

Aus der Klinik für Neurologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

**Charcot-Marie-Tooth Typ 4A:**

**GDAP1 erhöht die zelluläre Glutathionkonzentration und  
schützt vor oxidativem Stress**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Svenja Frede  
(2016)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker  
Erstgutachter: Prof. Dr. Axel Methner  
Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. Alexander Mathes

Je schöner und voller die Erinnerung, desto schwerer die Trennung.  
Aber die Dankbarkeit verwandelt die Erinnerung in eine stille Freude.  
Man trägt das vergangene Schöne nicht wie einen Stachel, sondern wie ein kostbares  
Geschenk in sich.

Dietrich Bonhoeffer

(1906-1945), Theologe und Widerstandskämpfer im dritten Reich

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Rebecca Noack, Svenja Frede, Philipp Albrecht, Nadine Henke, Annika Pfeiffer, Katrin Knoll, Thomas Dehmel, Gerd Meyer zu Hörste, Mark Stettner, Bernd C. Kieseier, Holger Summer, Stefan Golz, Andrzej Kochanski, Martina Wiedau-Pazos, Susanne Arnold, Jan Lewerenz and Axel Methner, (2011),

**Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential**, *Human Molecular Genetics*, (Volume 21), 150-162

## Zusammenfassung

Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT) umfasst eine Gruppe erblicher sensomotorischer Polyneuropathien. Die häufigste rezessiv vererbte Form der CMT wird durch Mutationen im Gen für *Ganglioside-induced differentiation associated protein 1*, kurz *Gdap1* ausgelöst und heißt CMT4A. Bisher ist noch nicht viel über GDAP1 bekannt: Es ist ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran und beeinflusst die Mitochondrienmorphologie.

In Untersuchungen über oxidativen Stress und mögliche Schutzfaktoren konnte in der gegen oxidativen Stress resistenten Zelllinie HT22R im Vergleich mit ihrer sensitiven Ursprungszelllinie eine Überexpression von GDAP1 nachgewiesen werden.

In diesen Versuchen wurde oxidativer Stress mittels oxidativer Glutamattoxizität ausgelöst. Hierbei kommt es durch eine Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration zu einer Hemmung der Zystinaufnahme und somit zu einer Verminderung von intrazellulärem Glutathion. In der Folge erliegt die Zelle oxidativem Stress, ausgelöst durch ihre endogen produzierten reaktiven Sauerstoffspezies. Die oben genannte Zelllinie HT22R ist eine Zelllinie, die resistent gegenüber dieser Form von oxidativem Stress ist. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese ist, dass die Hochregulation von GDAP1 an der Resistenz von HT22R-Zellen gegen oxidativen Stress beteiligt ist.

In dieser Dissertation werden die Funktion von GDAP1 und eine mögliche Rolle von oxidativem Stress in der Pathophysiologie der CMT-Krankheit genauer untersucht.

Zunächst wurde die Überexpression von GDAP1 in HT22R-Zellen auch auf Proteinebene bestätigt. Im Folgenden konnte dann in den glutamatsensitiven HT22-Zellen durch GDAP1-Überexpression ein Schutz vor oxidativem Stress induziert werden, nicht aber durch die Überexpression von GDAP1 mit krankheitsauslösenden Mutationen.

Außerdem führte die Überexpression von GDAP1, nicht aber die Überexpression von GDAP1 mit krankheitsauslösenden Mutationen zu einer Erhöhung der intrazellulären Glutathionkonzentration, einem wichtigen intrazellulären Antioxidans.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass oxidativer Stress an der Pathophysiologie der CMT4A beteiligt ist.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Ganglioside-induced differentiation associated protein 1</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Aufbau des Proteins.....	2
1.2.2 Lokalisation.....	3
1.2.3 Funktion.....	3
1.2.4 Mutationen.....	4
<b>1.3 Oxidativer Stress</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 Schutzmechanismen gegenüber oxidativem Stress.....	6
1.3.2 Glutamatoxizität.....	7
<b>1.4 Die Zelllinie HT22</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5 Zielsetzung</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>10</b>
2.1.1 Zellkultur.....	10
2.1.2 Bakterienkultur.....	11
2.1.3 Klonierung.....	11
2.1.4 Vektoren.....	12
2.1.5 Proteinbiochemie.....	12
2.1.6 Glutathion-Messung.....	13
2.1.7 Kits.....	14
2.1.8 Geräte.....	14
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.2.1 Zellkultur.....	15
2.2.2 Glutamatoxizitätsassay.....	16
2.2.3 Proteinbiochemie.....	17
2.2.4 Glutathion-Messung.....	18
2.2.5 NADPH-Messung.....	19
2.2.6 Klonierung.....	20
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Die Empfindlichkeit von HT22-Zellen gegenüber Glutamat ist abhängig von der Zelldichte</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 HT22R-Zellen sind resistent gegenüber oxidativer Glutamatoxizität</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3 HT22R-Zellen weisen erhöhte Glutathionkonzentrationen auf</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4 Die Rolle von GDAP1 bei der oxidativen Glutamatoxizität</b> .....	<b>24</b>
3.4.1 HT22R-Zellen exprimieren mehr GDAP1 als HT22-Zellen.....	24

3.4.2 GDAP1 schützt vor oxidativer Glutamatoxizität.....	25
3.4.3 Krankheitsverursachende Gdap1-Mutationen heben den Schutz vor oxidativer Glutamatoxizität auf .....	25
<b>3.5 Etablierung von stabil überexprimierenden Zelllinien .....</b>	<b>27</b>
3.5.1 Klonierung der pIRES-Expressionsvektoren.....	27
3.5.2 Bestimmung der Geneticinkonzentration zur Selektion transfizierter HT22- Zellen .....	28
3.5.3 Herstellung und Kontrolle der stabil überexprimierenden Zelllinien.....	29
<b>3.6 Auch stabile <i>Gdap1</i>-Überexpression schützt vor oxidativer Glutamatoxizität .....</b>	<b>30</b>
<b>3.7 Die stabil transfizierten krankheitsverursachenden <i>Gdap1</i>-Mutationen reduzieren den Schutz gegen oxidative Glutamatoxizität .....</b>	<b>30</b>
<b>3.8 Stabile GDAP1-Überexpression, aber nicht die stabile Überexpression der krankheitsverursachenden Mutationen erhöht den intrazellulären Glutathionspiegel .....</b>	<b>31</b>
<b>3.9 Stabil GDAP1-überexprimierende Zellen zeigen eine statistisch nicht signifikant erhöhte NADPH-Konzentration.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>34</b>
4.1 GDAP1 und oxidativer Stress .....	34
4.2 Die Rolle von GDAP1 im Glutathionstoffwechsel.....	36
4.3 GDAP1 und Charcot-Marie-Tooth .....	37
<b>5. Schlussfolgerung.....</b>	<b>39</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>40</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>1</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>BCA</b>	Bichinonsäure	<b>SI-Einheiten</b>	
<b>CMT</b>	Charcot-Marie-Tooth-Krankheit	<b>bp</b>	Basenpaare
<b>CTB</b>	Cell Titer Blue	<b>cm</b>	Zentimeter
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's</i> modifiziertes <i>Eagle</i> Medium	<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>h</b>	Stunde
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>kb</b>	Kilobasen
<b>DTNB</b>	Dithiobisnitrobenzoesäure	<b>kbp</b>	Kilobasenpaare
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum	<b>l</b>	Liter
<b>GDAP1</b>	<i>Ganglioside-induced differentiation associated protein 1</i>	<b>mg</b>	Milligramm
		<b>ml</b>	Milliliter
<b>GSH</b>	Glutathion	<b>mM</b>	Millimol
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase	<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>HBSS</b>	<i>Hank's</i> gepufferte Salzlösung	<b>µl</b>	Mikroliter
<b>MCB</b>	Monochlorobiman	<b>µM</b>	Mikromol
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	<b>N</b>	Normalität
		<b>Nm</b>	Nanometer
<b>n</b>	Anzahl	<b>s</b>	Sekunde
<b>NADP/H</b>	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat	<b>U/min</b>	Umdrehungen/ Minute
<b>P</b>	Signifikanzwert		
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung	<b>U/ml</b>	Unit/Milliliter
<b>RIPA</b>	Radioimmunpräzipitationspuffer	<b>V</b>	Volt
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies		
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat		
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwertes		
<b>SRA</b>	<i>Sample reducing Agent</i>		
<b>SSA</b>	Sulfosalicylsäure		
<b>TBE</b>	TRIS-Borat-EDTA		
<b>TNB</b>	Thiobisnitrobenzoesäure		

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1** Schematische Darstellung von GDAP1

**Abbildung 2** Lokalisation von GDAP1 in der äußeren Mitochondrienmembran

**Abbildung 3** Krankheitsauslösende *Gdap1*-Mutationen haben Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie.

**Abbildung 4** Glutathionmetabolismus

**Abbildung 5** HT22-Zellen sterben an glutamat-induziertem Zelltod in Abhängigkeit von ihrer Zelldichte

**Abbildung 6** HT22R-Zellen sind resistent gegenüber oxidativer Glutamatoxizität und enthalten mehr Glutathion als HT22-Zellen. Mit zunehmender Glutamatkonzentration nimmt die Glutathionkonzentration ab.

**Abbildung 7** HT22R-Zellen exprimieren mehr GDAP1 als HT22-Zellen

**Abbildung 8** GDAP1-Überexpression schützt HT22-Zellen vor oxidativer Glutamatoxizität. Krankheitsverursachende *Gdap1*-Mutationen reduzieren diesen Schutz.

**Abbildung 9** Klonierung der pIRES2-EGFP-Vektoren.

**Abbildung 10** Herstellung der stabilen Zelllinien.

**Abbildung 11** Stabile GDAP1-Überexpression schützt HT22-Zellen vor oxidativer Glutamatoxizität. Krankheitsverursachende *Gdap1*-Mutationen reduzieren diesen Schutz.

**Abbildung 12** Stabile GDAP1-Überexpression erhöht den intrazellulären Glutathionspiegel von HT22-Zellen, dieser Effekt wird von den krankheitsauslösenden Mutationen reduziert.

**Abbildung 13** *Gdap1*-überexprimierende Zellen weisen eine statistisch nicht signifikant erhöhte NADPH-Konzentration auf, dieser Effekt ist bei den krankheitsauslösenden Mutationen eingeschränkt.

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit

1886 beschrieben die Franzosen Jean-Martin Charcot und Pierre Marie, sowie der Brite Howard Henry Tooth eine Nervenerkrankung, die durch Muskelschwund, Schwäche und Sensibilitätsstörungen gekennzeichnet war und zunächst besonders in den distalen Extremitäten auftrat. Die *Charcot-Marie-Tooth-Krankheit* (CMT) ist die häufigste vererbte neuromuskuläre Erkrankung und betrifft ungefähr einen von 2500 Menschen (Gess, Schirmacher, & Young, 2013; Skre, 1974). Durch die Fortschritte in der Neurophysiologie konnten bald zwei Haupttypen unterschieden werden: eine demyelinisierende Verlaufsform mit Nervenleitgeschwindigkeiten  $< 38$  m/s, die dann Charcot-Marie-Tooth Typ 1 (CMT1) genannt wurde und eine axonale Verlaufsform mit Nervenleitgeschwindigkeiten  $> 38$  m/s, die CMT2 heißt (Harding & Thomas, 1980; Thomas & Calne, 1974). 1991 konnte die erste Genmutation identifiziert werden, die CMT auslöst (Lupski, et al., 1991; Raeymaekers, et al., 1991). Diese Form der Erkrankung wurde CMT1A genannt, für jedes weitere entdeckte Gen folgte ein neuer Buchstabe. Bisher konnten mehr als 30 Gene gefunden werden, deren Mutation zu CMT führt. Es gibt in der axonalen, als auch in der demyelinisierenden Verlaufsform sowohl autosomal-dominant als auch autosomal-rezessiv vererbte Gendefekte. Die autosomal-rezessiv vererbten Formen der CMT1-Erkrankung heißen CMT4.

CMT4 ist mit einem Anteil von 4 % aller CMT-Fälle in Europa relativ selten (Dubourg, et al., 2001), in Gegenden mit einem höheren Anteil konsanguiner Elternschaften liegt der Anteil allerdings bei 30-50 % (Martin, 1999). Der CMT4-Typ ist gekennzeichnet durch ein Auftreten in der frühen Kindheit mit Muskelatrophie und Schwäche, die von den distalen Extremitäten nach proximal aufsteigen kann und zu einer Gangunfähigkeit führt (Dubourg, et al., 2001). Zusätzlich kann es zu Symptomen wie Stimmbandlähmung, Bulbärparalyse, Fazialisparese, Zwerchfelllähmung und Innenohrschwerhörigkeit kommen. Häufig korrelieren diese Symptome mit bestimmten Genmutationen (Reilly, Murphy, & Laura, 2011).

Unter den rezessiv vererbten CMT-Formen ist die CMT4A die häufigste (Nelis, et al., 2002). Sie beruht auf einer Mutation im Chromosom 8q21.3 (Ben Othmane, et al., 1993), genauer gesagt im kodierenden Gen für das *Ganglioside-induced differentiation associated protein 1* (GDAP1) (Baxter, et al., 2002; Cuesta, et al., 2002). Es wurden

auch axonale (Cuesta, et al., 2002) und intermediäre (Senderek, et al., 2003) Verlaufsformen beschrieben die auf einer *Gdap1*-Mutation beruhen.

## 1.2 Ganglioside-induced differentiation associated protein 1

### 1.2.1 Aufbau des Proteins

GDAP1 ist ein Protein aus 358 Aminosäuren, das kodierende Gen ist 23.728 Basenpaare lang (Cassereau, et al., 2011). Die Erstbeschreibung von GDAP1 erfolgte 1999: Neuro2a-Zellen wurden mit GD3-Synthase transfiziert. Das Gangliosid GD3 sorgt für eine weitere Differenzierung der Zellen, bei denen 10 Transkripte hochreguliert wurden, die '*ganglioside-induced differentiation associated protein 1-10*' genannt wurden (Liu, Nakagawa, Kanematsu, Uchida, & Tsuji, 1999). In bioinformatischen Untersuchungen wurden strukturelle Ähnlichkeiten zwischen GDAP1 und Glutathion-S-Transferasen (GST) nachgewiesen. Glutathion-S-Transferasen sind Enzyme, die Glutathion (GSH) kovalent an toxische Stoffwechselprodukte binden und diese so unschädlich machen. Am N-terminalen Ende von GDAP1 (Aminosäuren 26-111) befindet sich die für GST typische GSH-Bindungsstelle und die Aminosäuren 210-287 bilden die für GST typische Alpha-Helix zur Substratbindung. (Baxter, et al., 2002; Cuesta, et al., 2002; Marco, Cuesta, Pedrola, Palau, & Marin, 2004; Shield, Murray, & Board, 2006). Zusätzlich besitzt GDAP1 am C-terminalen Ende noch eine Transmembrandomäne und eine hydrophobe Domäne, die bei löslichen GST nicht vorkommen (Cuesta, et al., 2002; Marco, et al., 2004) (Abb. 1). Mit einem inkompletten GDAP1-Protein ohne Transmembrandomäne konnte aber bisher keine GST-Aktivität oder GSH-Bindung nachgewiesen werden (Shield, et al., 2006).

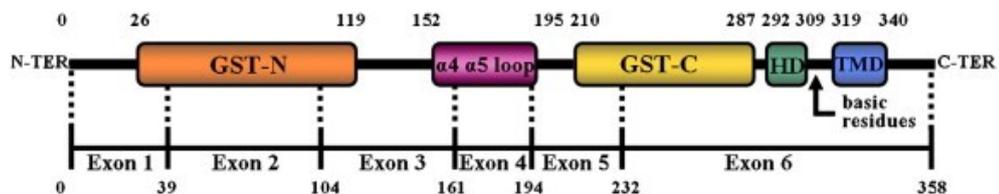


Abb. 1 **Schematische Darstellung von GDAP1.** Die obere Nummerierung gibt die Aminosäureposition der Strukturdomänen wieder, die untere Markierung die der Exons. (Cassereau, et al., 2011)

## 1.2.2 Lokalisation

*Gdap1*-Mutationen lösen sowohl demyelinisierende, als auch axonale oder intermediäre Verlaufsformen der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit aus. Von Niemann et al. wurde GDAP1 sowohl in den Neuronen als auch in den Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems nachgewiesen (Niemann, et al., 2005), Pedrola et al. konnten GDAP1 hingegen ausschließlich in Neuronen und nicht in den Schwann-Zellen nachweisen (Pedrola, et al., 2005).

GDAP1 ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Der N-terminale Teil, der auch die GST-Domäne enthält, zeigt dabei zur zytosolischen Seite (Niemann, et al., 2005; Wagner, et al., 2009). Darüber hinaus hat GDAP1 eine einzelne Transmembrandomäne, die zweite hydrophobe Domäne ist im Zytosol oder möglicherweise ebenfalls in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Wagner, et al., 2009) (Abb. 2).

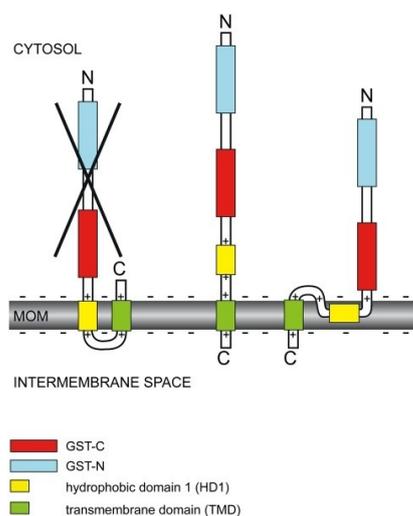


Abb. 2 **Lokalisation von GDAP1 in der äußeren Mitochondrienmembran.** Die für Glutathion-S-Transferasen typische GSH-Bindungsstelle (GST-C) sowie die Substratbindungsstelle (GST-N) befinden sich im Zytosol, die Transmembrandomäne (TMD) und eventuell auch die hydrophobe Domäne (HD1) liegen in der äußeren Mitochondrienmembran. (Wagner, Ruegg, Niemann, & Suter, 2009)

## 1.2.3 Funktion

Mitochondrien sind Zellorganellen, die sich ständig verändern und untereinander verschmelzen oder sich teilen können. In einem Review von Detmer und Chan wurde die mitochondriale Dynamik zusammengefasst (Detmer & Chan, 2007). Eine funktionierende Mitochondrienpopulation ist erforderlich für eine ausreichende Energieversorgung der Zellen. Der ständige Austausch durch Fusion ermöglicht es, dass schlecht funktionierende Mitochondrien wieder mit für ihren Stoffwechsel essentiellen Bestandteilen versorgt werden. Besonders Zellen mit hohem Energiebedarf, wie zum Beispiel Nervenzellen, sind durch Störungen der mitochondrialen Dynamik beeinflussbar. Funktioniert die Teilung der Mitochondrien nicht, ist die respiratorische Kapazität einge-

schränkt, außerdem ist die Migration der Mitochondrien innerhalb der Zelle gestört und besonders peripher gelegene Zellabschnitte werden nicht mehr ausreichend mit Energie versorgt. Auch während der Apoptose, dem programmierten Zelltod, kommt es zu einer vermehrten Teilung der Mitochondrien. Dabei werden aus dem Intermembranspalt bestimmte Stoffe freigesetzt, wie zum Beispiel Zytochrom C, das im Zytosol eine Kaskade von Caspasen aktiviert, die für die Apoptose nötig sind (Detmer & Chan, 2007).

Für GDAP1 wurde eine teilungsfördernde Aktivität nachgewiesen. Eine Überexpression führte zu einer vermehrten Teilung der Mitochondrien, ohne dabei Apoptose auszulösen (Niemann, et al., 2005). Daran ist besonders der hydrophobe Teil beteiligt (Wagner, et al., 2009).

#### **1.2.4 Mutationen**

Bis heute wurden über 41 krankheitsauslösende GDAP1-Mutationen beschrieben. Hervorzuheben sind drei *Missense*-Mutationen, die in dieser Studie verwendet werden: R310Q in der hydrophoben Domäne, M116R in der vermeintlichen GSH-Bindungsdomäne und R120Q, die keiner bestimmten Domäne zugeordnet werden kann (Cassereau, et al., 2011). Die Genprodukte dieser drei Mutationen konnten in der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen werden, allerdings hatten sie nur noch einen abgeschwächten Einfluss auf die Architektur der Mitochondrien: Im Gegensatz zum gesunden GDAP1 führte R310Q zu keiner Mitochondrienteilung, wohingegen bei M116R und R120Q der Effekt auf die Mitochondrienfragmentation nur leicht reduziert ist (Niemann, et al., 2005) (Abb. 3).

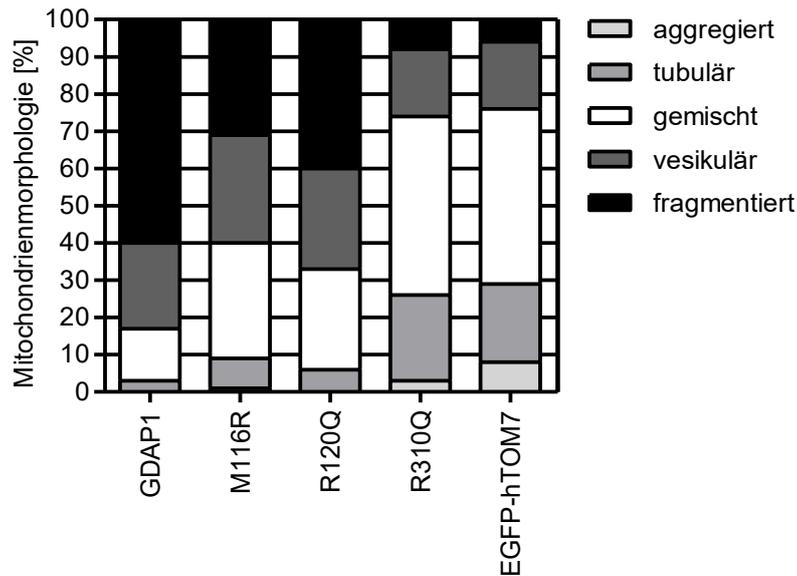


Abb.3 Krankheitsauslösende *Gdap1*-Mutationen haben Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie. Die Mitochondrien wurden in fünf Kategorien eingeteilt, von aggregiert bis fragmentiert. *Gdap1*-Überexpression führt zu einer starken Fragmentierung mit einem großen Anteil von fragmentierten und vesikulären Mitochondrien. Einen ähnlichen Effekt hat die Punktmutation M116R. Im Gegensatz dazu hat die Mutation R310Q kaum Einfluss auf die Morphologie und unterscheidet sich kaum von der Negativkontrolle EGFP-hTOM7 (Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005).

### 1.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist bei der Entstehung von neurologischen Störungen und Erkrankungen beteiligt. Werden innerhalb der Zelle mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet als abgebaut, spricht man von oxidativem Stress (Halliwell, 2001; Li, O, Li, Jiang, & Ghanbari, 2013). Die reaktiven Sauerstoffspezies akkumulieren in der Zelle und schädigen Proteine, Nukleinsäuren und Membranen, was schließlich zum Zelltod führen kann. Ein Großteil der reaktiven Sauerstoffspezies entsteht während der Atmungskette in den Mitochondrien. Dort entsteht hauptsächlich Superoxid ( $O_2^-$ ) (Finkel & Holbrook, 2000). Zusätzlich kann Sauerstoff enzymatisch oder spontan zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reduziert werden (Fridovich, 1998). Intrazellulär finden sich außerdem noch eine ganze Reihe anderer Enzyme, die reaktive Sauerstoffspezies bilden können (Tan, Schubert, & Maher, 2001). Zusätzlich zu den endogenen kommen auch noch exogene Quellen wie UV-Licht, Toxine oder inflammatorische Zytokine hinzu (Finkel & Holbrook, 2000). Nervengewebe ist durch den hohen Sauerstoffverbrauch und die lang-

same Regeneration besonders anfällig für oxidativen Stress (Barnham, Masters, & Bush, 2004; Li, et al., 2013).

### **1.3.1 Schutzmechanismen gegenüber oxidativem Stress**

Um sich vor reaktiven Sauerstoffspezies zu schützen gibt es in den Zellen eine ganze Reihe von Enzymen und antioxidativen Molekülen. Die wichtigste Rolle spielt hier das Glutathion (GSH). Es ist ein Tripeptid aus Glutamat, Zystein und Glycin. Der limitierende Schritt in der Synthese von Glutathion ist die Zystinaufnahme in die Zelle. Zystin wird im Austausch gegen Glutamat in die Zelle aufgenommen und intrazellulär zu Zystein reduziert, welches dann für die Glutathionsynthese zur Verfügung steht. Die Glutathionperoxidase katalysiert die Oxidation von zwei Glutathionmolekülen zum Glutathiondisulfid. Auf diese Weise können freie Elektronen der reaktiven Sauerstoffspezies gebunden werden. Durch die Glutathionreduktase kann das Glutathiondisulfid wieder in zwei Glutathionmoleküle gespalten werden, dabei wird NADPH benötigt. Glutathion-S-Transferasen können Glutathion auch direkt an Xenobiotika und andere Giftstoffe binden und so unschädlich machen (Maher, 2005) (Abb. 4). NADPH ist ein wichtiger Bestandteil des zellulären antioxidativen Systems. Neben der Reduktion von Glutathiondisulfid, wird es von Katalasen benötigt, die Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umwandeln und es ist nötig für die Reaktionen im Thioredoxinsystem. Thioredoxine dienen als elektronenübertragende Kofaktoren bei antioxidativen Reaktionen (Ying, 2008). Gebildet wird NADPH unter anderem im Pentosephosphatweg und im Zitratzyklus.

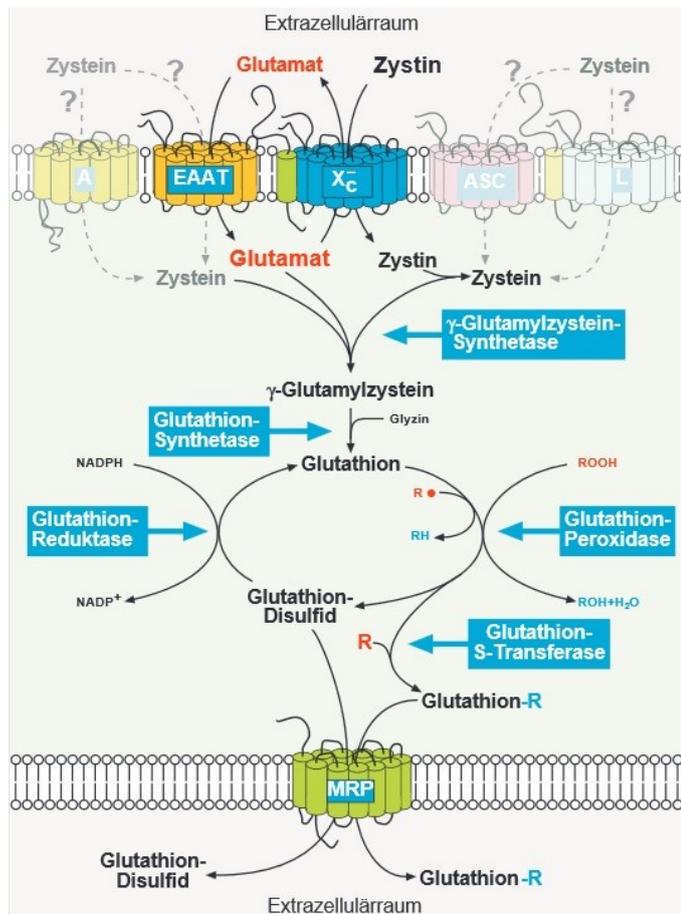


Abb. 4 **Glutathionmetabolismus.** Über den Antiporter  $X_c^-$  wird im Austausch gegen Glutamat Zystin in die Zelle aufgenommen und steht dort in reduzierter Form der Glutathionsynthese zur Verfügung. Durch die Glutathionperoxidase und die Glutathion-S-Transferase können Peroxide ( $ROOH$ ) und freie Radikale ( $R$ ) entgiftet werden. Die Glutathionreduktase kann NADPH-abhängig Glutathiondisulfid wieder in zwei Glutathionmoleküle spalten (Jan Lewerenz & Methner, 2006).

### 1.3.2 Glutamatoxizität

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Maher, 2005). Exzessive Glutamatkonzentrationen jedoch verursachen Zelltod, der bei der Pathogenese verschiedener neurologischer Krankheitsbilder, wie dem ischämischen Schlaganfall, beteiligt ist. Dieser Mechanismus, in dem Glutamat eine Überstimulation von ionotropen Glutamatrezeptoren bewirkt, wird Exzitotoxizität genannt (Choi, 1988). Im Gegensatz dazu existiert auch noch die oxidative Glutamatoxizität. Hierbei wird durch eine exzessive extrazelluläre Glutamatkonzentration der Zystin/Glutamat-Antipporter  $X_c^-$  inhibiert, was zu einer intrazellulären Zystinverarmung führt. Als Folge kann nicht mehr genügend Glutathion gebildet werden und die Zelle geht an ihren en-

dogen produzierten reaktiven Sauerstoffspezies zugrunde. In der Regel kann so, mit 2,5-5 mM Glutamat ein fast 100 %iger Zelltod ausgelöst werden (J. Lewerenz, Klein, & Methner, 2006). Im Gegensatz dazu liegen beim ischämischen Schlaganfall extrazelluläre Konzentrationen von 500  $\mu$ M vor (Maher, 2005).

## **1.4 Die Zelllinie HT22**

Die Zelllinie HT22 aus hippocampalen Mäuse-Neuronen bildet keine ionotropen Glutamatrezeptoren. Aus diesem Grund eignet sie sich besonders gut für die Versuche mit oxidativer Glutamattoxizität, weil der exzitatorische Glutamateffekt keine Rolle spielt. So können oxidativer Stress und neuroprotektive Substanzen untersucht werden (Albrecht, et al., 2010; J. Lewerenz, et al., 2009; J. Lewerenz, Letz, & Methner, 2003; van Leyen, et al., 2008).

Durch wiederholte Exposition mit Glutamat konnte aus den HT22-Zellen eine glutamatresistente Zelllinie etabliert werden, die HT22R genannt wurde (J. Lewerenz, et al., 2006; Sahin, Saxena, Joost, Lewerenz, & Methner, 2006). Es wurden verschiedene Proteine gefunden, die in HT22R-Zellen in höherer Konzentration vorlagen und einen protektiven Einfluss gegen oxidative Glutamattoxizität haben (Dittmer, et al., 2008; J. Lewerenz, et al., 2006; Noack, et al., 2012; Sahin, et al., 2006; Toutzaris, et al., 2010). In Untersuchungen des Transkriptoms dieser neuen Zelllinie zeigte sich unter anderem eine Hochregulation von GDAP1 um den Faktor 15 (Noack, et al., 2012). In dieser Studie soll ausschließlich die Funktion von GDAP1 näher untersucht werden.

## **1.5 Zielsetzung**

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress bei einer Vielzahl von neurologischen Erkrankungen eine Rolle spielt.

Die Glutamattoxizität ist eine wichtige Methode, um möglichst physiologisch oxidativen Stress zu simulieren. Dabei konnte in der glutamatresistenten Zelllinie HT22R eine Hochregulation mehrerer Proteine festgestellt werden, unter anderem von GDAP1 (Dittmer, et al., 2008; J. Lewerenz, et al., 2006; Noack, et al., 2012; Sahin, et al., 2006; Toutzaris, et al., 2010). Möglicherweise ist die Hochregulation einiger dieser Proteine ursächlich für die Resistenz gegen oxidativen Stress.

Die genaue Rolle von GDAP1 ist bisher nicht bekannt, jedoch führt die Mutation dieses Gens zur neurodegenerativen Erkrankung Charcot-Marie-Tooth Typ 4A.

In dieser Doktorarbeit soll die Funktion von GDAP1 genauer untersucht werden, außerdem soll geklärt werden, ob oxidativer Stress möglicherweise auch in der Pathophysiologie von CMT4A eine Rolle spielt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellkultur

In der Zellkultur wurde mit der murinen Zelllinie HT22 gearbeitet, sowie mit den durch wiederholte Inkubation in glutamathaltigem Medium abgeleiteten glutamatresistenten HT22R-Zellen (J. Lewerenz, et al., 2006).

Material	Hersteller
<i>Dulbecco's</i> modifiziertes Eagle Medium mit viel Glucose ( <i>DMEM</i> )	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Dulbecco's</i> phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1x	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Opti-mem 1x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipofektamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Geneticin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TrypanBlau, 0,4 %	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.2 Bakterienkultur

Für die Klonierung und zur Vermehrung der Plasmide wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  verwendet. Er hat den Genotyp F'Phi80dlacZ DeltaM15 Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1endA1 hsdR17(rK-mK+)phoA supE44 lambda-thi-1.

Material	Hersteller
LB Agar	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LB <i>Broth Base</i> , Pulver	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SOC Medium	Invitrogen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 2.1.3 Klonierung

Material	Hersteller
LE Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
10x TBE-Puffer, Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10x <i>BlueJuice</i> Gel Loading Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
1kb Plus DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4-DNA-Ligationspuffer	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzyme: Bam-HI, XbaI, NotI, SacII Restriktionsenzym-Puffer NEB2	New England Biolabs, Ipswich, USA

## 2.1.4 Vektoren

Vektor	Hersteller
pcDNA 3.1/HisB	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pBluescript II SK (+) (pSK)	Stratagene, La Jolla, USA
pIRES2-EGFP	Clontech Laboratories, Palo Alto, USA
GDAP1:pcDNA	Axel Niemann, ETH Zürich, Schweiz
M116R:pcDNA	Axel Niemann, ETH Zürich, Schweiz
R120Q:pcDNA	Axel Niemann, ETH Zürich, Schweiz
R310Q:pcDNA	Axel Niemann, ETH Zürich, Schweiz

## 2.1.5 Proteinbiochemie

Material	Hersteller	
Radioimmunpräzitationspuffer (RIPA)	Thermo Scientific, Rockford, USA	
<i>Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
<i>NuPAGE</i> Sample reducing agent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	
<i>NuPAGE 4-12 % BisTris ZOOM-Gel</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	
<i>NuPAGE MES SDS</i> Laufpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	
<i>Ibnot stack regular</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	
<i>Magic Mark XP</i> Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	
Milchpulver	Saliter, Günzburg, Deutschland	
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10x	PAA Laboratories, Pasching, Österreich	
<i>Tween 20</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	
Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Gdap1 1-14, Kaninchen	1:5000	Axel Niemann, ETH Zürich, Schweiz
Aktin, Maus	1:1000	Chemicon/Millipore, Temecula, USA

<i>IRDye</i> ® Zweitantikörper Anti-Maus, IgG, Ziege	1:30000	Licor Biosciences, Kö- nigstein, Deutschland
<i>IRDye</i> ® Zweitantikörper Anti-Kaninchen, IgG, Ziege	1:30000	Licor Biosciences, Kö- nigstein, Deutschland

## 2.1.6 Glutathion-Messung

Enzymatische GSH-Messung

Material		Hersteller
Sulfosalicylsäure (SSA)		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triethanolamin (TEA)		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutathion reduziert		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dithiobisnitrobenzoesäure (DTNB)		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH)		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glutathionreduktase aus der Bäckerhefe		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Assay-Puffer	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	1 mM EDTA	
	pH 7,5	
Assay-Mix	0,6 mM DTNB in Assay-Puffer	
	0,8 mM NADPH in Assay-Puffer	
	5 µl/ml Glutathionreduktase	

## Durchflusszytometrische GSH-Messung

Material	Hersteller
<i>Cellwash-Lösung</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Monochlorobiman (MCB)	Molecular Probes, Eugene, USA
<i>Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS)</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.7 Kits

Material	Hersteller
<i>CellTiter-Blue Cell Viability Assay</i>	Promega, Karlsruhe, Deutschland
<i>BC Assay: protein quantification kit</i>	Interchim, Montlucon Cedex, Frankreich
<i>EnzyChrom NADP/NADPH Assay Kit</i>	BioAssay Systems, Hayward, USA
<i>Qiaprep Spin Miniprep</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Nucleobond Xtra Maxi Kit (50)</i>	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
<i>Qiaquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 2.1.8 Geräte

Gerät	Hersteller
<i>Heracell 150 Incubator</i>	Kendro, Schwerte, Deutschland
<i>Herasafe Sterile Hood</i>	Kendro, Schwerte, Deutschland
<i>BX51 Fluoreszenzmikroskop</i>	Olympus, Hamburg, Deutschland
<i>FluoroGenios Pro</i>	Tecan, Männedorf, Deutschland
<i>Biofuge Strato</i>	Heraeus, Osterode, Deutschland
<i>iBlot Dry Blotting Device</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>LiCOR- Odyssey Infraredscanner</i>	Licor, Bad Homburg, Deutschland
<i>GDS-Gel Imaging System</i>	Intas, Göttingen, Deutschland
<i>FACS CantoII Flow Cytometer</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<i>Tabletop Centrifuge 5415R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Xcell Sure Lock System</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

HT22-Zellen wurden in *Dulbecco's* modifiziertem Eagle medium (DMEM) mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 5 % FCS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Das Medium der glutamatresistenten Zelllinie HT22R enthielt zusätzlich 10 mM Glutamat.

#### Passagieren der Zellen

Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mit 0,5 % Trypsin EDTA passagiert.

#### Kryokultur

Um für die Versuche ausreichend Zellen gleicher Passage zur Verfügung zu haben, wurden zu Beginn der Versuche ausreichend Zellen eingefroren und bei Bedarf aufgetaut. Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und in 5 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden sie für 6 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet zum Waschen in 2 ml frischem PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und das Pellet schließlich in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden zunächst 24 h bei -80 °C, danach in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Das Auftauen erfolgte zügig im Wasserbad bei 37 °C, bis der gefrorene Inhalt noch erbsengroß war und auf eine 10 cm-Platte mit vorgewärmtem Medium gegeben werden konnte. Nachdem die Zellen auf der Platte angewachsen waren, wurde vorsichtig das Medium gewechselt.

#### Transfektion

Zum Transfizieren wurde *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000 nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) verwendet. Dazu wurden am Vortag 100.000 Zellen in 2 ml Medium auf 6-Well Platten ausgesät, die zum Zeitpunkt der Transfektion 80-90 % Konfluenz erreichten. Pro Well wurden jeweils 4 µg DNA und 4 µl Lipofektamin in 200 µl Opti-mem, einem serumfreien Medium, gemischt. Nach 5 Minuten wurden beide Lösungen gemischt und nach weiteren 20 Minuten, in denen sich die Komplexe zwischen DNA und Liposomen bildeten, Antibiotika-freies Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden gewaschen und das Transfektionsmedium hinzugegeben. Als Kontrolle diente die

Transfektion mit dem entsprechenden Leervektor. Die Zellen wurden 24 h bzw. 48 h nach Transfektion für die unten beschriebenen Versuche eingesetzt.

Die Transfektionsrate wurde mehrfach optisch durch Fluoreszenzmikroskopie oder per Durchflusszytometrie kontrolliert und lag immer bei ca. 50 %. Als Kontrollvektor diente dazu der pIRES2-EGFP-Vektor.

#### Herstellung einer stabilen Zelllinie

100.000 HT22 Zellen wurden auf 6-Well Platten ausgesät und mit den pIRES2-EGFP-Vektoren transfiziert, der zusätzlich eine Geneticinresistenz enthält. Ein Well enthielt untransfizierte Zellen. Nach 24 Stunden wurden alle Zellen mit 2 mg/ml Geneticin behandelt, einem Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese hemmt. Nach zwei Tagen Inkubation waren alle untransfizierten Zellen tot. Die transfizierten Zellen wurden so lange in Geneticin-haltigem Medium kultiviert, bis keine Zellen mehr starben, danach wurde dem normalen Medium etwa alle vier Wochen Geneticin zugesetzt.

### **2.2.2 Glutamatoxizitätsassay**

Für die Zelltodversuche mit Glutamat wurden, wenn nicht anders angegeben, 5000 Zellen in 100 µl auf 96-Well Platten ausgesät. Um die Sensibilität der Zellen zu analysieren, wurden die Zellen 24 h später mit unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen behandelt. 24 h nach Glutamatzugabe konnte das Sterben subjektiv mikroskopisch beobachtet werden. Gleichzeitig wurden pro Well 20 µl *CellTiter-Blue*® hinzugegeben und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Das *CellTiter-Blue*®-Reagenz enthält den blauen Farbstoff Resazurin, der in lebenden Zellen zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 562 nm und einer Emissionswellenlänge von 612 nm photometrisch gemessen. Die Daten wurden mit der *GraphPadPrism*™ Software ausgewertet. Dazu wurde der Referenzwert (nur Medium) abgezogen und der 0 mM-Glutamat-Wert auf 100 % normalisiert. Es wurden mindestens drei Experimente gepoolt und statistisch mit dem t-Test (Stichprobentest) oder einer one-way ANOVA (Varianzanalyse) ausgewertet.

### 2.2.3 Proteinbiochemie

#### Proteinlysate

Zur Proteinisolation wurden 150.000 Zellen auf 6-Well Platten ausgesät und gegebenenfalls transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen auf Eis zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mechanisch gelöst, in 150 µl RIPA-Puffer mit Protease Inhibitor (1 Tablette auf 10 ml RIPA-Puffer) aufgenommen und 30 Minuten bei 13,2 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde bei -80 °C gelagert.

#### Bestimmung der Proteinkonzentration

Um Proteinkonzentrationen zu bestimmen, wurde das *BC Assay protein quantitation kit* von Uptima verwendet. Es beruht auf der Biuret-Reaktion: Die Peptidbindungen der Proteine reduzieren 2-wertige zu 1-wertigen Kupferionen, welche mit Bichinonsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden. Es wurde eine Standardkurve von 0 - 200 µg/ml Protein angefertigt; die Proben wurden 1:10 verdünnt. Der weitere Ablauf erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Interchim).

#### Western-Blot

40 µg Protein wurden mit H<sub>2</sub>O auf 40 µl aufgefüllt und mit 13 µl SDS zur Denaturierung der Proteine und 6 µl SRA als Reduktionsmittel versetzt. Nach 7-minütigem Erhitzen auf 99 °C und anschließendem Abkühlen, wurden 20 µl auf ein *NuPage 4-12 % BisTris-Gel* geladen. Der Lauffpuffer enthielt 50 ml *NuPAGE MES SDS RunningBuffer (20x)* und 950 ml H<sub>2</sub>O. Als Marker wurden 2,5 µl Magic Mark aufgetragen. Die Proteine wurden bei 200 V etwa 35 Minuten im Gel aufgetrennt. Zum Blotten wurde das *iBlot Dry Blotting Device* von Invitrogen genutzt. Danach wurde der Blot eine Stunde in 3% Milch (1,5 g Milchpulver in 50 ml PBS-Tween (500 µl Tween auf 1 l PBS)) geblockt. Die Erstantikörper wurden in 3 % Milch verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit dem Blot inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot 45 Minuten mit PBS-Tween gewaschen, dann für ca. 45 Minuten mit dem Zweitantikörper inkubiert. Anschließend wurde erneut 45 Minuten in PBS-Tween gewaschen, bevor der Blot am *LI-COR ®Odyssey* gescannt werden konnte.

## 2.2.4 Glutathion-Messung

### Enzymatische GSH-Messung

Für die Messung der GSH-Konzentration in Abhängigkeit von Glutamat wurden 150.000 Zellen pro Well auf 6-Well Platten ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium gegen glutamathaltige Media verschiedener Konzentrationen ausgetauscht, die Messung erfolgte nach weiteren 8 h. Für die Messung der GSH-Konzentration in unterschiedlich transfizierten Zellen erfolgte die Messung 24 h nach Transfektion. Die Zellen wurden zweifach mit kaltem PBS gewaschen. 2 Wells zusammen wurden in 2 ml kaltem PBS aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl 10 % Sulfosalicylsäure zur Proteinpräzipitation gegeben. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben 10 Minuten auf Eis inkubiert, danach 10 Minuten bei 1400 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 24 µl 1:1 in Wasser verdünnter Triethanolamin-Lösung gegeben, gründlich gemischt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde über Nacht in 100 µl 0,2 N Natriumhydroxidlösung gelöst, um es später für eine Proteinbestimmung zu nutzen. Für die Glutathion-Messung wurden in 96-Well Platten 10 µl des GSH-Standards oder der Probe in 90 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Um die Reaktion zu starten, wurde pro Well 100 µl *Assay-Mix* dazugegeben. Dieser enthielt 0,6 mM Dithiobisnitrobenzoesäure (DTNB), 0,8 mM Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und 1 U/ml Glutathionreduktase. DTNB reagiert dabei mit Glutathiondisulfid unter der Bildung von Thiobisnitrobenzoesäure (TNB) und einer Verbindung von Glutathion und TNB. In einem weiteren Schritt spaltet die Glutathionreduktase diese Verbindung und es entsteht wieder Glutathiondisulfid und freies TNB. Für diese Reaktion ist NADPH nötig. Freies TNB kann bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt werden. Die Umsatzgeschwindigkeit dieser Reaktion ist proportional zur enthaltenen GSH-Menge. Der Umsatz wurde mit dem *GENios Pro microplatereader* (Tecan) bei 390 nm verfolgt. Als Standards wurden 4, 10, 20, 30, 40 und 50 µM GSH-Lösungen verwendet. Für die Auswertung wurden die Referenzwerte (nur Wasser) abgezogen und danach durch die entsprechende Proteinkonzentration dividiert, um eventuelle Unterschiede in der Zellkonzentration auszugleichen. Außerdem wurde der Kontrollvektor auf den Wert 1 normalisiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software *GraphPadPrism*<sup>TM</sup>. Auch hier wurde zur statistischen Auswertung ein t-Test oder eine one-way-ANOVA durchgeführt.

### Durchflusszytometrische GSH-Messung

Für die GSH-Messung in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration im Medium wurden 100.000 Zellen pro Well auf 6-Well Platten ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gegen glutamathaltige Medien verschiedener Konzentrationen ausgetauscht und 16 h bei 37°C inkubiert. Um die Glutamatkonzentrationen der verschiedenen Mutationen zu messen, wurden Zellen mit den pIRES-2-EGFP-Vektoren transfiziert. Die vorbereiteten Zellen wurden mit HBSS gewaschen, danach 10 Minuten im Dunkeln mit 20 µM Monochlorobiman (verdünnt in HBSS) inkubiert, erneut mit HBSS gewaschen, trypsinisiert und in 800 µl Cellwash-Lösung aufgenommen. Danach wurden sie zweifach zum Waschen 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert und in frischer Cellwash-Lösung resuspendiert. Die Messung erfolgte bei Anregungswellenlänge von 393 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm.

### 2.2.5 NADPH-Messung

Zur NADPH-Bestimmung wurde das *EnzyChrom™ NADP/NADPH Assay Kit* von Bio-Assay Systems verwendet. Die transfizierten Zellen wurden mit Trypsin gelöst, dann 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert und zweifach mit PBS gewaschen. Danach wurden 500.000 Zellen pro Versuchsansatz gezählt, in 100 µl NADPH-Extraktionspuffer aufgenommen und anschließend für 5 Minuten auf 60 °C erhitzt. Dann wurden 20 µl Assay-Puffer und 100 µl NADP-Extraktionspuffer hinzugefügt. Nach vorsichtigem Schütteln wurden die Proben für 5 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Die folgende NADPH-Bestimmung im Überstand erfolgte nach Protokoll. Das im MTT enthaltene farblose Tetrazolium wird bei diesem Versuch zu rotem Formazan reduziert. Dabei wird NADPH+H zu NADP oxidiert. Je mehr NADPH in der Probe enthalten ist, desto schneller kann diese Reaktion ablaufen. Die Glucose-Dehydrogenase sorgt dafür, dass während der Bildung von Gluconolacton aus Glucose das NADP wieder zu NADPH reduziert wird und die Reaktion nicht zum Erliegen kommt. Für die Auswertung wurden die 0-Minuten-Werte von den 30-Minuten-Werten abgezogen. Mit der Software GraphPadPrism™ wurden die Werte auf die Standardkurve bezogen und statistisch ausgewertet.

## 2.2.6 Klonierung

### Herstellung kompetenter Bakterien

Die Bakterien wurden inkubiert, bis eine OD600 von 0,5 erreicht wurde. Nach einer 15-minütigen Zentrifugierung bei 5000 U/min und 4 °C wurden die Bakterien in 100 ml kalter, 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend in 100 ml kalter, 100 mM CaCl<sub>2</sub> Lösung mit 15 % Glycerol gelöst und als 100 µl *Aliquots* bei -80 °C gelagert.

### Transformation

Zur Transformation wurden 3 µl DNA zu kompetenten Bakterien gegeben, 20 Minuten auf Eis inkubiert, 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 300 µl SOC Medium 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Suspension wurde auf einer Agar-Platte mit dem passenden Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Ampicillin wurde in den Platten 1:1000, Kanamycin 1:2000 verdünnt. Am nächsten Morgen wurden Kolonien für die Plasmid-Isolierung gepickt.

### Plasmid-Isolierung

Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit Kits von Qiagen oder Macherey-Nagel nach Herstellerprotokoll.

### DNA-Verdau

Für den DNA-Verdau wurden zu 5 µl DNA je 0,5 µl der beiden Restriktionsenzyme, 1 µl des passenden Puffers und 3 µl H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Diese Lösung wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und danach auf einem 1 % Agarosegel getrennt. Die Agarose wurde dazu in einem 1x TBE-Puffer gelöst. Zu 10 µl Probe wurde 1 µl *BlueJuice* zugefügt und 10 µl pro Tasche auf das Gel geladen. Als Marker wurden 7 µl des *Ikb Plus DNA-Marker* (Invitrogen) geladen. Die DNA-Fragmente wurden bei etwa 130 V aufgetrennt.

### Lösung der Fragmente aus dem Gel

Um die entstandenen Fragmente aus dem Gel zu lösen wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Protokoll verwendet.

## Ligation

Für die Ligation wurden 1 µl linearer Vektor, 2 µl des einzubauenden Gens, 1 µl T4-Ligase, 1 µl Ligationspuffer und 5 µl H<sub>2</sub>O gemischt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert.

## Klonierung von *Gdap1* und Mutanten vom pcDNA3.1 in den pIRES2-EGFP-Vektor

Für die GSH-Bestimmung per Durchflusszytometrie, sowie zur Herstellung einer fluoreszierenden, stabilen Zelllinie, wurden die verwendeten Gene, *Gdap1* und die *Gdap1*-Mutanten, vom pcDNA3.1-Vektor in einen pIRES2-EGFP-Vektor kloniert, wie im Folgenden beschrieben.

Zunächst wurden die Gene vom pcDNA3.1-Vektor in einen pBluescript SK-Vektor (pSK) kloniert, von diesem in den pIRES2-EGFP-Vektor.

Die vier pcDNA-Vektoren, die die Gene für GDAP1 und die Mutanten M116, R120Q und R310Q enthielten, sowie der pSK-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI und dem Puffer NEB2 geschnitten. Die *Gdap1*-Fragmente von 1082 bp aus dem pcDNA-Vektor sowie das 3 kbp -Fragment des linearisierten pSK-Vektors wurden ausgeschnitten, ligiert, transformiert, auf ampicillinhaltigen Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils sechs Kolonien gepickt und eine Plasmid-Isolierung durchgeführt.

Die entstandenen pSK-Plasmide wurden zur Kontrolle mit den Enzymen BamHI und NotI und dem Puffer NEB2 geschnitten. Anhand des angefertigten Kontrollgels wurde jeweils das erste Plasmid ausgewählt, um weiter in den pIRES2-EGFP-Vektor kloniert zu werden. Dazu wurden die pSK-Plasmide mit den neuen Genen durch die Restriktionsenzyme BamHI und SacII mit dem Puffer NEB2 geschnitten und der pIRES2-EGFP-Vektor mit den Enzymen BglII und SacII und dem Puffer NEB2. Die 1106 bp langen Fragmente wurden mit dem linearisierten pIRES2-EGFP-Vektor wie oben beschrieben ligiert, die Ligationsprodukte transformiert und die Transformanten auf kanamycinhaltigen Platten ausgestrichen. Ein Kontrollverdau mit NheI, BamHI und dem Puffer NEB2 diente zur Kontrolle der Klonierung.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Empfindlichkeit von HT22-Zellen gegenüber Glutamat ist abhängig von der Zelldichte

Für die Zelltodversuche wurden die HT22-Zellen in drei verschiedenen Konzentrationen, nämlich 2500, 5000 und 7500 Zellen pro Well in 96-Well Platten ausgesät. 24 h nach Glutamatzugabe wurde das Zellüberleben gemessen. Der Effekt der oxidativen Glutamattoxizität ist dabei abhängig von der Zelldichte. Während bei einer sehr dünnen Zelldichte, mit zu Beginn 2500 ausplattierten Zellen pro Well, schon 2,5 mM Glutamat ausreichen um einen 90 %igen Zelltod auszulösen, überleben bei den sehr dicht wachsenden Zellen, mit zu Beginn 10000 ausplattierten Zellen pro Well, fast 70 % eine Glutamatkonzentration von 20 mM. Für die folgenden Zelltodversuche wurde daher immer eine mittlere Zelldichte, von zu Beginn 5000 ausplattierten Zellen pro Well gewählt, bei denen circa 40 % eine Glutamatkonzentration von 5 mM überleben (Abb. 5).

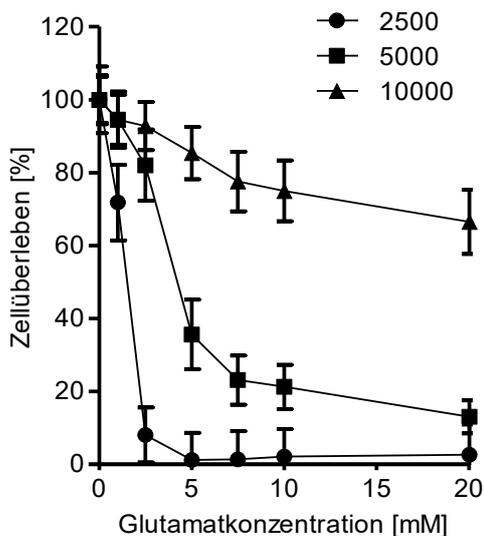


Abb. 5 HT22-Zellen sterben an glutamat-induziertem Zelltod in Abhängigkeit von ihrer Zelldichte.

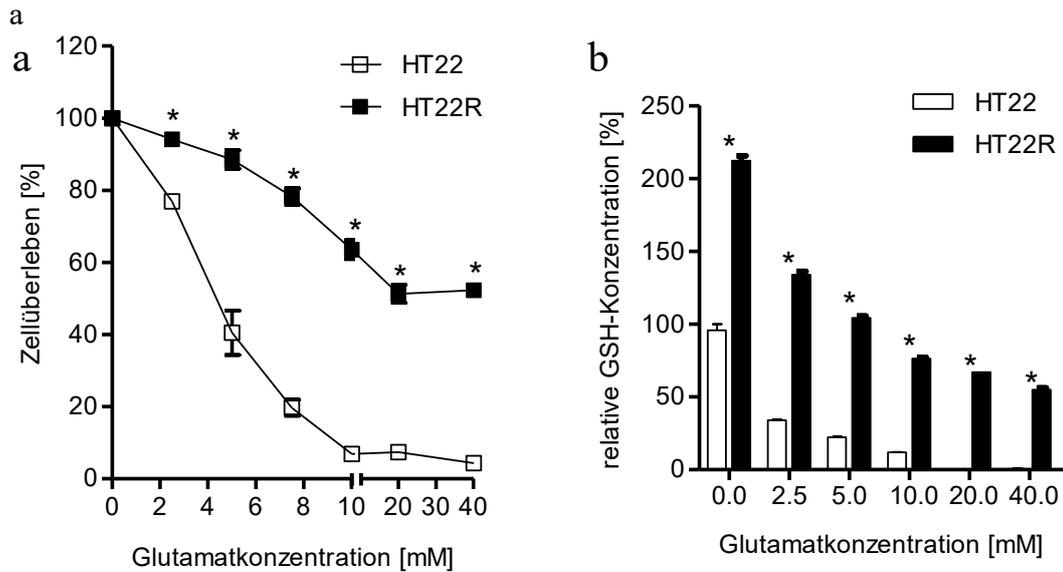
2500, 5000 und 10000 Zellen wurden ausplattiert, nach 24 h Behandlung mit Glutamat wurde das Zellüberleben gemessen. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) von  $n = 3$  Experimenten in Quintuplikaten.

### **3.2 HT22R-Zellen sind resistent gegenüber oxidativer Glutamattoxizität**

HT22R-Zellen wurden aus der HT22-Zelllinie abgeleitet, indem die Zellen wiederholt hohen Glutamatkonzentrationen ausgesetzt wurden, um die resistenten Zellen zu selektieren (J. Lewerenz, et al., 2006). In Zelltodversuchen zeigen HT22R-Zellen ein signifikant höheres Überleben als HT22-Zellen. 50 % der HT22R-Zellen überleben dabei Glutamatkonzentrationen von 40 mM, bei den HT22-Zellen sind im Gegensatz dazu schon bei 10 mM Glutamat 90 % der Zellen tot (Abb. 6a).

### **3.3 HT22R-Zellen weisen erhöhte Glutathionkonzentrationen auf**

Nach achtstündiger Inkubation in glutamathaltigem Medium wurde die intrazelluläre Glutathionkonzentration enzymatisch gemessen. Bereits ohne Glutamatzusatz enthalten HT22R-Zellen mehr als doppelt so viel Glutathion wie HT22-Zellen. Bei beiden Zelllinien nimmt die Glutathionkonzentration in Abhängigkeit von der dazugegebenen Glutamatkonzentration ab. Bei den HT22-Zellen reicht schon eine Konzentration von 2,5 mM Glutamat, um die intrazelluläre Glutathionkonzentration um mehr als die Hälfte zu reduzieren, während bei den HT22R-Zellen noch bei 40 mM Glutamat etwa ein Drittel der ursprünglichen Glutathionkonzentration vorhanden ist (Abb. 6b).



**Abb. 6 HT22R-Zellen sind resistent gegenüber oxidativer Glutamatoxizität und enthalten mehr Glutathion als HT22-Zellen. Mit zunehmender Glutamatkonzentration nimmt die Glutathionkonzentration ab.**

(a) Zelltodkurve für HT22R- und HT22-Zellen nach 24-stündiger Inkubation in glutamathaltigem Medium. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 6$  Experimenten in Quintuplikaten (\*  $P < 0.05$ , 2way ANOVA). (b) Enzymatisch bestimmte intrazelluläre Glutathionkonzentration nach achtstündiger Inkubation in glutamathaltigem Medium. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 4$  Experimenten in Duplikaten (\*  $P < 0.05$ , 2way ANOVA).

### 3.4 Die Rolle von GDAP1 bei der oxidativen Glutamatoxizität

#### 3.4.1 HT22R-Zellen exprimieren mehr GDAP1 als HT22-Zellen

Eine Hochregulation von *Gdap1* in HT22R-Zellen konnte schon in anderen Studien gezeigt werden (Noack, et al., 2012). Um eine Hochregulierung auf Proteinebene zu bestätigen wurden Proteinlysate von HT22R- und HT22-Zellen, sowie als Kontrolle das Proteinlysate von Mäusehirnen in einem Western-Blot untersucht. Es zeigten sich zwei Banden, die sich in HT22R- und HT22-Zellen unterschieden, eine bei rund 60 kDa, die andere bei rund 40 kDa. Das Molekulargewicht von GDAP1 beträgt 41,5 kDa. Die entsprechende Bande ist in den HT22R-Zellen zwar schwach, aber deutlich stärker ausgeprägt als in den HT22-Zellen. Auch die Bande bei 60 kDa ist in den HT22R-Zellen deutlich stärker ausgeprägt und könnte einer Splice-Isoform des GDAP1 entsprechen (Abb. 7).

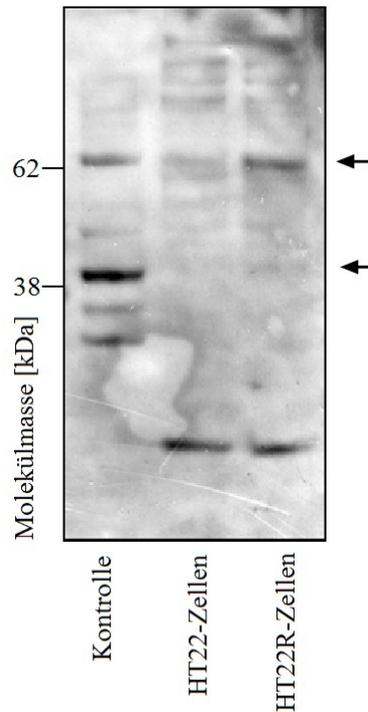


Abb. 7 **HT22R-Zellen exprimieren mehr GDAP1 als HT22-Zellen.**

Western Blot mit Lysaten von HT22- sowie HT22R-Zellen und von Mäusegehirnen als Positivkontrolle. In den HT22R-Zellen sind zwei Banden hochreguliert (Pfeile).

### 3.4.2 GDAP1 schützt vor oxidativer Glutamattoxizität

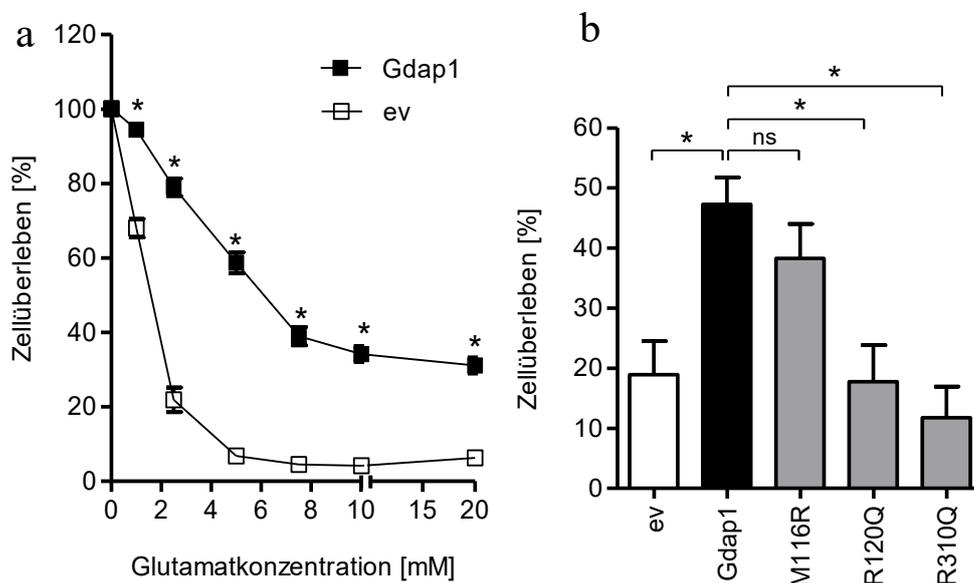
Für die Zelltodversuche wurden die Zellen nach transienter Transfektion 24 h in glutamathaltigem Medium inkubiert. Die *Gdap1*-überexprimierenden Zellen überlebten höhere Glutamatkonzentrationen. Im Gegensatz zu den untransfizierten Zellen, bei denen 2,25 mM Glutamat bei fast 80 % der Zellen den Zelltod auslösten, überlebten bei den transfizierten Zellen fast 40 % der Zellen Glutamatkonzentrationen von über 8 mM. GDAP1 schützt HT22-Zellen also vor oxidativer Glutamattoxizität (siehe Abb. 8a).

### 3.4.3 Krankheitsverursachende *Gdap1*-Mutationen heben den Schutz vor oxidativer Glutamattoxizität auf

Um herauszufinden, ob oxidativer Stress für die Entstehung von CMT4A relevant ist, wurden einige krankheitsauslösende Punktmutationen untersucht. Für die Zelltodversuche wurden die transient transfizierten Zellen nach Transfektion 24 h in glutamathaltigem Medium inkubiert. Die krankheitsauslösenden Mutationen führten dabei zu einer unterschiedlich ausgeprägten Reduktion des Schutzes gegen oxidative Glutamattoxizität. Eine fast komplette Aufhebung des GDAP1-vermittelten Schutzes war bei der Mu-

tation R310Q zu erkennen, während die Mutation M116R den Schutz nicht signifikant verminderte (Abb. 8b).

Diese Fähigkeit der verschiedenen Mutationen den Schutz vor oxidativer Glutamattoxizität aufzuheben korreliert mit der von Niemann und Kollegen dargestellten Fähigkeit eine Fragmentierung der Mitochondrien auszulösen (Abb. 3). GDAP1 und M116R führen zu einer starken Fragmentierung der Mitochondrien und schützen vor oxidativer Glutamattoxizität. Die Mutation R310Q dagegen hat den geringsten Effekt auf die Mitochondrienfragmentierung und schützt auch nicht vor oxidativer Glutamattoxizität. R120Q nimmt in beiden Experimenten eine Mittelstellung ein (Niemann, et al., 2005).



**Abb. 8 GDAP1-Überexpression schützt HT22-Zellen vor oxidativer Glutamattoxizität. Krankheitsverursachende Gdap1-Mutationen reduzieren diesen Schutz.**

(a) Zelltodkurve für transient *Gdap1* überexprimierende HT22-Zellen nach 24-stündiger Inkubation in glutamathaltigem Medium. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 9$  Experimenten in Quintuplikaten (\*  $P < 0.05$ , 2way ANOVA, Bonferroni).

(b) Zellüberleben von transient mit Wildtyp-*Gdap1* oder *Gdap1*-Mutationen transfizierten HT22-Zellen nach 24-stündiger Inkubation in 10 mM glutamathaltigem Medium. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 4$  Experimenten in Quintuplikaten (\*  $P < 0.05$ , ns  $P > 0.05$ , 1way ANOVA, Tukey's).

### 3.5 Etablierung von stabil überexprimierenden Zelllinien

Um die weiteren Experimente unkomplizierter und besser reproduzierbar zu machen, wurden für die oben genannten drei krankheitsauslösenden Mutationen jeweils stabile Zelllinien hergestellt.

#### 3.5.1 Klonierung der pIRES-Expressionsvektoren

Für die Klonierung wurden die pcDNA-Vektoren mit dem *Gdap1*-Wildtyp, beziehungsweise den *Gdap1*-Mutationen mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI geschnitten (Abb. 9a). Die entstandenen Fragmente von 1082 bp und der durch Verdau mit denselben Restriktionsenzymen linearisierte Vektor pSK mit einer Länge von 3kbp wurden ligiert.

Der pSK Vektor, der jetzt den *Gdap1*-Wildtyp, beziehungsweise die *Gdap1*-Mutationen enthielt wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und SacII geschnitten. Es entstanden Fragmente von 1106 bp. Diese Fragmente wurden mit dem durch BglII und SacII linearisierten Vektor pIRESII-EGFP ligiert (Abb. 9b).

Zur Überprüfung der Klonierung erfolgte ein Kontrollverdau der entstandenen pIRES2-EGFP-Vektoren mit den Restriktionsenzymen BamHI und NheI. Hier zeigte sich, dass in den erzeugten Vektoren die *Gdap1*- beziehungsweise die *Gdap1*-Mutation-Sequenzen enthalten sind mit einer Länge von ca. 1126 bp (Abb. 9c).

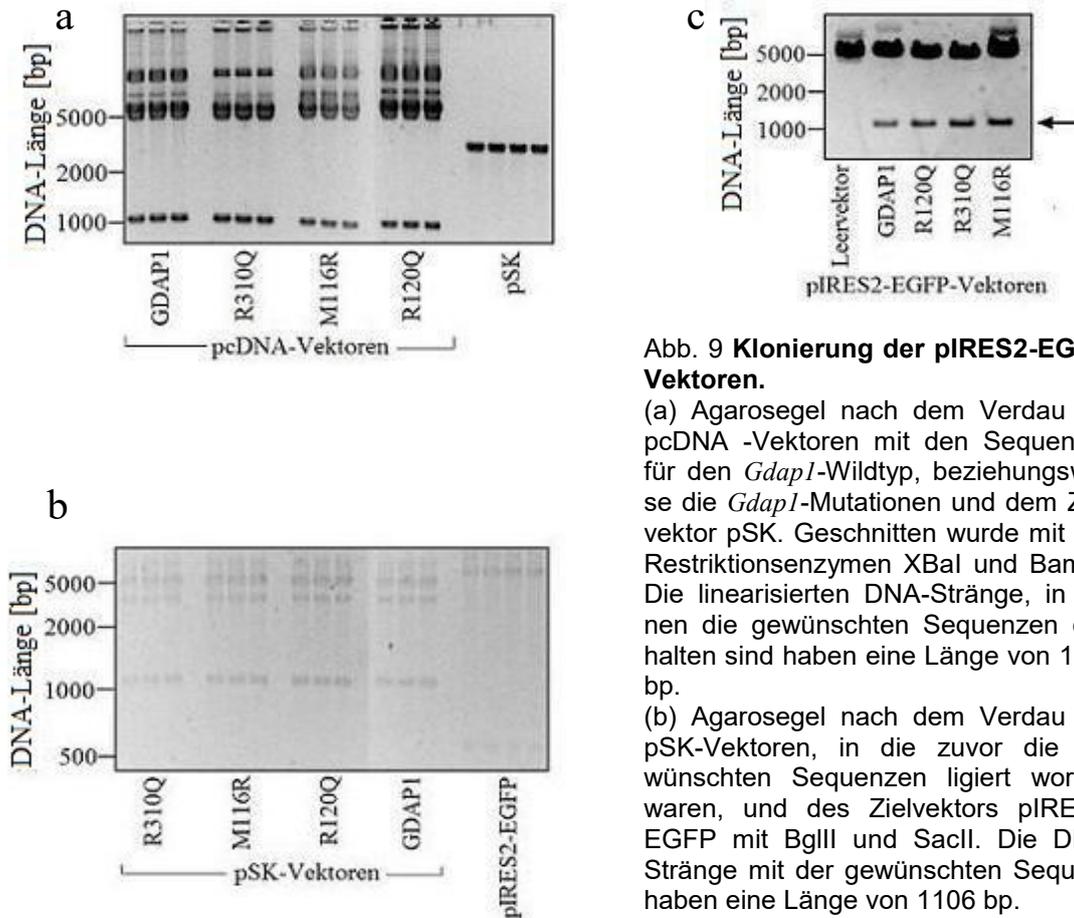


Abb. 9 Klonierung der pIRES2-EGFP-Vektoren.

(a) Agarosegel nach dem Verdau der pcDNA -Vektoren mit den Sequenzen für den *Gdap1*-Wildtyp, beziehungsweise die *Gdap1*-Mutationen und dem Zielvektor pSK. Geschnitten wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI. Die linearisierten DNA-Stränge, in denen die gewünschten Sequenzen enthalten sind haben eine Länge von 1082 bp.

(b) Agarosegel nach dem Verdau der pSK-Vektoren, in die zuvor die gewünschten Sequenzen ligiert worden waren, und des Zielvektors pIRES2-EGFP mit BglII und SacII. Die DNA-Stränge mit der gewünschten Sequenz haben eine Länge von 1106 bp.

(c) Agarosegel nach Kontrollverdau der fertigen pIRES2-EGFP-Vektoren mit BamHI und NheI. Die gewünschten Sequenzen von ca. 1180 bp sind in den Vektoren enthalten (Pfeil).

### 3.5.2 Bestimmung der Geneticinkonzentration zur Selektion transfizierter HT22-Zellen

Die pIRES2-EGFP Vektoren enthalten ein Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen. Da es sich bei den transfizierten HT22-Zellen um Eukaryoten handelt, ist Geneticin als entsprechendes Antibiotikum zur Selektion geeignet. Um die für eine Selektion optimale Geneticinkonzentration zu ermitteln, wurde der Effekt von ansteigenden Geneticinkonzentrationen auf HT22-Zellen getestet. Im Zelltodversuch zeigte sich, dass eine 24-stündige Inkubation mit 2 mg/ml Geneticin ausreicht um mehr als 90 % der Zellen absterben zu lassen (Abb. 10a).

### 3.5.3 Herstellung und Kontrolle der stabil überexprimierenden Zelllinien

Nach Transfektion der HT22S-Zellen mit den neuen pIRES2-EGFP Vektoren wurden die Zellen in geneticinhaltigem Medium inkubiert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen, die der gleichen Geneticinkonzentration ausgesetzt wurden. Nach zwei Tagen Inkubation in glutamathaltigem Medium waren alle untransfizierten Zellen tot, die transfizierten Zellen wurden so lange in geneticinhaltigem Medium kultiviert, bis keine Zellen mehr starben. Um die Expression der transfizierten Vektoren nachzuweisen wurde ein Western Blot angefertigt. Die GDAP1-entsprechende Bande konnte in allen Zelllinien nachgewiesen werden, außer in der mit dem Leervektor transfizierten Zelllinie. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte HT22-Zellen, bei denen die GDAP1-Bande nicht vorhanden ist (Abb. 10b).

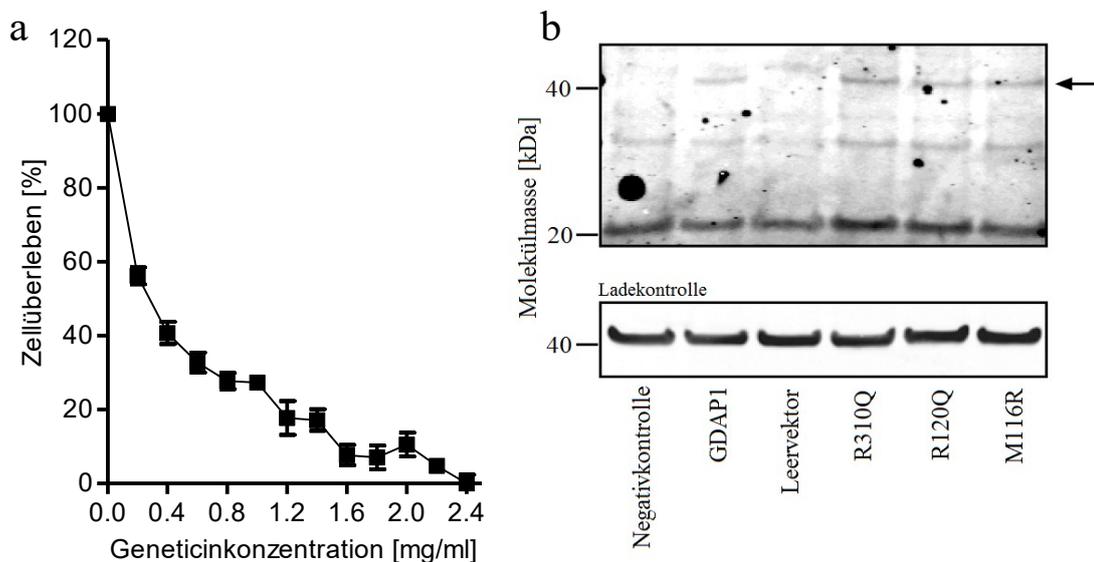


Abb. 10 **Herstellung der stabil überexprimierenden Zelllinien.**

(a) Zelltodkurve für HT22S-Zellen bei ansteigender Geneticinkonzentration. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 1$  Experiment in Quintuplikaten. (b) Proteinelektrophorese von Lysaten der stabilen Zelllinien. GDAP1 beziehungsweise die Mutationen werden in allen stabil transfizierten Zelllinien exprimiert, außer in der mit dem Leervektor transfizierten Zelllinie (Pfeil). Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen. Die Ladekontrolle mit Anti-Aktin-Antikörper zeigt eine gleichmäßige Proteinbeladung der Bahnen.

### **3.6 Auch stabile *Gdap1*-Überexpression schützt vor oxidativer Glutamatoxizität**

Mit den stabil transfizierten Zelllinien wurden die Zelltodversuche wiederholt. Wie auch in den vorherigen Versuchen wurden die Zellen nach 24 h Inkubation in 96-Well-Platten mit ansteigenden Glutamatkonzentrationen behandelt, das Zellüberleben wurde nach weiteren 24 h mit CTB gemessen. Es zeigte sich auch in den stabil *Gdap1*-überexprimierenden Zellen ein Schutz vor oxidativer Glutamatoxizität, wenngleich er in diesen Versuchen nicht signifikant war (Abb. 11a).

### **3.7 Die stabil transfizierten krankheitsverursachenden *Gdap1*-Mutationen reduzieren den Schutz gegen oxidative Glutamatoxizität**

Auch die *Gdap1*-Mutationen wurden in den stabil transfizierten Zelllinien auf ihren Effekt auf das Zellüberleben untersucht. In den stabil transfizierten Zelllinien hoben die krankheitsverursachenden Mutationen den GDAP1-vermittelten Schutz vor oxidativer Glutamatoxizität ebenfalls auf. Allerdings war bei den stabilen Zelllinien die Mutation M116R am wenigsten protektiv, wohingegen die Mutation R310Q annähernd genauso gut schützte wie der Wildtyp (siehe Abb. 11b). Die Stärke des Schutzes entsprach in den stabilen Zelllinien also nicht dem Effekt in den transient transfizierten Zellen und somit auch nicht dem Effekt auf die Fragmentierung der Mitochondrien (Niemann, et al., 2005).

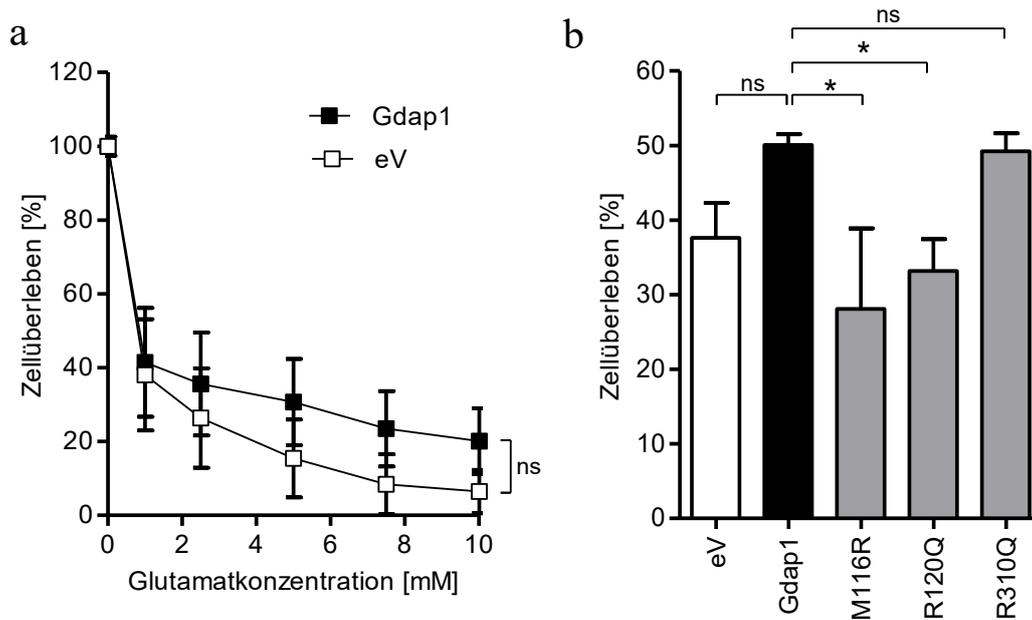


Abb. 11 **Stabile GDAP1-Überexpression schützt HT22-Zellen vor oxidativer Glutamattoxizität. Krankheitsverursachende *Gdap1*-Mutationen reduzieren diesen Schutz.**

(a) Zelltodkurve für stabil transfizierte Zellen nach 24-stündiger Inkubation in glutamathaltigem Medium. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 2$  Experimenten in Quintuplikaten (ns  $P < 0.05$ , 2way-ANOVA, Bonferroni).

(b) Zellüberleben der stabil transfizierten Zellen nach 24-stündiger Inkubation in 10 mM glutamathaltigem Medium. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 2$  Experimenten in Quintuplikaten (\*  $P < 0.05$ , ns  $P > 0.05$ , 1way-ANOVA, Tukey's).

### 3.8 Stabile GDAP1-Überexpression, aber nicht die stabile Überexpression der krankheitsverursachenden Mutationen erhöht den intrazellulären Glutathionspiegel

Da in HT22R-Zellen eine höhere Glutathionkonzentration nachgewiesen wurde als in HT22-Zellen wurde mit den stabil transfizierten Zellen der Effekt der GDAP1-Überexpression auf den intrazellulären Glutathionspiegel untersucht.

Bei der enzymatischen Glutathionmessung zeigte sich, dass eine stabile GDAP1-Überexpression die intrazelluläre Glutathionkonzentration erhöht, jedoch nicht signifikant gegenüber dem Leervektor. Die Mutationen dagegen zeigten eine im Vergleich zu der GDAP1-überexprimierenden Zelllinie geringere Glutathionkonzentration, bei der Mutation R310Q war dieser Unterschied signifikant (Abb. 12a).

In der durchflusszytometrischen Messung zeigte sich eine deutliche, signifikante Steigerung der intrazellulären Glutathionkonzentration bei der stabil GDAP1-

überexprimierenden Zelllinie gegenüber der den Leervektor exprimierenden Zelllinie. Die Mutationen führten zu einer nicht signifikanten Abnahme der durchflusszytometrisch gemessenen Glutathionkonzentration. Allerdings ist auch in diesem Experiment die Abstufung der verschiedenen Mutationen auf die Stärke der Reduktion zu erkennen und entspricht dem Effekt auf die Fragmentation der Mitochondrien (Niemann, et al., 2005) (Abb.12b).

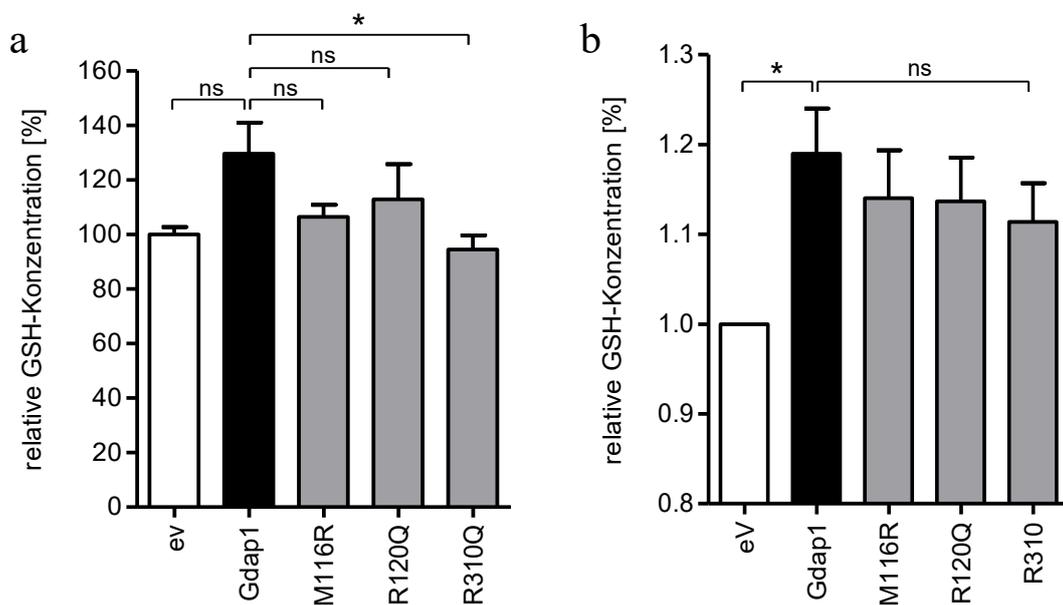


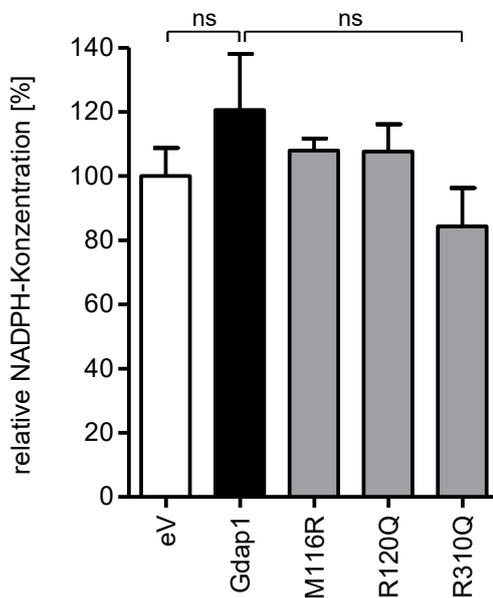
Abb. 12 **Stabile GDAP1-Überexpression erhöht den intrazellulären Glutathionspiegel von HT22-Zellen, dieser Effekt wird von den krankheitsauslösenden Mutationen reduziert.**

(a) Enzymatische Glutathionmessung in stabil transfizierten HT22-Zellen. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 4$  Experimenten in Duplikaten (\*  $P < 0.05$ , ns  $P > 0.05$ , 1way-ANOVA, Tukey's).

(b) Durchflußzytometrische Messung der Glutathionkonzentration. Die HT22-Zellen wurden transient mit den pIRES2-EGFP-Vektoren transfiziert, nach 24 h wurden sie 10 Minuten lang mit 20  $\mu$ M MCB inkubiert, dann erfolgte die Glutathionmessung. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 3$  Experimenten in Quadruplikaten (\*  $P < 0.05$ , ns  $P > 0.05$ , 1way-ANOVA, Tukey's).

### 3.9 Stabil GDAP1-überexprimierende Zellen zeigen eine statistisch nicht signifikant erhöhte NADPH-Konzentration

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des zellulären antioxidativen Systems ist NADPH, was von der Glutathion-Reduktase zur Reduktion von Glutathion aus Glutathiondisulfid benötigt wird. Es zeigte sich in der stabil GDAP1-überexprimierenden Zelllinie eine nicht signifikante Steigerung der NADPH-Konzentration. Die Mutationen zeigten geringere, aber ebenfalls nicht signifikante Unterschiede in der NADPH-Konzentration (Abb. 13).



**Abb. 13 GDAP1-überexprimierende Zellen weisen eine statistisch nicht signifikant erhöhte NADPH-Konzentration auf, dieser Effekt ist bei den krankheitsauslösenden Mutationen eingeschränkt.**

Die NADPH-Messung erfolgte 24 h nach dem Ausplattieren der stabilen Zelllinien. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM von n = 4 Experimenten in Duplikaten (ns P > 0.05, 1way-ANOVA, Tukey's).

## 4. Diskussion

### 4.1 GDAP1 und oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist erwiesenermaßen an der Pathogenese verschiedenster Krankheiten beteiligt (Uttara, 2009).

Zur Simulation von oxidativem Stress wurde in dieser Studie die oxidative Glutamattoxizität verwendet. Dabei sorgen hohe extrazelluläre Glutamatkonzentrationen für eine Hemmung der Zystinaufnahme in die Zelle und somit zu einer intrazellulären Verarmung an dem antioxidativ wirkenden Enzym Glutathion, mit der Folge, dass die Zellen an ihren endogen produzierten reaktiven Sauerstoffspezies zugrunde gehen.

Die in dieser Studie verwendeten murinen, hippocampalen HT22-Zellen zeichnen sich durch das Fehlen von ionotropen Glutamatrezeptoren aus, sodass sie für die Versuche zur oxidativen Glutamattoxizität besonders geeignet sind, weil der exzitatorische Glutamateffekt keine Rolle spielt (Albrecht, et al., 2010; J. Lewerenz, et al., 2009; J. Lewerenz, et al., 2003; van Leyen, et al., 2008).

Die Zugabe von Glutamat führt in diesen Zellen zur Induktion eines programmierten Zelltodes, auch Oxytose genannt, der mit einem Absinken der Glutathionkonzentration, einem Anstieg intrazellulärer freier Radikale, einer Aktivierung der 12-Lipoxygenase, der Translokation der proapoptotischen Proteins Bid in die Mitochondrien und schließlich zur Öffnung cGMP-abhängiger Kalziumkanäle mit Zusammenbruch des Membranpotenzials führt (Jan Lewerenz & Methner, 2006; Tan, et al., 2001).

In dieser Studie konnte mit einer Konzentration von 5 mM Glutamat ein mehr als 50 %iger Zelltod ausgelöst werden. Dies deckt sich mit früheren Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe (J. Lewerenz, et al., 2006). Solche Konzentrationen erscheinen unphysiologisch hoch, was aber darin begründet sein könnte, dass auch Zystin im Zellkulturmedium in unphysiologisch hoher Konzentration vorliegt. Werden die Daten auf physiologische Zystinkonzentrationen extrapoliert reicht schon eine zweifach erhöhte physiologische Glutamatkonzentration aus, um den Zelltod auszulösen, was z.B. bei einer Ischämie um eine Vielfaches überschritten werden würde (Jan Lewerenz & Methner, 2006).

Durch dauerhafte Inkubation in glutamathaltigem Medium konnte die glutamatresistente Zelllinie HT22R etabliert werden. Der Schutz vor oxidativer Glutamattoxizität könnte sowohl auf eine verminderte Bildung von ROS zurückzuführen sein, wie auch auf ver-

besserte Schutzmechanismen gegenüber oxidativem Stress. In dieser Zelllinie kam es bei dauerhafter Inkubation in glutamathaltigem Medium zu einer Deletion von 13 Basenpaaren, was dazu führte, dass der Transkriptionsfaktor ATF4 Teil eines Fusionsproteins wurde und nun unabhängig vom Phosphorylierungszustand translatiert wird und zu einer Überexpression von xCT, einer Untereinheit der Glutamat/Zystin-Antiporters  $X_c^-$ , führt (J. Lewerenz, et al., 2012). Neben xCT konnte in der Transkriptomanalyse dieser Zellen auch eine Hochregulation mehrerer anderer Gene nachgewiesen werden, u.a. von *Gdap1* (Noack, et al., 2012). Dies konnten wir auf Proteinebene im Westernblot bestätigen.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Schutz der HT22R-Zellen vor glutamat-induziertem Zelltod auch durch die GDAP1 Überexpression begründet ist.

In den durchgeführten Versuchen mit transient und stabil GDAP1-überexprimierenden HT22-Zellen ließ sich ein Schutz vor oxidativer Glutamattoxizität nachweisen. Allerdings waren transfizierte HT22-Zellen nicht so resistent gegenüber oxidativer Glutamattoxizität wie die HT22R-Zellen. Im Vergleich überlebten 60 % der HT22-R-Zellen eine Glutamatkonzentration von 10 mM, wohingegen bei derselben Konzentration nur knapp 40 % der *Gdap1*-transfizierten HT22-Zellen überlebten. Somit kann nur ein Teil der Protektion von HT22R-Zellen dem GDAP1 zugeschrieben werden. Wesentliche andere am Schutz der HT22R-Zellen beteiligte Proteine sind bereits identifiziert, es handelt sich dabei u.a. um das Enzym Katalase und um das oben bereits erwähnte xCT, eine Untereinheit des Glutamat/Zystin-Antiporters  $X_c^-$  (J. Lewerenz, et al., 2006).

Im Umkehrschluss konnte in weiterführenden Studien gezeigt werden, dass durch Knockdown von *Gdap1* in HT22R-Zellen ein Teil des Schutzes vor oxidativer Glutamattoxizität verloren geht (Noack, et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass GDAP1 unter den von uns erzeugten experimentellen Bedingungen vor oxidativem Stress schützen kann. Es bleibt noch zu klären, ob dieser Effekt auch in physiologischeren Modellen zu beschreiben ist. In einem ersten Schritt wurde bereits versucht in peripheren Motoneuronen der murinen Zelllinie NSC34 ein Schutz durch GDAP1 vor oxidativem Stress nachzuweisen. Tatsächlich konnte auch hier durch *Gdap1*-Knockdown die Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress gesteigert werden (Noack, et al., 2012).

## 4.2 Die Rolle von GDAP1 im Glutathionstoffwechsel

Der in HT22-R-Zellen vorhandene und durch *Gdap1*-Überexpression ausgelöste Schutz vor oxidativer Glutamatoxizität könnte, wie gesagt, entweder durch einen besseren Schutz vor oxidativem Stress, als auch durch eine verminderte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht sein. Eines der wichtigsten Antioxidantien im menschlichen Körper ist das Glutathion.

In HT22R-Zellen konnte eine mehr als doppelt so hohe Konzentration an Glutathion gemessen werden als in glutamatsensiblen HT22-Zellen. Durch Zugabe von Glutamat nahm die GSH-Konzentration ab, was nicht überraschend ist, da durch das extrazelluläre Glutamat der Glutamat-Zystin-Antiport nur noch eingeschränkt funktioniert und es so zu einer intrazellulären Zystinverarmung kommt und somit kein Glutathion mehr gebildet werden kann.

Auch durch transiente und stabile GDAP1-Überexpression konnten höhere intrazelluläre Glutathionspiegel erzeugt werden, wenngleich auch nicht in demselben Ausmaß wie in den HT22R-Zellen. Somit scheint GDAP1 durch eine Konzentrationserhöhung des antioxidativen Stoffes Glutathion vor oxidativem Stress zu schützen. Unklar ist allerdings, ob es an einer gesteigerten Synthese oder am verminderten Abbau liegt.

In weiterführenden Studien wurde nach Effekten von GDAP1 auf die späteren Schritte der oxidativen Glutamatoxizität gesucht. Wie bereits erwähnt kommt es im Verlauf neben der intrazellulären Glutathionverarmung zu einem Anstieg intrazellulärer freier Radikale, einer Aktivierung der 12-Lipoxygenase, der Translokation des proapoptischen Proteins Bid in die Mitochondrien und schließlich zur Öffnung cGMP-abhängiger Kalziumkanäle mit Zusammenbruch des Membranpotenzials (Jan Lewerenz & Methner, 2006; Tan, et al., 2001). Dort zeigte sich, dass GDAP1 auch vor der Aktivierung der 12-Lipoxygenase und der Störung des mitochondrialen Membranpotentials durch die Translokation von Bid schützt. Außerdem konnte in HT22R-Zellen und in mit *Gdap1*-transfizierten HT22-Zellen eine Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials und eine Verminderung der ROS-Konzentration gemessen werden.

*Gdap1* schützt also nicht ausschließlich durch eine Erhöhung der Glutathionkonzentration sondern auch durch eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials und einer verminderten Bildung von ROS, möglicherweise durch Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und der Förderung von alternativer Energiegewinnung über die

Glykolyse und den Pentosephosphatweg, was ebenfalls zytoprotektiv wirken soll (Noack, et al., 2012; Pfeiffer, et al., 2014).

In bioinformatischen Untersuchungen wurden Ähnlichkeiten von GDAP1 und Glutathion-S-Transferasen nachgewiesen. Am N-terminalen Ende befindet sich die GSH-typische Alpha-helix zur Substratbindung. Zusätzlich befinden sich am C-terminalen Ende zwei hydrophobe Bereiche, von denen mindestens eine Transmembrandomäne darstellt, was bei den löslichen GSTs nicht vorkommt.

Diese Tatsache und die beschriebenen intrazellulären Effekte sowie die Beeinflussung der Mitochondrienmorphologie (Niemann, et al., 2005) legen den Schluss nahe, dass es sich bei GDAP1 unter Umständen um einen Glutathionsensor handeln könnte, mit einer cytosolischen Glutathionbindestelle wie in GST, sowie einer Transmembrandomäne in der äußeren Mitochondrienmembran über die es zu einer Signalweitergabe in die Mitochondrien kommen könnte. Bisher konnte aber weder eine Glutathionbindung noch eine GST-Aktivität nachgewiesen werden (Shield, et al., 2006; Wagner, et al., 2009). Auch wenn in diesen Studien bakteriell exprimiertes GDAP1 ohne Transmembrandomäne untersucht wurde erscheint der Nachweis einer GST-Aktivität unwahrscheinlich, denn man würde eher eine Verminderung der Glutathionspiegel erwarten.

GDAP1 schützt also vor oxidativem Stress durch Erhöhung der intrazellulären Glutathionkonzentration, sowie durch Verminderung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. GDAP1 als Glutathionsensor in der äußeren Mitochondrienmembran bleibt vorerst Spekulation, wenn keine Glutathionbindung am kompletten Protein nachgewiesen werden kann.

### **4.3 GDAP1 und Charcot-Marie-Tooth**

Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit ist die häufigste erbliche neuromuskuläre Erkrankung und betrifft ungefähr einen von 2500 Menschen (Skre, 1974). CMT4A wird autosomal rezessiv vererbt und beruht auf einer *Gdap1*-Mutation (Baxter, et al., 2002; Cuesta, et al., 2002). In dieser Studie beschränkten wir uns auf die Missense-Mutationen R310Q, M116R und R120Q.

Ich konnte zeigen, dass krankheitsauslösende *Gdap1*-Mutationen nur noch eingeschränkt gegen oxidative Glutamattoxizität schützen. Interessanterweise korrelierte der Schutz mit der Fähigkeit die Mitochondrienmorphologie zu beeinflussen. R310Q-

transfizierte HT22-Zellen waren nicht mehr gegen oxidativen Stress geschützt und es führte auch zu keiner Mitochondrienfragmentierung, wie eine Überexpression mit intaktem GDAP1 (Niemann, et al., 2005). Auch der Schutz vor 12-Lipoxygenase und Bid-Translokation, sowie der Effekt auf das mitochondriale Membranpotential sowie die ROS-Produktion wurde durch die Transfektion von R310Q in HT22-Zellen eingeschränkt (Noack, et al., 2012). Außerdem enthielten mit R310Q-transfizierte HT22-Zellen im Vergleich zu mit *Gdap1*-transfizierten HT22-Zellen eine geringere NADPH-Konzentration, ein weiteres wichtiges intrazelluläres Antioxidans, das unter anderem von der Glutathionreduktase zur Reduktion von Glutathion aus Glutathiondisulfid benötigt wird.

Dies legt nahe, dass es bei der Pathogenese von Charcot-Marie-Tooth zu oxidativem Stress kommt und die Zellen durch die Mutationen in *Gdap1* nicht mehr genügend geschützt sind und darum geschädigt werden.

Alle Experimente in dieser Studie wurden an der murinen hippocampalen Zelllinie HT22 durchgeführt. Um weitere krankheitsbezogene Informationen zu sammeln, müssen weitere Untersuchungen an repräsentativeren Zellen durchgeführt werden. Erste Schritte wurden mit den Versuchen an murinen peripheren Motoneuronen, den NSC34-Zellen, schon gemacht, dort konnten die Ergebnisse teilweise bestätigt werden. In einem weiteren Schritt wurden Fibroblasten von 2 CMT4A-Patienten untersucht, in denen die Glutathionkonzentration signifikant erniedrigt war (Noack, et al., 2012).

Auch bei M. Parkinson und anderen Motoneuronenerkrankungen konnten erniedrigte Glutathionkonzentration festgestellt werden und bei der Pathogenese von M. Parkinson, M. Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen spielt oxidativer Stress bekanntermaßen eine Rolle (Uttara, Singh, Zamboni, & Mahajan, 2009).

CMT4A ist demnach eine weitere Erkrankung in einer langen Liste, bei deren Pathophysiologie oxidativer Stress eine Rolle spielt.

## 5. Schlussfolgerung

Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit ist mit einer Prävalenz von 1:2500 ungefähr so häufig wie die Mukoviszidose oder das Down-Syndrom (Skre, 1974).

Auch wenn sie mit einer normalen Lebenserwartung einhergeht bedeutet sie für die Patienten doch erhebliche Einschränkungen durch fortschreitende körperliche Behinderungen.

Da die Pathogenese der Erkrankung bisher unklar ist, kann auch keine kurative Therapie erfolgen. Durch Physiotherapie und orthopädische Maßnahmen wird versucht die Bewegungsfähigkeit der Betroffenen längst möglich zu erhalten.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer Untergruppe der CMT, nämlich dem autosomal rezessiv vererbten Typ 4, der in Europa nur noch 4% der CMT-Fälle ausmacht (Dubourg, et al., 2001), wovon ein noch kleinerer Anteil durch Mutationen im Gen für GDAP1 ausgelöst werden und dann die CMT4A verursacht.

Über das betroffene Protein GDAP1 war bekannt, dass es ein integrales Membranprotein der äußeren Mitochondrienmembran ist und Einfluss auf die Teilung von Mitochondrien hat, außerdem hat es Homologien zu Glutathion-S-Transferasen. Wir fanden GDAP1 in einer Zelllinie mit einer Resistenz gegen oxidativen Stress und konnten die Schutzfunktion teilweise auf GDAP1 zurückführen. GDAP1 schützt die Zellen vor oxidativem Stress, indem es die intrazelluläre Glutathion- und NADPH-Konzentration erhöht, was bei krankheitsauslösenden Mutationen nur noch eingeschränkt funktioniert.

In der Pathogenese der CMT4A ist folglich auch oxidativer Stress ein Faktor, wie bei vielen anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson auch. Dort wird versucht mit antioxidativen Substanzen präventiv und therapeutisch Behandlungserfolge zu erzielen. Ob das auch bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit erfolgreich sein kann, muss sich noch zeigen.

## Literaturverzeichnis

- Albrecht, P., Lewerenz, J., Dittmer, S., Noack, R., Maher, P., & Methner, A. (2010). Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system xc<sup>-</sup> as a neuroprotective drug target. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 373-382.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 205-214.
- Baxter, R. V., Ben Othmane, K., Rochelle, J. M., Stajich, J. E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J. E., Gilbert, J. R., Pericak-Vance, M. A., & Vance, J. M. (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet*, 30, 21-22.
- Ben Othmane, K., Hentati, F., Lennon, F., Ben Hamida, C., Blel, S., Roses, A. D., Pericak-Vance, M. A., Ben Hamida, M., & Vance, J. M. (1993). Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum Mol Genet*, 2, 1625-1628.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Desquiere, V., Verny, C., Nicolas, G., Dubas, F., Amati-Bonneau, P., Reynier, P., Bonneau, D., & Procaccio, V. (2011). Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Exp Neurol*, 227, 31-41.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1, 623-634.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M. J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marin, I., Vilchez, J. J., & Palau, F. (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet*, 30, 22-25.
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 870-879.
- Dittmer, S., Sahin, M., Pantlen, A., Saxena, A., Toutzaris, D., Pina, A. L., Geerts, A., Golz, S., & 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.
- Dubourg, O., Tardieu, S., Birouk, N., Gouider, R., Leger, J. M., Maisonobe, T., Brice, A., Bouche, P., & LeGuern, E. (2001). The frequency of 17p11.2 duplication and Connexin 32 mutations in 282 Charcot-Marie-Tooth families in relation to the mode of inheritance and motor nerve conduction velocity. *Neuromuscul Disord*, 11, 458-463.

- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, *408*, 239-247.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*, *201*, 1203-1209.
- Gess, B., Schirmacher, A., & Young, P. (2013). Genetik der Neuropathien. *Der Nervenarzt*, *84*, 157-165.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, *18*, 685-716.
- Harding, A. E., & Thomas, P. K. (1980). The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain*, *103*, 259-280.
- Lewerenz, J., Albrecht, P., Tien, M. L., Henke, N., Karumbayaram, S., Kornblum, H. I., Wiedau-Pazos, M., Schubert, D., Maher, P., & Methner, A. (2009). Induction of Nrf2 and xCT are involved in the action of the neuroprotective antibiotic ceftriaxone in vitro. *J Neurochem*, *111*, 332-343.
- Lewerenz, J., Klein, M., & Methner, A. (2006). Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc<sup>-</sup> protects from oxidative glutamate toxicity. *J Neurochem*, *98*, 916-925.
- Lewerenz, J., Letz, J., & Methner, A. (2003). Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress. *J Neurochem*, *87*, 522-531.
- Lewerenz, J., & Methner, A. (2006). Mechanismen und Bedeutung der oxidativen Glutamattoxizität. *Neuroforum*, *03*, 222-226.
- Lewerenz, J., Sato, H., Albrecht, P., Henke, N., Noack, R., Methner, A., & Maher, P. (2012). Mutation of ATF4 mediates resistance of neuronal cell lines against oxidative stress by inducing xCT expression. *Cell Death Differ*, *19*, 847-858.
- Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z.-G., & Ghanbari, H. (2013). Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 24438-24475.
- Liu, H., Nakagawa, T., Kanematsu, T., Uchida, T., & Tsuji, S. (1999). Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J Neurochem*, *72*, 1781-1790.
- Lupski, J. R., de Oca-Luna, R. M., Slaugenhaupt, S., Pentao, L., Guzzetta, V., Trask, B. J., Saucedo-Cardenas, O., Barker, D. F., Killian, J. M., Garcia, C. A., Chakravarti, A., & Patel, P. I. (1991). DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*, *66*, 219-232.
- Maher, P. (2005). The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev*, *4*, 288-314.

- Marco, A., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F., & Marin, I. (2004). Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol*, *21*, 176-187.
- Martin, J. J., Brice, A., Van Broeckhoven C. (1999). 4th Workshop of the European CMT-Consortium--62nd ENMC International Workshop: rare forms of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders 16-18 October 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, *9*, 279-287.
- Nelis, E., Erdem, S., Van Den Bergh, P. Y., Belpaire-Dethiou, M. C., Ceuterick, C., Van Gerwen, V., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F., Gabreels-Festen, A. A., Verellen, C., Tan, E., Demirci, M., Van Broeckhoven, C., De Jonghe, P., Topaloglu, H., & Timmerman, V. (2002). Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology*, *59*, 1865-1872.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A., & Suter, U. (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol*, *170*, 1067-1078.
- Noack, R., Frede, S., Albrecht, P., Henke, N., Pfeiffer, A., Knoll, K., Dehmel, T., Meyer Zu Horste, G., Stettner, M., Kieseier, B. C., Summer, H., Golz, S., Kochanski, A., Wiedau-Pazos, M., Arnold, S., Lewerenz, J., & Methner, A. (2012). Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum Mol Genet*, *21*, 150-162.
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M. E., & Palau, F. (2005). GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet*, *14*, 1087-1094.
- Pfeiffer, A., Jaeckel, M., Lewerenz, J., Noack, R., Pouya, A., Schacht, T., Hoffmann, C., Winter, J., Schweiger, S., Schäfer, M. K. E., & Methner, A. (2014). Mitochondrial function and energy metabolism in neuronal HT22 cells resistant to oxidative stress. *British Journal of Pharmacology*, *171*, 2147-2158.
- Raeymaekers, P., Timmerman, V., Nelis, E., De Jonghe, P., Hoogendijk, J. E., Baas, F., Barker, D. F., Martin, J. J., De Visser, M., Bolhuis, P. A., & et al. (1991). Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord*, *1*, 93-97.
- Reilly, M. M., Murphy, S. M., & Laura, M. (2011). Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, *16*, 1-14.
- Sahin, M., Saxena, A., Joost, P., Lewerenz, J., & Methner, A. (2006). Induction of Bcl-2 by functional regulation of G-protein coupled receptors protects from oxidative glutamate toxicity by increasing glutathione. *Free Radic Res*, *40*, 1113-1123.

- Senderek, J., Bergmann, C., Ramaekers, V. T., Nelis, E., Bernert, G., Makowski, A., Zuchner, S., De Jonghe, P., Rudnik-Schoneborn, S., Zerres, K., & Schroder, J. M. (2003). Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain*, *126*, 642-649.
- Shield, A. J., Murray, T. P., & Board, P. G. (2006). Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun*, *347*, 859-866.
- Skre, H. (1974). Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet*, *6*, 98-118.
- Tan, S., Schubert, D., & Maher, P. (2001). Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr Top Med Chem*, *1*, 497-506.
- Thomas, P. K., & Calne, D. B. (1974). Motor nerve conduction velocity in peroneal muscular atrophy: evidence for genetic heterogeneity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *37*, 68-75.
- Toutzaris, D., Lewerenz, J., Albrecht, P., Jensen, L. T., Letz, J., Geerts, A., Golz, S., & Methner, A. (2010). A novel giant peroxisomal superoxide dismutase motif-containing protein. *Free Radic Biol Med*, *48*, 811-820.
- Uttara, B. (2009). Oxidative stress an neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, *7*, 65-74
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, *7*, 65-74.
- van Leyen, K., Arai, K., Jin, G., Kenyon, V., Gerstner, B., Rosenberg, P. A., Holman, T. R., & Lo, E. H. (2008). Novel lipoxygenase inhibitors as neuroprotective reagents. *J Neurosci Res*, *86*, 904-909.
- Wagner, K. M., Ruegg, M., Niemann, A., & Suter, U. (2009). Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One*, *4*, e5160.
- Ying, W. (2008). NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*, *10*, 179-206.

## **Danksagung**

Mein Dank geht an all diejenigen, die mich während der Arbeit an dieser Dissertation immer wieder unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Methner, der mir eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat und mich bis zum Abschluss mit viel Geduld und Mühe gefördert hat.

Außerdem danke ich dem restlichen Team der damaligen AG Methner im Lifescience Center Düsseldorf, insbesondere Frau Dr. Rebecca Noack für ihre Betreuung und Unterstützung im Labor und darüber hinaus.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern Dank, denn ohne Euch hätte ich es niemals soweit geschafft!

## Eidesstattliche Versicherung

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

18.09.2015  
Svenja Frede