Aus der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

Funktionelle Charakterisierung eines neuen Proteins mit einer Superoxiddismutase-Domäne

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diamandis Toutzaris

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Axel Methner

Korreferent: Prof. Dr. med. Carsten Korth

„Wir haben das Glück, in einem Zeitalter zu leben, in dem noch immer Entdeckungen gemacht werden. Es ist wie mit der Entdeckung Amerikas- man kann es nur einmal entdecken.“

Richard Feynman, 1965

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

A novel giant peroxisomal superoxide dismutase motif-containing Protein

Toutzaris D, Lewerenz J, Albrecht P, Jensen LT, Letz J, Geerts A, Golz S, Methner A.

Free Radical Biology and Medicine, 15 March 2010; 48(6):811-820

I. Einleitung ..... - 1 -

A. Oxidativer Stress in degenerativen Erkrankungen des Nervensystems ..... - 1 -

1. M. Parkinson ..... - 3 -
2. M. Alzheimer ..... - 3 -
3. M. Huntington ..... - 3 -
4. Amyotrophe Lateralsklerose ..... - 4 -

B. Superoxiddismutasen als Schutz gegen oxidativen Stress ..... - 4 -

C. Glutamattoxizität- ein Modell zur Auslösung von Zelltod durch oxidativen Stress ..... - 6 -

D. Identifikation von TIGR ..... - 7 -

II. Ziel der Arbeit und Fragestellung ..... - 9 -

III. Material und Methoden ..... - 10 -

A. Material ..... - 10 -

1. Lösungen und Reagenzien ..... - 10 -
2. Restriktionsenzyme ..... - 11 -
3. Antikörper ..... - 11 -
4. Plasmide ..... - 11 -
5. Oligonukleotide ..... - 12 -
6. Zelllinien ..... - 13 -
7. Bakterienstämme ..... - 13 -
8. Zellkulturmedium ..... - 13 -
9. Bakterienmedium ..... - 14 -
10. Selektionsantibiotika ..... - 14 -

B. Methoden ..... - 15 -

1. Klonierung ..... - 15 -
2. Gelelektrophorese ..... - 16 -
3. Ligation ..... - 17 -
4. Herstellung kompetenter Bakterien ..... - 17 -
5. Transformation ..... - 18 -
6. Plasmidpräparation ..... - 18 -
7. DNA – Konzentrationsbestimmung ..... - 19 -
8. Kultivierung der Zelllinien ..... - 20 -
9. Transfektion ..... - 20 -
10. Mutation der TIGR – Sequenz ..... - 20 -
11. Zelltoxizitätsassay ..... - 21 -
12. SOD – Assay ..... - 21 -
13. Protein – Elektrophorese und Immunblot ..... - 22 -
14. Immunzytochemie ..... - 23 -

IV. Ergebnisse ..... - 24 -

A. Charakterisierung von TIGR ..... - 24 -

B. Expression im menschlichen Gewebe ..... - 26 -

C. TIGR schützt, im Gegensatz zur Mutation im SOD-Fragment, vor oxidativem Stress ..... - 26 -

D. TIGR erhöht die SOD-Aktivität in transfizierten Zellen ..... - 27 -

E. TIGR ist mit Katalase in Peroxisomen lokalisiert ..... - 28 -

V. Diskussion ..... - 31 -

A. Sind glutamatresistente HT22R-Zellen ein gutes Modell für oxidativen Zelltod? ..... - 31 -

B. Ist TIGR eine mögliche Superoxiddismutase?.....- 32 -

VI. Zusammenfassung.....- 34 -

VII. Literatur.....- 35 -

VIII. Danksagung.....- 39 -

IX. Lebenslauf.....- 40 -

I. Einleitung

A. Oxidativer Stress in degenerativen Erkrankungen des Nervensystems

Beim Aufkommen der ersten Lebewesen auf diesem Planeten konnten diese die Energiegewinnung zur Aufrechterhaltung des Lebens nicht mittels der Atmung gewährleisten, da Sauerstoff nur in geringsten Mengen in der Atmosphäre nachweisbar war. Die Energiegewinnung fand vielmehr unter Zuhilfenahme der Glykolyse statt. Erst im weiteren Verlauf, durch Anstieg des atmosphärischen Sauerstoffanteils auf nun 21%, entwickelten sich Lebewesen, welche im Gegensatz zu ihren anaeroben Vorgängern den Sauerstoff aktiv zur Energiegewinnung nutzen konnten. Diese aerobe Atmung spiegelt sich vor allem in der mitochondrialen Atmungskette der Zellen wieder, in der Glukose mittels elementaren Sauerstoffes vollständig zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert wird, wobei Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) synthetisiert wird.

Ein essentieller Schritt in der Entwicklung höherer Lebensformen ist die Nutzung der aeroben Energiegewinnung. Dieser Prozess geht allerdings mit vielen Gefahren einher, denen biologische Systeme im Umgang mit Sauerstoff gegenüberstehen. So vermögen Sauerstoff, und vor allem seine reaktionsfähigen Radikale, fast alle im lebenden Organismus vorkommenden Verbindungen durch Oxidation in der Funktion zu verändern und gar unbrauchbar zu machen. Es ist nicht verwunderlich, dass Sauerstoff für die ursprünglichen Lebensformen, die anaeroben Bakterien, toxisch ist. Zu diesen „reaktiven Sauerstoffspezies“ ROS (reactive oxygen species) gehören unter anderem die freien Radikale $OH^{\cdot}$ (Hydroxyl – Radikal), $ROO^{\cdot}$ (Peroxylradikal), $RO^{\cdot}$ (Alkoxylradikal) und vor allem das $O_2^{\cdot -}$ (Hyperoxid – Anion) sowie H_2O_2 (Sauerstoffperoxid) als Ausgangsstoff von ROS. Eine Vielzahl von Ursachen, die zur Entstehung von ROS beitragen, ist bekannt. Erwähnenswert sind physikalische Einflüsse wie UV-Licht, Gamma- und Röntgenstrahlen sowie toxische Faktoren wie beispielsweise Inhalation von Tabakrauch.

In Organismen werden ebenfalls ständig ROS gebildet; eine wichtige Rolle spielt hierbei die bereits erwähnte mitochondriale Atmungskette, insbesondere an den Komplexen I (NADH Dehydrogenase) und III (Ubiquinon – Cytochrom c Reduktase). So hat die Mehrheit der intrazellulär gebildeten ROS einen mitochondrialen Ursprung (Finkel and Holbrook, 2000) und weiterhin einen Schwerpunkt am Komplex III (Turrens, 1997). Hier entsteht als Zwischenschritt bei der Bildung des Ubiquinons das Semiquinon-Anion-Radikal, welches direkt und ohne enzymatische Katalyse Elektronen auf Sauerstoff überträgt und so nachfolgend Superoxidradikale bildet (Finkel and Holbrook, 2000).

Organismen stehen einer Vielfalt von ROS-induzierten Schäden gegenüber. So konnten durch DNA-Oxidation Schäden der Desoxyribose und der Basen nachgewiesen werden (Aust and Eveleigh, 1999). Peptidbindungen von Proteinen sind ein weiterer Angriffspunkt von ROS, wobei sowohl diese (Berlett and Stadtman, 1997), als auch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran (Finkel and Holbrook, 2000) gespalten werden können. Eine zelluläre Anhäufung von ROS und somit Schädigung der Zelle kann dann schließlich zur Apoptose, dem programmierten Zelltod der Zelle, führen (Johnson et al., 1996).

In Anbetracht der von den ROS ausgehenden Gefahren entwickelten sich verschiedene zelluläre Schutzmechanismen, um Schädigungen zu verhindern (Sies, 1993). Grob kann hierbei zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Mechanismen unterschieden werden. Zu den enzymatischen Abwehrmechanismen gehören die Superoxiddismutasen (SOD), die Superoxidionen zu Wasserstoffperoxid katalysieren, welches dann von der Katalase zu Wasser reduziert wird (Hodgson and Fridovich, 1975). Darauf soll im Weiteren näher eingegangen werden.

Zu den gängigsten Antioxidantien in Organismen gehört das Glutathion, ein Peptid bestehend aus Zystin, Glyzin und Glutamat, welches in allen menschlichen Zellen synthetisiert werden kann und in nahezu allen Zellen in hoher Konzentration vorkommt. Reduziertes Glutathion wird durch die Glutathionperoxidase oxidiert, wobei ebenfalls Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert wird. Die Gruppe der Glutathion-S-Transferasen gehört genauso zu den enzymatischen Antioxidantien, indem sie die Bildung von Thioether aus Glutathion und reaktiven Verbindungen katalysiert (Hayes and Pulford, 1995).

Bezüglich der nicht – enzymatischen Mechanismen sind vor allem die antioxidativen Wirkungen der Vitamine A, C und E zu erwähnen. Vitamin E (α-Tocopherol) beispielsweise ist fettlöslich und reagiert mit den Peroxylradikalen der Fettsäuren unter Bildung des Tocopherol-Radikals, welches wiederum mit Vitamin C (Ascorbinsäure) reagiert und diese so eliminiert.

Das menschliche Gehirn macht nur etwa 2% des Körpergewichtes aus, verbraucht aufgrund seiner hohen Stoffwechselrate jedoch über 20% des zur Verfügung stehenden Gesamtsauerstoffes (Ito et al. 2005); bei erhöhter Neuronenaktivität steigt der Bedarf. Dieser Umstand, zusammen mit der nur geringen Regenerationsfähigkeit des Nervensystems, erklärt die hohe Anfälligkeit des Gehirnes gegenüber Störungen im Gleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und den antioxidativen Mechanismen; die Folge ist oxidativer Stress und dadurch bedingte degenerative Erkrankungen, welche im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

1. M. Parkinson

Die Parkinson-Erkrankung ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen mit einer Prävalenz von etwa 0,1% der über 40jährigen in der Bevölkerung (Siderowf and Stern, 2003). Im klinischen Erscheinungsbild zeigt sich in erster Linie eine Bewegungsstörung mit Hypokinese, Tremor, Rigor und instabiler Körperhaltung (posturale Instabilität). Trotz großer Fortschritte in der Entwicklung therapeutischer Ansätze schreitet die Erkrankung auch unter Behandlung fort, da eine neuroprotektive oder neuroregenerative Therapie bislang nicht bekannt ist (Dawson and Dawson, 2002). Die Ätiologie der Erkrankung ist bislang ebenfalls unbekannt. Pathophysiologisch kommt es hierbei zu einem Untergang der nigrostriatalen Neuronen und so zu einem Dopaminmangel. Postmortale Studien am Menschen erheben den Verdacht, dass die Anhäufung von ROS eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielt (Jenner and Olanow, 1998; Schulz et al., 2000; Zhang et al., 2000). Weitere Studien zeigten diesbezüglich einen Zusammenhang mit einer Störung im Komplex I der mitochondrialen Atmungskette; so konnten sowohl in Hirnschnitten als auch in peripherem Gewebe eine bis zu 25%ige Reduktion der Komplex I - Aktivität nachgewiesen werden, welche, wie bereits erwähnt, zu einer Anreicherung von ROS und somit zum Zelltod führt (Orth and Schapira, 2002; Schapira et al., 1998; Sherer et al., 2002). Die Ursache der Aktivitätsminderung des Komplex I, ob nun genetisch oder durch Umwelteinflüsse erworben, ist unbekannt.

2. M. Alzheimer

Die Alzheimer-Erkrankung gehört ebenfalls zu den neurodegenerativen Erkrankungen mit einer steigenden Prävalenz im hohen Alter. Das Erscheinungsbild ist von einer Progredienz kognitiver Defizite und Demenz gezeichnet und führt innerhalb weniger Jahre nach Diagnosestellung zum Tode. Auch hier ist die Ätiologie nicht bekannt, eine Therapie ist nicht verfügbar. Neuropathologisch wegweisend sind eine Anreicherung von extrazellulärem Protein, dem β-Amyloid, und intrazellulären Neurofibrillenbündeln, bestehend aus dem Tau-Protein (Joachim and Selkoe, 1992). Inwieweit diese jedoch für den Krankheitsverlauf verantwortlich sind, bleibt umstritten. Rezente Studien gehen von einem erhöhten oxidativen Stress aus, noch bevor es zu einer Akkumulation von β-Amyloid bzw. Neurofibrillen kommt (Smith et al., 2000).

3. M. Huntington

Die Huntington-Erkrankung, oder auch Chorea Huntington, ist eine autosomal dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, welche meist um das 40. Lebensjahr erstmals in Erscheinung tritt und mit einer fortschreitenden choreatischen Bewegungsstörung sowie psychiatrischen Auffälligkeiten einhergeht. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach dem Auftreten der ersten Symptome beträgt ca. 15 Jahre, eine Heilung ist nicht möglich. Pathophysiologisch liegt eine erhöhte Wiederholungsrate des Trinukleotids CAG auf dem für das Protein Huntingtin kodierenden Gen vor, was zu eine verlängerte Polyglutamin-Einheit im Protein Huntingtin führt (1993). Eine zentrale Rolle bezüglich der Krankheitsprogression scheint aber auch hier die Bildung von ROS und der daraus folgende oxidative Stress zu spielen (Browne et al., 1997; Grunewald and Beal, 1999). Im betroffenen Hirngewebe zeigt sich v.a. eine erhöhte Menge an Lipofuszin (Braak and Braak, 1992; Tellez-Nagel et al., 1974), ein gelb-braunes intrazelluläres Pigment, welches auch Alterspigment genannt und bei oxidativem Stress vermehrt gebildet wird (Sohal and Brunk, 1989).

4. Amyotrophe Lateralsklerose

Bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) kommt es zu einer Schädigung der Motoneurone; folglich kommt es zu einer progredienten Schwäche und daraus resultierenden Gang-, Schluck-, Sprech- und Atemstörungen. Die Erkrankung führt etwa vier Jahre nach Diagnosestellung zum Tode; eine Therapie ist nicht bekannt. Etwa 10% der Erkrankungsfälle zeigen ein autosomal dominantes Erbmuster (Horton et al., 1976; Mulder et al., 1986), vom klinischen Verlauf ist diese familiäre ALS (FALS) nicht von der sporadischen Variante zu unterscheiden (Swerts and Van Den Bergh, 1976). In einer Studie an 13 Familien mit FALS konnten Daniel R. Rosen und Kollegen schließlich als gemeinsames Merkmal Mutationen in dem für die Superoxiddismutase 1 (SOD1) kodierenden Gen feststellen (Rosen et al., 1993). Wie bereits erwähnt, spielt die SOD eine wichtige Schlüsselrolle in der Eliminierung von oxidativem Stress. Inwieweit oxidativer Stress auch in der Pathogenese der sporadischen ALS eine Rolle spielt, ist weiterhin nicht bekannt.

B. Superoxiddismutasen als Schutz gegen oxidativen Stress

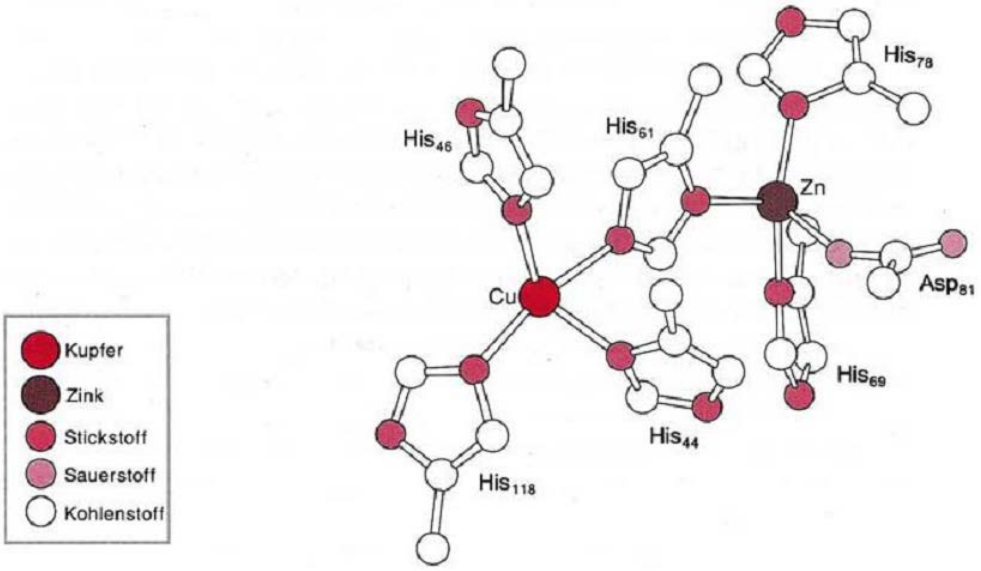
Das Enzym SOD wurde 1969 von McCord und Fridovich erstmals beschrieben(McCord and Fridovich, 1969) und gehört zu den enzymatischen Abwehrmechanismen, welche die Zelle und somit den Organismus vor oxidativem Stress schützen. SOD katalysiert die Reaktion $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$, wobei das Superoxidradikal $O_2^{\cdot -}$ ein freies Radikal ist, welches durch Zunahme eines Elektrons aus molekularem Sauerstoff entsteht. Bislang

konnten drei verschiedene Isoformen der SOD in Säugetierzellen beschrieben werden; die Isoformen unterscheiden sich aufgrund des Metalls in ihrem aktiven Zentrum und ihres Vorkommens im Organismus.

Die SOD1, oder auch Cu/Zn-SOD, ist vor allem im intrazellulären Cytosol, aber auch im Zellkern und in den Lysosomen lokalisiert, hat eine Molekülmasse von 32 kDA und enthält Kupfer und Zink im aktiven Zentrum (Chang et al., 1988; Crapo et al., 1992; Keller et al., 1991; Liou et al., 1993). Die zweite Isoform (SOD2 oder Mn-SOD) ist in den Mitochondrien der Zelle mit Mangan im aktiven Zentrum zu finden (Weisiger and Fridovich, 1973). Die Molekülgröße beträgt 23 kDa (Barra et al., 1984). Anfang der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts konnten Marklund und Kollegen in menschlichem Plasma, Lymphe und Liquor die dritte Isoform (SOD3), welche aufgrund ihres extrazellulären Vorkommens auch EC-SOD genannt wird, und 132 kDa Molekülgröße besitzt, beschreiben (Marklund, 1980; Marklund, 1982; Marklund et al., 1982). Auch hier findet sich Kupfer und Zink im aktiven Zentrum (Marklund, 1982). Außer auf der bereits eingegangenen FALS mit Mutationen in der SOD1 konnten Verbindungen zwischen pathologischer SOD-Aktivität und dem Auftreten verschiedener Erkrankungen wie benignen und malignen Brusterkrankungen (Afrasyap et al., 1998), diversen Leukämien (Gonzales et al., 1984) oder auch des hämorrhagischen Denguefiebers (Ray et al., 1999) festgestellt werden.

Trotz des unterschiedlichen Metallzentrums und der Lokalisation zeigen die SOD im molekularen Aufbau Gemeinsamkeiten: Die Metall-Ionen Kupfer und Zink, bzw. Mangan, werden von mehreren Histidinresten flankiert (Bannister et al., 1987). Die essentielle Aminosäure Histidin spielt als Ligand von Metallionenkomplexen eine wichtige Rolle in der Evolution. So ist Histidin auch in der Komplexierung des Eisenatoms im Blutfarbstoff Hämoglobin beteiligt.

Anhand dieser Eigenschaften des aktiven Zentrums lassen sich Proteinmotive, also Eigenschaften der Protein–Tertiärstruktur, der SOD definieren.



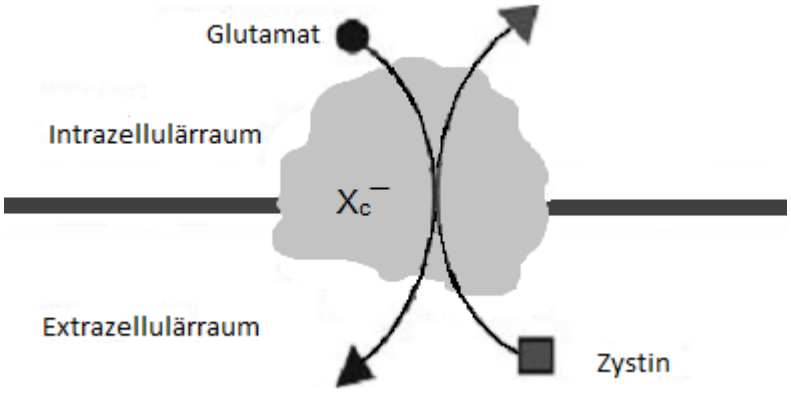
Die Struktur des aktiven Zentrums der SOD1 (aus: Lippard & Berg, Principles of Bioanorganic Chemistry 1994, S. 327)

C. Glutamattoxizität- ein Modell zur Auslösung von Zelltod durch oxidativen Stress

Im Hinblick der Bedeutsamkeit von oxidativem Stress in der Pathogenese der bereits erwähnten Erkrankungen kristallisierte sich die Notwendigkeit zur Etablierung eines In-vitro Modells heraus. Hierbei hat sich das Modell der oxidativen Glutamattoxizität bewährt (Albrecht et al., 2010; Tan et al., 2001).

Der Neurotransmitter L-Glutamat kommt im gesamten Gehirn in unterschiedlicher Konzentration vor. Eine exzessive Stimulation von Glutamatrezeptoren, wie sie beispielsweise bei ischämischen oder neurodegenerativen Prozessen vorkommt, führt zu einem massiven Kalziumeinstrom und folglich zum Zelltod (Choi, 1985). Diesem Prozess der Exzitotoxizität steht die oxidative Glutamattoxizität gegenüber: Außer als Neurotransmitter fungiert Glutamat zusammen mit Zystein und Glyzin als Bausteine für Glutathion (Griffith, 1999), einen bedeutenden Oxidationshemmer (Dringen and Hirrlinger, 2003). Glutathion überträgt aufgrund seiner freien Thiolgruppe Elektronen auf ROS und macht dies somit unschädlich (Cooper and Kristal, 1997). Der Zystin-Glutamat-Antiporter „System X_c^-“ transportiert im Verhältnis 1:1 Zystin in und Glutamat aus der Zelle (Bannai, 1986). Bei

erhöhter extrazellulärer Glutamatkonzentration wird das System X_c^- blockiert, so dass Zystin nicht in die Zelle gelangt, Glutathion nicht gebildet werden kann und so oxidativer Stress zum Zelltod führt. Diese oxidative Glutamattoxizität wurde 1989 erstmals in retinalen Neuroblastom-Zellen beschrieben (Murphy et al., 1989). Im Verlauf konnte dies auch in weiteren neuronalen Zelllinien nachgewiesen werden (Davis and Maher, 1994; Froissard et al., 1997; Schubert et al., 1992). Als nützlichste Zelllinie zur Untersuchung der oxidativen Glutamattoxizität erwies sich aufgrund ihrer diesbezüglich hohen Sensitivität jedoch die hippocampale Zelllinie HT22 der Maus (Albrecht et al., 2010; Ishige et al., 2001; Li et al., 1997; Maher, 2001; Tan et al., 1998).

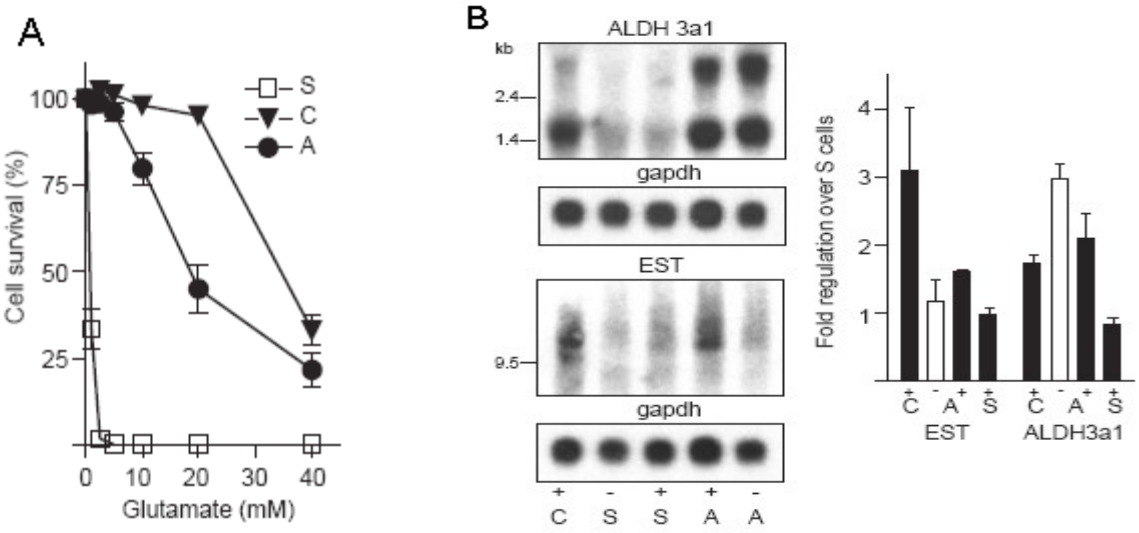


Der Zystin-Glutamat-Antiporter X_c^- transportiert im Verhältnis 1:1 Zystin in und Glutamat aus der Zelle

D. Identifikation von TIGR

In der Arbeitsgruppe wurde die hippokampale Zelllinie HT22 der Maus wiederholt toxischen Glutamatkonzentrationen unter Kultivierung der überlebenden Zellen ausgesetzt. Hieraus entstand so eine neue, glutamatresistente Zelllinie, welche HT22R genannt wurde (Dittmer et al., 2008; Lewerenz et al., 2006). Es stellte sich die Frage, inwieweit Änderungen in der Regulation von Transkripten verantwortlich für die Ausbildung der Glutamatresistenz sind. Mit Hilfe der Suppression Subtractive Hybridization, einem Verfahren, welches basierend auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) anhand einer Referenzprobe alle nicht bekannten Gene einer Experimentalprobe findet (Diatchenko et al., 1996), konnten in Vorarbeiten mehrere Transkripte isoliert werden, die im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie (HT22S) in der resistenten Linie (HT22R) hochreguliert waren (Lewerenz, 2003). Neben der bereits als Zellschutz bekannten Aldehyddehydrogenase-3 (ALDH3) (Townsend et al., 2001) war dies

ein bislang nicht näher charakterisiertes Gen mit einem 11.000 Basenpaar großem Signal im Northern-Blot, welches TIGR für „Transcript Increased in Glutamate Resistance“ genannt wurde (Lewerenz, 2003).



A) Das Zellüberleben in Prozent von HT22 Wildtypzellen [S], sowie von vorbehandelten HT22-Zellen (einerseits nach mehrmaligen kultivieren über 24 Stunden in hohen Glutamatkonzentration [A], andererseits bis 48 Stunden in hohen Glutamatkonzentrationen [C]), gemessen in einem MTT-Assay und normalisiert gegenüber unbehandelten Zellen. B) 5µg der jeweiligen RNA (+ mit Glutamat, - ohne Glutamat kultiviert), aufgetragen im Northern-Blot und mit Antisense-RNA von ALDH-3 bzw. des bislang nicht charakterisierten Transkripts EST (Expressed Sequence Tag) hybridisiert. Das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH dient als Kontrolle. Daneben die quantitative Analyse der Genregulierung, gemessen anhand der Bandenintensität (Lewerenz, 2003).

II. Ziel der Arbeit und Fragestellung

Oxidative Glutamattoxizität der neuronalen Zelllinie HT22 ist ein Modell für Zelltod durch oxidativen Stress, indem extrazelluläres Glutamat den Transport von Zystin in die Zelle hemmt und so die Bildung von Glutathion verhindert, welches die Zelle durch Eliminierung von ROS vor Zelltod durch oxidativen Stress schützt.

In HT22 Zellen, die chronisch oxidativem Stress ausgesetzt und somit resistent gegenüber Glutamat sind, wurde nach Hybridisierungs- und Screeningverfahren hochregulierte Transkripte gesucht, worunter sich ein bis dahin nicht beschriebenes Transkript fand, welches ein Protein mit einem SOD-Motiv und einer Gesamtgröße von 3440 Aminosäuren kodiert.

Ziel der Arbeit war es, dieses TIGR genannte Transkript (für „Transcript Increased in Glutamate Resistance“) näher zu charakterisieren.

Dabei sollte gezeigt werden, inwieweit die Hochregulierung von TIGR in Wildtyp-Zellen diese vor oxidativem Zelltod schützt. Weiterhin stellte sich die Frage, ob das enthaltene SOD-Motiv eine Rolle in einem eventuellen Zellschutz spielt und ob tatsächlich eine bislang nicht bekannte Superoxiddismutase vorliegt. Auch die intrazelluläre Lokalisation von TIGR und die Expression in unterschiedlichem Gewebe sollte ergründet werden.

Da oxidativer Stress und daraus resultierender Zelltod eine essentielle Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen spielt, stellt sich letztendlich die Frage, inwieweit eine Dysfunktion von TIGR hier ebenfalls einen Anteil hat.

III. Material und Methoden

A. Material

1. Lösungen und Reagenzien

- **FCS *(Fetal Calf Serum)***, Hersteller: Gibco®
- **Trypsin 0,5% (10X) mit EDTA**, Hersteller: Gibco®
- **RIPA – Puffer**, Hersteller: Sigma-Aldrich®
- **Protease – Inhibitor** „cOmplete ULTRA Tablets“, Hersteller: Roche®
- **PBS – Puffer *(Phosphate-Buffered Saline, 1X)***

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH_2PO_4	1,5 mM
Na_2HPO_4	7,4 mM

Dest. Wasser, pH 7.4

- **TBE – Puffer (Tris-Borate-EDTA, 10X)**

Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	10 mM

Dest. Wasser, pH 8.0

- **PBS-T**

PBS & 0,05% Tween®20, Hersteller: Sigma-Aldrich®

- **MTT – Solubilisierungs –Puffer**

Natriumlaurylsulfat (SDS)	20%

Dimetyhlformamid (DMF)	20%
Essigsäure	10%
Dest. Wasser, pH 4.0	

- **TELT – Puffer**

Tris-HCl	50 mM
EDTA	62,5 mM
Lithiumchlorid	2,5 M
Triton 100X	0,4 %
pH 8.0	

2. Restriktionsenzyme

Alle in der Arbeit benutzten Restriktionsenzyme stammen von dem Hersteller New England Biolabs® (NEB). Die diesbezüglich verwendeten Puffer (*SuRE/Cut Buffer A, B, L, M & H*) wurden von Roche® bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers benutzt.

3. Antikörper

- **Polyclonale Antisera gegen zwei verschiedene TIGR-Epitope** Aminosäuren 1-16 und 3147-3162 durch Immunisierung von Kanninchen mit den entsprechenden Peptiden, Hersteller: Eurogentec®.
- **Anti-Xpress-Antikörper™** (Invitrogen®); Monoklonaler Mausantikörper zur Bindung an die Aminosäurensequenz „Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys“
- **Anti-Katalase monoklonaler Antikörper** (Invitrogen®)

4. Plasmide

Gene	Vektor	Besonderheiten	Hersteller
Leervektor	pcDNA® 3.1 HIS B	Expressionsvektor mit Xpress® - Epitope; Resistenz gegen Geneticin®	Invitrogen®
TIGR	pDNR-1	Wildtyp	AG Methner; Vektor: Clontech®
β-Galaktosidase	pcDNA 3.1. HIS *lacZ*	Kontrollvektor	Invitrogen®
Leervektor	pGEM®-T Easy	Vektor mit T-Überhang zur PCR-Klonierung	Promega®
Leervektor	pENTR®-1A	Leervektor des Gateway®-Systems	Invitrogen®
EGFP	pDEST	Fluoreszierender Vektor zur Verwendung im Gateway®-Systems	AG Methner; Vektor: Invitrogen®

5. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech® bezogen.

Oligonukleotid	Sequenz
TIGR:5158U35	5´-CAC CGA GCG GCT GCC CTC ATT CTT AGC TCT TCT GG-3´
TIGR:5157L35	5´-CAG AAG AGC TAA GAA TGA GGG CAG CCG CTC GGT GC-3´
TIGR:4680U22	5´-CTG CCA CCT CTC TTC TTA CAC C-3´
TIGR:6583L22	5´-TCA GCT TGC AAT TCC GAA CCA G-3´

6. Zelllinien

- **N2a – Zelllinie (Maus – Neuroblastoma – Zellen)**

  Gebräuchliche, Neuroblastom-Zelllinie der Maus. Verwendet zur Transfektion der Plasmidkonstrukte und Durchführung der Zelltoxizitätsversuche.

- **HT22 – Zelllinie (Maus – Hippocampus – Zellen)**

  Hippocampuszellen der Maus; Verwendet wurde die Wildtyplinie (HT22-S) und die Subpopulation HT22-R, welche aufgrund von repetitiver Zugabe von Glutamat resistent gegenüber Glutamattoxizität ist.

7. Bakterienstämme

- **Escherichia coli DH5α – Stamm** ***(Genotyp: F' Phi80dlacZ DeltaM15 Delta (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+)phoA supE44 lambda-thi-1)***

  Zur Herstellung kompetenter Zellen und anschließender Transformation der Plasmide

- **One Shot® ccdB Survival™-T1R, Invitrogen®** ***(Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG tonA::Ptrc –ccdA)***

  Chemisch kompetenter Escherichia coli – Stamm zur Verwendung im Gateway-System (Invitrogen®); aufgrund des Genotyps resistent gegenüber dem ccdB-Gen (Bernard and Couturier, 1991; Salmon et al., 1994) und somit fähig zur Transformation mit ccdB- Gen enthaltenden Plasmidkonstrukten.

8. Zellkulturmedium

Zur Kultivierung der Zellen (N2a, HT22) wurde das Zellkulturmedium DMEM *(Dulbeccos modified eagle serum)* high Glucose (4,5 g/ml) des Herstellers PAA® mit Sitz in Pasching, Österreich verwendet. In das Medium zugegeben wurde FCS (10% zur Kultivierung der N2a-Zellen, bzw. 5% zur Kultivierung der HT22-Zellen) sowie ein 1%iges Penicillin / Streptomycin – Gemisch (entsprechend 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, Hersteller: Gibco®).

9. Bakterienmedium

- Luria – Bretani Broth Medium (LB – Medium)

  Zur Herstellung des LB – Mediums wurden 20g Lennox L Broth Base® Pulver (Hersteller: Invitrogen®) in einem Liter destillierten Wasser zunächst autoklaviert und anschließend mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt (s. unten).

- Luria – Bretani Broth Agar Medium

  Zur Kultivierung von Bakterienkolonien wurden LB – Agarplatten verwendet; diesbezüglich wurden 32g des Lennox L Agar® Pulvers (Hersteller: Invitrogen®) in einem Liter destilliertem Wasser autoklaviert, nach kurzem Abkühlen in Raumtemperatur mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt (s. unten), anschließend in Petrischalen mit 10cm Durchmesser (Greiner®) gegossen, zur weiteren Abkühlung und Aushärtung weiter bei Raumtemperatur belassen und letztendlich zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert.

- S.O.C. Medium®

  Zum Erreichen einer möglichst hohen Transformationseffizient mit E. coli – Bakterien wurde das S.O.C. Medium® (Hersteller: Invitrogen®) verwendet (Hanahan, 1983).

10. Selektionsantibiotika

- Selektionsantibiotika zur Transformation

  Abhängig vom Antibiotikum – Resistenzgen der verwendeten Plasmide wurde für das LB – Medium und die LB- Agarplatten entweder Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml verwendet. Bezogen wurden beide Antibiotika von Sigma Aldrich®.

- Selektionsantibiotikum zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

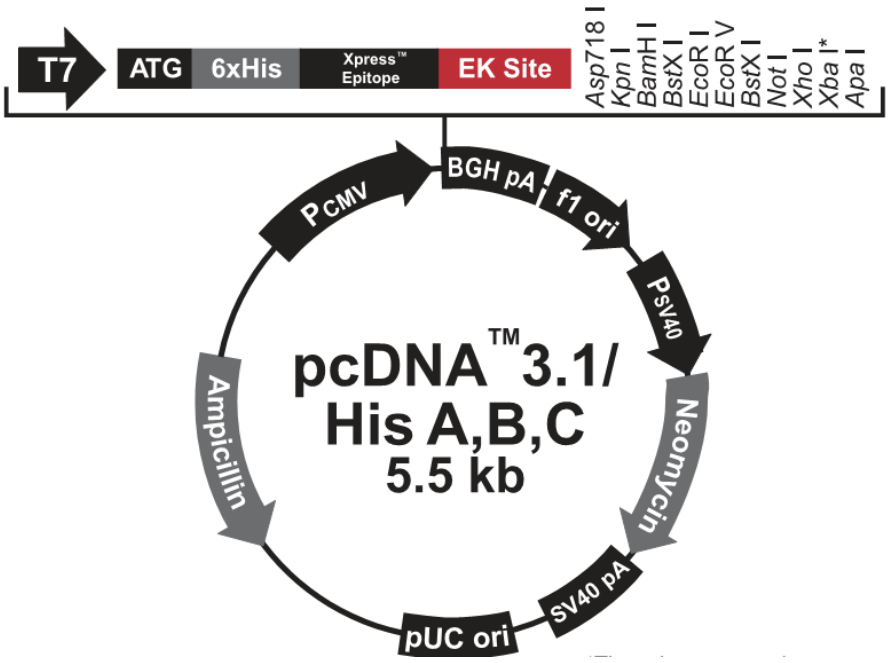
  Das Aminoglykosid Geneticin® (G418), ein häufig verwendetes Antibiotikum zur Selektion von Säugetierzellen, wurde von Invitrogen® bezogen und nach Durchführung eines Zytotoxizitäts – Assays mit MTT, zur Bestimmung der potentesten Selektionsdosis, in einer Konzentration von 1000 µg/ml benutzt.

B. Methoden

1. Klonierung

- **Klonierung von TIGR in den Expressionsvektor pcDNA™3.1 HIS/B (Invitrogen®)**

Im Rahmen von Vorarbeiten (Lewerenz, 2003) wurde das Transkript TIGR nach aufwendigen Klonierungsschritten in den Donor-Vektor pDNR™ (Clontech®) überführt. Zur Durchführung der geplanten Untersuchungen war es zunächst notwendig, TIGR in einen geeigneten Expressionsvektor zu überführen. Aufgrund des enthaltenen Promotors zur effizienten Proteinexpression in Säugetierzellen, des enthaltenen Antigenepitops zur Detektion (mittels des Antikörpers Anti-Xpress®-Antibody, ebenfalls Invitrogen®) und der Möglichkeit zur Herstellung einer stabilen Zelllinie durch das Selektionsantibiotikum Geneticin®, erschien der Expressionvektor pcDNA™3.1 HIS von Vorteil. Hier wurde, entsprechend der Schnittstelle und Erhaltung des offenen Leserahmens, der Vektor pcDNA™3.1 HIS/B gewählt.



Der gewählte Expressionsvektor pcDNA™ 3.1 HIS/B enthält neben der multiplen Klonierungsschnittstelle einen CMV-Promoter, ein Antigenepitop zur Bindung des Antikörpers Anti-Xpress®-Antibody (Invitrogen®), sowie Resistenzen gegen Ampicillin (zur bakteriellen Transformation) und Neomycin, bzw. Geneticin® (zur eukaryonten Transfektion).

Aus: http://www.lifetechnologies.com/1/1/160-pcdna3-1-his-a-b-c.html. Mit freundlicher Genehmigung der Life Technologies™.

Zunächst wurde mittels Restriktionsendonukleasen ein Verdau zum Ausschneiden des vollständigen TIGR – Konstrukts aus dem Vektor pDNR™, bzw. ein Verdau zum öffnen (Linearisierung) des Zielvektor, hergestellt. Als Puffer diente der SuRe/Cut® Puffer H.

Verdauansatz:	TIGR:pDNR (Konz. 0,5µg/µl)	pcDNA™3.1 HIS/B (Konz. 0,75 µg/µl)
DNA	10µl	7,5µl
Puffer	5µl	5µl
EcoRI	0,5µl (10 Unit)	0,5µl (10 Unit)
XbaI	-	0,5µl (10 Unit)
SpeI	0,5µl (10 Unit)	-
Dest. Wasser	34µl	36,5µl
TOTAL:	50µl	50µl

Die Verdauansätze wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch getrennt.

2. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese eignet sich als analytische Methode gut zur Trennung von DNA und Proteine. Dabei wandern, in diesem Fall die negativ geladenen DNA – Moleküle, innerhalb eines elektrischen Feldes und nach Auftragung in ein Gel, abhängig ihrer Molekülgröße zur

Anode. Kleinere Moleküle erreichen diese schneller. Als Gel zur Auftrennung der DNA wurde ein 0,7%iges Agarose-TBE-Gel mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,15 µg/ml, Bezugsquelle: Roche®) verwendet. Nach Herstellung und Aushärtung des Gels wurde dieses in die mit TBE (1X) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Geltaschen wurden anschließend mit dem Verdauansatz, welcher zunächst mit dem Ladepuffer Bluejuice™(2X) des Herstellers Invitrogen® beschwert wurde, gefüllt. Als DNA – Standardmarker diente der 1kb Plus™Ladder – Marker (Invitrogen®). Nach Beendigung der Elektrophorese unter einer Spannung von 100V konnten die gewünschten DNA – Banden unter UV-Licht dank des Ethidiumbromids identifiziert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten werden.

Die DNA konnte dann mit dem QIAquick Gel Extraction Kit™ (Qiagen®), entsprechend des Protokolls des Herstellers, aus dem Gel gereinigt werden.

3. Ligation

Die durch die Gelextraktion gewonnene DNA wurde mittels einer Ligationsreaktion mit dem ebenfalls aus der Gelextraktion gewonnenen, linearisierten Vektor fusioniert. Das 3'-Hydroxy-Ende wird mit dem passenden 5'-Phosphat-Ende durch das Enzym Ligase verbunden.

Hierbei wurde in einem Endvolumen von 10µl 10-50ng des Vektors zusammen mit der DNA in einem Verhältnis von 1:5 mit 1µl T4-DNA-Ligase® und 2µl des zugehörigen Ligasepuffers (beides von Invitrogen®) bei 4°C über Nacht inkubiert.

4. Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter und damit transformationsfähiger Bakterien wurden *E. coli DH5α* – Bakterien, welche keine natürliche Kompetenz besitzen, mit Kalziumchlorid behandelt. Zunächst wurde die Bakterien in 200ml LB – Medium unter schütteln (200 U/min) kultiviert. Nach Erreichen einer optischen Wachstumsdichte von 0,5 OD (bei 600nm) wurde die Suspension bei 4000x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen kühl auf Eis gelagert. In kaltem Magnesiumchlorid (100mM) wurden die Bakterienzellen anschließend resuspendiert, für 30 Minuten erneut auf Eis gelagert und nach den vorherigen Zentrifugationsbedingungen wieder für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in kaltem Kalziumchlorid (100mM,

zusätzlich 15% Glycerol [Invitrogen®]) aufgelöst und schlussendlich in 100µl Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

5. Transformation

Zur Transformation von kompetenten Bakterien wurde die Hitzeschock-Methode angewendet. Auf Eis wurde die gewünschte Plasmid-DNA, hier 2µl des Ligationsansatzes, zu den kompetenten Bakterien hinzugefügt und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Plasmid – Bakteriengemisch für 90 Sekunden in 42°C warmen Wasser inkubiert und anschließend unverzüglich wieder für ca. 5 Minuten auf Eis gelagert. 500µl des S.O.C. – Mediums® wurden hinzugegeben und anschließend bei 37°C für eine Stunde unter schütteln (200 U/min) kultiviert. 200µl der Lösung wurden dann auf LB – Agarplatten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum (hier: Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Aus den dann entstandenen Bakterienkolonien wurde mittels der Plasmidpräparation das Plasmid gewonnen.

6. Plasmidpräparation

Aus praktischen Gründen wurden durch zwei unterschiedliche Methoden sowohl Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab, bis etwa 20µg Plasmid –DNA, als auch in großem Maßstab durchgeführt. Einerseits kann die Präparation auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basieren (Birnboim and Doly, 1979). Hier wird die DNA durch ein alkalisches Umgebungsmilieu zunächst denaturiert. Nach einem Neutralisierungsschritt hybridisiert die Plasmid – DNA, wohingegen die größere chromosomale DNA liniearisiert bleibt und ausgewaschen wird.

Ein weiteres Prinzip ist die „Kochlyse“. Dabei werden die Bakterienzellen zunächst mit Lysozym zerstört, anschließend werden die Bakterienproteine mit Isopropylalkohol denaturiert und abzentrifugiert; letztendlich kann die Plasmid-DNA aus dem Überstand gewonnen werden (Summerton et al., 1983).

- Plasmid – DNA Präparation in kleinem Maßstab

  Zur Überprüfung des Transformationserfolges wurden einige der über Nacht gewachsenen Einzelzellkolonien (s. oben) in Reagenzgefäße mit 3ml LB – Medium mit dem jeweiligen Selektionsanibiotikum überführt und für etwa 5 Stunden unter schütteln (200 U/min) bei 37°C kultiviert. 1,5ml wurden dann in entsprechend große Reagenzgefäße pipettiert, bei

12.000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde im folgenden Schritt zunächst in 800µl TELT – Puffer und 10 µl Lysozym (100 mg/ml, Sigma Aldrich®) resuspendiert und dann für ca. 4 Minuten bei 100°C gekocht. Es folgte eine Inkubation von etwa 5 Minuten auf Eis, anschließend wurden die denaturierten Bakterienreste mit einer Pipettenspitze entfernt. Die übrig gebliebene Lösung wurde bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von 12.000 U/min zentrifugiert und der Überstand in neue, 1,5ml fassende Reagenzgefäße pipettiert. Nach Zugabe von 550µl Isopropylalkohol und nach mischen der Lösung wurde diese entsprechend den oben beschriebenen Bedingungen erneut für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte dann eine Zugabe von 150µl 70%igen Ethanols und eine letzte Zentrifugation (12.000 U/min für 5 Minuten). Der Ethanol wurde aspiriert und verworfen; nach trocknen der Plasmid - DNA im Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur für etwa eine Stunde wurde diese dann in 30µl Wasser mit RNAse resuspendiert. Anhand der so gewonnen Plasmid – DNA konnte dann der Transformationserfolg durch einen Probeverdau oder Sequenzierung (mit Standard – Oligonukleotiden des Plasmids; Sequenzierung durch MWG – Biotech®) objektiviert werden.

- Plasmid – DNA Präparation in großem Maßstab

Zur weiteren Nutzung des durch Klonierung, Ligation und Transformation hergestellten Plasmidkonstrukts in einer Transfektion werden größere Menge DNA benötigt. Diesbezüglich wurden 500µl eines LB-Medium – Bakteriengemisch eines positiven Bakterienklones (s. oben) in 200ml LB-Medium über Nach bei 37°C und schütteln (200 U/min) kultiviert. Der Überstand wurde nach Zentrifugierung (15 Minuten bei 5000 U/min) verworfen und die Plasmid – DNA wurde mittels des Qiagen® Plasmid Maxi Kit™ nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die Methode basiert hier auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Spezielle Säulen binden die DNA, welche in weiteren Waschschritten durch Entfernung der Proteine und der chromosomalen DNA am Ende in Wasser gelöst wird.

7. DNA – Konzentrationsbestimmung

Die DNA – Konzentration wurde photometrisch bei einer optischen Dichte von 260nm bestimmt. Zunächst wurde die DNA in einem Verhältnis von 1:100 mit Wasser für photometrische Zwecke verdünnt. Nach Kalibrierung des Photometers erfolgte die

Extinktionsmessung bei 260nm, wobei bei doppelsträngiger DNA eine optische Dichte von 1,0 (bei 260nm) 50µg/ml entspricht.

8. Kultivierung der Zelllinien

Zur Kultivierung der Zelllinien wurde das oben genannte Zellkulturmedium verwendet und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 aufbewahrt. Nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% in den verwendeten Petrischalen mit 10cm Durchmesser wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (Verhältnis des Mediums zum Trypsin 1:10), bis zur Ablösung der Zellmasse von der Petrischale, inkubiert. Das Trypsin-EDTA wurde in anschließendem Schritt mit frischem Zellkulturmedium inaktiviert, die gelösten Zellen aufgenommen und in einer neuen Petrischale mit Zellkulturmedium in einem Verhältnis von 0.5:10 im Brutschrank inkubiert.

9. Transfektion

Eine effiziente Methode zur Transfektion ist die Lipofektion mittels kationischer Lipidvesikel (Felgner et al., 1987). Die Lipidvesikel werden dabei in einem Komplexierungsschritt mit der gewünschten Plasmid-DNA verbunden und im Anschluss in die Zelle transportiert. Als Lipofektionsagens wurde Lipofectamine 2000® von Invitrogen® verwendet. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 5 Minuten, in der in zwei verschiedenen Reagenzgefäßen zum einem die Plasmid-DNA mit dem serumfreien Medium Opti-MEM® (Invitrogen®) und zum anderen Lipofectamine 2000® mit Opti-MEM® zugegeben wurde, konnten nach Zusammenmischung der beiden Lösungen DNA-Lipid-Komplexe entstehen. Nach einer erneuten Inkubation von jetzt 20 Minuten wurden diese den zu etwa 80% konfluenten Zellplatten mit antibiotikumfreiem Medium in 6-Loch - Zellkulturplatten hinzugefügt. Pro Loch wurde etwa 5µg DNA und 10µl Lipofectamine 2000® verwendet.

10. Mutation der TIGR – Sequenz

Zur Mutation des SOD – Motivs der TIGR – Sequenz wurde das QuikChange® Site-Directed-Mutagenesis Kit (Stratagene®) nach den Instruktionen des Herstellers verwendet um Punktmutationen zu generieren. Das Prinzip beruht auf eine PCR; als Matrize dient die Ausgangssequenz im Expressionvektor (Wildtyp – TIGR), die konstruierten Oligonukleotide beinhalten allerdings bereits die gewünschten Basenänderungen. Nach erfolgter PCR wird

der Ansatz mit der Restriktionendonuklease DpnI verdaut. DpnI schneidet die Sequenz GA|TC, tut dies allerdings nur in methylierter DNA, so dass der Ursprungsvektor (Wildtype – TIGR) dadurch inaktiviert wird und lediglich die in der PCR gebildete Mutationsvariante als intaktes Plasmid in den weiteren Schritten transformiert werden kann.

Aufgrund der Größe des TIGR-Plasmids mit über 16.000 Basenpaaren konnte die PCR nicht erfolgreich durchgeführt werden. Zur Überwindung dieses Problems musste zunächst ein kleineres Konstrukt geschaffen werden. Diesbezüglich wurde eine PCR mit TIGR im Expressionsvektor und den Oligonukleotiden 5´-CTG CCA CCT CTC TTC TTA CAC C-3´ und 5´-TCA GCT TGC AAT TCC GAA CCA G-3´ durchgeführt. Das so gewonnene Fragment, welches das SOD – Motiv beinhaltet und etwa 2.000 Basenpaare groß ist, wurde anschließend in pGEM®-T Easy (s. oben) kloniert. Mit einer Gesamtgröße von etwa 5.000 Basenpaaren konnte dann die Mutation des SOD – Motivs nach dem oben genannten Verfahren mit den Oligonukleotiden 5´-CAC CGA GCG GCT GCC CTC ATT CTT AGC TCT TCT GG-3´ und 5´-CAG AAG AGC TAA GAA TGA GGG CAG CCG CTC GGT GC-3´ durchgeführt werden. Der Erfolg der Mutation wurde durch Sequenzierung (MWG-Biotech®) bestätigt.

11. Zelltoxizitätsassay

Zur Bestimmung der Zellüberlebungsrate nach Exposition eines schädlichen Agens kann die Stoffwechselaktivität der Zellen mittels verschiedener Zelltoxizitäts – Assays gemessen werden. Hier wurde der MTT-Test (Mosmann, 1983) verwendet. Der Tetrazoliumfarbstoff 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, bezogen von Sigma Aldrich®) wird durch Dehydrogenasen der lebenden Zellen in das wasserunlösliche Formazan gespalten, welches so ausfällt und violett gefärbt ist. Der Farbunterschied kann spektralphotometrisch bei 560nm gemessen werden. Zur Durchführung des Tests wurden die transfizierten Zellen zunächst in 96-Loch – Titierplatten ausplattiert (5000 Zellen pro Loch), über Nacht im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Glutamat, bzw. H_2O_2, versetzt und erneut 24 Stunden inkubiert. Am Folgetag wurde dann nach Zugabe von MTT in einer Konzentration von 1 mg/ml und Inkubation im Brutschrank für zwei Stunden der Solubilisierungspuffer zur Lösung des Formazanpräzipitats hinzu gegeben und bei Raumtemperatur in Abwesenheit von Licht inkubiert. Die Absorption konnte dann bei einer Wellenlänge von 560nm gemessen werden.

12. SOD – Assay

Zur Messung der SOD – Aktivität der Zellen wurde das Superoxide Dismutase Assay Kit von Cayman chemical® nach Angaben des Herstellers verwendet. SOD katalysiert die Dismutation des Superoxid-Anions zu H_2O_2 und Sauerstoff. Ein im Kit verwendetes Tetrazoliumsalz reagiert unter Reduktion eines Superoxids zu einem Formazan – Farbstoff; die Reduktion ist direkt an der Xanthinoxidaseaktivität gekoppelt und wird durch die SOD – Aktivität gehemmt. Spektrophotometrisch wird bei 440nm der Farbstoff im Vergleich zu einer Standardreihe von verschiedenen, bekannten SOD – Aktivitäten gemessen. Die SOD – Aktivität ist umso höher, je geringer die Farbreaktion ist, da die Absorption proportional zur Menge an Superoxid und umgekehrt proportional zur Menge an SOD ist.

13. Protein – Elektrophorese und Immunblot

Zur Visualisierung eines gesuchten Proteins aus einer Zelllinie eignet sich die bewährte Methode des Immunblots (Westernblot) nach vorausgegangener Auftrennung der Proteine (Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979). Zunächst wurde das Gesamtprotein extrahiert. Nach dem Kultivieren der adhärenten Zellen wurde diese nach dem Waschen mit PBS in 4°C kalten RIPA – Puffer mit Protease – Inhibitoren (siehe oben) inkubiert. Die Zellen wurden in einem 15ml fassenden Gefäß pipettiert und bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von 12.000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Proteine konnten dann mittels der SDS – Page in Ihre Molekülgrößen aufgetrennt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) wird auf die Proteine hinzu gegeben und bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Verwendet wurde hier das Reduzierungsagenz Sample Reducing Buffer®(10X) und der Ladepuffer NuPAGE® LDS Sample Buffer(10X) (Lithiumdodecylsulfat anstatt Natriumdodecylsufat zur höheren Denaturierungseffizienz) von Invitrogen®. Zu etwa 20µg Proteinlysat wurden 2,5µl des LDS – Puffers und 1µl des Reduzierungsagenz bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Hierdurch werden Wasserstoffbrücken gelöst und die Sekundär- und Tertiärstruktur aufgebrochen. Die Proteingemische wurden im Anschluss in gleichen Mengen in die Taschen eines Polyacrylamidgels pipettiert; unter einer elektrischen Spannung und aufgrund seiner negativen Ladung konnte das Proteingemisch dann durch das Gel migrieren und, bei unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten durch die unterschiedleichen Proteingrößen, aufgetrennt werden (Laemmli, 1970).

Zur Durchführung dieses Schrittes wurde das NuPAGE® Novex Tris-Acetate Gel in der Kammer XCell SureLock™(beides von Invitrogen®) benutzt. Die Kammer wurde mit insgesamt 800ml vom NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Puffer(1X) und 500µl NuPAGE® Antioxidant gefüllt (ebenfalls von Invitrogen®). Das Gel wurde nach den Angaben des Herstellers in der Kammer fixiert und je 15µl der Proben sowie der Standardmarker

HiMark™Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen®) wurden in die Taschen gefüllt. Nach einem Lauf von einer Stunde unter einer Spannung von 150V konnte das Gel zum Transfer auf eine Nitrocellulose – Membran (Immunblot oder Western – Blot) weiter verwendet werden (Towbin et al., 1979). Hierzu wurde das „Tankblot“ Verfahren angewendet (Invitrogen®). Der Transfer erfolgte bei 30V für 90 Minuten. Die auf dem Gel gelegenen Proteine wurden dabei auf die Nitrocellulose – Membran, durch Wanderung von der Kathode zur Anode, transferiert. Der Erfolg des Transfers konnte mit dem roten Azofarbstoff Ponceau S, durch Bindung an die positiven Aminogruppen, kontrolliert werden. Zur Maskierung freier Bindungsstellen erfolgte im Anschluss die Inkubation der Membran bei 4°C über Nacht in einem Blockierungspuffer, bestehend aus 3% fettreduziertem Milchpulver und PBS-T. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für je 10 Minuten wurde dann der Erstantikörper Anti-Xpress-Antibody™ in Blockierungspuffer für 3 Stunden bei Raumtemperatur unter langsamen Schaukelbewegungen inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T für je 10 Minuten erfolgte die Inkubation mit einem Horse-Raddish-Peroxidase gekoppeltem Zweitantikörper für 90 Minuten in Raumtemperatur und einem abgedunkeltem Raum. Es folgten der letzte Waschschritt (dreimal für je 5 Minuten mit PBS-T) und die Detektion der Proteine nach Behandlung mit Chemilumineszenz (Roche®) und Exposition der Membran auf einen Autoradiographiefilm.

14. Immunzytochemie

Zur immunzytochemischen Darstellung wurden die Zellen mit TIGR-EGFP transfiziert, auf Deckplättchen kultiviert und mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung (Sigma®) für 20 Minuten in Raumtemperatur fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellen und Maskierung der freien Bindungsstellen folgte dann eine Inkubation in einer Lösung bestehend aus 10% BSA und 0,5% TritonX-100 in PBS für eine Stunde. Der Anti-Katalase – Antikörper wurde für eine Stunde hinzu gegeben (Verhältnis 1:100), anschließend erfolgte ein Waschschritt mit PBS mit zweimaliger Wiederholung und eine 30minütigeInkubation mit einem Zweitantikörper (Anti-Rabbit-Antibody, Invitrogen®) bzw. DAPI. Die Färbung wurde schlussendlich im konfokalen Mikroskop ausgewertet.

IV. Ergebnisse

A. Charakterisierung von TIGR

TIGR wurde von Julia Letz und Axel Methner durch 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) aus cDNA von HT22R-Zellen kloniert. Es zeigte sich eine Größe von 11.000 Basenpaaren mit einem offenen Leserahmen (ORF) von 3430 Aminosäuren. Durch Vergleiche mit der online zur Verfügung stehenden Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) konnte die TIGR-Sequenz dem menschlichen Gen KIAA0467 zugeordnet werden. Auf genomischer Ebene im Menschen findet sich das Gen auf Chromosom 1p über eine Länge von 61.158 Basenpaaren und besteht aus 87 Exons. In der Maus ist TIGR auf Chromosom 4 über 46.465 Basenpaaren und 72 Exons lokalisiert.

Nach Eingabe der Sequenz in die Protein- und Domänendatenbank PROSITE (http://www.expasy.org/prosite), zeigt sich ein SOD-Motiv im mittleren Anteil des Proteins mit den typischen zwei Histidinresten, welche eventuell als Kupferliganden fungieren könnten (Abb. 1).

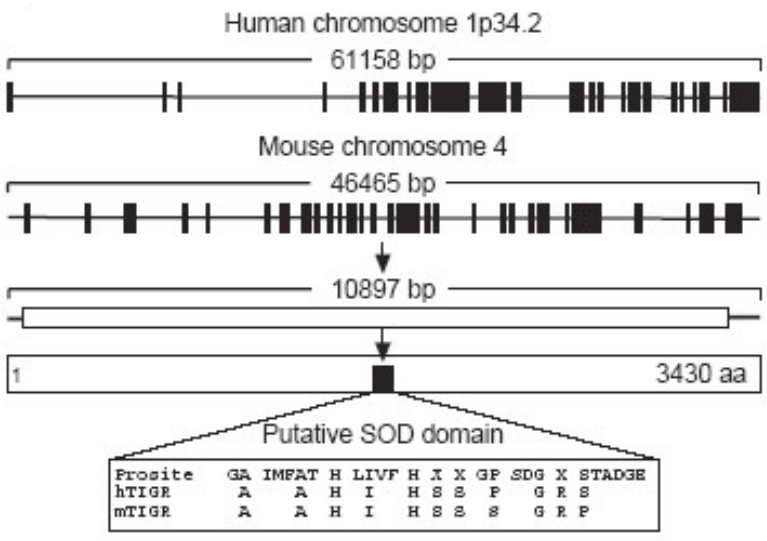


Abbildung 1: Auf genomischer Ebene findet sich TIGR im Menschen auf Chromosom 1p, in der Maus auf Chromosom 4. Das große, 3430 Aminosäuren umfassende Gen enthält nach der Proteindatenbank PROSITE ein SOD-Motiv.

Expressionsanalysen im Gewebe der Maus durch quantitative real-time-PCR zeigten ferner eine Überexpression von TIGR in Hirn- und Lungengewebe mit einer Anzahl von über $5x10^6$ Transkripten im Gehirn, ca. $3x10^6$ in der Lunge und unter 10^6 Transkripten in zum Beispiel Herz-, Nieren- und Milzgewebe (Abb. 2A). Im Weiteren wurden Kaninchen mit Peptiden aus dem N- und C-terminalen TIGR-Protein immunisiert. Die so gewonnenen IgG-Antisera wurden zusammen mit Dr. P. Albrecht für immunhistochemische Versuche benutzt und färbten im Gegensatz zum Kontrollserum (vor Immunisierung) im Rattengewebe die Pyramidenzellen des Kortex und die Neurone des Hippocampus (Abb. 2B) (Toutzaris et al., 2010).

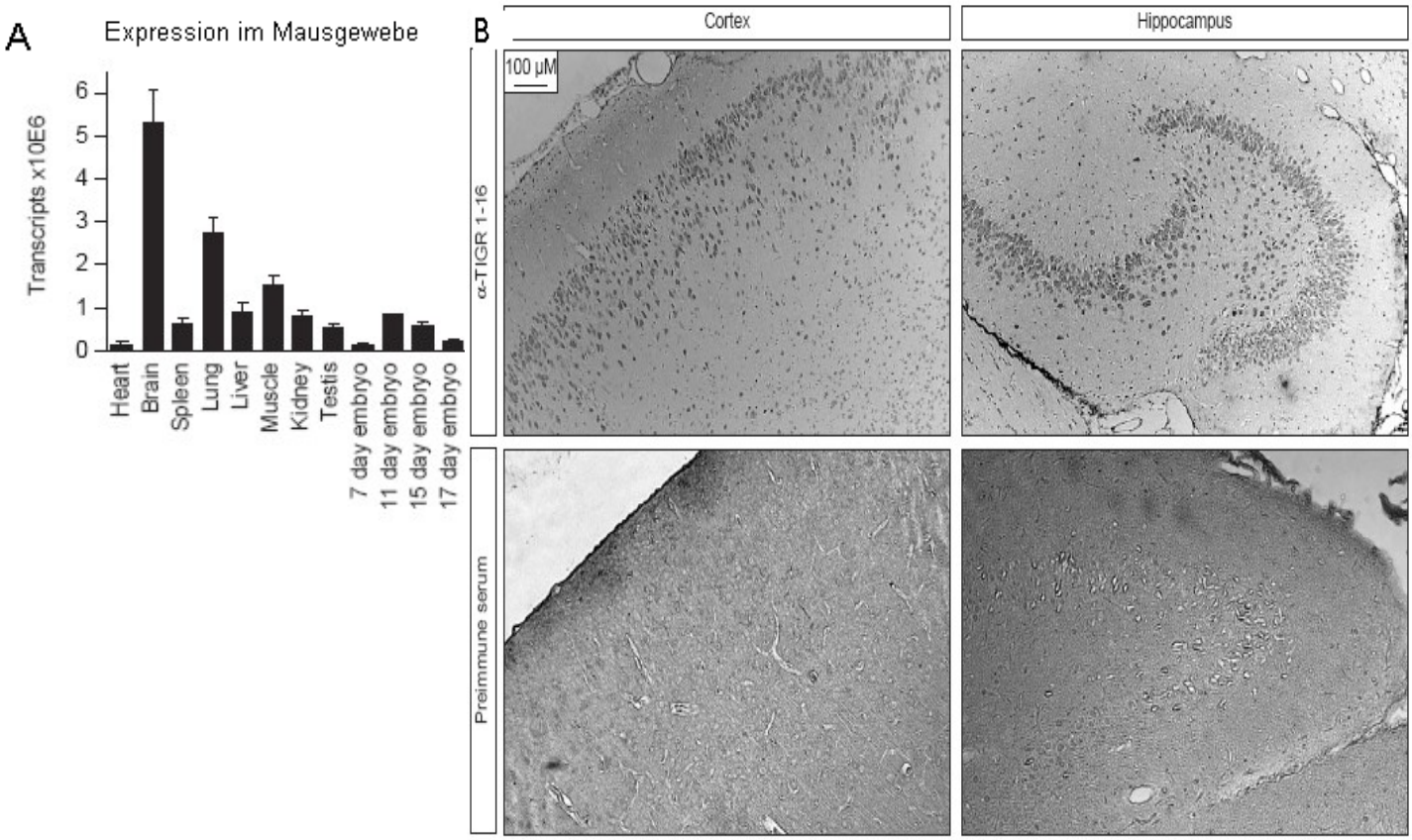


Abbildung 2: A) In der quantitativen real-time-PCR zeigt sich eine Überexpression von TIGR im Lungen- und Hirngewebe der Maus. B) Antisera gegen TIGR färben immunhistochemisch die Pyramidenzellen des Kortex und die Neuronenzellen im Hippocampus der Ratte im Vergleich zum Präimmunserum.

B. Expression im menschlichen Gewebe

Wie bereits erwähnt, konnte die Expressionen von TIGR im Lungen- und Hirngewebe der Maus nachgewiesen werden. In Zusammenarbeit mit der Bayer HealthCare® AG dehnten wir die Untersuchungen auf menschliches Gewebe aus. Hier konnte, analog zum Mausversuch, in der quantitativen real-time-PCR ebenfalls Expression in Gewebe mit vermehrtem oxidativen Stress, vor allem im Parietal- und Frontallappen ($6x10^6$ bzw. $3x10^6$ Transkripte) sowie in den Spinalganglien ($3x10^6$ Transkripte), gezeigt werden. Im weiteren peripheren Gewebe ergaben die Messungen, bis auf Harnblasengewebe mit über $3x10^6$, vorwiegend niedrige Expressionswerte mit unter 10^6 Transkripten (Abb. 4) (Toutzaris et al., 2010).

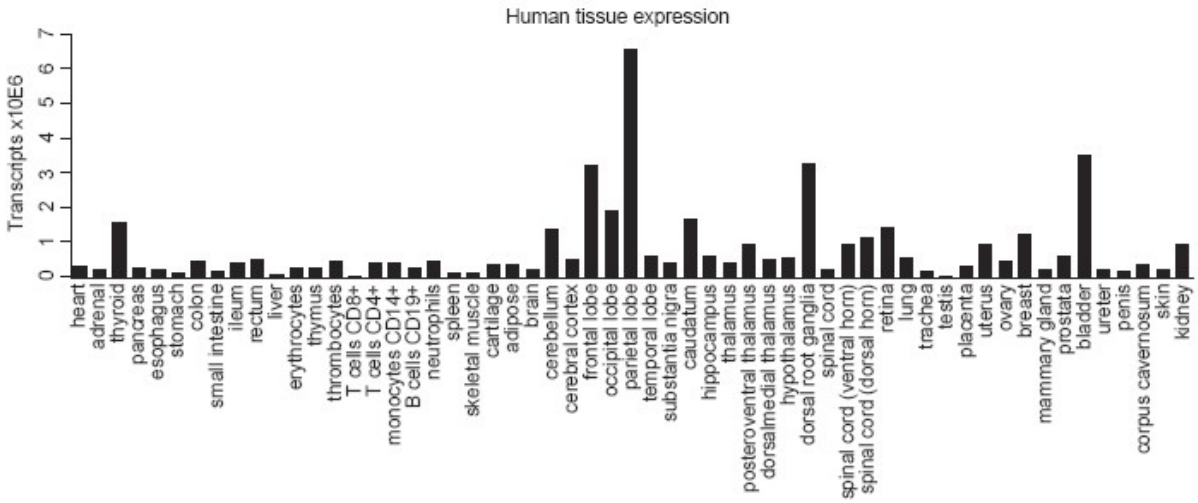


Abbildung 4: Real-time-PCR von menschlichem Gewebe zeigte Hochregulierung von TIGR im Nervensystem (v.a. Frontal- und Parietallappen; aber auch in den Spinalganglien, Kleinhirn, Kaudatum und Okzipitallappen) und in der Harnblase.

C. TIGR schützt, im Gegensatz zur Mutation im SOD-Fragment, vor oxidativem Stress

Die Glutamattoxizität führt zum Zelltod durch oxidativen Stress. Ob die Überexpression von TIGR die Zelle vor oxidativen Stress schützt, war jedoch unklar. Weiterhin stellt sich die Frage, inwieweit bei einem eventuellen Zellschutz das in TIGR enthaltene SOD-Motiv eine Rolle spielt.

Zur näheren Betrachtung erfolgte zunächst eine Klonierung der gesamten TIGR-Sequenz in einen Expressionsvektor und anschließend eine stabile Transfizierung in

Neuroblastomazellen der Maus (N2A). Da HT22-Zellen resistent gegenüber einer Anzahl von Selektionsreagenzien und somit problematisch stabil zu transfizieren sind, wurde auf diese Zelllinie verzichtet.

Hinsichtlich des Effektes des SOD – Motivs wären TIGR transfizierte Zellen ohne intaktes Motiv von Interesse. Diesbezüglich wurde eine N2A-Zelllinie mit einer Punktmutation der Histidinreste zu Phenylalanin im SOD-Motiv mittels Site-directed mutagenesis hergestellt.

Nach Behandlung der Zellen mit Glutamat in verschiedenen Konzentrationen wurde die Zytotoxizität anhand des MTT-Assays gemessen. Hier zeigte sich in den TIGR-transfizierten Zellen ab etwa 40mM Glutamat ein Schutz vor Zelltod gegenüber den Zellpopulationen mit der TIGR-Mutante und dem Kontrollvektor. Weiterhin wurde auch H_2O_2 als ein weiteres, oxidativen Stress auslösendes Agenz, zur Behandlung der Zellen benutzt. Analog zum vorherigen Versuch konnte auch hier ab 750µM ein signifikanter Vorteil der TIGR-transfizierten Zellen bzgl. des Schutzes vor Zelltod nachgewiesen werden (Abb. 5).

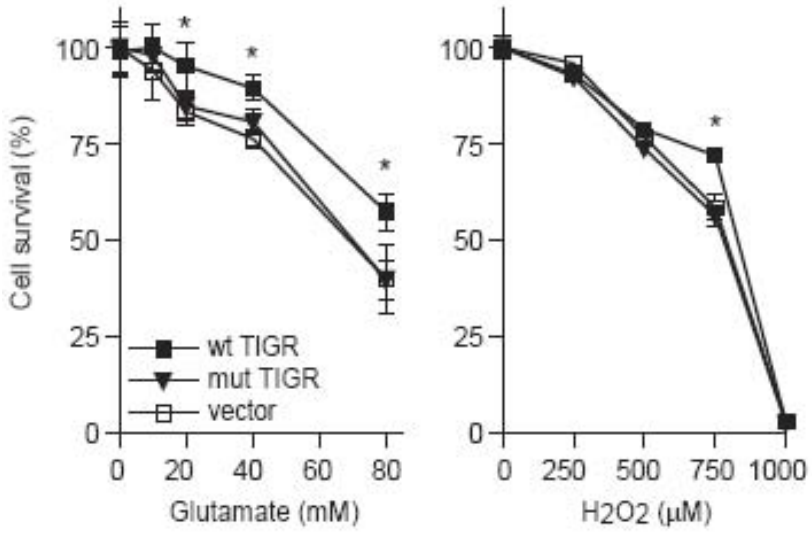


Abbildung 5: N2A-Zellen wurde mit TIGR (wt TIGR), der TIGR-Mutation (mut TIGR) und mit dem Leervektor (vector) stabil transfiziert. Nach einer 24stündigen Kultivierung mit verschiedenen Glutamat-, bzw. H_2O_2-Konzentrationen wurde das Zellüberleben mittels MTT-Assay gemessen.

D. TIGR erhöht die SOD-Aktivität in transfizierten Zellen

Zusammenfassend zeigt sich, dass TIGR zum einen ein SOD-Motiv besitzt, zum anderen analog zu den SOD eine protektive Wirkung gegenüber oxidativen Stress aufweist, welche durch Mutation des Motivs verloren geht. Folglich stellte sich die Frage, ob TIGR eine bislang nicht charakterisierte SOD ist.

Diesbezüglich wurde die SOD-Aktivität mittels eines Assays gemessen: Ein Tetrazoliumsalz reagiert unter Reduktion eines Superoxids zu einem Formazan-Farbstoff. Die Menge des reduzierten Superoxids ist an die Aktivität der Xanthinoxidase gekoppelt, welche wiederum durch die SOD inhibiert wird. Anhand der Farbreaktion wird die SOD-Aktivität mit zur Hilfenahme einer SOD-Standardreihe bestimmt.

Tatsächlich konnte hierbei gezeigt werden, dass die TIGR – transfizierte Zelllinie im Gegensatz zu der Zelllinie mit dem mutierten Motiv und der Kontrolllinie eine erhöhte SOD-Aktivität aufweist (Abb. 6).

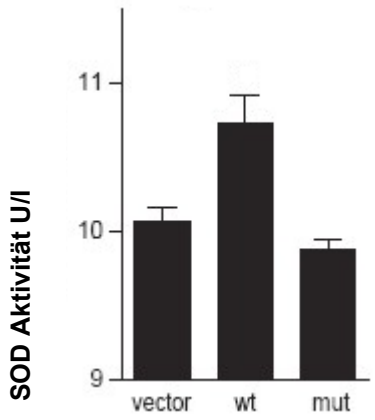


Abbildung 6: Die SOD-Aktivität in stabil transfizierten N2A-Zellen wurde mittels eines SOD-Assays gemessen. Die TIGR transfizierten Zellen (wt) zeigten eine höhere Aktivität (in U/ml) als die Vektorkontrolle (vector) und die SOD-Mutation (mut).

E. TIGR ist mit Katalase in Peroxisomen lokalisiert

Zur weitergehenden Charakterisierung von TIGR wurde die Lokalisation auf zellulärer Ebene untersucht. Da sich die bereits oben beschriebenen Antisera für immunzytochemische Untersuchungen als unbrauchbar erwiesen, wurde TIGR zunächst N-Terminal mit dem fluoreszierenden Protein EGFP gekoppelt. Anschließend erfolgte eine transiente Transfektion in HT22 Zellen; unter dem Konfokalmikroskop zeigte sich eine cytosolische Anreicherung, welche morphologisch an Peroxisomen erinnert. Diesbezüglich wurde im Weiteren ein monoklonaler Antikörper gegen Katalase hinzugenommen, welche vorwiegend an den Peroxisomen lokalisiert ist. Hier konnte eine peroxismale Anreicherung bestätigt werden: es zeigte sich eine Kolokalisation von TIGR mit Katalase in den Peroxisomen (Abb. 7 A und B).

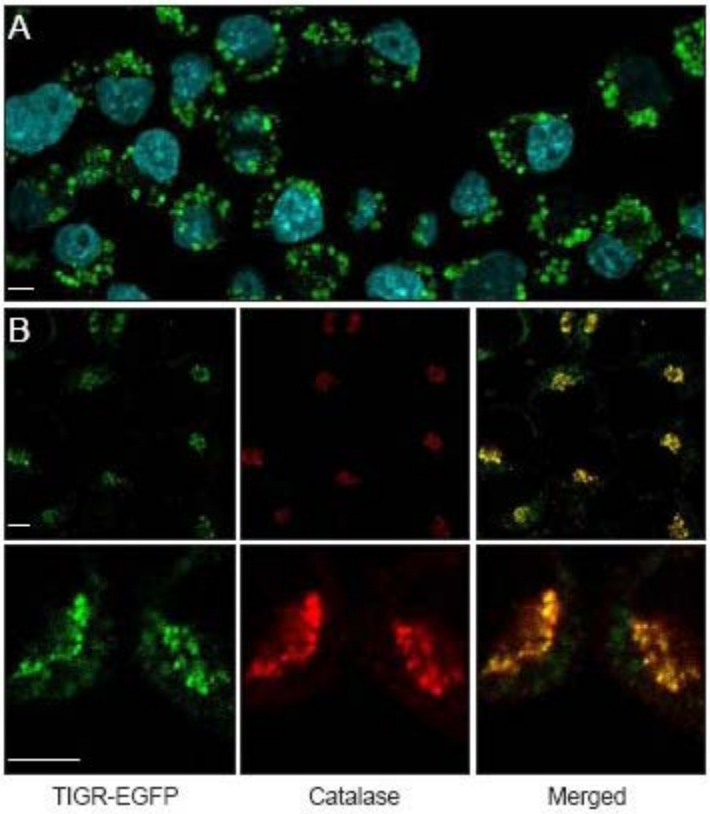


Abbildung 7: TIGR ist mit Katalase in den Peroxisomen kolokalisiert. In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wurden mit TIGR-EGFP transient transfizierte Zellen zum einen mit dem Zellkernmarker DAPI (A), zum anderen mit einem monoklonalen Antikörper gegen Katalase, als Peroxisomenmarker (B), gefärbt.

Zum Nachweis von TIGR auf der Proteinebene wurde eine elektrophoretische Auftrennung mit anschließendem immunologischen Nachweis mittels der Westernblot-

Methode angewandt (Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979). Dies erwies sich allerdings aufgrund der immensen Größe des Proteins, über 400kDa, als äußerst schwierig. So konnte nach zahlreichen Versuchen mit Modifizierung der Bedingungen das Protein in den stabil transfizierten Zellen visualisiert werden (Abb. 8). Nach Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer zellulären Fraktionen (Zytosol, Membran, Zellkern) gelang der Nachweis nicht mehr.

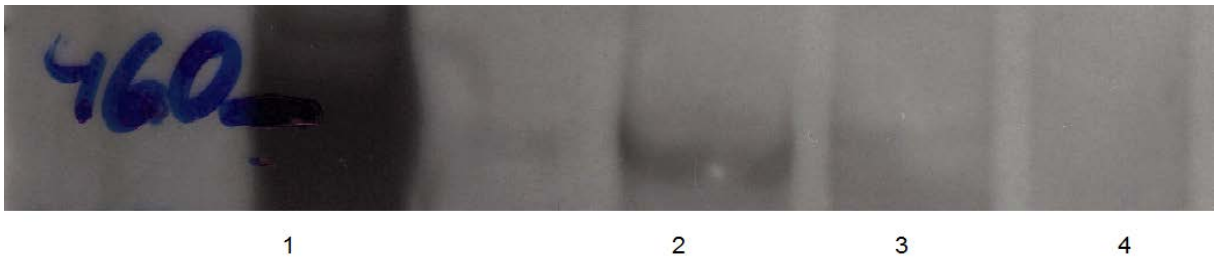


Abbildung 8: Im Westernblot zeigte sich auf Proteinebene TIGR in den stabil transfizierten Zellen mit einer Größe von über 400 kDa. Legende: 1. Marker 2. Mit TIGR stabil transfizierte N2A-Zellen 3.: Mit TIGR transient transfizierte TIGR Zellen 4. Mit Leervektor (lacZ) transfizierte N2A-Zellen.

V. Diskussion

A. Sind glutamatresistente HT22R-Zellen ein gutes Modell für oxidativen Zelltod?

Wie bereits erwähnt, spielt oxidativer Stress in der Pathogenese vieler Erkrankungen eine zentrale Rolle. Es stellte sich somit bereits früh die Frage nach einem guten *In vitro* - Modell. Murphy und Kollegen präsentierten diesbezüglich 1989 ein Modell, indem durch Zugabe von Glutamat oxidativer Stress induziert werden kann (Murphy et al., 1989) und welches Glutamattoxizität genannt wird.

Glutamat selbst ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des Zentralnervensystems und bindet nach einer synaptischen Freisetzung an verschiedene, spezifische Glutamatrezeptoren. Bei Schädigungen im Bereich des Zentralnervensystems, wie z.B. beim ischämischen Schlaganfall, Traumata oder neurodegenerativer Erkrankungen, kommt es zu einer überschießenden Freisetzung von Glutamat und somit zu einer Reizüberflutung der Glutamatrezeptoren. In der Folge führt die Aktivierung der Rezeptoren zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle und somit zum Zelltod (Choi, 1985). Dieser Mechanismus wird auch Exzitotoxizität genannt.

Glutamat dient zusammen mit Glyzin und Zystein jedoch auch als Baustein für Glutathion (Griffith, 1999), welches als eines der wichtigsten Antioxidantien die Zelle vor oxidativen Stress schützt (Dringen and Hirrlinger, 2003) und den Abbau von ROS fördert (Simonian and Coyle, 1996).

Cystein liegt vor allem als oxidierte Form Cystin vor und muss zur Bildung von Gluthation in ausreichender Menge zur Verfügung stehen und in die Zelle transportiert werden. Zum Transport dient der Cystin / Glutamat Antiporter, auch System X^-_c genannt, welcher in einem Verhältnis von 1:1 Glutamat aus der Zelle und Cystin in die Zelle befördert (Bannai, 1986). Hier greift das Modell der Glutamattoxizität, in der durch eine Zugabe von Glutamat eine Hohe exogene Konzentration erreicht und so das System X^-_c blockiert wird. Es folgt ein konsekutives Absinken der Glutathionkonzentration, somit eine Anhäufung von ROS und letztendlich der oxidative Zelltod (Tan et al., 1998). Im Gegensatz zum regulären

programmierten Zelltod, der Apoptose, zeigt der Zelltod durch Glutamattoxizität, oder auch Oxytose genannt (Tan et al., 2001), keine relevanten morphologischen Veränderungen des Zellkerns, sondern vielmehr eine Zellschrumpfung (Tan et al., 1998).

Unterstrichen wurde dies durch weitere Forschungen, z.B. der Nachweis einer Hochregulation von Enzymen des Glutathionstoffwechsels in einer glutamatresistenten neuronalen Zelllinie (Sagara et al., 1998). Auch konnte unsere Gruppe in einer, durch wiederholte Aussetzung von Glutamat, glutamatresistenten HT22 – Zelllinie die Hochregulation des System X^-_c nachweisen (Lewerenz et al., 2006).

Ein gutes *In vitro* – Modell zeichnet sich in erster Linie durch seine pathophysiologische Nähe zu den *In vivo* Verhältnissen dar. Wie bereits geschildert, wird durch die Glutamattoxizität ROS der Zelle nicht von exogen zugeführt, sondern entsteht physiologisch in der Zelle durch Verminderung des wichtigen Antioxidans Glutathion. Die chronische Aussetzung von Glutamat und damit die Kultivierung von glutamatresistenten Zellen führt zu einer physiologischen Hochregulierung von Transkripten, welche die Zelle durch den chronisch gebotenen Reiz, also der Depletion von Glutathion, benötigt, um weiterhin gegen oxidativen Stress zu bestehen. Weitere praktische Gründe des Modells der Glutamattoxizität sind die problemlose Reproduzierbarkeit und die schnelle Ausführung.

B. Ist TIGR eine mögliche Superoxiddismutase?

In vorangegangenen Untersuchungen wurden hochregulierte Transkripte in glutamatresistenten Zellen, und somit potentiell vor oxidativen Zelltod schützende Transkripte, ausfindig gemacht. Eines dieser Transkripte, welches TIGR genannt wurde, stand für ein bislang nicht näher beschriebenes Gen. Die TIGR-Proteinsequenz enthält ein Superoxiddismutase – Motiv, welches in nur 174 von über 470.000 Proteinen zu finden ist. Superoxiddismutasen katalysieren Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxyd, welche weiter von der Katalase zu Wasser und Sauerstoff katalysiert wird.

Nachgewiesene, hohe Expressionen von TIGR in Geweben mit ausgeprägtem oxidativen Stress, wie Gehirn und Lunge, legen eine Bedeutung des Proteins bezüglich des Schutzes vor oxidativen Zelltod nahe. Zelllinien mit hochreguliertem TIGR konnten im Gegensatz zur Kontrolllinie und im Gegensatz zu einer Zelllinie mit Mutationen im SOD – Motiv von TIGR einen Schutz vor oxidativen Stress zeigen. Die SOD – Aktivität in dieser Zelllinie war

ebenfalls erhöht. Schlussendlich konnten immuncytochemische Versuche eine Kolokalisation von EGFP-TIGR mit Katalase in den Peroxisomen zeigen.

Ob TIGR tatsächlich eine noch nicht beschriebene Superoxiddismutase ist, bleibt offen. Ein SOD – Assay der Hefe konnte keine erhöhte SOD – Aktivität in TIGR-transfizerten Hefezellen nachweisen (Toutzaris et al., 2010). Anzumerken ist allerdings, dass die Transfektion des ganzen TIGR – Konstrukts toxisch auf die Hefe wirkte und somit nur ein Fragment, das das SOD-Motiv enthielt eingesetzt werden konnte. Weiterhin ist es möglich, dass bestimmte Kofaktoren, welche nicht in der Hefe zu finden sind, für die regelrechte Funktion von TIGR benötigt werden. Zusätzlich könnte durch die stabil transfizierten Zellenlinien, und somit der chronischen Hochregulierung von TIGR, eine kompensatorische Hochregulierung von solchen Kofaktoren begünstigt werden, welche bei der transienten Transfektion fehlt.

Zur Klärung der endgültigen Einordnung und der Frage, ob Mutationen von TIGR beim Menschen mit neurodegenerativen Erkrankungen einhergehen, wie beispielsweise die Mutation der Superoxiddismutase1 mit der familiären Form der amyotrophen Lateralsklerose assoziiert ist, bedarf es weitere Untersuchungen auf der Proteinebene. Aufgrund der immensen Größe des Proteins mit über 3430 Aminosäuren und der einhergehenden technischen Problematik würde dies den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Die protektive Bedeutung von TIGR konnte in einer rezenten Studie nochmals unterstrichen werden. Frankel und Kollegen (Frankel et al., 2009) identifizierten mit Hilfe eines Mutationsscreenings bei Mäusen, die Mutationen wurden dabei durch das Mutagen N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff induziert, Gene, welche die epileptische Anfallsschwelle senken und somit Epilepsien begünstigen. Diese Suche zeigte, dass Mutationen in TIGR (in dieser Arbeit *Szt2*, für *S*eizure *T*hreshold*2*, genannt) die epileptische Anfallsschwelle der Maus senken. Die biologische Funktion des Gens und seine zellschützende Rolle wurden in der Arbeit nicht behandelt, allerdings ist die Assoziation zwischen oxidativem Stress und Epilepsie schon länger bekannt und Gegenstand der Forschung (Chuang et al., 2004; Kunz et al., 2000; Waldbaum and Patel, 2010): Zelluläre Schäden durch oxidativen Stress beeinflussen die neuronale Erregbarkeit und Erhöhen die Epilepsieanfälligkeit.

VI. Zusammenfassung

Im Laufe der Evolution entwickelten die höheren Lebewesen intrazelluläre Mechanismen, welche die Zelle vor oxidativen Stress schützen sollen; notwendig wurde dies, da zu einer effektiven Energieverwendung Sauerstoff benötigt wird, die dadurch entstehenden Metaboliten, vor allem die reaktiven Sauerstoffspezies, jedoch potentiell schädlich sind. Zu diesen Schutzmechanismen gehören unter anderem die Superoxiddismutasen, welche die schädlichen Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid metabolisieren.

Da das Nervensystem in hohem Maße Energie zur Aufrechterhaltung der Funktion benötigt, können Störungen der oxidativen Mechanismen hier besonders fatale Verläufe zeigen. Eine Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen können als Folge von oxidativen Stress angesehen werden.

Zur experimentellen Untersuchung des oxidativen Stresses wurde das Glutamattoxizität-Model entwickelt. Anhand dieses Modells kann oxidativer Stress auf zellulärer Ebene durch die Zugabe von Glutamat simuliert werden. Werden Zellen chronisch Glutamat in ansteigenden Konzentrationen ausgesetzt, entwickelt sich eine gewisse Resistenz gegenüber oxidativen Stress. Auf der Nukleotidebene wurden zunächst hochregulierte Transkripte in diesen resistenten Zellen ausfindig gemacht. Ziel dieser Arbeit war es nun, ein hier entdecktes und bislang nicht beschriebenes Transkript näher zu untersuchen.

Die Sequenz wurde TIGR benannt und kodiert ein 3440 Aminosäuren enthaltenes Protein, welches im Menschen vor allem im Nervensystem und in der Lunge, also Geweben mit hohem oxidativen Umsatz, vorkommt. Des Weiteren lässt sich in TIGR ein SOD-Motiv finden.

Toxizitätstests konnten zeigen, dass eine Überexpression von TIGR Zellen vor oxidativen Zelltod schützt; Mutationen in TIGRs SOD-Motiv hingegen nicht. Auch war die SOD-Aktivität in TIGR transfizierten Zellen erhöht. Auf zellulärer Ebene zeigte sich weiterhin eine Kolokalisation von TIGR mit der Katalase in den Peroxisomen. Interessant ist, dass die Katalase das von der SOD gebildete Wasserstoffperoxid weiter in Wasser und Sauerstoff metabolisiert.

In Hefezellen konnte eine erhöhte SOD-Aktivität nicht nachgewiesen werden, so dass es sich bei TIGR aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um eine eigenständige SOD handelt. Allem Anschein nach spielt TIGR jedoch eine nicht unbedeutende Rolle in der Regulierung der SOD-Aktivität und somit im Schutz der Zelle vor oxidativen Stress.

VII. Literatur

(1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. Cell *72*, 971-983.
Afrasyap, L., Guvenen, G., and Turkmen, S. (1998). Plasma and erythrocyte total antioxidant status in patients with benign and malign breast disease. Cancer Biochem Biophys *16*, 129-138.
Albrecht, P., Lewerenz, J., Dittmer, S., Noack, R., Maher, P., and Methner, A. (2010). Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system xc- as a neuroprotective drug target. CNS & neurological disorders drug targets *9*, 373-382.
Aust, A.E., and Eveleigh, J.F. (1999). Mechanisms of DNA oxidation. Proc Soc Exp Biol Med *222*, 246-252.
Bannai, S. (1986). Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. J Biol Chem *261*, 2256-2263.
Bannister, J.V., Bannister, W.H., and Rotilio, G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. CRC Crit Rev Biochem *22*, 111-180.
Barra, D., Schinina, M.E., Simmaco, M., Bannister, J.V., Bannister, W.H., Rotilio, G., and Bossa, F. (1984). The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. J Biol Chem *259*, 12595-12601.
Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem *272*, 20313-20316.
Bernard, P., and Couturier, M. (1991). The 41 carboxy-terminal residues of the miniF plasmid CcdA protein are sufficient to antagonize the killer activity of the CcdB protein. Mol Gen Genet *226*, 297-304.
Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res *7*, 1513-1523.
Braak, H., and Braak, E. (1992). Allocortical involvement in Huntington's disease. Neuropathol Appl Neurobiol *18*, 539-547.
Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, M.J., Berger, S.C., Muqit, M.M., Bird, E.D., and Beal, M.F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. Ann Neurol *41*, 646-653.
Chang, L.Y., Slot, J.W., Geuze, H.J., and Crapo, J.D. (1988). Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. J Cell Biol *107*, 2169-2179.
Choi, D.W. (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. Neurosci Lett *58*, 293-297.
Chuang, Y.C., Chang, A.Y., Lin, J.W., Hsu, S.P., and Chan, S.H. (2004). Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. Epilepsia *45*, 1202-1209.
Cooper, A.J., and Kristal, B.S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. Biol Chem *378*, 793-802.
Crapo, J.D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J.W., and Chang, L.Y. (1992). Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 10405-10409.
Davis, J.B., and Maher, P. (1994). Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. Brain Res *652*, 169-173.

Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002). Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. Nat Neurosci *5 Suppl*, 1058-1061.
Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D.*, et al.* (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 6025-6030.
Dittmer, S., Sahin, M., Pantlen, A., Saxena, A., Toutzaris, D., Pina, A.L., Geerts, A., Golz, S., and Methner, A. (2008). The constitutively active orphan G-protein-coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment epithelium-derived growth factor. J Biol Chem *283*, 7074-7081.
Dringen, R., and Hirrlinger, J. (2003). Glutathione pathways in the brain. Biol Chem *384*, 505-516.
Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 7413-7417.
Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature *408*, 239-247.
Frankel, W.N., Yang, Y., Mahaffey, C.L., Beyer, B.J., and O'Brien, T.P. (2009). Szt2, a novel gene for seizure threshold in mice. Genes, brain, and behavior *8*, 568-576.
Froissard, P., Monrocq, H., and Duval, D. (1997). Role of glutathione metabolism in the glutamate-induced programmed cell death of neuronal-like PC12 cells. Eur J Pharmacol *326*, 93-99.
Gonzales, R., Auclair, C., Voisin, E., Gautero, H., Dhermy, D., and Boivin, P. (1984). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. Cancer Res *44*, 4137-4139.
Griffith, O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radic Biol Med *27*, 922-935.
Grunewald, T., and Beal, M.F. (1999). Bioenergetics in Huntington's disease. Ann N Y Acad Sci *893*, 203-213.
Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol *166*, 557-580.
Hayes, J.D., and Pulford, D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol *30*, 445-600.
Hodgson, E.K., and Fridovich, I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. Biochemistry *14*, 5299-5303.
Horton, W.A., Eldridge, R., and Brody, J.A. (1976). Familial motor neuron disease. Evidence for at least three different types. Neurology *26*, 460-465.
Ishige, K., Chen, Q., Sagara, Y., and Schubert, D. (2001). The activation of dopamine D4 receptors inhibits oxidative stress-induced nerve cell death. J Neurosci *21*, 6069-6076.
Ito, H., Kanno, I., Fukuda, H. (2005). Human cerebral circulation: positron emission tomography studies. Ann Nucl Med. 19(2) 65-74.
Jenner, P., and Olanow, C.W. (1998). Understanding cell death in Parkinson's disease. Ann Neurol *44*, S72-84.
Joachim, C.L., Selkoe, D.J. (1992). The seminal role of ß-amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease. Alzheimer Disease and Associated Disorders, *9,* S7-34.
Johnson, T.M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A., and Finkel, T. (1996). Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 11848-11852.

Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S., and Hallewell, R.A. (1991). Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 7381-7385.
Kunz, W.S., Kudin, A.P., Vielhaber, S., Blumcke, I., Zuschratter, W., Schramm, J., Beck, H., and Elger, C.E. (2000). Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. Ann Neurol *48*, 766-773.
Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.
Lewerenz, J. (2003). Molecular Mechanisms of Protection against Oxidative Glutamate Toxicity in the Neuronal Cell Line HT22: Pharmacological characterisation of a protective signalling pathway via G_s-proteins and identification genes upregulated in glutamate resistance by subtractive suppression hybridisation.
Lewerenz, J., Klein, M., and Methner, A. (2006). Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc- protects from oxidative glutamate toxicity. J Neurochem *98*, 916-925.
Li, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1997). A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. Neuron *19*, 453-463.
Liou, W., Chang, L.Y., Geuze, H.J., Strous, G.J., Crapo, J.D., and Slot, J.W. (1993). Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. Free Radic Biol Med *14*, 201-207.
Maher, P. (2001). How protein kinase C activation protects nerve cells from oxidative stress-induced cell death. J Neurosci *21*, 2929-2938.
Marklund, S. (1980). Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. Acta Physiol Scand Suppl *492*, 19-23.
Marklund, S.L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 7634-7638.
Marklund, S.L., Holme, E., and Hellner, L. (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. Clin Chim Acta *126*, 41-51.
McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem *244*, 6049-6055.
Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods *65*, 55-63.
Mulder, D.W., Kurland, L.T., Offord, K.P., and Beard, C.M. (1986). Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *36*, 511-517.
Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., and Coyle, J.T. (1989). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. Neuron *2*, 1547-1558.
Orth, M., and Schapira, A.H. (2002). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. Neurochem Int *40*, 533-541.
Ray, G., Kumar, V., Kapoor, A.K., Dutta, A.K., and Batra, S. (1999). Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with dengue fever. J Trop Pediatr *45*, 4-7.
Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci U S A *76*, 3116-3120.
Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X.*, et al.* (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature *362*, 59-62.
Sagara, Y., Dargusch, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert, D., and Maher, P. (1998). Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. Free Radic Biol Med *24*, 1375-1389.

Salmon, M.A., Van Melderen, L., Bernard, P., and Couturier, M. (1994). The antidote and autoregulatory functions of the F plasmid CcdA protein: a genetic and biochemical survey. Mol Gen Genet *244*, 530-538.
Schapira, A.H., Gu, M., Taanman, J.W., Tabrizi, S.J., Seaton, T., Cleeter, M., and Cooper, J.M. (1998). Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Ann Neurol *44*, S89-98.
Schubert, D., Kimura, H., and Maher, P. (1992). Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 8264-8267.
Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., and Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. Eur J Biochem *267*, 4904-4911.
Sherer, T.B., Betarbet, R., and Greenamyre, J.T. (2002). Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. Neuroscientist *8*, 192-197.
Siderowf, A., and Stern, M. (2003). Update on Parkinson disease. Ann Intern Med *138*, 651-658.
Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem *215*, 213-219.
Simonian, N.A., and Coyle, J.T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annu Rev Pharmacol Toxicol *36*, 83-106.
Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., and Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta *1502*, 139-144.
Sohal, R.S., and Brunk, U.T. (1989). Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. Adv Exp Med Biol *266*, 17-26; discussion 27-19.
Summerton, J., Atkins, T., and Bestwick, R. (1983). A rapid method for preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem *133*, 79-84.
Swerts, L., and Van Den Bergh, R. (1976). [Familial amytrophic lateral sclerosis. A study of a family suffering from this disease for three generations]. J Genet Hum *24*, 247-255.
Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. J Cell Biol *141*, 1423-1432.
Tan, S., Schubert, D., and Maher, P. (2001). Oxytosis: A novel form of programmed cell death. Curr Top Med Chem *1*, 497-506.
Tellez-Nagel, I., Johnson, A.B., and Terry, R.D. (1974). Studies on brain biopsies of patients with Huntington's chorea. J Neuropathol Exp Neurol *33*, 308-332.
Toutzaris, D., Lewerenz, J., Albrecht, P., Jensen, L.T., Letz, J., Geerts, A., Golz, S., and Methner, A. (2010). A novel giant peroxisomal superoxide dismutase motif-containing protein. Free Radic Biol Med *48*, 811-820.
Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A *76*, 4350-4354.
Townsend, A.J., Leone-Kabler, S., Haynes, R.L., Wu, Y., Szweda, L., and Bunting, K.D. (2001). Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells. Chem Biol Interact *130-132*, 261-273.
Turrens, J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosci Rep *17*, 3-8.
Waldbaum, S., and Patel, M. (2010). Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. Epilepsy research *88*, 23-45.
Weisiger, R.A., and Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem *248*, 4793-4796.
Zhang, Y., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2000). Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. Neurobiol Dis *7*, 240-250.

VIII. Danksagung

Zur erfolgreichen Fertigstellung der Arbeit möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Axel Methner bedanken: Für die Überlassung des Themas, für die Geduld und für die exzellente Betreuung während der gesamten Zeit. Axel, ich habe Dir viel zu verdanken.
Für die Möglichkeit der klinischen Arbeit und der Forschung an der Neurologischen Klinik danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Hartung.
Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitgliedern unserer Forschungsgruppe am Life Science Center.
Frau Monika Kühn danke ich für die Durchsicht der Arbeit.
Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich stets in allen Belangen unterstützen.

Schließlich danke ich meiner Frau Stella, auf deren Unterstützung und Hilfe ich mich stets verlassen kann und die mir am 05.05.2011 das wertvollste aller Geschenke gemacht hat. Euch beiden ist diese Arbeit gewidmet.

IX. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Toutzaris
Vorname	Diamandis
Geburtsdatum	07.11.1977
Geburtsort	Krefeld
Staatsangehörigkeit	griechisch
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1984-1988	Grundschule Gartenstraße, Krefeld
1988-1997	Fichte-Gymnasium, Krefeld

Studium und praktische Tätigkeiten

1997-2004	Studium der Medizin, Universität Düsseldorf
2003-2004	Praktisches Jahr: Evangelisches Krankenhaus, Mülheim an der Ruhr
August-September 2002	Famulatur Innere Medizin: Henry Dynan Hospital, Athen
Mai-Juni 2003	Famulatur Kardiologie: Klinikum Krefeld
Juni-Juli 2003	Famulatur, hausärztliche Praxis: Dres. Rademacher, Krefeld

Beruflicher Werdegang

Seit Januar 2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf; Weiterbildung zum Facharzt für Neurologie. Studienarzt in zahlreichen klinischen Studien.

Kenntnisse

Fremdsprachen	englisch, griechisch
EDV	Microsoft Office, Software & Hardware Installationen

Publikationen

1: Freedman MS, Bar-Or A, Oger J, Traboulsee A, Patry D, Young C, Olsson T, Li D, Hartung HP, Krantz M, Ferenczi L, Verco T; MAESTRO-01 Investigators. *A phase III study evaluating the efficacy and safety of MBP8298 in secondary progressive MS.* Neurology. 2011 Oct 18;77(16):1551-60.

2: **Toutzaris D**, Lewerenz J, Albrecht P, Jensen LT, Letz J, Geerts A, Golz S, Methner A. *A novel giant peroxisomal superoxide dismutase motif-containing protein.* Free Radic Biol Med. 2010 Mar 15;48(6):811-20.

3: Zohren F, **Toutzaris D**, Klärner V, Hartung HP, Kieseier B, Haas R. *The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans.* Blood. 2008 Apr 1;111(7):3893-5.

4: Dittmer S, Sahin M, Pantlen A, Saxena A, **Toutzaris D**, Pina AL, Geerts A, Golz S, Methner A. *The constitutively active orphan G-protein-coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment epithelium-derived growth factor.* J Biol Chem. 2008 Mar 14;283(11):7074-81.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 21.04.2012

Diamandis Toutzaris