit einem Zellsterben einhergeht. Da sich ein niedriger bis kaum detektierbarer *Orc1* mRNA Level unter physiologischen Bedingungen in Neuronen zeigte, ergab sich die Frage nach einer Dysregulation dieses Proteins unter pathophysiologischen Bedingungen. Das Modell der *oxygen-glucose deprivation* (OGD) wurde verwendet, um in Neuronen einen pathophysiologischen Reiz durch Hypoxie und Glukoseentzug zu setzen. Nach Reoxygenierung wurde die *Orc1* Expression mit quantitativer Real-time PCR auf mRNA Ebene und Immunoblotting auf Proteinebene untersucht.

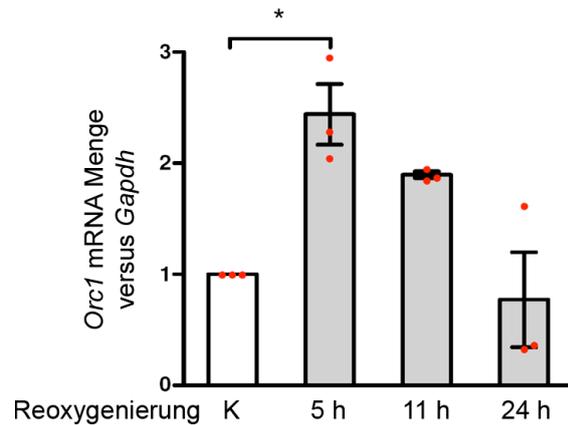


Abb.4.3.: *Orc1* Expression in kortikalen Neuronen nach OGD

Kortikale Neurone wurden an Tag 11 *in vitro* einer OGD ausgesetzt. Die mRNA wurde nach 5 h, 11 h und 24 h Reoxygenierung oder aus Zellen unter Kontrollbedingungen (K) isoliert und die Expression von *Orc1* über quantitative Real-time PCR im Zeitverlauf gemessen. Auf den internen Standard *Gapdh* wurde normalisiert. Die Darstellung erfolgte relativ zu der normalisierten *Orc1* mRNA Menge unbehandelter Zellen. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten wurden mit one-way ANOVA gefolgt von einer Tukey post-hoc-Analyse ausgewertet ($p < 0,05^*$). Daten sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

Es zeigte sich nach 5 h Reoxygenierung eine signifikante Erhöhung der *Orc1* mRNA. Diese war im 24-stündigen Zeitverlauf rückläufig.

Um die Expression von *Orc1* auf Proteinebene zu untersuchen wurden zu gleichen Zeiten nach Reoxygenierung Proteine aus kortikalen Neuronen isoliert. Das murine ORC1 besitzt eine Größe von 97 kDa. Mehrere Modifikationen sind bekannt, die das Molekulargewicht erhöhen.

Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot. Auf diesem ist nach 24 h Reoxygenierung die Erhöhung von ORC1, sowohl unmodifiziert bei 97 kDa als auch modifiziert bei 115 kDa, zu sehen. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Aus fünf unabhängigen Experimenten wurde eine densitometrische Analyse durchgeführt, bei der sich die Erhöhung des modifizierten ORC1 nach 24 h statistisch signifikant zeigte.

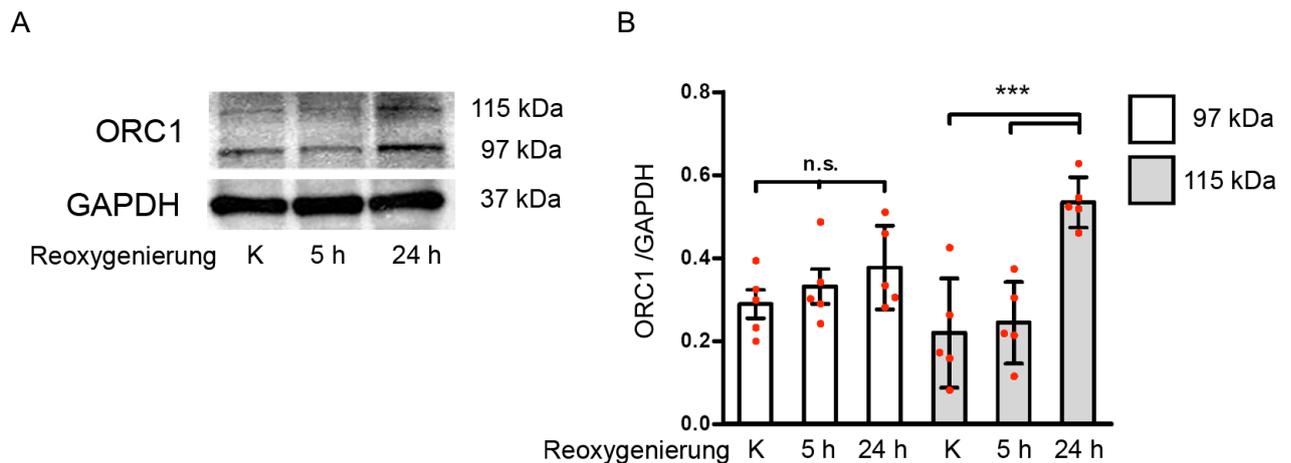


Abb.4.4.: ORC1 in kortikalen Neuronen nach OGD.

Kortikale Neurone wurden an Tag 11 *in vitro* einer OGD ausgesetzt und die Proteine aus den Zellen im angegebenen Zeitverlauf nach Reoxygenierung oder aus kontrollbehandelten Zellen isoliert.

Ein repräsentativer Western Blot ist in A gezeigt. Die Bande bei 97 kDa zeigt das unmodifizierte ORC1. Bei 115 kDa stellt sich das modifizierte ORC1 dar. In B ist eine densitometrische Auswertung der ORC1 Menge aus fünf unabhängigen Experimenten gezeigt. Eine statistische Analyse erfolgte mit one-way ANOVA gefolgt von einer Tukey post-hoc-Analyse ($p < 0,001$ ***). Die Daten der Densitometrie sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

4.1.4. *Orc1* Promotorregulation in kortikalen Neuronen nach OGD

Die *Orc1* Promotorregulation in kortikalen Neuronen wurde mit einem Luziferaseassay untersucht. Um der Frage nachzugehen, ob die in Abb. 3 und 4 beschriebene *Orc1* Regulation nach OGD auf eine neuronal-spezifische Aktivierung des *Orc1* Promotors zurückzuführen ist, wurde ein CRE/loxP Rekombinasekonstrukt kloniert und etabliert.

In Abb. 5 ist dieses Konstrukt schematisch dargestellt.

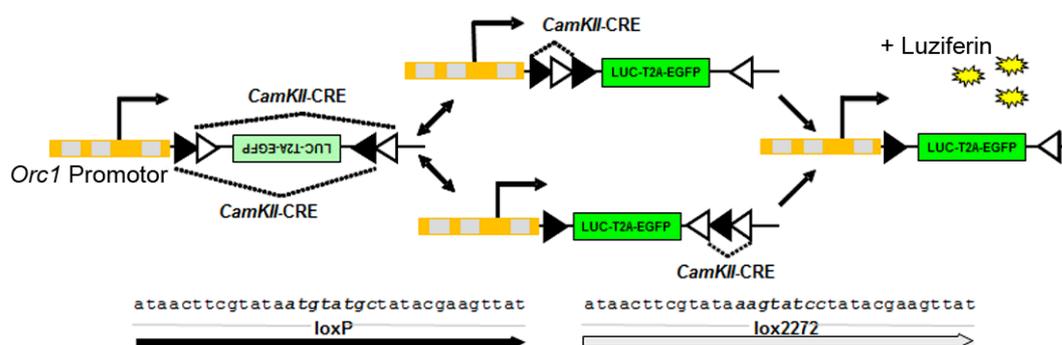


Abb.4.5.: Schema des lentiviralen Luziferasekonstruktes zur Untersuchung der *Orc1* Promotoraktivität in Neuronen.

Die Expression der *firefly*-Luziferase (LUC) und des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) wird vom *Orc1* Promotor kontrolliert. Dieser kann die Expression der beiden Gene nur in Anwesenheit

einer Cre-Rekombinase, welche die Inversion dieses Genabschnittes über flankierende loxP/lox-Sequenzen katalysiert, treiben.

Dieses Konstrukt wurde lentiviral in Neurone transduziert und in deren DNA integriert, die aus transgenen Mäusen gewonnen wurden. Die Neurone exprimieren die CRE-Rekombinase unter dem neuronal-spezifischen *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* (CamKIIa-CRE^{1Gsc}) Promotor. In diesen Zellen können nun die endogenen Transkriptionsfaktoren über den *Orc1* Promotor die Expression der *firefly*-Luziferase und des EGFP steuern.

Die CamKII-CRE Neurone wurden lentiviral mit dem in Abb.5. dargestellten Luziferasekonstrukt transfiziert und einer OGD ausgesetzt. Direkt nach dem Sauerstoff- und Glukoseentzug sinkt die Luziferaseaktivität, was einer Repression des *Orc1* Promotors entspricht. Nach 60 Minuten der Reoxygenierung ließ sich eine signifikante Erhöhung der Luziferaseaktivität messen. Diese spiegelt die neuronal-spezifische Aktivierung des *Orc1* Promotors wider.

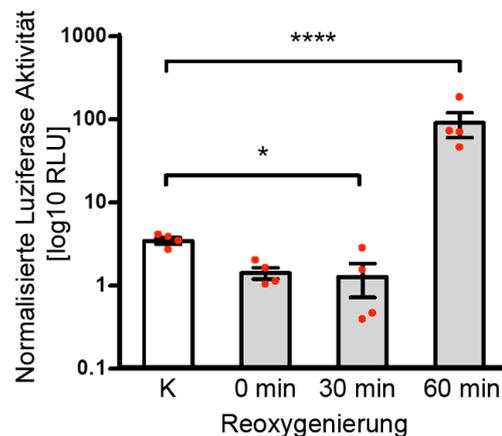


Abb.4.6.: Neuronale *Orc1* Promotoraktivierung nach OGD.

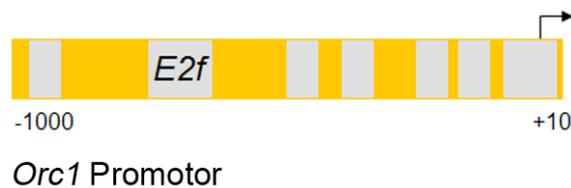
Mit dem in Abb. 5 erläuterten Luziferasekonstrukt werden kortikale CamKII-Cre-Rekombinase positive Neurone (DIV4) lentiviral transduziert. An Tag 10 *in vitro* wird eine OGD durchgeführt und die Luziferaseaktivität zu den angezeigten Zeitpunkten nach Reoxygenierung gemessen. Die *light units* sind auf die Proteinmenge normalisiert und als *relative light units* (RLU) aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=2 dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit one-way ANOVA gefolgt von einer Tukey post-hoc-Analyse ($p < 0,05^*$, $p^{****} < 0,0001$). Die Daten sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

4.2. *Orc1* Promotorregulation durch E2F-Transkriptionsfaktoren

Die Expression von zellzyklusrelevanten Genen ist maßgeblich durch die E2F-Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Um zu untersuchen, ob die neuronale *Orc1* Promotoraktivierung und Expression nach OGD durch die E2F-Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird, wurde zunächst eine *in silico* Analyse des *Orc1* Promotors (+10-1000bp vor Transkriptionsstart) über die TRANSFAC Datenbank durchgeführt. Es zeigten sich neun E2F-Bindestellen.

A



B

Factor name	Position (strand)	Core score	Matrix score	Sequence
E2F	3 (-)	1.000	0.801	tggTGGCGcacg
E2F	513 (-)	0.823	0.797	gctGCGCGctgt
E2F	575 (-)	0.990	0.845	gatTCGCGtccg
E2F	786 (+)	0.853	0.824	cgacCGCGGaaa
E2F	880 (-)	1.000	0.875	aatTGGCGgaag
E2F	929 (+)	1.000	0.839	gaaaCGCCAatc
E2F	951 (-)	0.833	0.791	tgtGGGCGgggt
E2F	969 (-)	1.000	0.845	tagTGGCGcgaa
E2F	971 (+)	0.990	0.956	gtggCGCGAaaa

Abb.4.7.: Schema mit E2F Bindestellen des murinen *Orc1* Promotors.

Die *in silico* Analyse des *Orc1* Kernpromotors in der TRANSFAC Datenbank (<http://www.biobase-international.com/product/transcription-factor-binding-sites>) ergab folgende neun E2F-Bindungsstellen, die in A schematisch dargestellt sind. Die breiten grauen Balken symbolisieren zwei nahe beieinanderliegende oder überlappende Sequenzen. In B sind die Positionen mit Orientierung der E2F-Konsensussequenzen, sowie die Übereinstimmung der Core Sequenz (in Großbuchstaben) und der gesamten Matrixsequenz zu der *Orc1* Promotorsequenz als *score* aus der Datenbankanalyse tabellarisch dargestellt.

4.2.1. E2F4-abhängige *Orc1* Promotorregulation im HT22 Modell

Die murine hippokampale Zelllinie HT22 diente als Zellkulturmodell zur Untersuchung der *Orc1* Promotorregulation.

Zunächst wurde die *Orc1* Expression im Zellzyklusverlauf auf Proteinebene analysiert.

Dazu wurden HT22 Zellen durch Serumentzug in G0 arretiert. Der synchrone Zellzykluseintritt der HT22 Zellen wurde durch Serumzugabe bewerkstelligt.

Um in diesem Zellkulturmodell die *Orc1* Expression mit der Zellzyklusphase zu korrelieren, wurde ORC1 unter Serumentzug und nach 12 h, 16 h, 20 h und 24 h nach Serumzugabe mit Immunoblot und zu gleichen Zeitpunkten die Zellzyklusphase mit FACS analysiert.

Bei der Proteinisolierung fand eine Fraktionierung in nukleäre und zytosolische Proteine statt, um gleichzeitig der Frage nachzugehen, ob ORC1 modifikations- und/oder zellzyklusabhängig im Zytoplasma zu finden ist. Als Lade- und Fraktionierungskontrolle dienten Histondeacetylase (HDAC), für die nukleäre, und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH), für die zytosolische Fraktion.

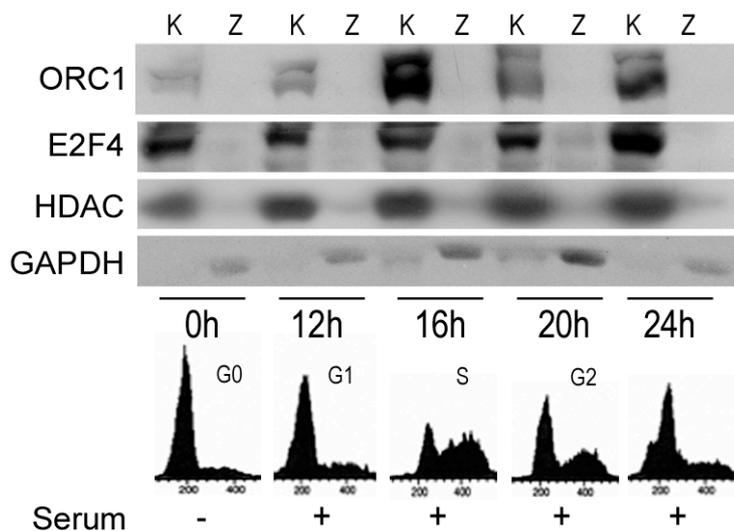


Abb.4.8.: ORC1 in synchronisierten HT22 Zellen im Zeitverlauf.

HT22 Zellen wurde für 48 h Serum entzogen. Zu den angezeigten Zeitpunkten nach Serumzugabe wurden die Proteine isoliert und auf ORC1 und E2F4 mittels Immunoblot untersucht. Dargestellt ist die nukleäre (N) und zytosolische (Z) Fraktion. HDAC und GAPDH dienten als Kontrollen zur Fraktionierung und Beladung des Gels. Parallel dazu ist die Zellzyklusphase der HT22 Zellen zu gleichen Zeitpunkten mit FACS analysiert worden.

Unter Arrest in G0 ist die ORC1 Menge in HT22 Zellen deutlich erniedrigt und steigt langsam in G1, bis zu einem Maximum in der S-Phase an. ORC1 wies dabei zwei Banden bei 97 kDa und 115 kDa auf. In der zytosolischen Fraktion war weder das unmodifizierte noch das modifizierte ORC1 Protein zu finden. Das E2F4 Protein zeigt einen nahezu konstanten Proteinlevel in der Kernfraktion.

Das HT22 Zellkulturmodell wurde zur Untersuchung der Promotorregulation von *Orc1* im Luziferaseassay verwendet. Dazu wurde der *Orc1* Kernpromotor vor die *firefly*-Luziferase kloniert und dieses lentiviral in HT22 Zellen teilweise zusammen mit E2F4-V5 transduziert. Zwei Tage später erfolgte ein Serumentzug für 28 h. In G0 lässt sich ein Trend in der

Repression der *Orc1* Promotor-regulierten Luziferaseexpression durch exogenes E2F4-V5 finden. In der S-Phase ist der *Orc1* Promotor aktiviert und die Luziferaseaktivität steigt signifikant an. In dieser Phase lässt sich der *Orc1* Promotor durch exogenes E2F4 reprimieren.

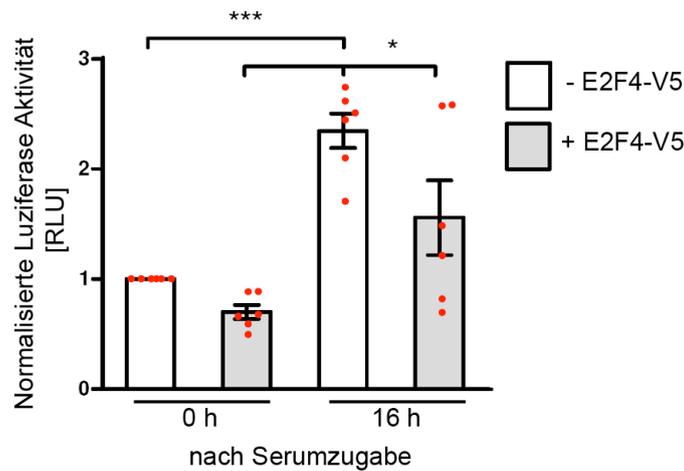


Abb.4.9.: *Orc1* Promotorrepression durch exogenes E2F4-V5 in synchronisierten HT22 Zellen mittels Luziferaseassay.

HT22 Zellen wurden lentiviral mit einem *Orc1* Promotor-Luziferasekonstrukt infiziert. Zum Teil wurden diese lentiviral mit E2F4-V5 infiziert. Nach 48 h Serumentzug wurde die Luziferaseaktivität ohne (graue Balken) und mit E2F4-V5 (weiße Balken) gemessen. 16 h nach Serumentzug wurde die Luziferaseaktivität ebenfalls gemessen. Die *Light Units* wurden in Duplikaten gemessen und auf die Proteinmenge normalisiert (RLU). Die Darstellung erfolgte relativ zu der relativen Luziferaseaktivität von Zellen unter Serumentzug. Die statistische Auswertung aus drei unabhängigen Experimenten erfolgte mit einem one-way ANOVA gefolgt von einer Tukey post-hoc-Analyse. Die Daten sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt ($p < 0,05^*$, $p < 0,001^{***}$).

4.3. E2F4-abhängige *Orc1* Promotorregulation in Neuronen nach Ischämie/Hypoxie

4.3.1. Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren in kortikalen Neuronen

Mit einem Chromatinimmunpräzipitationsassay vor und nach OGD wurde untersucht, ob die endogenen E2F-Transkriptionsfaktoren in kortikalen Neuronen am endogenen *Orc1* Promotor binden. Dazu wurde Chromatin mit daran fixierten Proteinen aus kortikalen Neuronen vor und nach OGD isoliert und auf die in Abb. 10 angegebenen Proteine mit Antikörpern präzipitiert. Das daran gebundene Chromatin wurde auf den *Orc1* Promotor mit quantitativer Real-time PCR untersucht.

Es fand sich eine Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren E2F1 und E2F4 im Vergleich zur unspezifischen Bindung von IgG. Die Bindung von E2F1 war vor allem unter pathologischen Bedingungen nach OGD zu finden, wohingegen die Bindung von E2F4 sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen am *Orc1* Promotor festzustellen war.

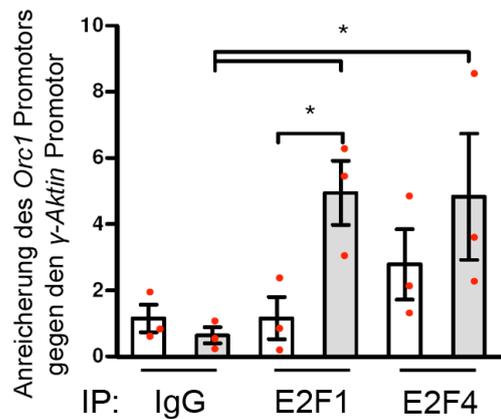


Abb.4.10.: Nachweis der Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren am *Orc1* Promotor in kortikalen Neuronen mittels ChIP.

Der *Orc1* Promotorbesatz mit E2F1 und E2F4 in kortikalen murenen Neuronen wird mittels Chromatinimmunpräzipitation unter Kontrollbedingungen und 24 h nach OGD untersucht. Dazu wird das Chromatin mit den daran fixierten Proteinen nach OGD aus Neuronen isoliert, mit Antikörpern gegen die angezeigten Proteine immunpräzipitiert und der *Orc1* Promotor mittels quantitativer PCR nachgewiesen. IgG dient als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindung. Die Immunpräzipitation gegen den γ -Aktin Promotor diente als Kontrolle und die Darstellung erfolgt als Anreicherung zu diesen Proben. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit one-way ANOVA gefolgt von einer Tukey post-hoc-Analyse. Die Daten sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt ($p < 0,05^*$).

4.3.2. Charakterisierung der *E2f4* miR-shRNA

Zur Klärung der Frage welchen Einfluß der reprimierende Transkriptionsfaktor E2F4 auf die *Orc1* Expression hat, wurden drei miR-shRNA Sequenzen gegen *E2f4 in silico* von dem BLOCK-iT™ RNAi design tool von Invitrogen identifiziert. Diese wurden durch Oligonukleotidannealing und Ligation in den pcDNA™ 6.2 GW-EmGFP-miR Vektor kloniert und in den lentiviralen Transfektorvektor pFSy(1.1)GW mit dem Synapsin Promotor kloniert.

Um die effektive Herunterregulation des Zielgens der drei Sequenzen zu prüfen, wurde E2F4-V5 zusammen mit den *E2f4* miR-shRNA enthaltenden Vektoren in Hek293 Zellen transfiziert, 2 Tage später die Proteine isoliert und mittels Immunoblotting auf die Menge an E2F4-V5 untersucht. EGFP diente als Lade- und Transfektionskontrolle.

Die *E2f4* miR-shRNA 3 regulierte das überexprimierte E2F4-V5 am effektivsten herunter und wurde für die kommenden Versuche eingesetzt.

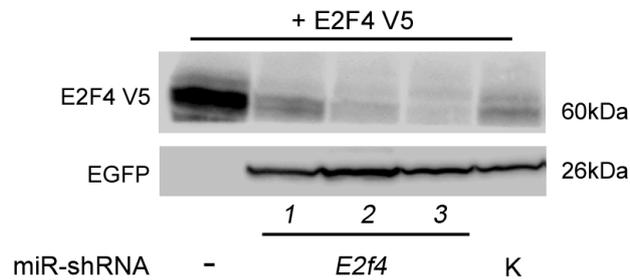


Abb.4.11.: Herunterregulation von exogenem E2F4-V5 mittels *E2f4* miR-shRNA.

Drei miR-shRNAs gegen *E2f4* wurden jeweils zusammen mit exogenem E2F4-V5 durch Calciumphosphat in Hek293 überexprimiert. Nach 48 h wurden die Proteine isoliert und die Herunterregulation wurde mittels Immunoblotting gegen E2F4-V5 untersucht. Als Lade- und Transfektionskontrolle diente EGFP, welches zusammen mit der miR-shRNA exprimiert wird.

4.3.3. Durch *E2f4* miR-shRNA beeinflusste *Orc1* Expression in kortikalen Neuronen nach OGD

Die Bindung und die Regulation des *Orc1* Promotors durch den Transkriptionsfaktor E2F4, zog die Frage nach der Expressionsregulierung von *Orc1* durch E2F4 nach sich.

Um dies zu untersuchen wurden kortikale Neurone an Tag 4 *in vitro* mit der miR-shRNA gegen *E2f4* infiziert und an Tag 10 *in vitro* einer OGD ausgesetzt. 24 h später wurde die RNA isoliert und mittels quantitativer Real-time PCR die Expression von *Orc1* analysiert.

Die Ergebnisse zeigen eine etwa 2,5-fache Hochregulation von *Orc1* nach OGD in den Zellen, die mit der Kontroll miR-shRNA infiziert wurden. Diese Hochregulation nach OGD fand sich in den Zellen, die die *E2f4* miR-shRNA enthielten, um das 5-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert.

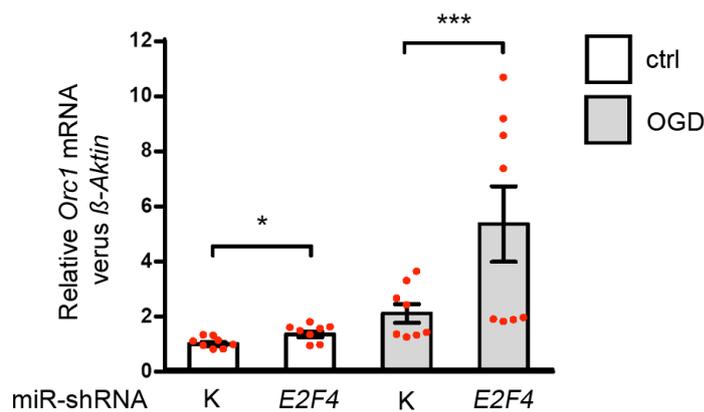


Abb.4.12.: *Orc1* Hochregulation in *E2f4* miR-shRNA infizierten Neuronen nach OGD.

Kortikale Neurone wurden an Tag 4 *in vitro* lentiviral mit *E2f4* miR-shRNA oder Kontroll miR-shRNA infiziert. An Tag 10 *in vitro* wurde eine OGD durchgeführt. 24 h nach Reoxygenierung wurde der *Orc1* Expressionslevel auf mRNA Ebene untersucht. Dazu wurde die RNA aus diesen Zellen geerntet und über quantitative Real-time PCR auf *Orc1* untersucht. Normalisiert wurde auf die Kontrolle β -Aktin und dargestellt ist die Expression relativ zu Kontroll miR-shRNA (K) infizierten Zellen, die keiner OGD ausgesetzt wurden. Die Auswertung erfolgte aus Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=2 mit einem one-way ANOVA gefolgt von einer Tukey post- hoc-Analyse ($p < 0,05^*$ $p < 0,001^{***}$) und sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

4.4. Verhinderung der *Orc1* Expression schützt vor neuronalem Zelltod nach Ischämie/Hypoxie

Der reprimierende Transkriptionsfaktor E2F4 scheint in Neuronen im pathophysiologischen Kontext einen protektiven Effekt zu haben. Da nun ORC1 zum einen nach OGD reguliert wird und zum anderen als Zielgen von E2F4 in Neuronen im Kontext der OGD identifiziert wurde, stellt sich die Frage, welchen Einfluss ORC1 auf das Überleben von Neuronen nach ischämisch/hypoxischer Schädigung hat.

4.4.1. Charakterisierung der *Orc1* miR-shRNA

Zur Charakterisierung der Funktion von ORC1, wurde ein miR-shRNA basierter Ansatz gewählt. Drei miR-shRNA gegen *Orc1* wurden durch das RNAi Block It design tool von Invitrogen *in silico* herausgegeben.

Zunächst wurde exogenes ORC1 mCherry zusammen mit jeweils einer der drei miR-shRNAs gegen *Orc1* in Hek293 Zellen mit Calciumphosphat transfiziert und die Menge von ORC1 über Immunfluoreszenz und Immunoblotting gegen mCherry analysiert.

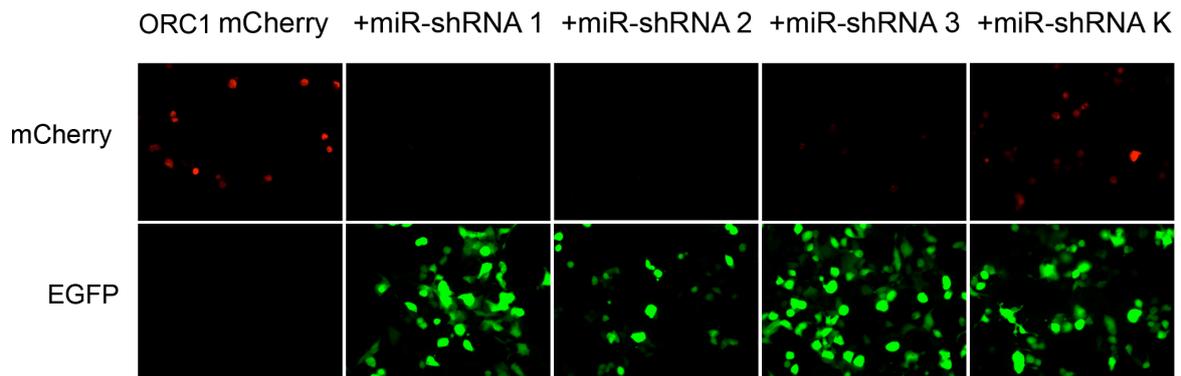


Abb.4.13.: Nachweis der ORC1 Herunterregulation von exogenem ORC1 mCherry durch *Orc1* miR-shRNA mittels Immunfluoreszenz.

HEK293 wurden mit ORC1 mCherry und teilweise zusätzlich mit der fünffachen Menge an *Orc1* miR-shRNA oder Kontroll miR-shRNA (K) mit Calciumphosphat transfiziert. EGFP diente als Transfektionskontrolle. 2 Tage später wurde mittels Immunfluoreszenzaufnahmen die Herunterregulation von ORC1 mCherry untersucht.

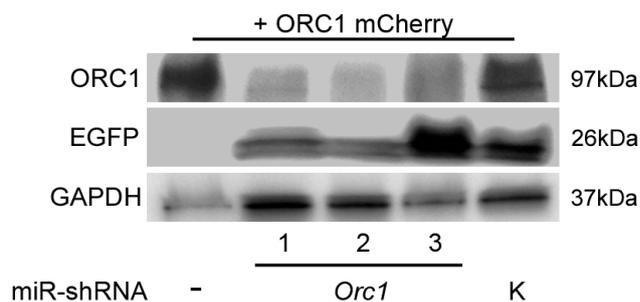


Abb.4.14.: Nachweis der Herunterregulation von exogenem ORC1 mCherry durch *Orc1* miR-shRNA mittels Immunoblotting.

Drei miR-shRNAs gegen *Orc1* wurden jeweils zusammen mit exogenem ORC1 mCherry mit Calciumphosphat in HEK293 überexprimiert. Nach 48 h wurden die Proteine isoliert und die Herunterregulation wurde mittels Immunoblotting gegen mCherry untersucht. Als Lade- und Transfektionskontrolle diente EGFP, welches zusammen mit der miR-shRNA exprimiert wird.

Um die Auswirkung der *Orc1* miR-shRNA auf das endogene *Orc1* zu analysieren wurden kortikale Neurone an Tag 5 *in vitro* jeweils mit den drei *Orc1* miR-shRNAs oder Kontroll miR-shRNA lentviral transduziert. An Tag 10 *in vitro* wurde die mRNA isoliert und die *Orc1* Expression mittels quantitativer Real-time PCR untersucht.

Es zeigte sich, dass alle drei miR-shRNA die mRNA von *Orc1* um etwa die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle herunterregulierten.

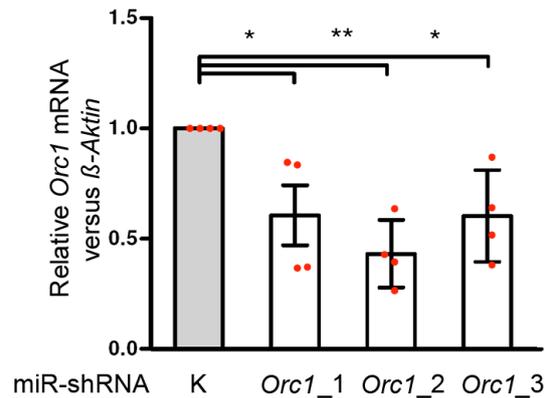


Abb.4.15.: Untersuchung der miR-shRNA gegen *Orc1* auf die endogenen *Orc1* mRNA Expressionslevel in primären kortikalen Neuronen der Maus.

Die drei miR-shRNAs gegen *Orc1* wurden lentiviral in kortikale Neurone (5 Tage *in vitro*) transduziert, diese nach 5 Tagen *in vitro* geerntet und die mRNA isoliert. Die Expression von *Orc1* wurde mittels quantitativer Real-time PCR untersucht und auf β -Aktin normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit einem one-way ANOVA gefolgt von einer Tukey post-hoc-Analyse ($p < 0,05^*$). Die Daten sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

4.4.2. Einfluss von ORC1 auf das Überleben von kortikalen Neuronen nach OGD

Um den Einfluss von ORC1 auf das Überleben zu untersuchen wurde zum einen die Herunterregulation des Proteins durch *Orc1* miR-shRNA und zum anderen die Überexpression von ORC1 genutzt. Die Herunterregulation von *Orc1* auf das Überleben von Neuronen wurde im pathophysiologischen Kontext der OGD untersucht.

Dazu wurden kortikale Neurone in Kultur an Tag 5 *in vitro* mit der *Orc1* miR-shRNA oder Kontrolle infiziert und an Tag 10 *in vitro* einer OGD ausgesetzt. 24 h später erfolgte die Analyse des Zellüberlebens durch Zellzählung und Lactat-dehydrogenase (LDH)- Assay.

Die Zellzählung erfolgte anhand Auszählung EGFP-positiver Neurone aus semi-automatisiert erstellten Mikroskopbildern vor und nach OGD. Abb. 17 zeigt repräsentative Aufnahmen. In der linken Spalte sind EGFP-positive Neurone vor OGD gezeigt. In der mittleren Spalte sind EGFP-positiv Neurone in roter Fehlfarbe nach OGD zu sehen. In der rechten Spalte sind die überlebenden EGFP-positiven Neurone aus Überlappung der Aufnahmen in gelber Fehlfarbe und die degenerierten Neurone in grün gezeigt.

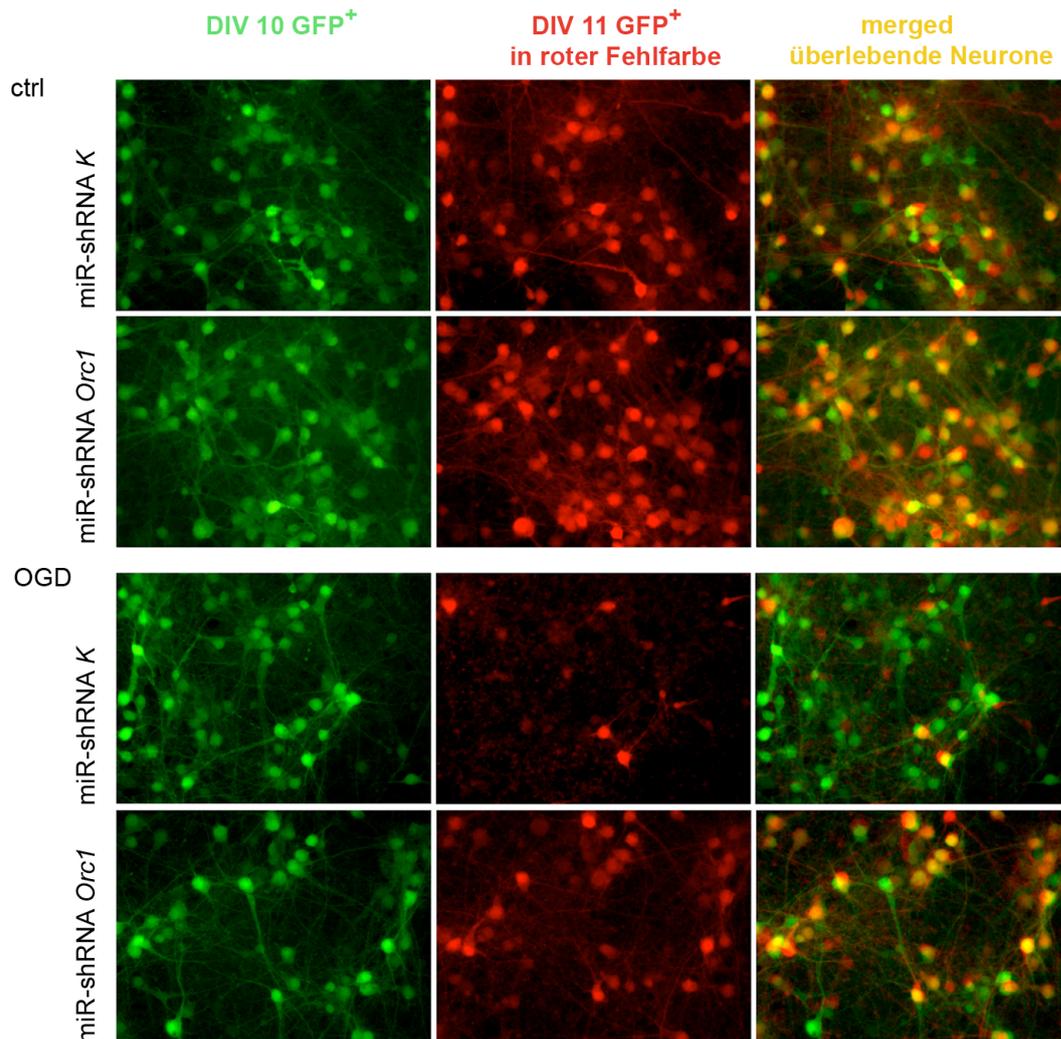


Abb.4.16.: *Orc1* miR-shRNA erhöht das Überleben von kortikalen Neuronen nach OGD.

Kortikale Neurone *in vitro* wurden an Tag 5 lentiviral mit *Orc1* miR-shRNA oder Kontroll miR-shRNA infiziert und an Tag 10 unter Kontrollbedingungen gehalten (basal) oder einer OGD ausgesetzt. Nach 24 h Reoxygenierung nach OGD wurde die Überlebensrate anhand Auszählung der EGFP-positiven Zellen vor und nach OGD ermittelt. Es wurden insgesamt 2283 transduzierte Zellen der miR-shRNA Kontrolle und 2081 transduzierte Zellen der miR-shRNA *Orc1* vor und nach OGD evaluiert. Die Zellen vor OGD sind in der linken Spalte und die Zellen nach OGD in der mittleren Spalte in roter Fehlfarbe dargestellt. Die überlebenden Zellen finden sich in gelber Fehlfarbe in der rechten Spalte.

Mittels Auszählung der Zellen aus in Abb. 17 beispielhaft gezeigten Bildern lässt sich die Überlebensrate der Neurone nach OGD feststellen. Um den basalen Einfluß der miR-shRNA ohne hypoxische Schädigung zu analysieren wurde das Zellüberleben durch Auszählung vor OGD im Vergleich von Tag 6 und 8 *in vitro* ermittelt. Den Einfluß der Schädigung durch die OGD und die *Orc1* miR-shRNA auf das Überleben wurde durch Auszählung im Vergleich von Tag 9 und 11 *in vitro* ermittelt.

Es stellte sich heraus, dass die *Orc1* miR-shRNA im Vergleich zur Kontroll miR-shRNA auf das basale Zellüberleben keinen Einfluß hatte. Jedoch zeigte sich ein signifikant erhöhtes Überleben der *Orc1* miR-shRNA behandelten Zellen nach OGD.

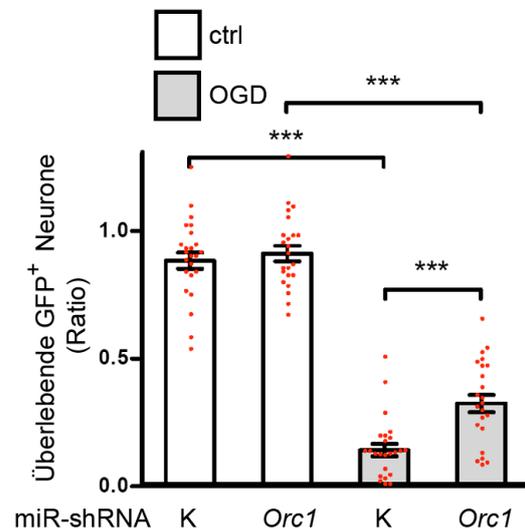


Abb.4.17.: Statistische Analyse der Überlebensrate der *Orc1* miR-shRNA behandelten kortikalen Neuronen nach OGD.

Das basale Zellüberleben nach Infektion mit der *Orc1* bzw. Kontroll-miR-shRNA wurde durch Auszählung an Tag 6 und 9 berechnet. Mit einem semi-automatisierten Verfahren wurden Software-gestützt zu jedem Zeitpunkt die gleichen Felder vor und nach OGD ausgezählt.

Die Zellzählung erfolgte aus 7-8 *high ower fields* aus drei unabhängigen Experimenten. Die Auswertung der Zellzählung der in Abb. 16 dargestellten Bilder erfolgte mittels two-way ANOVA gefolgt von einer Tukey post-hoc-Analyse ($p < 0,001^{***}$). Die Daten sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

Um die Zellschädigung zu messen, wurde ein Lactat-dehydrogenase (LDH) Assay durchgeführt. Dabei ist das Vorkommen von LDH ein Marker für die Zellintegrität. Bei Zellschädigung wird LDH ins Medium freigesetzt und kann indirekt gemessen werden. Es zeigte sich eine verminderte LDH Ausschüttung in den *Orc1* miR-shRNA behandelten Zellen, was einer verminderten Zellschädigung nach OGD im Vergleich zu Kontroll miR-shRNA behandelten Zellen entspricht.

Somit hatte die *Orc1* miR-shRNA einen protektiven Effekt auf das neuronale Zellüberleben nach OGD.

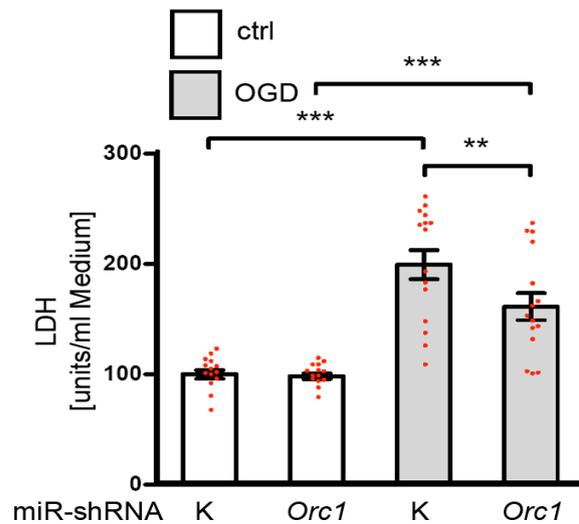


Abb.4.18.: *Orc1* miR-shRNA begrenzt die LDH Aktivität von kortikalen Neuronen nach OGD.

Kortikale Neurone *in vitro* wurden an Tag 5 lentiviral mit *Orc1* miR-shRNA oder Kontroll miR-shRNA infiziert und an Tag 10 einer OGD ausgesetzt. Nach 24 h Reoxygenierung wurde indirekt die LDH Aktivität über Reduktion des Co-faktors β -NADH bei 340 nm im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen. Die statistische Analyse erfolgte mittels two-way ANOVA gefolgt von einer Tukey post-hoc-Analyse ($p < 0,05^* n=14$). Die Daten sind als einzelne Messwerte (rote Datenpunkte) sowie als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt

Um umgekehrt die Auswirkung des Zellüberlebens bei ORC1 Überexpression zu analysieren, wurde ein lipofectaminbasierter Überexpressionsassay durchgeführt. Exogenes ORC1 in der Fusion zu *monomeric Cherry* (mCherry) als rot fluoreszierendes Protein oder als Kontrolle mCherry alleine wurden in den pLenti6 Vektor kloniert. Mittels Lipofectamin erfolgte die Transfektion in mature kortikale Neurone in Kultur. 7 h nach Transfektion ließ sich eine Expression des mCherry in der Fluoreszenzmikroskopie beobachten. Zu dieser Zeit bewirkte die Überexpression des ORC1 mCherry Fusionsproteins im Vergleich zu dem mCherry Protein ein vermehrtes neuronales Zellsterben.

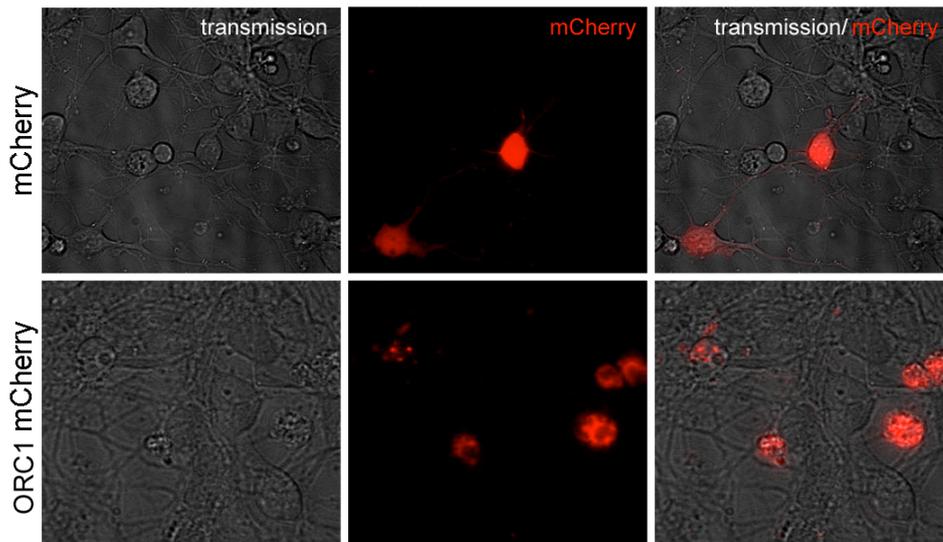


Abb.4.19.: ORC1 Überexpression durch Lipofectamin induziert neuronales Zellsterben.

Kortikale Neurone in Kultur wurden an Tag 5 mit Lipofectamin mit ORC1 mCherry- oder mCherry-Fusionskonstrukt, jeweils von einem Ubiquitinpromotor kontrolliert, transfiziert. Nach 7 h ließ sich unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Überexpression über das Fluoreszenzprotein mCherry beobachten. Aus 13-16 *high power fields* aus zwei unabhängigen Experimenten wurden mCherry-positive Neurone ausgezählt. Die degenerierenden Zellen wiesen im Gegensatz zu den gesunden Zellen eine Fragmentierung des Zellkerns auf.

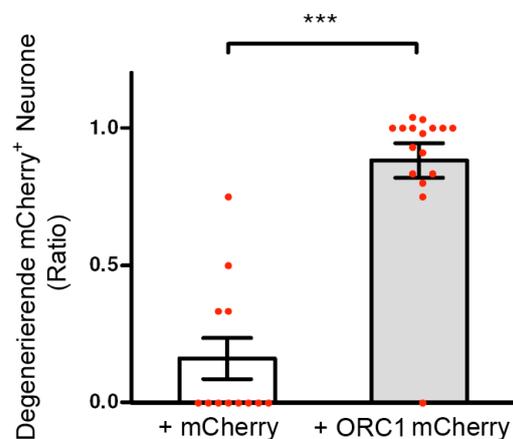


Abb.4.20.: Statistische Analyse: ORC1 Überexpression durch Lipofectamin induziert neuronales Zellsterben.

Die Auszählung der degenerierenden mCherry-positiven Zellen nach lipofectaminbasierter Transfektion mit mCherry alleine oder mit ORC1 mCherry zeigt ein erhöhtes neuronales Zellsterben nach ORC1 Überexpression. Die statistische Analyse aus zwei unabhängigen Experimenten erfolgte mittels ungepaartem t-Test (Mann-Whitney-U Test) (n=13-16 *high power fields*; mit 354 Zellen, $p < 0,001^{***}$).

Somit induziert die ORC1 Überexpression in maturaen Neuronen unter basalen Bedingungen einen neuronalen Zelltod.

5. Diskussion

Die E2F-Transkriptionsfaktoren sind als Schlüsselproteine in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose bekannt^{95,96}. In Neuronen sind sie an der Differenzierung, der Migration als auch in der Induktion des Zelltodes beteiligt^{55,59,97}. Der E2F4/p130 Repressorkomplex erhält - zusammen mit Co-Repressoren - als DREAM (*dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B*) Komplex und über die Rekrutierung von Chromatinremodelling Komplexen - wie SWI/SNF- in differenzierten Zellen den repressiven Status in der G0-Phase aufrecht^{98,99}. In Neuronen erfolgt unter pathophysiologischen Stimuli aufgrund einer Dissoziation des Repressorkomplexes von Zielgenpromotoren eine Derepression der Zielgene, was zum neuronalen Zelltod führt¹⁰⁰.

In dieser Arbeit wurde *Orc1* als Zielgen von E2F4 identifiziert, dessen Reexpression im *in vitro* Schlaganfall Modell der *oxygen glucose deprivation* zum neuronalen Zelltod führt.

5.1. Neuronale *Orc1* Reexpression nach OGD

Der *origin recognition complex* (ORC) leitet durch seine Funktion als prä-replikativer Komplex die DNA-Synthese in der S-Phase ein, indem er als Landefläche für CDC6, die MCM Proteine 2-7 und PCNA dient. Die Assemblierung aller sechs Untereinheiten ist notwendig, um die Replikation - u.a. durch die ATPase Funktion von ORC1 - einzuleiten und somit die Proliferation von Zellen überhaupt möglich zu machen^{101,102}. Neben der Replikation ist er in Zellzyklusprozesse in der Mitose wie die Chromatidkohäsion und Zytokinese involviert¹⁰³. Weiterhin können Proteine rekrutiert werden, die die Heterochromatinformierung forcieren. Somit steuert der ORC die Expression von Genen²⁴. All diese Funktionen sind auf den Zellkern beschränkt.

In Neuronen, also terminal differenzierten Zellen, wurde aufgrund der zytoplasmatischen und membranassoziierten Lokalisation einzelner ORC Proteine von Huang et al. eine neuronalspezifische Funktion unabhängig der oben erläuterten postuliert. Die ORC Untereinheiten 3-5 ließen sich in der Membran und im Zytoplasma von Neuronen von Ratten an Postnataltag 10 (P 10) detektieren. Da *Orc2-5* in adultem neuronalem Hirngewebe deutlich, *Orc6* schwach und *Orc1* nicht detektierbar exprimiert wurden, postulierte er aufgrund des inkompletten ORCs eine neuronale Funktion abseits der Replikation⁶⁷.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die *Orc1* Expression in embryonalen (E14) und adulten neuronalen Geweben der Maus durch quantitative Real-time PCR untersucht. Untersucht wurden hier das Kleinhirn, der Cortex und der Bulbus olfactorius. Die *Orc1* Expression war im adulten Bulbus olfactorius im Vergleich zu dem embryonalen Bulbus

olfactorius deutlich erhöht. Interessant scheint dieser Aspekt, da sich im adulten Bulbus olfactorius aus der subventriklären Zone eingewanderte Vorläuferzellen befinden, welche zur Zellteilung fähig sind. Es fand sich eine sehr niedrige *Orc1* Expression im adulten und embryonalen Cortex und Kleinhirn. Als Vergleich diente die embryonale Leber, in der sich aufgrund der Hämatopoese proliferierende Zellen befinden^{104,105}.

Diese Expressionsunterschiede ließen sich aufgrund der hohen Sensitivität der quantitativen Real-time PCR detektieren. Jedoch handelt es sich bei den untersuchten Proben um Gewebepräparationen und somit wurde die RNA aus einem Zellgemisch aus Neuronen, Gliazellen, Endothelzellen und Immunzellen sowie hämatopoetischen Zellen isoliert und untersucht.

Huang et al. untersuchte die Expression von *Orc1* in adultem neuronalen Gewebe aus Cerebellum, Hippokampus und Cortex mittels Northern Blot. *Orc1* mRNA Transkripte waren unter physiologischen Bedingungen mittels Northern Blot nicht zu detektieren.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Expression der sechs ORC Untereinheiten in kortikalen Neuronen in Kultur mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Die *Orc3* Expression zeigt sich im Vergleich zu den anderen Untereinheiten des ORC in der quantitativen Real-time am höchsten. Hier handelt es sich um eine Kultur mit einer Anreicherung von Neuronen und einem Anteil unterschiedlicher Gliazellen, hauptsächlich Astrozyten, der etwa 10% der Zellen ausmacht.

Die *Orc1* Expression war relativ zu der Expression der anderen Untereinheiten durch quantitative Real time PCR gerade noch detektierbar. Sie spiegelt eine sehr geringe Expression von *Orc1* unter physiologischen Kulturbedingungen in kortikalen Neuronen in Kultur wider. Die zu der Expression der anderen Untereinheiten des ORC relativ hohe Expression von *Orc3* ist stimmig mit den Daten von Huang et al.. In dieser Studie wurde durch RNA Interferenz mit *Orc3* eine neuronenspezifische Funktion von ORC3 gefunden. Die Herunterregulation von *Orc3* in hippokampalen Neuronen beeinflusst das Auswachsen der Dendriten, das *Branching* (Verzweigung) und die Entwicklung der *Spines*⁶⁷.

Über eine neuronalspezifische Funktion des ORC unter pathophysiologischen Bedingungen ist in der Literatur bislang nichts beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde ORC1 in einem Kandidatenansatz unter der pathophysiologischen Bedingung der OGD in Neuronen untersucht. Dies schien aufgrund der Tatsache interessant, dass Neuronen nach pathophysiologischen Stimuli einen aberranten Zellzykluseintritt vollziehen und vereinzelt Marker für die S-Phase aufweisen. ORC1 kommt in proliferierenden Zellen eine Schlüsselrolle. Dessen Anlagerung an den ORC und Vermittlung der Chromatinbindung wird als ‚rate limiting step‘ bezeichnet¹⁴. Das bedeutet, dass ORC1 zellbiologisch essentiell für die Einleitung der DNA-Synthese ist. Was für eine Rolle spielt ORC1 jedoch in Neuronen?

Das Phänomen des aberranten Zellzykluseintritts ist in neurodegenerativen Erkrankungen wie der langsam progredienten Alzheimer Erkrankung und dem akuten Schlaganfall bekannt^{72,80}. Aus *in vivo* und *in vitro* Studien zum Schlaganfall weiß man, dass Zellzyklusproteine reexprimiert werden, die in Neuronen unter physiologischen Bedingungen auf der Transkriptionsebene reprimiert waren. So wird *Zyklin D1* nach OGD und MCAo hochreguliert⁸². Die Expression der Zellzyklusfaktoren nach Schädigung führt meist zum neuronalen Zelltod, welcher durch die Inhibition der Zyklin/CDK Komplexe durch Olomucine nach OGD und Flavopiridol nach MCAo verhindert werden kann^{74,80}. Die pharmakologischen Ansätze verhindern zwar global das neuronale Zellsterben durch Hemmung der Zyklin/CDK Komplexe, jedoch ist aufgrund der Unspezifität nicht zu unterscheiden, in welchem Zelltyp dies von Bedeutung ist, da durch Zytostatika allgemein die Proliferation blockiert wird. Ein Substrat der G1-Zyklin/CDK Komplexe ist E2F1. Somit werden indirekt E2F1 Zielgene reguliert. Es konnte eine erhöhte *E2f1* mRNA nach OGD und ein erhöhter Proteinlevel nach MCAo festgestellt werden¹⁰⁶. Marker für die S-Phase wie zelleigenes PCNA, welches ein E2F-Zielgen darstellt, oder eingebrachtes BrDU waren ebenfalls erhöht nachweisbar^{81,107}. Somit lag es nahe, die Lücke zwischen Zellzykluseintritt und S-Phase in den Fokus der Experimente zu nehmen und die Expression von *Orc1* in Neuronen im pathophysiologischen Kontext der OGD zu untersuchen.

In kortikalen Neuronen zeigte sich nach OGD bereits 5 h nach Reoxygenierung eine erhöhte mRNA von *Orc1*. Der ORC1 Proteinlevel war ebenfalls erhöht. Densitometrisch signifikant erhöht erwies sich dabei eine modifizierte Form von ORC1, die ein Molekulargewicht von etwa 115 kDa- im Vergleich zum unmodifizierten ORC1 von 97 kDa- im Immunoblot aufwies. Posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitylierung und Phosphorylierung von ORC1 regulieren in proliferierenden Zellen dessen Assoziation zum ORC, dessen Lokalisation und Degradation. De Pamphilis et al. beschrieb, dass mono- und diubiquityliertes ORC1 nicht am Chromatin bindet, sondern im Zytoplasma zu finden ist und so zum proteosomalen Abbau markiert ist. Das ubiquitylierte ORC1 besitzt dabei ein Molekulargewicht von etwa 119 kDa¹⁰⁸. Somit könnte es sich bei dieser Modifikation von ORC1 um Ubiquitylierung handeln, aber auch andere noch unbeschriebene Modifikationen sind denkbar. Neben Ubiquitylierung ist die kovalente Konjugation von *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) eine Proteinmodifikation, die unter ischämischen Bedingungen in Neuronen vorkommt und die Stabilität und die Lokalisation von Zielproteinen reguliert¹⁰⁹. SUMOylierung ist eine relativ neu entdeckte Modifikation. Von SUMO 1-4 wird SUMO 2/3 in Neuronen gefunden, die sich an der Grenze zum Infarktareal, also in der Penumbra befinden¹¹⁰. In diesen Neuronen wirkt SUMOylierung protektiv gegen hypoxisch/ischämische Schädigung nach OGD¹¹¹. So ist SUMO 2/3 mit 12 kDa eine Modifikation, die zu der Bande des modifizierten ORC1 passen würde.

In proliferierenden HT22 Zellen findet sich ebenfalls das modifizierte ORC1 bei 115 kDa. Diese Bande als auch die Bande des unmodifizierten ORC1, sind ausschließlich in der Kernfraktion zu finden. Würde es sich um eine Ubiquitylierung handeln, würde man annehmen, dass das ubiquitylierte ORC1 zusätzlich im Zytoplasma zu finden ist. Denn laut DePamphilis et.al wird ORC1 durch Ubiquitylierung zum Kernexport und zur proteosomalen Degradierung im Zytoplasma markiert²⁶.

Um welche Modifikation von ORC1 es sich hier handelt und welche Rolle die ORC1 Modifikation im pathophysiologischen Kontext der zerebralen Ischämie/Hypoxie spielt, bleibt aktuell offen.

Um zu untersuchen, ob die *Orc1* Reexpression auf eine neuronalspezifische *Orc1* Promotoraktivierung zurückzuführen ist, wurde ein CRE-Luziferase System etabliert. Anstelle der Promotoraktivierung und *de novo* Transkription von *Orc1* wäre eine Stabilisierung der *Orc1* mRNA und eine gesteigerte Translation denkbar, die zu der erhöhten *Orc1* mRNA 5 h nach Reoxygenierung und erhöhtem Protein nach 24 h geführt haben könnte.

Die *Orc1* Promotor-getriebene Luziferase wurde lentiviral in CamKII-CRE-Neuronen eingebracht und die *Orc1* Promotoraktivität nach OGD untersucht. Es zeigte sich nach 60 Minuten Reoxygenierung nach OGD eine erhöhte Aktivität des *Orc1* Promotors. Somit ist die erhöhte *Orc1* mRNA und das Protein auf eine Regulation des *Orc1* Promotors in Neuronen zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals festgestellt, dass *Orc1* unter der pathophysiologischen Bedingung der OGD in Neuronen reexprimiert wird, was auf eine Aktivierung des *Orc1* Promotors in Neuronen zurückzuführen ist. Doch welche Funktion erfüllt das reexprimierte ORC1 in Neuronen?

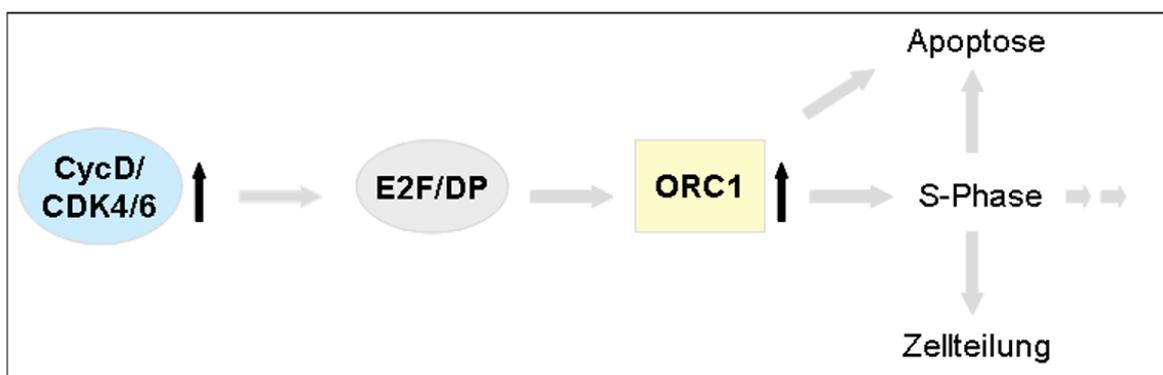


Abb.5.1.: Hypothese: Das E2F regulierte ORC1 führt in postmitotischen Zellen entweder über die S-Phase oder direkt zur Apoptose. Theoretisch wäre eine Zellteilung differenzierter Neurone denkbar.

Eine Hypothese lautet, dass das reexprimierte ORC1 unter pathophysiologischen Bedingungen ein Baustein in der Signalkaskade des aberranten Zellzykluseintrittes darstellt.

5.2. *Orc1* ist ein E2F4-reguliertes Zielgen nach OGD

Die E2F-Transkriptionsfaktoren regulieren in proliferierenden Zellen den physiologischen Zellzyklus über die Regulation der Zielgene mit Funktion im G1/S-Übergang, in der S-Phase, in der Mitose sowie den *checkpoints* und der DNA-Reparatur¹¹². Zyklusabhängige Kinasen und Zykline sind in den pathologischen aberranten Zellzykluseintritt von Neuronen nach Schädigung und konsekutiven Zelltod involviert. Die E2F-Transkriptionsfaktoren E2F1 und E2F4 haben ebenfalls einen Einfluss auf die Schädigung nach zerebraler Ischämie/Hypoxie. E2F4 Verlust führt im Mausmodell der transienten globalen Ischämie zu einer Vergrößerung des geschädigten Areals⁷⁰. Park et. al fanden in einem Ansatz mit transienter siRNA-vermittelter Herunterregulation von *E2f4* in kortikalen Neuronen in Kultur ein vermehrtes neuronales Zellsterben nach Hypoxie. In dieser Studie wurden die Neuronen für 18 h einer Hypoxie unter einem NMDA- Rezeptorblocker ausgesetzt⁷⁰.

Im Mausmodell der zerebralen Ischämie führt der transaktivierende und proapoptische Transkriptionsfaktor E2F1 zu einer Vergrößerung des Schlaganfallareals nach MCAo⁶⁹.

Aus den im vorigen Kapitel erläuterten Ergebnissen lässt sich postulieren, dass unter physiologischen Bedingungen in terminal differenzierten Neuronen der *Orc1* Promotor reprimiert wird und dass nach Schädigung eine Aufhebung der Repression stattfindet, um die Aktivierung zu ermöglichen. E2F-Transkriptionsfaktoren regulieren in proliferierenden Zellen die Expression von *Orc1*¹¹³.

Der *Orc1* Promotor weist mehrere E2F-Bindungsstellen in der *in silico* Analyse auf. In Chromatinimmunpräzipitationsexperimenten aus kortikalen Neuronen lässt sich ein Besatz des *Orc1* Promotors mit den E2F-Transkriptionsfaktoren nachweisen. So findet sich eine Bindung von E2F4 unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, wohingegen E2F1 vor allem nach OGD am *Orc1* Kernpromotor zu finden ist. Hier scheint also der aktivierende Transkriptionsfaktor E2F1 die Repression durch E2F4 kompensieren zu können. Dies führt offensichtlich insgesamt zu einer Steigerung der Transkription und Erhöhung der *Orc1* mRNA. Da dieser Chromatinimmunpräzipitationsassay nach 24 h Reoxygenierung durchgeführt wurde, könnte man postulieren, dass zu diesem Zeitpunkt die Bindung der Faktoren nur in den Zellen nachweisbar war, die durch Bindung von E2F4 am *Orc1* Promotor bis dahin überlebt haben.

Ob es umgekehrt möglich ist den aktivierten *Orc1* Promotor durch E2F4 zu reprimieren, wurde mit einem *Orc1* Promotor Luziferaseassay adressiert. Im Zellkulturmodell mit synchronisierten HT22 Zellen war es möglich den nach Serumzugabe aktivierten *Orc1* Promotor durch exogenes E2F4-V5 zu reprimieren. Somit erweisen sich in diesem Experiment in proliferierenden Zellen ganz prinzipiell die Präsenz und Funktionalität von E2F4 am *Orc1* Promotor.

Es ist bereits bekannt, dass unter pathophysiologischen Bedingungen, wie der zerebralen Ischämie/Hypoxie der neuronale Zelltod über eine Derepression von E2F4/p130 Zielgenen wie dem proapoptotischen Faktor B Myb vermittelt wird ⁷⁰.

Von Green et al. wurde postuliert, dass der neuronale Zelltod von einer diffizilen E2F-abhängigen Regulation zwischen Repression und Derepression abhängt ⁹⁷.

Um den Einfluß von E2F4 auf die *Orc1* Expression in Neuronen nach OGD zu untersuchen, wurde eine neuronalspezifische miR-shRNA gegen E2F4 eingesetzt, die lentiviral in kortikale Neurone transduziert wurde. Es zeigte sich eine E2F4-abhängige *Orc1* Expression in den kortikalen Neuronen. Vor OGD war die *Orc1* mRNA bei E2F4 Herunterregulation leicht erhöht. Nach OGD erwies sich die erhöhte *Orc1* Expression bei E2F4 Verlust verstärkt. Somit geht ein E2F4 Verlust mit einer Derepression des *Orc1* Promotors einher, welche sich besonders unter pathophysiologischen Bedingungen auswirkt. Neben E2F4 Verlust ist also ein pathophysiologischer Stimulus notwendig, um die *Orc1* Expression signifikant zu erhöhen.

Zusammenfassend ist hier festgestellt worden, dass die *Orc1* Reexpression in Neuronen nach OGD auf eine Derepression am *Orc1* Promotor durch Verlust des E2F4 Repressorkomplexes zurückzuführen ist.

5.3. Blockade der *Orc1* Reexpression nach OGD ist neuroprotektiv

Neuronale Vorläuferzellen erhalten durch die Ischämie/Hypoxie Signale, die sie zur Proliferation und Migration anregen. Es wurde gezeigt, dass sowohl die residenten Vorläuferzellen im Neocortex als auch die Vorläuferzellen in der subventrikulären Zone nach 3-8 Wochen nach einem Schlaganfall Neurogenese begehen ^{84,114}. Zur Proliferation ist die DNA-Synthese und somit die Assemblierung des ORC mit allen sechs Untereinheiten unabdingbar ¹¹⁵. Somit ist es denkbar, dass die neuronale Reexpression von *Orc1* unter Ischämie/Hypoxie in einer neuronalen Subpopulation ein Schritt in Richtung neuronale Regeneration darstellt.

Postmitotische geschädigte Neurone reaktivieren ihren Zellzyklus und begehen je nach Ausmaß der Schädigung Apoptose. Es wird postuliert, dass der G1 *checkpoint* dafür verantwortlich ist ⁸². Jedoch zeigen einige Neurone, bevor sie sterben, Marker für die S-Phase. Somit scheint es neben der G1 *checkpoint* Aktivierung einen alternativen Apoptoseweg zu geben.

Ein Hinweis darauf, dass ORC1 in diesen Weg involviert sein könnte, zeigen ORC1 Überexpressionsexperimente, die von DePamphilis et. al. durchgeführt wurden. Dabei induzierte in proliferierende Zellen eingebrachtes, unmodifiziertes ORC1 über Caspase 3 Aktivierung eine p53 unabhängige Apoptose ²⁶. Die Zellen weisen Apoptosezeichen wie

zelluläres *Blebbing* und DNA-Fragmentierung auf. Wie genau der Apoptosemechanismus über ORC1 abläuft, ob ORC1 direkt oder über Mediatorproteine Caspase 3 aktiviert, ist nicht untersucht. Aber es zeigt, dass eine Verbindung von ORC1 zu proapoptischen Faktoren besteht.

Mittels lentiviral transduzierter *Orc1* miR-shRNA wurde hier die Rolle von *Orc1* nach Ischämie/Hypoxie in Neuronen adressiert. Verhinderung der ORC1 Synthese erhöht das Überleben der kortikalen Neuronen in Kultur nach OGD, was durch Zellzählung und LDH Assay gezeigt wurde. Diese Untersuchung zeigt erstmals, dass mit ORC1 ein *rate limiting factor* in Neuronen existiert, durch dessen Blockierung das neuronale Zellüberleben nach Schädigung signifikant erhöht wird. Anzunehmen ist weiterhin, dass eine Subpopulation von Neuronen ORC1- unabhängig Zelltod begeht. Andererseits wird nicht in allen Neuronen der ORC1 Level durch die *Orc1* miR-shRNA soweit erniedrigt sein, dass diese vor neuronalem Zelltod nach OGD geschützt werden können.

Im Umkehrschluss ist ORC1 als ein Faktor identifiziert, der in geschädigten Neuronen das Zellsterben vorantreibt. Wird ORC1 als Fusionskonstrukt zu dem rot fluoreszierenden Protein *monomeric Cherry* (mCherry) in kortikalen Neuronen in Kultur überexprimiert, zeigen diese ein vermehrtes Zellsterben. Ob dies auf Apoptosemechanismen- wie Caspaseaktivierung- oder auf nekrotisches Sterben zurückzuführen ist, bleibt zu untersuchen. Ob tatsächlich solche Gendosen unter pathophysiologischen Zuständen wie der zerebralen Ischämie erreicht werden oder ob erst die Kombination aus anderen Zelltodstimuli und die Erhöhung des ORC1 Proteins zum Zelltod führen, bleibt noch zu klären.

Sumrejkanchanakij et. al untersuchte die Auswirkung der Zyklin D1 Überexpression in postmitotischen Neuronen. Er fand, dass überexprimiertes Zyklin D1 im Zytoplasma gehalten wird und keinen Auswirkungen auf das Zellüberleben hat. Erst die Expression mit Forcierung des Kerntransports von Zyklin D1 treibt die Neurone in Apoptose¹¹⁶. Somit scheint die zelluläre Sequestration eine Rolle bei der Apoptoseeinleitung zu spielen, welche für ORC1 im Kontext der zerebralen Ischämie/Hypoxie offen bleibt.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit *Orc1* als neuronales E2F4-Zielgen im Zellkulturmodell des ischämischen Schlaganfalls identifiziert, welches durch Derepression von E2F4 den neuronalen Zelltod induziert. Somit ist mit ORC1 ein neues Schlüsselprotein in der neuronalen Schadenskaskade von Zellzyklusreaktivierung zu Apoptose identifiziert, das für den Untergang einer relevanten Subpopulation von Nervenzellen von entscheidender Bedeutung ist.

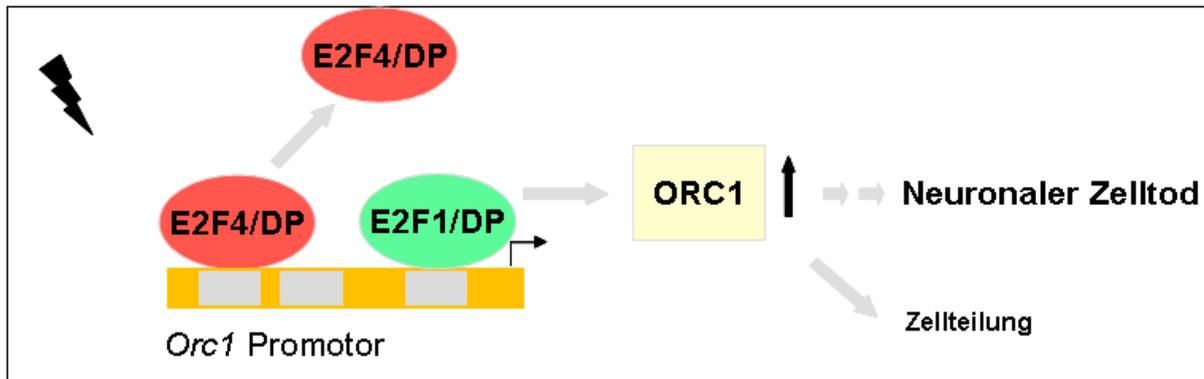


Abb.5.2.: Hypothese der *Orc1* Regulation: In postmitotischen Neuronen wird nach neuronaler Schädigung der *Orc1* Promotor durch Änderung des Promotorbesatzes mit den E2F-Transkriptionsfaktoren aktiviert und *Orc1* wird reexprimiert. Dies führt nach den Ergebnissen dieser Arbeit zum neuronalen Zelltod und nicht zur Einleitung der Zellteilung post-mitotischer Neurone.

5.4. Ausblick

Einige Fragestellungen haben sich aus den experimentellen Befunden ergeben:

1. Um welche Proteinmodifikation von ORC1 handelt es sich, die nach OGD im Immunoblot nachzuweisen ist?
2. Wo ist ORC1 nach hypoxischer Schädigung lokalisiert und ist die Modifikation in die Lokalisation involviert?
3. Über welche Signalkaskade löst ORC1 die Apoptose aus und ist die Lokalisation dafür ausschlaggebend?

Um die Aufgabe von ORC1 in Neuronen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit mit kortikalen Neuronen in Kultur gearbeitet und als Schädigungsmodell für die zerebrale Ischämie/Hypoxie wurde die OGD verwendet. In diesem Modell werden die neuroimmunologischen und kardiovaskulären Einflüsse nach ischämisch/hypoxischer Schädigung außen vorgelassen, die in einem Organismus den neuronalen Zelltod beeinflussen, um sich auf die neuronalen Mechanismen zu fokussieren. Zudem wurden die Experimente mit neuronal spezifischen Untersuchungen wie der Synapsin-Promotor getriebenen Expression der miR-shRNA und dem *Orc1* Promotorassay mit dem CRE-Flex Luziferasesystem, durchgeführt, um den molekularen Mechanismus in Neuronen zu analysieren. Einerseits ermöglicht dieses vereinfachte Modellsystem erst die zelltypspezifische Erforschung der Mechanismen, andererseits lässt man die zahlreichen Interaktionen mit Gliazellen, Astrozyten, Immunzellen sowie Zytokinen und Endothel

unbetrachtet, die im Schlaganfall sowohl die neuronale Schädigung als auch die Erholungsphase im weiteren Verlauf mitbeeinflussen.

Aus diesem Grund ist die Rolle von *ORC1* in *in vivo* Experimenten in der Maus nach MCAo zu untersuchen.

So sind Untersuchungen mit einer konditionalen *Orc1 knock out* Maus geplant. Diese kann nach neuronal-spezifischem Verlust im Schlaganfall Modell charakterisiert werden. Dabei macht man sich die pharmakologisch induzierbare CRE-Proteinaktivierung zu nutze, um eine genomische Ablation von *Orc1* erst nach Abschluss der Embryonalentwicklung zu erzielen.

Man könnte sich vorstellen, dass, wenn man die neuronale Expression von *Orc1* nach ischämisch/hypoxischer Schädigung durch MCAo verhindert, die Mechanismen der Regeneration mit Einbeziehung der neuronalen Vorläuferzellen gestört werden. Somit könnte selbst die neuronal-spezifische Hemmung von *Orc1* kurze Zeit nach MCAo protektiv sein, indem z.B. das Schadensareal verkleinert wird, jedoch die Langzeitauswirkungen auf die Kognition negativ beeinflusst werden.

6. Zusammenfassung

Ein Schlaganfall geht aufgrund der Degeneration von Neuronen häufig mit bleibenden Behinderungen einher. Dies basiert auf der Tatsache, dass postmitotische Neurone nicht zur Regeneration durch Zellteilung fähig sind und die Rehabilitation von neuen Lernvorgängen und plastischen Umbauprozessen abhängt, was jedoch u.a. durch die Größe des geschädigten Areals beschränkt möglich ist.

Mit der Beobachtung des aberranten Zellzykluseintritts von Neuronen wurde ein Phänomen entdeckt, von dem man annahm, es sei ein Versuch zur neuronalen Regeneration. Dabei werden Zellzyklusproteine wie zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) und Zykline reaktiviert oder vermehrt exprimiert. Es stellte sich heraus, dass nach Reaktivierung von Zellzyklusproteinen der neuronale Zelltod u.a. über den aktivierenden Transkriptionsfaktor E2F1 eingeleitet wird. Dabei scheint der G1/S-Phase *checkpoint* verantwortlich zu sein. Einige Neurone weisen Zeichen für die S-Phase auf, so dass diese Zellen den *checkpoint* überschritten haben.

Neben der Aktivierung treibt ein Verlust der Repression von Genen postmitotischer Neurone nach ischämisch/hypoxischer Schädigung in die Apoptose. So führt einem Verlust des E2F4/p130 Repressorkomplexes an Zielgenpromotoren zum neuronalen Zelltod.

Die sechs ORC Proteine leiten als *origin recognition complex* (ORC) in proliferierenden Zellen die S-Phase ein. Die ORC Proteine 2-6 werden in Neuronen unter physiologischen Bedingungen exprimiert und erfüllen dort vermutlich Funktionen abseits der DNA Replikation. ORC1 ist unter physiologischen Bedingungen in Neuronen kaum vorhanden.

In dieser Arbeit wurde erstmals die neuronale Reexpression von *Orc1* im pathophysiologischen Kontext durch das Modell des kombinierten Sauerstoff- und Glukoseentzugs (OGD: oxygen glucose deprivation) gezeigt. Diese Reexpression von *Orc1* basiert auf einem Verlust der Promotorrepression durch E2F4 und führt zum neuronalen Zelltod. Wird die Reexpression über eine neuronalspezifische RNA-Interferenz mit *Orc1* blockiert, lässt sich das Sterben von Neuronen nach OGD verhindern.

Somit wurde ORC1, welches unter physiologischen Bedingungen in proliferierenden Zellen die Einleitung die Replikation ermöglicht, als ein proapoptischer Faktor in der Schadenskaskade postmitotischer Neuronen nach Ischämie/Hypoxie identifiziert, welcher durch den E2F4/p130 Repressorkomplex reguliert wird.

7. Anhang

7.1. Literatur

1. Hartwell, L.H. & Weinert, T.A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634 (1989).
2. Bates, S. & Vousden, K.H. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 12-18 (1996).
3. Vlach, J., Hennecke, S. & Amati, B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J* **16**, 5334-5344 (1997).
4. Sherr, C.J. & Roberts, J.M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**, 1149-1163 (1995).
5. Vidal, A. & Koff, A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* **247**, 1-15 (2000).
6. Magnaghi-Jaulin, L., *et al.* Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**, 601-605 (1998).
7. Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E. & Ginsberg, D. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* **21**, 437-446 (2002).
8. Hateboer, G., *et al.* Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol Cell Biol* **18**, 6679-6697 (1998).
9. Maiti, B., *et al.* Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* **280**, 18211-18220 (2005).
10. Cam, H., *et al.* A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell* **16**, 399-411 (2004).
11. Logan, N., *et al.* E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* **24**, 5000-5004 (2005).
12. Wigley, D.B. ORC proteins: marking the start. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 72-78 (2009).
13. Almouzni, G. The origin replication complex (ORC): the stone that kills two birds. *Bioessays* **16**, 233-235 (1994).
14. DePamphilis, M.L. The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene* **310**, 1-15 (2003).
15. Speck, C., Chen, Z., Li, H. & Stillman, B. ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 965-971 (2005).
16. Pak, D.T., *et al.* Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* **91**, 311-323 (1997).
17. Cuvier, O., Lutzmann, M. & Mechali, M. ORC is necessary at the interphase-to-mitosis transition to recruit cdc2 kinase and disassemble RPA foci. *Curr Biol* **16**, 516-523 (2006).
18. Sasaki, T. & Gilbert, D.M. The many faces of the origin recognition complex. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 337-343 (2007).

19. de Munnik, S.A., *et al.* Meier-Gorlin syndrome genotype-phenotype studies: 35 individuals with pre-replication complex gene mutations and 10 without molecular diagnosis. *Eur J Hum Genet* **20**, 598-606.
20. Miyake, Y., Mizuno, T., Yanagi, K. & Hanaoka, F. Novel splicing variant of mouse Orc1 is deficient in nuclear translocation and resistant for proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* **280**, 12643-12652 (2005).
21. Ohtani, K., *et al.* Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol* **16**, 6977-6984 (1996).
22. Callebaut, I., Courvalin, J.C. & Mornon, J.P. The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS Lett* **446**, 189-193 (1999).
23. Noguchi, K., Vassilev, A., Ghosh, S., Yates, J.L. & DePamphilis, M.L. The BAH domain facilitates the ability of human Orc1 protein to activate replication origins in vivo. *EMBO J* **25**, 5372-5382 (2006).
24. Prasanth, S.G., Shen, Z., Prasanth, K.V. & Stillman, B. Human origin recognition complex is essential for HP1 binding to chromatin and heterochromatin organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15093-15098.
25. Kneissl, M., Putter, V., Szalay, A.A. & Grummt, F. Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells. *J Mol Biol* **327**, 111-128 (2003).
26. Saha, T., Ghosh, S., Vassilev, A. & DePamphilis, M.L. Ubiquitylation, phosphorylation and Orc2 modulate the subcellular location of Orc1 and prevent it from inducing apoptosis. *J Cell Sci* **119**, 1371-1382 (2006).
27. Chen, M. & Wang, J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* **7**, 313-319 (2002).
28. Bao, Q. & Shi, Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* **14**, 56-65 (2007).
29. Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. & Haupt, Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* **116**, 4077-4085 (2003).
30. Buja, L.M., Eigenbrodt, M.L. & Eigenbrodt, E.H. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* **117**, 1208-1214 (1993).
31. Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I. & Giacca, M. Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle* **4**, 930-939 (2005).
32. Moroni, M.C., *et al.* Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* **3**, 552-558 (2001).
33. Nahle, Z., *et al.* Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* **4**, 859-864 (2002).
34. Hershko, T., Chaussepied, M., Oren, M. & Ginsberg, D. Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ* **12**, 377-383 (2005).
35. Johnston, S.C., Mendis, S. & Mathers, C.D. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. *Lancet Neurol* **8**, 345-354 (2009).
36. Heiss, W.D. & Graf, R. The ischemic penumbra. *Curr Opin Neurol* **7**, 11-19 (1994).

37. Back, T. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* **18**, 621-638 (1998).
38. Lees, K.R., *et al.* Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* **375**, 1695-1703.
39. Saver, J.L., *et al.* Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med* **372**, 2285-2295.
40. Hacke, W., *et al.* Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **359**, 1317-1329 (2008).
41. Wahlgren, N., *et al.* Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet* **372**, 1303-1309 (2008).
42. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397 (1999).
43. Dong, X.X., Wang, Y. & Qin, Z.H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* **30**, 379-387 (2009).
44. Wang, H.G., *et al.* Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339-343 (1999).
45. Nicholls, D.G. Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr Mol Med* **4**, 149-177 (2004).
46. Sims, N.R. & Zaidan, E. Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischaemia. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 531-550 (1995).
47. Hou, S.T., *et al.* The transcription factor E2F1 modulates apoptosis of neurons. *J Neurochem* **75**, 91-100 (2000).
48. Hong, L.Z., Zhao, X.Y. & Zhang, H.L. p53-mediated neuronal cell death in ischemic brain injury. *Neurosci Bull* **26**, 232-240.
49. Pan, W. & Kastin, A.J. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol* **83**, 363-374 (2007).
50. Wodarz, A. & Huttner, W.B. Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev* **120**, 1297-1309 (2003).
51. Alvarez-Buylla, A. & Garcia-Verdugo, J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* **22**, 629-634 (2002).
52. Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Nakayama, H. & Doi, K. Cell cycle progression is required for nuclear migration of neural progenitor cells. *Brain Res* **1088**, 57-67 (2006).
53. Oppenheim, R.W. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**, 453-501 (1991).
54. Frade, J.M. & Ovejero-Benito, M.C. Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle* **14**, 712-720.
55. McClellan, K.A., *et al.* Unique requirement for Rb/E2F3 in neuronal migration: evidence for cell cycle-independent functions. *Mol Cell Biol* **27**, 4825-4843 (2007).
56. Calegari, F. & Huttner, W.B. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* **116**, 4947-4955 (2003).

57. Nguyen, L., Besson, A., Roberts, J.M. & Guillemot, F. Coupling cell cycle exit, neuronal differentiation and migration in cortical neurogenesis. *Cell Cycle* **5**, 2314-2318 (2006).
58. Campbell, G.R., Baudhuin, A., Vranizan, K. & Ngai, J. Transcription factors expressed in olfactory bulb local progenitor cells revealed by genome-wide transcriptome profiling. *Mol Cell Neurosci* **46**, 548-561.
59. Kusek, J.C., Greene, R.M. & Pisano, M.M. Expression of the E2F and retinoblastoma families of proteins during neural differentiation. *Brain Res Bull* **54**, 187-198 (2001).
60. Dagnino, L., *et al.* Expression patterns of the E2F family of transcription factors during mouse nervous system development. *Mech Dev* **66**, 13-25 (1997).
61. Cooper-Kuhn, C.M., *et al.* Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1. *Mol Cell Neurosci* **21**, 312-323 (2002).
62. Persengiev, S.P., Kondova, I. & Kilpatrick, D.L. E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol* **19**, 6048-6056 (1999).
63. Ruzhynsky, V.A., *et al.* Cell cycle regulator E2F4 is essential for the development of the ventral telencephalon. *J Neurosci* **27**, 5926-5935 (2007).
64. Konishi, Y., Stegmuller, J., Matsuda, T., Bonni, S. & Bonni, A. Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain. *Science* **303**, 1026-1030 (2004).
65. Kim, A.H., *et al.* A centrosomal Cdc20-APC pathway controls dendrite morphogenesis in postmitotic neurons. *Cell* **136**, 322-336 (2009).
66. Yang, Y., *et al.* A Cdc20-APC ubiquitin signaling pathway regulates presynaptic differentiation. *Science* **326**, 575-578 (2009).
67. Huang, Z., Zang, K. & Reichardt, L.F. The origin recognition core complex regulates dendrite and spine development in postmitotic neurons. *J Cell Biol* **170**, 527-535 (2005).
68. MacManus, J.P., *et al.* Absence of the transcription factor E2F1 attenuates brain injury and improves behavior after focal ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1020-1028 (2003).
69. MacManus, J.P., Koch, C.J., Jian, M., Walker, T. & Zurakowski, B. Decreased brain infarct following focal ischemia in mice lacking the transcription factor E2F1. *Neuroreport* **10**, 2711-2714 (1999).
70. Iyirhiaro, G.O., *et al.* Regulation of ischemic neuronal death by E2F4-p130 protein complexes. *J Biol Chem* **289**, 18202-18213.
71. Harms, C., *et al.* Melatonin is protective in necrotic but not in caspase-dependent, free radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures. *FASEB J* **14**, 1814-1824 (2000).
72. Herrup, K., Neve, R., Ackerman, S.L. & Copani, A. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci* **24**, 9232-9239 (2004).
73. Busser, J., Geldmacher, D.S. & Herrup, K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* **18**, 2801-2807 (1998).
74. Osuga, H., *et al.* Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10254-10259 (2000).
75. Ino, H. & Chiba, T. Cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 are required for excitotoxin-induced neuronal cell death in vivo. *J Neurosci* **21**, 6086-6094 (2001).

76. Rakic, P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci* **3**, 65-71 (2002).
77. Tonchev, A.B., Yamashima, T., Zhao, L., Okano, H.J. & Okano, H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* **23**, 292-301 (2003).
78. Kuan, C.Y., *et al.* Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci* **24**, 10763-10772 (2004).
79. Bauer, S. & Patterson, P.H. The cell cycle-apoptosis connection revisited in the adult brain. *J Cell Biol* **171**, 641-650 (2005).
80. Katchanov, J., *et al.* Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* **21**, 5045-5053 (2001).
81. Wen, Y., Yang, S., Liu, R. & Simpkins, J.W. Cell-cycle regulators are involved in transient cerebral ischemia induced neuronal apoptosis in female rats. *FEBS Lett* **579**, 4591-4599 (2005).
82. Rashidian, J., Iyirhiaro, G.O. & Park, D.S. Cell cycle machinery and stroke. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 484-493 (2007).
83. Jin, K., *et al.* Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* **24**, 171-189 (2003).
84. Ohira, K., *et al.* Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci* **13**, 173-179.
85. Sun, C., *et al.* Conditional ablation of neuroprogenitor cells in adult mice impedes recovery of poststroke cognitive function and reduces synaptic connectivity in the perforant pathway. *J Neurosci* **33**, 17314-17325.
86. Dull, T., *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**, 8463-8471 (1998).
87. Reich, A., *et al.* Fas/CD95 regulatory protein Faim2 is neuroprotective after transient brain ischemia. *J Neurosci* **31**, 225-233.
88. Mullis, K., *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273 (1986).
89. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).
90. Dittgen, T., *et al.* Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18206-18211 (2004).
91. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
92. Burnette, W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203 (1981).
93. Kouskouti, A. & Talianidis, I. Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *EMBO J* **24**, 347-357 (2005).

94. Hulett, H.R., Bonner, W.A., Barrett, J. & Herzenberg, L.A. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* **166**, 747-749 (1969).
95. Lazzarini Denchi, E. & Helin, K. E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. *EMBO Rep* **6**, 661-668 (2005).
96. Greene, L.A., Biswas, S.C. & Liu, D.X. Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell Death Differ* **11**, 49-60 (2004).
97. Liu, D.X. & Greene, L.A. Regulation of neuronal survival and death by E2F-dependent gene repression and derepression. *Neuron* **32**, 425-438 (2001).
98. Litovchick, L., *et al.* Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol Cell* **26**, 539-551 (2007).
99. Sadasivam, S. & DeCaprio, J.A. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer* **13**, 585-595.
100. Liu, D.X., Nath, N., Chellappan, S.P. & Greene, L.A. Regulation of neuron survival and death by p130 and associated chromatin modifiers. *Genes Dev* **19**, 719-732 (2005).
101. Lipford, J.R. & Bell, S.P. Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol Cell* **7**, 21-30 (2001).
102. Randell, J.C., Bowers, J.L., Rodriguez, H.K. & Bell, S.P. Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol Cell* **21**, 29-39 (2006).
103. Chesnokov, I.N. Multiple functions of the origin recognition complex. *Int Rev Cytol* **256**, 69-109 (2007).
104. Laird, D.J., von Andrian, U.H. & Wagers, A.J. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell* **132**, 612-630 (2008).
105. Fausto, N. Liver regeneration. *J Hepatol* **32**, 19-31 (2000).
106. Gendron, T.F., *et al.* Attenuation of neurotoxicity in cortical cultures and hippocampal slices from E2F1 knockout mice. *J Neurochem* **78**, 316-324 (2001).
107. Tomasevic, G., Kamme, F. & Wieloch, T. Changes in proliferating cell nuclear antigen, a protein involved in DNA repair, in vulnerable hippocampal neurons following global cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* **60**, 168-176 (1998).
108. Li, C.J. & DePamphilis, M.L. Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Mol Cell Biol* **22**, 105-116 (2002).
109. Yang, W., Sheng, H., Homi, H.M., Warner, D.S. & Paschen, W. Cerebral ischemia/stroke and small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation--a new target for therapeutic intervention? *J Neurochem* **106**, 989-999 (2008).
110. Yang, W., Sheng, H., Warner, D.S. & Paschen, W. Transient focal cerebral ischemia induces a dramatic activation of small ubiquitin-like modifier conjugation. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 892-896 (2008).
111. Datwyler, A.L., *et al.* SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**, 2152-2159.
112. Bracken, A.P., Ciro, M., Cocito, A. & Helin, K. E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci* **29**, 409-417 (2004).

113. Asano, M. & Wharton, R.P. E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*. *EMBO J* **18**, 2435-2448 (1999).
114. Kuge, A., *et al.* Temporal profile of neurogenesis in the subventricular zone, dentate gyrus and cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *Neurol Res* **31**, 969-976 (2009).
115. Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A. & Yates, J.L. Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10085-10089 (2001).
116. Sumrejkanchanakij, P., Tamamori-Adachi, M., Matsunaga, Y., Eto, K. & Ikeda, M.A. Role of cyclin D1 cytoplasmic sequestration in the survival of postmitotic neurons. *Oncogene* **22**, 8723-8730 (2003).
117. Molecular Biology of the Cell, 4th edition. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. New York: Garland Science; (2002).
118. Bundesgesundheitsblatt 2013; dx.doi.org/10.1007/s00103-012-1659-0

7.2. Verzeichnisse

7.2.1. Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: Schema Zellzyklus	4
Abb.1.2.: RB - E2F-Signalweg	5
Abb.1.3.: Der ORC Zyklus	7
Abb.1.4.: Zeitlicher Verlauf der pathophysiologischen Ereignisse nach ischämisch/ hypoxischer Schädigung	9
Abb.4.1.: Expressionslevel von <i>Orc1</i> in neuronalen Geweben	33
Abb.4.2.: Die Expression von <i>Orc1-6</i> in kortikalen Neuronen	34
Abb.4.3.: <i>Orc1</i> Expression in kortikalen Neuronen nach OGD	35
Abb.4.4.: ORC1 in kortikalen Neuronen nach OGD	36
Abb.4.5.: Schema des lentiviralen Luziferasekonstruktes zur Untersuchung der <i>Orc1</i> Promotoraktivität in Neuronen	36
Abb.4.6.: Neuronale <i>Orc1</i> Promotoraktivierung nach OGD	37
Abb.4.7.: Schema des murinen <i>Orc1</i> Promotors	38
Abb.4.8.: ORC1 in synchronisierten HT22 Zellen im Zeitverlauf	39
Abb.4.9.: <i>Orc1</i> Promotorrepression durch exogenes E2F4-V5 in synchronisierten HT22 Zellen mittels Luziferaseassay	40
Abb.4.10.: Nachweis der Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren am <i>Orc1</i> Promotor in kortikalen Neuronen mittels ChIP	41
Abb.4.11.: Herunterregulation von exogenem E2F4-V5 mittels <i>E2f4</i> miR-shRNA 43	42
Abb.4.12.: <i>Orc1</i> Hochregulation in <i>E2f4</i> miR-shRNA infizierten Neuronen nach OGD	43
Abb.4.13.: Nachweis der ORC1 Herunterregulation von exogenem ORC1 mCherry	

durch <i>Orc1</i> miR-shRNA mittels Immunfluoreszenz	44
Abb.4.14.: Nachweis der ORC1 Herunterregulation von exogenem ORC1 mCherry durch <i>Orc1</i> miR-shRNA mittels Immunblotting	44
Abb.4.15.: Untersuchung der miR-shRNA gegen <i>Orc1</i> auf die endogenen <i>Orc1</i> mRNA Expressionslevel	45
Abb.4.16.: <i>Orc1</i> miR-shRNA erhöht das Überleben von kortikalen Neuronen nach OGD	46
Abb.4.17.: Statistische Analyse der Überlebensrate der <i>Orc1</i> miR-shRNA behandelten kortikalen Neuronen nach OGD	47
Abb.4.18.: <i>Orc1</i> miR-shRNA begrenzt die LDH Aktivität von kortikalen Neuronen nach OGD	48
Abb.4.19.: ORC1 Überexpression durch Lipofectamin induziert neuronales Zellsterben	49
Abb.4.20.: Statistische Analyse: ORC1 Überexpression durch Lipofectamin induziert neuronales Zellsterben	49
Abb.5.1.: Hypothese	53
Abb.5.2.: Hypothese der <i>Orc1</i> Regulation	57

7.2.2. Tabellenverzeichnis

Tab.1.: Bakterien	15
Tab.2.: Zelllinien	15
Tab.3.: PCR Primer	20
Tab.4.: miR-shRNAs	21
Tab.5.: Antikörper	22
Tab.6.: Vektoren	22

7.2.3. Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Anaphase promoting Complex
ATP	Adenosintriphosphat
BAH	Bromoadjacent
BrdU	Bromo-deoxyuridine
BSS0	Balanced salt solution
CamKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
Caspase	Cysteine-dependent aspartate-specific protease
Cdc6	Cell division cycle 6 homolog

CDK	Cyclin-dependent Kinase
CKI	Cyclin dependent Kinase Inhibitors
Cre	Causes recombination
DAPI	4,6'-diamidino-2-phenylindole
DIV	days <i>in vitro</i>
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonal
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene-Diamin-Tetra-Acetat
E2F	Elongation Factor 2 family member
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FoxM1	Forkhead box protein M1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
G1/ G2	Gap phase 1/Gap phase 2
HDAC	Histone Deacetylase
Hek	Human embryonic kidney cells
HP1a	Heterochromatin Protein 1a
HRP	Horse Radish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
Ink4	Inhibitors of CDK4
KA	Kainat
kDa	kilo Dalton
KO	Knock Out
LB	Lysogeny Broth
LDH	Lactate Dehydrogenase
LoxP	Locus of X-over P1
LUC	Luciferase
MAP2	Microtubule-Associated Protein 2
MCAo	Middle Cerebral Artery occlusion
MCM	Mini-Chromosome Maintenance
M-phase	Mitose-Phase
MycBP	Myc Binding Protein
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

mRNA	Messenger ribonucleic acid
NLS	Nuclear localisation signal
OGD	Oxygen Glucose Deprivation
ORC	Origin Recognition Complex
Orc1	Origin Recognition Complex subunit 1
P	Postnatal
p130/p107	Pocket Protein 130/107
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidium Iodide
PLL	Poly-L-Lysine
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RB	Retinoblastoma Protein
RNA	Ribonucleic Acid
RLU	Relative light unit
rpm	Rotations per minute
RT	Room Temperature
rtPA	Recombinant tissue plasminogen activator Alteplase
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
S-phase	Synthesis-Phase
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolet
WPRE	Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element

7.3. Publikationen

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.

Phosphatidylinositol 3-Akt-kinase-dependent phosphorylation of p21(Waf1/Cip1) as a novel mechanism of neuroprotection by glucocorticoids. J Neurosci. 2007 Apr 25;27(17):4562-71.

Osterloh L, von Eyss B, Schmit F, Rein L, Hübner D, Samans B, Hauser S, Gaubatz S

The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G2/M genes and for entry into mitosis. EMBO J. 2007 Jan 10;26(1):144-57. Epub 2006 Dec 7.

7.4. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Denise Hübner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regulation und Bedeutung von *Origin recognition complex subunit 1 (Orc1)* für den neuronalen Zelltod nach kombiniertem Sauerstoff- und Glukoseentzug, einem Zellkulturmodell des ischämischen Schlaganfalls“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Denise Hübner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

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.

Phosphatidylinositol 3-Akt-kinase-dependent phosphorylation of p21(Waf1/Cip1) as a novel mechanism of neuroprotection by glucocorticoids.

J Neurosci. 2007

Beitrag im Einzelnen: Immunoblot Analysen von Casapase 3/cleaved Casapase 3 in kortikalen Neuronen in Kultur nach AF64A Behandlung

Publikation 2:

Osterloh L, von Eyss B, Schmit F, Rein L, Hübner D, Samans B, Hauser S, Gaubatz S

The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G2/M genes and for entry into mitosis.

EMBO J. 2007

Beitrag im Einzelnen: Nachweis der Herrunterregulation von LIN-9 durch shRNA mittels Immunoblot; Waschtumsassay in BJ-ET Zellen nach LIN-9 Depletion

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

7.5. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.