

**Oxidativer Stress- assoziierter neuronaler Zelltod und die
Identifikation neuroprotektiver Gene durch ein neuartiges
Screening-System**

von

Jürgen Zitzler

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

eingereicht im Juni 2004

angefertigt bei der Xantos biomedicine AG

bei

Prof. Dr. Peter Buckel

Eingereicht am	07.06.2004
Mündliche Prüfung	26.07.2004
1. Gutachter	Prof. Dr. Peter Buckel
2. Gutachter	Prof Dr. Charles David

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Peter Buckel für die Betreuung und Unterstützung der vorliegenden Arbeit, für die Förderung und Zusammenarbeit mit anderen Labors sowie für die Ermöglichung des Besuchs an (inter)nationalen Tagungen.

Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Charles David für seine Tätigkeit als 2. Gutachter

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Behl für die fachliche Zusammenarbeit bei dieser Arbeit, für die anregenden Diskussionen und seinen motivierenden Optimismus sowie für die Möglichkeit eines Gastaufenthaltes in seinem Labor.

Dr. Ulrich Brinkmann danke ich für die fachliche Unterstützung und die Betreuung bei der Xantos biomedicine AG.

Mein Dank gilt auch Dr. Wolfgang Liebetrau, der der geistige Urvater dieses Projektes war.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der Xantos biomedicine AG für wertvolle Anregungen und ihre Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank geht an Dr. Matthias Klein, Dr. Dieter Link für die Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit und an Christine Rottenberger für die Mithilfe bei einer Vielzahl von Versuchen.

Der Gruppe „Robotics“ danke ich für den ständigen Nachschub an cDNAs und für die Programmierung der Roboter.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Behl danke ich für die Aufnahme in ihr Literaturseminar, sowie die Hilfe bei fachlichen Fragestellungen. Insbesondere danke ich Dr. Dieter Manthey, Dr. Monika Schäfer und Jürgen Zschocke für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Matthias und beiden Dieters danke ich für den ersten, und Jörg Tabbert für den letzten Schliff dieser Arbeit und die korrekte Verteilung der Kommas.

Meiner Freundin Anja danke ich für ihre Geduld, ihr Verständnis für lange Arbeitstage und arbeitsreiche Wochenenden sowie für ihre Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht gelungen wäre

Mein ausdrücklicher Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung

Diese Arbeit wurde angefertigt vom November 2000 bis Dezember 2003.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Jürgen Zitzler, Dieter Link, Rolf Schäfer, Wolfgang Liebetrau, Michael Kazinski, Angelika Bonin-Debs, Christian Behl, Peter Buckel and Ulrich Brinkmann

"High throughput functional genomics identifies genes which ameliorate toxicity due to oxidative stress in neuronal HT22 cells: GFPT2 protects cells against peroxide";
MCP; 2004 [in press]

Abkürzungen

ADAM:	a desintegrin and metalloproteinase; α -Sekretase
AGE:	advanced glycation endproducts
APLP:	amyloid precursor-like proteins
APP:	amyloid precursor protein
ARE:	antioxidant response element
ATP:	Adenosin Triphosphat
BDNF:	brain-derived neurotrophic factor
bFGF:	basic fibroblast growth factor
BSO:	Buthionin Sulfoximin
CASY:	cell counter and analysis system
CNC:	cap'n'coller
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxyd
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
ERK:	extracellular signal regulated kinase
ESR:	Elektronen Spin Resonanz Methode
EST:	expressed sequence tag
GFP:	green fluorescent protein
GSH:	Glutathion
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
HCA:	Homocystein Säure
HEK:	human embryonic kidney
HSP:	Hitzeschock Proteine
IGF-1:	insulin-like growth factor-1
JNK:	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
LIF:	leukaemia inhibitory factor
MAPK:	mitogen activated protein kinase
MTP:	Mikrotiterplatte
MTT:	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
NF κ B:	nuclear factor kappa B
NGF:	nerve growth factor
NKC:	natural killer cells

NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
PAI-1:	plasminogen activator inhibitor 1
PBS:	phosphat buffered saline
PCD:	programmed cell death
PCR:	Polymerase Kettenreaktion
PKC:	Protein Kinase C
PLO:	Poly-L-Ornithine
RFU:	relative Fluoreszenz Einheit
RLU:	relative Lunineszenz Einheit
RNA:	Ribonukleinsäure
RNAi:	RNA interference
ROS:	reaktive Sauerstoff Spezies
TGF β 1:	transforming growth factor beta 1
Well:	Vertiefung in einer MTP
ZNS:	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Oxidativer Stress.....	2
2.1.1 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies.....	2
2.1.1.1 Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) und Hydroxylradikale (HO).....	3
2.1.1.2 Glutamat Toxizität.....	4
2.1.2 Apoptose, Nekrose, Oxytose.....	5
2.1.3 Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden durch ROS.....	6
2.1.4 Krankheiten assoziiert mit oxidativem Stress.....	8
2.1.4.1 Morbus Alzheimer und oxidativer Stress.....	8
2.2 Schutzmechanismen.....	10
2.2.1 Selektive Neurodegeneration.....	10
2.2.2 Endogene und exogene Neuroprotektionsmechanismen.....	10
2.3 Methoden zur Identifikation neuer Gene und Signalwege.....	11
2.3.1 Affymetrix Chip-Analysen.....	11
2.3.2 Der Funktionelle Screen.....	12
3 Ziel dieser Arbeit.....	14
4 Material und Methoden.....	15
4.1 Material.....	15
4.1.1 Geräteliste.....	15
4.1.2 DNA- und Analyse-Kits.....	16
4.1.3 Primer.....	16
4.1.4 Basis-Vektoren.....	17
4.1.5 Bakterienstämme.....	17
4.1.6 Zellen.....	17
4.2 Methoden.....	18
4.2.1 Zellkultur.....	18
4.2.1.1 Lösungen für Zellkultur.....	18
4.2.1.2 HT-22.....	18
4.2.1.3 HEK 293.....	18
4.2.1.3.1 Lösungen für die Transfektion von HEK 293 Zellen.....	19
4.2.1.3.2 Transfektion von HEK 293 Zellen.....	19
4.2.1.4 Herstellung Wasserstoffperoxid resistenter Zelllinien.....	20
4.2.1.5 Herstellung Glutamat resistenter Zelllinien.....	20
4.2.1.6 Lagerung und Auftauen von Zellen.....	20
4.2.2 Lebend-Tod Messungen.....	21
4.2.2.1 AlamarBlue.....	21
4.2.2.2 Cell-Titer-Glo.....	21
4.2.2.3 Zellzahlbestimmung.....	21
4.2.3 Das Screening-System.....	22
4.2.3.1 Vorbehandlung der Screening-Platten.....	22
4.2.3.2 Replikation an der ersten Roboterplattform.....	22
4.2.3.3 DNA Präparation an der zweiten Roboterplattform.....	23
4.2.3.4 DNA-Transfektion an der dritten Roboterplattform.....	23
4.2.3.5 Toxizitäts-Test.....	24
4.2.4 Validierung der Kandidaten Gene.....	24
4.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	24

4.2.4.2	Photometrische Bestimmung der DNA Konzentration	25
4.2.4.3	Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen	25
4.2.4.4	Elektrophoretische Trennung und Isolierung von DNA Fragmenten.....	26
4.2.4.5	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	26
4.2.4.6	Klonierung von DNA Fragmenten	27
4.2.4.7	Chemo-Transformation von <i>E.coli</i>	28
4.2.5	Isolierung und Analyse zytoplasmatischer RNA.....	28
4.2.5.1	Isolierung zytoplasmatischer RNA.....	28
4.2.5.2	Erststrang cDNA Synthese mittels reverser Transkriptase.....	29
4.2.5.3	Quantitative PCR (Q-PCR)	30
4.2.5.4	Expressionsanalysen mit Hilfe von Affymetrix Chips	31
4.2.6	Validierung der Hits	33
4.2.6.1	Konzentrationsreihe.....	33
4.2.6.2	Annexin V /PI-Färbung	33
4.2.6.3	Cell Death Detection ELISA PLUS	34
4.2.6.4	Induktion von NFκB.....	35
5	Ergebnisse.....	36
5.1	Etablierung eines Hochdurchsatz- Screening-Systems	36
5.1.1	Das Screening-Modell	36
5.1.2	cDNA-Kollektionen	37
5.1.2.1	Anzahl der verwendeten cDNA-Klone.....	38
5.1.3	Bestimmung der Zellzahl mit AlamarBlue.....	39
5.1.4	Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Vorkultur	41
5.1.5	Stabilisierung der Screening-Bedingungen durch Vorbehandlung der MTP	42
5.1.6	H ₂ O ₂ als exogener toxischer Stimulus.....	44
5.1.7	Minimale Expressionszeit für protektive cDNAs.....	47
5.1.8	Konzentrationsfenster.....	48
5.1.9	Plattenbelegung	49
5.1.10	„Hit“-Definition.....	51
5.1.11	Charakterisierung des H ₂ O ₂ vermittelten Zelltodes.....	51
5.2	Screening Ergebnisse	52
5.2.1	Charakterisierung der Gene mit bekannten Detoxifizierungseigenschaften.....	55
5.2.2	Charakterisierung der noch nicht oder nur indirekt für die Modulation von oxidativem Stress beschriebenen Gene	57
5.3	Glutamat- und H ₂ O ₂ - resistente Zelllinien	59
5.3.1	Charakterisierung der generierten Zelllinien.....	59
5.4	Expressionsanalysen	64
5.4.1	Expressionsanalysen der resistenten Zelllinien	64
5.4.2	Expressionsanalyse der sechs im Screen identifizierten Hits	70
5.5	Datenbankabgleich zur Identifizierung Apoptose-induzierender Genen	71
6	Diskussion	76
6.1	Das Screening Setup	76
6.1.1	Zellsystem zur transienten Transfektion.....	76
6.1.2	<i>In vitro</i> Induktion von oxidativem Stress	78
6.1.3	Technische Durchführung des Screens.....	80
6.2	Identifizierte Hits	81
6.2.1	Katalase	82
6.2.2	Glutathion Peroxidase-1	83
6.2.3	Peroxiredoxin-1 und Peroxiredoxin-5	84
6.2.4	Nuclear factor erythroid derived 2-like 2	86
6.2.5	Glutamin: Fruktose-6-phosphat Amidotransferase	88
6.3	Vergleich des funktionellen Screens mit Expressionsanalysen	92
6.3.1	Bewertung der Expressionsanalysen	92
6.3.2	Synergie aus Expressionsanalysen und funktionellem Screen	94

6.4	Zukünftige Versuche.....	97
7	Referenzen.....	99
	Lebenslauf.....	112

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe einer neuartigen Screening-Methode im Hochdurchsatz-Maßstab Gene identifiziert, welche einen Schutz vor dem bei Morbus Alzheimer assoziierten oxidativen Nervenzelltod vermitteln können. Dazu wurde jeder Klon einer cDNA Kollektion einzeln in klonale hippokampale Mausneuronen der Zelllinie HT-22 transient transfiziert und die Zellen anschließend mit einer toxischen Konzentration Wasserstoffperoxid stimuliert. Nach Inkubation wurde der Anteil lebender Zellen als Grad für den durch das transfizierte Gen vermittelten Schutz bestimmt. Auf diese Weise konnten sechs Gene identifiziert werden, welche HT-22 Zellen signifikant vor toxischen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid schützten. Vier der sechs Gene: Glutathion Peroxidase-1, Peroxiredoxin-1, Peroxiredoxin-5 und Katalase, kodieren direkt antioxidativ wirkende Genprodukte, deren Identifikation die Funktionalität des Screening-Systems bestätigte.

Neben Genen, deren Proteintranskripte direkt antioxidativ wirken, konnte des Weiteren der Transkriptionsfaktor Nrf2 und das Enzym Glutamin: Fruktose-6-phosphat Amidotransferase-2 (Gfat-2) detektiert werden. Nrf2 aktiviert die Transkription sog. „antioxidant response element (ARE)“-regulierter Antioxidanzien und detoxifizierender Enzyme, und wirkt somit indirekt schützend. Für Gfat-2 war bisher noch kein direkter Zusammenhang für die Protektion vor oxidativem Stress beschrieben. Mit der Charakterisierung dieses Effektes wurde begonnen.

Parallel zu diesem Screening-Ansatz wurden Zelllinien generiert, die gegen oxidativen Zelltod resistent sind. Als Modell dienten Mausneuronen der Zelllinie HT-22. Von dieser Zelllinie wurden Klone isoliert, die resistent gegenüber den oxidativen Substanzen Glutamat und Wasserstoffperoxid sind. Untersucht wurde dabei die Genexpression der resistenten Klone mit der der sensitiven parentalen Zellen. Der Grad der Genexpression wurde dabei mit Hilfe von Affymetrix-Chips untersucht. Getestet wurde inwieweit die Überexpression derjenigen Gene, die in beiden resistenten Zelllinien eine verstärkte Expression aufwiesen, einen Schutz in den sensitiven Zellen gegenüber einem oxidativem Stress vermitteln konnte. Eine Stichprobe von 25 Genen bestätigte dabei keinen Zusammenhang zwischen starker Expression und funktioneller Protektion. Zusätzlich wurde überprüft, ob die verminderte Sensitivität H₂O₂- und Glutamat resistenter Zelllinien auf einen oxidativen Stress eine verminderte Regulation Apoptose induzierender Gene mit sich bringt. Ein Datenbankabgleich identifizierte neun Gene, die in beiden resistenten Zelllinien vermindert exprimierten und deren Überexpression in HEK 293 Zellen Apoptose induzierte.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der in dieser Arbeit beschriebene funktionelle Screening-Ansatz im Vergleich zu genomweiten Expressionsanalysen deutliche Vorteile bei der Identifizierung von Gen-Funktionen besitzt, ohne dabei Einschränkungen in der untersuchten Probenzahl hinnehmen zu müssen. Die in beiden Ansätzen identifizierten Gene, könnten als Ansatzpunkte für neuroprotektive Wirkstoffe genutzt werden.

2 Einleitung

2.1 Oxidativer Stress

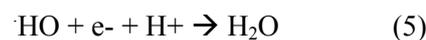
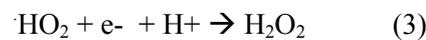
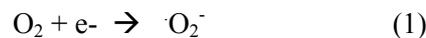
Die toxische Wirkung von Sauerstoff auf neuronale Gewebe war seit dem 19. Jahrhundert bekannt und wurde erstmals von Paul Bert 1872 (Gilbert 1999) beschrieben, indem er Tiere unter hyperoxischen Bedingungen beobachtete. Seit dem 20. Jahrhundert wurden oxidativer Stress und die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) in Zusammenhang mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Apoplexie, amyotrophische laterale Sklerose (ALS), Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (Coyle et al. 1993) gebracht. Die besondere Anfälligkeit von neuronalen Geweben auf oxidativen Stress wurde in einer Vielzahl von experimentellen Beobachtungen belegt und durch die besondere Lipidbeschaffenheit sowie den geringen Anteil an reaktiven Schutzmechanismen im Gehirn erklärt (Behl et al. 1998).

Unter oxidativem Stress versteht man das Ungleichgewicht zwischen der Produktion und dem Abbau reaktiver Sauerstoffspezies. Dieses Ungleichgewicht kann zum einen durch eine Akkumulation von ROS, entweder durch äußere Einflüsse (Glutamat, H₂O₂), intrazelluläre Störungen (u.a. Gendefekte) entstehen, oder zum anderen durch eine verminderte ROS Abbaurrate, durch einen reduzierten Antioxidationsmechanismus, hervorgerufen werden.

2.1.1 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies

Eine der wichtigsten in der Natur vorkommenden Quellen für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ist ionisierende Strahlung, die sowohl terrestrischen als auch kosmischen Ursprungs sein kann. Vor allem in wässrigem Milieu entsteht eine Vielzahl von reaktiven Formen. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter physiologischen Bedingungen ist ein ebenfalls natürlicher Vorgang, wobei der größte Anteil während der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien entsteht (Halliwell et al. 1986). Studien mit isolierten Einzelelementen der Atmungskette zeigen, dass ein Großteil der ROS dabei an Komplex I (NADH-Ubiquinon-Reduktase) und Komplex III (Ubiquinol-CytochromC Reduktase) entsteht (Cadenas et al. 1977). Neben einer Vielzahl von autooxidativen Reaktionen generieren auch viele Enzyme reaktive Sauerstoffspezies. Zu ihnen gehören Oxidasen, Oxygenasen, Peroxidasen und Cytochrom P450 (Halliwell et al. 1994). Der Terminus der reaktiven Sauerstoffspezies umfasst sowohl freie Radikale wie das Superoxidradikal (O_2^-), das Hydroxylradikal

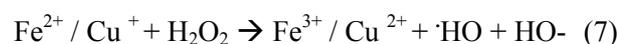
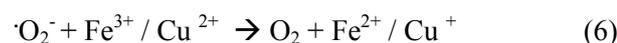
(HO) und das Hydroperoxyradikal (HOO), als auch nicht-Radikale wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂), singulärer Sauerstoff (¹O₂) oder Hypochlorid (OCl⁻). Häufig werden die nicht-radikalen Verbindungen in Reaktionen zu Radikalen umgewandelt. Freie Radikale besitzen eines oder mehrere ungepaarte Elektronen, welches sie zu bevorzugten Reaktionspartnern macht. Die dabei entstehenden Endprodukte sind häufig ihrerseits Radikale, was zu Kettenreaktionen führen kann. Radikale reagieren mit anderen Molekülen, indem sie Wasserstoffatome abspalten, anfügen oder Elektronen transferieren. Unter aeroben Bedingungen ist Sauerstoff der häufigste Reaktionspartner für Radikalreaktionen (Riley 1994). O₂ besitzt zwei ungepaarte Elektronen und wird in der Atmung zu H₂O reduziert. Dabei entstehen eine Reihe radikalischer Zwischenprodukte (Yu 1994):



2.1.1.1 Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Hydroxylradikale (HO)

Als Quelle für die Generierung von H₂O₂ gelten neben Peroxisomen, dem Endoplasmatischen Retikulum und zytosolischen Enzymen (Fridovich et al. 1961) vor allem Elektronentransportsysteme in der Mitochondrienmembran (Chance et al. 1979). Wasserstoffperoxid kann sowohl enzymatisch, z.B. durch die SOD (engl. superoxide dismutase), als auch nicht-enzymatisch erzeugt werden. Wasserstoffperoxid ist chemisch gesehen kein Radikal, wird aber aufgrund seiner Fähigkeit, hoch aktive Hydroxylradikale zu bilden, zur Familie der ROS gezählt. Neben der geringen Reaktivität besitzt Wasserstoffperoxid zusätzlich eine hohe Diffusionsreichweite.

Diese beiden Eigenschaften machen es zu einem Vorläufertoxin, welches Zytotoxizität von einer auf die nächste Zelle übertragen kann. Der toxische Effekt von H₂O₂ wird durch Hydroxylradikale vermittelt. Diese entstehen in der sog. Haber-Weiss- bzw. Fenton-Reaktion. Dabei spielen Kupfer- und Eisen-Ionen eine entscheidende katalytische Rolle.



Hydroxylradikale sind im Vergleich zu Wasserstoffperoxid Molekülen hoch reaktiv und reagieren umgehend nach ihrer Entstehung weiter. Ihre Halbwertszeit beträgt bei 37 °C 1 ns bei einer durchschnittlichen Diffusionsdistanz von 1-1.8 nm (Saran et al. 1989). Hydroxylradikale reagieren durch Abspaltung von Wasserstoff, durch Elektronentransfer, oder durch Addition an ungesättigte Bindungen. Neben der oben beschriebenen Reaktion können Hydroxylradikale aus Wasserstoffperoxid auch durch einfache Reduktion entstehen (Reaktion 4). Aufgrund ihrer hohen Reaktivität reagieren Hydroxylradikale mit den meisten Biomolekülen und können diese auf vielseitige Weise (2.1.2) schädigen.

2.1.1.2 Glutamat-Toxizität

Obwohl Glutamat als Neurotransmitter bekannt ist, kann es, wenn in pathologisch erhöhten Konzentrationen vorliegend, oxidativen Stress auslösen. Die Toxizität durch Glutamat kann durch rezeptorvermittelte oder rezeptorunabhängige Signalwege induziert werden. Der rezeptorvermittelte Signalweg wird durch die Bindung von Glutamat an ionotropen Glutamatrezeptoren (u.a. N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren) initiiert. Dadurch wird ein Einstrom von Ca^{+} - und Na^{+} - Ionen in die Zelle induziert. Die dabei veränderte Calcium-Homöostase greift negativ regulierend in den Elektronentransport der Mitochondrien ein und führt zu einer verminderten ATP-Produktion. Um diesen Ausfall kompensieren zu können, wird der Elektronentransport verstärkt, wodurch gleichzeitig vermehrt Sauerstoffradikale und deren Derivate gebildet werden. Dem vermehrten Einstrom von Na^{+} - Ionen versucht die Zelle über eine gesteigerte $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ - ATPase - Pumpleistung entgegen zu wirken. Der dafür notwendige ATP- Verbrauch wird über zusätzlichen Elektronentransport kompensiert, was wiederum positiv zur ROS-Bildung beiträgt. Der rezeptorunabhängige Signalweg erfolgt über den Glutamat/Cystin- Antiporter *Xc*- (Murphy et al. 1989), der im Normalzustand intrazelluläres Glutamat aus der Zelle und extrazelluläres Cystin in die Zelle transportiert. Durch eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration wird nun jedoch Cystin aus der Zelle transportiert. Cystin wird intrazellulär zu Cystein umgewandelt, welches zur Proteinsynthese und für die Bildung von Glutathion (GSH), einem zentralen Antioxidanz, verwendet wird. Durch erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen kommt es somit zu einem verminderten Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies, wodurch diese akkumulieren und oxidativer Stress entsteht, was schließlich zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose führt.

2.1.2 Apoptose, Nekrose, Oxytose

Traditionell werden zwei Formen des Zelltodes unterschieden: Apoptose und Nekrose. Der Begriff der Apoptose oder des programmierten Zelltodes (programmed cell death; PCD) wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie zur Beschreibung eines intrinsischen Selbstmordprogramms in Hepatozyten verwendet (Kerr et al. 1972). Die Apoptose ist durch eine Anzahl biochemischer und morphologischer Veränderungen im Zellkern, im Zytoplasma und in verschiedensten Zellorganellen definiert (Wyllie 1992; Green et al. 1998). Ein frühes Ereignis während der Apoptose ist die Verringerung des Zellvolumens und das Entfernen vom Zellverband, was zu einem Schrumpfen des Zellkörpers führt. Anschließend verdichten sich das Zytoplasma und die intrazellulären Organellen. Die deutlichsten Veränderungen betreffen den Zellkern. Der Zellkern verdichtet sich und das Chromatin kondensiert und aggregiert an der Kernperipherie. Im Verlauf der Apoptose wird der Zellkern fragmentiert. Das Chromatin wird zunächst in große (50 kb; kilo base pairs), und später in kleinere oligonukleosomale Fragmente von 180 bp (base pairs; bp), und in Vielfache davon, kontrolliert gespalten (Oberhammer et al. 1993). Diese leiterartige Fragmentierung wird durch DNase I und DNase II (Barry et al. 1993; Peitsch et al. 1993), vermittelt. Ein entscheidendes Ereignis während der Apoptose ist die koordinierte Aktivierung von Aspartat- spezifischen Cystein- Proteasen, den Caspasen. Zytoplasmatische Organellen bleiben während der Apoptose strukturell intakt. Lediglich in den Mitochondrien kommt es zum Verlust der äußeren Membranintegrität (Kroemer et al. 1997). Veränderungen in der Zytoskelettstruktur der Zelle führen zur Abschnürung einzelner Membrankompartimente, den sog. apoptotischen Körperchen (engl. apoptotic bodies). Apoptotische Zellen und apoptotische Körperchen werden anschließend phagozytiert (Savill et al. 1993). Im zentralen Nervensystem wird diese Aufgabe hauptsächlich durch Microgliazellen abgedeckt. Dabei verhindert die Phagozytose inflammatorische Reaktionen, die durch das Austreten von intrazellulären Proteinen oder Nukleinsäuren in den extrazellulären Raum auftreten würden, wie es während dem nekrotischen Zelltod geschieht.

Der größte Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose wird durch die Auswirkungen einer sterbenden Zelle bzw. eines sterbenden Zellverbandes auf die Nachbarzellen verdeutlicht. Im Vergleich zur Apoptose tritt die Nekrose bei schweren akuten Verletzungen auf und geht mit zusätzlichen Gewebeschädigungen einher. Die Nekrose ist beschrieben durch die Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen in den extrazellulären Raum, was die Entstehung von entzündlichen Reaktionen und massive Zellyse zur Folge hat. Speziell bei Nervenzellen kann die Freisetzung intrazellulärer Moleküle, wie Glutamat aus abgestorbenen Zellen zu schweren Schäden in Nachbarzellen beitragen (siehe 2.1.1.2). Auf der zellulären Ebene ist Nekrose morphologisch durch ein Anschwellen des Zytoplasmas und intrazellulärer Organellen sowie einer frühen Zerstörung der Plasmamembranintegrität definiert (Majno et al. 1995).

Obwohl es während der Apoptose und der Nekrose zu unterschiedlichen morphologischen Ausprägungen kommt, gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei diesen beiden Formen um die

Extreme eines ineinander verlaufenden Spektrums von Möglichkeiten handelt, wie eine Zelle sterben kann (Leist et al. 1997). Sowohl in Geweben als auch in Zellkulturen existieren beide Formen nebeneinander. In Neuronen wurde gezeigt, dass ein und derselbe Stimulus, verabreicht in geringen Konzentrationen, zu Apoptose und in hohen Konzentrationen zur Nekrose der Zellen führen kann (Bonfoco et al. 1995). Daneben kann es auch zu einer zeitlichen Aufeinanderfolge beider Formen kommen. Tan und Maher beschrieben eine neue Form des Zelltodes, die Oxytose, bei dem der durch oxidativen Stress induzierten Zelltod sowohl Charakteristika von Apoptose als auch Nekrose aufweist (Tan et al. 1998).

2.1.3 Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden durch ROS

Die reaktiven Sauerstoffspezies, die sowohl bei Stimulation mit Wasserstoffperoxid als auch mit Glutamat entstehen, können zu vielseitigen Schädigungen des Zellmaterials bis hin zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose führen. Dabei können reaktive Sauerstoffspezies als Signalmoleküle fungieren und zur Aktivierung definierter Redox-sensitiver Signaltransduktionswege führen, die die Zellen in den programmierten Zelltod, die Apoptose führen (Datta et al. 2002). Zum anderen fungieren ROS als direkte Effektoren bei der Oxidation von DNA, der Degradation von DNA durch Induktion von Einfach- und Doppelstrangbrüchen, bzw. durch Seitenverknüpfungen mit Proteinen sowie bei der Lipidperoxidation und induzieren somit oft den unprogrammierten, nekrotischen Zelltod.

Eines der am häufigsten untersuchten Ereignisse ist die Lipidperoxidation an Zellmembranen und Lipidproteinen. Diese kann durch Superoxidradikale (O_2^-), Hydroxylradikale (HO), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), oder singulären Sauerstoff (1O_2) ausgelöst werden. Besonders anfällig für die Lipidperoxidation sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl. *poly unsaturated fatty acid*, PUFA), die entweder frei oder in veresterter Form als Phospholipide in Membranen vorliegen. Initiiert wird diese Kettenreaktion durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms von der Methylen-Gruppe einer ungesättigten Fettsäure, wodurch ein Lipidradikal (\dot{L}) entsteht. Das Lipidradikal wiederum reagiert mit Sauerstoff (O_2) und bildet ein Peroxylradikal (\dot{LOO}). Die Kettenreaktion wird dadurch fortgesetzt, in dem das Peroxylradikal mit ungesättigten Fettsäuren zu Lipid-Hydroperoxid (LOOH) reagiert. Dabei entsteht erneut ein Lipidradikal (\dot{L}), welches den Zyklus erneut starten kann. Das Lipid-Hydroperoxid kann entweder mit Eisen(II)-Ionen zu Alkoxyradikalen (\dot{LO}) reagieren oder zu Hydrocarbonen bzw. Alkoholen und Aldehyden prozessiert werden. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 2.1 gegeben.

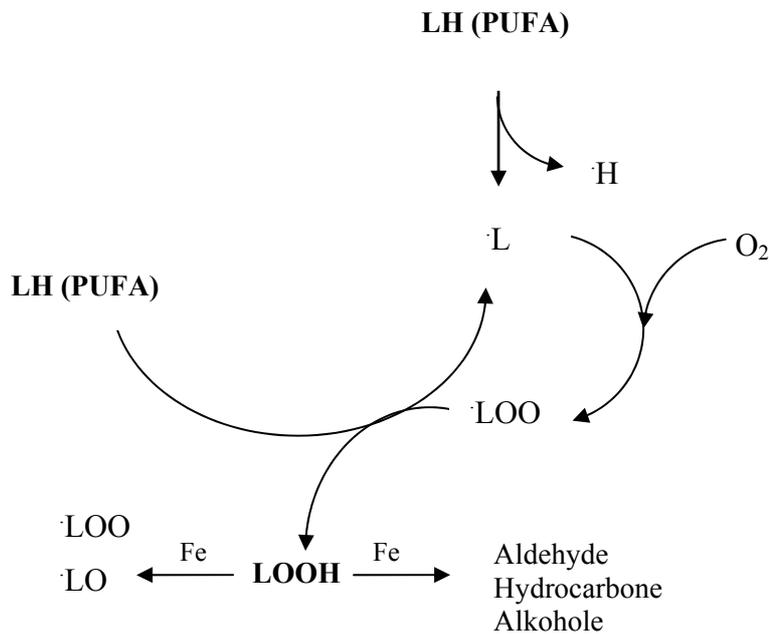


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Lipidperoxidation (Okada 1996).

Terminiert werden kann diese Reaktion durch Interaktion zweier Radikale, bzw. durch Reaktion der Radikale mit Antioxidanzien nach folgender Formel, wobei oxAO das oxidierte Antioxidanz darstellt.



Lipid-Hydroperoxide (LOOH) werden u.a. zu Malondialdehyden (MDA) und 4-Hydroxynonenal (4-HNA) prozessiert (Esterbauer et al. 1991). Beide können Schäden durch Vernetzungen zwischen Proteinen und DNA verursachen (Halliwell & Gutteridge 1986). Erhöhte MDA- Konzentrationen konnten bei Diabetes mellitus, Artherosklerose und neuronalen Erkrankungen festgestellt werden (Meraji et al. 2000). Die Protein-Protein- Bindung kommt dabei durch Interaktion zweier Lysin-Aminogruppen mit der Aldehydgruppe von MDA zustande. Oxidationen von Proteinen gehen initial mit der Abspaltung eines Wasserstoffatoms entweder aus dem Kohlenwasserstoff-Grundgerüst oder einer Aminosäure-Seitengruppe einher. Das freie Elektron ist dabei meist an einem Kohlenstoffatom lokalisiert. Zwei derartige Radikale können sich anschließend in einer Radikalreaktion zu einem Protein-Protein- Komplex zusammenschließen. Des weiteren kann es zu Inter- und Intrapeptidbindungen durch Bildung von Disulfidbrücken bei der Oxidation zweier Cystein-Sulphydryl-Gruppen kommen.

Bei der Reaktion von ROS mit DNA kommt es u.a. zur Oxidation einzelner Basen (z.B. 8-Hydroxydesoxyguanosin und Hydroxydesoxyadenin), und es entstehen Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche. Dabei initiierte Mutationen können zu Verschiebungen im Leseraster bzw. zum Austausch von

Aminosäuren während der Translation führen. Wichtig bei der Transkription ist u.a. die nicht-kovalente Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA- Erkennungssequenzen. ROS-induzierte Veränderungen in Bindungsaffinitäten zwischen DNA und Proteinen bzw. zwischen Proteinen untereinander können dabei die Transkription entscheidend modifizieren (Breimer 1990). Dazu tragen auch beschriebene kovalente DNA-Histon Bindungen bei (Gajewski et al. 1990).

Besonders anfällig für ROS- verursachte DNA-Schäden ist mitochondriale DNA (mtDNA). In Untersuchungen mit mtDNA wurde sowohl eine erhöhte Mutationsrate (Wallace 1992b) als auch eine erhöhte Konzentration von 8-Hydroxydeoxyguanosin nachgewiesen (Giulivi et al. 1998). Beides liegt vor allem an einer erhöhten Grundkonzentration an Sauerstoff-Radikalen aus der Atmungskette, dem Fehlen von schützenden Histonen, dem Fehlen von Introns und einer geringen Reparaturkapazität (Trounce et al. 1989) im Vergleich zu genomischer DNA. Die dadurch zunehmend verminderte Mitochondrienleistung wird mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht (Wallace 1992a).

2.1.4 Krankheiten assoziiert mit oxidativem Stress

Ein besonders anfälliges Organ für oxidativen Stress ist das Gehirn. Vor allem wegen des hohen Gehalts an vielfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), welche gute Reaktionsziele für Hydroxylradikale bieten, sind Nervenzellen besonders anfällig gegenüber Oxidation (Behl & Holsboer 1998). Charakteristisch für das Gehirn ist zudem eine hohe Konzentration von enzymatisch aktiven Metall-Ionen, wie Eisen- und Kupferionen. Der dritte Aspekt für die besondere Anfälligkeit des Gehirns ist die vergleichsweise niedrige Konzentration an einerseits endogenen antioxidativen Enzymen wie der Gluthation Peroxidase und andererseits an nicht-enzymatischen Antioxidanzien wie Vitamin E (Ames et al. 1993; De Marchena et al. 1974).

Begünstigt wird die Entstehung von ROS und oxidativem Stress durch den hohen Sauerstoffumsatz im Gehirn.

2.1.4.1 Morbus Alzheimer und oxidativer Stress

Eine der am häufigsten vorkommenden Erkrankungen des ZNS (zentrales Nervensystem) ist die Alzheimersche Erkrankung. Morbus Alzheimer (AD) ist die häufigste Ursache für Altersdemenz (50-70 %) und wurde erstmals 1907 von Alois Alzheimer beschrieben (About a peculiar disease of the cerebral cortex. By Alois Alzheimer, 1907 (Translated by L. Jarvik and H. Greenson) 1987). Morbus Alzheimer tritt meist sporadisch auf (SAD), wobei das Alter den größten Risikofaktor darstellt. Die familiäre AD (FAD) macht nur einen geringen Prozentsatz aus. Der Krankheitsverlauf ist

charakterisiert durch einen langsam fortschreitenden Verlust der Kognitionsleistung (Citron 2000). Pathologisch lassen sich drei Hauptmerkmale der Alzheimerschen Krankheit definieren: Der massive Verlust von Neuronen, intrazelluläre Fibrillen, so genannte neurofibrilläre ‚Tangles‘ (NFT) in degenerierten Neuronen und extrazelluläre Proteinablagerungen. NFTs bestehen aus unlöslichen Aggregaten des hyperphosphorylierten Mikrotubulin assoziierten Tau-Proteins. Die Proteinablagerungen, sog. senile Plaques (SP), bestehen hauptsächlich aus aggregiertem Amyloid β Protein ($A\beta$), welches aus einem Vorläuferprotein, dem APP (engl. amyloid precursor protein) durch drei verschiedene Sekretasen prozessiert wird (Annaert et al. 1999; De Strooper et al. 1998; Haass et al. 1999; Selkoe 1999)

Der Kern dieser Plaques besteht aus einem 42 Aminosäuren langen $A\beta$ -Peptid ($A\beta_{42}$), welches für die initiale Entstehung der Plaques erforderlich ist. Im Normalzustand wird hauptsächlich lösliches $A\beta_{40}$ gebildet, welches keine Plaques bildet. Erst durch die Überproduktion von $A\beta_{42}$ bei Morbus Alzheimer kommt es vermehrt zur Plaquebildung. $A\beta$ ist ein natürliches Produkt der APP-Prozessierung und kommt als lösliches Peptid im Zellplasma und in der Gehirnflüssigkeit vor (Seubert et al. 1992). Lediglich in der aggregierten fibrillären β -Faltblatt-Form ist $A\beta$ toxisch (Schubert et al. 1995). Senile Plaques sind häufig von degenerierten Neuronen, dystrophen Neuriten und aktivierten Immunzellen umgeben und werden als frühes Ereignis in der Pathogenese von Morbus Alzheimer angesehen. Die Wirkung, die von diesen Plaques ausgeht, kann u.a. durch die toxischen Eigenschaften des $A\beta$ -Peptides erklärt werden. $A\beta$ kann direkt neurotoxisch wirken (Yankner et al. 1990) und somit zu den in AD auftretenden Zellschädigungen beitragen. Dabei spielt oxidativer Stress eine entscheidende Rolle. An kultivierten Neuronen konnte gezeigt werden, dass $A\beta$ H_2O_2 erzeugen und somit oxidativen Stress induzieren kann (Behl et al. 1994b). Gleichzeitig konnte $A\beta$ -Toxizität durch Antioxidanzien inhibiert werden (Behl et al. 1992; Behl et al. 1994b), was ein weiteres Indiz für die Beteiligung freier Radikale an der $A\beta$ -Toxizität ist. In Gehirnen von Alzheimer-Patienten wurde zudem verstärkt Protein- und DNA-Oxidation festgestellt. Bei der chemischen Erzeugung von ROS durch $A\beta$ spielt das Methionin an Position 35 (Met35) eine wichtige Rolle. Methionin kann leicht oxidiert werden und führt anschließend zu einer Konformationsänderung zugunsten der toxischen β -Faltblattstruktur (Selkoe 1994). Substitution von Met35 durch Norleucin hebt den toxischen Effekt von $A\beta$ auf (Varadarajan et al. 2000). Eine wichtige Rolle bei der Erzeugung von Radikalen durch $A\beta$ ist die Anwesenheit von Metallionen. Neben Cu^{2+} -Ionen, die an die drei Histidin-Reste in $A\beta$ binden können, wurden auch erhöhte Eisenionen Konzentrationen in den Plaques nachgewiesen (Smith et al. 1997). Durch Elektronen-Abstraktion vom Amyloid-Peptid entstehen Peptidradikale, wobei Kupferionen eine entscheidende Rolle spielen (Pogocki 2003). Zusätzlich werden in Fenton-Reaktionen (Abschnitt 2.1.1) weitere zellschädigende reaktive Sauerstoffspezies erzeugt. Bestätigt wird dieses Szenario durch mehrere Befunde in Gehirnen von Alzheimer-Patienten. Dort kann vermehrt Oxidation von Proteinen und DNA, als auch eine gesteigerte Lipidperoxidationsrate nachgewiesen werden. Im Gegenzug verringert sich die Konzentration an mehrfach ungesättigten

Fettsäuren. Eine erhöhte Konzentration an 4-Hydroxynonenal (HNE) und Acrolin, als toxische Endprodukte der Lipidperoxidation, untermauern dies (Varadarajan et al. 2000). Letztendlich kommt es durch die geschädigte Membranintegrität zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und einer zerstörten Ionen-Homöostase (Mark et al. 1995). $\text{A}\beta$ -Toxizität zerstört somit direkt oder indirekt die zelluläre Funktionalität, was letztendlich zu Neurotoxizität und neuronalem Zelltod durch Apoptose oder Nekrose führt (Varadarajan et al. 2000).

2.2 Schutzmechanismen

2.2.1 Selektive Neurodegeneration

In Gehirnen von Alzheimer-Patienten sind nicht alle Gehirnregionen gleichermaßen von Neurodegeneration betroffen, obwohl es in vielen Regionen zu amyloiden Ablagerungen kommt. Bestimmte Areale des Gehirns sind stärker von neuronalem Zelltod betroffen als andere (Braak et al. 1991). Besonders deutlich treten Schädigungen im Hippocampus, in der Amygdala und in der grauen Substanz des Neocortex auf (Gomez-Isla et al. 1997). Andere Regionen wie das Cerebellum entwickeln trotz amyloider Plaques nur einen geringen Anteil an degenerierten Neuronen. Die Identifizierung natürlich vorkommender Signalwege, die einen protektiven Effekt auf degenerative Einflüsse haben, ist daher für die Entwicklung von Präventions- und Heilungsmitteln von großer Bedeutung.

2.2.2 Endogene und exogene Neuroprotektionsmechanismen

Untersuchungen mit $\text{A}\beta$ -resistenten PC12-Zelllinien zeigten eine Überexpression des neuroprotektiven Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$, im Vergleich zu den nicht-resistenten vulnerablen parental PC12-Zellen (Lezoualc'h et al. 1998). $\text{NF}\kappa\text{B}$ protektierte neuronale Zellen gegenüber oxidativem Stress (Lezoualc'h et al. 1998) und wurde auch in der Umgebung früher seniler Plaques identifiziert. Nach Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}$, der inhibierenden Untereinheit von $\text{NF}\kappa\text{B}$, wird $\text{NF}\kappa\text{B}$ aktiviert, gelangt in den Kern und wirkt dort als aktiver Transkriptionsfaktor auf Gene, deren Produkte u.a. das Wachstum von Lymphozyten, die Adhäsion von Leukozyten bzw. die Chemoattraktion von Makrophagen regulieren (Kaltschmidt et al. 1997). In neuronalen Primärkulturen wurde nachgewiesen, dass $\text{A}\beta$ über reaktive

Sauerstoffzwischenprodukte NFκB aktivieren kann. Endogenen Schutz vor Apoptose können auch die Proteine der Bcl-2 / Bax-Familie vermitteln, die die Freisetzung von Cytochrom C und somit die Aktivierung von Kaspasen verhindern (Mattson 2000). Eine wichtige Rolle spielen auch neurotrophe Faktoren, wie BDNF (engl. brain-derived neurotrophic factor) (Schabitz et al. 2000), NGF (engl. nerve growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor) (Mattson 2000; Saito et al. 2004) u.a. durch die Stimulation von antioxidativen Enzymen. Daneben werden auch einigen Mitgliedern der Zytokine, wie LIF (engl. leukaemia inhibitory factor) neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben, indem sie NFκB aktivieren. Eine wichtige Gruppe sind die Hitzeschock-Proteine (Hsp). Diese durch Stress induzierten, u.a. als Chaperone wirkenden Proteine sorgen dafür, dass Proteine ihre funktionellen Konformationen beibehalten bzw. wiedererhalten. Experimente mit Glutamat- und H₂O₂-resistenten Zelllinien zeigen eine Überexpression von antioxidativen Enzymen wie der Katalase oder Enzymen, die in den Glutathion-Metabolismus involviert sind (Dargusch et al. 2002). Des Weiteren wurden in Aβ-resistenten PC12-Zelllinien eine erhöhte Expression von Katalase und Glutathion Peroxidase nachgewiesen (Dargusch & Schubert 2002).

Diese unvollständige Liste an unterschiedlichen Reaktionen auf einen toxischen Stimulus zeigt, dass die Zelle über eine Vielzahl von Regulationsmechanismen verfügt, die einer Degeneration entgegenwirken können. Die Identifizierung der Gene und Signalwege, die zur Resistenz bestimmter Gehirnareale bei Morbus Alzheimer *in vivo*, bzw. zur Resistenz gegenüber einem neurotoxischen Stimulus *in vitro* beitragen, sind für die Entwicklung von Medikamenten von besonderem Interesse.

2.3 Methoden zur Identifikation neuer Gene und Signalwege

2.3.1 Affymetrix Chip-Analysen

Eine Vielzahl etablierter Techniken ermöglicht die Identifizierung neuer Gene und Signalwege. Speziell wenn es darum geht, zwei unterschiedliche Zustände miteinander zu vergleichen, bietet eine genomweite Expressionsanalyse einen guten Überblick über veränderte Zustände im Grad der Expression tausender unterschiedlicher Gene. Expressionschips von Affymetrix decken mittlerweile das gesamte murine und menschliche Genom ab. Neben bereits bekannten Genen und etwaigen „Splicing“-Varianten befinden sich auch eine große Anzahl unbekannter Sequenzen auf den Analysechips. Jedes Gen bzw. jeder EST (engl. expressed sequences tag) ist durch ein Set von 11-20 Paaren mit Sequenzproben bestehend aus jeweils 25 Oligonukleotiden repräsentiert. Für den Expressionsvergleich zwischen dem Normalzustand und dem veränderten Zustand wird RNA aus dem

jeweiligen zu untersuchenden Gewebe bzw. der zu untersuchenden Zelllinie isoliert und anschließend in cRNA umgeschrieben. Nach der Markierung mit Biotin erfolgt die Hybridisierung auf dem Chip. Der Vergleich zweier Chipexperimente miteinander gibt Auskunft über veränderte Expressionsspiegel und gibt Hinweise auf die eventuelle Beteiligung einzelner Gene bzw. einzelner Signalwege. Kontrollen auf jedem Chip garantieren, dass Einzelchipergebnisse untereinander vergleichbar sind. Kontrollen für jede Gensequenz verhindern Hybridisierung ähnlicher Sequenzen, die zur Verfälschung eines Signals beitragen könnten. Die Aussagen, die auf Expressionsanalysen beruhen, spiegeln dabei den Momentanzustand auf RNA-Ebene wieder. Aussagen auf der Proteinebene oder der funktionellen Ebene der veränderten Gene können daraus nicht abgeleitet werden und müssen im Einzelfall in Folgeversuchen experimentell nachgewiesen werden.

2.3.2 Der funktionelle Screen

Entscheidend in der Interpretation von Expressionsdaten sind funktionelle Informationen zu den verschieden regulierten Genen bzw. Signalwegen. Der enormen Menge an Sequenz- und Expressionsinformationen steht eine sehr limitierte Anzahl an Daten über die Funktion der Gene gegenüber. Experimentelle Validierung der oft großen Anzahl an *in silico* gewonnenen Daten durch Datenbankvergleiche ist daher zwingend notwendig und stellt den eigentlich begrenzenden Faktor bei der Identifizierung neuer krankheitsassoziiierter Gene dar. Mit Hilfe eines in dieser Arbeit beschriebenen automatisierten Hochdurchsatzverfahrens ist es möglich, eine große Anzahl von Gensequenzen einzeln auf Grund einer durch transiente Überexpression hervorgerufenen Phänotyp funktionell zu charakterisieren. Dabei wird jedes Expressionsplasmid einer cDNA-Bibliothek oder einer cDNA-Kollektion einzeln in ein ausgewähltes zelluläres System transfiziert und anschließend geprüft, ob der durch das Plasmid hervorgerufene Phänotyp Relevanz in dem untersuchten Krankheitsbild besitzt.

Durch das Hochdurchsatzverfahren wird es hier möglich, aus der Gesamtheit aller exprimierten Gene diejenigen zu identifizieren, die auf wichtige physiologische Prozesse Einfluss nehmen. So können auch unbekannt Genen sofort Funktionen zugeordnet werden. Der Vorteil liegt hierbei in der Durchführung des Verfahrens in einem definierten indikationsbezogenen zellulären System.

Ausgehend von cDNA-Bibliotheken oder cDNA-Kollektionen verläuft der Screen in drei automatisierten Einzelschritten, von der DNA-Präparation der Plasmide über die Transfektion bis hin zur Analyse der Genfunktion in einem zellulären System ab. Eine Kurzbeschreibung der einzelnen Plattformen ist in Tabelle 2.1 gegeben.

Roboter	Prozesse
Plattform 1	<ul style="list-style-type: none"> • Picken von Einzelklonen aus cDNA-Bank oder Klonsammlung in Platten im 384 Well Format (Lagerung als Glycerol-stock) • Replikation der 384er Platten in 96 ger Deep-well Platten
Plattform 2	<ul style="list-style-type: none"> • endotoxinfreie Plasmid-Präparation mit Zentrifugationsschritten, Dispensierung der Puffer und Absaugen der Überstände
Plattform 3	<ul style="list-style-type: none"> • Zellaussaat • Transfektion muriner Zellen mit Dispensierung der Transfektionsreagentien • Read-out (colorimetrisch, fluoreszent oder lumineszent)

Tabelle 2.1 Kurzbeschreibung der Arbeitsprozesse an den verwendeten Roboterplattformen.

Die Technologie ist grundsätzlich für Analysen jeder zellulären Veränderung anwendbar, die über einen geeigneten biochemischen Marker oder eine morphologische Umwandlung messbar oder darstellbar ist. Damit sind nicht nur einzelne Stoffwechselwege gemeint sondern zum Beispiel auch die Differenzierung von Zellen, die Optimierung der Wirkung eines Medikaments auf einen bestimmten Zelltyp, die Induktion von Apoptose bzw. Nekrose oder der Schutz einer Zelle vor toxischen Substanzen.

3 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Genen mittels einer „funktionellen-Genomanalyse“, die eine schützende Wirkung bei oxidativem Stress assoziiertem Nervenzelltod vermitteln. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt und vergleichend miteinander bewertet: 1. Identifizierung neuer Gene durch ein neu entwickeltes Screening-System und 2. Vergleich von Expressionsprofilen H₂O₂- und Glutamat-resistenter Zelllinien mit den von sensitiven Zelllinien zur Identifikation von Genen assoziiert mit Resistenz.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräteliste

Analysenwaage	Kern
CO2 Inkubator	Schultheiss
Durchflußzytometer FACS Calibur	Becton Dickinson
Eismaschine AF 100	Scotsman
Electrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech
Elektroporationsgerät Micro Pulser	Bio Rad
Fluoroskan Ascent FL	Labsystems
Funktion Line Inkubator	Heraeus
GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems
Heizblock HBT 130	HLC
Horizontalgelkammer	OWL
Laborzentrifuge K415C	Sigma
Light Cycler Karussell Zentrifuge	Roche
Lumi Imager F1	Boehringer Mannheim
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
pH-Meter	inoLab
Präzisionsküvette aus Quarzglas	Hellma
Q-PCR Light Cycler	Roche
Spektralphotometer Biomate3	Thermo Spectronic
Sterilbank	BDK
Thermocycler T3	Biometra
Thermomixer Compact	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Transfektionsroboter Biomek FX	Beckmann Coulther
Videokamera	Zeiss
Vortex REAX top	Heidolph
Wasserbad Multi Temp III	Pharmacia Biotech

White/Ultraviolet Transilluminator	UVP
Zellkultur Wasserbad 1083	GFL
Zellzählgerät CASY	Schärfe System

4.1.2 DNA- und Analyse-Kits

1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche
Nucleobond AX	Macherey-Nagel
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Concert Cytoplasmic RNA Reagent	Invitrogen
1 kb DNA Größenstandard	Gibco
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche
CDD ⁺ -Test	Roche
Annexin /PI	BD Pharmingen
Dual-Glo TM Luziferase Messsystem	Promega

4.1.3 Primer

G6PDH forward	5'-CCAACCGCCTCTTCTACCT-3'
G6PDH reverse	5'-AGGGCTTCTCCACGATGA-3'
NIFIE14 forward	5'-GCATCTATGACTTCATTGG-3'
NIFIE14 reverse	5'-CATTCCGAGACATGACAAGG-3'
REA forward	5'-CAGAACCGAATCTATCTCACAGC-3'
REA reverse	5'-CTCATTTCTTACCCTTAATGA-3'
SLC25A1 forward	5'-CGC CAC CTA CTC TGA -3'
SCL25A1 reverse	5'-CAC CAG GCC ACA GAA -3'
BC2 forward	5'-TGG CAC AAG CCA TGA A -3'
BC2 reverse	5'-CCA TGG CCT TAG TAA CAC-3'
EMP3 forward	5'-ACT CAT CTA TGC CAT CC-3'
EMP3 reverse	5'-GGC GAA GCA GTA ACC -3'

4.1.4 Basis-Vektoren

pCMV6-x1 4	OriGene
pCMV6-x1 5	OriGene
pCMV6-x1 6	OriGene
pCMV-SPORT 6	Invitrogen

4.1.5 Bakterienstämme

E.coli DH5 α (Invitrogen) F- ϕ 80*lacZ*.M15 .(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1*
hsdR17(rk-, mk+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ -

4.1.6 Zellen

HT-22	murine Hippokampuszellen	C. Behl (Universität Mainz) P.Maher (TSRI, San Diego)
HEK 293	human Nierenzellen	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Lösungen für Zellkultur

PBS: 140 mM NaCl
 1,5 mM KH_2PO_4
 8,1 mM $\text{NaHPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 2,7 mM KCl
 pH: 7,4

4.2.1.2 HT-22

HT-22 Zellen sind ein Subklon der HT-4 Zellen, welche aus dem Hippokampus einer Maus isoliert und mittels SV-40 T-Antigen immortalisiert wurden (Morimoto et al. 1990). Sie wurden aufgrund ihrer Glutamatsensitivität selektioniert und verfügen über keine ionotropen Glutamatrezeptoren (Davis et al. 1994). HT-22 Zellen wurden in DMEM (engl. Dulbecco's modified Eagle medium) (Gibco) mit Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem (30 min bei 56 °C) Rinderserum (Gibco), 1 % Natrium Pyruvat (Gibco), 1 % Penicillin-Streptomycin (Gibco) und 2 mM L-Glutamine (Gibco) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in T-75 Kulturflaschen (Costar) bei 37 °C und 5 % CO_2 Gehalt in MCO-174I Inkubatoren (Sanyo). Die Zellen wurden mit 2 ml warmem PBS (engl. phosphat buffered saline) gewaschen und mit Hilfe von 700 μl warmem Trypsin (Gibco) abgelöst. Zellen wurden nach dem Trypsinieren in 10 ml DMEM aufgenommen, und manuell die Zellzahl bestimmt. Für die Kultivierung der Zellen über einen 48 h Zeitraum wurden $5,0 \times 10^5$ Zellen, für einen 72 h Zeitraum $3,25 \times 10^5$ Zellen in 20 ml DMEM aufgenommen.

4.2.1.3 HEK 293

HEK 293 Zellen (human embrionic kiney cells, HEK) sind humane embryonale Nierenzellen, die mit Adenovirus-5-DNA transformiert wurden (Graham et al. 1977).

HEK 293 Zellen sind adhärenente wachsende Zellen und wurden in DMEM mit Zusätzen von 10 % Rinderserum, 1% Natrium Pyruvat, 2mM L-Glutamine und 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in T-75 Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt in MCO-174I Inkubatoren (Sanyo). Zellen wurden mit 2 ml warmem PBS gewaschen und mit Hilfe von 700 µl warmem Trypsin (Gibco) passagiert.

4.2.1.3.1 Lösungen für die Transfektion von HEK 293 Zellen

CaCl ₂	610 mM
2 x HBS	16,4 g NaCl / l 11,9 g HEPES / l 0,25 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O pH: 7,05
Chlorquine	2 mM
DMEM	435 ml DMEM 50 ml Rinderserum (FCS) 5 ml L-Glutamine 5 ml Penicillin / Streptomycin 5 ml Natrium Pyruvate

4.2.1.3.2 Transfektion von HEK 293 Zellen

Transfektion von HEK 293 Zellen erfolgte durch Kalzium-Phosphat-Präzipitation. Für eine Transfektion im 96-Well-Format wurden 1,9 x 10⁴ Zellen/ Well 24 h vor der Transfektion ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Die Vorbereitung des Transfektionsansatzes erfolgte in 96-Well Spitzbodenplatten. Für einen 8-fach Ansatz wurden 2,5 µg Plasmid-DNA mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 25 µl verdünnt. Nach Zugabe von 35 µl 2 x HBS wurden 10 µl CaCl₂ beigemischt und der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen bildete sich ein Präzipitat aus Ca-Phosphat und DNA. Der Ansatz wurde mit 10 µl Chloroquine gemischt, und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 9 µl des Transfektionsansatzes in ein Well pipettiert. 4 h nach Inkubation im Brutschrank wurden 130 µl / Well abgenommen und durch 130 µl / Well frisches DMEM ersetzt.

4.2.1.4 Herstellung Wasserstoffperoxid resistenter Zelllinien

5 x 10⁵ HT-22 Zellen wurden in 10 cm Petrischalen in 10 ml Kulturmedium ausgesät. Selektionsdruck wurde mit 18 µM t-Butylhydroperoxid (H₂O₂) (Merck) ausgeübt. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, wurde das Medium alle 2 Tage erneuert.

Wasserstoffperoxid resistente Klone wurden mit Klonierungsringen isoliert und in neue 10 cm Zellkulturschalen überführt. Diese wurden erneut dem Selektionsmedium ausgesetzt. Daraus isolierte Klone wurden in 24 Well-Platten (Costar) überführt und unter gleichen Bedingungen weiter kultiviert. Schließlich wurden die resistenten Klone in T-75 Zellkulturflaschen überführt.

4.2.1.5 Herstellung Glutamat resistenter Zelllinien

Für die Isolierung von Glutamat-resistenten Zelllinien wurde genauso wie bei der Isolierung von Wasserstoffperoxid resistenten Zellen verfahren (4.2.1.4). Dem Wachstumsmedium wurden allerdings 10 mM Natriumglutamat (Sigma) zugesetzt. Während der Vereinzlung wurde die Glutamat Konzentration auf 15 mM erhöht. Einzelklone wurden in Selektionsmedium in 24 Well-Platten und anschließend in T-75 ml Zellkulturflaschen kultiviert.

4.2.1.6 Lagerung und Auftauen von Zellen

Zur längeren Lagerung der HT-22 und HEK 293 bzw. der Einzelklone der resistenten Zelllinien wurde die Zellmenge einer T-75 Zellkulturflasche in 3 ml eines Einfriermediums, bestehend aus 10 % (Dimethylsulfoxyd) DMSO (Roth), 50 % FBS und 40 % DMEM, aufgenommen und je 1 ml in ein Einfrierröhrchen (Kryo) überführt. Die Aliquots wurden für 3 Tage bei -80 °C gehalten, bevor sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

Aufgetaut wurden die Zellen mit 1 ml warmes DMEM. Um das noch vorhandene DMSO zu beseitigen, wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml DMEM resuspendiert.

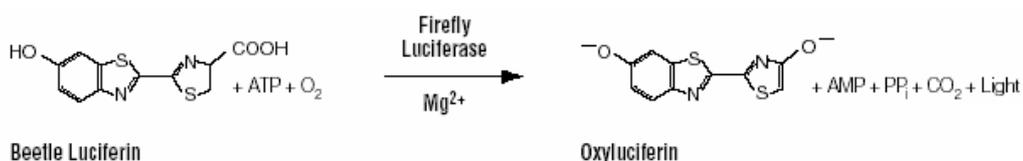
4.2.2 Lebend-Tod Messungen

4.2.2.1 AlamarBlue

Die Vitalität der Zellen wurde über die Fähigkeit, AlamarBlue (Biosource) zu reduzieren, bestimmt. AlamarBlue unterbrach nicht, wie andere Lebend-Tod-Messmethoden (z.B. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium)), in denen Tetrazolium Salz reduziert wird, den Elektronenfluss in der Atmungskette, und hatte deshalb keine toxischen Nebenwirkungen. Die chemische Reduktion von AlamarBlue konnte sowohl fluorometrisch als auch colorimetrisch gemessen werden. AlamarBlue wurde in Verhältnis 1:10 ins Kulturmedium gegeben. Die Fluoreszenz wurde nach drei Stunden Inkubation bei 37 °C gemessen (Fluoroskan Ascent FL; Labsystems).

4.2.2.2 Cell-Titer-Glo

Die Zellzahlbestimmung mittels Cell-Titer-Glo erfolgte über die Quantifizierung des intrazellulären ATP-Gehaltes. Dieser war direkt proportional zur Zellzahl. Dabei wurde Luziferin in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen und Sauerstoff durch Luziferase oxidiert. Das dabei entstandene Lumineszenz Signal war direkt proportional zum ATP-Gehalt (Crouch et al. 1993).



Das CellTiter-Glo Reagenz wurde im Verhältnis 1:4 ins Kulturmedium gegeben. Die Lumineszenz wurde nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C gemessen.

4.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Manuelle Zellzahlbestimmung wurde mit dem CASY (engl. cell counter and analysis system) erhoben. Dazu mussten die Zellen zuerst vereinzelt und anschließend in einer isotonen Elektrolytlösung resuspendiert werden. 100 µl der Zellsuspension wurden anschließend in 10 ml der Elektrolytlösung

aufgenommen. Das Prinzip der Messung beruhte auf dem Widerstandsmessprinzip. Die Zellsuspension wurde mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messpore definierter Größe gesaugt. Während der Messung wurde über der Kapillarstrecke ein 1 MHz Niederspannungsfeld angelegt. Die elektrolytgefüllte Messpore stellte dabei einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Messpore verdrängten die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolytlösung und führten so zu einer Widerstandserhöhung über die Kapillarstrecke, wobei die Widerstandsänderung ein Maß für das Volumen der Zellen darstellte. Tote Zellen, bei denen die Zellmembran keine elektrische Barriere darstellte, wurden hingegen mit der Größe ihres Zellkernes erfasst.

4.2.3 Das Screening-System

Die Hochdurchsatztauglichkeit dieses funktionellen Screens machte den Gebrauch von standardisierten Abläufen notwendig. Jeder Einzelschritt wurde deshalb durch ein automatisiertes Protokoll auf der Roboter-Plattform abgedeckt.

4.2.3.1 Vorbehandlung der Screening-Platten

Screening-Platten wurden vor dem Plattieren mit HT-22 Zellen mit Poly-L-Ornithine (PLO) (Sigma) bzw. Gelatine (Sigma) behandelt. Für die Behandlung mit PLO wurden 704 µl einer 0,01 % Lösung in 10 ml destilliertem Wasser verdünnt. Je 100 µl davon wurden in jedes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte (MTP) gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde mit einer Mehrkanalpipette abgenommen und die Platten für 20 min getrocknet. Bei der Vorbehandlung mit 0,1 % Gelatine wurde identisch verfahren.

4.2.3.2 Replikation an der ersten Roboterplattform

Die Einzelklone der verwendeten Klonkollektionen (OriGene Technologies, Rockville und Mammalian Gene Collection, RZPD)(Strausberg et al. 1999) wurden in 384-Well Mikrotiterplatten bei -80 °C in 21 % LB / Glycerin Lösung (10 g / l Pepton aus Casein, 5 g / l Hefeextrakt (Roth), 5 g / l NaCl) gelagert. Die Präparation der DNA erfolgte aus 96-Well-Platten.

Deshalb wurden aus jeder 384-Well Platte mit Hilfe eines „Picking“-Roboters vier 96-Well-Platten angeimpft. Dabei enthielt jedes Well der 96-Well-Platte 1,5 ml LB Medium versetzt mit 100 ng / ml Ampicillin. Die angeimpften MTP wurden anschließend über Nacht in einem Schüttelschrank mit 280 rpm bei 37°C inkubiert.

4.2.3.3 DNA Präparation an der zweiten Roboterplattform

Die 96-Well MTP wurden bei 3000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Auf einer Schüttelstation mit Dispenser wurden 170 µl P1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/ml RNase A (Qiagen)) zugegeben und für 5 min bei 1000 rpm geschüttelt. Daraufhin wurden 170 µl P2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) zugegeben, und für 10 s bei 300 rpm geschüttelt gefolgt von 5 min Inkubation bei RT. Anschließend wurden 170 µl P3 (3 M KAc, pH 5,5) zugegeben und für 30 s bei 1000 rpm geschüttelt. Nach einer 5 min Inkubation bei 4 °C wurden die MTP für 5 min bei 3500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in eine neue MTP gegeben. Zu dem Überstand wurden 120 µl P4 (2,5 % SDS (Roth) in Isopropanol) gegeben und dieser für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 3500 x g abzentrifugiert und der Überstand erneut zwischengelagert. Es wurden 120 µl Silika (50 mg / ml SiO₂ (12,5 g auf 250 ml Wasser) zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Silikasuspension wurde hierbei folgendermaßen hergestellt: 12,5 g Silika auf 250 ml Wasser gegeben und für 30 min verrührt. Der Überstand (enthielt Silikastaub) wurde abgenommen. Anschließend wurden 150 µl konzentrierte HCl dazugegeben und mit H₂O auf 250 ml aufgefüllt. Das Ganze wurde danach autoklaviert. Anschließend wurde für 5 min bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden 400 µl Aceton zugegeben, für 1 min bei 1000 rpm geschüttelt und anschließend 5 min bei 2000 x g abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Platten mit den Silikapellets für 20 min auf einer Heizplatte bei 70 °C getrocknet. Schließlich wurden 140 µl doppelt destilliertes Wasser mit einer Temperatur von 65 °C zugegeben, 5 min bei 800 rpm geschüttelt, 5 min bei 3000 x g abzentrifugiert und der Überstand mit der DNA in einer 96-Well MTP gelagert.

4.2.3.4 DNA-Transfektion an der dritten Roboterplattform

Je 5 µl der isolierten DNA wurden auf ein 1 % Agarose Gel geladen. Als Referenz dienten fünf verschieden konzentrierte DNA Lösungen. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid (Boehringer Mannheim) im Verhältnis 1:20000 beigesetzt. Gele wurden in TBE in einer Gelkammer für 45 min bei 150 V einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die Visualisierung wurde

anschließend mittels eines Lumi-Imager F1TM (Boehringer Mannheim) bei einer Emissions-Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Für die Transfektion wurden ~250 ng DNA / Well in einem Volumen von 10,5 µl destilliertem Wasser aufgenommen. Die Transfektion wurde im 96-Well-Format durchgeführt. In einer zweiten parallelen 96-Well-Platte wurden 0,93 µl / Well Metafectene (Biontex) mit 35 µl DMEM (ohne Antibiotika und Serum) gemischt. Alle weiteren Schritte wurden automatisch an einer Roboterstation durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden 24,5 µl / Well DMEM (serum- und antibiotikafrei) der DNA Lösung beigesetzt und gemischt. 35 µl des Metafectene / DMEM Gemisches wurden zu 35 µl der DNA / DMEM Lösung gegeben und gemischt. Jeweils acht 96-Well-Platten wurden dabei mit einem Pipettenspitzensatz bearbeitet. Dazwischen geschaltete Waschschriffe verhinderten DNA-Übertragung zwischen den Platten.

Nach 40 min Inkubation bei Raumtemperatur, in der die DNA mit dem Metafectene sog. Micellen gebildet hatte, wurden 60 µl / Well des DNA / Metafectene-Gemisches in das Zellkulturmedium gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 40 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.2.3.5 Toxizitäts-Test

Getestet wurde der Einfluss jeder einzelnen cDNA auf die Überlebensrate der Zellen nach Stimulation mit H₂O₂ oder Glutamat. 40 h nach Transfektion wurde das Zellmedium auf 50 µl / 96-Well reduziert. Die gewünschte Konzentration von H₂O₂ bzw. Glutamat wurde in einem Endvolumen von 50 µl / Well DMEM angesetzt und auf die Zellen gegeben. Medium das mit H₂O₂ versetzt war, musste innerhalb von 20 min auf die Zellen gegeben werden. Für größere Ansätze wurden deshalb nach 20 Minuten stets neue Lösungen hergestellt. Sämtliche Lösungen enthielten 100 ng / ml Amphotericin B (Promocell). 24 h nach Toxin Zugabe wurde die Überlebensrate mit Hilfe von AlamarBlue ermittelt.

4.2.4 Validierung der Kandidaten Gene

4.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmide wurden mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Hierzu wurden Anionenaustauschsäulen von Machery-Nagel verwendet. Ausgehend von einer 100 ml Bakterienflüssigkultur konnten zwischen 75 und 200 µg Plasmid-DNA präpariert werden, wobei die

Plasmid-Ausbeute, je nach verwendetem Plasmid, stark schwankte. Nach der Lyse der Bakterien durch SDS (Natriumdodecylsulfat) unter stark alkalischen Bedingungen (200 mM NaOH) wurden die bakteriellen Proteine und die genomische Bakterien-DNA durch Zugabe einer hochmolaren (2,8 M) Kaliumacetatlösung denaturiert und präzipitiert. Die Plasmid-DNA blieb unter diesen Bedingungen in Lösung und konnte mittels Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Die Bindung der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA an die positiv geladene Silica-Trägermatrix erfolgte unter niedriger KCl-Konzentration (900 mM, pH 6,3). Mit mittlerer KCl-Konzentration (1,15 mM) wurden Verunreinigungen abgewaschen. Plasmid-DNA wurde nachfolgend mit einem 1 M KCl-Puffer und gleichzeitiger Erhöhung des pH-Wertes (auf 8,5) von der Säule eluiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

4.2.4.2 Photometrische Bestimmung der DNA Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der gelösten DNA wurden 2 µl in 98 µl destilliertem Wasser verdünnt und in eine gereinigte Quarzküvette (Hellma) gefüllt. Anschließend wurde mit einem UV Spectralphotometer (BioMate™; ThermoSpectronic) die Absorption der verdünnten DNA-Lösung bei 260 nm ermittelt. Als Referenzwert diente doppelt destilliertes H₂O. Definitionsgemäß bedeutete ein Absorptionswert von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm eine DNA Konzentration von 50 µg / ml. Die Konzentration wurde berechnet als

$A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} = (n) \mu\text{g DNA} / \text{ml}$ für DNA und

$A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g} / \text{ml} = (n) \mu\text{g RNA} / \text{ml}$ für RNA.

4.2.4.3 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen hydrolysieren DNA an spezifischen Erkennungssequenzen und spalten diese in Fragmente definierter Größe. Alle hier beschriebenen Reaktionen wurden bei 37 °C im Heizblock (HLC) durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug 2 h. Es wurden zwischen 0,1 und 1 µg DNA mit 1/10 Volumen spezifischen Reaktionspuffer (Fermentas) in einem Endvolumen von 20 µl gelöst. Anschließend wurden zwischen 5 und 10 U Restriktionsendonuklease / µg DNA (Fermentas) zugesetzt und die Reaktion bei 37°C gestartet. Die Analyse der Spaltprodukte wurde mit Hilfe von 1 %-igen Agarosgelen durchgeführt.

4.2.4.4 Elektrophoretische Trennung und Isolierung von DNA Fragmenten

Die Gelelektrophorese von DNA wurde in Horizontalgelkammern mit einem Gelvolumen von 50 ml in kleinen Kammern und 100 ml in großen Kammern durchgeführt. Dazu wurde 1-1,5 % Agarose mit 1 x Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer in der Mikrowelle kurz aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt und anschließend in den Gelschlitten gegossen. Ethidiumbromid interkalierte in die DNA und konnte unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die DNA-Lösung wurde mit 0,2 Volumeneinheiten 5 x Ladepuffer (50mM EDTA, pH: 8,0; 30 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau) versetzt, auf das Gel aufgetragen und für 45 min bei 120 V und 400 mA aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x TBE Puffer (10fach : 108 g Tris / l; 55 g Borsäure / l; 40 ml 0,5M EDTA / l; pH: 8)

Als Längenstandard für den Bereich zwischen 100 – 12000 bp diente der 1 kb Plus DNA Marker (GibcoBRL). Die Detektion der DNA erfolgte in einem LumiImager F1TM (Boehringer Mannheim).

Zur Isolierung einzelner DNA-Fragmenten aus einem Gemisch wurde dieses in einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im UV Licht konnten die gewünschten Banden sichtbar und mittels eines Skalpells herausgeschnitten werden. Die Reinigung der DNA von Agaroseresten, Salzen, Proteinen, RNA wurde mit einem Gelextraktionskit von Qiagen durchgeführt. Das Kit wurde gemäß der Produktinformation angewendet.

4.2.4.5 Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die PCR (Saiki et al. 1988) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Hierzu wurden eine doppelsträngige DNA (Template-DNA) denaturiert und an die entstehenden komplementären DNA-Einzelstränge zwei Oligonukleotid-Startsequenzen (Primer), die die zu amplifizierende Region (Target-DNA) flankieren, hybridisiert. Von den Oligonukleotid-Startsequenzen wurden nun mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase die komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Eine repetitive Folge von Template Denaturierung, Startersequenz-Hybridisierung und Verlängerung der Startsequenzen durch die DNA-Polymerase führt zu einer exponentiellen Akkumulation der Target-DNA, deren Ende durch die 5'-Enden der Primer definiert waren. In der Praxis wurde die PCR in einem Eppendorfgefäß in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

50-500 ng Template DNA

5 µl 10x PCR-Puffer

2 µl 50 mM MgCl₂

1 µl dNTP-Mix (10 mM)

1 µl Vorwärts Primer (10 µM)

1 µl Rückwärts Primer (10 µM)
 1 µl Taq-Polymerase
 auf 50 µl mit destilliertem Wasser auffüllen

Die Reaktion lief in einem PCR-Gerät (Thermocycler; Biometra) ab. Das Standardprotokoll sah wie folgt aus:

Schritt	Zeit	Temperatur
1) initiale Denaturierung	5 min	94 °C
2) Denaturierung	45 s	94 °C
3) Startsequenz Anlagerung	50 s	variabel
4) Polymerisierung	100 s	72 °C
5) Schritte 2-4 40 x wiederholt		
6) abschließende Polymerisierung	5 min	72 °C
7) Lagerung	unbestimmt	4 °C

Die Startsequenz-Anlagerungstemperatur hing von der Schmelztemperatur und somit von der Sequenz der Oligonukleotide ab. Das amplifizierte PCR-Produkt ließ sich anschließend auf einem 1 % Agarosegel mittels Ethidiumbromid visualisieren.

4.2.4.6 Klonierung von DNA Fragmenten

Zur Klonierung aufgereinigter PCR- bzw. anderen DNA-Fragmenten (Insert) in einen neuen Vektor mussten sowohl die DNA-Fragmente als auch der Vektor mit Restriktionsendonukleasen behandelt werden. Grundsätzlich wurde versucht, die Restriktionsendonukleasen so zu wählen, dass diese nach dem Verdau überhängende Enden (sticky ends) an der Vektor- und Insertsequenz erzeugten. Dieses ermöglichte im Vergleich zu einem blunt-end Verdau (ohne Überhang) eine gerichtete Klonierung. Vektor und Insert wurden gemäß 4.2.4.3 und 4.2.4.4 behandelt und anschließend aufgereinigt.

Die nachfolgende Ligierung eines Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment mit kompatiblen Enden wurde durch die T4-DNA-Ligase (Fermentas) katalysiert. Dazu wurden 100 ng Vektor mit einem 10-fachen Überstand des zu ligierenden DNA-Fragments in 20 µl Ligase-Puffer mit einer Enzymeinheit T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C inkubiert. Der Ligierungsansatz konnte anschließend direkt zur Transformation in chemokompetente *E.coli* Bakterien verwendet werden.

4.2.4.7 Chemo-Transformation von *E.coli*

Zur Herstellung von chemokompetenten *E.coli* wurden 500 ml Selektionsmedium (LB Medium + 100 ng / ml Ampicillin) mit 500 µl einer DH5α Bakterien-Vorkultur (Invitrogen) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,3 bis 0,4 nm Wellenlänge in einem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die Kolben mit der Bakterienkultur wurden auf Eis für 45 min abgekühlt und anschließend bei 4 °C und 1600 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5-10 ml eisgekühlter CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert und nach 30 min auf Eis bei 4 °C und 1600 x g für 10 min zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in 5 ml einer 50 mM CaCl₂-Lösung lagerte der Ansatz für mindestens 4 h auf Eis. Die Bakterienlösung wurde mit 1 ml 75 % Glycerin durchmischt und anschließend zu je 100 µl Aliquots schock-tiefgefroren. Die kompetenten Bakterien konnten bei -80 °C für ca. 12 Monate gelagert und direkt zur Transformation verwendet werden.

Für die Standardtransformation wurden 5 µl eines Ligierungsansatzes zu 40 µl chemokompetenter Bakterien in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde nach 10 min auf Eis für 2 min auf 42 °C erwärmt. Nach einer Minute Abkühlung auf Eis wurden die transformierten Bakterien mit 900 µl SOC-Medium (5,0 % Hefe Extrakt; 2,0 % Tryptone; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM MgSO₄; 20 mM Glukose) resuspendiert und für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden 100 µl auf einer Platte mit Selektionsmedium ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde bei jeder Transformation auch ein Bakterienaliquot mit nicht-ligiertem Vektor transformiert. Ein Teil der Klone wurden am nächsten Tag in je 5 ml LB-Selektionsmedium gezüchtet und die isolierte Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen kontrolliert.

4.2.5 Isolierung und Analyse zytoplasmatischer RNA

4.2.5.1 Isolierung zytoplasmatischer RNA

Für die Präparation von RNA wurden entweder Plastikgefäße und Plastikpipetten verwendet, die vor dem Gebrauch noch schweißverschlossen waren oder Glasgefäße und Glaspipetten, welche zuvor mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) von RNasen befreit wurden. Die RNA wurde mit ConcertTM zytoplasmatischem RNA Reagenz (Invitrogen) isoliert. Das Reagenz desintegriert Zellmembrane und denaturiert die freiwerdenden Proteine. Das Zellhomogenat wurde anschließend mit Phenol und Chloroform extrahiert und die RNA durch Präzipitation aus der wässrigen Phase isoliert. Zur RNA Gewinnung aus HT-22 wurden 5 x 10⁵ Zellen in 15 cm Petrischalen in 40 ml DMEM für 48 h kultiviert (siehe. 4.2.1.2). Das Zellkulturmedium wurde daraufhin abgenommen und die Zellen mit

7 ml RNA-Reagenz (4 °C) lysiert. Anschließend wurde das Lysat in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 4 °C und 2600 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, separat gelagert und anschließend mit 700 µl 10 % SDS, 2,1 ml 5 M NaCl und 1,4 ml Chloroform versetzt. Daraufhin wurde die Lösung mit 2600 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde mit 0,8 Volumeneinheiten Isopropylalcohol gefällt und nach 10 min Inkubation mit 2600 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend mit 3,5 ml Ethanol gewaschen, bei 2600 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, luftgetrocknet und in 50 µl DEPC haltigem doppelt destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die Konzentration der RNA-Lösung durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm ermittelt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.2.5.2 Erststrang cDNA Synthese mittels reverser Transkriptase

Das Umschreiben von RNA in einen komplementären DNA Einzelstrang (cDNA), der als Template-DNA für PCR Reaktionen diente, erfolgte mit der AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*) Transkriptase. Die Einzelkomponenten wurden aus einem Kit für RT-Reaktionen (Roche) entnommen. Pro Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA umgeschrieben. Ein Reaktionsgemisch von 20 µl Endvolumen enthielt:

1 µg	gesamt RNA
2 µl	10x Reaktionspuffer
4 µl	MgCl ₂ 25 mM
2 µl	Deoxynukleotide (dNTP's) je 10 mM
2 µl	Random Primer (2 µg / µl)
1 µl	RNase Inhibitor (50 Units / µl)
0,8 µl	Reverse Transkriptase
x µl	bideist. Wasser

Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 25 °C und daraufhin bei 42 °C für 60 min inkubiert. Während des ersten Inkubationsschrittes lagerten sich die Primer and die RNA an, um anschließend bei 42 °C als Startsequenz für die reverse Transkription zu dienen. Sowohl die reverse Transkriptase als auch das RNA Template wurde anschließend bei 99 °C für 5 min denaturiert und die gesamte Reaktion danach für 5 min auf 4 °C abgekühlt. Die cDNA konnte daraufhin für PCR Reaktionen verwendet werden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

4.2.5.3 Quantitative PCR (Q-PCR)

Im Vergleich zur Endpunkt-PCR konnten mit Hilfe der quantitativen PCR Rückschlüsse auf die verwendete Ausgangsmenge des Templates gezogen werden. Dies war z.B. dann von Interesse, möchte man den Grad der RNA-Expression einzelner Gen-Transkripte in verschiedenen Geweben (Proben) untersuchen. Die Darstellung dieses Wertes erfolgte dabei immer relativ zu einer Referenzgröße. Bei der relativen Quantifizierung war die Referenzgröße meist ein sog. Haushalts-Gen, dessen Expressionsspiegel in den verschiedenen Proben als konstant angesehen wurde. Für diese Arbeit diente Glukose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH) als Referenzgen. Sämtliche Reaktionen wurden mit dem LightCycler von Roche und der dazugehörigen Auswertungssoftware (RelQuant) durchgeführt. Die Reaktionskomponenten wurden dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) entnommen, in Eppendorfgläsern gemischt und in Glaskapillaren (Roche), in denen die eigentliche Reaktion stattfindet, überführt. Im Kit enthalten war eine FastStart Taq Polymerase, die erst durch 10 min Inkubation bei 95 °C aktiviert wurde und der Farbstoff SYBR-Green I. SYBR-Green I bindet spezifisch an doppelsträngige PCR Produkte und konnte im UV-Licht detektiert werden. Reaktionen liefen in einem Endvolumen von 20 µl ab und enthielten:

2 µl cDNA (1 pg-10 ng)
 1,6 µl MgCl₂ (25 mM)
 1 µl Primer vorwärts (10 µM)
 1 µl Primer rückwärts (10 µM)
 2 µl FastStart SYBR Green Mix
 12,4 µl bidest. Wasser

Der Reaktionsansatz wurde gemischt, in Glaskapillaren überführt und in einem Karussell bei 3000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Pro Karussell konnten 32 Reaktionen bearbeitet werden. Das Standardprotokoll sah wie folgt aus:

1) Fast Start	{ 95 °C 10 min
2)	{ 95 °C 10 s
3) Amplifikation 45 Zyklen	{ 56 °C 10 s
4)	{ 72 °C 13 s
5) Schmelzkurve	{ 56 °C 15 s
6) Abkühlen	{ 40 °C 30 s

Dabei hing die Temperatur bei Schritt 3 und 5 von der Schmelztemperatur des jeweils verwendeten Primerpaares ab. Sowohl für das Targetgen als auch für das Referenzgen wurden zuerst sog.

Standardkurven erstellt, die wiederum für die Erstellung eines Koeffizienten-Wertes verwendet wurden. Dieser wurde benötigt, um unterschiedliche Effizienzen der Primerpaare von Target- und Referenzgen zu berücksichtigen. Ging man davon aus, dass der Wert gleich war, berechnete sich die PCR-Amplifikation nach folgender Formel:

$$N = N_0 \times E^{CP}$$

mit

N : Anzahl der PRC Moleküle zu einem bestimmten Zyklus

N_0 : Ausgangsmenge der PCR Moleküle

E : Amplifikationseffizienz (bei idealer Amplifikation = 2)

CP : Anzahl der Zyklen

Um die Standardkurven zu berechnen, wurde eine Verdünnungsreihe einer beliebigen cDNA-Probe erstellt. Die hierfür verwendete Proben-cDNA wurde in fünf Schritten im Verhältnis 1:10 verdünnt. Sowohl für das Target- als auch für das Referenzgen wurden mit jeder Verdünnung drei Reaktionen gestartet. Aus der Steigung der Eichgerade errechnete sich der Koeffizienten-Wert.

Anschließend wurde in jeder Probe (z.B. unterschiedliche Gewebe) der Grad der Expression von Target- und Referenzgen bestimmt. Der daraus gebildete Quotient gab Auskunft über die relative Expression des Targetgens in allen Proben. Eine so genannte Kalibrator-cDNA, aus der sowohl das Target- als auch das Referenzgen amplifiziert werden konnte und die in jeder Reaktion vertreten war, ermöglichte eine Normierung und den Vergleich verschiedener Experimente untereinander.

Experimentell wurde für beschriebenes Verfahren je 10 ng / μ l Proben cDNA in Triplikaten zur Amplifikation von Target- und Referenzgen eingesetzt, um den relativen Grad der Expression des Targetgens für jede Probe zu bestimmen.

4.2.5.4 Expressionsanalysen mit Hilfe von Affymetrix Chips

Affymetrix Chip-Analysen wurden erhoben, um das gesamte Expressionsmuster eines Genoms unter bestimmten Bedingungen zu untersuchen. Dabei war es entscheidend, dass auf dem Chip möglichst viele verschiedene Gensequenzen bzw. ESTs (engl. expressed sequences tag) abgedeckt waren. Der hier verwendete murine U74Av2-Chip von Affymetrix deckte Maussequenzen von 6000 verschiedenen Genen und 6000 verschiedenen EST's ab. Jedes Gen bzw. jeder EST war durch ein Set von 11-20 Paaren bestehend aus jeweils 25 Oligonukleotiden repräsentiert. Diese waren entweder zu 100 % sequenzhomolog (Perfect Match, PM) bzw. besaßen in ihrer Sequenz ein nicht homologes Nukleotid (Mismatch, MM). Beide Arten von Sets wurden für statistische Aussagen herangezogen.

Für Expressionsanalysen wurde Gesamt-RNA aus einer Glutamat-resistenten-, einer Wasserstoffperoxid resistenten- sowie aus zwei nicht resistenten HT-22 Zelllinien verwendet. Die Klone wurden nach 4.2.1.2 für 11 Passagen in Kultur genommen. Die RNA-Proben wurde gemäß 4.2.5.1 isoliert, die Konzentration photometrisch bestimmt und zusätzlich auf Degradation untersucht. Je 20 µg gesamt RNA wurden daraufhin zur weiteren Bearbeitung an das RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) nach Berlin geschickt. Dort erfolgten sowohl die Qualitätskontrolle als auch die Aufarbeitung der RNA. Für letzteres wurde nach Betreiberangabe zuerst die RNA in cDNA und anschließend in biotinyliert cRNA umgeschrieben, bevor diese auf den Chip hybridisiert wurde. Jede Probe wurde auf einem Chip hybridisiert. Die hybridisierten Proben wurden mit Streptavidin-Phycoerythrin markiert, bevor der Chip analysiert wurde. Zur Analyse der Genexpression wurden drei Werte herangezogen. Der Detektions-Wert (engl. detection call) beschrieb qualitativ, ob ein Transkript als 'anwesend'(present, P)'abwesend' (absent, A) oder 'schwach anwesend' (marginal, M) detektiert wurde. Ausschlaggebend hierfür war die Häufigkeit der Detektion eines jeden Transkriptes, was sich wie folgt berechnete:

$$R = (PM-MM) / (PM+MM)$$

Je geringer die Streuung für R für alle 16-20 Oligonucleotid Sets, desto größer war die Wahrscheinlichkeit einer sicheren Zuordnung. Der p-Wert berechnete sich nach dem einseitigen Wilcoxon's-Test (Statistical Algorithms Reference Guide, Affymetrix). Für die Zuordnung wurden zwei Grenzen definiert: $\alpha_1 = 0,04$ und $\alpha_2 = 0,06$.

Für p-Wert < 0,04 galt der detection call 'anwesend'

Für p-Wert > 0,06 galt der detection call 'abwesend'

Für p-Wert > 0,04 < 0,06 galt der detection call 'schwach anwesend'

Im hier verwendeten Experiment wurden mehrere Chip-Daten miteinander verglichen, um Unterschiede in der Expression von Genen oder EST's zu bestimmen. Dabei wurde die Differenz (PM-MM) eines Transkriptes auf dem Experiment-Chip (RNA aus Glutamat bzw. H₂O₂-resistenten Zellen) mit dem entsprechenden Probenpaar auf dem Kontroll-Chip (RNA aus nicht resistenten HT-22) verglichen. Dabei berechnete ein Algorithmus den sog.'Change' und die dazugehörige Signifikanz, ein anderer Algorithmus die sog. 'Signal Log Ratio'. Dieses drückte den quantitativen Wert des 'Change' aus. Angesetzte Grenzen definierten, ob ein Change 'erhöht'(increased, I), 'vermindert' (decreased, D), 'unverändert' (no change, NC), 'schwach erhöht' (marginal increased; MI) oder 'schwach vermindert' (marginal decreased; MD) war. Auch hierfür wurde der Wilcoxon's-Test herangezogen:

Für p-Wert < 0,0025 galt der Change 'increased'

Für p-Wert > 0,9975 galt der Change 'decreased'

Für p-Wert >0,003 <0,997 galt der Change 'no change'

Für p-Wert > 0,0025 <0,003 galt der Change 'marginal increased'

Für p-Wert >0,997 <0,9975 galt der Change 'marginal decreased'

Der 'Signal Log Ratio'-Wert enthielt eine quantitative Aussage über die Veränderung im Expressionsspiegel zwischen einem Transkript aus den resistenten Zellen im Vergleich zu demselben Transkript aus den unbehandelten Kontroll-Zellen. Dieser Wert wurde nach der 'Biweight'-Methode von Tuckey (Statistical Algorithms Reference Guide, Affymetrix) berechnet, und als Logarithmus zur Basis 2 (log2) dargestellt.

4.2.6 Validierung der Hits

4.2.6.1 Konzentrationsreihe

Im Gegensatz zu den Screening-Bedingungen wurde jeder Klon über eine H₂O₂-Konzentrationsreihe getestet. Hierfür wurden 2000 Zellen / Well in eine mit PLO vorbehandelte 96-Well-Platte plattiert und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die äußersten 2 Reihen sowie die äußersten Spalten einer jeder Platte blieben für die Nachtestung untransfiziert. Jede Platte wurde nur mit einer Plasmid-DNA transfiziert, wobei pro Hit-Platte eine Kontroll-Platte angelegt wurde. 40 h nach Transfektion wurde H₂O₂ mit ansteigender Konzentration von 60 µM bis 110 µM gemäß 4.2.3.5 zugegeben. Jede Platte wurde mit luftdurchlässiger Verschlussfolie (Roth) versiegelt, um Verdampfungseffekte zu minimieren. Zellzahl wurde 18 h später mit AlamarBlue bestimmt (vgl. 4.2.2.1).

4.2.6.2 Annexin V /PI-Färbung

Um den Anteil apoptotischer Zellen nach H₂O₂ Stimulation zu bestimmen, wurde die Dislokation von Phosphatidylserin (PS) analysiert. Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, welches in vitalen Zellen nur auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert war. Die Translokation von PS an die Außenseite der Zellmembran ist als frühes Ereignis während der Apoptose beschrieben worden (Fadeel 2004). AnnexinV (BD Pharmingen) ist ein Ca²⁺-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für PS. Die FITC-Markierung (fluorescein isothiocyanate) von AnnexinV erlaubt die

Detektion von PS am FACS Durchflußzytometer (fluorescence-activated cell-sorting). Bei nekrotischen Zellen konnte AnnexinV-FITC aufgrund der nicht mehr intakten Zellmembran auch innenständiges PS markieren, bzw. war auch hier PS auf der Außenseite der Zellmembran zu finden. Die Unterschiede zwischen primär- und sekundär apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde über eine Co-Färbung mit Propidiumjodid (PI) möglich. Primär apoptotische Zellen besaßen noch eine intakte Zellmembran und färbten nicht PI. Nekrotische Zellen färbten PI und waren AnnexinV-positiv. Zellen wurden unter Screening-Bedingungen plattiert, transfiziert und mit H₂O₂ stimuliert. 18 h nach H₂O₂ Exposition wurden das Zellmedium abgenommen, in einem Falconröhrchen zwischengelagert, die Zellen mit 100 µl 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 60 µl 1 x Trypsin gelöst. Die Zellsuspension wurde mit dem abgenommenen Zellmedium vereinigt und bei 1000 x g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach Resuspension mit 3 ml AnnexinV Bindepuffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4) für 4 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden das Zellpellet in 100 µl AnnexinV Bindepuffer aufgenommen und mit 5 µl AnnexinV-FITC vermischt. Nach einer Inkubation bei 4 °C im Dunkeln für 20 min wurden nochmals 400µl AnnexinV-Bindepuffer zugegeben. Kurz vor der Messung wurden 2 µl Propidiumjodid (Intergen) zugegeben und der Ansatz anschließend im Durchflußzytometer analysiert. Zur Bestimmung des apoptotischen und nekrotischen Anteils wurden 10000 Zellen analysiert.

4.2.6.3 Cell Death Detection ELISA PLUS

Ziel dieses Messverfahrens (cell death detection, CDD) war es, die Induktion von Apoptose über DNA-Fragmentierung nachzuweisen. Während der Apoptose wurde doppelsträngige DNA an internukleosomalen Linkerregionen unter Freisetzung von Mono- und Oligonukleosomen geschnitten. Die freigesetzten Histon-assoziierten DNA-Fragmente konnten nach dem Prinzip eines Sandwich-Enzym-Immunoassays quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden. Dabei bindet ein muriner anti-Histon-Biotin-Antikörper an die Histone H1, H1A, H2B, H3 und H4 des Kerngerüsts von Nukleosomen. Gleichzeitig wurde der Immunokomplex über Biotin an Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatten gebunden. Zusätzlich reagierte ein anti-DNA-POD (Peroxidase)-Antikörper mit der DNA der Nukleosomen. Die quantitative Analyse der Nukleosomen erfolgte schließlich photometrisch über die Reaktion von POD mit einem Fluoreszenzmarker (ABTS, (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonicacid])) als Substrat (nach Gebrauchsanweisung, Roche).

Der CDD-Test wurde mit HEK 293 Zellen durchgeführt. 24 und 48 h nach Transfektion wurden die 96-Well Mikrotiterplatten bei 235 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend 130 µl des Überstandes abgenommen. Nach 30 min Inkubation in 200µl Lysepuffer (Roche Kit) wurden die

Platten erneut mit $235 \times g$ für 10 min zentrifugiert. 20 μl Überstand wurden in Streptavidin gecoatete Platten überführt und mit 78 μl Immunoreagenz (72 μl Inkubationspuffer, 4 μl Anti-Histon-Biotin, 4 μl Anti-DNA-POD) gemischt. Die Platte wurde anschließend für 2 h bei Raumtemperatur und 100 rpm geschüttelt und im Folgenden 4 x mit 200 μl Inkubationspuffer gewaschen. 4 min nach Zugabe von 100 μl ABTS-Lösung (1 x ABTS Tablette in 15 ml Substratpuffer) erfolgte die Absorptionsmessung bei 405 nm. Messungen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt.

4.2.6.4 Induktion von NF κ B

Die Induktion von NF κ B wurde mit Hilfe eines Vektorkonstruktes ermittelt, welches sechs NF κ B DNA-Bindestellen vor einem Firefly-Luziferase-Gen besaß. Wurde NF κ B aktiviert, so ging dies meist mit einer Phosphorylierung des spezifischen Inhibitors I κ B α einher. Dieser löst sich und ermöglicht die Translokation von NF κ B in den Zellkern, wo es mit spezifischen DNA Bindestellen assoziiert und die Transkription nachgeschalteter Gene reguliert. Interagierte NF κ B mit den Bindestellen des Vektorkonstruktes, so induzierte dies die Transkription der Firefly-Luziferase. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde parallel zum Firefly-Luziferase-Konstrukt auch ein Vektor transfiziert, der eine *Renilla*-Luziferase kodierte. Die Aktivität beider Luziferasen wurde 41 h nach Transfektion ermittelt. Als Substrat für die Firefly-Luziferase diente Luziferin wie in 4.2.2.2 beschrieben. Anschließend an das Lumineszenzsignal der Firefly-Luziferase wurde das Lumineszenzsignal der *Renilla*-Luziferase ermittelt. Dazu musste zuerst das Signal der Firefly-Luziferase unterdrückt werden und gleichzeitig Koelenteradzin, das Substrat für die *Renilla*-Luziferase bereitgestellt werden. Anschließend konnte das Lumineszenzsignal aus der *Renilla*-Reaktion abgegriffen werden.

Für die Messung der NF κ B-Aktivität wurde das Dual-Glo™ Luziferase-Messsystem von Promega verwendet. Dabei wurden 2400 HT-22 Zellen in jedes Well einer 96-Well-Platte gegeben und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Transfektion erfolgt wie unter Screening Bedingungen. Das Verhältnis der transfizierten cDNAs betrug: 75 % „Gene of interest“, 15 % NF κ B-Firefly-Konstrukt und 10 % *Renilla*-Luziferase Konstrukt. Insgesamt wurden 250 ng DNA / Well transfiziert. 41 h nach Transfektion wurden die Zellen für 15 min lysiert und anschließend die Aktivitäten beider Luziferasen bestimmt. Zur Auswertung wurde der Quotient aus Firefly-Luziferase Lumineszenz zu *Renilla*-Luziferase-Lumineszenz bestimmt.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung eines Hochdurchsatz- Screening-Systems

Die Entwicklung eines automatisierten Screening-Protokolls war an mehrere Grundvoraussetzungen geknüpft. Es musste mit Zelllinien gearbeitet werden, die transient transfiziert werden konnten, wobei die Handhabung durch die Roboter keinen störenden Einfluss auf das Zellsystem ausüben durfte. Ein geeigneter toxischer Stimulus musste anschließend alle nicht durch die transfizierten cDNAs geschützten Zellen abtöten. Mit einer hochdurchsatztauglichen Methode sollte anschließend die Anzahl überlebender Zellen bestimmt werden, um protektive Effekte definieren zu können. Um reproduzierbare Ergebnisse zu generieren, musste das System stabil, d.h. mit hinreichend geringen Messwertschwankungen behaftet sein.

5.1.1 Das Screening-Modell

Um nahe am Phänotyp neuronaler Erkrankungen zu bleiben, wurde der Screen mit neuronalen HT-22 Zellen durchgeführt. Ausgehend von einer Vorkultur wurde die gleiche Anzahl von Zellen in jedes Well einer MTP plattiert.

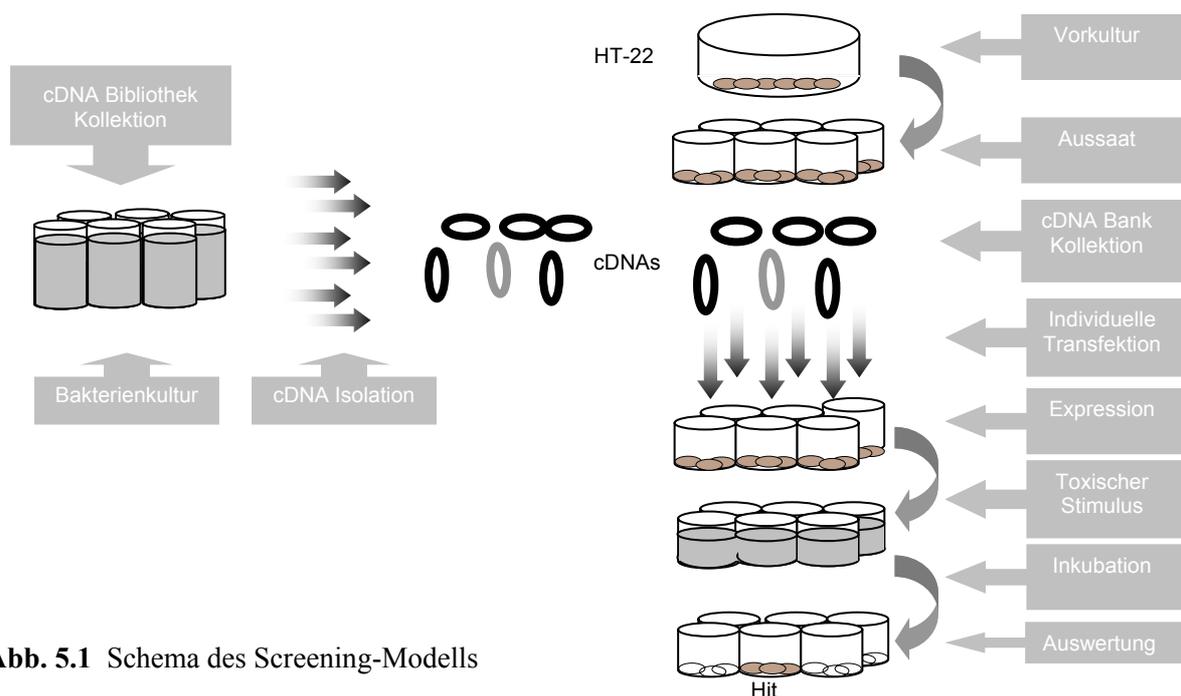


Abb. 5.1 Schema des Screening-Modells

Nach 24 Stunden wurde jedes Well mit einem individuellen cDNA-Expressionsplasmid (pCMV) transfiziert. Anschließend an die Expression wurden die Zellen mit einem toxischen Stimulus behandelt und danach die Überlebensrate bestimmt. Diejenigen Zellen, die durch die Expression der transfizierten cDNAs ein schützendes Milieu erzeugen konnten, überlebten den toxischen Stimulus zu einem höheren Prozentsatz und generierten anschließend ein höheres Zellzahlensignal als untransfizierte Zellen bzw. als Zellen, die durch die Expression der transfizierten cDNAs kein schützendes Umfeld erzeugen konnten.

5.1.2 cDNA-Kollektionen

Für den Screen wurde eine humane cDNA-Kollektionen von OriGene-Technologies Inc. verwendet. Diese bestand aus insgesamt 10000 cDNA-Klonen, deren cDNA-Inserts jeweils eine vollständige Gensequenz abdeckten. Zu allen Klonen waren 5' und 3' Sequenzen vorhanden, die mit der NCBI Datenbank (National Center for Biotechnology Information) abgeglichen waren. Sequenzanalysen mit 96 zufällig ausgewählten Klonen ergab eine Fehlerrate von 2,1 %, was bedeutete, dass zwei der nachsequenzierten cDNA-Inserts eine falsche Identität hatten. Bei keinem der 96 einzeln getesteten Klone wurden Mischpopulationen festgestellt. Zudem besaßen alle getesteten Bakterien-Klone vergleichbare Wachstumsraten, welche 24 h nach Animpfen durch die optische Dichte ermittelt wurden. Eine durchschnittliche Insertgröße von ca. 2800 bp konnte nach Restriktionsverdau aller 96 cDNA-Klone mit *NotI* und anschließender Trennung auf einem 1 % Agarosegel ermittelt werden.

	OriGene	MGC
Klonzahl	10000	7639
Durchschnitt. Insert Größe	2800 bp	1800 bp
5'/3' sequenziert [%]	100	52
Komplett sequenziert [%]	/	48
Anzahl manuell nachgetesteter Klone	96	58
Fehlerrate [%]	2,1	8,5
Volle Länge [%]	100	83
Artefakte [%]	0	3
Redundanz mit sich selbst [%]	6,2	12
Redundanz untereinander [%]	19,4	

Tabelle 5.1 Charakterisierung der cDNA Bibliotheken.

Der Anteil komplett sequenzierter Klone der OriGene Bank ermittelt sich aus dem Anteil der überlappenden 5'/3' Sequenzierungen. Zur Berechnung der Redundanz wurde jede Klonsequenz mit

allen anderen verfügbaren Sequenzdaten innerhalb einer Kollektion bzw. zwischen den Kollektionen abgeglichen. Als Stringenzkriterium galt eine 99 % Homologie über mindestens 500 Nukleotide.

89 % aller 10000 OriGene cDNA-Klone besaßen sog. „NM“-Einträge in den NCBI Datenbanken und beschreiben deshalb bestätigte Protein kodierende mRNA-Transkripte. Lediglich 11 % waren vorhergesagte unbestätigte Gensequenzen und erhielten sog. „XM“-Einträge. Die Redundanz innerhalb der 10000 OriGene Klone lag bei 6,2 % (Tabelle 5.1).

Eine weitere cDNA-Kollektion war durch eine human volle Länge MGC (mammalian gene collection) Kollektion (Strausberg et al. 1999) gegeben. Diese umfasste 7639 Klone, und besaß eine durchschnittliche Insertgröße von 1800 bp. 52 % der Klone waren nur 5'/3'-, der Rest komplett sequenziert. 34 % der Klone waren verifiziert als Voll-Länge (d.h. vollständige Gensequenz), 49 % waren lediglich vorhergesagte Voll-Länge Klone und 14 % der Klone waren nicht komplett oder hatten einen Fehler im Leserahmen (Tabelle 5.1). 3 % der Kollektion war mir Artefakten bestückt, welche entweder mit anderen cDNA-Klonen kontaminiert waren, oder kein Insert trugen.

Sequenzanalyse mit 58 zufällig ausgewählten Klonen ergab eine Fehlerrate von 8,5 %, was bedeutete, dass 5 der nachsequenzierten cDNA-Inserts eine falsche Identität hatten. Die restlichen 53 Klone konnten als korrekt verifiziert werden.

5.1.2.1 Anzahl der verwendeten cDNA-Klone

Von den ursprünglich 7639 Klonen der MGC Sammlung wurden 2016 Klone für den Screen verwendet. Der Rest war nach der DNA-Präparation zu gering konzentriert, als dass sie die erforderlichen 230 ng DNA / Well erreichten. Aus der OriGene-Sammlung wurden 32 Platten (96-Well) mit insgesamt 3072 Klonen verwendet. Hier konnte aus allen 32 Platten DNA in ausreichender Menge gewonnen und im Screen verwendet werden. Jede DNA-Platte wurde zweimal unter Screening-Bedingungen getestet. Insgesamt wurden 5088 Klone getestet. Bei einer Redundanz von 19,4 % entsprach dies 4102 verschiedenen Klonen. Somit wurden 22,8 % der Gesamtanzahl beider Bibliotheken getestet. Aus Kapazitätsgründen konnten nicht mehr Klone für diese Arbeit untersucht werden.

5.1.3 Bestimmung der Zellzahl mit AlamarBlue

Die Messung der Zellzahl wurde mittels verschiedener Methoden durchgeführt: AlamarBlue, MTT und Cell-Titer-Glo. AlamarBlue und MTT detektierten die metabolische Aktivität der Zellen und lieferten indirekt über den Grad der Substratreduktion Rückschlüsse über die Zellzahl. Die Messung mit dem Cell-Titer-Glo dagegen ermittelte die Zellzahl indirekt über die von den Zellen konstant gehaltene ATP Konzentration. Die genaueste Bestimmung der Überlebensrate konnte mit AlamarBlue und dem Cell-Titer-Glo erhoben werden (Abb. 5.2-3), wobei letzterer nur bedingt hochdurchsatztauglich war. Die Reduktion von MTT (Abb. 5.4) zeigte dagegen das geringste Auflösungsvermögen.

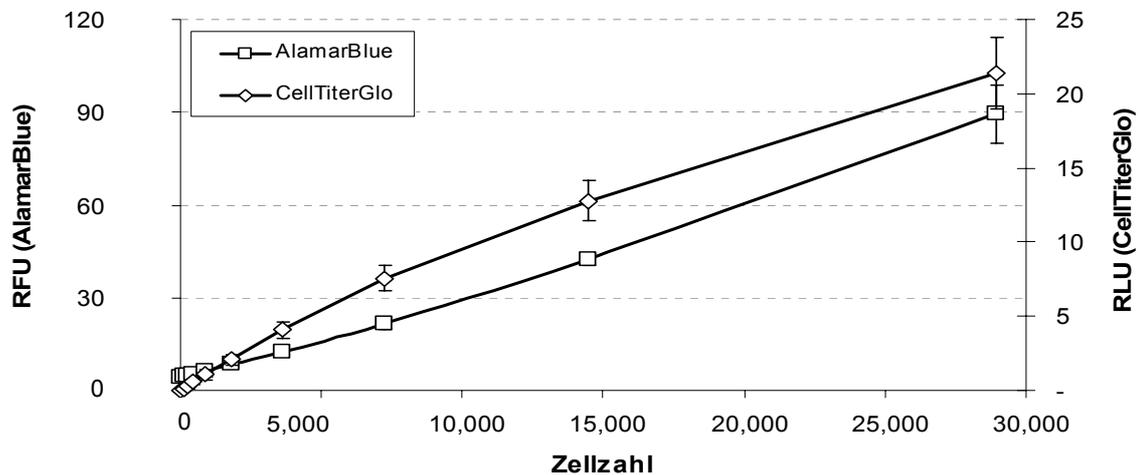


Abb. 5.2 Linearität von AlamarBlue und Cell-Titer-Glo bis 30.000 Zellen.

HT-22 wurde in verschiedenen Zelldichten ausgesät. 18 h danach wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 4.2.2.1-2). Das AlamarBlue Signal wurde fluorometrisch, das Cell-Titer-Glo Signal über ein Lumineszenzsignal ermittelt. Fehlerbalken zeigen zweifache Standardabweichung. Parallel dazu wurde manuell die Zellzahl ermittelt (4.2.2.3). Die Signale wurden als RFU- (relative fluorescence units) oder RLU- (relative luminescence units) Einheiten dargestellt.

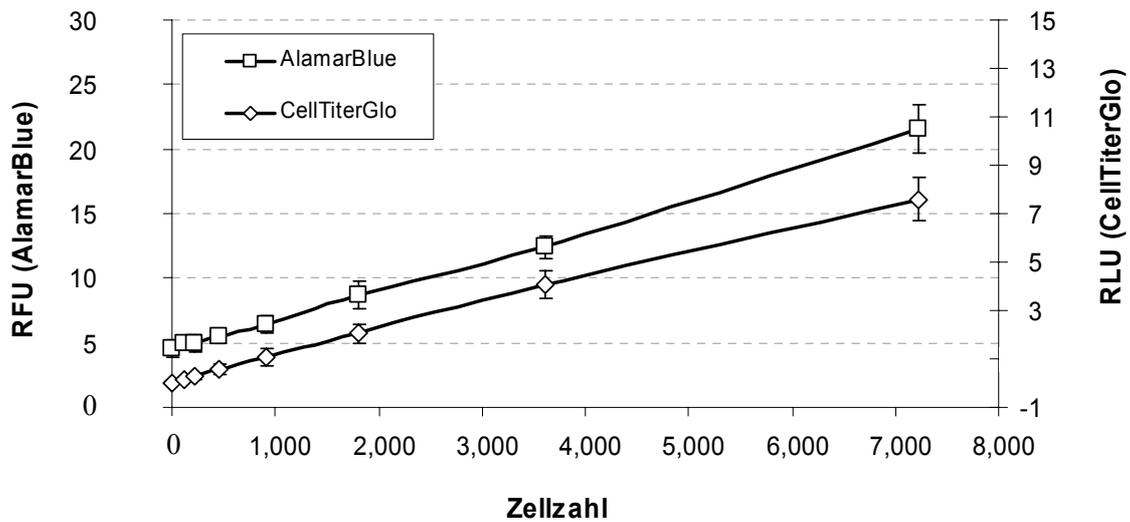


Abb. 5.3 Linearität von AlamarBlue und Cell-Titer-Glo bis 7000 Zellen.

Parallel zur Zellzahlbestimmung durch AlamarBlue und Cell-Titer-Glo wurde manuell die Zellzahl ermittelt. Die Signale wurden als RFU (relative fluorescence units) oder RLU- (relative luminescence units) Einheiten dargestellt

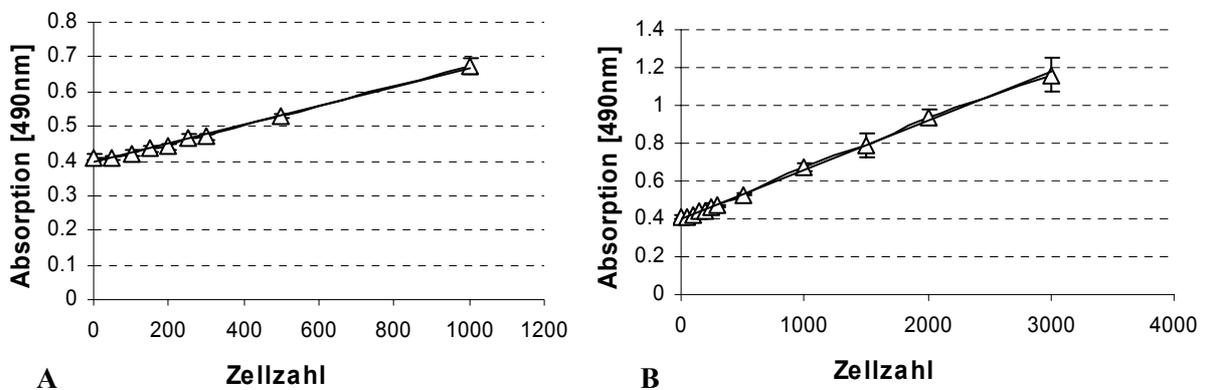


Abb. 5.4 Linearität von MTT im niederen (A) und im hohen (B) Zellzahlbereich.

Im Vergleich zu AlamarBlue und Cell-Titer-Glo wurde das MTT Signal durch Absorption bei 490 nm ermittelt. Die Zellzahl wurde parallel zum MTT Signal manuell erhoben. Fehlerbalken stellen 2-fache Standardabweichung dar.

Ziel war es, eine Messmethode zu bevorzugen, die sowohl Linearität als auch geringe Streuung und damit ein maximales Auflösungsvermögen, bei vertretbaren Kosten, gewährleistet.

Linearität zwischen Zellzahl und abgegriffenem Signal war in allen drei Messmethoden vorhanden. Lediglich das Auflösungsvermögen war bei Messungen mit AlamarBlue und Cell-Titer-Glo im Vergleich zu Messungen mit MTT deutlich erhöht.

Die höchste Auflösung war mit den Cell-Titer-Glo zu erreichen. Hier konnten bis zu einer Zellzahl von 1000 Zellen Unterschiede von 150 Zellen signifikant ($p < 0,05$; Student's t-Test) unterschieden werden, zudem verhielt sich das Signal proportional zur ausgesäten Zellzahl. Eine Verdopplung der Ausgangszellzahl ging mit einer Verdopplung im gemessenen Signal einher (Abb. 5.2 und 5.3). Im höheren Zellzahlbereich flachte dieser Wert leicht ab. Im Vergleich dazu konnten mit AlamarBlue bis zu einer Zellzahl von 1000 Zellen Unterschiede bis 300 Zellen signifikant ($p < 0,05$; Student's t-Test) getrennt werden (Abb. 5.3). Die direkte Proportionalität war in einem Bereich von 500 bis 30000 Zellen gegeben. Im niederen Zellzahlbereich konnte bei einer Verdopplung der Zellzahl lediglich eine Signalsteigerung maximal um den Faktor 1,5 erreicht werden. Am geringsten fiel dieser Faktor bei der Messung mit MTT aus. Hier ging eine Verdopplung der Zellzahl lediglich mit einer maximalen Signalsteigerung um den Faktor 1,5 einher (Abb. 5.4 A). Signifikant konnten mit dem MTT-Test Zellzahl-Unterschiede von 500 Zellen detektiert werden. Die Hochdurchsatztauglichkeit war bei allen Messmethoden gegeben. Um für den Screen keine teuren Lumineszenzplatten verwenden zu müssen, die für die Messung mit Cell-Titer-Glo notwendig gewesen wären, wurde die Überlebensrate unter Screening-Bedingungen mit AlamarBlue ermittelt.

5.1.4 Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Vorkultur

Die Transfektion der Zellen erfolgte mit Metafectene, da sich dieses Transfektionsreagenz als effizient und nicht toxisch für HT-22 Zellen herausgestellt hat. Weder Transfektion mit Kalziumphosphat noch mit anderen Reagenzien wie Lipofectamin2000 oder Superfect erzielten ähnliche Resultate wie Metafectene (Daten nicht gezeigt)

Je mehr Zellen eines Wells durch die transfizierten cDNAs geschützt werden konnten, desto deutlicher fiel die anschließende Detektion aus. Die vordringliche Aufgabe bestand deshalb darin, die maximale Transfizierbarkeit der Zellen zu gewährleisten. Um für optimale und reproduzierbare Transfektionsbedingungen zu sorgen, wurde der Einfluss der Vorkultur auf die Transfektionseffizienz bestimmt. Die Vorkultur der im Screen verwendeten HT-22 Zellen wurde in T75-Zellkulturflaschen 18 mal passagiert (vgl. 4.2.1.2). Aus drei unterschiedlich dichten Vorkulturen wurden jeweils 2000 Zellen / Well in eine MTP ausplattiert. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen mit 230 ng / Well GFP (engl. green fluorescent protein) transfiziert. 24 h bzw. 48 h nach Transfektion wurde im Lichtmikroskop und unter UV-Licht sowohl die Zellmorphologie als auch die Transfektionseffizienz bestimmt (Tabelle 5.2).

Konfluenz (%) Vorkultur	Zellzahl (pro ml)	Zelldurchmesser Vorkultur \pm SD	Phänotyp 24 h	Phänotyp 48 h	GFP 24 h (%) \pm SD (%)	GFP 48 h (%) \pm SD (%)
10 %	$\sim 1 \times 10^5$	$16 \pm 0.5 \mu\text{m}$	0	0	20 ± 8	20 ± 8
50 %	$4-6 \times 10^5$	$16 \pm 0.4 \mu\text{m}$	++	++	70 ± 10	50 ± 10
100 %	$>1 \times 10^6$	$12 \pm 0.8 \mu\text{m}$	+	++	50 ± 10	30 ± 10

Tabelle. 5.2 Auswirkungen der Vorkultur auf die Transfektionseffizienz.

Drei verschieden dichte Vorkulturen wurden manuell gezählt und der Zelldurchmesser ermittelt. Ausgehend von diesen Kulturen wurden je 2000 Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert. 24 h bzw. 48 h nach Transfektion mit 230 ng / Well GFP-Plasmid wurden der Phänotyp und die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen ermittelt. Dabei wurden adhärente Zellen mit (+) und Zellen, die zusätzlich maximal ausgebreitet waren, mit (++) gewertet. Experimente, in denen mindestens 50 % der Zellen nicht adhärent waren, wurden mit 0 gewertet.

Wie erwartet gewährleisteten nur konstant gehaltene Vorkulturbedingungen, die Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen. Des Weiteren zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen Zelldichte der Vorkultur und Transfektionseffizienz.

Bei konfluenten Bedingungen befanden sich die Zellen außerhalb ihrer exponentiellen Wachstumsphase, die für optimale Transfektionsbedingungen benötigt wurde. Ausgehend von einer 100 % konfluenten Vorkultur waren die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion schlechter transfizierbar als vergleichsweise Zellen aus 50 % konfluenten Vorkulturen. Am deutlichsten wurde dies 24 h nach Aussaat. Zellen einer 50 % konfluenten Vorkultur waren adhärent und maximal ausgebreitet, wohingegen Zellen aus zu dichten oder zu dünnen Vorkulturen entweder noch nicht vollständig adhärent oder noch nicht vollständig ausgebreitet waren. Im Screen wurden deshalb nur Zellen verwendet, deren Vorkultur zum Zeitpunkt der Aussaat zwischen $4-6 \times 10^6$ Zellen / T75 Zellkulturflasche betrug.

5.1.5 Stabilisierung der Screening-Bedingungen durch Vorbehandlung der MTP

Die Transfizierbarkeit der Zellen 24 h nach Aussaat war für das Screening-Protokoll unabdingbar. Dafür war erforderlich, wie in 5.1.3 beschrieben, dass die Zellen adhärent waren und sich in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Adhärenz der Zellen an die MTP-Oberfläche konnte durch Vorbehandlung mit Poly-L-Ornithine (PLO) bzw. Gelatine verbessert werden. Wie in Abbildung 5.5 zu sehen, hat PLO den günstigsten Einfluss auf die Zelladhäsion und das Zellwachstum. Für dieses Experiment wurden alle 96-Wellen einer MTP mit verschiedenen cDNAs transfiziert. Die Platten wurden zuvor mit PLO bzw. Gelatine vorbehandelt (4.2.3.1). 24 h bzw. 48 h

nach Transfektion wurde die Zellzahl mit AlamarBlue bestimmt. In dem Box-Plot-Diagramm sind die Verteilung der Messpunkte und die relative Lage der Hälfte der (50 %-Box) Messpunkte innerhalb der Streuung gezeigt. Bereits 24 h nach Transfektion zeigten sich Effekte bei PLO beschichteten MTP. Neben dem höchsten Signal war die Signalstreuung in PLO behandelten Wells am geringsten. Deutlicher wurde dieser Effekt 48 h nach Transfektion. Sowohl bei unbehandelten als auch bei mit Gelatine behandelten Wells lag die gemessene Zellzahl deutlich unterhalb derer in mit PLO behandelten Platten. Als Kontrollexperiment wurden je 40 Wells dreier verschieden behandelter MTP mit GFP transfiziert. Auch hier zeigte sich nach 48 h, dass in PLO beschichteten Platten die Zellen schneller gewachsen sind und sich homogener verhielten. Grund für diesen Effekt bei PLO behandelten Platten, lag in der homogenen und schnelleren Adhäsion aller Zellen in jedem Well. Je schneller die Zellen adhären waren, desto schneller gingen sie in die Wachstumsphase über. Dadurch verringerten sich die Auswirkungen stressender Effekte während der Transfektion was die Schwankungen bei unbehandelten Platten erklärte.

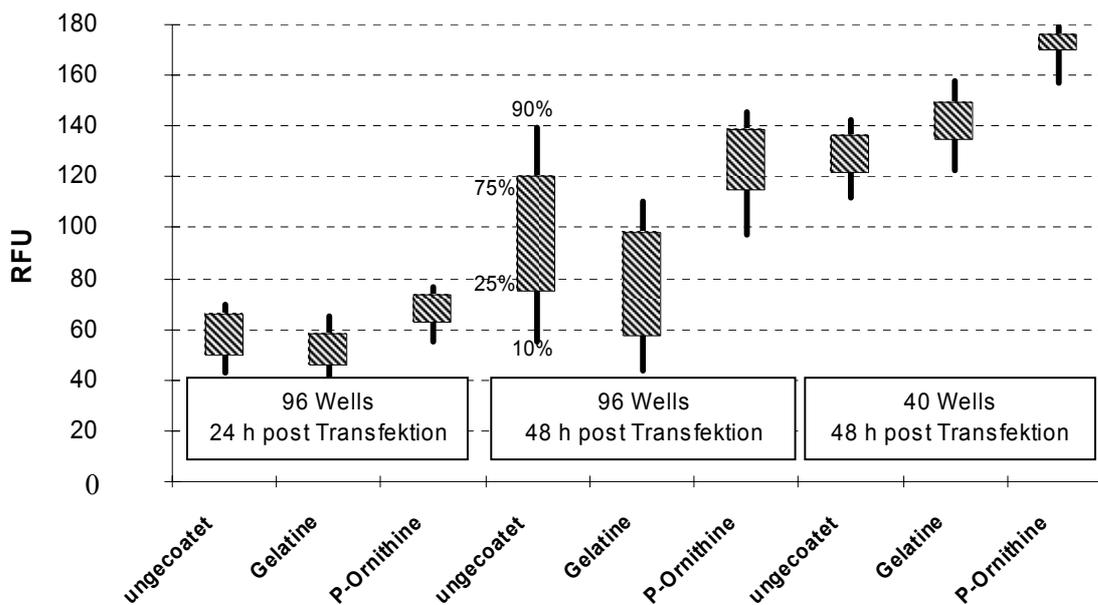


Abb. 5.5 Einfluss von Gelatine und PLO auf das Zellwachstum.

MTP wurden mit PLO bzw. Gelatine beschichtet. Pro Well wurden 2000 Zellen ausplattiert und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen transfiziert. 24 h bzw. 48 h nach Transfektion wurde die Zellzahl mit AlamarBlue ermittelt und in einem Box-Plot-Diagramm aufgetragen. Das Überlebenssignal wurde mit AlamarBlue erhoben und als RFU-Einheiten dargestellt.

5.1.6 H₂O₂ als exogener toxischer Stimulus

Oxidativer Stress beschreibt das Ungleichgewicht zwischen der Entstehung und dem Abbau freier Radikale bzw. reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS). In einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder im Schlaganfall wird der Erzeugung von ROS im zentralen Nervensystem (ZNS) eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Experimentell konnte die Neubildung von ROS auf unterschiedliche Weise hervorgerufen werden. Stimulation mit hohen Konzentrationen von Glutamat zum Beispiel führt zu einer Blockierung des Cystein-Glutamat Transporters, wodurch die Aufnahme von Cystein gestoppt wird. Der Wegfall von intrazellulärem Cystein führt dazu, dass kein neues Glutathion gebildet werden kann, welches für die Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser verantwortlich ist. Ohne Glutathion kommt es zu einem massiven Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration, was zu Zellschädigung und letzten Endes zum Zelltod führen kann. Die Übertragbarkeit dieses Modells für die Screening-Bedingungen wurde in mehreren Experimenten bestimmt. In mit PLO beschichteten MTP wurden in jedes Well 2000 Zellen ausgesät, für 48 h bzw. 72 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glutamat stimuliert. 24 h später wurde der Effekt auf die Überlebensrate mit AlamarBlue ermittelt. Dabei zeigte sich ein zelldichteabhängiger Effekt des Glutamat-Stimulus. Je länger die Zellen wuchsen und je höher die Zelldichte war, desto mehr Glutamat war notwendig, um die Zellen abzutöten. 48 h nach Aussaat lag die EC 50 Konzentration bei 5 mM Glutamat. 24 h später wurde dieser bei 220 mM Glutamat ermittelt (Abb. 5.6).

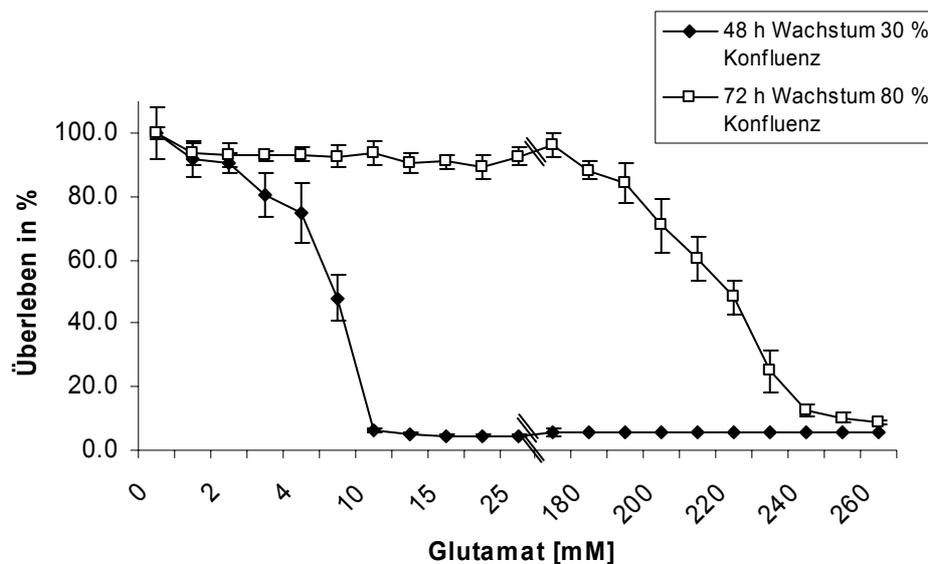


Abb. 5.6 Einfluss der Zelldichte auf die Toxizität von Glutamat. 2000 Zellen wurden in einer MTP ausgesät und für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Glutamat stimuliert und die Vitalitätsrate 24 h später mit AlamarBlue bestimmt. Für die unterschiedlichen Konzentrationen wurde, ausgehend von einer 3 M

Glutamat-Lösung, die jeweilige Endkonzentration in DMEM verdünnt und auf die Zellen gegeben. Jedem Messpunkt liegt eine 4-fach-Bestimmung zugrunde.

Neben Glutamat konnte oxidativer Stress auch durch direkte Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) simuliert werden. Wasserstoffperoxid diffundiert direkt durch die Zellmembran und wirkte intrazellulär unter anderem als Vorläufermolekül für hoch reaktive Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$).

Wasserstoffperoxid wurde in Form von t-Butyl Wasserstoffperoxid verwendet. Für die Ermittlung der EC 50-Werte wurden wie beschrieben 2000 Zellen in jedes Well einer MTP plattiert. Nach Wachstumsperioden von 48 h bzw. 72 h wurde Wasserstoffperoxid in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen gegeben und für 24 h inkubiert. Das jeweilige Vitalitätssignal wurde mit AlamarBlue abgegriffen, und zur Berechnung der EC 50 Konzentration herangezogen. Abbildung 5.7 zeigt beide Absterbekurven. Nach einer Wachstumsphase von 48 h konnte eine EC 50-Konzentration für Wasserstoffperoxid von $30 \mu\text{M}$ berechnet werden. 72 h nach Aussaat mussten $85 \mu\text{M}$ H_2O_2 eingesetzt werden, um 50 % der Zellen zu töten. In beiden Experimenten ließ sich eine sigmoide Absterbekurve ermitteln.

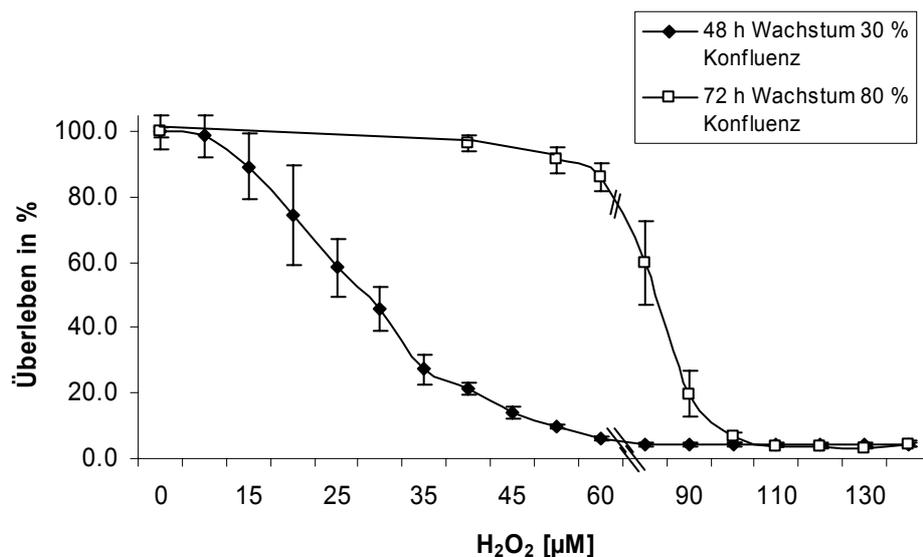


Abb. 5.7 Einfluss der Zelldichte auf die Wirkung von Wasserstoffperoxid.

2000 Zellen wurden in einer MTP ausgesät und für unterschiedliche Zeiten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von H_2O_2 stimuliert, und die Vitalitätsrate 24 h später mit AlamarBlue erhoben. Für die unterschiedlichen Konzentrationen wurde, ausgehend von einer 3 mM H_2O_2 -Lösung, die jeweilige Endkonzentration in DMEM verdünnt und auf die Zellen gegeben. Für jeden Messpunkt liegt eine 4-fach-Bestimmung zugrunde.

Wie später genauer beschrieben (s.u.), war eine Expressionszeit von mindestens 41 h erforderlich, um eine deutliche Protektion im Vergleich zu einer Kontrolltransfektion zu sehen. Der toxische Stimulus erfolgte somit nicht früher als 64 h nach der Aussaat. Für den Screen wurde als toxischer Stimulus Wasserstoffperoxid verwendet. Ausgehend von einer 3 mM H_2O_2 Lösung wurde eine

Endkonzentration von 90 μM in jedem Well eingestellt. Stabilität von H_2O_2 war lediglich für 20 Minuten bei Raumtemperatur nach Zugabe in DMEM gegeben. Applikation zu einem späteren Zeitpunkt ging mit dem Verlust des Wirkungsspektrums einher. Dieser Verlust war zudem temperaturabhängig, da eine 0°C temperierte H_2O_2 -Lösung bis zu 90 Minuten stabil war (Daten nicht gezeigt). Abbildung 5.8 zeigt den Verlust der Toxizität einer 90 μM H_2O_2 -Lösung bei Raumtemperatur in Abhängigkeit der Zeit bis zur Zugabe auf die Zellen. Das Überlebenssignal wurde 24 h nach Zugabe von H_2O_2 bestimmt. Der früheste mögliche Zeitpunkt für das Abgreifen des Überlebenssignals war nach 5 h gegeben. Zu diesem Zeitpunkt war das Überlebenssignal einer Kontrolltransfektion minimal und blieb zudem auch unverändert stabil. Das Signal konnte jedoch auch zu einem späteren Zeitpunkt abgegriffen werden, wie in Abbildung 5.9 dargestellt.

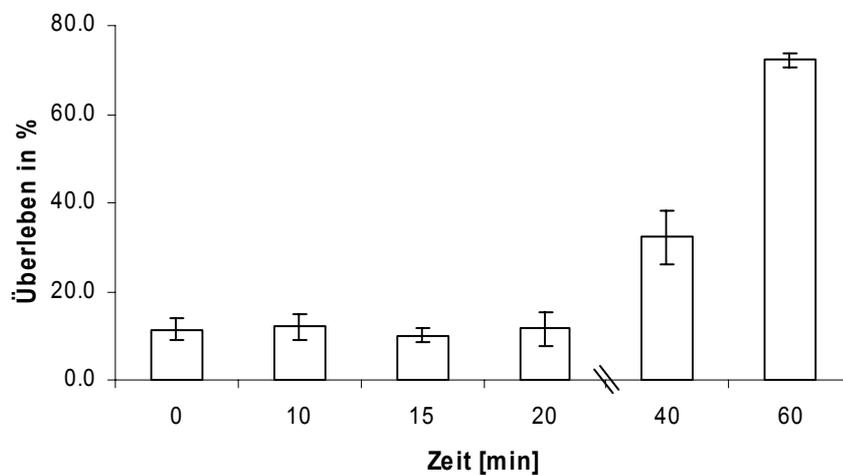


Abb. 5.8 Toxizität von H_2O_2 in Abhängigkeit der Zeit bis zur Zugabe auf die Zellen. 2000 HT-22 Zellen / Well einer MTP wurden ausplattiert, 24 h später transfiziert und für 41 h bei 37°C inkubiert. H_2O_2 wurde ausgehend von einer 3 mM Lösung auf 90 μM in DMEM verdünnt und bei Raumtemperatur bis zur Zugabe auf die Zellen gelagert. 24 h danach wurde das Überlebenssignal bestimmt. Jedem Messzeitpunkt liegt eine 8-fach-Bestimmung zugrunde. Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

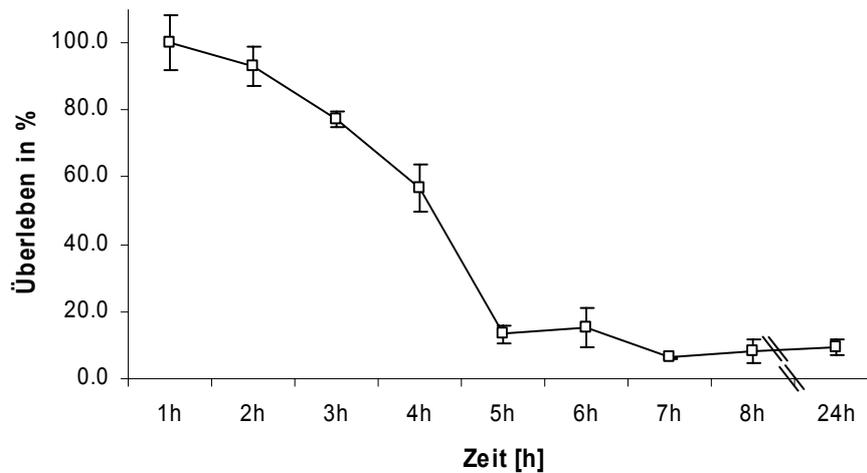


Abb. 5.9 Absterberate auf einen 90 μM H_2O_2 -Stimulus in Abhängigkeit der Zeit. 2000 HT-22 Zellen / Well einer MTP wurden ausplattiert, 24 h später transfiziert und für 48 h bei 37 °C inkubiert. H_2O_2 wurde ausgehend von einer 3 mM Lösung auf 90 μM in DMEM verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde das Überlebenssignal bestimmt. Jedem Messzeitpunkt liegt eine 8-fach-Bestimmung zugrunde. Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

5.1.7 Minimale Expressionszeit für protektive cDNAs

Wie bereits beschrieben erfolgte die Transfektion 24 h nach Aussaat mittels Metafectene. Durch eine Transfektionsoptimierung, in der sowohl das Verhältnis von DNA zu Reagenz als auch die optimale DNA Menge ermittelt wurde, konnten reproduzierbare Transfektionseffizienzen von $\geq 60\%$ erreicht werden. Zur Quantifizierung diente GFP. Maximal konnten pro Well 250 ng Plasmid-DNA transfiziert werden. Größere Mengen gingen mit Zellschädigung einher. Ein bereits in der Literatur beschriebenes, neuroprotektives Protein wurde als Positivkontrolle verwendet. Mit Hilfe der Glutathion Peroxidase-1 (Gpx-1) wurde das Transfektions-Protokoll und Screening-Protokoll optimiert.

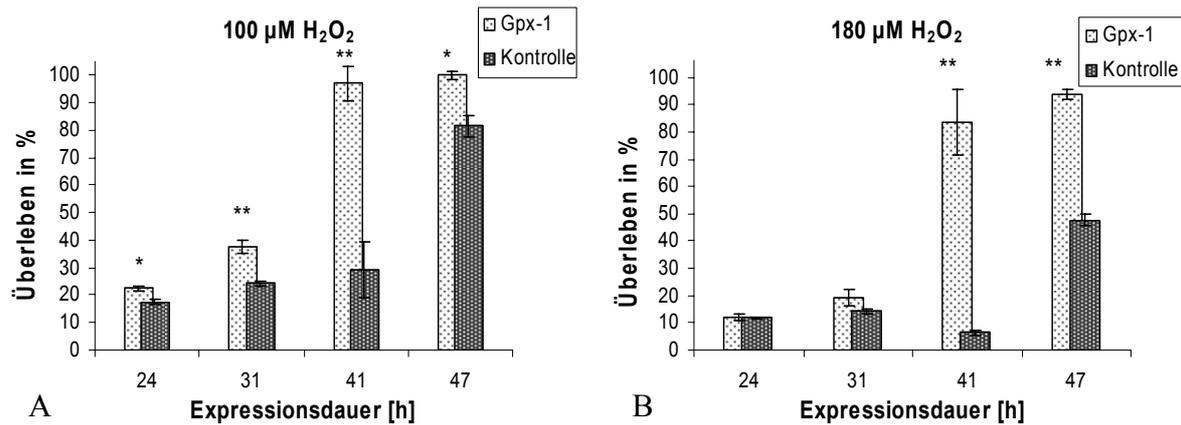


Abb. 5.10 Zeitfenster für die Detektion protektiver cDNAs.

Für die Ermittlung der optimalen Expressionszeit wurden PLO beschichtete MTP mit 230 ng / Well Gpx-1 bzw. Kontroll Plasmid unter Screening-Bedingungen transfiziert. Nach 24 h, 31 h, 41 h und 47 h Expressionszeit wurden je 8 Wells mit A) 100 μ M bzw. B) 180 μ M H₂O₂ stimuliert und das Überlebenssignal 18 h nach Stimulation bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte 8 verschiedener Datenpunkte \pm Standardabweichung (* $p < 0.01$ und ** $p < 0.001$; Student's t-Test).

2000 Zellen wurden in mit PLO vorbehandelten MTP pro Well ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 230 ng / Well Gpx-1 bzw. Leervektor unter Screening-Bedingungen transfiziert. Nach unterschiedlich langen Expressionszeiten wurden die Platten mit 100 μ l / Well einer 100 μ M Wasserstoffperoxid Lösung behandelt und die Überlebensrate 18 h nach Stimulation ermittelt. Bei einer optisch ermittelten Transfektionseffizienz von $> 60\%$ musste Gpx-1 mindestens 41 h exprimiert werden, um im Vergleich zur Leervektortransfektion ein größtmögliches Überlebenssignal zu generieren. 47 h nach Transfektion waren 100 μ M H₂O₂ nicht mehr ausreichend, um die Zellen der Leervektorkontrolle abzutöten. Diese zellzahlabhängige Wirkungsweise von H₂O₂ musste bei der Wahl des H₂O₂ Stimulus unter Screening-Bedingungen berücksichtigt werden. Der erhöhten Zellzahl nach 47 h im Vergleich zu 41 h Expressionszeit konnte mit einer Erhöhung der H₂O₂ Konzentration entgegengekommen werden.

5.1.8 Konzentrationsfenster

Die Wahl der Konzentration könnte darüber entscheiden, welche Art von Protektoren im Screen identifiziert werden können. Wird die Konzentration zu hoch gewählt, detektiert man nur noch starke Protektoren und nimmt den Verlust von schwächeren Protektoren in Kauf. Wählt man die Konzentration allerdings zu gering, besteht die Gefahr, zu viele falsch-positive Hits zu generieren.

Betrachtet man das Verhältnis von Gpx-1 zu Leervektor- (Lv) transfizierten Zellen nach 41 h Expression und 18 h Stimulation mit verschiedenen H_2O_2 Konzentrationen, so ließen sich vier mögliche Bereiche definieren, aus denen die endgültige Screening-Konzentration gewählt werden konnte (Abb. 5.11). Die EC 50 Konzentration der Leervektortransfektion lag bei $85 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Der protektive Effekt von Gpx-1 konnte bereits in der ersten Phase bis $75 \mu\text{M}$ detektiert werden. In der zweiten Phase vergrößerte sich der Effekt zwischen absterbenden und protektierten Zellen. Die dritte Phase charakterisierte den Bereich nach der EC 50-Konzentration. In diesem Bereich könnten sowohl starke als auch schwächere Protektoren detektiert werden. In der letzten Phase könnten möglicherweise schwächere Protektoren nicht mehr detektiert werden.

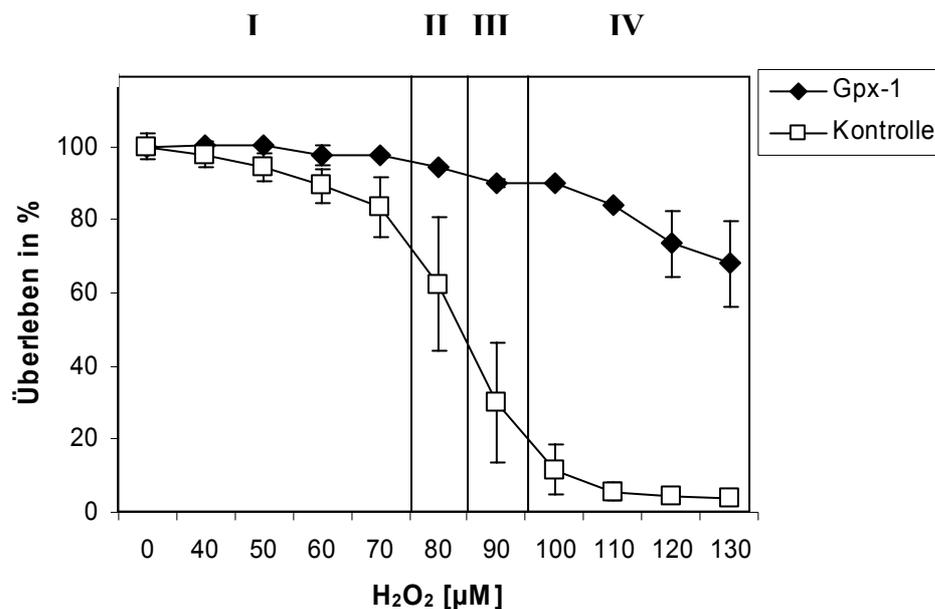


Abb. 5.11 Konzentrationsbereich für den Screen.

2000 Zellen / Well wurden unter Screening-Bedingungen inkubiert und mit 230 ng Plasmid DNA / Well transfiziert. 41 h nach Transfektion wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen H_2O_2 stimuliert. Pro Datenpunkt entfielen sechs unabhängige Messpunkte. Angezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD).

Die Konzentration im Screen wurde in einem Bereich von 90- 95 μM so gewählt, dass die Anzahl der falsch-positiven Hits möglichst gering gehalten wurde, und trotzdem möglichst das ganze Spektrum an Protektoren identifiziert wird.

5.1.9 Plattenbelegung

Experimente mit Gpx-1 und Kontrollplasmiden zeigten, dass es bei H_2O_2 -Stimulation zu signifikanten Signalschwankungen in den Randwells kam. Dies konnte auf den schnelleren Temperatureausgleich

und die höhere Verdampfungsrate in den Randwells zurückgeführt werden. Der Verdampfungseffekt konnte durch Volumenbestimmungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde unter Screening-Bedingungen nur die inneren 60 Wells einer jeden Platte belegt (Abb. 5.12). Nachfolgende Abbildung zeigt die Plattenbelegung in diesem Experiment.

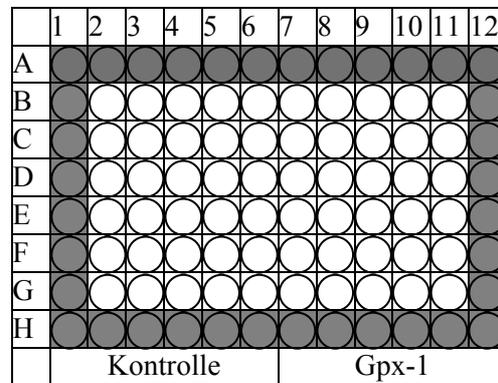


Abb. 5.12 Plattenbelegung.

Nach Transfektion von 230 ng / Well Gpx-1 und Leervektor unter Screening-Bedingungen, wurden die Zellen für 41 h inkubiert, und anschließend mit 95 µM H₂O₂ stimuliert. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 18 h wurde das Überlebenssignal bestimmt. Die Signale (Abb. 5.13) der 18 Rand- und der 30 Mittel-Wells einer jeden Transfektionsreihe zeigten an den Rändern sowohl größere Werte als auch größere Streuungen im Vergleich zur Mitte.

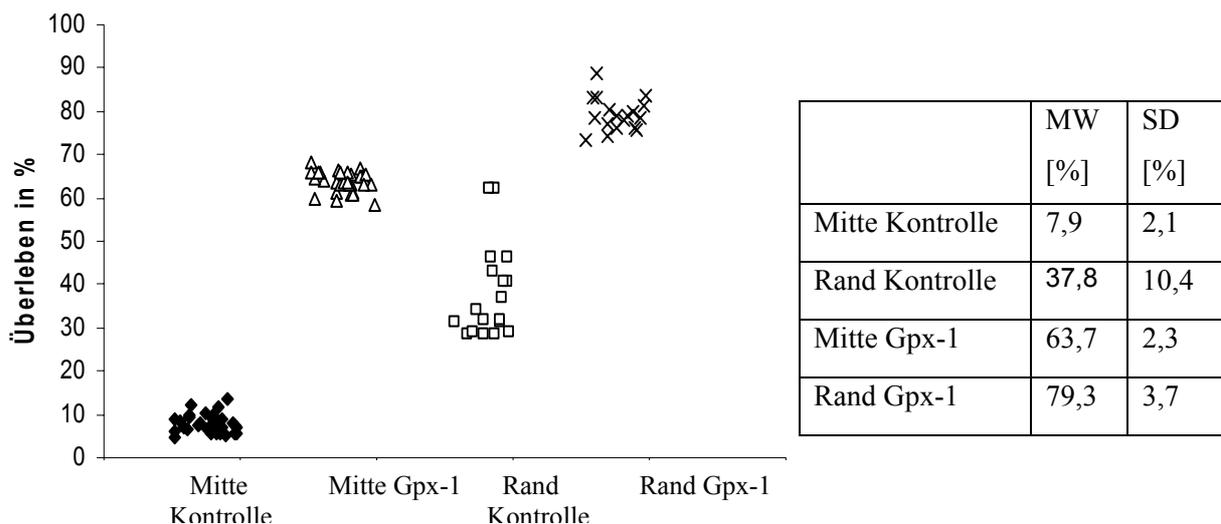


Abb. 5.13 Signalverteilungen innerhalb einer Screening-Platte.

Je 48 Wells einer Screening-Platte wurden unter Screening-Bedingungen mit Gpx-1 bzw. einem Kontrollplasmid transfiziert, 41 h inkubiert und anschließend für 18 h mit 95 µM H₂O₂ stimuliert. Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) sind in der Tabelle angegeben.

Unter Screening-Bedingungen würde somit an den Rändern eine große Anzahl falsch positiver Signale erzeugt. Um falsch-positive Signale besser eingrenzen zu können, wurde jede Platte mit Kontrollen bestückt.

Als Kontrolle und Normgröße zur Definition der „Hits“ wurden auf jeder Platte vier Negativ-Kontrollen (Leervektor) (Position: B, C 10-11), vier Positiv-Kontrollen (Gpx-1) (Position: F, G 10-11) und vier Wells mit GFP zur Bestimmung der Transfektionseffizienz (Position: D, E 10-11) bestückt.

5.1.10 „Hit“-Definition

Als Hit wurden all diejenigen cDNA-Expressionsplasmide definiert, deren Expression in HT-22 nach einer Stimulation mit H₂O₂ zu einer Steigerung des Überlebenssignals, über die einfache Standardabweichung vom Mittelwert des Plattendurchschnitts und der Negativ-Kontrollen führte. Für cDNAs in den Randwells galt der zweifache Durchschnitt der Randwells, um als Hit definiert zu werden. Als Negativ-Kontrollen dienten GFP- und Leervektor-Transfektionen.

5.1.11 Charakterisierung des H₂O₂ vermittelten Zelltodes

Um abzuschätzen, welche molekularen Mechanismen die cDNAs beeinflussen müssen, um die Zellen vor H₂O₂-vermitteltem Zelltod zu schützen, wurde die Art des Zelltodes ermittelt.

Der Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde 18 h nach Stimulation mit Wasserstoffperoxid ermittelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Gemessen wurde der Anteil AnnexinV (AnV) bzw. Propidiumjodid (PI) markierter Zellen. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin, welches während der Apoptose an die Außenseite der Zellmembran lokalisiert und als früher apoptotischer Marker gilt. Propidiumjodid interkaliert mit DNA und markierte lediglich Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran. Als apoptotisch wurden im Durchflußzytometer deshalb diejenigen Zellen detektiert, die PI negativ (d.h. nicht markiert) und AnV positiv (d.h. markiert) waren. Nekrotische Zellen waren PI und AnV positiv und vitale Zellen PI und AnV negativ. Der Anteil apoptotischer Zellen 18 h nach Stimulation mit 100 µM H₂O₂ betrug 8,5 %. 91,5 % der Zellen waren nekrotisch (Abb. 5.14). Nach Stimulation mit 50 µM H₂O₂ betrug der Anteil apoptotischer Zellen 3,5 %, der der nekrotischen Zellen 22,5 %. Insgesamt waren 74 % der Zellen vital. Kinetik Experimente belegten, dass es sich bei dem Anteil nekrotischer Zellen nach 18 h Stimulation mit H₂O₂ nicht um sekundär nekrotische Zellen handelte, da der Anteil an apoptotischen Zellen bei früheren Zeitpunkten unverändert blieb (Daten nicht gezeigt).

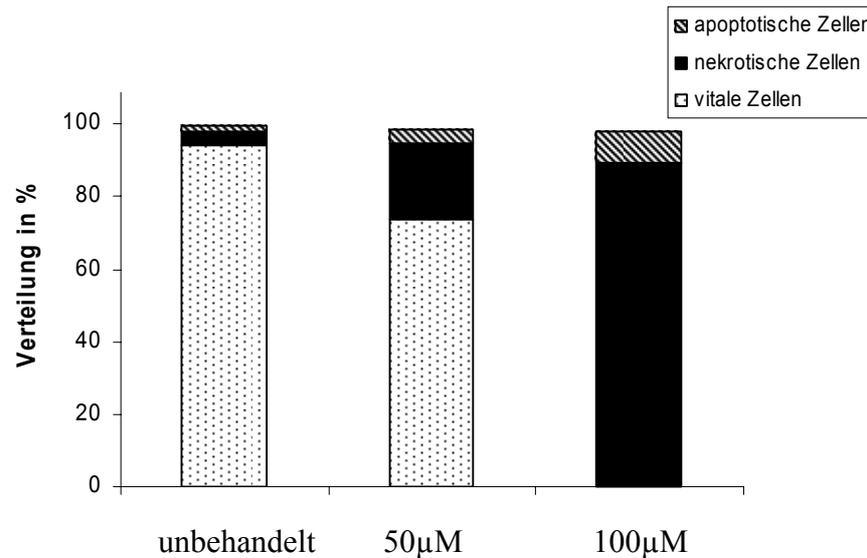


Abb. 5.14 Anteil apoptotischer Zellen nach Stimulation mit H_2O_2 . Zellen wurden unter Screening-Bedingungen ausgesät und für 48 h inkubiert. Anschließend mit 50 μM und 100 μM H_2O_2 für 18 h behandelt. Die Färbung mit AnnexinV und Propidiumjodid erfolgte, wie beschrieben, unter 4.2.6.2. Die quantitative Erfassung der unterschiedlich markierten Zellen erfolgte im Durchflußzytometer. Pro Konzentration wurden 8 Wells einer 96-Well MTP untersucht.

Der geringe Anteil apoptotischer Zellen nach H_2O_2 Stimulation impliziert, dass antiapoptotische Gene, sofern sie nicht zusätzlich antioxidative Eigenschaften vermitteln, im Screen nicht detektiert werden sollten.

5.2 Screening Ergebnisse

Die Funktionalität des Screening-Systems zur Identifizierung protektiver cDNAs wurde mit einer cDNA-Klon-Platte erbracht, auf der sich der Glutathion Peroxidase-1 cDNA-Klon befand. Diese Platte wurde unter Screening-Bedingungen präpariert und die daraus gewonnene Plasmid-DNA unter Screening-Bedingungen transfiziert. Nach Stimulation mit 90 μM H_2O_2 wurde das Überlebenssignal ermittelt. Berechnet wurden der Plattendurchschnitt und die einfache Standardabweichung, so dass statistisch 68,27 % aller negativen cDNAs innerhalb dieses Ausschlussintervalls lagen. Alle Signale die oberhalb dieser Grenze lagen, wurden als „Hit“ definiert.

Die Glutathion Peroxidase-1 konnte unter Screening-Bedingungen eindeutig wieder gefunden werden (Abb. 5.15). Die Wiederfindungsrate bei künstlich bestückten Platten unter Screening-Bedingungen lag für die Glutathion Peroxidase-1 unter 90 μM H_2O_2 Selektion bei 100 %. Die 5088 Klone der cDNA Bibliotheken wurden insgesamt zweimal unter Screening-Bedingungen getestet. In der ersten

Screeningrunde konnten 97 Klone identifiziert werden, deren Signal über dem Kontrollsignal lag. In der zweiten Screeningrunde konnten davon 38 Klone bestätigt werden.

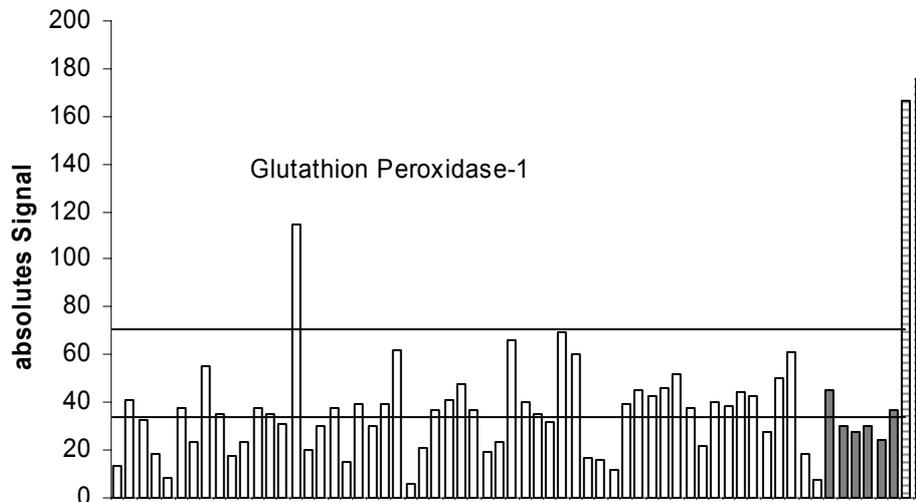


Abb. 5.15 Bestätigung der Funktionalität des Systems unter Screening-Bedingungen.

230 ng / Well Plasmid-DNA einer Kollektionsplatte, auf der die Glutathion Peroxidase-1 vertreten war, wurde unter Screening-Bedingungen transfiziert und anschließend mit 90 μM H_2O_2 stimuliert. Das Überlebenssignal wurde nach 18 h abgegriffen. Auf der Screeningplatte befanden sich Kontroll-DNAs (Grau: Leervektor und GFP; kariert: Gpx-1), die zur Normierung herangezogen wurden. Die untere Grenze markiert den gesamten Plattendurchschnitt. Die obere Grenze markiert die einfache Standardabweichung.

Zusätzlich traten 9 neue Klone auf, die in der ersten Runde nicht detektiert wurden. Tabelle 5.3 fasst die Auswertung beider Screens zusammen. Insgesamt lag die „Hit-Rate“ im ersten Screen bei 1,9 %. Durch die Nachtestung im zweiten Screen bestätigten sich nur noch 37 % der Hits, was zu einer gesamten Hit-Rate von 0,7 % führte.

	OriGene	MGC	Gesamt
gescreente Klonzahl	3072	2016	5088
Detektion im 1. Screen	75	23	97
% Anteil	2,4 %	1,15 %	1,9 %
Detektion im 2. Screen	41	6	47
Davon nur im 2. Screen	7	2	9
Detektion im 1. und 2. Screen	34	4	38
% Anteil	1,0 %	0,2 %	0,7 %
Manuelle Nachtestung	6	0	6
% Anteil	0,11 %	0	0,11 %

Tabelle 5.3 Auswertung beider Screening-Runden.

Alle 38 in beiden Screening-Runden aufgetretenen Klone wurden manuell nachgetestet. Hierfür wurde Säulen aufgereinigte Plasmid DNA verwendet. Insgesamt konnten in der manuellen Nachtestung 6 Klone bestätigt werden. Diese zeigten eine signifikante Signalsteigerung gegenüber den Kontrollen über mindestens zwei unterschiedliche H₂O₂ Konzentrationen in mindestens drei unabhängigen Experimenten. Eine Kurzbeschreibung der sechs bestätigten cDNA-Klone ist in Tabelle 5.4 gegeben.

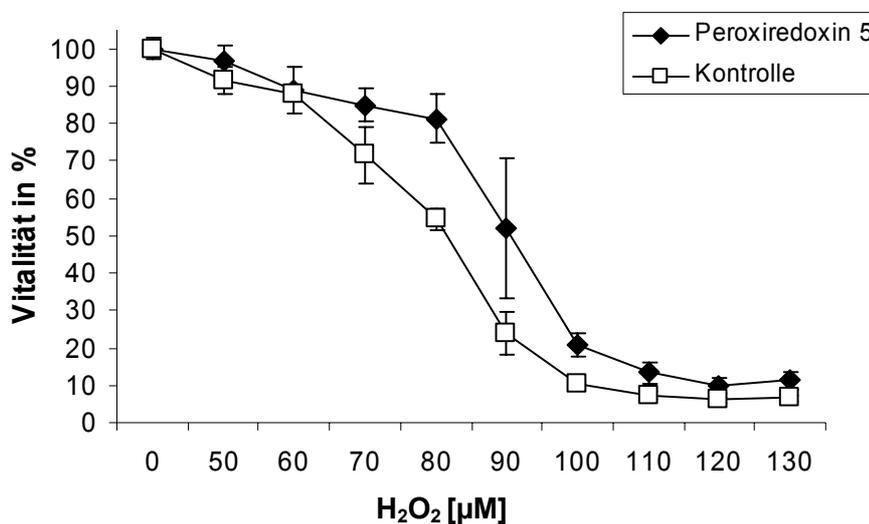
Identität	Literatur	Kurzbeschreibung
Glutathion Peroxidase 1 (Gpx1)	De Haan et al. 2003 Ishibashi et al. 2002 Gouaze et al. 2002	Katalysiert die Oxidation von Glutathion; antioxidatives und antiapoptotisches Enzym; beteiligt an Entzündungsreaktionen
Katalase (Kat)	Irshad et al. 2002	Katalysiert Wasserstoffperoxid zu Wasser; antioxidatives Enzym
Peroxiredoxin 1 (Prdx1)	Kim et al. 2001 Geiben-Lynn et al. 2003	Antioxidatives Enzym; beteiligt an der antiviralen Aktivierung von CD8 (+) T-Zellen
Peroxiredoxin 5 (Prdx5)	Knoops et al. 1999 Zhou et al. 2000	Thioredoxin Peroxidase; beteiligt an der intrazellulären Redox Signalübertragung; antioxidatives und antiapoptotisches Enzym
Nuclear factor erythroid derived 2-like 2 (Nfe2l2 oder Nrf2)	Chan et al. 2001 Chan et al. 1999 Alam et al. 1999 Moinova et al. 1999 Wild et al. 1999	Transkriptionsfaktor; reguliert die Aktivierung detoxifizierender Gene; beteiligt an der Synthese von Glutathion
Glutamine-Fructose-6-phosphate Transaminase-2 (Gfat2)	DeHaven et al. 2001 Yamazaki et al. 2000	Enzym für die Biosynthese von Hexosaminen; beteiligt am Mechanismus der Glukose-Toxizität und der Insulinresistenz; hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert

Tabelle 5.4 Charakterisierung der evaluierten Hits.

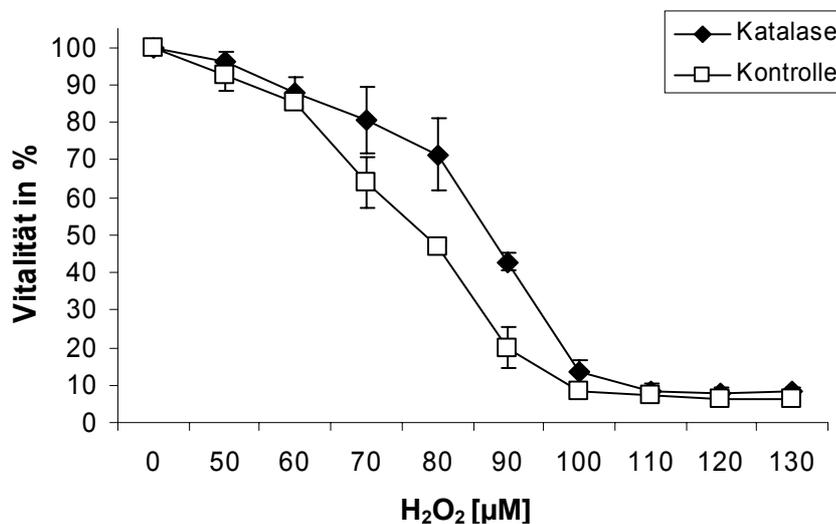
5.2.1 Charakterisierung der Gene mit bekannten Detoxifizierungseigenschaften

Vier der sechs identifizierten cDNAs waren bekannte direkt detoxifizierende Gene. Zu ihnen gehörten die Katalase, die Glutathion Peroxidase-1 sowie Peroxiredoxin-1 und -5.

Jede Screeningrunde wurde mit nur einer H_2O_2 Konzentration durchgeführt. Auch wurde jeder cDNA-Klon pro Screeningrunde in nur einem Well untersucht. Zur genaueren Definition der Stärke der Protektion wurden zu jedem Hit Dosis-Wirkungskurven erhoben. Bei allen konnte eine Verschiebung des EC 50-Wertes beobachtet werden. Die geringsten Verschiebungen wurden bei Transfektionen mit Peroxiredoxin-5 und der Katalase detektiert (Abb. 5.16A A-B). Die größten Verschiebungen im EC 50-Wert wurden bei Peroxiredoxin-1 und der Glutathion Peroxidase-1 festgestellt (Abb. 5.16A C-D). Beide zeigten auch die stärkste Protektion bei Konzentrationen über $100 \mu M H_2O_2$.



A



B

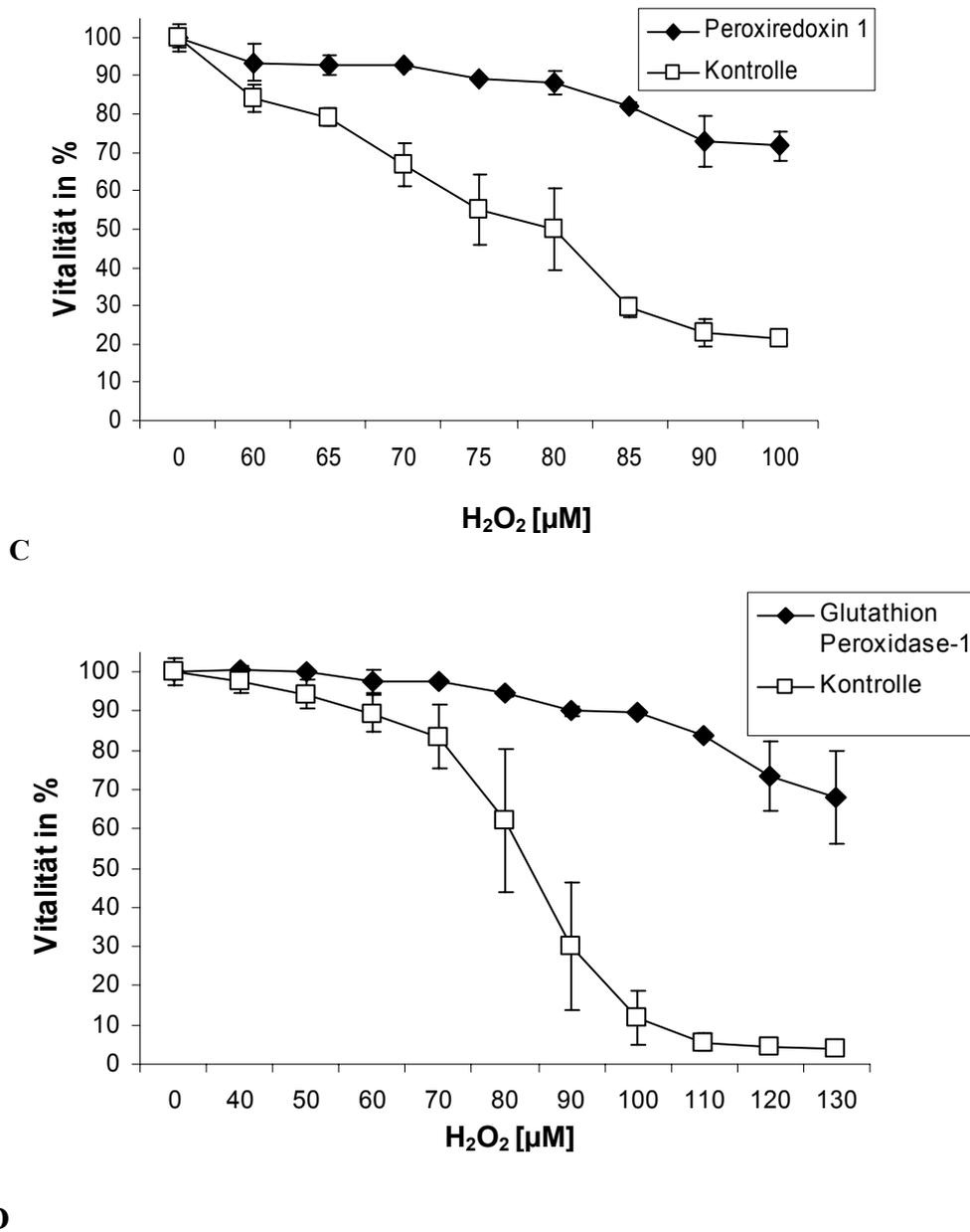


Abb. 5.16A A-D Nachtestung der bestätigten Protektoren: Peroxiredoxin-5, Katalase, Peroxiredoxin-1 und Glutathion Peroxidase-1. Jedem Datenpunkt liegt eine 4-fach-Bestimmung zugrunde. Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. (A $p < 0.005$; B, C, D, $p < 0.001$ TWO-WAY ANOVA)

Alle vier beschriebenen Gene sind bekannte antioxidativ wirkende Enzyme (Tabelle 5.4), die direkt an der Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffmoleküle beteiligt waren. Das Auftreten dieser Gene war eine Bestätigung der Funktionalität des verwendeten Screening-Systems.

5.2.2 Charakterisierung der noch nicht oder nur indirekt für die Modulation von oxidativem Stress beschriebenen Gene.

Ein anderer in beiden Screening-Runden aufgetretener, und manuell bestätigter Hit war Nfe2l2 oder Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) (Abb. 5.16B A). Im Gegensatz zu den direkt-antioxidativ wirkenden Enzymen handelt es sich hier um einen Transkriptionsfaktor (Tabelle 5.4). Es wurde gezeigt, dass Nrf2 die Transkription detoxifizierender Enzyme wie z.B. der Glutathion S-Transferase reguliert (Huang et al. 2000; Rushmore et al. 1990). Diese positive Regulation sorgt für Protektion gegen oxidativen Stress und andere Toxine. Ein weiteres im Screen identifiziertes und bisher noch nicht in der Regulation von oxidativem Stress bekanntes Gen war die Glutamine-Fruktose-6-Phosphat Amidotransferase-2 (gfpt2 oder gfat2).

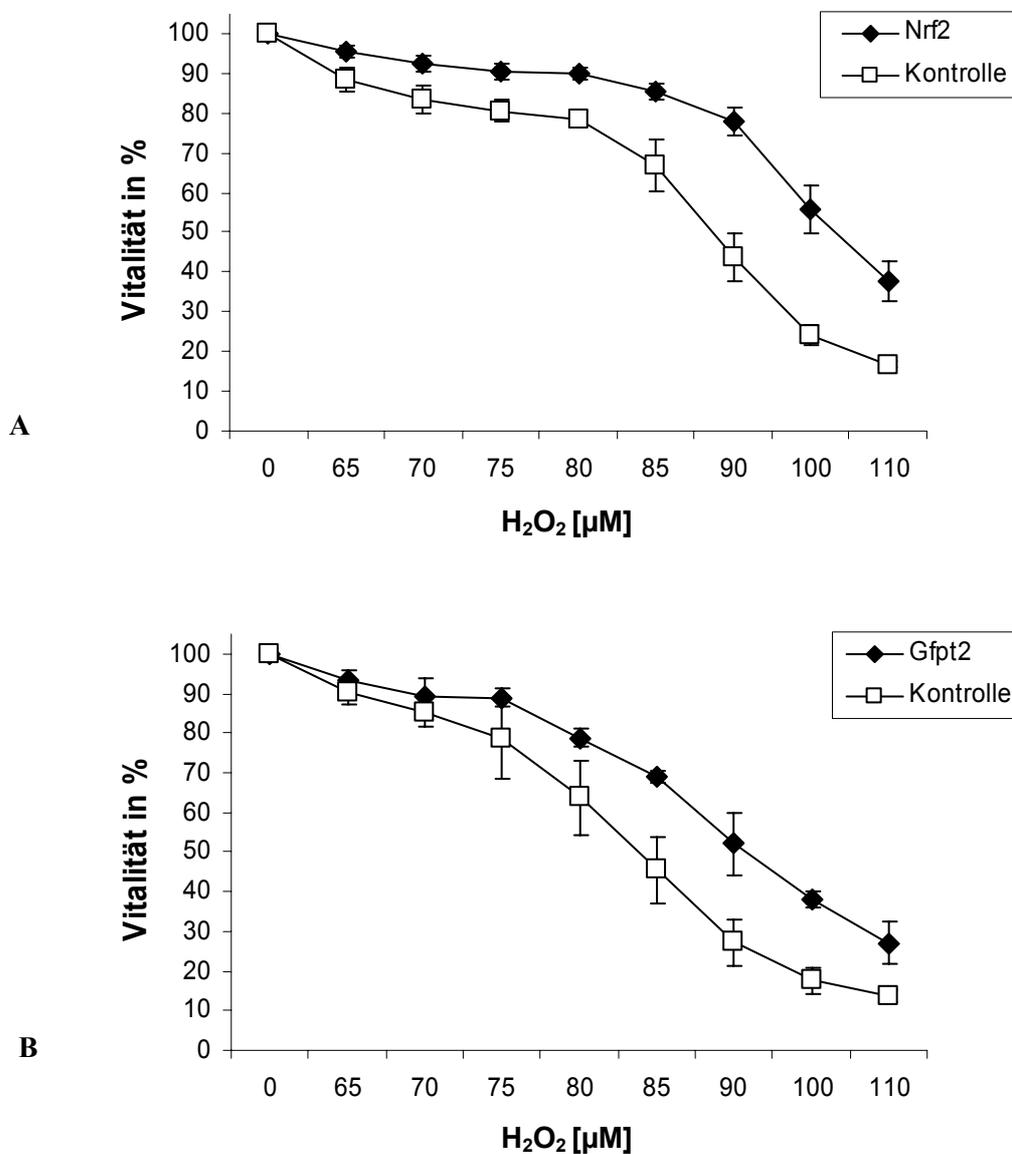


Abb. 5.16B A-B Nachtestung der bestätigten Protektoren: Nrf2 und Gfat2.

Jedem Datenpunkt liegt eine 4-fach Bestimmung zugrunde. Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt ($p < 0.001$ TWO-WAY ANOVA).

Gfat2 zeigte sowohl in beiden Screening-Runden als auch in der manuellen Nachtestung eine signifikante Protektion gegenüber der Kontroll-Transfektion (Abb. 5.16B B). Gfat2 ist das Kinetik bestimmende Enzym im Syntheseweg der Hexosamine (DeHaven et al. 2001; Yamazaki et al. 2000). Einen möglichen mechanistischen Anhaltspunkt für die schützenden Eigenschaften von Gfat2 könnte eine Induktion von NF κ B darstellen (James et al. 2002). Um dies zu untersuchen, wurde mit Hilfe eines Plasmidkonstruktes, welches sechs NF κ B-Bindestellen vor einem Herpes Simplex Thymidin Kinase Gen- (tk) Promotor und einem Luziferase-Gen geschaltet hatte, die Induktion von NF κ B nach Transfektion mit Gfat2 getestet. Parallel zu Gfat2 wurde auch ein Kontroll-Plasmid transfiziert. Wie aus Abbildung 5.16C zu erkennen konnte nach Transfektion mit Gfat2 eine um 30 % gesteigerte Induktion von NF κ B im Vergleich zur Kontroll-Transfektion nachgewiesen werden.

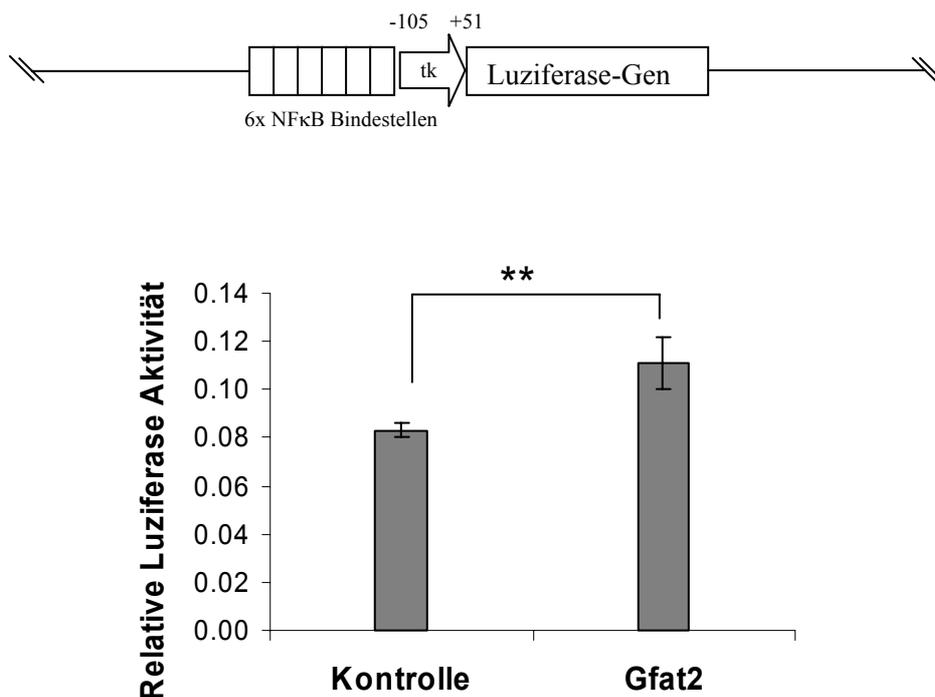


Abb. 5.16C NF κ B-Reporterkonstrukt und NF κ B-Aktivität in HT-22 Zellen.

Zellen wurden mit 230 ng /Well DNA im Verhältnis: 75 % Gfat2 oder Kontrolle, 15 % NF κ B-Reporterkonstrukt und 10 % Kontroll-Transfektionsplasmid transfiziert. Die Luziferaseaktivität des Reporterkonstrukts und der Kontroll-Transfektion wurde 41 h nach Transfektion erhoben. Dargestellt ist der Quotient aus Reportersignal zur Transfektionseffizienz. Jeder Balken repräsentiert 6 Messpunkte. Das Ergebnis war repräsentativ für drei unabhängige Experimente (** $p < 0.01$; Student's t-Test).

5.3 Glutamat- und H₂O₂-resistente Zelllinien

In einem parallelen Ansatz wurden Subklone der hippocampalen Maus HT-22 Zelllinie selektiert, die Resistenzen gegen Glutamat und Wasserstoffperoxid aufwiesen. Vergleiche von Gen-Expressionsprofilen der resistenten, gegenüber Expressionsprofilen von nicht resistenten Zellen wurden analysiert, um Anhaltspunkte zu finden, welche Gene in der Vermittlung von oxidativer Resistenz involviert sein könnten. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob transiente Überexpression einzelner verstärkt exprimierender Gene der resistenten Zellen in den sensitiven parentalen Zellen alleine eine signifikante Protektion auf einen oxidativen Stress vermitteln konnte. Das Expressionsprofil der resistenten Klone (Glu-res bzw. H₂O₂-res) sowie das der parentalen nicht resistenten Zellen (HT-22-N) wurde mit Hilfe von Affymetrix Chip-Analysen erstellt.

5.3.1 Charakterisierung der generierten Zelllinien

HT-22 Zellen sind adhärent wachsende Zellen, welche unter dem Lichtmikroskop einen gut erkennbaren Zellkörper und Zellkern besitzen (Abb. 5.17 A). Die Glut-res als auch die H₂O₂-res Klone besitzen im Vergleich hierzu einen vergrößerten Zellkörper. Die Struktur des Zellkörpers scheint zerklüfteter und weist eine größere Anzahl Dendrit ähnlicher Fortsätze auf (Abb. 5.17 B und C). Zusätzlich erschien die Morphologie des Zellkerns verändert, er war vergrößert und einige Zellen waren binukleär bzw. polynukleär. (Abb. 5.17 B schwarze Pfeile)

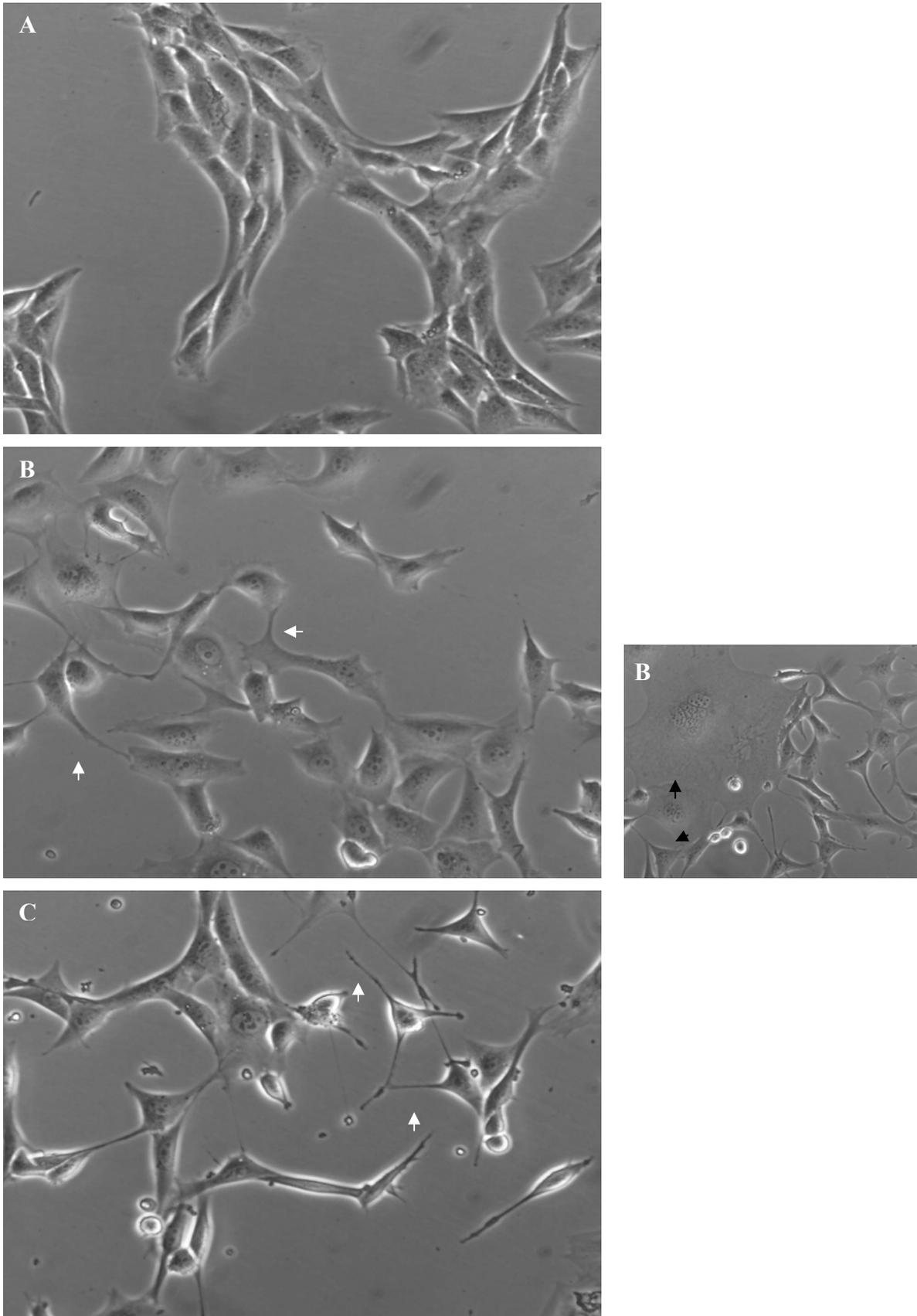


Abb. 5.17 Phasenkontrastaufnahmen von HT-22 Zellen. A) nicht resistente HT-22 Zellen (HT-22-N), B) Glutamat resistente Zellen (Glut-res) bei 15mM Glutamat und C) Wasserstoffperoxid resistente Zellen (H_2O_2 -res) bei $18\mu M H_2O_2$. Vergrößerungsfaktor x 200. Sowohl H_2O_2 -res als auch Glut-res-Zellen zeigten vergrößerte, teils binukleäre bzw. polynukleäre Zellkerne (schwarze Pfeile). Weiße Pfeile markieren Dendrit ähnliche Fortsätze in den resistenten Zelllinien.

Das Wachstumsverhalten der resistenten und nicht resistenten Zellen zeigte deutliche Unterschiede. H₂O₂-res- und die Glut-res-Zellen wiesen unter Selektionsdruck ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu HT-22-N Zellen auf (Abb. 5.18). Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde sowohl mit AlamarBlue als auch durch Zellzahlzählungen ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass das Verhältnis der Fluoreszenzsignale gleich dem Verhältnis der realen Zellzahlen war und eine Signalerhöhung auch tatsächlich mit einer Erhöhung der Zellzahl einherging. Das nach 96 h abfallende Signal bei HT-22 N Zellen war auf die für 96-Well MTP zu hohe Zellzahl zurückzuführen. Die Zellen bildeten einen Zellrasen, der sich von Untergrund ablöste.

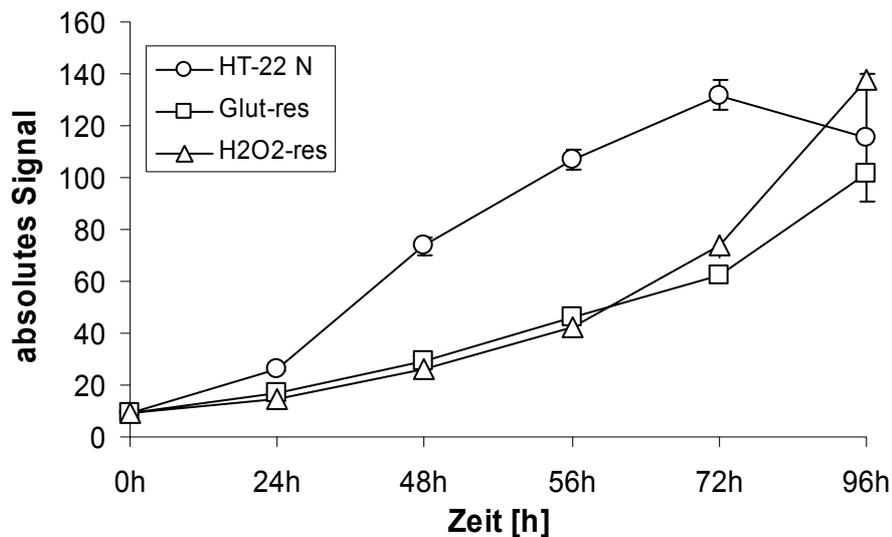


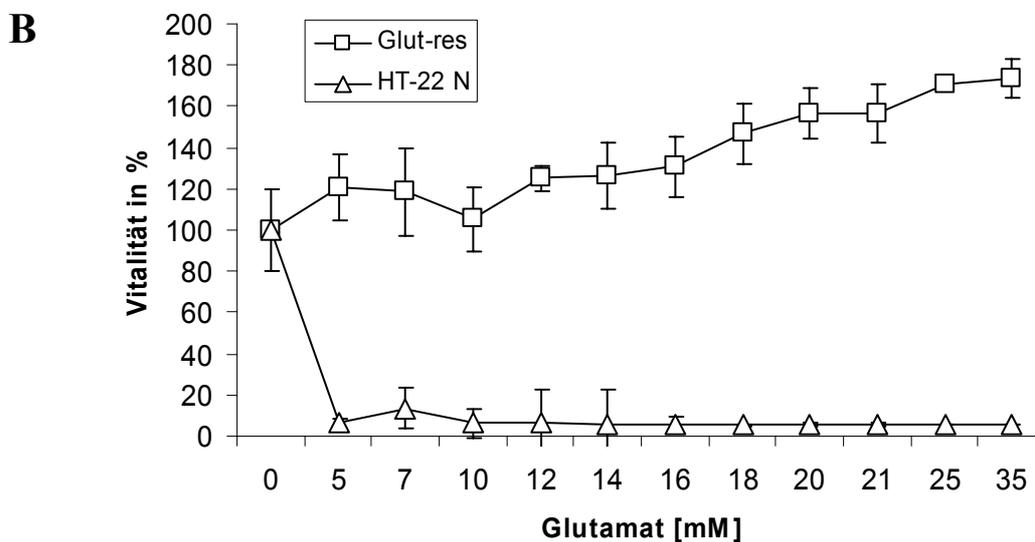
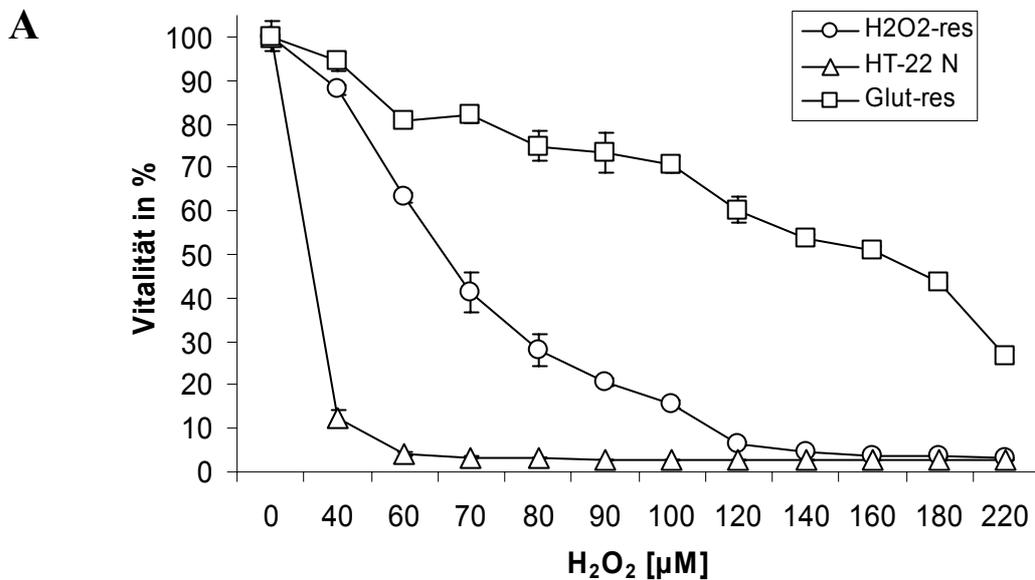
Abb. 5.18 Wachstumskurven der resistenten und nicht resistenten HT-22 Zellen.

Die Wachstumsrate wurde mit AlamarBlue ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung aus vier unabhängigen Messpunkten.

Resistente HT-22 Klone wurden durch Langzeitbehandlung mit Wasserstoffperoxid bzw. Natriumglutamat etabliert (s. Abschnitt 4.2.1.4 und 4.2.1.5). Um die Toleranz der so entstandenen Zelllinien gegenüber den oxidativen Stressoren zu testen, wurden Toxizitätstests durchgeführt.

Die H₂O₂-res-Zellen zeigten erwartungsgemäß eine deutlich höhere Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid als die nicht resistenten Zellen (Abb. 5.19). Ebenso erwiesen sich Glut-res-Zellen deutlich toleranter auf einen Glutamat Stress als nicht resistente Zellen (Abb. 5.19 B). Beide resistente Zelllinien zeigten zudem eine erhöhte Kreuzresistenz. So waren Glut-res-Zellen auch gegen Wasserstoffperoxid und H₂O₂-res-Zellen auch gegen Glutamat resistent (Abb. 5.19 A und C). Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse von Dargusch und Schäfer (Dargusch & Schubert 2002; Schäfer et al. 2004) und deutete darauf hin, dass oxidativer Zelltod, obwohl durch unterschiedliche toxische Substanzen ausgelöst, über gemeinsame Signalwege ablaufen könnte. Die Glut-res-Zellen besaßen sogar eine höhere Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid als H₂O₂-res-Zellen. Um auszuschließen, dass beide resistenten Zelllinien eine generelle, nicht-selektive Resistenz gegenüber einer Vielzahl von

toxischen Substanzen entwickelt hatten, wurde die Sensibilität der Zellen auf einen nicht oxidativen Stimulus untersucht. Stimulation mit Staurosporin, einem Reagenz, das Apoptose induzierte, tötete alle getesteten Zellen gleichmäßig ab. H₂O₂-res und Glut-res-Zellen wiesen somit eine selektive Resistenz gegenüber oxidativen Stressoren auf, da sie sich gegenüber anderen Toxinen wie die parentalen HT-22 N verhielten.



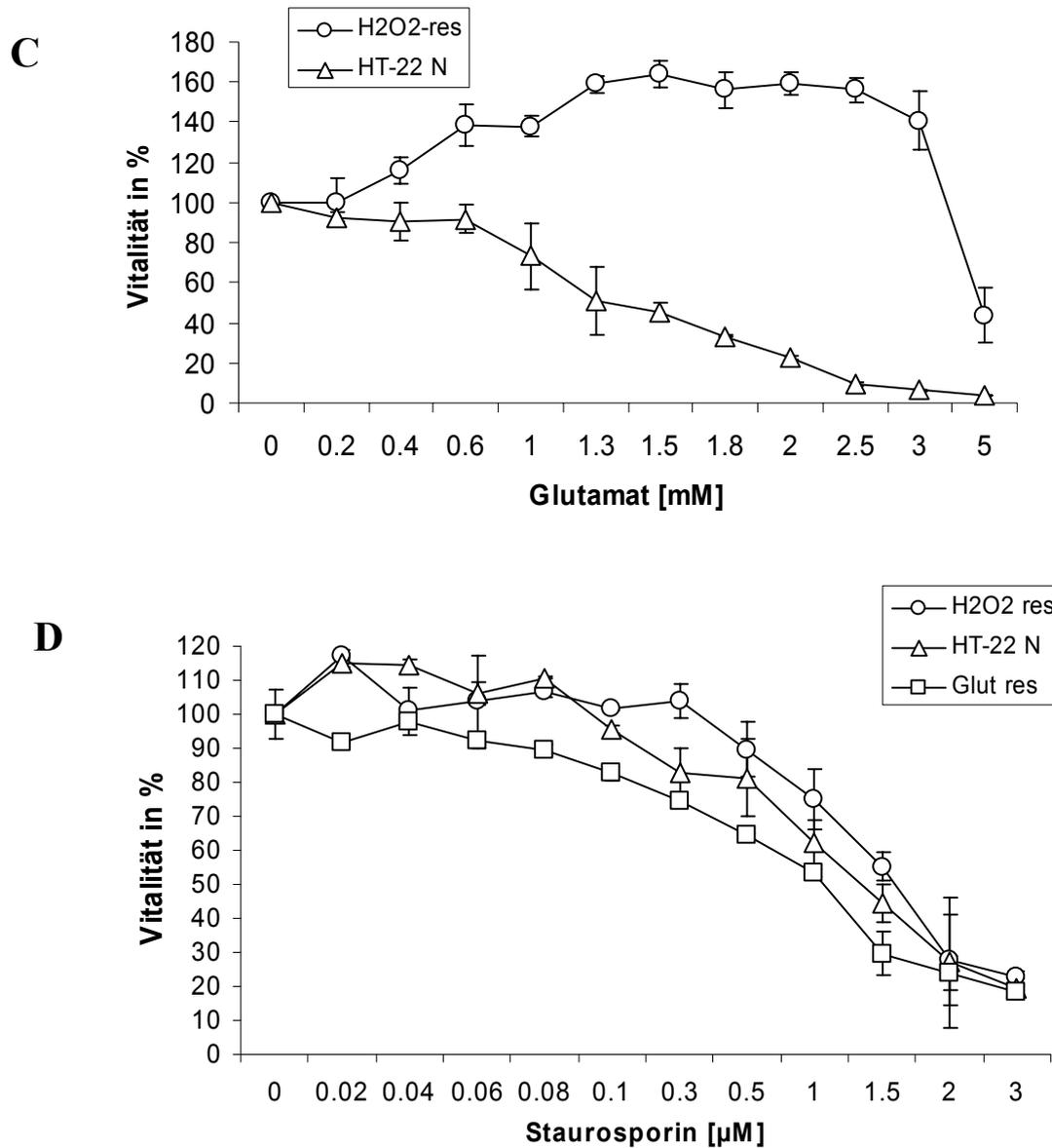


Abb. 5.19 Toxizitätstests mit den drei Modellzellklonen HT-22 N, Glut-res und H₂O₂-res. Getestet wurde das Verhalten auf einen A) H₂O₂ Stimulus und B+C) auf einen Glutamat-Stimulus und D) auf einen Staurosporin Stimulus. Der Nullwert der unbehandelten Zellen wurde mit einer Überlebensrate von 100 % gleichgesetzt. H₂O₂-res-Zellen wiesen für alle getesteten H₂O₂ Konzentrationen bis 120 µM eine höhere Resistenz auf als HT-22 N (Abb. A; $p < 0.001$; TWO-WAY ANOVA). Daneben zeigen H₂O₂-res-Zellen auch eine Toleranz gegenüber Glutamat (Abb. C $p < 0.001$; TWO-WAY ANOVA). Die Glut-res-Zellen zeigten für alle getesteten Glutamatkonzentrationen eine erhöhte Resistenz in Vergleich zu den HT-22 N Zellen (Abb. B; $p < 0.001$; TWO-WAY ANOVA). Zusätzlich besaßen Glut-res-Zellen eine starke Toleranz gegen Wasserstoffperoxid (Abb. A; $p < 0.001$; TWO-WAY ANOVA). Die H₂O₂ Toleranz der Glut-res-Zellen überstieg sogar die der H₂O₂-res-Zellen.

5.4 Expressionsanalysen

5.4.1 Expressionsanalysen der resistenten Zelllinien

Zur Expressionsanalyse wurden Analysechips der Firma Affymetrix verwendet. Diese deckten Sequenzen von 6000 verschiedenen Maus-Genen und 6000 verschiedenen ESTs ab, wobei jede Sequenz durch zwei Sets von 16-20 Oligonukleotide repräsentiert war (siehe 4.2.5.4). Die Chips wurden mit markierter cRNA aus Glut-res Zellen, H₂O₂-res-Zellen und HT-22 N Zellen hybridisiert. Aus Kontrollgründen wurden zwei Chips mit HT-22 N verwendet.

	Messbar	Erhöht	Vermindert	Unverändert
Glut-res - HT-22 N (1)	6137	827	730	4521
H ₂ O ₂ -res - HT-22 N (1)	6121	798	1075	4173
Glut-res - HT-22 N (2)	6135	832	612	4642
H ₂ O ₂ -res - HT-22 N (2)	6120	1060	1099	3899
HT-22 N (1)- HT-22 N (2)	6292	130	59	5812
H ₂ O ₂ -res - Glut-res	6120	692	1019	4348
Glut-res - HT-22 N (1)+(2)		531	485	
H ₂ O ₂ -res - HT-22 N (1)+(2)		695	850	
Glut-res +H ₂ O ₂ -res - HT-22 N (1)+(2)		186	194	

Tabelle 5.6 Statistische Auswertung der vier Chip-Experimente.

Analysiert wurden die Expressionsmuster Glut-res-Zellen und H₂O₂-res-Zellen im Vergleich zu beiden Kontrollen HT-22 N(1)+(2). Zusätzlich wurden beide Kontrollen HT-22 N(1)+(2) und beide resistenten Klone untereinander verglichen. „schwach anwesende“ Detektionen sind in der Anzahl der „Anwesenden = Messbaren“ enthalten. Nicht angezeigt sind die jeweils „schwach erhöhten“ und die „schwach verminderten“ Detektionen (siehe 4.2.5.4). Nur die messbaren Sequenzen wurden bezüglich ihres Expressions-Status genauer analysiert. Der Anteil der nicht messbaren bzw. nicht auswertbaren Sequenzen betrug ca. 50 %.

Die statistischen Auswertungen erfolgten nach dem einseitigen Wilcoxon's-Test (Statistical Algorithms Referende Guide, Affymetrix) und nach der 'Biweight'-Methode von Tuckey (Statistical Algorithms Reference Guide, Affymetrix). Die Auswertung der vier Chip-Experimente ist in Tabelle 5.6 zusammengefasst. Bei den Analysen der resistenten Klone gegenüber den Kontroll-Zellen zeigte sich, dass generell 50 % aller auf dem Chip befindlichen Sequenzen nicht signifikant detektiert werden konnten und in der Bewertung mit „abwesend“ bewertet wurden. Die restlichen 50 % konnten

bezüglich ihres Expressionsstatus genauer analysiert werden. Grundlage für weitere Analysen war der Vergleich zwischen den beiden Kontrollen: HT-22 N (1) und HT-22 N (2). Da es sich hier um zwei Klone der gleichen Kontrollgruppe handelte, waren die Analysen für die Aussagekraft der anderen Expressionsvergleiche maßgebend. Lediglich 3 % der Gene wurden mit verändertem Status detektiert. 5812 Gene bzw. ESTs wurden als „unverändert“ bestimmt. Die Reproduzierbarkeit zwischen zwei Chips bzw. zwischen beiden Proben lag bei 97 %. Insgesamt waren in den Glut-res-Zellen 531 Gene in ihrem Expressionsmuster gegenüber beiden nicht resistenten Kontrollen signifikant erhöht ($p < 0,0025$; Wilcoxon's-Test). In den H2O2-res-Zellen zeigten 695 Gene einen signifikant erhöhten Grad an Expression im Vergleich zu beiden Kontrollen ($p < 0,0025$; Wilcoxon's-Test). Geht man davon aus, dass es gemeinsame Signalwege auf verschiedene oxidative Toxine gibt (vgl. Abb. 5.19), ist auch noch die gemeinsame Schnittmenge zwischen beiden resistenten Zelllinien und beiden Kontrollen interessant. 80 bekannte Gene und 106 unbekannte Sequenzen waren in beiden resistenten Zelllinien gegenüber beiden Kontrolllinien im Grad der Expression signifikant erhöht ($p < 0,0025$; Wilcoxon's-Test) (Tabelle 5.7)

Affymetrix Identifikation	Übexpression. Faktor 2 ^x	SD	Genbank Identifizierung
102818_at	2.2	0.4	X72697 M.musculus XMR
95584_at	2.2	1.0	AA794108: Mus musculus cDNA
98772_at	2.1	0.2	U27267: Small inducible cytokine B subfamily, member 5
102255_at	2.0	0.6	AB015978: Oncostatin receptor
94761_at	1.9	0.1	X70058: Small inducible cytokine A7
102736_at	1.8	0.0	M19681: Small inducible cytokine A2
161511_f_at	1.7	0.5	AV152244: Mus musculus cDNA
92542_at	1.7	0.3	AI849035: Mus musculus cDNA
95348_at	1.6	0.3	J04596: GRO1 oncogene
95349_g_at	1.6	0.1	J04596: GRO1 oncogene
103545_at	1.5	0.1	AA240695: Mus musculus cDNA
93100_at	1.5	0.3	X13297: Mouse mRNA for vascular smooth muscle alpha-actin
160799_at	1.5	0.2	AW060549: Mus musculus cDNA
95177_at	1.5	0.2	AA414993: Mus musculus cDNA
104195_at	1.5	0.3	AA939440: Mus musculus cDNA
98472_at	1.4	0.5	Y00629: Histocompatibility 2, T region locus 23
101936_at	1.4	0.4	AF033566: Mus musculus cdc2/CDC28-like protein kinase 4 (Cdk4) mRNA
100680_at	1.4	0.5	U41636: Deubiquitinating enzyme 1
102048_at	1.4	0.1	AF041847: Mus musculus cardiac ankyrin repeat protein MCARP mRNA
94395_at	1.4	0.3	AI194254: Mus musculus cDNA
161173_f_at	1.3	0.1	AV229143: Mus musculus cDNA
161997_f_at	1.3	0.1	AV329607: Mus musculus cDNA
102298_at	1.3	0.1	M17298: Nerve growth factor, beta
94774_at	1.3	0.2	M31418: Interferon activated gene 202
102091_f_at	1.3	0.5	AA407599: Mus musculus cDNA
97844_at	1.3	0.4	U67187: Mus musculus G protein signaling regulator RGS2 (rgs2) mRNA
99134_at	1.2	0.3	U21673: T-complex-associated testis expressed 3
103562_f_at	1.2	0.3	M26005: Mouse endogenous retrovirus truncated gag protein, complete cds
160620_at	1.2	0.5	U83174: Gene trap ROSA 26

94476_at	1.2	0.1	AA672926: Mus musculus cDNA
97996_at	1.2	0.3	U58134: Mus musculus poly(A) polymerase VI mRNA, complete cds
96302_at	1.2	0.3	AA711516: Mus musculus cDNA
98822_at	1.2	0.2	X56602: Mus musculus mRNA Interferon-induced 15-KDa protein
93118_at	1.1	0.1	AI844131: Mus musculus cDNA
95655_at	1.1	0.1	AA717740: Mus musculus cDNA
160227_s_at	1.1	0.3	AI132491: Mus musculus cDNA
101883_s_at	1.1	0.2	L22977: Mouse A12 mRNA, complete cds
102053_at	1.1	0.1	AF015790: Mus musculus □raline□ipids scramblase mRNA, complete cds
102292_at	1.1	0.3	U00937: Mus musculus GADD45 protein (gadd45) gene, complete cds
98465_f_at	1.1	0.2	M31419: Interferon activated gene 204
95121_at	1.0	0.1	AW060791: Mus musculus cDNA
98110_at	1.0	0.4	AI853375: Mus musculus cDNA
104089_at	1.0	0.1	AW045664: Mus musculus cDNA
160633_at	1.0	0.6	U89876: Mus musculus transcriptional coactivator ALY (ALY) mRNA)
161666_f_at	1.0	0.1	AV138783: Mus musculus cDNA
97154_f_at	1.0	0.4	AA413015: Mus musculus cDNA
96920_at	0.9	0.1	AW125478: Mus musculus cDNA
97838_at	0.9	0.2	AA684508: Mus musculus cDNA
98761_i_at	0.9	0.1	L20450: Mus musculus DNA-binding protein mRNA, complete cds
99963_at	0.9	0.2	U07861: Zinc finger protein 101
102233_at	0.9	0.1	AI553401: Mus musculus cDNA
102905_at	0.9	0.2	Y13089: M.musculus mRNA for caspase-11
92953_at	0.9	0.2	U60969: Formin
93147_f_at	0.9	0.4	AI839880: Mus musculus cDNA
101876_s_at	0.9	0.1	M35247: Histocompatibility 2, T region locus 17
104640_f_at	0.9	0.3	AI464596: Mus musculus cDNA
160791_at	0.9	0.1	AW049254: Mus musculus cDNA
160857_at	0.9	0.3	U30244: Mus musculus Eph family ligand ELF-2 precursor mRNA
97689_at	0.9	0.4	M26071: Coagulation factor III
97885_at	0.9	0.2	AB031386: Mus musculus mRNA for Clast1, complete cds
160686_at	0.9	0.1	AI836015: Mus musculus cDNA
92806_at	0.9	0.2	AI843868: Mus musculus cDNA
93089_at	0.9	0.3	X12507: Eukaryotic translation initiation factor 4A2
95122_g_at	0.9	0.2	AW060791: Mus musculus cDNA
96189_at	0.9	0.2	AW046184: Mus musculus cDNA
99535_at	0.9	0.3	AW047630: Mus musculus cDNA
93274_at	0.8	0.3	M38381: CDC-like kinase
94239_at	0.8	0.1	Y08701: M.musculus mRNA for Pinin protein
94982_f_at	0.8	0.3	AI852470 Mus musculus cDNA
101997_at	0.8	0.3	AI851598: musculus cDNA
96686_i_at	0.8	0.5	AI853864: Mus musculus cDNA
98409_at	0.8	0.2	L00923: Mouse myosin I mRNA, complete cds
101937_s_at	0.8	0.2	AF005423: Mus musculus cdc2/CDC28-like kinase 4 (Clk4) mRNA
102761_at	0.8	0.1	AF041060: Mus musculus co-chaperone mt-GrpE#2 mRNA
101697_f_at	0.8	0.1	AI844607: Mus musculus cDNA
104000_at	0.8	0.1	AI181346: Mus musculus cDNA
104620_at	0.8	0.1	AW123402: Mus musculus cDNA
97111_at	0.8	0.2	AA290180: Mus musculus cDNA
97261_at	0.8	0.2	AF055664: Heat shock protein, DNAJ-like 2
101993_at	0.8	0.3	X56304:Tenascin
95395_at	0.8	0.1	AI225869: Mus musculus cDNA
99806_at	0.8	0.3	D78175: Natriuretic peptide receptor 3

102737_at	0.8	0.2	U35233: Endothelin 1
103043_at	0.8	0.2	Z35294: M.musculus MTCP-1 gene
160988_r_at	0.8	0.1	AA709728: Mus musculus cDNA
161076_at	0.8	0.1	AI462312: Mus musculus cDNA
95444_at	0.8	0.2	AW122274: Mus musculus cDNA
102626_r_at	0.7	0.2	AF080070: Mus musculus zinc finger protein 54 (Zfp54) mRNA
94995_at	0.7	0.2	AI854331: Mus musculus
102217_at	0.7	0.2	AI639925: Mus musculus cDNA
104149_at	0.7	0.1	AI642048: Mus musculus cDNA
93078_at	0.7	0.2	X04653: Mouse mRNA for Ly-6 alloantigen (Ly-6E.1)
97900_at	0.7	0.2	AI845714: Mus musculus cDNA
99999_at	0.7	0.2	D83033: Mouse mRNA for nuclear protein, NP220, complete cds
100892_at	0.7	0.2	AI850186: Mus musculus cDNA
103481_at	0.7	0.3	AA623379: Mus musculus cDNA
93026_at	0.7	0.2	AW124337: Mus musculus cDNA
98531_g_at	0.7	0.1	AI849615: Mus musculus cDNA
98594_at	0.7	0.1	AW125453: Mus musculus cDNA
102839_at	0.7	0.1	D78354:Mus musculus TRA1 mRNA, complete cds
104694_at	0.7	0.2	AI152353: Mus musculus cDNA
160842_at	0.7	0.1	X58472: Mouse KIN17 mRNA for kin17 protein
161856_f_at	0.7	0.2	AV059766: Mus musculus cDNA
94387_at	0.7	0.1	AF016544: Mus musculus SPAF (SPAF) mRNA, partial cds
97273_at	0.7	0.1	AI845953: Mus musculus cDNA
104639_i_at	0.7	0.3	AI464596: Mus musculus cDNA
102056_f_at	0.7	0.2	AA839379: Mus musculus cDNA
160205_f_at	0.7	0.2	AB024427: Mus musculus mRNA for Sid1669p, complete cds
101990_at	0.7	0.1	X51905: Lactate dehydrogenase 2, B chain
93772_i_at	0.7	0.1	AI835041: Mus musculus cDNA
96687_f_at	0.7	0.2	AI853864: musculus cDNA
104322_at	0.6	0.3	AI121796: Mus musculus cDNA
160076_at	0.6	0.1	AF053550: Mus musculus metaxin 2 (Mtx2) mRNA
92360_at	0.6	0.2	U43900: Signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1
92840_at	0.6	0.2	AA683712: Mus musculus cDNA
95000_g_at	0.6	0.0	AJ010338: Mus Musculus mRNA for hypothetical protein
95077_at	0.6	0.2	U12922: RAB geranylgeranyl transferase, b subunit
99149_at	0.6	0.1	AI851230: Mus musculus cDNA
100290_f_at	0.6	0.1	AI197337: Mus musculus cDNA
160151_i_at	0.6	0.1	AW122811: Mus musculus cDNA
161000_i_at	0.6	0.2	AA275196: Mus musculus cDNA
96609_at	0.6	0.2	AW122195: Mus musculus cDNA
103258_at	0.6	0.2	U19271: Mus musculus receptor DEC205 mRNA, complete cds
103840_at	0.6	0.0	AJ011923: Mus musculus mRNA for cell cycle checkpoint protein
93278_at	0.6	0.2	M91458: Sterol carrier protein 2, liver
95712_at	0.6	0.2	AW045261: musculus cDNA
99121_at	0.6	0.1	X90875: M.musculus mRNA for FXR1 protein
103497_at	0.6	0.1	AA592351: Mus musculus cDNA
104096_at	0.6	0.1	Y16386: Mus musculus mRNA for origin recognition complex subunit 4
160309_at	0.6	0.2	AW259500: Mus musculus cDNA
160768_at	0.6	0.1	AI461837: Mus musculus cDNA
161648_at	0.6	0.1	AV087550: Mus musculus cDNA
92828_at	0.6	0.1	AB004789: Mus musculus mRNA for dolichol-phosphate-mannose synthase
94466_f_at	0.6	0.1	U19891:CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP), related sequence 1
96894_at	0.6	0.2	AW122685: Mus musculus cDNA

98610_at	0.6	0.0	AW047926: Mus musculus cDNA
98922_at	0.6	0.1	L34260: Intergral membrane protein 1
100917_at	0.6	0.1	AA795841: Mus musculus cDNA
102032_at	0.6	0.3	AW060819: Mus musculus cDNA
104476_at	0.6	0.1	U27177: Retinoblastoma-like 1 (p107)
93799_at	0.6	0.0	AI845933: Mus musculus cDNA
95662_at	0.6	0.1	AW211667: Mus musculus cDNA
96649_at	0.6	0.0	AW046552: Mus musculus cDNA
98619_at	0.6	0.1	AW121709: Mus musculus cDNA
99052_at	0.6	0.2	D76432: Transcription factor 8
103913_at	0.5	0.1	AI851315: Mus musculus cDNA
104049_at	0.5	0.0	AW047134: Mus musculus cDNA
160131_at	0.5	0.0	AI854404: Mus musculus cDNA
160455_s_at	0.5	0.1	AW123786: Mus musculus cDNA
93342_at	0.5	0.1	AI852665: Mus musculus cDNA
93567_at	0.5	0.1	AW122536: Mus musculus cDNA
93967_at	0.5	0.1	AI850979: Mus musculus cDNA
95139_at	0.5	0.1	AW122075: Mus musculus cDNA
99087_at	0.5	0.1	AW060179: Mus musculus cDNA
99650_at	0.5	0.0	X90945:M.musculus mRNA for casein kinase I-alpha
102710_at	0.5	0.1	AF020313:Mus musculus □raline-rich protein 48 mRNA, partial cds
160136_r_at	0.5	0.2	AI120170: Mus musculus cDNA
160501_at	0.5	0.1	Y09632:Mus musculus mRNA for rabkinesin-6
99108_s_at	0.5	0.1	U15012:Growth hormone receptor
102047_at	0.5	0.1	AF043326:Mus musculus N-myristoyltransferase 1 mRNA, complete cds
102781_at	0.5	0.1	U37351:Mus musculus Paneth cell enhanced expression PCEE mRNA
92794_f_at	0.5	0.0	M35970:Mouse tumor metastatic process-associated protein (NM23) gene mRNA
93306_at	0.5	0.1	U51196:Mus musculus APC-binding protein EB1 homolog mRNA, complete cds
93971_f_at	0.5	0.1	AI838669: Mus musculus cDNA
99164_at	0.5	0.2	AI844560: Mus musculus cDNA
99603_g_at	0.5	0.1	AF064088:Mus musculus transcription factor GIF mRNA, complete cds
98111_at	0.5	0.1	L40406:Heat shock protein, 105 kDa
98509_at	0.5	0.2	AI834979: Mus musculus cDNA
103441_at	0.5	0.1	AI194248: Mus musculus cDNA
103753_at	0.5	0.1	AI159572: Mus musculus cDNA
160153_at	0.5	0.1	AI835917: Mus musculus cDNA
160875_at	0.5	0.1	AF090314:Mus musculus proteasome beta-subunit C5 (Psmb1) mRNA, partial cds
101490_at	0.5	0.2	AW122692: Mus musculus cDNA
95010_at	0.5	0.2	U21050:Tnf receptor-associated factor 3
160749_at	0.4	0.1	AI846812: Mus musculus cDNA
92567_at	0.4	0.2	L02918:Mouse procollagen type V alpha 2 (Col5a-2) mRNA, complete cds
94980_at	0.4	0.1	AI006319: Mus musculus cDNA
104052_at	0.4	0.1	AI840921: Mus musculus cDNA
96616_at	0.4	0.1	AI891629: x1 Mus musculus cDNA
104163_at	0.4	0.1	AA711002: Mus musculus cDNA
96647_at	0.4	0.1	AA645440: Mus musculus cDNA
99162_at	0.4	0.1	AW122398: Mus musculus cDNA
99574_at	0.4	0.1	AI850887: Mus musculus cDNA
101519_at	0.4	0.2	M29264:Mouse signal recognition particle subunit (SRP14) mRNA, complete

103821_at	0.4	0.1	AJ223087: Mus musculus mRNA for Cdc6-related protein
97824_at	0.3	0.1	AW121031: Mus musculus cDNA

Tabelle 5.7. Liste aller Gene bzw. ESTs, die in beiden resistenten Zelllinien (H₂O₂-res und Glut-res) gegenüber beiden Kontrollen (HT-22 N (1) und (2)) eine signifikante Erhöhung im Expressionsspiegel aufwiesen. Dargestellt sind der gemittelte Grad der Überexpression sowie die Standardabweichung (SD) der vier Einzelvergleiche.

Neben Serin-Protease Inhibitoren, die vor allem in Glut-res-Zellen heraufreguliert waren, zeigten in beiden resistenten Zelllinien mehrere Mitglieder der Cytokine und Kinasen einen erhöhten Expressionsspiegel, des weiteren fallen Wachstumsfaktoren, Hitzeschockproteine, Transkriptionsfaktoren und auch mehrere durch Interferon induzierte Gene auf. Getestet wurde, ob transiente Überexpression einzelner Gene in den parental sensitiven Zellen eine signifikante Protektion nach einer Stimulation mit Wasserstoffperoxid vermitteln konnte. Hierzu wurden 25 cDNAs ausgewählt (Tabelle 5.8), die entweder in einer resistenten Zelllinie oder in beiden resistenten Zelllinien gleichzeitig einen erhöhten Grad an Expression aufwiesen. Ausschlaggebend für die Wahl der 25 cDNAs waren eine beschriebene Gensequenz sowie der Grad der Expression. Funktionell getestet wurden deshalb nur diejenigen bekannten Gene, die mindestens um den Faktor 2,4 hoch reguliert wurden. Die Liste der hoch regulierten cDNAs der Glutamat- bzw. H₂O₂- resistenten Zellen beinhalteten jedoch auch Gene, die für jede Zelllinie spezifisch waren. Um auch hier eine Auswahl von Genen nach ihrer Funktionalität hin zu untersuchen, wurde eine Stichprobe von Genen ausgewählt, die mindestens um den Faktor 3 im Vergleich zu den Kontrollzellen hoch reguliert war.

Affymetrix Identifikation		Überexpression Faktor 2 ^x	SD	Genbank Identifizierung
98772_at	b	2.1	0.2	U27267: Small inducible cytokine B subfamily, member 5
94761_at	b	1.9	0.1	X70058: Small inducible cytokine A7
102736_at	b	1.8	0.0	M19681: Small inducible cytokine A2
93100_at	b	1.5	0.3	X13297: Mouse mRNA for vascular smooth muscle alpha-actin
98472_at	b	1.4	0.5	Y00629: Histocompatibility 2, T region locus 23
101936_at	b	1.4	0.4	AF033566: Mus musculus cdc2/CDC28-like protein kinase 4 (Clk4) mRNA
102298_at	b	1.3	0.1	M17298: Nerve growth factor, beta
94774_at	b	1.3	0.2	M31418: Interferon activated gene 202
97844_at	b	1.3	0.4	U67187: Mus musculus G protein signaling regulator RGS2 (rgs2) mRNA
101576_f_at	g	3.9	0.3	M25529: Serine protease inhibitor 1
101574_f_at	g	3.7	0.8	M75717: Mus musculus alpha-1 protease inhibitor 5 (alpha-1 PI-5) mRNA

101572_f_at	g	3.6	0.4	M75721: Serine protease inhibitor 1-1
100329_at	g	3.3	0.6	X00945: Mouse alpha 1-protease inhibitor gene fragment (alpha 1-PI; alpha 1-antitrypsin)
102712_at	g	3.1	1.6	X03505: Serum amyloid A 3
93109_f_at	g	2.5	0.1	M75718: Serine protease inhibitor 1-4
93051_at	g	2.1	0.1	Z37107: M.musculus mRNA for epoxide hydrolase
101565_f_at	g	2.0	0.6	M75720: Serine protease inhibitor 1-3
160647_at	g	1.8	0.4	AF079834: Mus musculus stress-inducible intracellular carbonic anhydrase isozyme VI mRNA
98034_at	h	3.2	0.1	U35330: Histocompatibility 2, class II, locus Mb1
98406_at	h	2.5	0.1	AF065947: Mus musculus strain NOD/LtJ small inducible cytokine A5 (ScyA5) mRNA
100981_at	h	2.3	0.8	U43084: Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
102906_at	h	2.2	0.0	L38444: Mus musculus (clone U2) T-cell specific protein mRNA
98471_f_at	h	1.9	0.0	D49544: Mouse mRNA for KIFC1
101936_at	h	1.8	0.1	AF033566: Mus musculus cdc2/CDC28-like protein kinase 4 (Clk4) mRNA
97844_at	h	1.6	0.2	U67187: Mus musculus G protein signaling regulator RGS2 (rgs2) mRNA

Tabelle 5.8 Stichprobe von Genen, die entweder in beiden resistenten Zelllinien (b), nur in den H₂O₂-resistenten Zelllinien (h) oder nur in den Glutamat-resistenten Zelllinien (g) eine verstärkte Expression gegenüber den nicht resistenten Zelllinien aufwiesen. Der Grad der Regulation ist als $2^{\text{exp}(x)} \pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt.

Vier der 25 Gene befanden sich auch in der Liste der Gene, die im funktionellen Screen getestet wurden. Unter experimentellen Bedingungen, die denen für die Testung der Hits aus dem funktionellen Screen entsprachen (Abschnitt 5.2), zeigte keine der getesteten cDNAs einen protektiven Effekt bei mindestens zwei unterschiedlichen H₂O₂ Konzentrationen in mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.4.2 Expressionsanalyse der sechs im Screen identifizierten Hits

Auf den Affymetrix-Chips (Abschnitt 5.4) waren lediglich vier der sechs Gene vertreten, die im Screen als Hits auftraten. Für die Glutathion Peroxidase 1, Katalase und Peroxiredoxin-1 konnte kein signifikanter Expressionsunterschied in den resistenten Zelllinien gegenüber den sensitiven Zellen detektiert werden. Dagegen war Nrf2 in H₂O₂- und Glutamat-resistenten HT-22 Zellen gegenüber den Kontrollzellen um den Faktor 1,3 bis 1,4 verstärkt exprimiert. Gfpt2 waren nicht auf den Chips vertreten. Für Gfpt2 wurden deshalb Q-PCR-Daten aus den resistenten und den nicht resistenten Zelllinien erhoben.

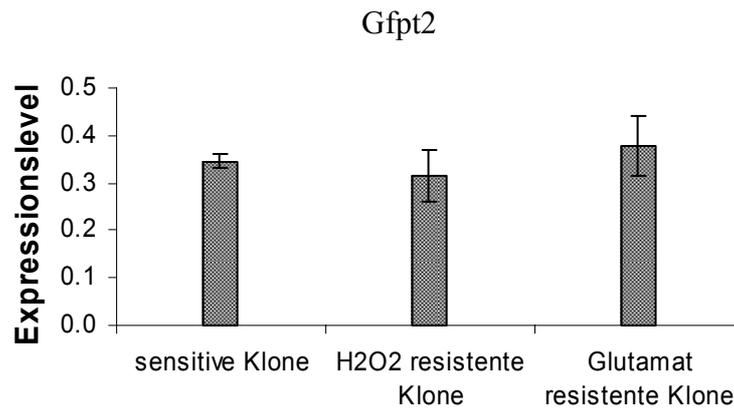


Abb. 5.20 Q-PCR Daten von Gfpt2 aus resistenten und nicht resistenten HT-22 Zellen. RNA wurde aus jeweils drei verschiedenen Klonen einer jeden Gruppe isoliert und für die Q-PCR Analyse herangezogen. Werte wurden dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Wie aus Abbildung 5.20 zu erkennen, konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression in den resistenten Zelllinien gegenüber den Kontrollen nachgewiesen werden.

5.5 Datenbankabgleich zur Identifizierung Apoptose-induzierender Genen

Resistenz auf einen oxidativen Stimulus könnte neben der verstärkten Expression von Protektoren auch durch verminderte Expression von Apoptose- bzw. Nekrose induzierenden Genen zustande kommen. Um dieses Hypothese zu untersuchen, wurden alle in gleichzeitig beiden resistenten Zelllinien vermindert exprimierenden Gene mit einer Apoptose-Datenbank verglichen. Die Datenbank umfasste humane cDNA-Expressionsplasmide, deren Transfektion in drei unabhängigen Versuchsreihen in HEK 293 Zellen Apoptose induzierte. Der apoptotische Phänotyp wurde dabei sowohl optisch als auch biochemisch durch den Nachweis von DNA-Fragmentierung im CDD-Test bestätigt. Da es sich bei der verwendeten Datenbank um humane Sequenzen handelte, mussten zunächst die humanen Homologen der murinen Chipsequenzen aus der Affymetrix-Datenbank extrahiert werden. Diese wurden mit einer angesetzten Stringenz von 95 % Sequenzhomologie über einen Bereich von mindestens 400 Nukleotiden mit der Apoptose-Datenbank verglichen. Der Vergleich identifizierte 7 Sequenzen. Bei der gleichen Stringenz über einen Bereich von nur 200 Nukleotiden wurden 2 zusätzliche Sequenzen gefunden. Ein Vergleich der hoch regulierten Gene beider resistenten Zelllinien mit derselben Apoptose-Datenbank lieferte lediglich ein Gen. Ausgehend von der oben beschriebenen Hypothese konnte festgestellt werden, dass wenn resistente Zellen apoptose-induzierende Gene regulieren, diese auf der Stufe der Expression vermehrt herabregulieren als heraufregulieren.

Eine kurze Charakterisierung der 9 Gene ist im Folgenden beschrieben.

Identität	Kontrolle	CDD 24 h	CDD 48 h
Repressor of estrogen receptor activity (REA)	1.0	1.6	1.4
Epithelial membrane protein 3 (EMP3)	1.0	0.9	2.6
Differentiation-dependent A4 protein (PLP2)	1.0	0.4	1.2
Solute carrier family 4, anion exchanger, member 2 (erythrocyte membrane protein band 3-like 1) (SLC4A2)	1.0	1.2	3.2
N-ethylmaleinimide-sensitive factor attachment protein, alpha (NAPA)	1.0	0.7	3.5
Seven transmembrane domain protein (NIFIE14)	1.0	3.1	4.6
Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4 (KCNN4)	1.0	1.0	1.3
BC-2 protein	1.0	1.6	1.6
SLC25A1 (mitochondrial citrate transporter)	1.0	7.0	5.7

Tabelle 5.8. Liste, der mit der Apoptose-Datenbank übereinstimmenden Gene.

Dargestellt ist der relative Grad an DNA-Fragmentierung im Vergleich zu einer Negativkontrolle, welche nach Transfektion keine DNA-Fragmentierung induziert oder phänotypische Merkmale der Apoptose ausbildet. Gezeigt ist sowohl der Wert nach 24 Stunden als auch der nach 48 Stunden.

Ein zusätzliches Apoptose induzierendes, jedoch nicht in der Apoptose.Datenbank vertretenes Gen war Bax (engl. Bcl2-associated X protein) welches in beiden resistenten Zelllinien um den Faktor 1,5 herabreguliert wurde.

Zur Bestätigung der Expressionsdaten wurde für eine Auswahl der herunterregulierten Genen die Expressionsstärke mit Hilfe der „quantitativen PCR“ (Q-PCR) bestimmt. Als Ausgangsmaterial diente RNA aus drei H₂O₂- und zwei Glutamat-resistenten Zelllinien. Der Grad der verminderten Expression im Vergleich zu den nicht resistenten Zellen ist in Tabelle 5.9 dargestellt. Für fünf der neun Gene wurden Q-PCR-Daten erstellt. Die verminderte Expression konnte dabei für vier der fünf Gene bestätigt werden.

Identität	Affymetrix Daten	
	Glut-res	H ₂ O ₂ -res
PLP-2	1,36 ± 0	1,68 ± 0
SLC4A2	1,36 ± 0,09	2,5 ± 0,17
NAPA	1,41 ± 0,19	1,68 ± 0
KCNN4	1,86 ± 0,5	2,2 ± 0,46
REA	1,3 ± 0,09	3,6 ± 0,25
EMP3	1,8 ± 0	1,4 ± 0
NIFIE14	1,86 ± 0	1,5 ± 0
BC-2	1,47 ± 0,1	1,47 ± 0,1
SLC25A1	2,0 ± 0	2,82 ± 0

Tabelle 5.9 Liste, der mit der Apoptose-Datenbank übereinstimmenden Gene und der Faktor der verminderten Expression in den Glutamat- und H₂O₂-resistenten Zellen im Vergleich zu den nicht resistenten Zellen.

REA war auf dem Affymetrix-Chip um den Faktor 1,3 in Glut-res und um den Faktor 3,6 in H₂O₂-res-Zellen herabreguliert. In Real Time Q-PCR-Experimenten konnte eine signifikant verringerte Regulation im RNA-Expressionspegel nicht bestätigt werden (Abb. 5.21).

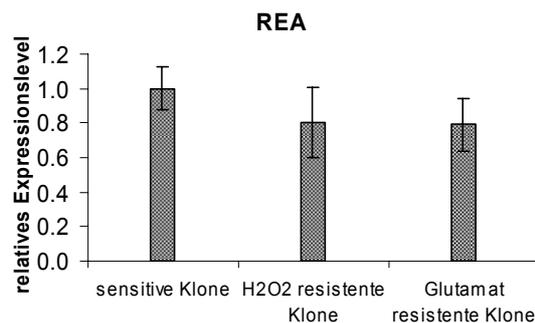


Abb. 5.21 RT-PCR mit REA.

Aufgetragen in sind der Mittelwert und die Standardabweichung der HT-22-N, der H₂O₂-res und der Glut-res Klone

EMP3 war auf dem Affymetrix-Chip um den Faktor 1,8 in Glut-res und um den Faktor 1,4 in H₂O₂-res-Zellen herabreguliert. In Real Time Q-PCR-Experimenten konnte eine signifikant verringerte Regulation im RNA Expressionsspiegel nur in den Glutamat-resistenten Zellen bestätigt werden (Abb. 5.22).

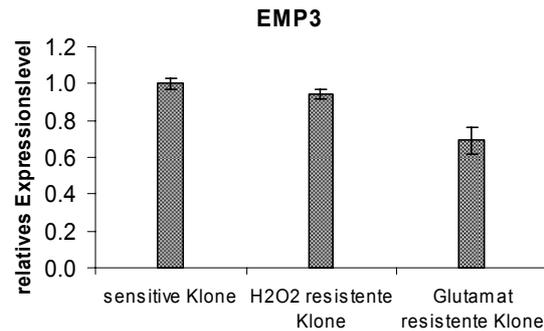


Abb. 5.22 RT-PCR mit EMP3.

Aufgetragen in sind der Mittelwert und die Standardabweichung der HT-22-N, der H₂O₂-res und der Glut-res Klone.

NIFIE14 war auf dem Affymetrix-Chip um den Faktor 1,86 in Glut-res und um den Faktor 1,5 in H₂O₂-res-Zellen herabreguliert. In Real Time Q-PCR-Experimenten konnte eine signifikant verringerte Regulation im RNA Expressionsspiegel bei Glut-res und H₂O₂-res-Zellen bestätigt werden (Abb. 5.23).

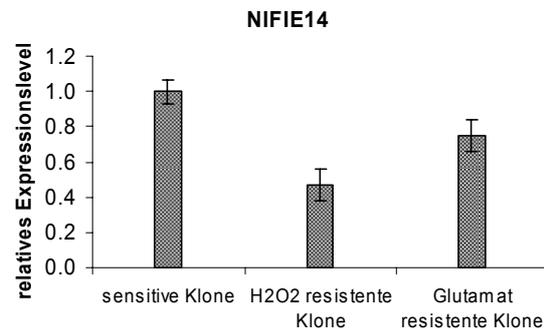


Abb. 5.23 RT-PCR mit NIFIE14.

Aufgetragen in sind der Mittelwert und die Standardabweichung der HT-22-N, der H₂O₂-res und der Glut-res Klone.

BC-2 war auf dem Affymetrix-Chip um den Faktor 1,47 in Glut-res und H₂O₂-res-Zellen herabreguliert. In Real Time Q-PCR-Experimenten konnte eine signifikant verringerte Regulation im RNA Expressionsspiegel bei Glut-res und H₂O₂-res-Zellen bestätigt werden (Abb. 5.24)

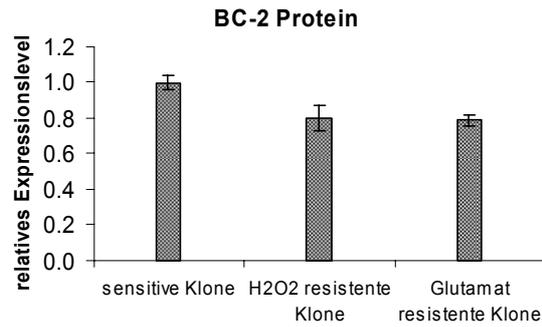


Abb. 5.24 RT-PCR mit BC-2.

Aufgetragen in A) sind der Mittelwert und die Standardabweichung der HT-22-N, der H₂O₂-res und der Glut-res Klone.

SLC25A1 war auf dem Affymetrix-Chip um den Faktor 2,0 in Glut-res und um den Faktor 2,82 in H₂O₂-res-Zellen herabreguliert. In Real Time Q-PCR-Experimenten konnte eine signifikant verringerte Regulation im RNA Expressionsspiegel bei Glut-res und H₂O₂-res-Zellen bestätigt werden (Abb. 5.25).

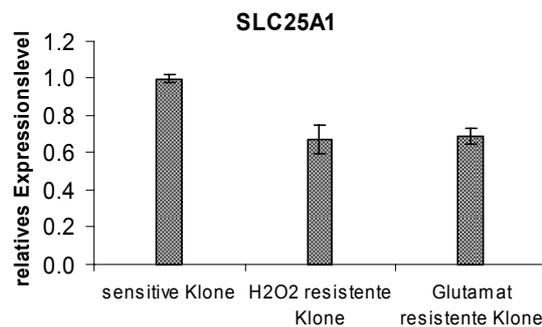


Abb. 5.25 RT-PCR mit SLC25A1.

Aufgetragen in sind der Mittelwert und die Standardabweichung der HT-22-N, der H₂O₂-res und der Glut-res Klone.

Inwieweit und zu welchem Maße diese neun Gene für die Resistenz der Zelllinien mitverantwortlich sind, müsste in z.B. RNAi-Experimenten untersucht werden.

6 Diskussion

Das verwendete Screening-System identifizierte Gene, welche neuronale HT-22 Zellen vor toxischer Stimulation mit Wasserstoffperoxid schützten. Dabei wurden sowohl bekannte antioxidative Gene gefunden, die dabei das System validierten, als auch Gene, für die bis dahin noch kein direkter Zusammenhang mit der Modulation von oxidativem Stress beschrieben war.

Durch oxidativen Stress vermittelter Verlust von neuronalen Zellen ist ein Merkmal, welches in der Entstehung und der Progression häufig vorkommender neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson auftritt (Metodiowa et al. 2000). Die hier gefundenen Gene und Signalwege könnten somit neue Ansätze für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen liefern.

6.1 Das Screening Setup

6.1.1 Zellsystem zur transienten Transfektion

Ein anerkanntes zelluläres System für die Untersuchungen von oxidativem Stress in neuronalen Zellkulturen war mit der Maus HT-22 Zelllinie gegeben. Diese ursprünglich aus dem Hippokampus gewonnene Zelllinie (Davis & Maher 1994) besitzt keine ionotropen Glutamatrezeptoren und wurden deshalb zur Untersuchung der nicht-Rezeptor vermittelten Glutamat Toxizität herangezogen (Sagara et al. 1998; Tan et al. 1998). Neben Glutamat induzieren weitere Toxine wie H_2O_2 , Amyloid beta ($A\beta$) oder NO eine konzentrationsabhängige Degeneration von HT-22 (Abb. 5.6 und 5.7) (Dargusch & Schubert 2002). Entscheidend für die Wahl als Screening-Zelllinie war neben einem ausgeprägten konzentrationsabhängigen Phänotyp als Reaktion auf einen toxischen Stimulus die Fähigkeit, Resistenzen gegenüber Glutamat, H_2O_2 oder $A\beta$ zu entwickeln. Resistente HT-22 Zellklone zeigen nicht nur eine verminderte Sensitivität gegenüber den Toxinen, gegen die sie resistent gemacht wurden, sondern auch gegenüber einer Vielzahl anderer Toxine, die oxidativen Stress auslösen können (Dargusch & Schubert 2002). Wie vermutet zeigten deshalb die für diese Arbeit generierten resistenten Zelllinien entsprechende Kreuzresistenzen (siehe Abb. 5.19). Inhibitoren wie NDGA (nordihydroguanaretic acid) oder DHPG (3,5-dihydroxyphenyl-glycine), die in einen speziellen Signalweg des programmierten Zelltodes, der Oxytose (Tan et al. 1998) eingreifen, zeigen für eine toxischen Behandlungen mit H_2O_2 Glutamat, $A\beta$, Cystin Entzug oder BSO einen protektiven Effekt (Tan et al. 2001). Stimulation der HT-22 mit zumindest diesen Toxinen initiieren überlappend Teile der Oxytose und münden somit teilweise in gemeinsamen Signaltransduktionswegen. Andere Toxine

wie Arsenit, Cisplatin oder Stickstoffmonoxid (NO), deren Wirkungsweisen unter anderem auch über die Entstehung von ROS- vermittelt werden, können durch Oxytoseinhibitoren nicht beeinflusst werden und aktivieren einen Oxytose unabhängigen Transduktionsweg. Trotzdem zeigen Glutamat resistente und H₂O₂ resistente HT-22 Klone eine geringere Sensitivität gegen Cisplatin und Arsenit (Dargusch & Schubert 2002). Diese Multi-Resistenz kann demnach nicht durch positive bzw. negative Regulation eines einzigen Signalweges zustande kommen. Diese Hypothese, dass es mehrere gemeinsame Signaltransduktionswege und Detoxifizierungsmechanismen in resistenten HT-22 Zellen gibt, war ausschlaggebend für die Expressionsanalysen, die im zweiten Teil dieser Arbeit beschrieben wurden.

Multi-Resistenz durch gemeinsame Mechanismen bedeutet im Gegenzug jedoch nicht, dass die spezifische Aktivierung einzelner Gene nicht in der Lage wäre, eine signifikante Protektion auf einen definierten toxischen Stimulus zu generieren. Eine Vielzahl von Signalwegen und Detoxifizierungsmechanismen für HT-22 Zellen wurden hierfür publiziert. Zum Beispiel schützt Aktivierung der Protein Kinase C, die durch oxidativen Stress *in vivo* verloren geht (Durkin et al. 1997), *in vitro* HT-22 Zellen vor oxidativem Stress vermittelt durch Glutamat, BSO (buthionine sulfoximine), oder HCA (homocysteic acid). Dabei aktiviert die Protein Kinase C sowohl ERK (extracellular signal regulated kinase) als auch JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) und inaktiviert p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) (Maher 2001). Gegensätzliche Experimente von Satoh und Stanciu postulieren dagegen eine Protektion von HT-22 auf einen Glutamat-Stimulus durch Inaktivierung von ERK (Satoh et al. 2000; Stanciu et al. 2000). Östrogen und Vitamin E detoxifizieren H₂O₂ und schützen dadurch HT-22 Zellen vor oxidativem Stress (Vedder et al. 2000). Protektion vermittelt die Aktivierung der Katalase als direkt detoxifizierendes Enzym sowie die Aktivierung von Enzymen, die für die Synthese von Glutathion, einem intrazellulären Antioxidanz, entscheidend sind (Schubert et al. 1995).

Das hier beschriebene Screening-System beruhte auf der transienten Überexpression einzeln isolierter cDNAs, und einen dadurch veränderten zellulären Phänotyp nach einem toxischen Stimulus. Das Zellsystem sollte nicht nur nahe an der Ätiologie des zu untersuchenden Krankheitsbildes sein, es musste auch in ausreichend großer Menge transfizierbar sein, um einen einheitlichen Phänotyp zu gewährleisten.

Mit Metafectene konnten Transfektionseffizienzen von bis zu 80 % in HT-22 Zellen erreicht werden. Die Stabilität dieses Systems war jedoch an definierte Vorkulturbedingungen und an exponentielles Wachstum der Zellen während der Transfektion gebunden. So zeigten lediglich Zellen aus einer halb konfluenten Vorkultur maximale Transfizierbarkeit (Tabelle 5.2). Steigernd auf die Effizienz wirkte sich auch die Vorbehandlung der MTP mit Poly-L-Ornithine (PLO) aus. Zusätzlich hatte dies auch positive Auswirkungen auf ein homogenes Zellwachstum während und nach der Transfektion. In Box-Plot-Diagrammen (Abb. 5.5) konnte dieser Effekt im Vergleich zu unbehandelten und mit Gelatine behandelten Platten dargestellt werden. Die Transfektionseffizienz ließ sich auf PLO Platten um bis zu 30 % steigern.

6.1.2 *In vitro* Induktion von oxidativem Stress

Die Applikation von Glutamat und Wasserstoffperoxid sind gängige *in vitro* Modelle für die Untersuchung von oxidativem Stress (Murphy et al. 1989). Eine hohe exogene Konzentration von Glutamat inaktiviert den Glutamat/ Cystin Antiporter *Xc-* in folge dessen intrazelluläres Cystin in HT-22 depletiert (Murphy et al. 1989). Cystein geht aus Cystin hervor und ist notwendig für die Proteinsynthese von Glutathion. Glutathion ist ein Tripeptide bestehend aus Glutamat, Glycin und Cystein, und repräsentiert eines der wichtigsten wasserlöslichen intrazellulären Antioxidanzien (Simonian et al. 1996). Verlust von Glutathion geht mit einem Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration einher und induziert oxidativen Stress (Simonian & Coyle 1996). Biochemisch und morphologisch zeigt eine toxische Stimulation mit Glutamat sowohl Merkmale der Apoptose als auch der Nekrose. Tan beschrieb diese Form des Zelltodes als Oxytose (Tan et al. 2001). Distinkt von der klassischen Apoptose, kommt es beim oxytotischen Zelltod weder zu einer Kondensation des Chromatins noch zu einer anschließenden Fragmentierung des Nukleus (Tan et al. 2001).

Für die Verwendung im Screen war Glutamat ungeeignet, da es keinen stabilen EC50 Konzentrationsbereich gab, bei dem ein reproduzierbarer Phänotyp im Zellkultursystem erzeugt werden konnte. Ausgehend von 2000 Zellen befanden sich 41 h nach Transfektion ca. 34.000 Zellen in jedem Well. Bei dieser Zelldichte mussten bis zu 220 mM Glutamat eingesetzt werden, um 50 % der Zellen abzutöten (Abb. 5.6), wobei dieser Wert starken Schwankungen unterzogen war. Dies lag zum Teil an der hohen Zelldichte, welche dafür sorgte, dass nicht alle Zellen gleichermaßen dem Glutamat-Stimulus ausgesetzt waren. Des Weiteren kam es bei diesen Konzentrationen zu einer Übersäuerung des Zellkulturmediums was einen zusätzlichen Faktor darstellt, der auf das Absterben Einfluss haben könnte. Unter Screening-Bedingungen erwies sich H_2O_2 als der konstantere Stimulus. Die Relevanz von H_2O_2 als Induzierer von oxidativem Stress *in vitro* und *in vivo* ist durch eine Anzahl experimenteller Befunde belegt. 41 h nach Transfektion konnte ein reproduzierbares Konzentrationsfenster (70-100 μ M) definiert werden, in dem 90 % der Zellen abstarben (Abb. 5.7). Alle Zellkulturplatten wurden unter Screening-Bedingungen mit einer definierten Konzentration von H_2O_2 stimuliert. Diese wurde so gewählt, dass ca. 80 % der Negativkontrollen bzw. der nicht protektierten Zellen abstarben (Abb. 5.11). Um eine Gleichbehandlung aller in einem Experiment verwendeten Screening-Platten zu gewährleisten, wurde die H_2O_2 Lösung für die Stimulation alle 20 Minuten erneuert, da diese bei Raumtemperatur lediglich für 20 Minuten in wässriger Lösung konstant funktionell war (Abb. 5.8). Kontroll-Transfektionen auf jeder Platte halfen konzentrationsbedingte Schwankungen zu interpretieren.

Während der Entstehung und Progression von Morbus Parkinson, einer neuronalen Krankheit, die durch den Verlust dopaminerger Neuronen charakterisiert ist, kommt es u.a. zur Induktion von oxidativem Stress durch eine erhöhte Produktion von ROS (Cohen 1994). H_2O_2 entsteht unter physiologischen Bedingungen während der Auto-Oxidation und der Deaminierung von Dopamin

(Farber et al. 1990) und kann anschließend in Fenton-Reaktionen zu Hydroxyl-Radikalen katalysiert werden. Tabner demonstrierte die direkte Entstehung von Hydroxylradikalen an α -synuclein Ablagerungen in Lewy-Körperchen mit Hilfe der Elektronen Spin Resonanz Methode (ESR) (Tabner et al. 2001). Für Fenton-Reaktionen benötigte reaktive Metallionen wie Eisen oder Kupfer (Stadtman 1990) finden sich in hohen Konzentrationen in der Substantia Nigra, der bevorzugten Gehirnregion für die Degeneration von dopaminergen Neuronen bei Morbus Parkinson (Nohl 1993). Daneben gibt es bei Morbus Parkinson Hinweise auf eine reduzierte Mitochondrienaktivität, eine erhöhte mitochondriale Superoxid-Dismutase (SOD) Aktivität und einen erhöhten Grad an Membranperoxidation (Lange et al. 1992; Metodiewa & Koska 2000). Monoamin Oxidase (Fahn et al. 1992) oder Prostaglandin-H Synthase (Hastings 1995) oxidieren Dopamin zu o-Quinon, welches anschließend spontan irreversible Aminochrome (Metodiewa & Koska 2000) bilden kann. Diese dienen als Quelle für die Entstehung von Superoxid Radikalen ($\cdot\text{O}_2^-$) und H_2O_2 . (Zhang et al. 1994).

Eine in vielen Merkmalen ähnliche Rolle spielt oxidativer Stress und H_2O_2 in Morbus Alzheimer. Stimulation mit toxischen Konzentrationen von $\text{A}\beta$ (Yankner et al. 1990) in PC-12 Zellen und Kortalneuronen zeigen Schäden im Golgi Apparat, den Mitochondrien und in anderen Membransystemen, was induziert, dass Membranschädigungen ein frühes Ereignis der $\text{A}\beta$ -Toxizität sind. Protektion kann durch Vitamin E, einem lipophilen Antioxidanz, vermittelt werden. Behl zeigte die Produktion von Peroxiden und die Induktion von Lipid Peroxidation in mit $\text{A}\beta$ Peptid behandelten B12-Zellen. Beides konnte durch Behandlung mit Katalase und anderen Antioxidanzien verhindert werden. $\text{A}\beta$ resistente Zellen sind zudem resistent gegenüber H_2O_2 (Behl et al. 1994b). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass H_2O_2 oder dessen toxischere Derivate, die Hydroxylradikale, die direkte toxische Substanz sind, die zur Degeneration von Neuronen in Morbus Alzheimer führen. $\text{A}\beta$ induzierte in B12-Neuronen einen größeren Anteil nekrotischer als apoptotischer Zellen (Behl et al. 1994a). Ein ähnliches Verhältnis wurde durch H_2O_2 in HT-22 generiert (Abb. 5.14). Anders als Glutamat, das indirekt über Rezeptoren oder Transporter auf die Entstehung von ROS wirkt, diffundiert H_2O_2 auf direktem Wege durch die Membrane (Vedder et al. 2000). Funktionell spielt H_2O_2 in neurodegenerativen Erkrankungen zwei unterschiedliche Rollen: zum einen die Erzeugung von oxidativem Stress durch Hydroxyl-Radikal und andere toxischen Derivate, und zum anderen als sekundärer Botenstoff. Speziell in geringen Konzentrationen initiiert H_2O_2 eine protektive Stressantwort. Ein dabei beteiligtes Enzym ist NF κ B (nuclear factor kappa B). NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Sauerstoffradikale aktiviert werden kann und zur Transkription antiinflammatorischer Genprodukte führt (Schreck et al. 1991). Lezoualc'h inhibierte die transkriptionelle Aktivität von NF κ B und reinitiierte so die Vulnerabilität H_2O_2 resistenter PC-12-Zellen, nachdem er zuvor in diesen eine erhöhte Basalkonzentration an NF κ B-Aktivität nachwies (Lezoualc'h et al. 1998). Kurz danach wurde von der gleichen Arbeitsgruppe beschrieben, dass aktiviertem NF κ B eine wichtige Rolle bei der neuroprotektiven Wirkung von IGF-1 (insulin-like growth factor-1) zugeschrieben wird (Heck et al. 1999).

6.1.3 Technische Durchführung des Screens

Ausgehend von einer konstant gehaltenen Vorkultur, die maximal 50 % konfluent wurde, wurden je 2000 HT-22 Zellen in jedes Well einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät. Diese wurden zuvor mit Poly-L-Ornithine beschichtet, damit alle Zellen gleichermaßen anwachsen konnten, und sich jede Zellkulturplatte somit homologer verhielt. Zudem war die Ausgangszellzahl so gewählt, dass bei der Stimulation mit Wasserstoffperoxid die Zelldichte nicht 100 % konfluent war, so dass jede Zelle demselben toxischen Stimulus ausgesetzt war. Alle nicht durch die transfizierte cDNA geschützten Zellen einer jeden Platte starben somit homogener ab und minimierten somit die Schwankungen des Basalsignals, welches nach der Stimulation mit Wasserstoffperoxid abgegriffen wurde.

24 h nach Aussaat wurde jedes Well der Zellkulturplatte mit einem individuellen cDNA-Expressionsplasmid transfiziert. Wichtig für die Transfektionseffizienz dabei war, dass sich die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden, um die DNA-Metafectene Komplexe optimal aufnehmen zu können. 41 h nach Transfektion erfolgte die toxische Stimulation mit Wasserstoffperoxid. Ein Problem das es dabei zu lösen galt war die Stabilität von Wasserstoffperoxid. Die Stabilität von H_2O_2 war temperaturabhängig und konnte bei Raumtemperatur nur über einen Zeitraum von 20 Minuten aufrechterhalten werden. Stimulation einer 96-Well-Platte mit einer definierten Konzentration innerhalb dieses Zeitfensters zeigte jedoch keine einheitliche Verteilung des Vitalitäts-Signals. Vergleich man das Verhältnis Kontrollvektor transfizierter Zellen in den Wells am Rande mit denen in der Mitte, so konnte die zu erwartende Sterberate durch H_2O_2 nur in den Wells in der Mitte beobachtet werden. Die Signale der Rand-Wells waren trotz identischer Transfektion und Stimulation signifikant erhöht (Abb. 5.13). Dies konnte durch einen Temperaturgradienten von den Plattenrändern zur Plattenmitte hin erklärt werden. Ein schnellerer Temperatureausgleich der Inkubortemperatur mit dem Zellkulturmedium in den Rand-Wells führte zu einer Inaktivierung der H_2O_2 Lösung und letztendlich zu einem erhöhten Signal in der Messung mit AlamarBlue.

Volumenbestimmungen in den Rand-Wells wiesen eine temperaturbedingte erhöhte Verdampfungsrates im Vergleich zum Plattendurchschnitt nach. Wäre die H_2O_2 -Lösung durch die erhöhte Temperatur nicht inaktiviert, müsste es durch die beobachtete Verdampfung zu einer Aufkonzentration des Zellmediums, einer verstärkten Toxizität und zu einer Reduktion des Vitalitätssignals kommen.

Die Belegung der Rand-Wells im Screen würde somit eine große Anzahl falsch-positiver Hits generieren. Als interne Kontrollen jeder Screeningplatte dienten der Leervektor, GFP und Gpx-1. GFP diente sowohl als Negativkontrolle als auch zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Letzteres war von Bedeutung, als für die Transfektion eines gesamten Screening-Experimentes von der ersten bis zu letzten Platte nur eine Metafectene-Stammlösung verwendet wurde. Bei einer Transfektionseffizienz von unter 50 % wurde das jeweilige Experiment abgebrochen. Die Leervektor- und Gpx-1 Kontrolle dienten zum einen als Stabilitätskontrolle für die H_2O_2 -Lösung, zum anderen als Teil der Normierungsgröße zur Definition von Hits. Die Funktionalität des Screening-Systems musste durch

„Positivkontrollen“ gezeigt werden. Ich habe dafür die Glutathione Peroxidase-1 (Gpx-1) gewählt, da dieses in der Literatur mit am besten für eine antioxidative Funktionen beschrieben wurde (Mills 1957). Das Screeningprotokoll war an die Kinetik der Glutathione Peroxidase-1 (Gpx-1) angelegt. Gpx-1 ist eines von fünf Gpx Isoenzymen und gehört zur Familie der Selenoproteinen (De Haan et al. 2003; Gouaze et al. 2002; Ishibashi et al. 2002). Gpx-1 wirkt antioxidativ durch die Reduktion von H_2O_2 und anderen Hydroperoxiden zu Wasser und Alkoholen. Der maximale protektive Effekt durch Gpx-1 konnte unter Screening-Bedingungen nach 41 h Expression nachgewiesen werden (Abb. 5.10). Dabei betrug die Screening-Konzentration 100 μM . Eine frühere Stimulation mit H_2O_2 reduzierte den Unterschied zwischen protektierten und nicht protektierten Zellen signifikant. Behandlung zu einem späteren Zeitpunkt führte zu einer verminderten Sensitivität gegenüber der Screening-Konzentration. Letzterer Effekt ließ sich auf eine gestiegene Zellzahl zurückführen. Je größer die Zelldichte, desto höher die EC 50 Konzentration. Unter den definierten Screening-Bedingungen (41 h Expression) konnten deshalb nur solche Gene oder cDNAs gefunden werden, die ähnliche Aktivitätskinetiken aufwiesen wie die Gpx-1.

Da wie in Experiment 5.10 gezeigt, eine Erhöhung der Zellzahl mit einer verminderten Sensitivität gegenüber der Screening-Konzentration einherging, konnten auch diejenigen Gene bzw. cDNAs identifiziert werden, die zu einem verstärkten Zellwachstum bis zur Stimulation mit H_2O_2 beitrugen.

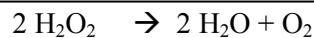
Die Wiederfindungsrate der zufällig verteilten Positivkontrolle auf einer Screening-Platte unter Screening-Bedingungen betrug 100 %.

6.2 Identifizierte Hits

Insgesamt wurden 5088 verschiedene cDNA-Klone in zwei unabhängigen Screening-Runden auf ihre Eigenschaft hin untersucht, vor einem toxischen H_2O_2 Stimulus zu schützen. Beide Runden wurden mit derselben DNA Präparation durchgeführt, um präparationsbedingte Schwankungen zu vermeiden. Dabei beruhte die Definition der gefundenen primären Hits auf einer Einzelmessung, da jede cDNA in nur jeweils einem Well getestet wurde. Diejenigen Klone, die in beiden Einzelmessungen eine Signalerhöhung gegenüber dem Plattendurchschnitt und den internen Kontrollen vermittelten, gelangten in die Nachtestung. Aus 5072 Klonen wurden auf diese Weise 38 Einzelklone isoliert (Tabelle 5.3). Aufgrund der statistischen Normalverteilung bei Mehrfachmessungen konnte es bei den Einzelwert-Messungen im Screen zur Definition falsch- positiver Hits gekommen sein. In manuellen, von der Roboterplattform unabhängigen, Nachtestungen wurden alle 38 Hits nochmals getestet. Nur 6 der ursprünglich 38 Hits zeigten in mindestens drei unabhängigen Experimenten unter mindestens zwei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen einen protektiven Effekt. Die Hitrate der bestätigten Klone betrug 1.1 ‰. Eine Diskussion der sechs bestätigten Hits ist im Folgenden dargelegt.

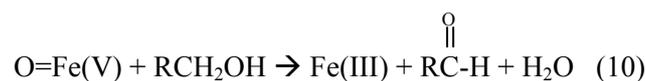
6.2.1 Katalase

Das erste Gen, dessen antioxidative Wirkung im Screen zu einer erhöhten Überlebensrate unter H_2O_2 Stress führte, war die Katalase. Bereits im 19. Jahrhundert wurde die Katalase als ein in der Natur weit verbreitetes Enzym erkannt (Bergmeyer 1955), das sowohl in aeroben als auch in aerotoleranten Organismen vorkommt. Die Katalase besitzt vier eisenhaltige Hämgruppen und katalysiert die Disproportionierung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 . Die Redoxreaktion erfolgt in einer zweistufigen Reaktion, wobei H_2O_2 sowohl als Substrat als auch als Oxidationsmittel fungiert (Chance et al. 1979).



Um dabei selbst nicht oxidiert zu werden, besitzt die Katalase NADPH an der Proteinoberfläche (Reid et al. 1981).

Die Katalase ist eines der effektivsten Enzyme, mit einer Umsatzzahl von 5×10^6 Molekülen/min. Man unterscheidet zwei Arten von Häm-Katalasen: monofunktionale Katalase, welche in Eukaryoten, Prokaryoten und Archaeen vorkommt und ausschließlich die Disproportionierungsreaktion katalysiert, sowie die in Prokaryoten und Archaeen gebildete bifunktionale Katalase-Peroxidase, die sowohl über eine Katalase- als auch über eine Peroxidase-Aktivität verfügt (Fraaije et al. 1996; Rocha et al. 1997; Terzenbach et al. 1998). Generell katalysieren Peroxidasen-Reaktionen nach folgendem Schema (10), wobei RCH_2OH einen Elektronendonator darstellt (Sichak et al. 1986).



Die Katalase lokalisiert größtenteils in Peroxisomen der Leber oder der Niere (Chance et al. 1979), in denen ein Großteil H_2O_2 generierender Enzyme, wie Oxidasen oder der Flavoprotein Dehydrogenasen vorhanden sind. In Mitochondrien (in der Leber) oder dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ist keine Katalase vorhanden, was bedeutet, dass dort gebildetes H_2O_2 *in vivo* nicht durch die Katalase abgebaut werden kann, solange dieses nicht zu den Peroxisomen diffundiert (Halliwell 1999).

Im Gehirn lokalisiert die Katalase vermehrt im Cerebellum und im vorderen Kortex, in denen sich auch die stärkste Katalase-Aktivität nachweisen lässt. Dagegen kann kein signifikanter Unterschied in der Lokalisierung und Aktivität zwischen normalen und dementen Gehirnen nachgewiesen werden (Chen et al. 1994; Richardson 1993).

Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen mit Glutamat- und H_2O_2 -resistenten Zelllinien zeigten keine verstärkte Expression der Katalase im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Dagegen wird eine erhöhte Konzentration von Katalase in A β resistenten Zelllinien gefunden (Dargusch & Schubert 2002).

Transiente Überexpression der Katalase in HT-22 zeigte einen relativ geringen Grad an Protektion (Abb. 5.16A B), was evtl. auf eine unterschiedliche Kinetik oder das spezielle Experimentsetup zurückzuführen war.

6.2.2 Glutathion Peroxidase-1

Die Bestätigung für das Screening-System wurde mit der Glutathion Peroxidase-1 erbracht.

Die Glutathion Peroxidase (Gpx) wurde erstmals von Mills 1957 als ein Enzym beschrieben, das Hämoglobin in Erythrozyten vor oxidativem Stress schützt (Mills 1957). Gpx gehört zur Familie der Selenoproteine und spielt eine entscheidende Rolle bei der Detoxifizierung von ROS, in dem es die Reduktion von H_2O_2 und einer Vielzahl anderer Hydroperoxiden zu Wasser und Alkoholen katalysiert (Freeman et al. 1982). Bisher unterscheidet man fünf Isoenzyme in Säugern (Chambers et al. 1986; Esworthy et al. 1997; Arthur 2000; Ursini et al. 1995; Vernet et al. 1996).

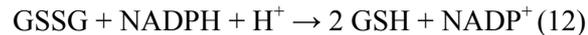
Von allen fünf Isoenzymen ist Gpx-1 in Säugetieren die bedeutendste für die Detoxifizierung von H_2O_2 . Mehrere *in vitro* und *in vivo* Befunde belegen für Gpx-1 eine essentielle antioxidative Funktion, welche ausschlaggebend für die Wahl als Positivkontrolle in dem hier durchgeführten Screen waren. Inkubation mit Selenomethionin erzeugt in kultivierten Endothelzellen eine 4-fache Aktivitätssteigerung von Gpx-1, was zu einer Protektion gegenüber Hyperoxie (Housset et al. 1983) und H_2O_2 (Ody et al. 1985) führt. Mirault und Kollegen überexprimierten Gpx-1 in humanen Brustkrebszellen (T4D7) und vermittelten somit Resistenz gegen H_2O_2 und Menadion (Mirault et al. 1991). In NIH3T3 und MCF7 Zellen kann durch Überexpression der gleiche Effekt erzielt werden (Kelner et al. 1995). Ein erhöhter Grad an Gpx-1 Aktivität in FL5- und MDBK-Zellen schützte die Zellen vor ROS-induzierter Apoptose (Hockenbery et al. 1993; Kayanoki et al. 1996). CD95 induzierte ROS-Produktion in T4D7 Krebszellen wird durch Gpx-1 geblockt. Zusätzlich kommt es zu einer Inhibierung sowohl von Initiator- als auch Effektor-Kaspasen durch die erhöhte Gpx-1 Aktivität (Gouaze et al. 2002). Gpx-1 Knockout Mäuse sind anfälliger gegenüber den Schädigungen hervorgerufen durch eine Myocardiale Ischämie (Yoshida et al. 1997) sowie gegenüber Paraquat und H_2O_2 (de Haan et al. 1998). Kortikale Neuronen aus Gpx-1 Knockout Mäusen sind 30 % anfälliger auf oxidativen Stress als Zellen aus Kontrollmäusen (de Haan et al. 1998). Weisbrot-Lefkowitz demonstrierte, dass durch Überexpression von Gpx-1 in transgenen Mäusen diese vor durch Apoplexia hervorgerufene Schäden geschützt sind (Weisbrot-Lefkowitz et al. 1998).

Als Kofaktor für die Gpx-1 dient Glutathion (GSH). Glutathion wirkt direkt antioxidativ und ist ein natürlich vorkommendes Tripeptid, bestehend aus γ -Glutaminsäure, Cystein und Glycin (Pompella et al. 2003). Die reduzierte Form (GSH) wird durch H_2O_2 oxidiert und bildet ein Glutathiondisulfid

(GSSG), ein Dimer aus Glutathion, dessen beide Glutathion-Bausteine über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Reaktion 11).



Die Glutathion Reduktase reduziert anschließend das oxidierte Glutathiondisulfid und komplettiert den Zyklus nach folgender Reaktion (12).



Eine transiente Überexpression von Gpx-1 protektierte HT-22 Zellen vor toxischen H_2O_2 Konzentrationen (Abb. 5.16A D). Der deutlichste Effekt konnte nach einer Expressionszeit von 41 h nachgewiesen werden (Abb. 5.10). In Gehirnen von Alzheimerpatienten ist die Aktivität von Gpx-1 im Vergleich zu Kontrollpatienten nicht verändert (Chen et al. 1994; Richardson 1993). Auch zeigten die von Dargusch generierten Glutamat-resistenten Zellen keine erhöhte Gpx-1 Expression im Vergleich zu nicht resistenten Zellen (Dargusch & Schubert 2002). Konsistent dazu waren die in dieser Arbeit verwendeten Affymetrix-Chip-Daten der Glutamat und H_2O_2 -resistenten HT-22 Klone, in denen auch keine verstärkte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden konnte.

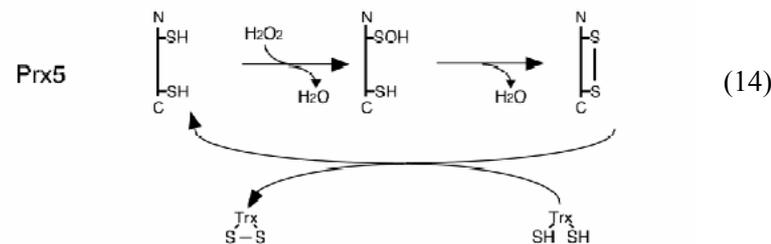
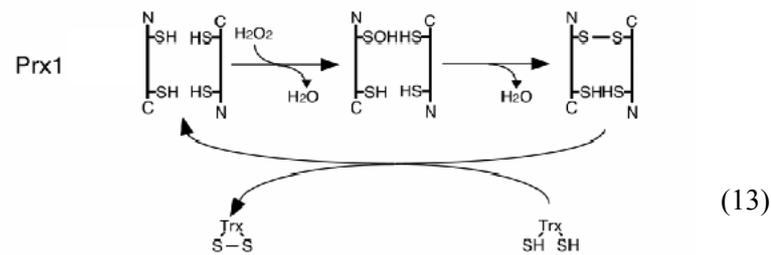
6.2.3 Peroxiredoxin-1 und Peroxiredoxin-5

Zwei weitere Proteine, deren antioxidative Funktion im Screen die Überlebensrate der HT-22 Zellen steigerten, waren Peroxiredoxin-1 und -5. Beide gehören in die relativ neue Proteinfamilie der Peroxiredoxine (Prx) (Kim et al. 1988).

Peroxiredoxine gehören zu den Peroxidasen und reduzieren H_2O_2 , Peroxinitrit und eine Vielzahl organischer Hydroperoxide (ROOH) zu Wasser und Alkohol (Wood et al. 2003).

Peroxiredoxine sind ubiquitär und können in Hefen, Pflanzen, Eukaryonten und Archaeen identifiziert werden (Wood et al. 2003). Die Familie zählt mindestens 6 Isoformen in Säugern (Prx 1-6) (Chae et al. 1994). Peroxiredoxine besitzen ein redox-aktives Cystein in einer N-terminalen konservierten Region, welches während der Reduktion von Peroxiden oxidiert wird (Claiborne et al. 2001). Vier der sechs Proteine besitzen ein zusätzliches Cystein in der C-terminalen Proteinregion (Prx 1-5). Diejenigen Prx-Proteine, die zwei konservierte Cystein-Reste besitzen, gehören zur Gruppe der 2-Cys Prx-Proteine (2-Cys Prx), wohingegen diejenigen mit nur einem Cystein-Rest (Prx-6) zu der Gruppe der 1-Cys Prx-Proteine (Cys Prx) gerechnet werden. Innerhalb der Gruppe der 2-Cys Prx unterscheidet man zusätzlich zwischen den „typischen“ (Prx 1-4) und den „atypischen“ (Prx-5) Peroxiredoxinen, je nach dem ob sie nach der Oxidation Homodimeren (Reaktion 13) bilden oder weiterhin als Monomere

bestehen (Reaktion 14) (Fujii et al. 2002). Die anschließende Reduktion erfolgt über Thioredoxin bzw. NADPH als Elektronen Donor (Abb. 6.1)(Seo et al. 2000).



Ab. 6.1 Reaktionsmodelle einzelner Peroxiredoxine zur Reduktion von Peroxiden. (Fujii & Ikeda 2002).

Der in dieser Arbeit beschriebene funktionelle Screen identifizierte alle Mitglieder der Peroxiredoxin Familie, die in der cDNA-Kollektion vertretenen waren. Zu Ihnen gehörten Peroxiredoxin-1 und 5.

Transiente Überexpression von Prx-5 in HT-22 schützte die Zellen deutlich weniger als Transfektion mit Prx-1 (Abb. 5.16A A) was evtl. auf die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisierung zurückzuführen war. Während Prx-1 im Zytoplasma lokalisiert und dort wirkt, befindet sich Prx-5 in den Mitochondrien und Peroxisomen (Knoops et al. 1999; Yamashita et al. 1999). Die protektiven Eigenschaften auf einen oxidativen Stress bzw. induzierte Apoptose wurden in einer Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Experimenten für beide Familienmitglieder belegt, und ist somit ein weiterer Beweis für die Funktionalität der hier entwickelten Screening-Methode (Shau et al. 1994; Fujii & Ikeda 2002; Shen et al. 2002; (Geiben-Lynn et al. 2003; Seo et al. 2000; Plaisant et al. 2003; Zhou et al. 2000)

Expressionsanalysen von Alzheimer- und Parkinsonpatienten mit solchen mit Down Syndrom spiegelten keine signifikante Veränderung von Prx-1 zu Kontrollpersonen wieder (Krapfenbauer et al. 2003). Übereinstimmend mit diesen Befunden zeigten die hier in dieser Arbeit durchgeführten Affymetrix Chip Expressionsanalysen Glutamat- und H₂O₂ resistenter HT-22 Zellen keinerlei verstärkte Regulation auf RNA-Ebene.

Aus der Literatur ist dagegen bekannt, dass Prx-1 in Lungen-, Thymus- und Brustkarzinomen verstärkt exprimiert ist (Fujii & Ikeda 2002). Transfektion von Antisense Prx1-RNA sensibilisiert Prostatakarzinomzellen gegenüber H₂O₂ (Shen & Nathan 2002), was impliziert, dass sich diese Karzinomzellen durch Peroxiredoxine vor oxidativem Stress schützen.

HIV-1 positive Patienten zeigen erhöhte Plasmakonzentrationen an Prx1 und eine verstärkte Expression in CD8⁺ T-Zellen, welche für die Inhibition der HIV-1 Replikation mitverantwortlich sind. Rekombinantes Prx1 inhibiert bei einer ID50 von 130 nM die HIV-1 Replikation in infizierten T-Zellen um 50 % und könnte somit zu möglichen therapeutischen Zwecken eingesetzt werden (Geibens-Lynn et al. 2003). Letztere Befunde legen nahe, dass die in diesem Screen identifizierten Gene nicht ausschließlich für neuronale Fragestellungen interessant sein können.

6.2.4 Nuclear factor erythroid derived 2-like 2

In die Familie der Transkriptionsfaktoren, die einen Schutz vor oxidativem Stress induzieren, gehört der im Screen identifizierte Faktor Nrf2 (nuclear factor erythroid derived 2-like2). Nrf2 ist Mitglied der „cap'n'coller“ (CNC) Transkriptionsfaktoren, welche durch basische Leucin-Zipper-Elemente charakterisiert sind (Nguyen et al. 2003). Dieselbe Familie umfasst weitere 5 Mitglieder: p45-Nfe2, Nrf1, Nrf3, Bach1 und Bach2 (Chan et al. 2001), wobei nur p45-Nfe2, Nrf1 und Nrf2 an das NFE2-AP1-Promotor-Motif im β -Globulin binden, welches zu ihrer Identifikation geführt hat (Tuan et al. 1985). Aufgrund starker Sequenzhomologien zu NFE2-AP1 wurde die Bindung von Nrf2 an ARE-Motive (engl. antioxidant response element) untersucht. Nrf2 wurde daraufhin als einer der wichtigsten Aktivatoren ARE-regulierter Gene identifiziert. Das ARE ist ein Enhancer-Element, welches die Transkription verschiedener Antioxidanzien und Typ-II detoxifizierender Enzyme zur Inaktivierung reaktiver Elektrophile bzw. nach ROS-induziertem Stress aktiviert (Huang et al. 2000). Zu ihnen gehören die NAD(P)H Quinon Oxidoreduktase-1 (Favreau et al. 1995), die Glutathion S-Transferase (GST) (Rushmore et al. 1990), die γ -Glutamylcystein Synthetase (GCS) (Moinova et al. 1998), die Hämoxigenase (Alam et al. 1999), die Katalase, die Superoxid Dismutase-1 sowie die UDP-Glukuronosyl Transferase (Chan et al. 2001). Neben antioxidativen und detoxifizierenden Enzymen reguliert Nrf2 auch Ferritin, welches Eisenionen in großer Menge bindet und es somit aus Sauerstoffradikal-bildenden Reaktionen entzieht (Pietsch et al. 2003).

In vivo Modelle mit Nrf2 Knockout Mäusen bestätigen sowohl eine reduzierte Induktion ARE regulierter Gene als auch eine gestiegene Sensitivität der Mäuse gegenüber verschiedenen toxischen Stimuli. Diese Mäuse reagieren anfälliger auf Hyperoxie (Cho et al. 2002) und Acetaminophen (APAP), einem fieberhemmenden Medikament. APAP und dessen Abbauprodukte führen bei Kontrollmäusen in hohen Konzentrationen zu Leberschäden durch die Induktion von oxidativen Stress, einem gestörten Kalziumgleichgewicht sowie einer Reduktion der Mitochondrienleistung (Bruno et al. 1998). Bei geringen Konzentrationen von APAP, die von Wildtyp Mäusen gut toleriert werden, sterben Nrf2 Knockout Mäuse dagegen an akutem Leberversagen (Chan et al. 2001). Glutathion (GSH), das durch die APAP-Behandlung in Hepatozyten depletiert wird, kann lediglich in

Wildtyp-Mäusen, jedoch nicht in Knockout-Mäusen regeneriert werden. In letzteren ist die Neusynthese von Glutathion durch die inhibierte Expression von GCS und GST verhindert. Beide Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung von Nrf2 für die Glutathionsynthese und die Regulation zellulärer Detoxifizierungsmechanismen (Chan et al. 2001). Makrophagen, deren Nrf2-Gen inaktiviert wird, sind nach Stimulation mit ROS-induzierenden Substanzen nicht mehr in der Lage, ARE-abhängige Antioxidanzien in ausreichenden Mengen zu exprimieren, und weisen dadurch eine erhöhte Sensibilität auf (Ishii et al. 2000). Transkription ARE-regulierter Gene konnten auch direkt durch Antisens Nrf2 Konstrukte geblockt werden (Chen et al. 2003).

Im inaktiven Zustand ist Nrf2 im Zytosol lokalisiert und bindet an das Zytoskelett assoziierte Protein Keap1 (Itoh et al. 1999). Behandlung mit DEM (diethylmaleat), einer elektrophilen, Stress-induzierenden Substanz löst die Bindung von Nrf2 zu Keap1 und ermöglicht die Translokation von Nrf2 in den Zellkern, um die Expression ARE-abhängiger Gene zu aktivieren (Huang et al. 2000). Reguliert wird dieser Mechanismus über Phosphorylierung von Nrf2. Stimulation von HepG2-Zellen mit PMA (phorbol 12-myristate 13-aacetat) induziert die Translokation von Nrf2 in den Zellkern und aktiviert ARE-regulierte Gene, wohingegen spezifische Protein Kinase C (PKC) Inhibitoren sowohl die Translokation als auch die Aktivierung wieder aufheben. Folgeexperimente belegen die direkte Phosphorylierung von Nrf2 an Serin-40 durch PKC und die dadurch induzierte Dissoziation von Nrf2 von Keap1 (Huang et al. 2002). Eine zweite positive Regulation erfolgt über die MAPK- (mitogen-activated protein kinase) Kaskade (Yu et al. 1999). Des Weiteren ist eine positive Regulation für die PI3 (phosphatidylinositol 3) –Kinase beschrieben (Kang et al. 2002). Simulation von Hepatoma-Zellen (H4IIE) mit *t*-BHQ (*tert*-Butylhydroquinone) bewirkt die Aktivierung der PI3-Kinase und die Translokation von Nrf2 in den Zellkern, wohingegen PI3-Kinase-Inhibitoren beides verhindern. PI3-Kinase-Signale regulieren zudem die Organisation von Aktin-Filamenten und den Proteintransport (Vollenweider et al. 1999). In H4IIE Zellen weist man nach *t*-BHQ Behandlung eine erhöhte Menge an Aktin im Zellkern nach sowie eine verstärkte Co-Immunopräzipitation von Nrf2 mit Aktin. Nrf2 gebunden an Aktin translokalisiert nach Induktion von oxidativem Stress in den Zellkern und aktiviert ARE regulierte Gene (Kang et al. 2002). Im Zellkern bildet Nrf2 mit anderen Transkriptionsfaktoren Proteinkomplexe, die entweder stimulierend oder hemmend auf die Transkription ARE-regulierter Gene wirken. Heterodimer aus Nrf2 und c-Jun, CBP ((cAMP responsive binding portein)-binding protein), ATF4 (activating transcription factor 4) sowie c-Fos und Fos-B aktivieren die Transkription (Dhakshinamoorthy et al. 2000; He et al. 2001; Katoh et al. 2001), während Heterodimere aus Nrf2 und MafK/G hemmenden Einfluss auf die Transkription ausüben (Dhakshinamoorthy & Jaiswal 2000).

Wie aus oben genannten Erläuterungen zu vermuten ist, schützte eine Überexpression von Nrf2 in HT-22 Zellen diese vor H₂O₂ induziertem oxidativen Stress (Abb. 5.16B A). In H₂O₂- und Glutamat-resistenten HT-22 Zellen war Nrf2 gegenüber den Kontrollzellen um den Faktor 1,3 bis 1,4 verstärkt exprimiert, was für eine Beteiligung an der Erzeugung der Glutamat- und H₂O₂-resistenten Zellen

sprechen könnte. Die Präsenz dieses Gens in der Liste der durch den funktionellen Screen identifizierten Gene unterstreicht die Sensitivität dieses neuartigen Screening-Ansatzes, welcher nicht nur direkt detoxifizierende Gene und deren Proteinprodukte detektiert, sondern auch in der Lage ist indirekt wirkende Signaltransduktionsfaktoren zu identifizieren.

6.2.5 Glutamin: Fruktose-6-phosphat Amidotransferase

Die Glutamin: Fruktose-6-phosphat Amidotransferase (Gfat, oder Gfpt) ist das Kinetik bestimmende Enzym im Hexosamine-Synthese-Signalweg. Es katalysiert die Reaktion von Fruktose-6-Phosphat (Fruc-6-P) und Glutamin (Gln) zu Glucosamin-6-Phosphat (GlcN-6-P) und Glutamat (Glu) (15)



In nachfolgenden Reaktionen entsteht aus GlcN-6-P das Hauptprodukt dieser Reaktion: Uridindiphospho-N-acetylglucosamin (UDP-GlcNac), welches zur Glykosylierung an Serin- und Threonin-Reste durch das Enzym OGT (O-GlcNac Transferase) verwendet wird (Figur 6.2 und 6.3) (DeHaven et al. 2001). Gfat ist hoch konserviert und weist 99 % Aminosäuresequenz Homologie zur Maus, 55 % zu Hefen und 35 % zu *E.coli* auf (McKnight et al. 1992). 1999 wurde eine zweite Isoform, Gfat2, von Oki beschrieben, welche sowohl in Mäusen als auch beim Menschen vorkam, und insgesamt 75 % Aminosäure-Identität zu Gfat1 aufwies (Oki et al. 1999). Gfat1 und Gfat2 kodieren beide die Glutamin: Fruktose-6-phosphat Amidotransferase, liegen aber auf unterschiedlichen Chromosomen (Chromosom 2p13 und 5q34-q35) und beschreiben zwei separate Gene (Oki et al. 1999). Der Promotor von Gfat2 besitzt SP1-Elemente, welche für die Basalaktivität notwendig sind, eine CCAAT-Box, AP-1 und AP-2 regulatorische Elemente, jedoch keine TATA-Box (Yamazaki et al. 2000). Gfat2 exprimiert vor allem im Pankreas, in der Leber und im Zentralen Nervensystem (ZNS) (Oki et al. 1999). Inhibitorstudien zur Untersuchung der durch Hyperglykämie hervorgerufenen vaskulären Komplikationen bei Typ2 Diabetes Mellitus (T2DM) identifizierten vier intrazelluläre Signaltransduktionswege, die alle durch eine durch Hyperglykämie regulierte Überproduktion von Superoxidanionen in den Mitochondrien induziert wurden (Abb. 6.2).

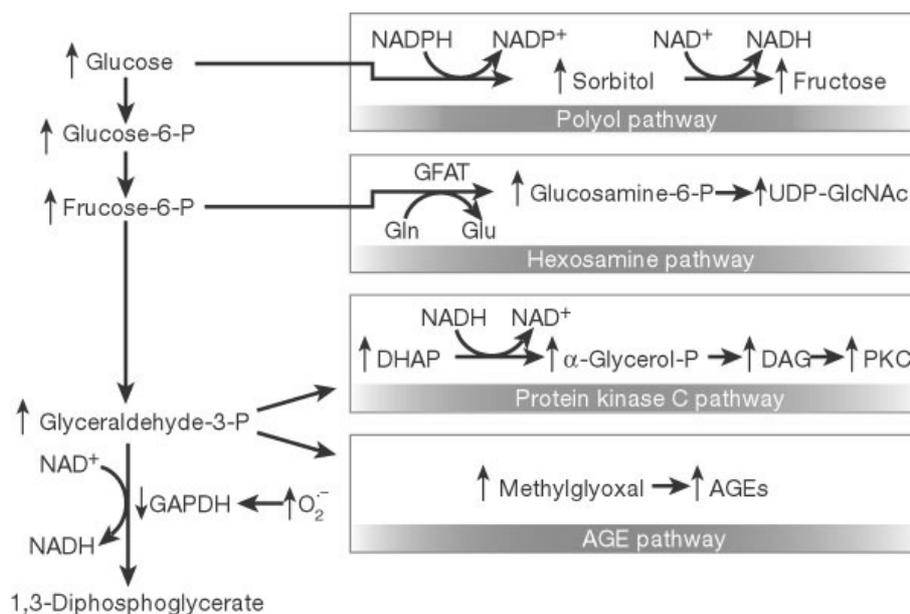


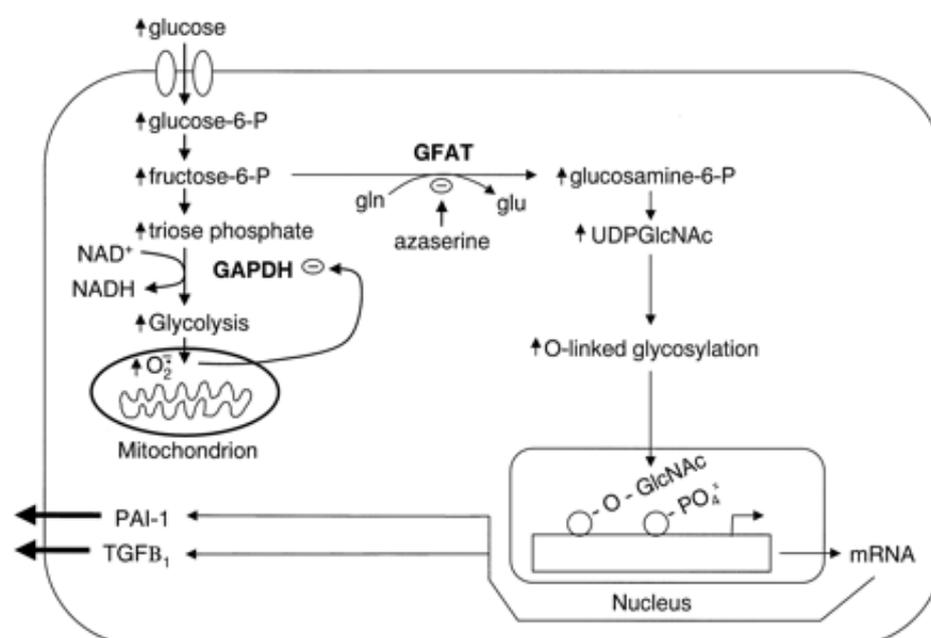
Abb. 6.2 Induktion vier verschiedener Signalwege durch Hemmung der GAPDH während hyperglykämischer Bedingungen.

Die während der Glykolyse entstehenden Produkte werden in unterschiedlichen alternativen Reaktionen weiter metabolisiert. Aus Triosen entstehen zum einen Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), welche zu Diacylglycerin (DAG) umgewandelt wird und einen Aktivator der PKC darstellt, oder zum anderen Methylglyoxal, einem Vorläufer von AGEs. Glukose kann auch direkt im Polyol-Reaktionsweg zu Fruktose verarbeitet werden. Dabei wird in großem Umfang NADPH verbraucht, welches u.a. für die Regeneration von Glutathion benötigt wird. Ein Anstieg von oxidativem Stress ist die Folge (Lee et al. 1999).

(www.nature.com/nature/journal/v414/n6865/fig_tab/414813a_F4.html)

Beteiligt dabei waren die Aktivierung der Protein Kinase C und deren Isoforme (Koya et al. 1998), eine verstärkte Bildung von AGEs (advanced glycation endproducts) (Brownlee 1995) und eine verstärkte Metabolisierung von Glukose durch den Aldose-Reduktase-Signalweg (Lee et al. 1995). Inhibition dieser Signalwege verhindert die durch Hyperglykämie verursachten vaskulären Komplikationen (Nishikawa et al. 2000). Eine verstärkte Metabolisierung von Glukose durch den Hexosamine Signalweg gilt als weitere Hypothese für die Entstehung des Typ2 Diabetes Mellitus (T2DM), die damit verbundene Insulinresistenz und die veränderte Mikrovaskularität (Kolm-Litty et al. 1998; Sayeski et al. 1996). In Zellkulturexperimenten sowie in *in vivo* Untersuchungen an Ratten kann eine verstärkte Insulinresistenz nach Infusion mit Glukosaminen, einem der Produkte aus dem Hexosamine Signalweg, nachgewiesen werden (Rossetti et al. 1995). Überexpression von Gfat im Fett-, Muskel- und Lebergewebe bei Mäusen resultiert ebenfalls in einer verstärkten Insulinresistenz und einer verminderten Glukoseintoleranz (Hebert et al. 1996; Veerababu et al. 2000). Überexpression in Mesenglia-Zellen und Fibroblasen induziert die Transkription von TGF α und TGF β 1 (engl. transforming growth factor). TGF β 1 gilt als Mediator für die Entwicklung von Nephropathie in Diabetes (Figur 6.3) (Weigert et al. 2003).

Erklärbar ist die durch Hyperglykämie induzierte Transkription durch Glykosylierung von Transkriptionsfaktoren wie Sp1 oder RNA-Polymerase-II-Transkriptionsfaktoren (Kadonaga et al. 1988) sowie über PKC und p38-MAP-Kinase abhängige Signaltransduktion (Burt et al. 2003). Inhibition von GFAT durch „antisense“-Konstrukte und spezifische Inhibitoren wie Azaserine blockieren die durch Hyperglykämie induzierte erhöhte Transkription von TGF α und TGF β 1 (Burt et al. 2003). Gesteigerte Insulin abhängige Glukose Aufnahme wird durch verstärkte Translokation von GLUT4 Glukosetransportern an die Zellmembran vermittelt. Glykosylierung durch Produkte des Hexosamine Signalweges sowie verminderte Phosphorylierung des Insulin Rezeptor Substrates-1 blockieren den initiierten GLUT4-Transport an die Membran und tragen so zu Insulinresistenz bei (Cooksey et al. 1999; Zhang et al. 2004).



Figur 6.3 Schematische Darstellung, wie durch Hyperglykämie induzierte Superoxidationen den Hexosamin Signalweg aktivieren, und dabei die Expression SP-1-abhängiger Gene regulieren. Eine verstärkte Produktion von Superoxidationen während der Glykolyse bei Hyperglykämie (Nishikawa et al. 2000) hemmt zu einem gewissen Teil die enzymatische Aktivität von GAPDH, wodurch es zu einer Anreicherung von Tiosen, Fruktose-6-Phosphat und Glukose-6-Phosphat kommt. Fruktose-6-Phosphat dient im Hexosamin Reaktionsweg als Edukt für die Synthese von UDP-GlcNAc, welches zur Glykosylierung von Transkriptionsfaktoren wie SP-1 verwendet wird. Gesteigerte SP-1-Aktivität erhöht die Expression SP-1-abhängiger Gene wie TGF β -1 und PAI-1 (Du et al. 2000).

Transiente Überexpression von Gfat2 vor einem toxischen H₂O₂ Stimulus resultierte in einer Protektionsrate vergleichbar mit der von NRF2 (Abb. 5.16B A).

Während der Stimulation mit H₂O₂ kann es u.a. zur Hemmung der GAPDH kommen (Brodie et al. 1987). Ein dadurch hervorgerufener Stau aller bis dato nicht weiterverarbeiteten Produkte aus den ersten Reaktionen der Glykolyse könnte durch Überexpression von GFAT2 abgebaut werden. Dabei

könnte der Neusynthese von AGEs als auch dem Verbrauch von NADPH durch die Synthese von Fruktose entgegengewirkt werden, welches für die Reduktion von oxidiertem GSSG zu GSH benötigt wird (Lee & Chung 1999). Überexpression von Gfat2 führt zu einer gesteigerten Produktion von UDP-GlcNAc und einer verstärkten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Glykosylierung. Erhöhte Expressionsraten konnten dadurch für TGFβ1 (Weigert et al. 2003) und NFκB (James et al. 2002) nachgewiesen werden. TGFβ1 ist ein multifunktionelles Zytokin, involviert in Zelldifferenzierung, Knochenbildung, Angiogenese, dem Zellzyklus, der Modulierung der Immunantwort und der Wundheilung (Sporn et al. 1987). 1990 zeigte Lindholm die Stimulation von NGF (engl. nerve growth factor) durch TGFβ1 *in vitro* in kultivierten Ratten Astrozyten und *in vivo* in neonatalen Rattengehirnen (Lindholm et al. 1990). Ein protektiver Effekt von NGF gegenüber H₂O₂ wurde mehrfach belegt (Goins et al. 1999). Zudem bestätigen *in vitro* Experimente, dass Toxizität durch Glutamat oder induzierte Hypoxia in Neuronen aus Hünchenembryonen mit TGFβ1 signifikant reduziert werden konnte (Prehn et al. 1993). PAI-1 (engl. plasminogen activator inhibitor 1) Expression wird ebenfalls durch SP-1-Glykosylierung gesteigert und vermittelte den schützenden Effekt von TGFβ1 vor NMDA induziertem Zelltod in Neuronen durch Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase (Docagne et al. 2002). Zum protektiven Effekt durch Überexpression von Gfat2 könnte aber auch eine gesteigerte NFκB-Aktivität beigetragen haben. Reporterkonstrukte mit NFκB-Bindeelementen liefern eine 2,2 fache Erhöhung der Aktivität nach Überexpression von Gfat. Ko-Stimulation mit Azaserin, einem GFAT-Inhibitor, blockiert die NFκB-Aktivierung (James et al. 2002). Konsistenz mit dieser beschriebenen NFκB-Aktivierung waren Messungen der NFκB-Aktivität in HT-22 unter Screening-Bedingungen. Diese zeigten eine Signalsteigerung um den Faktor 1,3 (Abb. 5.16C).

Einen durch NFκB vermittelbaren Schutz vor oxidativem Stress in neuronalen Zellen sowie in Aβ-resistenten Zellen wies Lezoualc'h 1998 nach (Lezoualc'h et al. 1998).

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache, dass Gfat in einem Screen nach Resistenzgenen gegenüber Methyl-Quecksilber (MeHg) in Hefe identifiziert wurde (Naganuma et al. 2000). Hierbei ging MeHg mit der SH-Gruppe eines aktiven Cysteins im GFAT-Protein eine Bindung ein und verhinderte so die Assoziation von Glutamin mit GFAT. Überexpression von GFAT sowie Zugabe von Glucosamin-6-Phosphat, dem Produkt des Hexosamine-Reaktionsweges, schützt die Hefen vor MeHg-Toxizität (Naganuma et al. 2000). In Säugerzellen führt die Assoziation von MeHg mit Protein Thiol-Gruppen ebenfalls zur Inaktivierung verschiedener Proteine. Betroffen davon ist z.B. der intrazelluläre Cystein Transport, der für die Synthese von Glutathion (GSH) notwendig ist (Allen et al. 2001). Mangel an GSH führt zu verstärktem oxidativem Stress. *In vivo* Experimente zeigten eine erhöhte Konzentration von ROS im Cerebellum von Mäusen und Ratten nach Stimulation mit MeHg (Ali et al. 1992; Sarafian et al. 1991). Ein weiterer Angriffspunkt für MeHg ist die Zerstörung der intrazellulären Kalziumhomöostase, wobei es zuerst zu einer Freisetzung aus intrazellulären Speichern

wie dem ER kommt und anschließend zu einem verstärkten Einstrom vom extrazellulären Kalzium in die Zelle (Marty et al. 1997).

Dass beiden toxischen Substanzen, MeHg und H₂O₂, ähnliche Toxizitätsmechanismen zu Grunde liegen, unterstreicht die Beobachtung, dass Fibroblasten, die auf H₂O₂ selektioniert werden, auch Resistenz gegenüber Quecksilber(II) aufwiesen (Sugiyama et al. 1993).

Auf den Affymetrix Chips war Gfat2 nicht vertreten. Q-PCR-Experimente mit H₂O₂- und Glutamat-resistenten Zellen zeigten jedoch keine signifikante Regulation gegenüber nicht resistenten Zellen (Abb. 5.20). Der genaue Wirkmechanismus von GFAT2 bleibt jedoch noch zu bestimmen. Die bereits genannten Verbindungen zu bekannten regulatorischen Veränderungen geben jedoch interessante Ansatzpunkte.

6.3 Vergleich des funktionellen Screens mit Expressionsanalysen

6.3.1 Bewertung der Expressionsanalysen

Parallel zum funktionellen Screen wurde versucht, mit Hilfe von Expressionsanalysen Gene zu identifizieren, die in H₂O₂- und Glutamat-resistenten Zellen ein verändertes Expressionsmuster im Vergleich zu nicht resistenten Zellen aufwiesen. Hierbei wurde untersucht, ob beobachtete Regulationen einzelner Gene bzw. cDNAs auf RNA-Ebene auch funktionell zur Ausbildung der jeweiligen Resistenz beitragen. Um eine möglichst große Anzahl unterschiedlicher cDNAs gleichzeitig zu betrachten, wurden die Analysen auf Affymetrix-Chips durchgeführt, die das Expressionsmuster 12000 verschiedener Gene bzw. cDNAs abbilden konnten. Identifizierte cDNAs bzw. Gene, die in den resistenten Zellen besonders reguliert waren, wurden, um funktionelle Rückschlüsse ziehen zu können, einzeln im zellulären System getestet.

Als Ausgangsmaterial diente RNA aus H₂O₂- und Glutamat-resistenten Zelllinien sowie RNA aus zwei nicht resistenten Kontrolllinien (Abb. 5.19 A-C). Auffallend war hier, dass Glutamat-resistente Zellen deutlich resistenter auf einen H₂O₂-Stimulus reagierten als H₂O₂-resistente Zellen (Abb. 5.19A). Erklärbar war dies durch die unterschiedliche Stärke des Selektionsdruckes, der während der Generierung auf die Klone ausgeübt wurde. So wurden H₂O₂-resistente Klone mit 18 µM H₂O₂ stimuliert, was ca. der halben EC 50 Konzentration der nicht resistenten Zellen entsprach, während Glutamat-resistente Klone mit 10-15 mM Glutamat selektioniert wurden, was die 8-10 fache EC 50 Konzentration widerspiegelte (Abb. 5.19 A und C). 531 cDNAs aus den Glutamat-resistenten Zellen und 695 cDNAs aus den H₂O₂-resistenten Zellen waren im Vergleich zu beiden Kontrolllinien signifikant hoch reguliert. Die gemeinsame Schnittmenge der hoch regulierten cDNAs beider

resistenten Zelllinien gegenüber beiden Kontrollen beinhaltete 186 cDNAs (Tabelle 5.6). Obwohl durch dieses Auswahlverfahren bereits 98,5 % aller untersuchten cDNAs aussortiert werden konnten, blieb immer noch eine schwer handhabbare Zahl von zu untersuchenden cDNAs übrig. funktionell getestet wurden deshalb nur diejenigen bekannten Gene, die mindestens um den Faktor 2,4 hoch reguliert wurden, wobei dieser Wert willkürlich festgelegt wurde. Unter experimentellen Bedingungen, die denen für die Testung der Hits aus dem funktionellen Screen entsprachen, zeigte keine der getesteten cDNAs einen protektiven Effekt. Die Liste der hoch regulierten cDNAs der Glutamat- bzw. H₂O₂-resistenten Zellen beinhaltete jedoch auch Gene, die für jede Zelllinie spezifisch waren. Um auch hier eine Auswahl von Genen nach ihrer Funktionalität hin zu untersuchen, wurde eine Stichprobe von Genen ausgewählt, die mindestens um den willkürlich gewählten Faktor 3 im Vergleich zu den Kontrollzellen hoch reguliert waren (Tabelle 5.8).

Auch hier vermittelte keines der Gene nach Überexpression in HT-22 einen signifikanten protektiven Effekt auf einen H₂O₂-Stimulus. Um die Gesamtzahl der interessanten Gene noch weiter eingrenzen zu können, wäre ein Vergleich der Expressionsmuster mehrerer Klone, die jeweils Resistenz zu unterschiedlichen Konzentrationen eines Toxins besaßen, sinnvoll.

Auch wenn keine direkten Protektoren aus diesen Expressionsanalysen und den getesteten Stichproben identifiziert werden konnten, so waren die hier gewonnenen Daten dennoch nützlich, um Hinweise auf mögliche an der Resistenz beteiligte Signaltransduktionswege zu ermitteln. Auffallend waren z.B. Serine Protease Inhibitoren (Docagne et al. 2002), die vor allem in den Glutamat-resistenten Zellen stark reguliert wurden, als auch mehrere Zytokine und Kinasen, die in beiden resistenten Zelllinien einen erhöhten Expressionsspiegel aufwiesen. Neben Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren wurden auch mehrere durch Interferon induzierte Gene (Veldhuis et al. 2003) detektiert. Eine interessante Gruppe stellten auch die Hitzeschockproteine dar, zu denen auch Chaperone gehörten, die in beiden resistenten Zelllinien stark exprimierten. Bei speziellen Krankheiten wie Morbus Alzheimer, die in die Gruppe der Proteinopathien fallen, in denen es durch oxidativen Stress u.a. zur Denaturierung und Aggregation von Proteinen kommt, spielt die Aufrechterhaltung der Proteinfunktionalität eine entscheidende Rolle (Hartl et al. 1995). Genauere mechanistische Zusammenhänge, auch inwieweit diese für die Vermittlung der jeweiligen Resistenz mitverantwortlich waren, muss in weiteren Analysen untersucht werden. Neben der Überexpression in sensitiven Zellen sollte auch getestet werden, inwieweit selektive Inhibierung der stark exprimierenden Gene evtl. durch RNA-Interference (RNAi) Konstrukte die Resistenz wieder aufheben.

Generell lag bei diesen Expressionsanalysen der limitierende Faktor bei der Auswahl der vermeintlich relevanten Gene. Aus 531 verstärkt exprimierenden cDNAs bei den Glutamat-resistenten Zellen und 695 verstärkt exprimierenden Genen bei den H₂O₂-resistenten Zellen konnte noch keine sinnvolle Auswahl getroffen werden. Sowohl die Beschränkung auf die Schnittmenge der verstärkt Exprimierenden beider resistenten Zelllinien als auch die darauf folgende Auswahl nach dem Grad der Überexpression waren nur eines von vielen möglichen Auswahlverfahren, um auf eine handhabbare

Zahl von Genen zu gelangen, die anschließend genauer untersucht werden sollten. Die Relevanz des jeweils gewählten Auswahlverfahrens muss deshalb jedes Mal erneut experimentell überprüft werden.

Erschwert wurde die Interpretation der Expressionsdaten einzelner cDNAs durch den bei dieser Analyseermittelten Gesamtüberblick aller untersuchten cDNAs. Inwieweit eine einzelne cDNA für den untersuchten Zustand Relevanz besaß, konnte hierbei nicht abgelesen werden.

In diesem Gesamtüberblick liegt jedoch auch der Vorteil dieser Analyseermethode, speziell wenn es um die Identifikation beteiligter Signalwege geht, d.h. um die gleichzeitige Regulation unterschiedlicher in einem gemeinsamen Signalweg beteiligter Gene.

Bei der Interpretation musste generell berücksichtigt werden, dass die Expressionsdaten nur Rückschlüsse auf transkriptionelle Modifikationen ermöglichten und nur bedingt Aussagen zu gebildeten Proteinnengen und Aktivitäten der Proteine zuließen. Obwohl in vielen Fällen die gebildete Menge an RNA äquivalent zur gebildeten Proteinmenge und dessen Aktivität war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass nachfolgende Translation oder posttranslationale Veränderungen den auf RNA-Ebene beobachteten Unterschied wieder aufhoben.

Obwohl letzteres auch für den in dieser Arbeit beschriebenen funktionellen Screen galt, konnten im Screen wesentliche Einschränkungen der Expressionsanalysen umgangen werden. Sowohl Expressionsanalysen als auch die hier beschriebene Screeningmethode erlaubten die Identifizierung stark exprimierender cDNAs. Da jedoch durch die Screeningmethode die cDNAs funktionell definiert wurden, ermöglichte dies einen kausalen Zusammenhang zwischen der cDNA und dem zellulären Effekt. Dass diese Kausalität bestand, bestätigten die vier im Screen identifizierten bekannten Antioxidanzien Glutathion Peroxidase-1, Peroxiredoxin-1 und 5 sowie die Katalase.

Eine Analyse der Expressionsmuster aller sechs im funktionellen Screen identifizierten Gene in den resistenten Zellen machte deutlich, dass protektierende Gene nicht zwangsläufig hoch reguliert sein mussten. Im Gegenzug implizierte eine starke transkriptionelle Expression in den resistenten Zellen keine direkte funktionelle Protektion.

6.3.2 Synergie aus Expressionsanalysen und funktionellem Screen

Eine Kombination beider Ansätze könnte somit zur Interpretation des jeweils anderen Datensatzes beitragen. Expressionsdaten könnten Aufschluss darüber geben, in welchen Geweben und Krankheitsbildern die funktionell definierten cDNAs besonders reguliert sind, um Rückschlüsse über deren Krankheitsrelevanz zu bekommen. Bei den hier beschriebenen neurodegenerativen Erkrankungen wäre es deshalb von Interesse, den Grad der Expression der sechs identifizierten Protektoren aus verschiedenen unterschiedlich von Degeneration betroffenen Gehirnregionen zu kennen. Funktionelle Daten könnten auf der anderen Seite bei der Interpretation von Expressionsdaten behilflich sein. Unter der Annahme, dass die Funktion eines Proteins und des kodierenden Gens in

unterschiedlichen Geweben nicht zwangsläufig divergent ist, könnten somit auffallende transkriptionelle Regulationen eines bestimmten Gens in unterschiedlichen Geweben in einen funktionellen Kontext gebracht werden.

Ein Beispiel für die Kombination von Expressionsanalysen und funktionellen Screening-Daten stellt nachfolgender Vergleich dar. Die Liste der gemeinsam herunter regulierten Gene beider resistenten Zelllinien wurde mit einer Liste von Genen aus einem funktionellen Screen verglichen, die nach Überexpression in HEK 293 Zellen Apoptose induzierten. Dies sollte Auskunft darüber geben, inwieweit die Regulation Apoptose induzierender Gene bei der Entstehung der Resistenz eine Rolle spielten.

Auch wenn akute Stimulation mit H_2O_2 (90-100 μM) HT-22 Zellen vermehrt in den nekrotischen Zelltod schicken (Abb. 5.14), so könnte bei einer moderaten Stimulation (18 μM), die für die Erzeugung der resistenten Klone verwendet wurde, die Regulation Apoptose induzierender Gene durchaus eine Strategie sein, um sich an die Selektionsbedingungen anzupassen. Zumal bei einer Stimulation mit niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen das Verhältnis der apoptotischen zu den nekrotischen Zellen deutlich höher war, als bei Stimulation mit hohen Konzentrationen (Abb. 5.14).

Zu diesem Zweck wurde auf eine Datenbank humaner Gene bzw. cDNAs zurückgegriffen, deren transiente Transfektion in drei unabhängigen Versuchsreihen in HEK 293 Zellen Apoptose induzierten. Der apoptotische Phänotyp wurde dabei sowohl optisch als auch biochemisch durch den Grad der DNA Fragmentierung im CDD-Test bestätigt. Der Vergleich identifizierte 9 Gene, die eine gemeinsame Schnittmenge darstellten. Ein Vergleich der Apoptose Datenbank mit den stark exprimierten Genen identifizierte lediglich ein gemeinsames Gen.

Zur Bestätigung der Expressionsdaten wurden für eine Stichprobe der 9 Gene Q-PCR Analysen durchgeführt. Die Primerpaare wurden dabei so gewählt, dass sie den Sequenzbereich abdeckten, der auch für die Affymetrix Chip-Analysen verwendet wurde.

Als Ausgangsmaterial diente RNA aus drei H_2O_2 - und zwei Glutamat-resistenten Klonen. Aus technischen Gründen konnte dabei nicht auf die RNA zurückgegriffen werden, die für die Affymetrix Experimente verwendet wurde, wodurch aus den Ergebnissen der Q-PCR-Experimente nur qualitative Aussagen getroffen werden konnten. Eine im Vergleich zu den Kontrollzellen verminderte Expression konnte dabei für vier der fünf getesteten Gene durch Q-PCR-Daten bestätigt werden. Für EMP3 und PIP2 war ein Zusammenhang mit Apoptose bereits bekannt. EMP3 ist ein Membranprotein, welches verstärkt in der Leber, dem Ovarium und in peripheren Blut Leukozyten exprimiert (Taylor et al. 1996). Konstitutive Überexpression von EMP3 in HEK 293 Zellen induziert sowohl die Bildung von apoptotischen Körperchen, eine positive AnnexinV-Färbung und einen Kaspasen abhängigen Zelltod (Wilson et al. 2002). Wichtig dabei ist die Bindung an die für die Bildung von apoptotischen Körperchen verantwortliche C-terminale Domäne in P2X(7) Rezeptoren. Da diese Rezeptoren auch vermehrt bei Neuronen vorkommen (Wakamori et al. 2004), könnte eine verminderte Expression von EMP3 durchaus Relevanz bei der Vermittlung von Resistenzen besitzen.

PIP2 ist ein integrales Membranprotein mit 4 putativen Transmembrandomänen und ist ursprünglich bei der Differenzierung des Darmepitheliums beschrieben worden (Oliva et al. 1993). In Expressionsanalysen mit apoptotischen Neuronen zeigt PIP3 jedoch eine starke Hochregulation (Chiang et al. 2001). Übereinstimmend dazu resultierte Überexpression in HEK 293 Zellen in der Induktion von Apoptose, die jedoch erst nach 48 h Expression detektiert werden konnte. Inwieweit eine verminderte Expression zur Resistenz in HT-22 Zellen beiträgt, muss in weiterführenden Experimenten evaluiert werden.

Ein weiteres interessantes Gen, dessen Expression in Glutamat- und H_2O_2 -resistenten Zellen stark reduziert wurde, war SLC4A2 oder AE2. AE2 kodiert für einen Membrangebundenen ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) Austauscher. AE2 ist ubiquitär lokalisiert und reguliert die Aufrechterhaltung sowohl des Zellvolumens als auch des intrazellulären pH-Wertes (Turi et al. 2002). Zusätzlich zu diesen regulatorischen Funktionen sorgt AE2 für den Austausch von Superoxid Anionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) mit extrazellulärem Bikarbonat (HCO_3^-). Extrazelluläres Superoxid induzierte jedoch enorme Zellschädigungen in Lungenepithelien und Lungengeweben in einem *in vitro* Experiment mit künstlich durchbluteten Lungen. Hemmung durch spezifische AE-Inhibitoren reduzierte dabei die durch oxidativen Stress induzierten Schäden (Nozik-Grayck et al. 1997).

In Q-PCR-Experimenten wurde gezeigt, dass die Expression von AE2 durch oxidativen Stress induziert werden konnte (Turi et al. 2002), was einen Gegensatz zu den in dieser Arbeit gefundenen Expressionsdaten darstellte. Kinetik Studien zeigten jedoch auch, dass diese Induktion der Expression lediglich bei kurz andauerndem oxidativem Stress gegeben war. Bei Stimulation über einen längeren Zeitraum, welcher bei dem hier verwendeten Selektionsdruck vorhanden war, konnte keine gesteigerte Expression mehr nachgewiesen werden (Turi et al. 2002). Eine aktiv verminderte Regulation könnte somit einen Schutz vor oxidativem Stress bedeuten. Somit wäre die verminderte Expression von AE2 auch ohne die Apoptosehypothese erklärbar.

Das am stärksten Apoptose induzierende Gen in HEK 293 Zellen war SLC25A1 (Abb. 5.25). Hierbei handelte es sich um ein Transporterprotein, das in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und für den Transport von Bi- und Tricarboxylaten, wie Citrat und Malat durch die innere Mitochondrienmembran mit verantwortlich ist (Kaplan et al. 1993). *In vivo* Experimente in Ratten demonstrierten einen Zusammenhang zwischen Fehlregulation von Tricarboxylat Transportern nach Behandlung mit Bleinitrat ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) und einer temporären Apoptoseinduktion in Hepatozyten (Dini et al. 1999). Nachfolgende Experimente zeigten, dass für die Induktion von Apoptose in Hepatozyten durch Bleinitrat eventuell sekretorische Faktoren aus Kupffer Zellen verantwortlich waren, die oxidativen Stress in Hepatozyten induzierten (Pagliara et al. 2003). Unter Hungerbedingungen konnte zusätzlich eine 40 % Reduktion im Expressionsspiegel von Citrat- Transportern nachgewiesen werden (Siculella et al. 2002). Inwieweit die in dieser Arbeit beschriebene verminderte Expression von SLC25A1 zur Resistenz gegenüber H_2O_2 und Glutamat in neuronalen Zellen beitrug, muss in weiteren Experimenten evaluiert werden.

Bei den restlichen fünf Genen handelte es sich entweder um Rezeptor-Regulatoren, Membran assoziierte Marker oder Membrankanäle bzw. Transporter (Brugnara 1997; Lemons et al. 1997; Montano et al. 1999; Whiteheart et al. 1993), für die weder Hinweise auf eine Regulation durch oxidativen Stress bekannt waren noch ein direkter Zusammenhang mit Apoptose bestand. Trotzdem zeigten sie nach Überexpression in HEK 293 Zellen deutliche optische als auch biochemische Merkmale der Apoptose. Um auszuschließen, dass es sich dabei um Nebeneffekte der Überexpression handelte, müssten noch weitere Apoptose spezifische Merkmale, wie die Aktivierung von Kaspasen oder die Freisetzung von Cytochrom C experimentell bestätigt werden.

Des Weiteren wäre zu untersuchen, inwieweit eine verminderte Expression dieser Gene auch *in vivo* Modellen auftritt, speziell in Geweben, die Resistenz gegenüber oxidativem Stress besitzen.

6.4 Zukünftige Versuche

Ziel dieser Arbeit war es, neue Gene bzw. cDNAs zu identifizieren, die einen Schutz vor oxidativem Stress vermittelten und somit neue Ansätze für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer liefern. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt, die zum einen Veränderungen im Grad der Expression von Zellen, die resistent gegenüber oxidativem Stress waren, mit dem Grad der Expression nicht resistenter Zellen verglichen, um daraus Rückschlüsse auf die Regulation resistenzrelevanter Gene bzw. Signalwege zu gewinnen. Dieser Ansatz lieferte eine Vielzahl von Veränderungen im Expressionsspiegel, deren Bedeutung für den Zelltod bei Morbus Alzheimer oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen es noch näher zu untersuchen gilt. Zunächst müsste ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen im Grad der Expression lediglich um Nebeneffekte der Langzeitbehandlung mit H₂O₂ oder Glutamat handelte. Hinweise auf Parallelen im Expressionsmuster bei Erkrankungen wie Morbus Alzheimer könnten Untersuchungen an post mortem Gewebe von Alzheimer-Patienten geben.

Anschließend sollten die auf transkriptioneller-Ebene beobachteten Effekte auf Proteom-Ebene bestätigt und dabei besonderes Augenmerk auf die Aktivität der Proteine gelegt werden. Nach den *in vitro* Experimenten sollten *in vivo* Tiermodelle folgen die entweder Kandidatengene überexprimieren oder aber deren Expression verhindern. Dies könnte klären, inwieweit diese Gene Einfluss auf den Grad der Neurodegeneration nach Induktion von oxidativem Stress haben. Spezifische Tiermodelle, die zu neurodegenerativen Erkrankungen ähnliche Pathologie aufweisen, wie APP-Doppelmutanten (Lewis et al. 2001), könnten noch krankheitsrelevantere Daten liefern.

Der zeitlich intensivste Schritt dabei wäre die Identifikation der relevanten Gene aus der Vielzahl der nicht direkt relevanten Gene. Dieser zeitlimitierende Faktor wurde im zweiten hier beschriebenen

Ansatz vermieden. Durch die in dieser Arbeit entwickelte Screening-Methode gelang es Gene zu identifizieren, welche nach Überexpression *in vitro* einen Schutz vor oxidativem Stress vermitteln.

Es konnte somit ein direkter Zusammenhang zwischen Überexpression und Funktion hergestellt werden. Mit diesen Genen könnten sofort Tiermodelle gestartet werden, die den Effekt der Überexpression auf den Grad der Neurodegeneration nach Induktion von oxidativem Stress definieren. Anschließend könnte mit der Aufklärung der mechanistischen Wirkungsweise der Gene begonnen werden. Um die Zahl der relevanten Gene zu erhöhen, könnten auch krankheitsspezifische cDNA-Bibliotheken oder Kollektionen getestet werden, z.B. Bibliotheken die aus Gehirnregionen von Alzheimer-Patienten gewonnen wurden, die eine natürliche Resistenz gegenüber A β -induziertem Zelltod besaßen.

Für therapeutische Zwecke sind mit den hier gewonnenen Daten mehrere Ansätze denkbar.

Da die Überexpression dieser Gene einen „Funktionsgewinn“ vermittelt, müsste nach niedermolekularen chemischen Verbindungen gesucht werden, die sowohl Blut-Hirn-Schrankengängig sind, als auch eine Aktivierung der Gene bzw. deren induzierte Signalwege zur Folge hätte.

Am exemplarischen Modell von Nrf2 könnten dies Aktivatoren der Protein Kinase C, der MAP Kinase bzw. der Phosphatidylinositol 3 Kinase sein, da diese Nrf2 aktivieren. Die Aktivierung von Nrf2 könnte aber auch über die Inaktivierung des zytoplasmatischen Inhibitors Keap1 (Itoh et al. 1999; Nguyen et al. 2003) erfolgen. Im Zellkern assoziiert Nrf2 mit weiteren Transkriptionsfaktoren, die entweder positiven oder hemmenden Einfluss auf die Transkription ARE-regulierter Gene haben. Hemmenden Einfluss auf die Transkription üben dabei z.B. Heterodimere aus Nrf2 und MafK/G aus (Dhakshinamoorthy & Jaiswal 2000). Niedermolekulare chemische Verbindungen die diese Interaktion hemmen, könnten die Transkription ARE-regulierender Gene positiv beeinflussen. Nrf2 wird *in vitro* schnell von Proteosomen abgebaut. Phosphorylierung von Nrf2 stabilisiert das Protein und verstärkt so die transkriptionelle Aktivität (Huang et al. 2002).

Neben der positiven Regulation von Aktivatoren, bzw. der negativen Regulation von Inhibitoren wären somit auch solche Chemikalien von therapeutischem Nutzen, welche die Stabilität der Proteine positiv beeinflussen.

7 Referenzen

- About a peculiar disease of the cerebral cortex. By Alois Alzheimer, 1907 (Translated by L. Jarvik and H. Greenson). *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1987; 1 (1):3-8.
- Alam J, Stewart D, Touchard C et al. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 1999; 274 (37):26071-8.
- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992; 13 (3):637-48.
- Allen JW, Shanker G, Aschner M. Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Res* 2001; 894 (1):131-40.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (17):7915-22.
- Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K et al. Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* 1999; 147 (2):277-94.
- Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57 (13-14):1825-35.
- Barry MA, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300 (1):440-50.
- Behl C, Davis J, Cole GM et al. Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186 (2):944-50.
- Behl C, Davis JB, Klier FG et al. Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res* 1994a; 645 (1-2):253-64.
- Behl C, Davis JB, Lesley R et al. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 1994b; 77 (6):817-27.
- Behl C, Holsboer F. [Oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease and antioxidant neuroprotection]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1998; 66 (3):113-21.
- Bergmeyer HU. [Measurement of catalase activity]. *Biochem Z* 1955; 327 (4):255-8.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92 (16):7162-6.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991; 82 (4):239-59.
- Breimer LH. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinog* 1990; 3 (4):188-97.

- Brodie AE, Reed DJ. Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148 (1):120-5.
- Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46:223-34.
- Brugnara C. Erythrocyte membrane transport physiology. *Curr Opin Hematol* 1997; 4 (2):122-7.
- Bruno MK, Khairallah EA, Cohen SD. Inhibition of protein phosphatase activity and changes in protein phosphorylation following acetaminophen exposure in cultured mouse hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 153 (1):119-32.
- Burt DJ, Gruden G, Thomas SM et al. P38 mitogen-activated protein kinase mediates hexosamine-induced TGFbeta1 mRNA expression in human mesangial cells. *Diabetologia* 2003; 46 (4):531-7.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI et al. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977; 180 (2):248-57.
- Chae HZ, Robison K, Poole LB et al. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91 (15):7017-21.
- Chambers I, Frampton J, Goldfarb P et al. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *Embo J* 1986; 5 (6):1221-7.
- Chan K, Han XD, Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (8):4611-6.
- Chan K, Kan YW. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (22):12731-6.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59 (3):527-605.
- Chen L, Richardson JS, Caldwell JE et al. Regional brain activity of free radical defense enzymes in autopsy samples from patients with Alzheimer's disease and from nondemented controls. *Int J Neurosci* 1994; 75 (1-2):83-90.
- Chen XL, Varner SE, Rao AS et al. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem* 2003; 278 (2):703-11.
- Chiang LW, Grenier JM, Ettwiller L et al. An orchestrated gene expression component of neuronal programmed cell death revealed by cDNA array analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (5):2814-9.
- Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP et al. Linkage analysis of susceptibility to hyperoxia. Nrf2 is a candidate gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26 (1):42-51.
- Citron M. Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Mol Med Today* 2000; 6 (10):392-7.

- Claiborne A, Mallett TC, Yeh JI et al. Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. *Adv Protein Chem* 2001; 58:215-76.
- Cohen G. The brain on fire? *Ann Neurol* 1994; 36 (3):333-4.
- Cooksey RC, Hebert LF, Jr., Zhu JH et al. Mechanism of hexosamine-induced insulin resistance in transgenic mice overexpressing glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase: decreased glucose transporter GLUT4 translocation and reversal by treatment with thiazolidinedione. *Endocrinology* 1999; 140 (3):1151-7.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262 (5134):689-95.
- Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ et al. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1993; 160 (1):81-8.
- Dargusch R, Schubert D. Specificity of resistance to oxidative stress. *J Neurochem* 2002; 81 (6):1394-400.
- Datta K, Babbar P, Srivastava T et al. p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34 (2):148-57.
- Davis JB, Maher P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res* 1994; 652 (1):169-73.
- de Haan JB, Bladier C, Griffiths P et al. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1998; 273 (35):22528-36.
- De Haan JB, Crack PJ, Flentjar N et al. An imbalance in antioxidant defense affects cellular function: the pathophysiological consequences of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse. *Redox Rep* 2003; 8 (2):69-79.
- De Marchena O, Guarnieri M, McKhann G. Glutathione peroxidase levels in brain. *J Neurochem* 1974; 22 (5):773-6.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 391 (6665):387-90.
- DeHaven JE, Robinson KA, Nelson BA et al. A novel variant of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-1 (GFAT1) mRNA is selectively expressed in striated muscle. *Diabetes* 2001; 50 (11):2419-24.
- Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK. Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem* 2000; 275 (51):40134-41.
- Dini L, Giudetti AM, Ruzittu M et al. Citrate carrier and lipogenic enzyme activities in lead nitrate-induced proliferative and apoptotic phase in rat liver. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47 (4):607-14.
- Docagne F, Nicole O, Gabriel C et al. Smad3-dependent induction of plasminogen activator inhibitor-1 in astrocytes mediates neuroprotective activity of transforming growth factor-beta 1 against NMDA-induced necrosis. *Mol Cell Neurosci* 2002; 21 (4):634-44.

- Du XL, Edelstein D, Rossetti L et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97 (22):12222-6.
- Durkin JP, Tremblay R, Chakravarthy B et al. Evidence that the early loss of membrane protein kinase C is a necessary step in the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J Neurochem* 1997; 68 (4):1400-12.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11 (1):81-128.
- Esworthy RS, Ho YS, Chu FF. The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys* 1997; 340 (1):59-63.
- Fadeel B. Plasma membrane alterations during apoptosis: role in corpse clearance. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6 (2):269-75.
- Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 1992; 32 (6):804-12.
- Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 1990; 62 (6):670-9.
- Favreau LV, Pickett CB. The rat quinone reductase antioxidant response element. Identification of the nucleotide sequence required for basal and inducible activity and detection of antioxidant response element-binding proteins in hepatoma and non-hepatoma cell lines. *J Biol Chem* 1995; 270 (41):24468-74.
- Fraaije MW, Roubroeks HP, Hagen WR et al. Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur J Biochem* 1996; 235 (1-2):192-8.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47 (5):412-26.
- Fridovich I, Handler P. Detection of free radicals generated during enzymic oxidations by the initiation of sulfite oxidation. *J Biol Chem* 1961; 236:1836-40.
- Fujii J, Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* 2002; 7 (3):123-30.
- Gajewski E, Dizdaroglu M. Hydroxyl radical induced cross-linking of cytosine and tyrosine in nucleohistone. *Biochemistry* 1990; 29 (4):977-80.
- Geiben-Lynn R, Kursar M, Brown NV et al. HIV-1 antiviral activity of recombinant natural killer cell enhancing factors, NKEF-A and NKEF-B, members of the peroxiredoxin family. *J Biol Chem* 2003; 278 (3):1569-74.
- Gilbert D. From the Breath of Life to Reactive Oxygen Species. In: Ga Colton, editor, translator and editor *Reactive Oxygen Species in biological Systems*. New York: Plenum Publisher; 1999; p. 3-27.
- Giulivi C, Cadenas E. The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366 (3):265-74.

- Goins WF, Lee KA, Cavalcoli JD et al. Herpes simplex virus type 1 vector-mediated expression of nerve growth factor protects dorsal root ganglion neurons from peroxide toxicity. *J Virol* 1999; 73 (1):519-32.
- Gomez-Isla T, Hollister R, West H et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1997; 41 (1):17-24.
- Gouaze V, Andrieu-Abadie N, Cuvillier O et al. Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277 (45):42867-74.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36 (1):59-74.
- Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 1998; 8 (7):267-71.
- Haass C, De Strooper B. The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key. *Science* 1999; 286 (5441):916-9.
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999; 31 (4):261-72.
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 10:5-12.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246 (2):501-14.
- Hartl FU, Martin J. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 1995; 5 (1):92-102.
- Hastings TG. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J Neurochem* 1995; 64 (2):919-24.
- He CH, Gong P, Hu B et al. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem* 2001; 276 (24):20858-65.
- Hebert LF, Jr., Daniels MC, Zhou J et al. Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J Clin Invest* 1996; 98 (4):930-6.
- Heck S, Lezoualc'h F, Engert S et al. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 1999; 274 (14):9828-35.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75 (2):241-51.
- Housset B, Ody C, Rubin DB et al. Oxygen toxicity in cultured aortic endothelium: selenium-induced partial protective effect. *J Appl Physiol* 1983; 55 (2):343-52.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 2002; 277 (45):42769-74.

- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97 (23):12475-80.
- Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J Exp Biol* 2002; 40 (11):1233-9.
- Ishibashi N, Prokopenko O, Reuhl KR et al. Inflammatory response and glutathione peroxidase in a model of stroke. *J Immunol* 2002; 168 (4):1926-33.
- Ishii T, Itoh K, Takahashi S et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275 (21):16023-9.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; 13 (1):76-86.
- James LR, Tang D, Ingram A et al. Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB- dependent promoter activation. *Diabetes* 2002; 51 (4):1146-56.
- Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J et al. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* 1988; 242 (4885):1566-70.
- Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B et al. Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (6):2642-7.
- Kang KW, Lee SJ, Park JW et al. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol* 2002; 62 (5):1001-10.
- Kaplan RS, Mayor JA, Wood DO. The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins. *J Biol Chem* 1993; 268 (18):13682-90.
- Katoh Y, Itoh K, Yoshida E et al. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* 2001; 6 (10):857-68.
- Kayanoki Y, Fujii J, Islam KN et al. The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. *J Biochem (Tokyo)* 1996; 119 (4):817-22.
- Kelner MJ, Bagnell RD, Ugluk SF et al. Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase affords cellular resistance to paraquat. *Arch Biochem Biophys* 1995; 323 (1):40-6.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26 (4):239-57.
- Kim K, Kim IH, Lee KY et al. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem* 1988; 263 (10):4704-11.
- Kim SH, Fountoulakis M, Cairns N et al. Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 2001; (61):223-35.

- Knoops B, Clippe A, Bogard C et al. Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. *J Biol Chem* 1999; 274 (43):30451-8.
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A et al. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998; 101 (1):160-9.
- Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47 (6):859-66.
- Krapfenbauer K, Engidawork E, Cairns N et al. Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res* 2003; 967 (1-2):152-60.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18 (1):44-51.
- Lange KW, Youdim MB, Riederer P. Neurotoxicity and neuroprotection in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 1992; 38:27-44.
- Lee AY, Chung SK, Chung SS. Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92 (7):2780-4.
- Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *Faseb J* 1999; 13 (1):23-30.
- Leist M, Nicotera P. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236 (1):1-9.
- Lemons PP, Chen D, Bernstein AM et al. Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood* 1997; 90 (4):1490-500.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001; 293 (5534):1487-91.
- Lezoualc'h F, Sagara Y, Holsboer F et al. High constitutive NF-kappaB activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells. *J Neurosci* 1998; 18 (9):3224-32.
- Lindholm D, Hengerer B, Zafra F et al. Transforming growth factor-beta 1 stimulates expression of nerve growth factor in the rat CNS. *Neuroreport* 1990; 1 (1):9-12.
- Maher P. How protein kinase C activation protects nerve cells from oxidative stress-induced cell death. *J Neurosci* 2001; 21 (9):2929-38.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146 (1):3-15.
- Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA et al. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurosci* 1995; 15 (9):6239-49.
- Marty MS, Atchison WD. Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 147 (2):319-30.
- Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1 (2):120-9.

- McKnight GL, Mudri SL, Mathewes SL et al. Molecular cloning, cDNA sequence, and bacterial expression of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J Biol Chem* 1992; 267 (35):25208-12.
- Meraji S, Abuja PM, Hayn M et al. Relationship between classic risk factors, plasma antioxidants and indicators of oxidant stress in angina pectoris (AP) in Tehran. *Atherosclerosis* 2000; 150 (2):403-12.
- Metodiowa D, Koska C. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotox Res* 2000; 1 (3):197-233.
- Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957; 229 (1):189-97.
- Mirault ME, Tremblay A, Beaudoin N et al. Overexpression of seleno-glutathione peroxidase by gene transfer enhances the resistance of T47D human breast cells to clastogenic oxidants. *J Biol Chem* 1991; 266 (31):20752-60.
- Moinova HR, Mulcahy RT. An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J Biol Chem* 1998; 273 (24):14683-9.
- Moinova HR, Mulcahy RT. Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261 (3):661-8.
- Montano MM, Ekena K, Delage-Mourroux R et al. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (12):6947-52.
- Morimoto BH, Koshland DE, Jr. Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87 (9):3518-21.
- Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A et al. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 1989; 2 (6):1547-58.
- Naganuma A, Miura N, Kaneko S et al. GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Faseb J* 2000; 14 (7):968-72.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC et al. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278 (7):4536-41.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404 (6779):787-90.
- Nohl H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *Br Med Bull* 1993; 49 (3):653-67.
- Nozik-Grayck E, Piantadosi CA, van Adelsberg J et al. Protection of perfused lung from oxidant injury by inhibitors of anion exchange. *Am J Physiol* 1997; 273 (2 Pt 1):L296-304.

- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C et al. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *Embo J* 1993; 12 (9):3679-84.
- Ody C, Junod AF. Effect of variable glutathione peroxidase activity on H₂O₂-related cytotoxicity in cultured aortic endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985; 180 (1):103-11.
- Okada S. Iron-induced tissue damage and cancer: the role of reactive oxygen species-free radicals. *Pathol Int* 1996; 46 (5):311-32.
- Oki T, Yamazaki K, Kuromitsu J et al. cDNA cloning and mapping of a novel subtype of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT2) in human and mouse. *Genomics* 1999; 57 (2):227-34.
- Oliva MM, Wu TC, Yang VW. Isolation and characterization of a differentiation-dependent gene in the human colonic cell line HT29-18. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302 (1):183-92.
- Pagliara P, Carla EC, Caforio S et al. Kupffer cells promote lead nitrate-induced hepatocyte apoptosis via oxidative stress. *Comp Hepatol* 2003; 2 (1):8.
- Peitsch MC, Polzar B, Stephan H et al. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *Embo J* 1993; 12 (1):371-7.
- Pietsch EC, Chan JY, Torti FM et al. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J Biol Chem* 2003; 278 (4):2361-9.
- Plaisant F, Clippe A, Vander Stricht D et al. Recombinant peroxiredoxin 5 protects against excitotoxic brain lesions in newborn mice. *Free Radic Biol Med* 2003; 34 (7):862-72.
- Pogocki D. Alzheimer's beta-amyloid peptide as a source of neurotoxic free radicals: the role of structural effects. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2003; 63 (2):131-45.
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003; 66 (8):1499-503.
- Prehn JH, Peruche B, Unsicker K et al. Isoform-specific effects of transforming growth factors-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *J Neurochem* 1993; 60 (5):1665-72.
- Reid TJ, 3rd, Murthy MR, Sicignano A et al. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78 (8):4767-71.
- Richardson JS. Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 695:73-6.
- Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994; 65 (1):27-33.
- Rocha ER, Smith CJ. Regulation of *Bacteriodes fragilis* katB mRNA by oxidative stress and carbon limitation. *J Bacteriol* 1997; 179 (22):7033-9.
- Rossetti L, Hawkins M, Chen W et al. In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *J Clin Invest* 1995; 96 (1):132-40.

- Rushmore TH, Pickett CB. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 1990; 265 (24):14648-53.
- Sagara Y, Dargusch R, Chambers D et al. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1998; 24 (9):1375-89.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239 (4839):487-91.
- Saito A, Narasimhan P, Hayashi T et al. Neuroprotective role of a proline-rich Akt substrate in apoptotic neuronal cell death after stroke: relationships with nerve growth factor. *J Neurosci* 2004; 24 (7):1584-93.
- Sarafian T, Verity MA. Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. *Int J Dev Neurosci* 1991; 9 (2):147-53.
- Saran M, Bors W. Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free Radic Res Commun* 1989; 7 (3-6):213-20.
- Satoh T, Nakatsuka D, Watanabe Y et al. Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 2000; 288 (2):163-6.
- Savill J, Fadok V, Henson P et al. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14 (3):131-6.
- Sayeski PP, Kudlow JE. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem* 1996; 271 (25):15237-43.
- Schabitz WR, Sommer C, Zoder W et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke* 2000; 31 (9):2212-7.
- Schäfer M, Goodenough S, Moosmann B et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Brain Res* 2004; 1005 (1-2):84-9.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 1991; 10 (8):2247-58.
- Schubert D, Behl C, Lesley R et al. Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92 (6):1989-93.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53 (5):438-47.
- Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 1999; 399 (6738 Suppl):A23-31.
- Seo J, Kim M, Kim J. Identification of novel genes differentially expressed in PMA-induced HL-60 cells using cDNA microarrays. *Mol Cells* 2000; 10 (6):733-9.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 1992; 359 (6393):325-7.

- Shau H, Kim A. Identification of natural killer enhancing factor as a major antioxidant in human red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199 (1):83-8.
- Shen C, Nathan C. Nonredundant antioxidant defense by multiple two-cysteine peroxiredoxins in human prostate cancer cells. *Mol Med* 2002; 8 (2):95-102.
- Sichak SP, Dounce AL. Analysis of the peroxidatic mode of action of catalase. *Arch Biochem Biophys* 1986; 249 (2):286-95.
- Siculella L, Sabetta S, di Summa R et al. Starvation-induced posttranscriptional control of rat liver mitochondrial citrate carrier expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299 (3):418-23.
- Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36:83-106.
- Smith MA, Harris PL, Sayre LM et al. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (18):9866-8.
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM et al. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 1987; 105 (3):1039-45.
- Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990; 9 (4):315-25.
- Stanciu M, Wang Y, Kentor R et al. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem* 2000; 275 (16):12200-6.
- Strausberg RL, Feingold EA, Klausner RD et al. The mammalian gene collection. *Science* 1999; 286 (5439):455-7.
- Sugiyama M, Tsuzuki K, Haramaki N. DNA single-strand breaks and cytotoxicity induced by sodium chromate(VI) in hydrogen peroxide-resistant cell lines. *Mutat Res* 1993; 299 (2):95-102.
- Tabner BJ, Turnbull S, El-Agnaf O et al. Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Curr Top Med Chem* 2001; 1 (6):507-17.
- Tan S, Schubert D, Maher P. Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr Top Med Chem* 2001; 1 (6):497-506.
- Tan S, Wood M, Maher P. Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J Neurochem* 1998; 71 (1):95-105.
- Taylor V, Suter U. Epithelial membrane protein-2 and epithelial membrane protein-3: two novel members of the peripheral myelin protein 22 gene family. *Gene* 1996; 175 (1-2):115-20.
- Terzenbach DP, Blaut M. Purification and characterization of a catalase from the nonsulfur phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1 and its role in the oxidative stress response. *Arch Microbiol* 1998; 169 (6):503-8.
- Trounce I, Byrne E, Marzuki S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet* 1989; 1 (8639):637-9.

- Tuan D, Solomon W, Li Q et al. The "beta-like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82 (19):6384-8.
- Turi JL, Jaspers I, Dailey LA et al. Oxidative stress activates anion exchange protein 2 and AP-1 in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283 (4):L791-8.
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R et al. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252:38-53.
- Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M et al. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* 2000; 130 (2-3):184-208.
- Vedder H, Teepker M, Fischer S et al. Characterization of the neuroprotective effects of estrogens on hydrogen peroxide-induced cell death in hippocampal HT22 cells: time and dose-dependency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108 (2):120-7.
- Veerababu G, Tang J, Hoffman RT et al. Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2000; 49 (12):2070-8.
- Veldhuis WB, Derksen JW, Floris S et al. Interferon-beta blocks infiltration of inflammatory cells and reduces infarct volume after ischemic stroke in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23 (9):1029-39.
- Vernet P, Rigaudiere N, Ghyselinck N et al. In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem Cell Biol* 1996; 74 (1):125-31.
- Vollenweider P, Clodi M, Martin SS et al. An SH2 domain-containing 5' inositolphosphatase inhibits insulin-induced GLUT4 translocation and growth factor-induced actin filament rearrangement. *Mol Cell Biol* 1999; 19 (2):1081-91.
- Wakamori M, Sorimachi M. Properties of native P2X receptors in large multipolar neurons dissociated from rat hypothalamic arcuate nucleus. *Brain Res* 2004; 1005 (1-2):51-9.
- Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992a; 61:1175-212.
- Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992b; 256 (5057):628-32.
- Weigert C, Friess U, Brodbeck K et al. Glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase enzyme activity is necessary for the induction of TGF-beta1 and fibronectin expression in mesangial cells. *Diabetologia* 2003; 46 (6):852-5.
- Weisbrodt-Lefkowitz M, Reuhl K, Perry B et al. Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 53 (1-2):333-8.
- Whiteheart SW, Griff IC, Brunner M et al. SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. *Nature* 1993; 362 (6418):353-5.
- Wild AC, Moinova HR, Mulcahy RT. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 1999; 274 (47):33627-36.
- Wilson HL, Wilson SA, Surprenant A et al. Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus. *J Biol Chem* 2002; 277 (37):34017-23.

- Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28 (1):32-40.
- Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11 (2):95-103.
- Yamashita H, Avraham S, Jiang S et al. Characterization of human and murine PMP20 peroxisomal proteins that exhibit antioxidant activity in vitro. *J Biol Chem* 1999; 274 (42):29897-904.
- Yamazaki K, Mizui Y, Oki T et al. Cloning and characterization of mouse glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 gene promoter. *Gene* 2000; 261 (2):329-36.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 1990; 250 (4978):279-82.
- Yoshida T, Maulik N, Engelman RM et al. Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation* 1997; 96 (9 Suppl):II-216-20.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74 (1):139-62.
- Yu R, Lei W, Mandlekar S et al. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* 1999; 274 (39):27545-52.
- Zhang F, Dryhurst G. Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *J Med Chem* 1994; 37 (8):1084-98.
- Zhang H, Jia Y, Cooper JJ et al. Common variants in glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFPT2) gene are associated with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and increased GFPT2 mRNA levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (2):748-55.
- Zhou Y, Kok KH, Chun AC et al. Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268 (3):921-7.

Curriculum vitae

Persönliche Daten	Name:	Jürgen Zitzler
	Geburtsdatum:	04.08.1975
	Geburtsort:	Immenstadt
Schulausbildung	September 1982- Juni 1986	Grundschule Bad-Oberdorf
	September 1986- Juni 1995	Mathematisch naturwissenschaftliches Gymnasium Sonthofen Abschluss: Abitur
Studium	Oktober 1996- August 1999	Universität Konstanz Diplomstudiengang Biologie
	August 1999- Juli 2000	State University of New York at Stony Brook Aufgenommen ins Masters Program Department of Microbiology and Genetics Abschluss: Master of Science
	November 2000- Nov. 2003	Ludwig-Maximilians-Universität, München Promotion bei der Xantos biomedicine AG