

Aus dem Institut für Anatomie II
Direktorin: Prof. Dr. Charlotte von Gall

Der Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf den Metabolismus von
Astrozyten
Auswirkungen auf die molekulare Uhr, Mitochondrien und Superoxid-Dismutasen

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

vorgelegt von

Maya-Lynn Leonhardt

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöckner

Erstgutachterin: Prof. Dr. Charlotte von Gall

Zweitgutachter: Prof. Dr. Sascha Weggen

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen nehmen in ihrer Prävalenz stetig zu, trotzdem ist bis *dato* noch keine kausale Therapie bekannt (Cao et al., 2020). Neue Erkenntnisse belegen, dass Astrozyten an Ursprung und Folgen von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind (Phatnani and Maniatis, 2015). Die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen ist multifaktoriell, ein ätiopathologischer Faktor ist oxidativer Stress (Simonian and Coyle, 1996). Symptomatisch führen viele neurodegenerative Erkrankungen im frühen Stadium zu Schlafstörungen und Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus (Videnovic et al., 2014). Die Auswirkung von oxidativem Stress auf die zirkadiane Rhythmik von Astrozyten ist bis *dato* noch nicht vollständig untersucht (Chen et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf das molekulare Uhrwerk, die Mitochondrien und die Superoxid-Dismutasen in der primären Astrozyten-Zellkultur näher untersucht. Diese Arbeit liefert somit eine wichtige Grundlage die rhythmische Astrozytenfunktion im Kontext von neurodegenerativen Erkrankungen besser zu verstehen und darauf aufbauend neue Therapiekonzepte abzuleiten.

Die Versuche wurden an primären Astrozyten-Zellkulturen von transgenen Mäusen durchgeführt, die ein Fusionsprotein aus einem rhythmischen Uhren-Gen und Luciferase exprimieren (PER2::LUC-Mäuse). Mit Hilfe dieses Reporter-Konstrukts kann die rhythmische Uhren-Genexpression und somit die Funktion des molekularen Uhrwerks über mehrere Tage in Echtzeit im Luminometer verfolgt werden. Das Toxin Rotenon wurde zur Induktion von oxidativem Stress in Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verwendet. Die Analyse der mitochondrialen Gene, *mfn2*, *fis1* und *nd1*, erfolgte mittels *real time* Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die Untersuchungen zu den antioxidativen Enzymen Superoxid-Dismutase (SOD) 1 und 2 erfolgte mittels *real time* PCR und mittels Western-Blot.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die zirkadiane Rhythmik von Astrozyten, gemessen an der PER2::LUC-Expression, durch oxidativen Stress beeinflusst wird. Es konnte allerdings kein Einfluss von zirkadianer Rhythmik oder oxidativem Stress auf die mitochondrialen Gene *mfn2*, *fis1* und *nd1* in Astrozyten nachgewiesen werden. Doch es wurde gezeigt, dass die SOD1 und SOD2 in Astrozyten zirkadian exprimiert werden. Diese zirkadiane Expression wird bei der SOD1 durch oxidativen Stress beeinflusst, während die SOD2 davon unabhängig exprimiert werden. Die Regulation der SOD scheint auf Protein- und nicht auf Gen-Ebene stattzufinden.

Es ist bekannt, dass PER2::LUC in Astrozyten rhythmisch exprimiert wird (Prolo et al., 2005), doch der Einfluss von oxidativem Stress wurde bis *dato* nur in anderen Geweben untersucht (Yu Tahara*, 2016). In Fibroblasten zeigt sich beispielsweise durch ROS eine Phasenverschiebung (Yu Tahara*, 2016) der PER2::LUC-Expression, während es in Astrozyten zu einer Abschwächung der Expressions-Amplitude kommt. Die Geschlechterunterschiede in der Reaktion auf oxidativen Stress in der Harderschen Drüse von Hamster (Coto-Montes et al., 2001) konnten in der PER2::LUC-Expression von Astrozyten jedoch nicht reproduziert werden. Die Gene der Fusions-Maschinerie *mfn2* und der Fissions-Maschinerie *fis1* werden in anderen Geweben in Abhängigkeit von der molekularen Uhr exprimiert (Jacobi et al., 2015, Kohsaka et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang der Gen-Expression mit PER2 nachgewiesen werden und keine Beeinflussung der Expression durch oxidativen Stress. Dass SOD in Ratten-Kortizes zeitabhängig aktiv sind, ist bereits bekannt (Diaz-Munoz et al., 1985), doch dass SOD1 und SOD2 in Astrozyten zirkadian, in Abhängigkeit von PER2, exprimiert werden, ist eine neue Erkenntnis dieser Arbeit. Im Einklang mit den Ergebnissen von Pinteaux et al. wird die SOD1 durch oxidativen Stress in geringerer Konzentration exprimiert und die SOD2 in höherer Konzentration (Pinteaux et al., 1996). Da es sich um eine Zellkultur im Maus-Modell handelt, ist die Übertragbarkeit auf den Menschen eingeschränkt, trotzdem ist der Zusammenhang von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress in Astrozyten eine wichtige Erkenntnis, aus der sich weitere Untersuchungen ableiten lassen.

Summary

Although the prevalence of neurodegenerative diseases is increasing, a therapy addressing causal mechanism has not yet been identified (Cao et al., 2020).

New findings show that astrocytes are involved in the origin and effect of neurodegenerative diseases (Phatnani and Maniatis, 2015). The origin of neurodegenerative diseases is multifactorial, but one important etiopathologic factor is known to be oxidative stress (Simonian and Coyle, 1996). In early stages symptoms of many neurodegenerative disease lead to sleeping disorders and to disturbance of the day-night-rhythm (Videnovic et al., 2014). The influence of oxidative stress on the circadian rhythm of astrocytes has not yet been fully discovered (Chen et al., 2020). In the present work the influence of circadian rhythm and oxidative stress on the molecular clock, the mitochondria and the superoxide dismutase has been investigated. This work provides an important basis to better understand the rhythmic astrocyte function in the context of neurodegenerative diseases and to use this to derive new therapy concepts.

The experiments were run using primary astrocyte cell cultures of transgenic mice, which express a fusion protein of a rhythmic clock gene and a Luciferase (PER2::LUC- mice). With the help of this reporter construct the rhythmic clock gene expression and consequently the function of the molecular clock can be detected for several days in the luminometer. Toxin Rotenone was used to induce oxidative stress in form of reactive oxygen species (ROS). The analyses of the mitochondrial genes *mfn2*, *fis1* and *nd1* was conducted via real time polymerase chain reaction (PCR). The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) 1 and 2 were analyzed using real time PCR and Western-Blot. The results of this work provide evidence for the circadian rhythm of astrocytes as detected by the PER2::LUC-expression, being influenced by oxidative stress. However, the mitochondrial genes *mfn2*, *fis1* and *nd1* do not seem to be influenced by oxidative stress or the circadian clock. Yet the SOD1 and SOD2 in astrocytes seem to be expressed dependent on circadian rhythm. In SOD1 circadian expression is affected by oxidative stress, while it is independently expressed in SOD2. The regulation of the SOD seems to take place on protein-level, but not on gene-level.

It is established that PER2::LUC is expressed rhythmically in astrocytes (Prolo et al., 2005), but until now the influence of oxidative stress has only been examined in other tissues (Yu Tahara*, 2016). For example fibroblasts show a phase shift after ROS induction (Yu Tahara*, 2016), while astrocytes show an attenuation of expression amplitudes. Yet the sex differences in the reaction to oxidative stress in the Hardersche gland of hamster (Coto-Montes et al., 2001), could not be reproduced in the PER2::LUC-expression of astrocytes. The genes of the fusion machinery *mfn2* and the fission machinery *fis1* have been shown to be dependent on the circadian clock in other tissues (Jacobi et al., 2015, Kohsaka et al., 2014) in the present work, however, no connection of the gene expression with PER2 or oxidative stress could be verified. It has already been established that the activity of SOD in the cortices of rats is time dependent (Diaz-Munoz et al., 1985), but this work contributes the novel insight that SOD1 and SOD2 in astrocytes are also expressed with a circadian rhythm, which is dependent on PER2. In line with the results of Pinteaux et al. the SOD1 is expressed in a lower concentration through oxidative stress while the SOD2 is expressed in a higher concentration (Pinteaux et al., 1996).

Since the experiments were performed in a cell culture of a mouse model the transferability to humans is limited. Yet the connection of circadian rhythm and oxidative stress in astrocytes is an important finding from which further investigations can be derived.

Abkürzungsverzeichnis

·OH	Hydroxyl-Radikal
AP0	Ammonium-Peroxodisulfate
BCA	Bicinchonin- <i>Acid</i> , Bicinchonin -Säure
BMAL1	<i>Brain and muscle arnt-like protein 1</i>
<i>bmal1</i>	Protein: BMAL1, Gen: <i>bmal1</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CCS	<i>copper chaperone for SOD1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
cDNA	<i>Complementary desoxiribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetra-Essigsäure
et al.	<i>Et alli/ alliae</i> , und weitere
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	Fetales Bovines Serum
FIS1	<i>Mitochondrial fission 1</i>
<i>fis1</i>	Protein: FIS1, Gen: <i>fis1</i>
FMN	Flavin-Mononukleotid
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfon-Säure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G, Antikörper
KCL	Kaliumchlorid
LUC	Luciferin
<i>luc</i>	Protein: LUC, Gen: <i>luc</i>
MEM	Minimum Essential Medium
Mfn2	<i>Mitofusin 2</i>
<i>mfn2</i>	Protein: Mfn2, Gen: <i>mfn2</i>
NaCl	Natrium Chlorid, Kochsalzlösung
NADH	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid

ND1	<i>NADH-ubiquinone oxidoreduktase chain 1</i>
<i>nd1</i>	Protein: ND1, Gen: <i>nd1</i>
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Anion-Radikal
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Triton X-100
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDL	Poly D-Lyseine
<i>per2</i>	<i>Period 2</i>
PER2	Protein: PER2, Gen: <i>per2</i>
PTM	Post-translationelle Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonucleinsäure
mRNA	<i>messengerRNA</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoff Spezies
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SOD 1-3	Superoxid-Dismutase 1-3,
<i>sod 1-3</i>	Protein: SOD1, SOD2, SOD3, Gen: <i>sod1</i> , <i>sod2</i> , <i>sod3</i>
sry	Gen <i>sex determing region y</i>
t1	Zeitpunkt 1 (20 Std)
t2	Zeitpunkt 2 (32 Std)
TBS	Tris buffered salt solution
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgabe
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einheiten

λ	Lambda, Wellenlänge
(v/v)	<i>(volume/volume)</i> (Volumen/Volumen)
(w/v)	<i>(weight/volume)</i> (Gewicht/ Volumen)
%	Prozent
°C	Grad Celsius
cm	Centimeter
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
rpm	<i>Round per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
Std	Stunde
V	Volt
xg	Relative Zentrifugalkraft
μ l	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zirkadianes System	1
1.1.1	Aufbau des zirkadianen Systems.....	2
1.1.2	Das molekulare Uhrwerk.....	3
1.1.3	PER2::LUC Mausmodell.....	5
1.2	Astrozyten	5
1.2.1	Astrozyten im zirkadianen System	7
1.3	Mitochondrien	8
1.3.1	Mitochondrien als Kraftwerk der Zelle	9
1.3.2	Oxidativer Stress und Antioxidantien.....	11
1.3.3	Rotenon als Hemmer des Komplex I.....	12
1.3.4	Astrozyten und oxidativer Stress.....	13
1.4	Mitochondriale Fusion und Fission.....	14
1.5	Superoxid-Dismutasen	17
1.5.1	Regulation der Superoxid-Dismutasen.....	20
1.6	Ziele der Arbeit	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Versuchstiere	24
2.1.2	Materialien.....	24
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Zellkultur	28
2.2.2	Behandlung der Zellen mit Rotenon.....	30
2.2.3	Echtzeit Analyse	30
2.2.4	Molekularbiologische Analyse.....	31
2.2.5	Biochemische Analyse	33
2.2.6	Funktionelle Analyse.....	36
2.2.7	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Erzeugung von intrazellulärem oxidativem Stress durch Rotenon.....	38
3.2	Einfluss der Faktoren Zeit und oxidativer Stress auf das molekulare Uhrwerk	38
3.2.1	Schwankung der PER2::LUC-Expression in Astrozyten über 72 Std.....	38
3.2.2	Einfluss von oxidativem Stress auf die PER2::LUC-Expression	39
3.2.3	Bestimmung der <i>per2</i> -Expression	41
3.3	Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf den mitochondrialen Metabolismus 42	
3.3.1	Analyse der mitochondrialen Gene <i>nd1</i> , <i>fis1</i> und <i>mfn2</i>	42
3.4	Einfluss von oxidativem Stress auf die Superoxid-Dismutasen	43
3.4.1	Superoxid-Dismutasen-Gen Analyse	43
3.4.2	Superoxid-Dismutase Protein Analyse.....	44
4	Diskussion.....	47
4.1	Erzeugung von oxidativem Stress durch Rotenon	48
4.2	Einfluss der Faktoren Zeit und oxidativer Stress auf das molekulare Uhrwerk	49
4.2.1	PER2-Expression über 72 Std in der primären Astrozyten-Zellkultur.....	49
4.2.2	Beeinflussung der PER2-Expression durch oxidativen Stress	51
4.2.3	Real time PCR <i>per2</i>	53

4.3	Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf die mitochondrialen Gene <i>nd1</i> , <i>mfn2</i> und <i>fis1</i>	54
4.3.1	Einfluss auf Gene der Fusions-und Fissions-Maschinerie	55
4.3.2	Einfluss auf <i>nd1</i>	57
4.4	Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf die antioxidativen Superoxid-Dismutasen	58
4.4.1	Einfluss von zirkadianer Rhythmik auf SOD1	58
4.4.2	Einfluss von oxidativem Stress auf SOD1	60
4.4.3	Einfluss von zirkadianer Rhythmik auf SOD2	62
4.4.4	Einfluss von oxidativem Stress auf SOD2	63
4.5	Schlussfolgerungen	66
5	Literaturverzeichnis	67
6	Anhang	82

1 Einleitung

Aufgrund des demographischen Wandels nimmt die Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, stetig zu (Cao et al., 2020). Trotzdem gibt es bis *dato* keine kausale Therapie.

Nachdem lange Zeit neurodegenerative Erkrankung nur mit einer Pathologie der Neurone in Zusammenhang gebracht wurden, ist mittlerweile bekannt, dass auch Astrozyten einen essenziellen Anteil an der Entstehung und den Folgen dieser Erkrankungen haben (Phatnani and Maniatis, 2015).

Die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen ist multifaktoriell. Ein ätiopathologisch wichtiger Faktor, der mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird, ist oxidativer Stress (Simonian and Coyle, 1996). Oxidativer Stress beschreibt das Missverhältnis oxidativer und antioxidativer Stoffe zu Gunsten der Oxidantien (Sies and Cadenas, 1985). Zu den Oxidantien gehören die reaktiven Sauerstoffspezies, welche physiologisch in der Zelle anfallen, aber in hoher Konzentration stark zellschädigend wirken (Kudin et al., 2004). Reaktive Sauerstoffspezies entstehen in erster Linie in den Mitochondrien, als ungewolltes Nebenprodukt der Atmungskette, welche als Energielieferant der Zelle dient. Der Stoffwechsel der Mitochondrien wird maßgeblich durch ihre Dynamik in Form von Fusion und Fission beeinflusst (Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Zu den Antioxidantien gehören die Enzyme Superoxid-Dismutasen (SOD), welche der Abwehr von oxidativem Stress dienen (Fridovich, 1975). Dysfunktionen der SOD können wiederum zu neurodegenerativen Erkrankungen führen (Rosen et al., 1993). Ein frühes Symptom von neurodegenerativen Erkrankungen sind Schlafstörungen und Störungen des Tag-Nacht-Rhythmus (Videnovic et al., 2014). Es kommt also zu Störungen des zirkadianen Systems der Patienten.

Der Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf den Metabolismus von Astrozyten und vor allem die Auswirkungen auf die molekulare Uhr, die Mitochondrien und die Superoxid-Dismutasen sind bis *dato* nicht vollständig untersucht.

1.1 Zirkadianes System

Das zirkadiane System, von lateinisch *circa dies* ungefähr ein Tag, beschreibt die Rhythmik von Organismen mit einer Periodenlänge von ungefähr einem Tag (Halberg, 1959).

Für eine komplette Rotation um die eigene Achse benötigt die Erde 24 Stunden (Std). Durch diese kommt es auf der Erde zu einer tageszeitlichen Schwankung der Sonnenstrahlenintensität mit dem bekannten Wechsel von Tag und Nacht. Hieraus

resultieren periodisch ändernde Umweltbedingungen, wie sich ändernde Lichtverhältnisse und schwankende Temperaturen über Tag und Nacht. Mit Beginn ihrer Existenz, vor etwa 540 Millionen Jahren, ist die Tierwelt dieser zirkadianen Rhythmik ausgesetzt. Im Rahmen der Evolution (Darwin, 1859) kam es zu einer Anpassung der Lebewesen an diese äußeren Gegebenheiten. Diese Anpassung zeigt sich zum Beispiel in tagaktiven/ *diurnalen*, nachtaktiven/ *nocturnalen*, und dämmerungsaktiven/ *crepuskularen*, Arten. Lange dachte man, dass der Rhythmus von Lebewesen alleine durch das Sonnenlicht bestimmt wird. Bis Jean Jaques d'Ortous de Mairan im Jahre 1729 auffiel, dass sich die Blätter der Mimose unabhängig vom Sonnenlicht morgens öffneten und abends schlossen (Kraft and Martin, 1995). Die Mimose ist in der Lage selbstständig einen Rhythmus zu generieren. Der Wissenschaftler Jürgen Aschoff zeigte zudem, dass der menschliche Organismus ebenfalls unabhängig von äußerer Lichteinwirkung, einen eigenen Rhythmus generiert. Hierfür untersuchte er Menschen, die freiwillig in isolierten Bunkern lebten (Aschoff, 1984). Die Regulation der Aktivität wird durch eine innere Uhr vermittelt. Das Verstehen dieser Regulationsmechanismen ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung.

1.1.1 Aufbau des zirkadianen Systems

1972 entdeckten die Wissenschaftler Robert Moore und Victor Eichler, dass es im Gehirn einen Ort gibt, der für die Rhythmik verantwortlich ist. Die innere Uhr ist im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN), einem Kern im anterioren Hypothalamus, lokalisiert (Moore and Eichler, 1972). Der SCN fungiert als Taktgeber/ *pacemaker* des zirkadianen Systems (Klein, 1991). Diese Taktgeber-Funktion des SCN demonstrierten Ralph und weitere, *et alii/ alliae* (et al.), indem sie Hamstern, welche eine spezielle Mutation im SCN trugen, die dazu führte, dass der tageszeitliche Rhythmus auf 22 Std verkürzt war, einen SCN aus einem gesunden Tier transplantierten und damit die reguläre 24 Std Rhythmik wiederherstellten (Ralph et al., 1990). Auch *in vitro* generieren die Neurone des SCN, im Gegensatz zu Neuronen anderer Regionen, synchronisierte Aktionspotentiale (Welsh et al., 1995). Zur Regulation der autonomen Rhythmik bezieht der SCN Informationen aus der Umwelt mit ein. Zum Beispiel wird der Hell/Dunkel-Zustand der Umgebung durch die Retina, oder bei ursprünglichen Wirbeltieren durch das Parietalauge, registriert (Hendrickson et al., 1972) und so der Rhythmus den äußeren Gegebenheiten angepasst (Albrecht and Eichele, 2003). Diese zentral koordinierte Rhythmik wirkt von dem SCN auf den gesamten Organismus. Die Kommunikation vom SCN mit peripheren Organen wird durch diverse Wege, wie z.B. das autonome Nervensystem (Vujovic et al., 2008) und Hormone (Le Minh et al., 2001) vermittelt. Resultierend kommt es zu tageszeitlichen Veränderungen in anderen Geweben.

Die Zirbeldrüse, *Glandula pinealis*, produziert Melatonin in tageszeitabhängiger Konzentration (Tamarkin et al., 1979). Es kommt zu einer, über den Tagesverlauf variierenden Expression von Corticosteroiden (Krieger, 1975) und zu Schwankungen der Körpertemperatur (Aschoff, 1984).

1.1.2 Das molekulare Uhrwerk

Neben dem SCN als oberstem rhythmischem Taktgeber generieren *in vitro* auch andere Gewebe, wie Leber-, Nieren- oder Lungengewebe, eine Rhythmik (Balsalobre et al., 1998, Schibler and Sassone-Corsi, 2002). Die peripheren Gewebe verlieren diese innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen, wohingegen die Zellen des Zentralnervensystems (ZNS) ihre Rhythmik über 32 Tage und mehr aufrechterhalten können (Yamazaki et al., 2000). Untersuchungen von Yagita et al. zeigen, dass es sich im SCN und im peripheren Gewebe um denselben molekularen Mechanismus zur Generierung der Rhythmik handelt (Yagita et al., 2001). Dieser autonome Rhythmus wird über das molekulare Uhrwerk generiert-einer komplexen Kettenreaktion aus Transkriptionalen- und Translationalen *Feedback*-Schleifen.

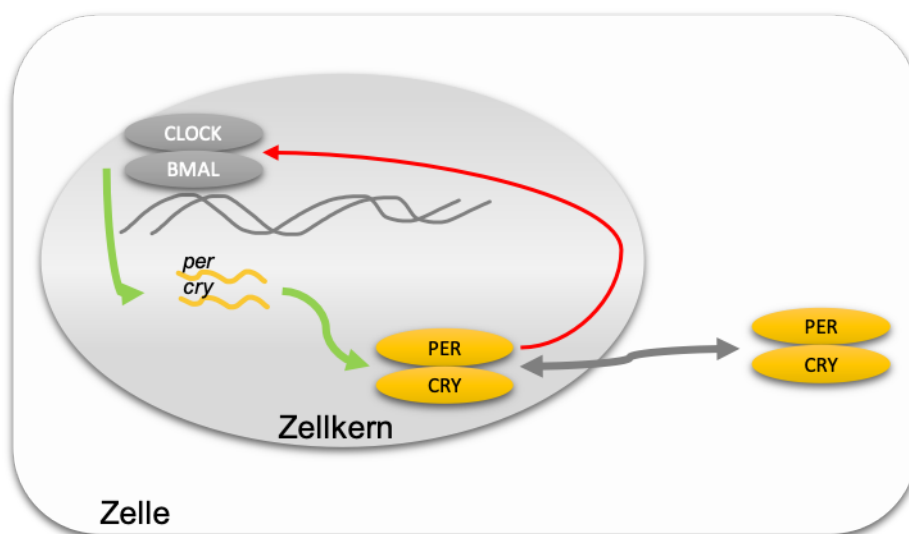


Abb. 1: Schematisch stark vereinfachtes molekulares Uhrwerk. Die Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL bilden ein Dimer, das die Transkription von *per* und *cry* induziert. Im Zytoplasma werden die PER und CRY Proteine translatiert. Sie werden in den Zellkern zurücktransportiert und bilden hier einen negativen Regulatorkomplex, der die Aktivität des CLOCK/BMAL-Dimers hemmt. Damit unterdrücken die PER und CRY Proteine in einer negativen *Feedback*-Schleife ihre eigene Expression. Der negative Regulatorkomplex wird mit zeitlicher Verzögerung proteasomal abgebaut, sodass ein neuer Zyklus starten kann. Jeder Zyklus dauert ca. 24 Std (zirkadian). Ausführungen nach Hastings (Hastings et al., 2007).

Für die Proteine des molekularen Uhrwerks sind multiple Gene identifiziert (Le Minh et al., 2001). Eine wichtige Rolle spielen hier die zwei Cryptochrome-Isoformen *cry1* und *cry2*

(Kume et al., 1999, van der Horst et al., 1999), die zwei Period-Isoformen *per1* und *per2* (Shearman et al., 1997, Sun et al., 1997, Tei et al., 1997) sowie *clock* (King et al., 1997) und das *Brain and Muscle ARNT-Like 1-Gen*, *bmal1* (Bunger et al., 2000). Das Zusammenspiel dieser Gene und ihrer Proteinbiosynthese wird über verschiedene positive und negative Rückkopplungsschleifen reguliert. So bilden die Proteine CLOCK und BMAL1 ein Heterodimer, welches als Transkriptionsfaktor für die Expression von *per* und *cry* fungieren. Die Translation von PER und CRY markiert den Beginn eines zirkadianen Tages. Über den zirkadianen Tag kommt es zu einer Akkumulation von PER und CRY. PER und CRY pendeln zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin-und her (Yagita et al., 2002) und übernehmen verschiedene Aufgaben im Organismus (Panda et al., 2002). Im Zellkern inhibiert das Dimer CRY/PER ab einer bestimmten Konzentration das Dimer der beiden Transkriptionsfaktoren CLOCK/BMAL1 und führt so über eine negative Rückkopplung zu einer Unterdrückung der *cry* und *per*-Expression. Das Maximum der PER-und CRY-Konzentration beschreibt das Ende des zirkadianen Tages (Hastings et al., 2007). Diese Hauptschleife wird durch verschiedene Nebenschleifen reguliert (Aschoff, 1984). Diese diversen Rückkopplungsschleifen resultieren in einer rhythmischen Expression von *per* und *cry* über Tag und Nacht (Dunlap, 1999). Die oszillierende Expression der Uhren-Gene ist ein wichtiger Faktor in der zirkadianen Rhythmik von Säugetieren (Young and Kay, 2001). Insbesondere *per2* spielt für das molekulare Uhrwerk von Säugetieren eine wichtige Rolle. Studien zeigen, dass es bei *per2-knock-out* Mäusen zu einer Verkürzung der zirkadianen Periodik kommt. Leben die genveränderten Mäuse in konstanter Dunkelheit, geht ihre tageszeitliche Rhythmik vollständig verloren (Zheng et al., 1999, Bae et al., 2001). *Per2* übernimmt neben der Rolle im molekularen Uhrwerk noch weitere Aufgaben im Organismus. So ist *per2* ein Tumorsuppressor-Gen, welches an der Regulation der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist (Fu et al., 2002). Magnone et al. weisen nach, dass murine *per2*-mutierte Fibroblasten resistenter gegenüber ROS sind, als Wildtyp-Fibroblasten. Als Reaktion auf massiven oxidativen Stress hat eine Zelle folgende Optionen: Autophagie, sprich die Beseitigung beschädigten Materials, Nekrose oder Apoptose. Magnone et al. belegten, dass ROS-induzierte Apoptose von *per2* abhängig ist und *per2*-mutierte Zellen seltener durch ROS in Apoptose gehen. Die Konsequenz ist ein erhöhtes Risiko z.B. für Krebserkrankungen, da es ROS-bedingt zu genetischen Schäden kommt (Fu et al., 2002). Magnone et al. belegen folglich, dass das Uhrwerk und die Reaktion auf oxidativen Stress aneinander gekoppelt sind (Magnone et al., 2014). Die Kopplung von zirkadianer Rhythmik und Beseitigung von oxidativem Stress ist notwendig, da es bedingt durch

tageszeitenabhängigen Metabolismus zu einem rhythmischen Anfallen von intrazellulären ROS kommt (Hardeland et al., 2003).

Für die Erforschung der Uhren-Gene und dem essenziellen Beitrag zum Verständnis des molekularen Uhrwerks wurden J.C. Hall, M. Rosbash und M. Young 2017 mit dem Nobelpreis geehrt.

Das Verständnis des molekularen Uhrwerks hat auch eine klinische Relevanz. Die Beeinflussung der inneren Uhr, z.B. durch chronischen Schlafmangel, hat einen Einfluss auf den Organismus. Dies zeigt sich beispielsweise im Hormonhaushalt (Van Cauter et al., 1998) und wird mit Erkrankungen wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 in Verbindung gebracht (Van Cauter et al., 2007).

1.1.3 PER2::LUC Mausmodell

Durch genveränderte Mäuse kann die Expression bestimmter Gene visuell dargestellt werden. Yoo et al. entwickelten 2004 das PER2::LUC-Maus-Modell, um die Expression des Uhren-Gens *per2* mittels Biolumineszenz-Messung sichtbar zu machen. In diesen transgenen Mäusen wird ein Luciferase-Gen (*luc*) an das 3'-Ende des endogenen *per2* gekoppelt (Yoo et al., 2004). Dies ermöglicht die Visualisierung der PER2-Expression, durch die quantitative Biolumineszenz-Messung von LUC mittels Luminometer. Yoo et al. konnten so zeigen, dass es auch in peripheren Organen, wie der Leber, Niere und Lunge sowie der Kornea und Zirbeldrüse zu einer Rhythmik der PER2-Expression kommt.

1.2 Astrozyten

1858 beschrieb Rudolph Virchow das die Neurone umgebende Gewebe als Neuroglia. Nach seinem Verständnis handelte es sich um Zwischenmasse, welches wie „Kitt“ die Neurone beisammen hielt (Virchow, 1858).

Nach heutiger Klassifikation gehören zu den Gliazellen unter anderem Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia (Verkhratsky, 2007). Astrozyten machen den numerisch größten Anteil des Gehirns aus (Tower and Young, 1973).

Astrozyten, aus dem Griechischen *αστρον* *astron*, Stern und *κυτος* *kytos*, Zelle, sind Zellen mit sternförmigen Ausläufern, die den Marker saures Gliafaser-Protein, *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), exprimieren (siehe Abb. 1.) Sie bilden ein vernetztes *Syncytium*, welches u.a. über *Gap junctions*, bestehend aus Connexin 43, (Barres et al., 1990, Orkand et al., 1966, Tacconi, 1998, Clasadonte et al., 2017) kommuniziert. In Astrozyten finden sich

sowohl im Zellkörper als auch in den Zellfortsätzen Mitochondrien, welche in Größe und Dichte variieren (Derouiche et al., 2015).

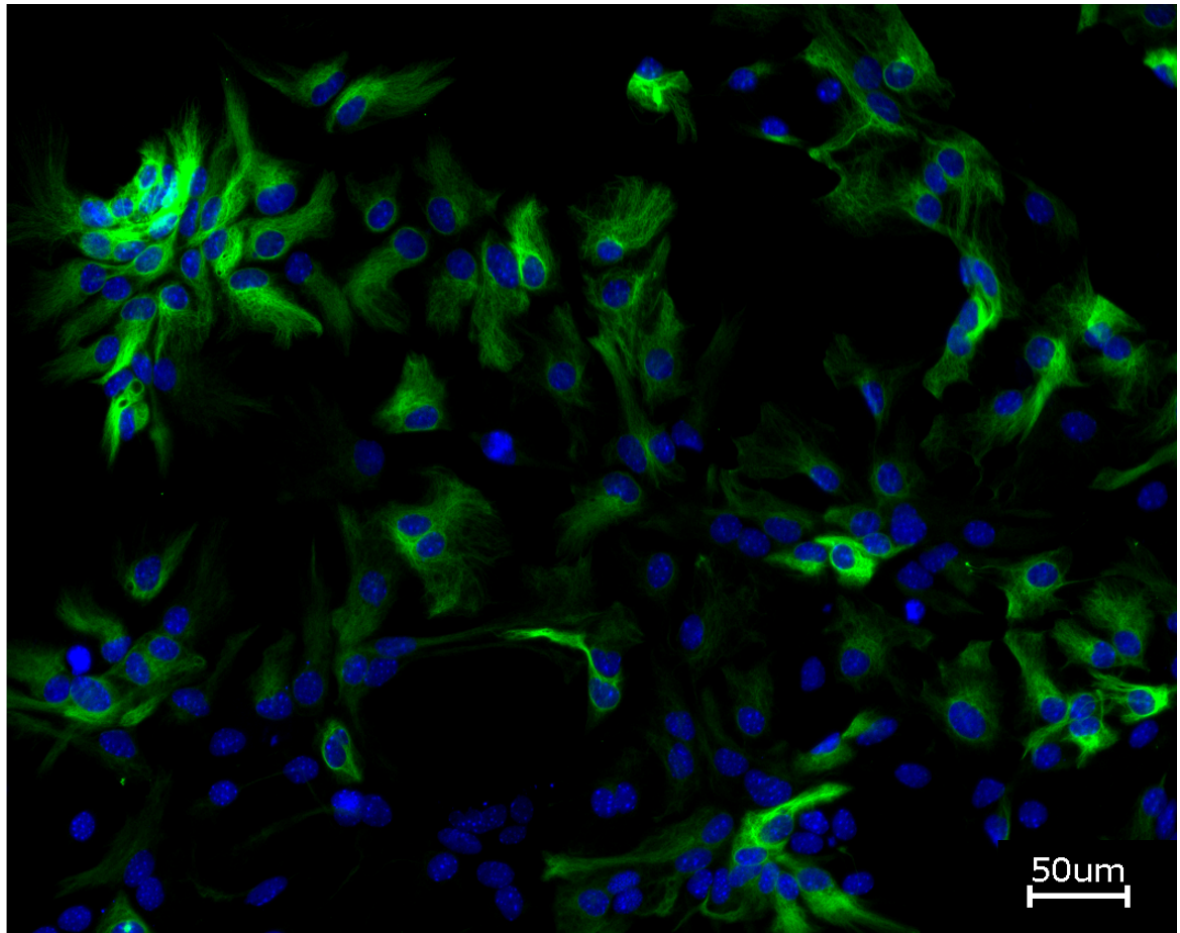


Abb. 1: Neokortikale Astrozyten Fluoreszenz-Mikroskopisches Bild, GFAP-Färbung und 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Kern-Färbung (Maßstab 50 μm)

Seit ihrer Entdeckung 1858 bis heute hat sich das Verständnis der Funktion der Astrozyten gewandelt. Es ist bekannt, dass Astrozyten eine Vielzahl an Funktionen im ZNS übernehmen. Verkhratsky et al. fassen den aktuellen Stand der Wissenschaft zu den komplexen Funktionen der Astrozyten in „*The physiology of Astroglia*“ zusammen (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Neben der Schutzfunktion (Derouiche et al., 2002) gehört die Beteiligung an Aufbau und Regulation der Blut-Hirnschranke zu den wichtigen Aufgaben der Astrozyten. Sie fungieren als Mediator zwischen Neuronen und dem Blutfluss und sorgen für die Sauerstoff- und Energieversorgung der Neurone (Carmignoto and Gomez-Gonzalo, 2010). So führt eine niedrige zerebrale Sauerstoffkonzentration zu einem Ansteigen des Kalzium-Spiegels in den Astrozyten, was zu einer erhöhten Glykolyse und einem Ausschütten von Laktat führt. Laktat führt wiederum, Prostaglandin-vermittelt, zur Vasodilatation (Gordon et al., 2008). Durch den erhöhten Blutstrom wird eine optimierte Sauerstoffversorgung des Gehirns gewährleistet.

Astrozyten sind an der Homöostase diverser zerebraler Mediatoren beteiligt: So sind sie Teil der Ionen- und insbesondere der Kalium-Homöostase (Hertz, 1965), sorgen für einen stabilen pH (Rose and Ransom, 1996) sowie, Aquaporin-4 vermittelt, für einen stabilen Volumenhaushalt (Nagelhus and Ottersen, 2013). Sie beeinflussen die zerebrale Kommunikation durch Neurotransmitter wie Glutamat und GABA (Hertz et al., 1999). 1999 wurde der Begriff *Tripartite Synapses* eingeführt, welcher im Aufbau einer Synapse das aktive Einschreiten der Astrozyten in die zerebrale Kommunikation berücksichtigt (Araque et al., 1999). Eine Synapse besteht demnach aus einem prä- und einem postsynaptischen Neuron sowie einem Astrozyten, welcher z.B. über die Aufnahme von Glutamat, ebenfalls aktiv daran Teil hat (Perea et al., 2009). Zudem haben Astrozyten einen Einfluss auf die neuronale Erregung (Travis, 1994) und Synapsen-Plastizität (Bernardinelli et al., 2014). So wirken Astrozyten an höheren kognitiven Leistungen, wie Lernen und Gedächtnis mit (Anderson et al., 1994, Jones and Greenough, 1996, Rodriguez et al., 2013). Astrozyten beeinflussen, Connexin 43 vermittelt, den Wachheitszustand von Mäusen und haben so einen Einfluss auf den Schlaf-Wach-Zyklus (Clasadonte et al., 2017). Von besonderer Relevanz für diese Arbeit ist die Rolle der Astrozyten in der zirkadianen Rhythmik (siehe Abschnitt 1.2.1) sowie der Einfluss der Astrozyten auf die ROS-Homöostase und die Abwehr von oxidativen Stress (Makar et al., 1994) (siehe Abschnitt 1.3.4).

Seit den späten 1980er Jahren ist es möglich die Funktion der Astrozyten in isolierten primären Zellkulturen zu untersuchen (Morrison and de Vellis, 1981). Das Protokoll der primären Astrozytenzellkultur dieser Arbeit orientiert sich an der Arbeit von Boyalla et al. (Sundar Boyalla et al., 2011).

1.2.1 Astrozyten im zirkadianen System

Prolo et al. liefern anhand von transgenen PER2::LUC-Mäusen als erste den Nachweis, dass auch in kultivierten Astrozyten eine Rhythmik der PER2-Expression nachweisbar ist (Prolo et al., 2005). Sie zeigten, dass die Amplitude des PER2::LUC-Fusionsproteins in Astrozyten von murinen Kortizes rhythmischen Schwankungen unterliegt.

Neben Neuronen sind Astrozyten ein wichtiger Bestandteil des SCN (Prosser et al., 1994). Durch Beeinflussung der neuronalen Aktivität, sind sie selbst an der Regulation der inneren Uhr beteiligt: Astrozyten unterdrücken nachts, durch Regulation der extrazellulären Glutamat-Level, die metabolische Aktivität der Neurone und haben so einen Einfluss auf den Tageszeiten abhängigen Metabolismus (Brancaccio et al., 2017). Die Relevanz der Astrozyten für die zirkadiane Rhythmik demonstrieren Tso et al., die bei *bmal1 knock-out*

Astrozyten des SCN Änderung der zirkadianen Periodik nachwiesen. Hieraus resultiert, dass Astrozyten für eine funktionierende innere Uhr benötigt werden (Tso et al., 2017). Astrozyten generieren autonom eine zirkadiane Rhythmik und können Neurone, welche durch *knock-out* Mutationen ihre Rhythmik verloren haben, instruieren. Dies zeigt, dass Astrozyten nicht nur als Unterstützer der Neurone fungieren, sondern eine ebenbürtige Rolle einnehmen (Brancaccio et al., 2019).

1.3 Mitochondrien

1897 führte Benda den Begriff Mitochondrien ein und beschrieb sie als ein „neues, vielleicht einer spezifischen Funktion dienendes Zellorgan“ (Meves, 1908).

Heute ist bekannt, dass es sich beim Mitochondrium um ein Zellorganell handelt, welches viele spezifische Funktionen besitzt.

Nach der Endosymbionten-Theorie von Lynn Margulis sind die Mitochondrien seit 2 Milliarden Jahren Bestandteil der eukaryotischen Zelle. Der evolutionäre Vorgänger der Mitochondrien, ein Prokaryont, ging eine Endosymbiose mit einer eukaryotischen Zelle ein. Sie tauschten so den Schutz der größeren Zelle gegen die Fähigkeit der Mitochondrien aus Kohlenhydraten oder Fetten mit Sauerstoff Energie zu gewinnen (Margulis, 1975, Margulis, 1981, Margulis and Bermudes, 1985). Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom (Nass, 1968) sowie zwei Membranen. Eine äußere Membran, die eukaryotischen Ursprungs ist sowie eine innere Membran, prokaryotischen Ursprungs. Die innere Membran ist stark gefaltet und bildet sogenannte *Cristae*, deren Dichte, abhängig vom Gewebetyp und Aktivitätsgrad der Zelle, variiert (Lea and Hollenberg, 1989, Mannella et al., 1994). Durch die Membranen entstehen zwei voneinander unabhängige Kompartimente, der Intermembran-Raum und die Mitochondrien-Matrix.

Die wohl bekannteste Aufgabe der Mitochondrien ist die des „Kraftwerks der Zelle“, sprich den Reaktionen des Fettsäuremetabolismus, des Zitrat-Zyklus und der oxidativen Phosphorylierung. Eine ausführliche Einleitung zu diesem Thema erfolgt im Abschnitt 1.3.1. Heute weiß man, dass Mitochondrien „*more than just a powerhouse*“, mehr als nur ein Kraftwerk, sind. Ihre Funktionen reichen von der Regulation des Metabolismus (Mannella et al., 1994), über einen Eingriff in den Zellzyklus (Chen et al., 2004) bis zu Vorgängen in der Apoptose (Goldstein et al., 2000, McBride et al., 2006). Um diese Vielzahl von Funktionen zu regulieren, ist die mitochondriale Dynamik relevant. Durch Teilung (Fission) und Verschmelzung (Fusion) können Mitochondrien ihre Morphologie und

Aktivität verändern (Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Eine ausführliche Einleitung zum Thema Fusion und Fission erfolgt im Abschnitt 1.4.

1.3.1 Mitochondrien als Kraftwerk der Zelle

Die Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle in der Energiegewinnung der Zelle.

Über die Nahrung aufgenommene Fettsäuren werden in der β -Oxidation der Mitochondrien gespalten. Hierbei entsteht das Produkt Acetyl-CoA, welches in den Zitrat-Zyklus eingespeist werden kann. Im Zitrat-Zyklus werden Substrate des Zellmetabolismus, zu Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wasser (H_2O) abgebaut (Krebs, 1940). Dieser Abbau führt zum Freiwerden von Elektronen, welche an Wasserstoff (H_2) und Elektronendonatoren, wie NADH oder FADH_2 gebunden werden. Bei den Teilreaktionen des Zitrat-Zyklus werden zusätzlich Stoffwechselprodukte frei, welche für den Metabolismus der Zelle relevant sind. Bei der oxidativen Phosphorylierung kommt es dann zu einem intrazellulär kontrollierten Ablaufen der stark exothermen Knallgasreaktion. Sind aerobe Bedingungen gegeben, ist dies die effizienteste Form der Energiegewinnung. Es kommt zur Erzeugung von Energie, in Form von ATP, durch die Reaktion von Wasserstoff und molekularem Sauerstoff zu Wasser:



Das kontrollierte Ablaufen dieser Reaktion in Enzymkomplexen wird Atmungskette genannt. Die Enzymkomplexe der Atmungskette sind bei Eukaryoten in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Klingenberg, 1970).

Der erste Beschreiber der Atmungskette war Otto Warburg, welcher dafür 1931 den Nobelpreis erhielt (Warburg, 1931). Er beschrieb das Warburg-Ferment, welches als Oxydase Elektronen von Substraten auf Sauerstoff übertrug (Warburg, 1928). Dass die Atmungskette aus mehr als einer Komponente bestehen musste, entdeckten Keilin et al. 1925. Sie beschrieben den Redox-Vermittler Cytochrom, ein intrazelluläres *respiratory pigment*, respiratorisches Pigment, welches dem Elektronen-Transport dient. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft setzt sich die Atmungskette aus vier Enzymkomplexen, der ATP-Synthetase und zwei beweglichen Elektronen-Überträgermoleküle Ubiquinon und Cytochrom C zusammen (Hatefi, 1985). Die Enzymkomplexe bestehen aus der NADH-Dehydrogenase, Komplex I (Hatefi and Bearden, 1976, Hatefi et al., 1962), der Succinat-Dehydrogenase, Komplex II (Kita et al., 1990), der Cytochrom-C-Reduktase, Komplex III (Keilin, 1939) sowie der Cytochrom-C-Oxidase, Komplex IV (Kadenbach et al., 1983). Im Jahr 2000 entdecken Schagger et al., dass die Komplexe nicht isoliert in der Mitochondrien-

Membran vorliegen, sondern sogenannte Superkomplexe oder Respirasomen bilden (Schagger and Pfeiffer, 2000).

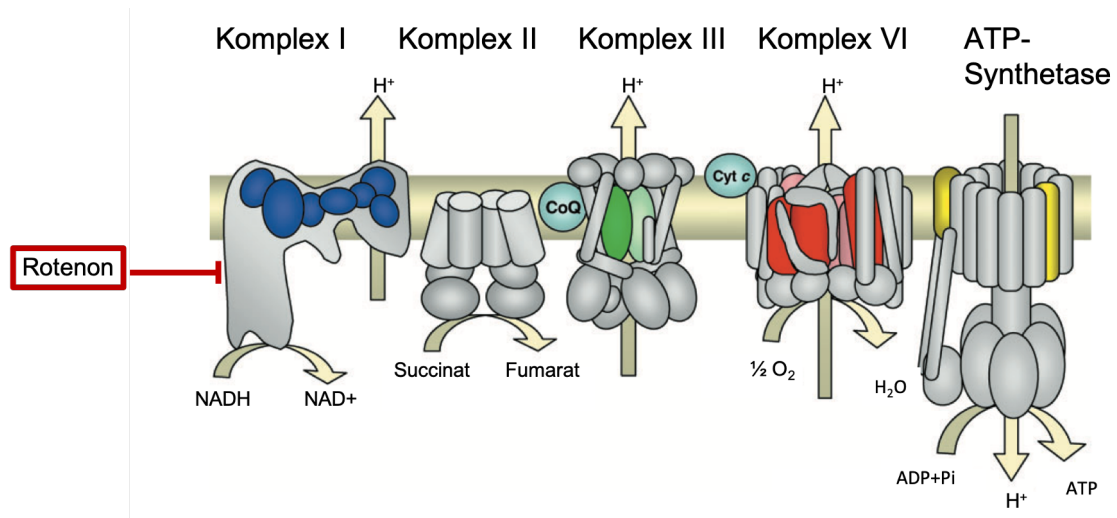


Abb. 3: Schematische Darstellung der Atmungskette. Komplex I: NADH-Dehydrogenase, Komplex II: Succinat-Dehydrogenase, III: Cytochrom-C-Reduktase, Komplex IV: Cytochrom-C-Oxidase. Rotenon wirkt inhibierend auf den Komplex I der Atmungskette. Abbildung modifiziert nach Zeviani et al. (Zeviani, 2004)

Die im Zitrat-Zyklus generierten Elektronen-Donatoren NADH und FADH_2 übertragen ihre Elektronen auf die Atmungsketten-Komplexe. NADH auf den Komplex I und FADH_2 auf Komplex II. Im Komplex IV kommt es dann zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Die Komplexe I, III und IV nutzen die Energie aus dem Elektronentransport, um einen Protonengradienten aufzubauen. Die ATP-Synthetase nutzt die Energie des Protonengradienten zur Katalyse der Reaktion von anorganischem Phosphat an ADP. Es entsteht ATP, die Energie-Währung der Zelle (Mitchell, 1961).

Der Komplex I ist aus 46 Untereinheiten und 9 Redox-Cofaktoren aufgebaut (Hirst et al., 2003). Die Cofaktoren setzen sich aus einem Flavin Mononukleotid (FMN) und 8 Eisen-Schwefel-Clustern zusammen (Ohnishi, 1998, Sazanov and Hinchliffe, 2006). Die Gene, welche für die Untereinheiten codieren, befinden sich größtenteils im Zellkern. Lediglich die Gene von sieben der 46 Untereinheiten befinden sich im mitochondrialen Genom (Chomyn et al., 1986, Chomyn et al., 1985). Ein wichtiges mitochondriales Gen, welches für den Aufbau des Komplex I relevant ist, ist das *NADH-ubiquinone oxidoreduktase chain 1* (*nd1*). *Nd1* ist an der Ubiquinon-Bindung am Komplex I beteiligt (Earley et al., 1987). Ob es in Astrozyten zu Expressionsschwankungen von *nd1* über die Zeit kommt und ob die *nd1*-Expression durch oxidativen Stress beeinflusst wird, ist bis *dato* nicht erforscht.

Der Komplex I, die NADH-Dehydrogenase, überträgt ein Elektron vom Donator NADH-H⁺ auf den Elektronenakzeptor Ubiquinon (Q), wodurch dieser zu Ubiquinol (QH₂) reagiert. Durch diesen Elektron-Transfer, kommt es zur Translokation von zwei Protonen (H⁺) in den Intermembranraum (Wikstrom, 1984).

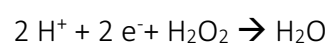
1.3.2 Oxidativer Stress und Antioxidantien

Beim Ablaufen der Atmungskette kommt es zur Bildung von physiologischen Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche durch zelluläre antioxidative Abwehrmechanismen in Schach gehalten werden. Ein Hauptort für die Entstehung von ROS ist der Redox-Cofaktor FMN im Zentrum von Komplex I (Turrens, 2003, Kudin et al., 2004). FMN begünstigt durch seine gut zugängliche Struktur das Anlagern von Sauerstoff und kann diesem so unkontrolliert ein Elektron übertragen. Es kommt zur Reduktion von Sauerstoff und so zur Entstehung von ROS. Im Komplex I entsteht hauptsächlich das Superoxid-Anion-Radikal (O₂^{•-}) (Kussmaul and Hirst, 2006). Durch Erkrankungen, die zu einem Defekt der Atmungskette führen (Raha and Robinson, 2000), oder durch Toxine, welche diese gezielt inhibieren, kommt es zur Akkumulation von ROS und damit zu oxidativen Stress.

Als Präger des Begriffs oxidativer Stress gilt ein ehemaliger Professor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Helmut Sies. Er beschrieb im Jahr 1985 oxidativen Stress als ein potentiell zu Schädigungen führendes Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Oxidantien (Sies and Cadenas, 1985).

Zu den Oxidantien gehören die ROS. Bei ROS handelt es sich um Sauerstoffverbindungen, welche ein ungepaartes Elektron besitzen und daher sehr reaktionsfreudig sind.

Durch die Aufnahme von einem Elektron durch Sauerstoff (O₂) kommt es zur Bildung vom Superoxid-Anion-Radikal $\cdot\text{O}_2^-$ (I). Eine weitere Reduktion führt zum Hydrogenperoxid H₂O₂ (II). Als letzte Reduktionsstufe entsteht das reaktionsfreudige Hydroxyl-Radikal $\cdot\text{OH}$ (III).



Zur Abwehr von ROS nutzt der Organismus Antioxidantien. Ein Antioxidans ist ein Reagenz, dass die Oxidation einer Substanz verhindert (Gutteridge and Halliwell, 1989). Man kann Antioxidantien in enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien

unterteilen. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören beispielsweise Vitamin C (Ascorbat), Vitamin E (α -Tocopherol) und Glutathion. Zu den direkten enzymatischen Antioxidantien gehören die Catalase (Rapoport and Muller, 1974), die Peroxidase (Saunders and Watson, 1950) sowie die Superoxid-Dismutasen (SOD) (Sies, 1993, Fridovich, 1975). Auf die SOD wird im Abschnitt 1.5. näher eingegangen.

Lange Zeit wurden ROS vor allem als notwendiges Übel und Abfallprodukt von aerobem Stoffwechsel angesehen. Eine Funktionalität der ROS wurde in phagozytierenden Leukozyten entdeckt, wo das Enzym NADPH-Oxydase O_2^- produziert, um als Teil des Immunsystems mit einem „*respiratory burst*“, Atemstillstand, Bakterien und Pilze abzuwehren (Segal and Shatwell, 1997). Im Verlauf wurden auch in anderen Geweben ROS-exprimierende Enzyme gefunden (Suh et al., 1999). Nach aktuellem Stand der Wissenschaft können ROS als „Redox“-Signalmolekül wirken und so eine wichtige Rolle in der zellulären Kommunikation für Proliferation, Differenzierung und Migration spielen (Rhee et al., 2000, Sundaresan et al., 1995).

1.3.3 Rotenon als Hemmer des Komplex I

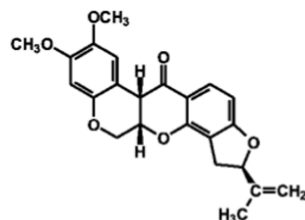


Abb.4:

Molekulare Struktur Rotenon nach Okun et al.
(Okun et al., 1999)

Rotenon ist eines von mehr als 60 Toxinen, das auf den Komplex I der Atmungskette wirkt und somit intrazellulären oxidativen Stress erzeugt (Lindahl and Oberg, 1961, Degli Esposti, 1998). Rotenon, $C_{29}H_{50}O_2$, wurde ursprünglich aus Hülsenfrüchten gewonnen und als Pestizid sowie im Fischfang verwendet (Harper and Underwood, 1965). Im Verlauf stand Rotenon als Pestizid aber unter dem Verdacht an der Ätiologie des Morbus Parkinson beteiligt zu sein. Sherer et al. stellen diesen Zusammenhang dar und belegten die Toxizität des Rotenons durch die Inhibition von Komplex I der Atmungskette und der daraus resultierenden Erzeugung von oxidativem Stress (Sherer et al., 2003, Sherer et al., 2007). Rotenon wirkt im Komplex I auf die NADH-Ubiquinon-Redukatase-Aktivität, indem es den Zugang von Ubiquinon an seine Bindungsstelle blockiert (Fato et al., 2009, Lenaz et al., 2006). Es kommt zur Inhibition der Elektronenübertragung von NADH auf Ubiquinon. Infolge dessen fällt immer mehr reaktionsfreudiges NADH an, welches den Cofaktor FMN

reduziert. FMN reagiert mit Sauerstoff und überträgt diesem seine freien Elektronen (Kussmaul and Hirst, 2006), es entstehen vermehrt ROS. Da es sich bei chemischen Reaktionen um ein Reaktionsgleichgewicht handelt, kommt es zudem durch die niedrige Ubiquinon-Konzentration zu einer Rückreaktion von Ubiquinol zu Ubiquinon und somit zu einem Freiwerden der Elektronen durch den Komplex I (Kudin et al., 2004). Dies hat die zusätzliche Entstehung von freien Elektronen zur Folge. Mittlerweile wird Rotenon als Referenz-Toxin zur Erzeugung von oxidativem Stress unter Laborbedingungen verwendet (Sherer et al., 2003).

Die Neurotoxizität von Rotenon ist schon seit Jahrzehnten bekannt (Sherer et al., 2007). Swankar et al. untersuchten 2012 erstmals die Toxizität von Rotenon auf Glia-Zellen, insbesondere auf Astrozyten. Sie wiesen nach, dass Rotenon in Astrozyten zu einer signifikant erhöhten ROS-Produktion führt (Swankar et al., 2012).

1.3.4 Astrozyten und oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist genotoxisch und wird mit diversen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson (Jenner, 2003), Morbus Alzheimer (Bonilla et al., 1999) sowie der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) (Borthwick et al., 1999) in Zusammenhang gebracht. Zudem scheint oxidativer Stress zu „einem Teufelskreis des Alterns“ zu führen. Oxidativer Stress führt zu einer Schädigung der mitochondrialen Zellbestandteile. Dies hat einen pathologischen Ablauf der Atmungskette zur Folge, was wiederum mehr oxidativen Stress erzeugt. Dieses bioenergetische Versagen führt zu fortschreitender Gewebeeralterung (Shigenaga et al., 1994, Sohal et al., 1994). Bereits 1956 formulierte Harman eine „*free radical theory of ageing*“, eine freie Radikale Theorie des Alterns, und brachte so das Altern mit ROS-Stress in Verbindung (Harman, 1956). Die Kausalität von ROS und Altern wird von aktuelleren Forschungsgruppen in Frage gestellt (Hekimi et al., 2011).

Lange Zeit wurden neurodegenerative Erkrankungen in erster Linie als Erkrankungen der Neurone interpretiert. Doch in den letzten Jahren wird immer mehr die Rolle der Astrozyten in diesem Kontext erforscht (Phatnani and Maniatis, 2015).

Seit 1994 werden Astrozyten mit dem Schutz der Neurone vor oxidativem Stress in Verbindung gebracht (Makar et al., 1994). Werden Neurone und Astrozyten demselben Maß an oxidativem Stress ausgesetzt, so können Astrozyten Konzentrationen an oxidativem Stress widerstehen, die bei Neuronen bereits zum Zelltod führt (Bolanos et al., 1997). 1989 entdeckten Raps et al., dass in primären Astrozyten-Zellkulturen mehr Glutathion zur Abwehr von ROS vorkommt, als in den Neuronen (Raps et al., 1989). Mit fortschreitender Forschung (Chen et al., 2001, Shih et al., 2003), stellte sich heraus, dass der Hauptteil der

Bekämpfung von oxidativem Stress im ZNS von Astrozyten übernommen wird, während es in Neuronen nur zu einer geringeren Expression von Antioxidantien kommt. Astrozyten dienen somit der Abwehr von ROS, welche von Neuronen und anderen Zellen des ZNS produziert werden (Dringen et al., 1999, Dugan and Kim-Han, 2004). Andersrum kann es aber auch zu neuronaler Schädigung, bedingt durch pathologische astrozytäre ROS-Produktion, kommen (Giulian, 1993, Colton and Gilbert, 1987).

Kommt es nun zu einer astrozytären Dysfunktion, einer Gliodegeneration, stört dies die Homöostase des ZNS und bedingt neurodegenerative Erkrankungen (Verkhratsky et al., 2015).

Diese Auswirkung zeigt sich beispielsweise beim Morbus Alzheimer, der häufigsten neurodegenerative Erkrankung. An der Ätiologie des Morbus Alzheimer sind oxidativer Stress (Bonilla et al., 1999) sowie eine astrozytäre Dysfunktion (Johnstone et al., 1999) beteiligt. Beim Morbus Alzheimer kommt es zu einer Akkumulation von senilen *Plaques*, in erster Linie β -Amyloid, aber auch zu einer ROS-vermittelte Störung des Ionen-Gradienten und Glucose-Haushalts (Butterfield and Halliwell, 2019). *In vitro* Studien demonstrieren eine Assoziation von β -Amyloid Akkumulation und ROS-Produktion in Astrozyten (Johnstone et al., 1999, Schubert et al., 2009). So gibt es immer mehr Hinweise, dass oxidativer Stress in Astrozyten ein Risikofaktor für neurodegenerativen Erkrankungen ist. Das Verständnis der Rolle der Astrozyten im ZNS und die Beeinflussung dieser durch oxidativen Stress, kann Grundlage für eine gezielte Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen sein (Chen et al., 2020).

1.4 Mitochondriale Fusion und Fission

Die Funktion der Mitochondrien wird maßgeblich reguliert und beeinflusst durch ihre Dynamik in Form von Fusion und Fission (Bereiter-Hahn and Voth, 1994).

Schon 1914 beobachteten Lewis et al., dass Mitochondrien in verschiedenen Geweben oder zu verschiedenen Zeitpunkten ihre Form verändern (Lewis and Lewis, 1914). Diese mitochondriale Dynamik entsteht durch Fusion, also Verschmelzung, und Fission, also Teilung der Organellen (Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Mitochondrien bilden so ein intrazelluläres Netzwerk (Nunnari et al., 1997), lat. *reticulum*, welches strukturell mit dem Zytoskelett assoziiert ist (Yaffe, 1999).

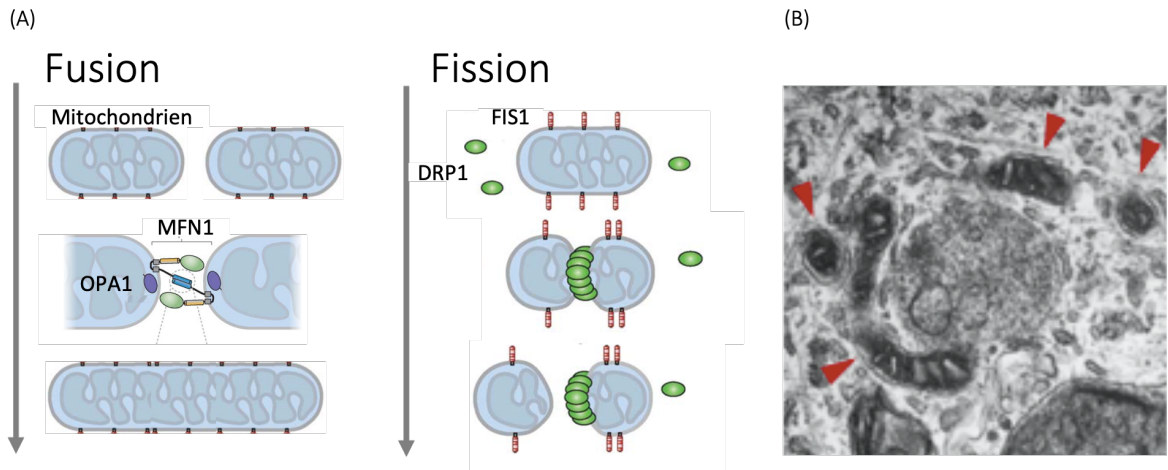


Abb.: 5, (A) Schemazeichnung der Fusions- und Fissions-Maschinerie von Mitochondrien; modifiziert nach Chan et al. Die Fusions-Maschinerie setzt sich zusammen aus den Proteinen MFN1, MFN2 und OPA1. Zur Fissions-Maschinerie gehören die Proteine DRP1 und FIS1 (Chan, 2006). (B) Elektronenmikroskopisches Bild von Mitochondrien (rote Pfeile) aufgenommen von Motori et al. (Motori et al., 2013).

Um diese Dynamik zu ermöglichen sind diverse Proteine beteiligt, die in einer Fusions- und einer Fissions-Maschinerie zusammenarbeiten.

Zur Fusions-Maschinerie gehören die Gene *mfn1*, *mfn2* und *opa1* (Chan, 2006). Das erste erforschte Gen ist das Mitofusin (*mfn*)-Gen von Chen et al. 2006. Bei der Zucht von *mfn1*- und *mfn2*-knock-out Mäusen kommt es zu einem Versterben der Embryonen *in Utero*. Untersucht man die Mäuse-Embryos, so lassen sich stark fragmentierte Mitochondrien nachweisen. Dies lässt auf eine Dysfunktion der Fusions-Maschinerie schließen (Chen et al., 2003). Bei *mfn1* oder *mfn2*-knock-out Mäusen kommt es zu einer verminderten Fusions-Funktion der Mitochondrien. Sobald mindestens eines der Gene vertreten ist, kann aber eine mitochondriale Fusion ermöglicht und die zelluläre Funktion aufrecht erhalten werden (Chen et al., 2005). Die *mfn*-Gene codieren für Dynamine, also GTPasen, welche in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert sind (Rojo et al., 2002, Hales and Fuller, 1997).

Ein weiteres für die Fusion relevantes Protein ist das *optic atrophy 1* Gen, *opa1*, bei dem es sich ebenfalls um eine GTPase handelt. *Opa1* wurde initial im Kontext mit der Hereditären Opticus-Neuropathie entdeckt und danach benannt (Alexander et al., 2000). Mittlerweile weiß man, dass es sich bei OPA1 um ein für die Fusion der Mitochondrien relevantes Protein handelt (Wong et al., 2000). OPA1 ist in der inneren Mitochondrien-Membran verankert und reicht in den Intermembran-Raum (Olichon et al., 2002). Das Fehlen von OPA1 führt zur Apoptose (Griparic et al., 2004).

Die Fusions-Maschinerie setzt sich also aus *mfn 1* und *2* und *opal* zusammen. Der Verlust von MFN verhindert sowohl die Fusion der inneren, als auch der äußeren Mitochondrien-Membran, während der Verlust von OPA1 nur die Fusion von der inneren, nicht aber der äußeren Mitochondrien-Membran verhindert (Song et al., 2009). Zeitgleich zur kontrollierten Fusion findet in der Zelle konstant eine kontrollierte Fission der Mitochondrien statt (Chen et al., 2005). Zur Fissions-Maschinerie gehören die Proteine DRP1 und FIS1. Bei einer Mutation im Gen des Dynamins *drp1* kommt es zur Ausbildung verlängerter Mitochondrien aufgrund eines Ungleichgewichts von Fusion und Fission. Dies liegt einer gestörten Teilung der Mitochondrien zugrunde (Bleazard et al., 1999, Smirnova et al., 2001). Das zweite Protein, welches eine wichtige Rolle in der Fission der Mitochondrien spielt, ist Fission 1, *fis1* (James et al., 2003). In einem *knock-out* Modell zeigen sich, äquivalent zum *drp1*-Ausfall, verlängerte Mitochondrien (Lee et al., 2004). Bei FIS1 handelt es sich um ein integrales Membranprotein, welches in der äußeren Mitochondrien-Membran lokalisiert ist (Mozdy et al., 2000).

Dieses gut regulierte Wechselspiel von Fusion und Fission ermöglicht, neben der zielgerichteten Variation der mitochondrialen Morphologie weitere Funktionen. Die Fusion ist mit der ATP Produktion und dem mitochondrialen Metabolismus assoziiert (Chen et al., 2005, Chen et al., 2003, Mourier et al., 2015). Es kommt bei der Fusion zu einer erhöhten Sekretion von Steroiden (Duarte et al., 2012) und Coenzym Q (Mourier et al., 2015). Die Vereinigung der einzelnen Mitochondrien ermöglicht die Verteilung sowie auch die Detektion von mutierter mitochondrialer DNA (Ishihara et al., 2009, Kowald and Kirkwood, 2011).

Die Fission dient der Verteilung der Mitochondrien in der Zelle. Zudem spielt die Fission eine Rolle im programmierten Zelltod, der Apoptose (Mishra and Chan, 2016, Youle and Karbowski, 2005).

Dysregulation von Fusion und Fission der Mitochondrien sind an der Zellalterung beteiligt. Durch verstärkte Fusion kommt es zu einem Abfall des Membranpotentials (Lee et al., 2007). Aus der hieraus resultierenden Dysfunktion der Atmungskette kommt es zu einer gesteigerten ROS-Produktion und es kommt zu oxidativem Stress. Durch mitochondriale Fission kann der oxidative Stress wieder reduziert werden. So sind die Folgen für die Zellalterung begrenzt reversibel (Correia-Melo and Passos, 2015). Eine funktionierende Regulation von Fusion und Fission ist für die Zelle also von elementarer Bedeutung.

Auf neuronaler Ebene führt das Versagen der Fusions-und Fissions-Maschinerie zu neurodegenerativen Erkrankungen. So führt z.B. eine Mutation im *mfn2* beim Menschen zu der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A (Zuchner et al., 2004). Das Wissen über die Dynamik der Mitochondrien in Glia-Zellen, insbesondere in Astrozyten, ist jedoch noch sehr gering und erst seit den letzten Jahren Inhalt wissenschaftlicher Forschung (Jackson and Robinson, 2018). In Astrozyten gibt es variierende Größen von Mitochondrien, wobei sich in den peripheren Fortläufern sehr kleine, 0,2-0,4 µm, Mitochondrien finden. Dies könnte durch eine hohe Rate an Fission ermöglicht werden (Derouiche et al., 2015). Stephen et al. zeigten 2015, dass es in Astrozyten in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität zu mitochondrialer Dynamik kommt (Stephen et al., 2015).

Zur Abwehr von oxidativem Stress und zur Prävention von neurodegenerativen Erkrankungen besitzt eine Zelle verschiedene antioxidative Mechanismen.

1.5 Superoxid-Dismutasen

Die Superoxid-Dismutasen (SOD) sind Teil des enzymatischen antioxidativen Systems. Als Erstbeschreiber der SOD gilt der Biochemiker Irvin Fridovich 1975. Er beschrieb die Funktion der SOD im Abbau des Superoxids $O_2^{\cdot-}$ zu Wasserstoffperoxid H_2O_2 . Das Wasserstoffperoxid kann im Anschluss über die Enzyme Catalase und Peroxidase eliminiert werden.



Bei den SOD handelt es sich um Metallo-Enzyme. In Säugetieren lassen sich drei Subtypen unterscheiden: Die Kupfer-/ Zink-SOD, SOD1, ist im Zytosol lokalisiert und setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, welche je ein Kupfer- und ein Zink-Atom enthält (Fridovich, 1975, Rae et al., 1999). *Sod1* ist bei Mäusen auf dem Chromosom 16 lokalisiert (Maier and Chan, 2002). Die Mangan-SOD, SOD2, findet sich in Mitochondrien und setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen (Fridovich, 1975). *Sod2* findet sich bei Mäusen auf dem Chromosom 17 (Maier and Chan, 2002). Die EC-SOD, SOD3, findet sich hauptsächlich im Extrazellulärraum und setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, die wie die SOD1 Kupfer- und Zink-Ionen enthalten (Marklund, 1984).

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den SOD1 und SOD2 in den Astrozyten des ZNS. Im murinen ZNS (Ratte) kommt es zu einer variierenden Expressionsstärke der SOD-Subtypen

in verschiedenen Zelltypen. So wird die SOD1 vor allem in Astrozyten produziert, in geringerer Konzentration auch in Neuronen. Dagegen kommt die SOD2 häufiger in Neuronen vor als in Astrozyten (Lindenau et al., 2000).

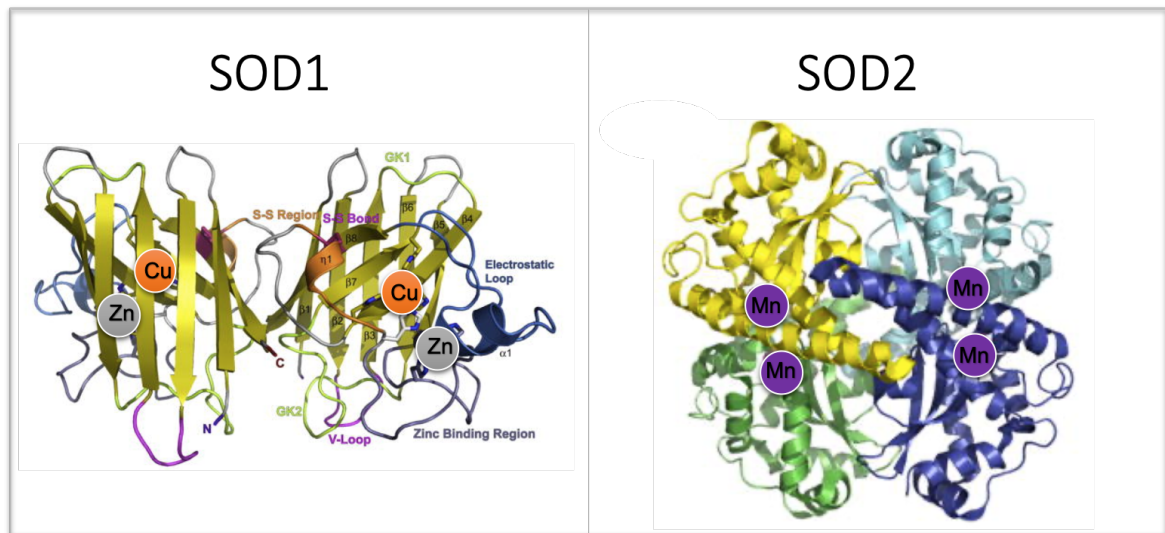


Abb. 6: Biochemische Struktur der Metallo-Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) 1 und 2. Die SOD1 setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen mit je einem Kupfer- und einem Zink-Atom. Die SOD2 setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen mit je einem Mangan-Atom. Abbildung modifiziert nach Perry et al. (Perry et al., 2010).

Unabhängig von dem Aufbau und der Lokalisation, liegt die Funktion der SOD im Abbau des $\cdot\text{O}_2^-$ -Ions unter der Produktion von H_2O_2 . Unter kontrollierten Bedingungen wird das H_2O_2 durch Enzyme abgebaut und die ROS so unschädlich gemacht. Es besteht aber die Gefahr, vor allem in Anwesenheit von Eisen, dass das entstehende Wasserstoffperoxid zum Hydroxyl Radikal reagiert. Die Entstehung des Hydroxyl-Radikals ist als Haber-Weiß-Reaktion beschrieben: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{HO} + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$ (Haber, 1934). Beim Hydroxyl-Radikal handelt es sich um eine sehr reaktionsfreudige ROS, welches eine hohe lokale Toxizität aufweist. Dieser Pathomechanismus spielt vor allem beim Morbus Parkinson eine Rolle, da es hier zu hohen Fe^{2+} -Konzentrationen kommt (Jenner, 2003). Während des Abbaus des $\cdot\text{O}_2^-$ -Ions durch die SOD besteht also das Risiko, dass ein Hydroxyl-Radikal entsteht. Daher ist es wichtig, dass der Abbau der ROS unter kontrollierten Bedingungen abläuft.

Die zerebrale $\cdot\text{O}_2^-$ -Elimination ist notwendig, da dieses neurotoxisch ist (Patel et al., 1996). Es gibt verschiedene Mechanismen $\cdot\text{O}_2^-$ -Ion vermittelter zerebraler Toxizität. Wie bereits in Abschnitt 1.2 besprochen, ist eine Aufgabe der Astrozyten die Aufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt (Perea et al., 2009, Araque et al., 1999). $\cdot\text{O}_2^-$ führt zu einer verminderten Aufnahme von Glutamat durch die Astrozyten (Volterra et al., 1994) und somit zu einer gestörten neuronalen Funktion (Schulz et al., 1995). Eine Überexpression von

SOD1 vermindert die Inhibition der astrozytären Glutamat-Aufnahme durch $\cdot\text{O}_2$ und schützt so die Neurone vor der Glutamat-Toxizität (Chen et al., 2000). Dies hat zur Folge, dass transgene SOD1-überproduzierende Mäuse eine geringere Morbidität durch Ischämie aufweisen als Wildtyp-Mäuse (Yang et al., 1994, Murakami et al., 1997). Umgekehrt kommt es bei SOD1-*knock-out*-Mäusen zu schwerwiegenderen Folgen durch Ischämie im Vergleich zu Mäusen, die regulär SOD1 produzieren (Kondo et al., 1997).

Zudem scheint das $\cdot\text{O}_2^-$ -Ion für die Störung der Bluthirnschranke nach zerebraler Ischämie verantwortlich zu sein (Kondo et al., 1997). Eine Überexpression von SOD1 in transgenen Mäusen führt zu einer Reduktion der Bluthirnschranken-Schädigung (Kim et al., 2001).

Mutationen in *sod1* sind an der Ätiologie der familiären Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) beteiligt. So sind 11 verschiedene *sod1*-Mutationen bekannt, die zu familiärer ALS führen (Rosen et al., 1993). Bei der ALS handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, welche mit einem Verlust von zentralen und peripheren Motoneuronen einhergeht. Es kommt zu einer progredienten Paralyse der Patienten. Es handelt sich um eine schwerwiegende Erkrankung mit einem schnellen Krankheitsverlauf und einer sehr hohen Letalität. 2% aller ALS Fälle und 20% der familiären ALS Fälle sind mit einer Mutation von *sod1* assoziiert (Maier and Chan, 2002). Der Zusammenhang von *sod1* Mutation und ALS ist noch nicht vollständig verstanden. Mutationen von *sod1* scheinen jedoch auf neuronaler Ebene mit einem verminderten axonalen Transport und einer gestörten axonalen Mitochondrien-Funktion einher zu gehen. Ursächlich für die Pathologien scheint die Fehlfaltung der SOD1 und die Aggregation im Gewebe zu sein, sodass ein aktueller therapeutischer Ansatz der ALS darin besteht, die Expression von *sod1* zu unterdrücken (Abati et al., 2020).

Sod2 Mutationen sind nicht mit ALS assoziiert (Tomkins et al., 2001). Ein *sod2-knock-out* Modell führt in Mäusen zur mitochondrialen Schädigung und damit *postpartal* zu einer Neurodegeneration sowie einer progredienten Schädigung von Kardiomyozyten. Kompensatorisch kommt es zu einem Aktivitätsanstieg der SOD1 um 25% (Lebovitz et al., 1996). Beim Menschen führt eine Mutation im *sod2* (Ala9 zu Val) zu einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (Hiroi et al., 1999). Grundlagenforschung zum Verständnis der Regulation der SOD ist essenziell, um zu einem Verständnis neurodegenerativer Erkrankungen zu gelangen und hieraus therapeutische Ansätze abzuleiten.

1.5.1 Regulation der Superoxid-Dismutasen

Die Konzentration und Aktivität des Enzyms Superoxid-Dismutase 1 wird über verschiedene Mechanismen reguliert.

Auf Gen-Ebene entscheiden neben Transkriptionsfaktoren (Fee, 1991) epigenetische Regulationsmechanismen, wie Methylierung und Histon-Modifikation, über die Quantität der Transkription von *sod1* (Jimenez-Pacheco et al., 2017). Das Hormon der *Glandula pinealis*, Melatonin, führt in Ratten-Kortizes zu einer Induktion der *sod1*-Transkription (Kotler et al., 1998, Reiter, 1998). Nach der Transkription kommt es über einen Spleiß-Mechanismus zur Modifikation der mRNA (Birve et al., 2010). Im Anschluss erfolgt die Translation des Proteins. Eine aufwändige Regulation der SOD1 findet auf Protein-Ebene statt. In den letzten Jahren lag ein Fokus der Wissenschaft auf den post-translationellen Modifikationen (PTM) der SOD1. Hier gibt es eine Vielzahl an Modifikationen, welche an verschiedenen Regionen der SOD1 vorgenommen werden können. C. J. Banks und J. L. Andersen fassen diese in ihrem Review von 2019 zusammen, sie bestehen aus: Phosphorylierung, Lysin-Modifikationen mit u.a. Ubiquitination, Redox-Modifikationen mit Oxidation und Glutathionylation, S-Acylation und Nitration (Banks and Andersen, 2019). Diese PTM haben einen Einfluss auf die Aktivität und Stabilität der SOD1 in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren.

Die Aktivierung der SOD1 erfolgt durch Kupfer-Zink-Bindung sowie die Bildung intramolekularer Disulfid-Brücken. Die Bindung von Kupfer und Zink wird von dem Enzym *copper chaperone for SOD1* (CCS) katalysiert (Culotta et al., 1997, Furukawa and O'Halloran, 2006). Die CCS-Aktivität ist O₂-abhängig und ermöglicht so die SOD1-Aktivierung in Abhängigkeit von oxidativem Stress (Leitch et al., 2012)

Neben der bekannten Funktion der SOD1 in der Elimination von $\cdot\text{O}_2^-$, ist seit 2014 eine weitere Funktion der SOD1 bekannt. Kommt es intrazellulär zu erhöhten ROS-Konzentrationen, führt dies zu einem Transport von SOD1 nach intranukleär, wo diese als Transkriptionsfaktor diverser Gene antioxidativer Enzyme fungiert (Tsang et al., 2014).

Die Expression der SOD2 unterliegt ebenfalls verschiedenen Regulationsmechanismen.

Sod2 wird in Abhängigkeit von den Transkriptionsfaktoren *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF- κ B) und *specificity Protein* (Sp) exprimiert (Mao et al., 2006). Im ZNS gibt es in dieser Regulation einen Unterschied zwischen Neuronen und Glia-Zellen. So wird *sod2* in Neurone in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor Sp3 und Sp4 exprimiert, wohingegen in Astrozyten NF- κ B, Sp1 und Sp3 für die Expression verantwortlich sind (Mao et al., 2006).

Wie die SOD1 unterliegt die SOD2 auf Protein-Ebene PTM zur Modifikation der Konzentration und der Aktivität (Banks and Andersen, 2019).

Die Aktivierung der SOD2 erfolgt mittels Acytilierung in einer zirkadianen Rhythmik. Die Acytilierung erfolgt über das Enzym *NAD-dependent deacetylase 3* (SIRT3), welches in Abhängigkeit von der molekularen Uhr aktiviert wird (Peek et al., 2013).

1.6 Ziele der Arbeit

Das zentrale Nervensystem besteht zu einem großen Anteil aus Astrozyten (Tower and Young, 1973). Diese beeinflussen die Neurone und stehen im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen (Phatnani and Maniatis, 2015). Sowohl das zirkadiane System als auch oxidativer Stress sind zwei essenzielle Einflussgrößen auf den zellulären Metabolismus. In dieser Arbeit wird die Auswirkung dieser zwei Faktoren auf Astrozyten untersucht. Hierfür werden zum einen Gene mitochondrialer Aktivität betrachtet, um den zellulären Metabolismus zu untersuchen. Zum anderen wird die Auswirkung des zirkadianen Systems und oxidativem Stress auf die antioxidativen Enzyme SOD1 und SOD2 beobachtet und analysiert.

Dafür werden folgende Hypothesen überprüft:

1. Rotenon erzeugt intrazellulären oxidativen Stress in Form von ROS.

Es ist bereits bekannt, dass Rotenon durch Hemmung der Atmungskette ROS erzeugt (Sherer et al., 2003). In diesem Versuch wird nachgewiesen, dass Rotenon auch in dem verwendeten Versuchsaufbau ROS induziert.

Zur Überprüfung dieser Hypothese werden primäre Astrozyten-Zellkulturen für 24 Std mit 1 μ M Rotenon behandelt und die ROS mittels ROS-Assay bestimmt.

2. Die Faktoren Zeit und oxidativer Stress haben einen Einfluss auf die Expression des molekularen Uhrwerks (PER2).

In der vorliegenden Arbeit wurde das PER2::LUC-Mausmodell verwendet, um den zirkadianen Metabolismus von Astrozyten darzustellen und eine Aussage über die Beeinflussung von diesem durch oxidativen Stress zu treffen.

Zudem finden sich in der Literatur Hinweise auf Geschlechtsunterschiede in der Expression der Uhren-Gene (Lim et al., 2013). Auf Grund dessen werden die Proteinsynthesen von PER2::LUC in der vorliegenden Arbeit nach Geschlechtern differenziert betrachtet.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wird die Expression des PER2::LUC-Fusionsproteins in primären Astrozyten-Zellkulturen im Luminometer untersucht. Zur Induktion von oxidativem Stress werden die Zellen mit Rotenon behandelt. Die Konzentration entspricht der Behandlung aus (1.)

3. Die zirkadiane Rhythmik und oxidativer Stress haben einen Einfluss auf die mitochondrialen Gene *nd1*, *mfh2* und *fis1*.

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass zirkadiane Rhythmik (Uchiyama, 1981) und oxidativer Stress (Pletjushkina et al., 2006) einen Einfluss auf die Fusion und Fission von Mitochondrien haben. In der vorliegenden Arbeit sollen die Erkenntnisse zum mitochondrialen Metabolismus in Astrozyten vertieft werden.

Zur Überprüfung dieser Hypothese werden die Expressionslevel der mitochondrialen Gene mittels *real time* PCR aus primären Astrozyten-Zellkulturen bestimmt. Die Zeitpunkte der Probenentnahme entsprechen der Per2-Rhythmik aus (2.). Zur Induktion von oxidativem Stress werden die Zellen mit Rotenon behandelt. Die Konzentration entspricht der Behandlung aus (1.)

4. Die zirkadiane Rhythmik und oxidativer Stress haben einen Einfluss auf die antioxidativen Enzyme SOD1 und SOD2.

Die SOD spielen einen entscheidenden Faktor in der Abwehr von oxidativem Stress (Maier and Chan, 2002). Es gibt Hinweise, dass die Expression der SOD durch zirkadiane Rhythmik beeinflusst wird (Martin et al., 2003).

Zur Überprüfung dieser Hypothese werden die Expressionslevel der *sod* mittels *real time* PCR und die Expression der SOD mittels *Westen-Blot* aus primären Astrozyten-Zellkulturen bestimmt. Die Zeitpunkte der Probenentnahme entsprechen der Per2-Rhythmik aus (2.). Zur Induktion von oxidativem Stress werden die Zellen mit Rotenon behandelt. Die Konzentration entspricht der Behandlung aus (1.)

Grundlagenforschung zu Astrozyten und deren Einflussgrößen ist essenziell, um zu einem Verständnis neurologischer Erkrankungen zu gelangen. Aus diesen Erkenntnissen können Ideen für weitere Versuche abgeleitet werden, um Therapien für diese Erkrankungen zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurde mit transgenen PER2::LUC-Mäusen (B6.129S6-Per2tm1Jt/J, Stock No: 006852 I mPer2Luc, The Jackson Laboratory, USA) gearbeitet. Hierbei handelt es sich um transgene Mäuse, denen ein Luciferase-Gen (*luc*) an das endogene Period2-Gen (*per2*) gekoppelt wurde, sodass abhängig von der endogenen *per2::luc*-Expression ein PER2::LUC-Fusionsprotein produziert wird. LUC besitzt biolumineszierende Eigenschaften und kann im Luminometer quantitativ bestimmt werden. Die Zucht der Mäuse erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Aktenzeichen U7611). Vor Beginn der Versuche wurde der FELASA-B zertifizierte Tierversuchskunde Kurs des ZETT an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf absolviert.

Für die Durchführung der Versuche kam es zur Organentnahme der postmortalen Tiere. Die Entnahme wurde in Übereinstimmung mit den EU-Richtlinien (2010/63/EU) durchgeführt.

2.1.2 Materialien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien mit Hersteller

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure Pufferlösung (HEPES), 1M	gibco
4-Nitrophenol	Sigma-Aldric
ACS ® NeuroBrew-21	MACCS® Miltenyi Biotec
Agar	Invitrogen
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Karl Roth
Ammonium Peroxodisulfat (APO)	Honeywell Fluka
Bovines Serum Albumine (BSA)	Pierce,
Choloroform, EMSURE®	Merck
Dimethylsulphoxide (DMSO), HYBRI-MAX®	gibco
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX ™-I	gibco
Dulbecco's Phosphat Pufferlösung (DPBS)	gibco

Electrophorese Marker (<i>Quick-Load</i> 100 bp DNA)	BioLabs
Ethanol, EMSURE ®	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,5 M	Thermo Fisher Scientific
F-12 Nutrien Mixtur (F-12 Nut Mix) + GlutaMax™-I	gibco
Fetal Bovines Serum (FBS)	gibco
GlutaMax™-I	gibco
Isopropanol, EMSURE ®	Merck
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun (NaCl)	B Braun
Kaliumchlorid (KCL)	Merck
Kapa 2G <i>Fast Ready Mix</i>	Sigma-Aldrich
Live Cell Imaging Solution (HEPES gepufferte Lösung)	Molecular probes ® by Life Technologies
Methanol, EMPLURA ®	Merck
Midori Green	NIPPON Genetics
Minimum Essential Medium (MEM)	gibco
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich
Nonfat Dry milk	Cell Signaling Technology
Penicillin Streptomycin	gibco
peqGOLD TriFast	PEQLAB Biotechnologie
Phenol Rot Lösung	Sigma-Aldrich
Poly D-Lyseine (PDL)	Merck Milipore
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards	BioRad
ROS-Detektions Reagenz	Invitrogen
Rotenon	Sigma-Aldrich
Rotiphorese® Gel 30 Acrylamid	Karl Roth
Strep Tactin-HRP Konjugat	BioRad
Thermo Super Signal West Femto	Thermo Fisher Scientific
Trypan-Blue Stain (0,4%)	gibco
Trypsin	gibco
Polyoxethylensorbitan monolaurate Polyethylene glycol sorbitan monolaurate (TWEEN)	Sigma-Aldrich

Tabelle 2: Primer Sequenzen für *real time* PCR

Primer	Sense	Hersteller
<i>18s</i> Sense	5'-CGCCTACCACATCCAAGG AA-3'	Sigma
<i>18s</i> Antisense	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	Sigma
<i>fis1</i> Sense	5'-CTACAGGGGTGCAGGAGAAA-3'	Sigma
<i>fis1</i> Antisense	5'-AGATGGACTGGTAGGCATGG-3'	Sigma
<i>gapdh</i> Sense	5'-CAACAGCAACTCCCACTCTTC-3'	Sigma
<i>gapdh</i> Antisense	5'-AAAGGAGTAAGAAACCCTGGACC-3'	Sigma
<i>mfn2</i> Sense	5'-CTGGGGACCGGATCTTCTTC-3'	Sigma
<i>mfn2</i> Antisense	5'-CTGCCTCTCGAAATTCTGAAACT-3'	Sigma
<i>nd1</i> Sense	5'-TTTACGAGCCGTAGCCCAA-3'	Sigma
<i>nd1</i> Antisense	5'-GGCCGGCTGCGTATTCTAC-3'	Sigma
<i>per2</i> Sense	5'-TGAGCTCGCTGAAGAACAG-3'	Sigma
<i>per2</i> Antisense	5'-TGTGTGGTGGTGAAGATGC-3'	Sigma
<i>sod1</i> Sense	5'-TCGGCTTCTCGTGTGCTCTCT-3'	Sigma
<i>sod1</i> Antisense	5'-TTCACCGCTTGCCTTCTGCT-3'	Sigma
<i>sod2</i> Sense	5'-GCCCCCTGAGTTGTTGAATA-3'	Sigma
<i>sod2</i> Antisense	5'-AGACAGGCAAGGCTCTACCA-3'	Sigma

Tabelle 3: Antikörper für Western-Blot

Primär-Antikörper	Hersteller
Anti-SOD1 Antikörper (<i>rabbit polyclonal</i>) #Ab13498 Lot.Nr. GR80256-24	Abcam
Anti-SOD2 Antikörper (<i>rabbit polyclonal</i>) # Ab13534 Lot.Nr. GR33618-30	Abcam
Anti-Actin Antikörper (<i>rabbit polyclonal</i>) # Cat #AAAn01Lot121	Cytoskeleton
Sekundär-Antikörper	Hersteller
Goat anti-Rabbit IgG, <i>Peroxidase-conjugated AffiniPure</i> #Code 111-035-144 Lot.Nr. 95092	Jackson Immuno Research Laboratories

Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank Galaxy 170S	Eppendorf
Cycler Mastercycler pro vapo.protect	Eppendorf,
Digital Graphic Printer UP-D897	SONY
EASYstrainer Zellsieb, 40µm	Greiner
Elektrophorese-Gerät Elektrophorese-Kammer	BioRad, Pharmacia Febikon
FLUOstar Omega, Atmospheric Control Unit	BMG LABTECH
Fotokammer für Gele	PHASE
Gelkassette, 1 mm	Novex® by live Technologies
Klebefolie qPCR	4titude ® Limited
Kühlschrank	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
Mikrotitrierplatten (6 well, 24 well, 96 well)	Greiner bio-one
Mili Q Ultra pure H ₂ O Gerät	MILLIPORE
Mischgerät, Vortex	neoLab
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
PeqPOWER 250 V	PEQLAB Biotechnologie
Petrischalen (6 cm Schalen mit Poly-L-Ornithin)	Sigma-Aldrich
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	STARLAB
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran 2µm	Novex
<i>Real-Time</i> PCR System StepOnePlus	Applied Biosystems
Schwenkplatte	Heidolph Instruments
Sterile Syringe Filter	VWR, Radnor
Stripetten	coStar
Thermomixer Compact	Eppendorf,
UV-Gel Foto-Gerät	PHASE
Waage M-Power	Sartorius
Wasserbad Aqualine	LAUDA

Western Blot ChemiDoc MP Imaging System	BioRad
Western Blot Kammer und Module	Thermo Fisher Scientific
Zählkammer, Neubauer	Optic Labor
Zellkultur Bank (Steril-Bank)	Thermo Fisher Scientific
Zellkultur-Bank-Sauger	Vacuubrand,
Zell-Schaber	Greiner bio-one
Zentrifuge	neoLab, Eppendorf
Zentrifugenröhrchen:	STARLAB

Tabelle 5: Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc.
Floustar Omega, Omega Data Analysis (300.R2)	BMG LABTECH
Image Lab	BioRad
Step one Software	Applied Biosystems

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Präparation zur Gewinnung von Astrozyten für die Primärzellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde mit primären Astrozyten-Zellkulturen aus transgenen PER2::LUC-Mäusen gearbeitet. Hierfür wurden drei Tage postnatale Mäuse nativ, nach Geschlechtern getrennt, präpariert. Männliche und weibliche Mäuse lassen sich anhand des anogenitalen Abstands voneinander unterscheiden. Bei den weiblichen Tieren ist der Abstand des Genitals zum After geringer, als bei den männlichen Mäusen. Um Fehler auszuschließen, wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Expression des Gens *sex determining region y (sry)* mittels konventioneller PCR untersucht, um männliche Tiere sicher von den weiblichen zu unterscheiden. Während der gesamten Prozessierung des Gewebes wurde die Geschlechtertrennung streng beibehalten und so die Integrität bewahrt. Die Mäuse wurden mit einer Präparationsschere dekapitiert, das Gehirn freipräpariert, der Kortex isoliert und in Präparationspuffer gelagert. Anschließend folgte die Lyse in Lysepuffer bei 37°C für 10 min. Nach der Lyse wurden die Kortexes in 10 ml 16 % Fetal Bovine Serum in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (FBS in DMEM) homogenisiert, um einen *Zellpool* zu generieren. Das Homogenisat wurde durch ein 40 µm-Zellsieb (Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) passiert und dann für 7 min bei 300 x g zentrifugiert (neoLab,

Heidelberg, Deutschland). Der Überstand wurde dekantiert und das *Pellet* in 7 ml 16 % FBS-DMEM resuspendiert. Es folgte die Aussaat der Resuspension in je 7 ml 16 % FBS-DMEM in eine 6 cm Schale, welche zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtet wurde.

Die Bebrütung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 37°C. Ein erster Medium Wechsel wurde 24 Std nach der Präparation durchgeführt. Nach weiteren 24 Std wurden lose und abgestorbene Zellen durch harsches Spülen mit Medium entfernt und erneut ein Medium-Wechsel durchgeführt. Die Präparation und Kultivierung der Astrozyten erfolgte nach dem Protokoll von Misiak et al (Misiak et al., 2010).

2.2.1.2 *Medium-Wechsel*

Für einen Medium Wechsel wurde das alte Medium abgenommen und frisches 16 % FBS-DMEM zu den Zellen addiert. Bei 6 cm Schalen wurde 7 ml Medium verwendet, bei einer 96-*well* Platte 100 µl Medium pro *well* und bei einer 24-*well* Platte 500 µl Medium pro *well*.

2.2.1.3 *Aussaat für Versuche*

Um die Zellen im gewünschten Verhältnis für Versuche auszusähen, wurden diese von der Schale gelöst, mittels Neubauer Zählkammer (Optic Labor) gezählt und subkultiviert.

Für das Lösen der Zellen vom Schalengrund wurden diese einmalig mit PBS/EDTA gewaschen und anschließend in Trypsin-haltigem, FBS-freien Medium für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 6 ml 16 % FBS in DMEM addiert, die Lösung in ein Reaktionsgefäß überführt und für 7 min bei 120 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das *Pellet* in 7 ml 16 % FBS in DMEM homogenisiert.

Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden 1:1 in Trypan-Blau gefärbt und in die Zählkammer überführt. Hier wurden die Zellen nach Schema ausgezählt und die Zellzahl errechnet. Die gewünschte Zelldichte für die erneute Aussaat lag bei $2-5 \times 10^4$ Zellen/ml. Im Brutschrank erfolgte die Bebrütung, bis sich lichtmikroskopisch ein konfluentes Wachstumsmuster eingestellt hat.

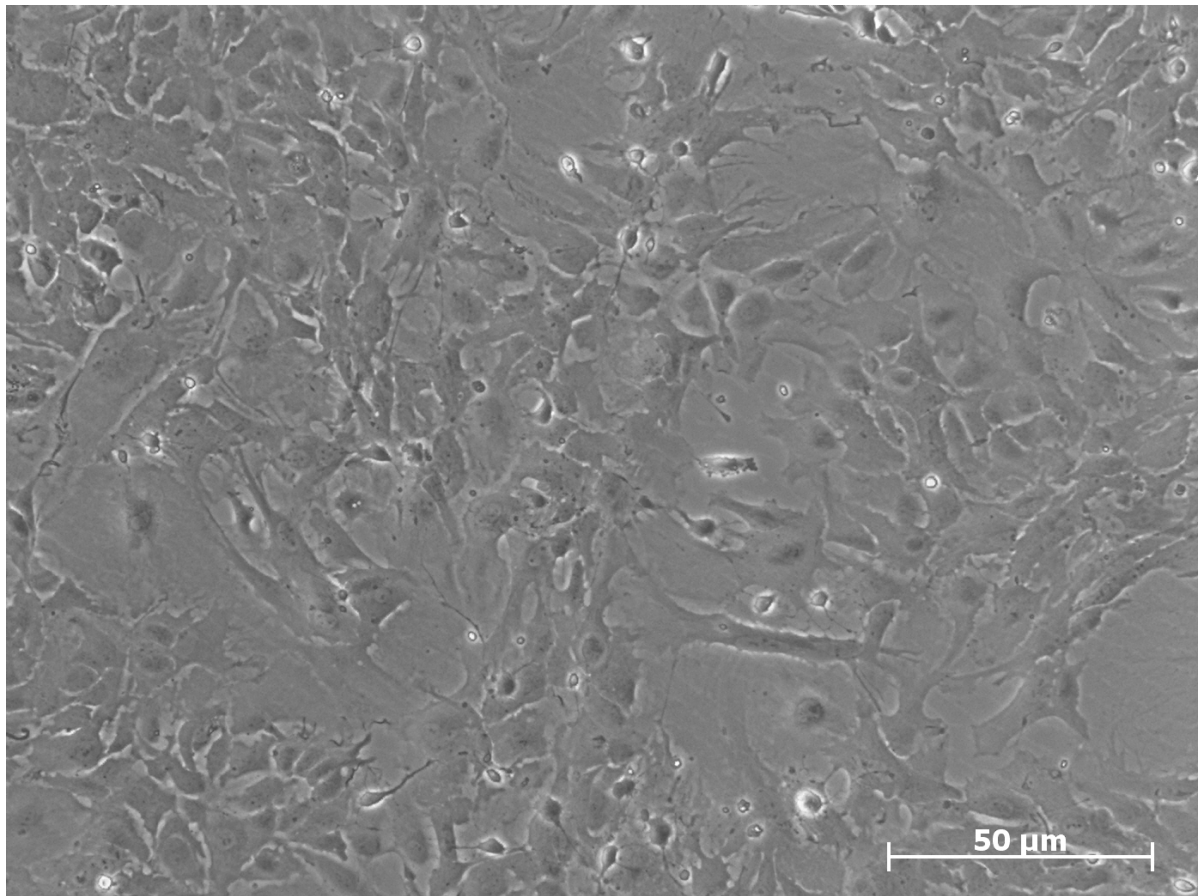


Abb. 1: Hellfeld-Mikroskopie in vitro, 20x, Neokortikale weibliche Astrozyten (Maßstab 50 μm)

2.2.2 Behandlung der Zellen mit Rotenon

2.2.2.1 Rotenon Behandlung

Sind die Astrozyten im Brutschrank bei 37 °C konfluent gewachsen, so kann die Behandlung mit Rotenon durchgeführt werden. Vor der Behandlung wurde frisches Versuchs-Medium und 1 μM Rotenon aus einer Stock-Lösung angesetzt. Pro *well* einer 6-*well* Platte wurden für die Kontrolle 2 ml Medium und für den Versuch 2 ml Rotenon-Lösung addiert. Die Behandlung erfolgte für die Gruppe t1 für 20 Std und für die Gruppe t2 für 32 h. Nach der Rotenon-Behandlung wurden die Zellen für die verschiedenen Auswertungs-Protokolle eingefroren.

2.2.3 Echtzeit Analyse

2.2.3.1 Luminometer Versuch

Für die Luminometer-Analysen wurden die Astrozyten nach dem beschriebenen Protokoll (siehe 2.2.1) präpariert, gezüchtet und auf 24-*well* Platten ausgesät. Es erfolgte die Behandlung der Rotenon-Gruppe mit 1 μM Rotenon und im Anschluss die Aufzeichnung

der Biolumineszenz im Luminometer. Während der Versuchszeit wurde eine Temperatur von 37 °C, 5% CO₂ sowie ein Druck von max. 10 psi eingehalten. Es erfolgte die Analyse für 72 Std. Das Protokoll für die Luminometer-Analyse orientiert sich an dem Vorgehen von Yu Tahara et al. (Yu Tahara*, 2016)

Dieser Versuch wurde durchgeführt von Dr. rer. nat. Marion Victor.

2.2.4 Molekularbiologische Analyse

2.2.4.1 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels *peqGOLD TriFast* Kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gemäß dem Firmenprotokoll. Die Arbeiten wurden an einem RNA-Arbeitsplatz unter Einhaltung der Sicherheitsvorschriften des Firmenprotokolls durchgeführt.

Für die RNA-Isolierung aus den kultivierten Astrozyten, wurde das Medium abgenommen und 1 ml *peqGOLD TriFast* pro well der 6-well Mikrotiterplatte addiert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren lysiert und dann für 5 min in *peqGOLD TriFast* inkubiert. Daraufhin wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und pro Probe 200 µl Chloroform (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 10 min hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert, um eine Auftrennung in drei Phasen zu erreichen. Die obere wässrige Phase enthielt RNA, die Interphase enthielt DNA und die untere rot-gefärbte Phase enthielt DNA und Proteine. Mit einer Pipette wurde die obere Phase in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Um die RNA aus der wässrigen Lösung zu fällen, wurden 500 µl Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) addiert, die Proben gemischt und auf Eis inkubiert. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde die Probe anschließend über Nacht bei -20°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C mit 15.000 x g. Um die RNA weiter zu reinigen, wurde die Probe zweimal mit 75 % Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Hierfür wurde jeweils der Überstand dekantiert, 1 ml eiskaltes 75 % Ethanol addiert, die Probe kurz unter Zuhilfenahme eines Schüttlers gemischt und anschließend für 10 min bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert. Abschließend wurde die Probe für 10 min bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert und das Ethanol dekantiert. Um eine Inhibierung der cDNA-Synthese durch Ethanol zu vermeiden, wurde das *Pellet* nun bei Raumtemperatur getrocknet. Final wurde die RNA in 12 µl RNase-und DNase-freies Wasser (MILIPORE, Burlington, Massachusetts, USA) gelöst und für 60 min bei 58°C und 450 rpm im Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

Die Durchführung der cDNA Synthese erfolgte mittels des *Revert Aid First Strand cDNA Synthese Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Um in allen Proben die gleiche Menge an RNA in cDNA umzusetzen, wurde die Konzentration der isolierten RNA mittels Nano-Drop2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermittelt. Es wurden 1 µg RNA für die cDNA-Synthese verwendet. Hierzu wurde 1 µl *Random Primer* addiert und mit nukleasefreiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt, gemischt und dann zentrifugiert. Es wurden 8 µl *Master Mix* aus dem cDNA Synthese Kit addiert, kurz gemischt und zentrifugiert. Es folgte die Inkubation bei 25°C für 5 min, dann bei 45°C für 60 min und zum Abstoppen der Reaktion eine Inkubation bei 70°C für 5 min. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der konventionellen PCR lässt sich vor der Durchführung einer *real time*-PCR überprüfen, ob die cDNA Synthese erfolgreich war. Hierfür wurden 1 µl cDNA und 24 µl *Master Mix* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die DNA wurde im *Cycler* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) repliziert. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 2 min, dann folgten 25 Zyklen mit 95°C für 15 sek. Für die *Primer*-Hybridisierung lief das Programm bei 57°C für 15sek und für die Elongation bei 72°C für 1 min. Für die Denaturierung erfolgte die Erhitzung auf 72°C für 10 min. Zum Schluss werden die Proben auf 4°C abgekühlt.

10 µl des PCR-Produkt wurden pro Probe anschließend auf ein 1,5 % (w/v) Agarosegel (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Hierfür wurde die Gelelektrophorese-Kammer (Febikon, Wermelskirchen, Deutschland) verwendet. Da dem Agarose-Gel der DNA-Farbstoff *Midroi Green* (NIPPON Genetics, Düren, Deutschland) hinzugefügt wurde, sind nun die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar. Die Aufnahmen der Gele erfolgten in einer Foto Kammer (PHASE, Lübeck, Deutschland).

2.2.4.4 Real time PCR

In dieser Arbeit wurden die mitochondrialen Gene *fis1*, *mfn2* und *nd1*, das Uhren-Gen *per2* und die Gene der Superoxid-Dismutasen *sod1* und *sod2* untersucht. Als Haushaltsgen wurde *18s* und *gapdh* verwendet.

Für die *real time* PCR wurden die gewonnenen cDNA Proben (Abschnitt 2.2.4.2) verwendet. Um eine interne Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden jeweils ein definierter Anteil (8,5 µl/ Probe) aller zu vergleichenden Proben zu einem 100 %-Standard

gepoolt, dieser dann zu einer Standardreihe verdünnt und der verbliebene Anteil mit nuklease-freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Standardreihe wurde wie folgt angefertigt: Für den 100 % Standard werden von jeder Probe 8,5 µl in ein Reaktionsgefäß gegeben und dann eine Verdünnungsreihe mit 50 %-, 25 %-, 12,5 %-, 6,25 %-, 3,125 %-und 1,56 % cDNA-Konzentration erstellt.

Für die anschließende Evaluierung mittels *real time*-PCR wurde pro Analyse jeweils 2 µl der Standard-Reihe, 2 µl der 1:10 verdünnten Proben sowie 2 µl Wasser als Negativkontrolle in die vorgesehenen *wells* einer 96-*well* Mikrotitrierplatte (Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) aufgetragen. Pro *well* wurden 18 µl *KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Kit* (ABI Prism, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) addiert. Die Mikrotitrierplatte wurde mit einer Klebefolie (4titude ® Limited, Surrey, UK) abgeklebt und zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Die Proben durchliefen im *Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) folgendes Programm: initiale Erhitzung auf 95°C für 3 min, dann folgten 40 Zyklen von 95°C für 3 sek, dann erfolgte die *Primer*-Hybridisierung für 30 sek bei einer *primer*-spezifischen Temperatur, darauf folgte die Elongation für 30 sek bei 72°C. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurve erstellt, indem die die Proben für 15 sek auf 95°C erhitzt wurden und dann für 1 min bei 60°C runtergekühlt wurden, um dann erneut für 15 sek auf 95°C erhitzt zu werden.

Die Temperaturen für die Anlagerung der *Primer* lagen für *fis1*, *mfn2* und *nd1* bei 60°C, für das *sod1* auch bei 60°C, für *sod2* bei 58°C. Die Anlagerungs-Temperatur der Haushaltsgene *18s* und *gapdh* lagen bei 60°C. Die spezifischen Anlagerungs-Temperaturen wurden zuvor mittels konventioneller PCR ermittelt. Die Durchführung und Auswertung der *real time*-PCR erfolgte nach Pfaffel et al., Schmittgen et al. und Livak et al. (Livak and Schmittgen, 2001, Pfaffl, 2001, Schmittgen and Livak, 2008).

Die Analyse der Daten erfolgte mittels *Step one Software* (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA).

2.2.5 Biochemische Analyse

2.2.5.1 Protein-Isolation

Alle Arbeitsschritte der Protein-Isolation erfolgten auf Eis. Die Astrozyten für die Isolation wurden in 6 cm Schalen (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gezüchtet. Für die Protein-Isolation wurden die Astrozyten mittels eiskaltem *Radio Immuno Precipitation Assay* (RIPA) Puffer (abcam(R)) mit 150 µl pro Schale lysiert und anschließend 150 µl RIPA Puffer addiert, um die Zellen mechanisch mittels Zell-Schaber

(Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) vom Schalengrund zu lösen und das Zell-RIPA-Puffer Gemisch in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße zu überführen. Die Zellen inkubierten für 20 min bei 4 °C und wurden alle 5 min kurz mittels Mischgeräts gemischt. Im Anschluss wurde die Probe bei 13000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand mit den isolierten Proteinen, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2 Protein Konzentrationsbestimmung (BCA-Assay)

Für die Protein-Konzentrationsbestimmung wurde das *Bicinchoninic acid assay* (BCA)TM Protein Assay Kit (Pierce, Bonn, Deutschland) verwendet. Es wurde eine Standardreihe aus bovinem Serum Albumin (BSA) pipettiert und das BCA-Arbeitsreagenz angesetzt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit gereinigtem Wasser verdünnt, hierfür werden 5 µl Probe und 20 µl Wasser auf einer 96 well Mikrotiterplatte aufgetragen. Von dem Standard und den Negativkontrollen, bestehend aus Wasser, wurden jeweils 25 µl/ well aufgetragen. In jedes well wurden nun 200 µl BCA-Arbeits-Reagenz hinzugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Mittels Plattenlesegerät FlouStar Omega (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland) wurde bei 562 nm die Absorption gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mittels dem Programm *Floustar Optima* (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland). Hier erfolgte die Berechnung der Daten anhand der Standardkurve, wurde durch die Negativ-Kontrolle korrigiert und auf der dritten polynominalen Regression aufgetragen. Der kalkulierte Wert ergibt die Konzentration der Proteine in unserer Probe.

2.2.5.3 Immunbiologischer Protein-Nachweis („Western Blot“)

Um die Protein-Expression zu analysieren, wurde die Western-Blot-Methode durchgeführt. Der „Western-Blot“ setzt sich aus drei Arbeitseinheiten zusammen. Initial wurden die Proben mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und die Proteine dann elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte dann immunbiologisch mittels spezifischer Antikörper. Die Zusammensetzung der hierfür verwendeten Puffer sind im Anhang in der Tabelle 3 aufgeführt. Final folgte die Entwicklung und die Auswertung.

Für die Auftrennung der Protein-Proben wurden 1 mm dicke, 15 well, 12 % *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS)-Polyacrylamid (PAA)-Gele verwendet. Das SDS dient der weiteren Denaturierung der Proben, sodass eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht erzielt wurde. Das Sammel-und Trenngel unterschieden sich vor allem in der Konzentration des Polyacrylamids, 4% im Sammelgel und 10% im Trenngel und im pH-Wert der 1 M Tri Base

HCL Lösung. Bei dem Sammelgel hatte diese bei 5°C einen pH von 6,8 und beim Trenngel einen pH von 8,8. Beide Gele wurden in eine 1 mm Gelkassetten (Novex® by live Technologies, Carlsbad, USA) gegossen. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese wie folgt denaturiert: Pro Probe wurden 10 µg Protein, gereinigtes Wasser und Lade-Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben, gemischt, zentrifugiert und bei 80°C im Wasserbad denaturiert. Die SDS-Polyacrylamidgele werden in die Elektrophorese-Kammer (XCell Sure Lock™, Thermo Fischer, Waltham, USA) überführt, die Kammer mit dem Laufpuffer gefüllt und die vorbereiteten Proben in die Gel-Taschen pipettiert. Als Marker wurde das Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (Bio Rad, Hercules, Vereinigte Staaten) verwendet. Die Elektrophorese erfolgt für 15 min bei 100 V und folgend für 120 min bei 135 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Elektrophorese Puffer abgegossen, die Kammer aufgebrochen und das Gel für den anschließenden Proteintransfer („*Blotting*“) zugeschnitten. Die Übertragung erfolgte auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran mit einer Porendicke von 0,2 µm, die zuvor zwecks Aktivierung mit Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) inkubiert wurde. Für den anschließenden nassen Proteintransfer („*wet blot*“) wird das Gel luftblasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt und zwischen Filterpapier und Schwamm geschichtet. Dieses „*Blotsandwich*“ wurde in die Blotkammer, die mit eiskaltem Blot-Puffer gefüllt war, überführt. Der Proteintransfer erfolgte bei 25 V für 90 min bei einem Gel, bzw. für 105 min bei zwei Gelen. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit Wasch-Puffer inkubiert und zwecks Blockierung unspezifischer Bindestellen für 60 min bei Raumtemperatur unter Schwenken in Puffer mit 5 % (w/v)-Milch inkubiert.

Die Antikörper wurden in 1 % Milchpulver und Blotwasch-Puffer gelöst. Der Anti-SOD1 Antikörper (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) wurde 1:5.000 und der Anti-SOD2 Antikörper (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) 1:10.000 verdünnt. Als Ladekontrolle wurde Anti-Actin Antikörper (Cytoskeleton, Inc., Denver, USA) in einer 1:2.000 Verdünnung verwendet. Die Membranen wurden über Nacht bei 15°C mit dem Antikörper inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Membranen für drei Mal 10 min in Blot Wasch-Puffer. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper Gt-Anti-Rb-HRP (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich) in einer 1:40.000 Verdünnung und Streptaktin in einer 1:30.000 Verdünnung (BioRad, Hercules, Vereinigte Staaten). Die Inkubation erfolgte für 60 min auf der Schwenkplatte bei Raumtemperatur. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift mit Blot Wasch-Puffer für sechs Mal 10 min an. Als letzter Schritt folgte die Detektion der Proteine

mittels Thermo Super Signal West Femto, Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 5 min. Dabei reagierte das Chemilumineszenz-Substrat mit dem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper, sodass eine Protein-Bande sichtbar wird. Das Aufnehmen der Bilder erfolgte mit dem Western Blot Imager (BioRad, Hercules, USA) und die Auswertung mittels der Software Image lab (BioRad, Hercules, USA).

2.2.6 Funktionelle Analyse

2.2.6.1 *Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)-Assay*

Das ROS Assay erfolgte mittels ROS-Detektions Reagenzien (Invitrogen, Carlsbad, USA). In der Zellkultur wurden die Zellen in einer schwarzen 96-*well* Platte kultiviert. Es wurden drei Gruppen unterschieden: die Kontroll-Gruppe, die Rotenon-Gruppe und die LDH-Gruppe. Die Rotenon-Gruppe wurde für 24 Std mit 1 μM Rotenon behandelt. Die LDH-Gruppe diente dem *Laktatdehydrogenase-Assay* (LDH-Assay)

Die drei Kontrollen setzen sich zusammen aus Kontrolle 1, diese Zellen wurden nur mit dem Versuchsmedium behandelt, Kontrolle 2, welche mit Versuchsmedium und Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt wurden und Kontrolle 3, welche als Positivkontrolle mit Wasserstoffperoxid /10 μM H₂DCFDA-Lösung fungierte.

Die Zellen wurden mit 100 μM H₂O₂ für 40 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das LDH-*Assay* wurde 10 min später mit einer Zugabe von Lysin-Puffer zu den dafür bestimmten Zellen begonnen. Das Medium wurde mittels Pipette abgenommen und in eine neue sterile 96-*well* Mikrotiterplatte überführt, um hieraus im Verlauf die LDH-Konzentration zu bestimmen.

Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und dann mit 10 μM H₂DCFDA für 45-60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen.

Die Messung der Fluoreszenz erfolgt mittels *Tecan-Reader* (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland) bei einer Exzitation von $\lambda = 495 \text{ nm}$ und einer Emission von $\lambda = 525 \text{ nm}$. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *Software FlouStar omega* (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland).

2.2.6.2 *LDH-Assay*

Die Durchführung des LDH-*Assay* (Cyto Tox 96 ® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Wisconsin, USA) erfolgte lichtgeschützt, um die sensiblen Chemikalien zu

schonen. Es wurden 50 µl Versuchsmedium in die sterile transparente 96-well Mikrotitrierplatte überführt und 50 µl des rekonstituierten Substrat-Mix hinzugegeben und für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden 50 µl der *Stop-Solution* aus dem Kit hinzugegeben. Die Messung der Absorption erfolgte mittels *Tecan-Reader* bei einer Absorption von $\lambda = 490$ nm.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe der *Software Graph Pad Prism* (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA). Die Daten wurden mittels Wilcoxon-Test für verbundene Gruppen analysiert. Die zu vergleichenden Gruppen sind miteinander verbunden, da ein *Zellpool* verwendet wurde. Der Wilcoxon-Test ermögliche die Analyse von normalverteilten und nicht-normalverteilten Gruppen.

Die Auswahl des statistischen Tests erfolgte in Rücksprache mit der Statistikerin Frau Daniela Keller.

Die statistischen Analysen wurden mit Daten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler, SEM (*Standard eviation of the mean*) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% (p-Wert ≤ 5 %) festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Erzeugung von intrazellulärem oxidativem Stress durch Rotenon

Um intrazellulär oxidativen Stress zu erzeugen, wurden primäre kortikale Astrozyten mit dem Atmungsketten-Komplex I-Inhibitor Rotenon behandelt. Dieser oxidative Stress wurde zur internen Kontrolle durch ein Assay zum Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies, *reactive oxygen species* (ROS), nachgewiesen. Um einen Geschlechterunterschied auszuschließen, wurden die Astrozyten geschlechtergetrennt kultiviert. Das ROS-Assay zeigte (Abb. 1), dass sowohl bei den Astrozyten der Männchen als auch der Weibchen eine Behandlung mit 1 μ M Rotenon für 24 Std zu einem signifikanten Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies führte.

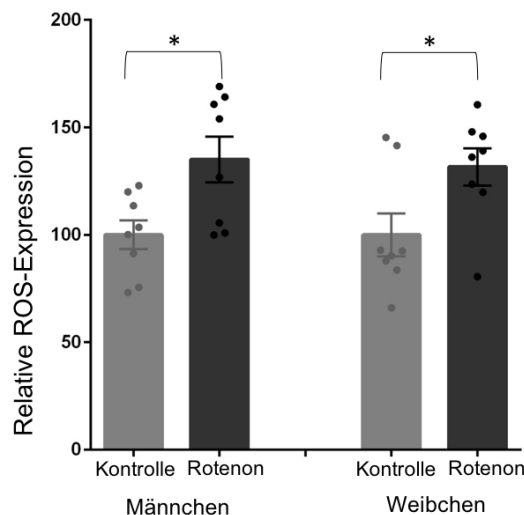


Abb. 1: Analyse des ROS-Konzentration nach Behandlung mit 1 μ M Rotenon. Es wurde ein Versuch mit einer Astrozytenkultur aus 8 Tieren durchgeführt. Die relative Expression wurde normiert auf die Kontrolle zum Zeitpunkt t1. Die Gruppen wurden mittels *unpaired t test* miteinander verglichen. Signifikanz (*) ist definiert als ein p-Wert $\leq 0,05$

3.2 Einfluss der Faktoren Zeit und oxidativer Stress auf das molekulare Uhrwerk

3.2.1 Schwankung der PER2::LUC-Expression in Astrozyten über 72 Std

Um die rhythmische Uhren-Gen-Expression in primären Astrozyten nachzuweisen, wurde die Fluoreszenz von Astrozyten aus transgenen Mäusen, die ein PER2::LUC-Fusionsprotein exprimieren, in Echtzeit aufgezeichnet. Um einen Geschlechterunterschied in der rhythmischen Expression des PER2::LUC auszuschließen, wurden die Astrozyten geschlechtergetrennt kultiviert.

Die Ergebnisse dieser Echtzeit-Analyse sind in Abb. 2 graphisch dargestellt. In der unbehandelten Astrozyten-Kultur (Kontrolle) kam es nach Medium-Wechsel zunächst zu einem Abfall der Fluoreszenz. Das Minimum wurde 20 Std nach Medium-Wechsel erreicht. Dieser Zeitpunkt wurde als t1 definiert. Danach kam es zu einem Anstieg der Fluoreszenz mit einem Maximum 32 Std nach Medium-Wechsel. Dieser Zeitpunkt wurde als t2 definiert.

Danach kam es wiederum zu einer Abnahme der Fluoreszenz mit einem weiteren Minimum 50 h nach Medium-Wechsel (t3) und einem erneuten Anstieg mit einem Maximum 62 h nach Medium-Wechsel (t4). Diese Ergebnisse bestätigen den in der Literatur beschriebenen zirkadianen Rhythmus der PER2::LUC-Expression in Astrozyten-Zellkulturen (Prolo et al., 2005). Im ersten Zyklus betrug die halbe Periodenlänge (zwischen t1 und t2) 12 Std und die Fluoreszenzintensität (Amplitude) zeigte einen etwa 6-fachen Unterschied. Im zweiten Zyklus betrug die Periodenlänge (zwischen t1 und t3 bzw. zwischen t2 und t4) ca. 30 h und die Fluoreszenzintensität (Amplitude) zeigte einen etwa 2-fachen Unterschied. Das deutet darauf hin, dass der zirkadiane Rhythmus der PER2::LUC Expression nach über 32 Std in Kultur nicht mehr stabil ist. Daher wurden für die Berücksichtigung des zirkadianen Rhythmus in den folgenden Experimenten die Zeitpunkte t1 und t2 gewählt.

Es gab keinen ausgeprägten Unterschied in der PER2::LUC-Expression zwischen den Astrozyten aus männlichen und weiblichen Tieren. Daher wurden für die weiteren Experimente die Ergebnisse geschlechterunabhängig untersucht.

3.2.2 Einfluss von oxidativem Stress auf die PER2::LUC-Expression

Um die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Expression des PER2::LUC zu untersuchen, wurden die Astrozyten mit 1 μ M Rotenon behandelt. Zum Ausschluss eines Geschlechterunterschied in der Auswirkung von oxidativem Stress auf die rhythmische Expression des PER2::LUC, wurden die Astrozyten geschlechtergetrennt kultiviert.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 2 graphisch dargestellt. Durch die Behandlung mit 1 μ M Rotenon kam es nach Medium-Wechsel zu einem geringeren Ausschlag der Amplitude der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t1 im Vergleich zur Kontrolle. Das Minimum der Expression wurde, wie bei der Kontrolle, 20 Std nach Medium-Wechsel, zu dem definierten Zeitpunkt t1, erreicht. Im Anschluss kam es zu einem Anstieg der Fluoreszenz mit einem Maximum nach 32 Std. Dieses Maximum wurde zum selben Zeitpunkt erreicht, wie bei der unbehandelten Kontrolle, doch kam es nur zu einem Viertel der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle. Nach dem Fluoreszenzmaximum zum Zeitpunkt t2 nimmt der Ausschlag der Amplitude im weiteren Verlauf deutlich ab. 50 Std (t3) nach Medium-Wechsel, kam es nicht zu einem erneuten Abfall der Fluoreszenzintensität. Diese ist ab diesem Zeitpunkt in etwa konstant. Dies deutet darauf hin, dass durch die Rotenon-Behandlung der zirkadiane Rhythmus der PER2::LUC-Expression über den gesamten Zeitraum beeinträchtigt ist und nach 50 Std nicht mehr stabil ist.

Echtzeitanalyse PER2::LUC-Expression

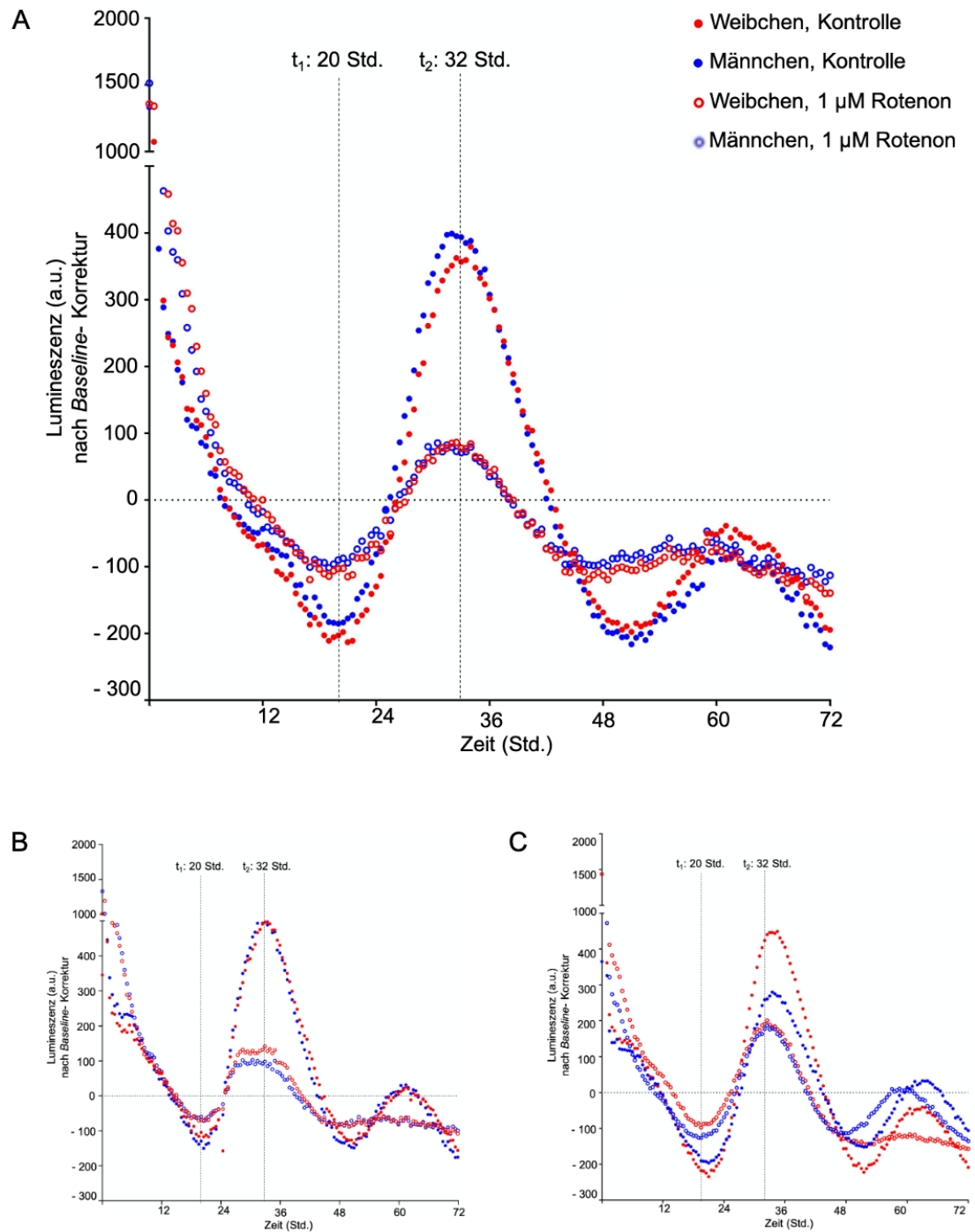


Abb. 2: Echtzeitanalyse der rhythmischen PER2::LUC-Expression in kultivierten Astrozyten. Gemessen wurde die Lumineszenz in Arbitrary units (a.u.) im Luminometer. Es wurden drei unabhängige Versuche mit Astrozyten-Zellkulturen aus insgesamt 18 Mäuse-Kortizes durchgeführt. **A** Experiment 2 (19.05.16), **B** Experiment 1 (06.07.16), **C** Experiment 3 (30.03.17).

3.2.3 Bestimmung der *per2*-Expression

Im Abschnitt 2., Schwankung der PER2::LUC-Expression in Astrozyten über 72 Std, wurde gezeigt, dass das PER2::LUC in primären murinen kortikalen Astrozyten einer oszillierenden Rhythmik über die Zeit unterliegt.

Als interne Kontrolle wurde das Expressionslevel des *per2* zu zwei Zeitpunkten t1 (20 Std nach Medium-Wechsel) und t2 (32 Std nach Medium-Wechsel) betrachtet und die unbehandelte Probe, hier Kontrolle genannt, mit einer Probe, welche mit Rotenon behandelt wurde, verglichen.

Für die Analyse der Daten wurde die Kontrolle zum Zeitpunkt t1 als 100 % definiert.

Abb. 3 zeigt die *real time* PCR von *per2*, normiert auf das Haushaltsgen *gapdh*. In der Analyse zeigte sich ein signifikanter Anstieg des *per2*-Expressionslevels um 80 Prozentpunkte vom Zeitpunkt 0 Std zum Zeitpunkt 12 Std ($p\text{-Wert} \leq 0,05$). Hier zeigte *per2* dasselbe Expressionsverhalten, wie das PER2::LUC-Fusionsprotein. Nach der Behandlung mit 1 μM Rotenon zeigte sich innerhalb der Behandlungs-Gruppen ein signifikanter Anstieg des Expressionslevels des *per2*, hier um 132 Prozentpunkte, zwischen den zwei Zeitpunkten 0 Std und 12 Std ($p\text{-Wert} \leq 0,05$).

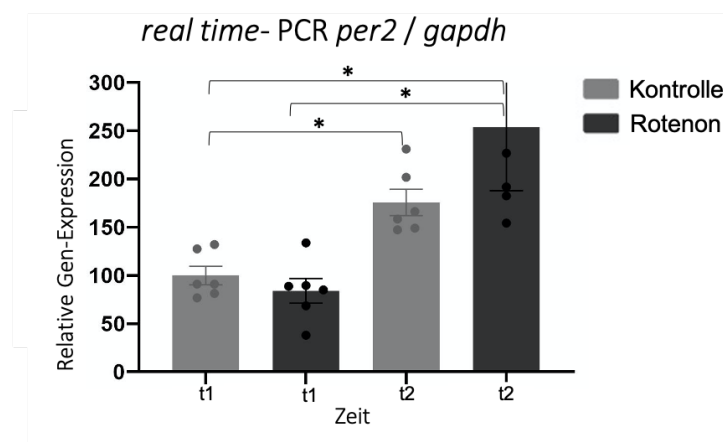


Abb. 3: Analyse der *real time* PCR des *per2* als interne Kontrolle. Es wurden zwei unabhängige Versuche mit einer Astrozyten-Zellkultur aus insgesamt 19 Mäuse-Kortizes durchgeführt. Die relative Expression wurde normiert auf die Kontrolle zum Zeitpunkt t1. Die Gruppen wurden mittels Wilcoxon-Test für verbundene Gruppen verglichen. Signifikanz (*) ist definiert als ein $p\text{-Wert} \leq 0,05$

3.3 Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf den mitochondrialen Metabolismus

3.3.1 Analyse der mitochondrialen Gene *nd1*, *fis1* und *mfn2*

Um die Hypothesen zu überprüfen, dass die Expression von Genen, die die Fusion und Fission von Mitochondrien regulieren, einer zirkadianen Rhythmik unterliegen und/ oder durch Rotenon-verursachten oxidativem Stress beeinflusst wird, wurden die Gene Mfn2, Fis1 und ND1 mittels *real time* PCR untersucht. Der zirkadiane Rhythmus der Astrozytenkulturen wurde berücksichtigt, indem die Proben zu den Zeitpunkten der minimalen (t1) und maximalen (t2) Per2::LUC-Expression gewonnen wurden (siehe Abschnitt 2.).

In der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression der entsprechenden Gene zwischen den beiden Zeitpunkten festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass es keinen zirkadianen Rhythmus der Expression der Fusions-und Fissions-Gene in Astrozytenkulturen gibt. Darüber hinaus konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den Rotenon-behandelten Gruppen festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass oxidativer Stress keinen Einfluss auf die Expression von Fusions-und Fissionsgenen hat.

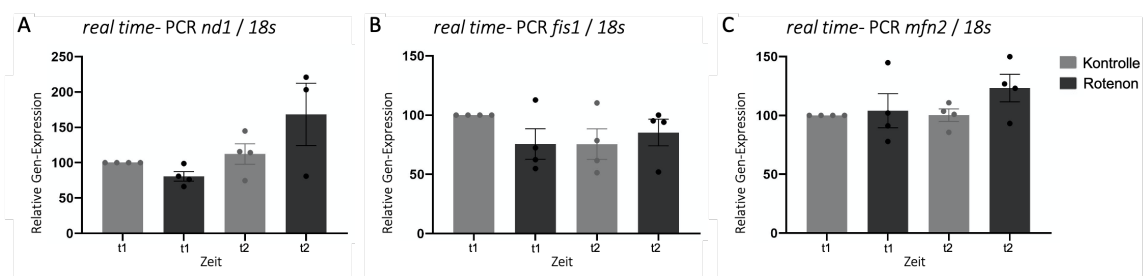


Abb. 3: Analyse der mitochondrialen Fusions-und Fissions-Gene
Die jeweilige Expression von **A** *nd1*, **B** *fis1* und **C** *mfn2* wurde relativ zum Haushalts-Gen *18s* ermittelt. Es wurden 4 unabhängige Versuche mit einer Astrozyten-Zellkultur aus 19 Mäuse-Kortizes durchgeführt. Die relative Expression wurde normiert auf die Kontrolle zum Zeitpunkt t1. Die Gruppen wurden mittels Wilcoxon-Test für verbundene Gruppen verglichen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

3.4 Einfluss von oxidativem Stress auf die Superoxid-Dismutasen

3.4.1 Superoxid-Dismutasen-Gen Analyse

Um die Hypothesen zu überprüfen, ob die Expression der Gene der Superoxid-Dismutasen *sod1* und *sod2* in Astrozyten einer zirkadianen Rhythmik unterliegen sowie ob diese durch Rotenon-verursachten oxidativem Stress beeinflusst wird, wurden *sod1* und *sod2* mittels *real time* PCR untersucht. Der zirkadiane Rhythmus der Astrozyten-Zellkulturen wurde berücksichtigt, indem die Proben zu den Zeitpunkten der minimalen (t1) und maximalen (t2) PER2::LUC Expression gewonnen wurden (siehe Abschnitt 2.).

Die *sod1* Expression, siehe Abb. 4 A zeigte in der Kontrollgruppe keinen Unterschied zwischen den Zeitpunkten t1 und t2. Das deutet darauf hin, dass es keinen zirkadianen Rhythmus der *sod1* Expression auf Gen-Ebene gibt. Allerdings gab es zum Zeitpunkt t2 in der Tendenz einen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Rotenon-behandelten Gruppe. Das deutet darauf hin, dass intrazellulärer oxidativer Stress eine gesteigerte *sod1* Expression in Abhängigkeit vom zirkadianen Rhythmus induzieren kann.

Für die *sod2* Expression, siehe Abb.4 B zeigte sich in der Kontrollgruppe kein Unterschied zwischen den Zeitpunkten t1 und t2. Das deutet darauf hin, dass es keinen zirkadianen Rhythmus der *sod2* Expression gibt. Durch die Behandlung mit Rotenon kam es zu den Zeitpunkten t1 und t2 in der Tendenz zu einem Abfall der Expression, es konnte allerdings keine Signifikanz dieser Entwicklung nachgewiesen werden. Dies deutet also darauf hin, dass intrazellulärer oxidativer Stress keinen Einfluss auf die *sod2*-Expression hat.

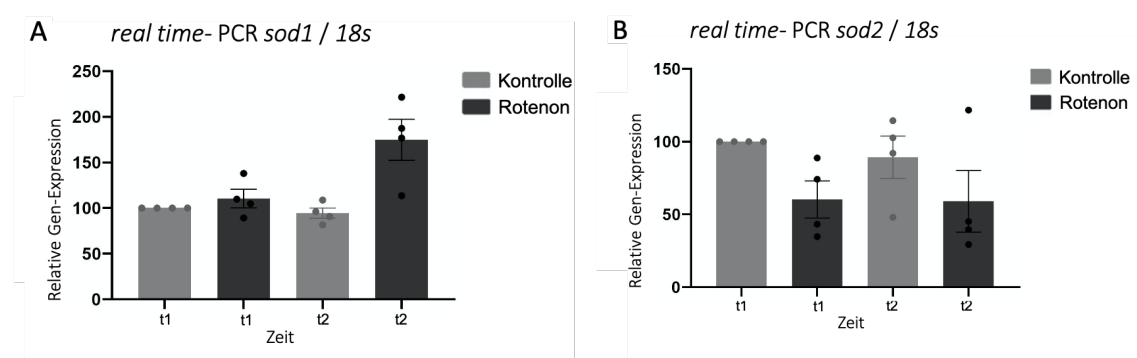


Abb. 4: Analyse der Gene der Superoxid-Dismutasen *sod1* und *sod2*. Die jeweilige Expression von **A** *sod1* und **B** *sod2* wurde relativ zum Haushalts-Gen 18s ermittelt. Es wurden 4 unabhängige Versuche mit einer Astrozyten-Zellkultur aus insgesamt 19 Mäuse-Kortizes durchgeführt. Die Gruppen wurden mittels Wilcoxon-Test für verbundene Gruppen verglichen.

3.4.2 Superoxid-Dismutase Protein Analyse

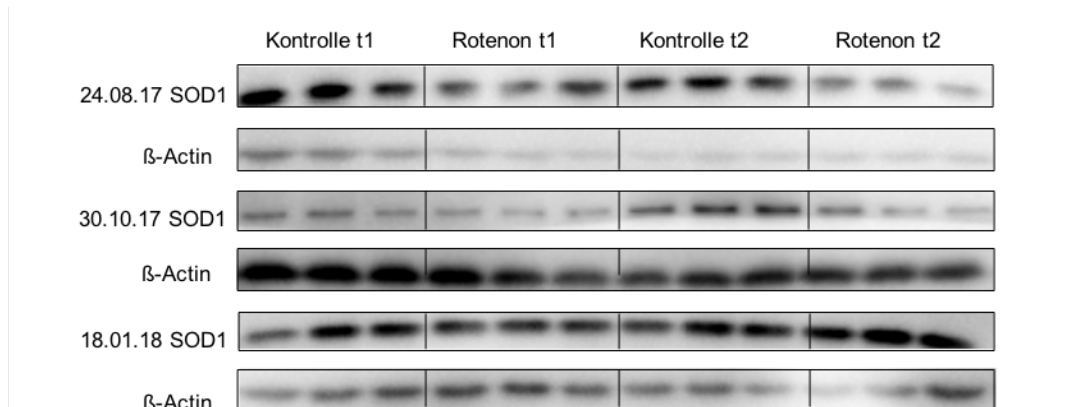
Nach der Gen-Analyse der SOD in Abschnitt 3.4.1., wurde nun die Expression der SOD betrachtet. Hierfür wurden Western-Blot Analysen angefertigt. Es wurden wieder die zwei Behandlungszeiträume t1 (0 Std) und t2 (12 Std) verwendet und die Zellen geschlechtergetrennt gezüchtet. Da sich kein Unterschied in der Protein-Expression zwischen den Geschlechtern zeigte, wurden diese für die Auswertung zusammengefasst.

Um die Auswirkung von oxidativem Stress zu analysieren, wurden die Zellen mit 1 μ M Rotenon behandelt.

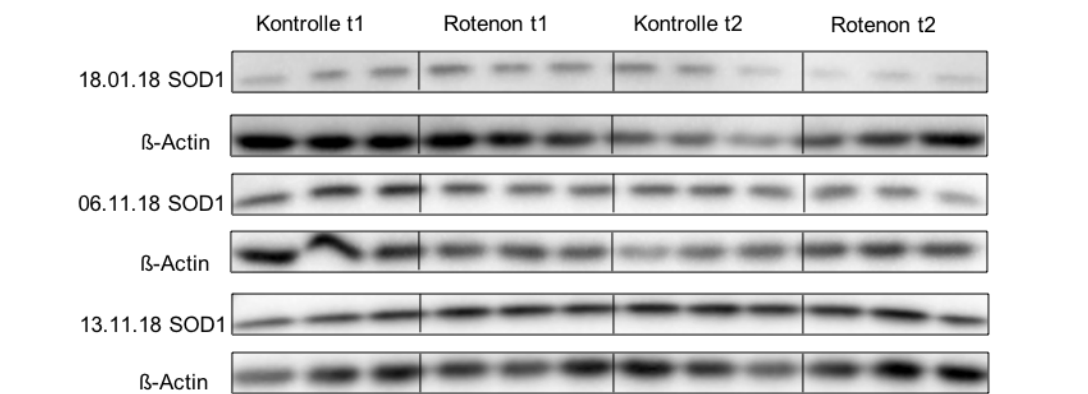
SOD1, siehe Abb. 5, zeigt einen signifikanten Anstieg ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) der Protein-Expression zwischen den zwei Zeitpunkten t1 und t2. Durch die Behandlung mit 1 μ M Rotenon kam es in der Tendenz zu einem Anstieg der Expression zum Zeitpunkt t1, im Vergleich mit der Kontrolle. Zum Zeitpunkt t2, zeigte sich dagegen eine signifikant niedrigere Protein-Expression ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) in der mit 1 μ M Rotenon behandelten Gruppe, im Vergleich zur Kontrolle.

SOD2 siehe Abb. 6, zeigt auch einen signifikanten Anstieg ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) der Protein-Expression zwischen den zwei Zeitpunkten t1 und t2. Einen Einfluss der 1 μ M Rotenon-Behandlung innerhalb eines Zeitpunktes konnte hier nicht gezeigt werden. Doch kam es zu einem signifikanten Anstieg ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) der Protein-Expression von der 1 μ M Rotenon behandelten Gruppe zum Zeitpunkt t2 im Vergleich zur Kontrolle zum Zeitpunkt t1.

Western-Blot Superoxid-Dismutase 1 (SOD1)



Quantitative Darstellung der SOD1-Expression, Western-Blot, männliche Tiere



Quantitative Darstellung der SOD1-Expression, Western-Blot, weibliche Tiere

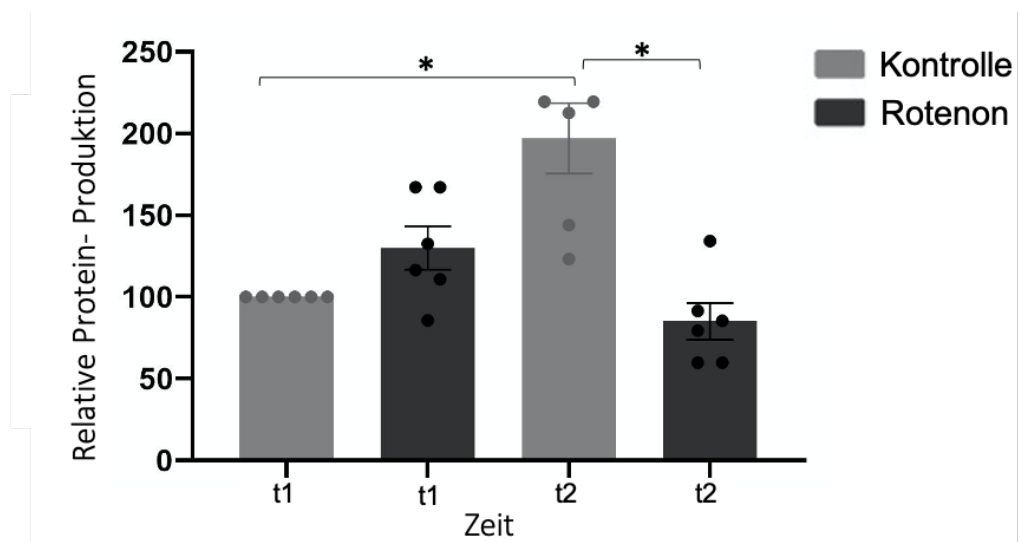
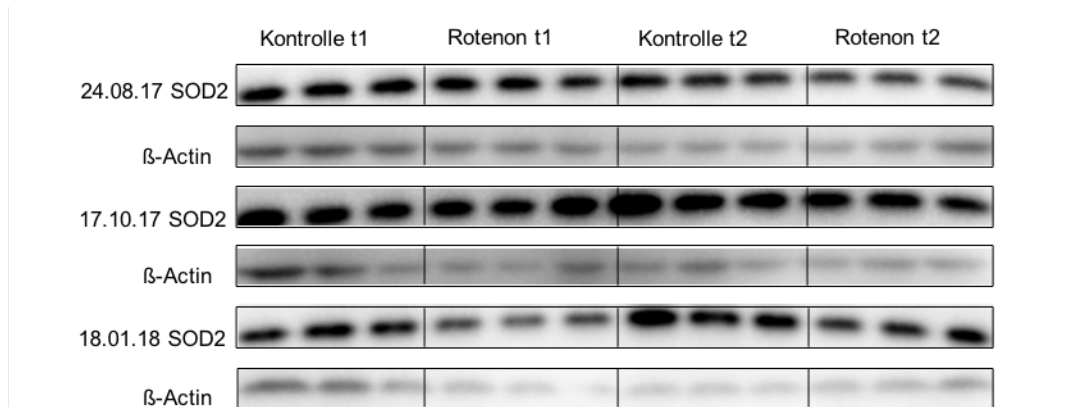
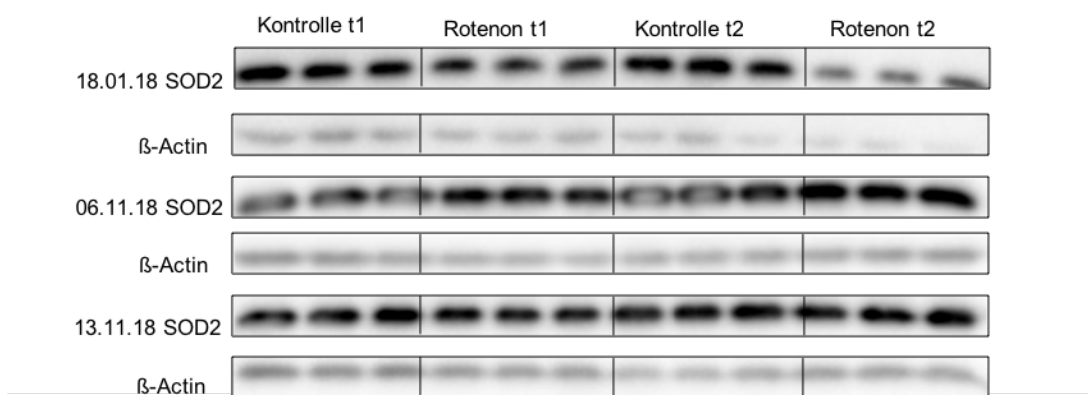


Abb. 5: Analyse des Proteins der Superoxid-Dismutase SOD 1. Die Expression wurde auf das Protein-Level von β -AKTIN normiert. Es wurden 6 unabhängige Versuche durchgeführt mit einer Astrozyten-Zellkultur aus insgesamt 24 Mäuse-Kortizes. Die relative Expression wurde normiert auf die Kontrolle zum Zeitpunkt t1. Die Gruppen wurden mittels Wilcoxon-Test für verbundene Gruppen verglichen. Signifikanz (*) ist definiert als ein p-Wert $\leq 0,05$.

Western-Blot Superoxid-Dismutase 2 (SOD2)



Quantitative Darstellung der SOD2-Expression, Western-Blot, männliche Tiere



Quantitative Darstellung der SOD2-Expression, Western-Blot, weibliche Tiere

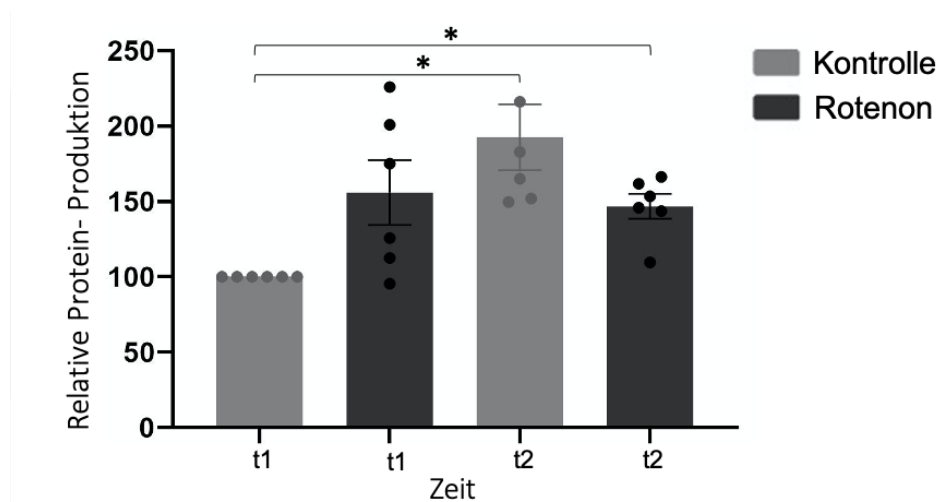


Abb. 6: Analyse des Proteins der Superoxid-Dismutase SOD 2. Die Expression wurde auf das Protein-Level von β -AKTIN normiert. Es wurden 6 unabhängige Versuche durchgeführt mit einer Astrozyten-Zellkultur aus insgesamt 24 Mäuse-Kortizes. Die relative Expression wurde normiert auf die Kontrolle zum Zeitpunkt t1. Die Gruppen wurden mittels Wilcoxon-Test für verbundene Gruppen verglichen. Signifikanz (*) ist definiert als ein p-Wert $\leq 0,05$.

4 Diskussion

Neurodegenerative Erkrankungen, wie der Morbus Alzheimer, oder die Amyotrophe Lateralsklerose, können zu schwerwiegenden Einschränkungen der kognitiven, sensorischen und motorischen Funktionen des Menschen führen und sind bis heute kaum therapeutisch beeinflussbar. Neue Erkenntnisse zeigen, dass Astrozyten an Ursprung und Folgen von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind (Phatnani and Maniatis, 2015).

Ein ätiopathologischer Faktor neurodegenerativer Erkrankungen ist oxidativer Stress (Cassina et al., 2008, Simonian and Coyle, 1996). Symptomatisch können neurodegenerativen Erkrankung im frühen Stadium zu Schlafstörungen und Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus führen (Videnovic et al., 2014).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der zirkadianen Rhythmik und dem Einfluss von oxidativem Stress auf den Metabolismus von Astrozyten; insbesondere mit den Auswirkungen auf die molekulare Uhr, die Mitochondrien und die Superoxid-Dismutasen. Dass der Metabolismus von Astrozyten einer zirkadianen Rhythmik unterliegt, ist bereits bekannt (Prolo et al., 2005). Doch ob die rhythmische Expression des Uhren-Gens *per2* durch oxidativen Stress beeinflusst wird, ist bis *dato* ungeklärt. Darum wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des PER2::LUC-Fusionsproteins an transgenen Mäusen unter dem Einfluss von Rotenon untersucht und gezeigt, dass oxidativer Stress dämpfend auf die PER2::LUC-Expressionsamplitude wirkt. So wurde demonstriert, dass die zirkadiane Rhythmik von Astrozyten durch oxidativen Stress beeinflussbar ist.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss diese Faktoren auf den Metabolismus der Astrozyten haben, wurden die Mitochondrien betrachtet. Mitochondrien sind ein entscheidendes Organell im Metabolismus der Zelle und ihre Funktionalität wird maßgeblich durch ihre Dynamik beeinflusst (McBride et al., 2006, Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Inwieweit die Gene der mitochondrialen Dynamik *mfn2* und *fis1*, sowie das mitochondriale Gen *nd1* in Astrozyten zirkadian exprimiert werden und ob diese Expression durch oxidativen Stress beeinflusst wird, war bislang noch nicht bekannt. Darum wurde in der vorliegenden Arbeit mittels qPCR die Expression dieser Gene bestimmt. Es konnte nicht bestätigt werden, dass die Expression dieser Gene von der *per2*-Expression oder oxidativem Stress abhängt.

In der Abwehr von oxidativem Stress spielen die antioxidativen Enzyme eine wichtige Rolle (Sies and Cadenas, 1985). Ein wichtiger Vertreter sind die Superoxid-Dismutasen (Fridovich, 1975). Defekte dieser Enzyme sind mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (Rosen et al., 1993). Ob diese Enzyme in Astrozyten zirkadian exprimiert werden und ob die zirkadiane Rhythmik durch oxidativen Stress beeinflusst wird, ist noch nicht bekannt. So kann die vorliegende Arbeit in qPCR- und Western-Blot-Analysen nachweisen,

dass die SOD1 und die SOD2 zirkadian exprimiert werden. Die zirkadiane Expression der SOD1 wurde durch oxidativen Stress gedämpft, während die Expression der SOD2 unabhängig von oxidativem Stress erfolgt.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit ermöglichen ein besseres Verständnis des Zusammenhangs von Astrozyten, oxidativem Stress und zirkadianer Rhythmik. Aus diesem Zusammenhang lassen sich neue Hypothesen ableiten, um so in weiteren Versuchen ein differenzierteres Wissen über neurodegenerativen Erkrankungen zu erlangen.

4.1 Erzeugung von oxidativem Stress durch Rotenon

Die Erzeugung von ROS durch Rotenon in der primären Astrozyten-Zellkultur wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Behandlung mit Rotenon (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für 24 Std mittels ROS-Assay (Georgiou et al., 2008) untersucht (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Es wurde eine niedrige Rotenon-Konzentration von 1 μ M gewählt und über einen längeren Zeitraum appliziert, um ROS zu induzieren, ohne einen Zelltod auszulösen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Mikroskop überprüft.

Durch die Behandlung kam es zu einem signifikanten Anstieg der ROS-Konzentration, sowohl bei den weiblichen, als auch bei den männlichen Astrozyten (p -Wert $\geq 0,5$).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden der aktuellen Literatur. Swarnkar et al. behandelten eine Astrozyten-ähnliche Zell-Linie aus Ratten mit verschiedenen Konzentrationen von Rotenon für 4 Std und induzierten so ab 1 μ M Rotenon signifikant erhöhte ROS-Level im Vergleich zur Kontrolle (Swarnkar et al., 2012). Dies bestätigt für diese Zelllinie eine Korrelation von ROS und Rotenon. Deheshi et al untersuchten, äquivalent zu der vorliegenden Arbeit, primäre Astrozyten und verwendeten hierfür hochdosiertes Rotenon von 25 μ M für eine kurze Zeit von 10 min. Sie induzierten so signifikant-hohen ROS-Stress (Deheshi et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von Rotenon auf den Metabolismus untersucht werden, sodass eine niedrigere Konzentration gewählt wurde, damit es zu einem Überleben der Zellen über einen längeren Zeitraum kommt. Die Langzeitauswirkung von Rotenon auf Astrozyten untersuchten Radad et al. Sie verwendeten eine Behandlungszeit von 6 Tagen und eine Konzentration von 10 nM. Sie belegen, dass auch sehr niedrige Konzentrationen über einen längeren Zeitraum, einen Einfluss auf Astrozyten haben (Radad et al., 2008). In diesem Versuch wurde die Induktion von ROS durch 1 μ M Rotenon in diesem Modell belegt. Der ideale Behandlungszeitraum für die weiteren Versuche wurde in dem Luminometer-Versuch (siehe Abschnitt 4.2.1) ermittelt.

4.2 Einfluss der Faktoren Zeit und oxidativer Stress auf das molekulare Uhrwerk

Es ist bekannt, dass das molekulare Uhrwerk in Astrozyten eine wichtige Rolle spielt (Prolo et al., 2005). Noch nicht erforscht wurde, welchen Einfluss das Geschlecht und oxidativer Stress auf die PER2::LUC-Expression in Astrozyten haben. In dem folgenden Abschnitt wird die PER2::LUC-Expression von primären Astrozyten nach Geschlechtern differenziert diskutiert sowie der Einfluss von oxidativem Stress analysiert.

Folgende Erkenntnisse konnten erzielt werden:

- (I) Bestätigung der Erkenntnis von Prolo et al., dass Astrozyten PER2::LUC rhythmisch exprimieren (Prolo et al., 2005).
- (II) Es gibt kein Geschlechterunterschied in der PER2::LUC-Expression von murinen Astrozyten.
- (III) Oxidativer Stress beeinflusst die PER2::LUC-Expression von murinen Astrozyten.
- (IV) Es gibt keine Geschlechterunterschiede in der durch oxidativen Stress beeinflussten PER2::LUC-Expression in murinen Astrozyten.

Viele neurodegenerative Erkrankungen, wie M. Alzheimer gehen mit einem gestörten Tag-Nacht-Rhythmus einher (Loewenstein et al., 1982). Um ein breiteres Verständnis über diesen Zusammenhang zu erlangen, ist es interessant den Einfluss von oxidativen Stress, einem Auslöser von neurodegenerativen Erkrankungen (Simonian and Coyle, 1996), auf das molekulare Uhrwerk, in diesem Fall auf *per2*, zu untersuchen. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass oxidativer Stress einen Einfluss auf die PER2-Expression hat. Dies könnte Anstoß für weitere Forschung geben, um die Ätiologie von Störungen des Tag-Nach-Rhythmus bei neurodegenerativen Erkrankungen zu untersuchen.

4.2.1 PER2-Expression über 72 Std in der primären Astrozyten-Zellkultur

Die Expression von PER2 in der primären Astrozyten-Zellkultur wurde anhand von transgenen PER2::LUC-Mäusen untersucht. Es zeigte sich eine regelmäßige Schwankung der PER2::LUC-Expression, die über 72 Std aufrechterhalten werden konnte.

Die detektierte Periodenlänge betrug 24 Std, mit einem Lumineszenz-Minimum nach 20 Std, für folgende Versuche als t1 definiert sowie ein Maximum nach 32 Std, für folgende Versuche als t2 definiert (siehe Abschnitt 3.2.1).

Eine Rhythmik in der PER2::LUC-Expression beobachteten auch Prolo et al. welche 2005 als Erste die PER2::LUC-Expression von kortikalen Astrozyten-Zellkulturen untersuchten. Hier kam es zu einer Periodenlänge von ungefähr 22,4 Std. Ebenfalls detektierte Prolo et al. eine Abnahme der Amplitude über die Zeit, hier mit einem Verlust der Rhythmik nach 6 Tagen (Prolo et al., 2005). Äquivalent zu dem Versuch von Prolo et al. konnte in der

vorliegenden Arbeit, die Rhythmik der PER2::LUC-Expression reproduziert werden. Die zeitliche Differenz in der Aufrechterhaltung der Rhythmik könnte etwas mit den verwendeten Medien zu tun haben. Ein Medium-Wechsel führte zur Reaktivierung der Rhythmik (Yamazaki et al., 2000).

In Astrozyten des SCN ist eine Aufrechterhaltung des Rhythmus über weit mehr als 6 Tage nachzuweisen (Duhart et al., 2013). Dies bedeutet, dass die Aufrechterhaltung der Rhythmik abhängig von der Lokalisation der Astrozyten im ZNS ist. Korticale Astrozyten können einen Rhythmus selbstständig nur für eine kurze Zeit aufrechterhalten (Prolo et al., 2005). Auch in peripheren Geweben kommt es Schwankungen eines Period-Proteins. In diesem Fall konnten Yamazaki et al. nachweisen, dass PER1::LUC in verschiedenen peripheren Geweben von Ratten, wie Leber und Lunge, rhythmisch oszillierend ausgeschüttet wird. Sie maßen eine Periodenlänge von ungefähr 24 Std und eine Abnahme der Schwankung nach 6 Tagen, wobei diese durch einen Medium-Wechsel ebenfalls reaktiviert werden konnte (Yamazaki et al., 2000). Dies zeigt, dass die Uhren-Gene auch in transgenen Mäusen sowohl in zentralen als auch in peripheren Geweben oszillieren.

Somit bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Erkenntnisse der aktuellen Literatur, dass primäre kortikale Astrozyten PER2::LUC rhythmisch exprimieren und somit einer zirkadianen Rhythmik unterliegen.

Da die aktuelle Literatur darauf hindeutet, dass es Geschlechterunterschiede in der zirkadianen Rhythmik gibt (Nicolaidis and Chrousos, 2020), wurde diese Variable in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Es gibt strukturelle Unterschiede der SCN von männlichen und weiblichen Mäusen, sowohl auf neuronaler als auch auf astrozytärer Ebene (Guldner, 1983). Ob dieser Geschlechterunterschied in Astrozyten auch in der Expression des PER2::LUC-Fusionsproteins besteht, wurde bis *dato* noch nicht untersucht. In der vorliegenden Studie zeigte sich in den Luminometer-Analysen kein signifikanter Unterschied in der PER2::LUC-Expression zwischen männlichen und weiblichen Astrozyten.

Wu et al. untersuchten auf Gen-Ebene den Geschlechterunterschied der *per2*-Expression von SCN-Zellen. Die *per2*-Expression der männlichen Mäuse war signifikant niedriger als die *per2*-Expression der weiblichen Tiere (Wu et al., 2018). In dem Versuch der vorliegenden Arbeit mit kortikalen Astrozyten konnte zwar kein signifikanter Unterschied in der PER2-Expression detektiert werden, doch präsentierte sich in dem Versuch vom 30.03.17 in der Tendenz ebenfalls eine niedrigere Expression von PER2 der Männchen im Vergleich zu den Weibchen. Auf Protein-Ebene konnten im Gewebe des SCN keine Geschlechterunterschiede

in der PER2::LUC-Expression beobachtet werden (Kuljis et al., 2013). In Leber und Hypophyse lassen sich Geschlechterunterschiede in der PER2::LUC-Expression nachweisen. So zeigen Kuljis et al., dass es bei den Zellen der männlichen Mäuse zu einer signifikanten Phasenverschiebung der PER2::LUC-Expression nach vorne, im Vergleich zu den weiblichen Tieren (Kuljis et al., 2013) kam.

So scheint der Geschlechterunterschied gewebeabhängig zu sein.

Kloehn et al. befassen sich mit Geschlechterunterschieden in der PER2 Expression der Nebenniere. Für ihre Analysen verwendeten sie ebenfalls transgene PER2::LUC-Mäuse und belegten, dass es zu Schwankungen mit einer höheren Amplitude in den Zellen der männlichen Tiere kommt im Vergleich zu den weiblichen Tieren (Kloehn et al., 2016).

Wie in den Ergebnissen von Wu et al. und in dem Versuch der vorliegenden Arbeit vom 30.03.17, kam es bei den männlichen Tieren zu einer niedrigeren PER2::LUC-Expression. So scheint die Protein-Schwankung bei den männlichen Tieren weniger stark ausgeprägt zu sein als bei den Weibchen. Diese Beobachtung reproduzierte sich auch bei Untersuchungen an Menschen von Gomez-Abellan et al. Sie untersuchten 2012 die Geschlechterunterschiede von Uhren-Genen/ -Proteinen im Fettgewebe von Menschen. Sie belegten Geschlechterunterschiede von *per2* und PER2 und wiesen nach, dass die *per2*-Expression der Frauen signifikant höher ist als die der Männer (Gomez-Abellan et al., 2012). Es ist unklar, ob man von der Expressionsstärke von PER2 auf den Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf den Organismus schließen kann. Der weibliche Organismus ist, bedingt durch den monatlichen hormonellen Zyklus, insgesamt stärker zeitlich reguliert als der männliche. Ob und wie diese Geschlechterunterschiede auch auf Ebene des molekularen Uhrwerks bestehen sollte Inhalt weiterer Forschung sein. Wir konnten zeigen, dass es keine signifikanten Geschlechterunterschiede in der PER2::LUC-Expression von Astrozyten gibt.

4.2.2 Beeinflussung der PER2-Expression durch oxidativen Stress

Die Beeinflussung der PER2::LUC-Expression muriner Astrozyten durch oxidativen Stress wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Behandlung mit 1 μ M Rotenon untersucht. Es präsentierte sich eine Abnahme der Lumineszenz-Amplitude über den gesamten Kurvenverlauf. Zum Zeitpunkt der minimalen PER2::LUC-Expression (t1) kam es durch die Rotenon-Behandlung zu einer geringeren Abnahme der Fluoreszenz und zum Zeitpunkt der maximalen PER2::LUC-Expression (t2), zu einer geringeren Zunahme der Fluoreszenz. Dieser Versuch belegt, dass Rotenon einen Einfluss auf die Proteinbiosynthese von PER2 hat. Der Einfluss von ROS auf die PER2::LUC-Expression von murinen Astrozyten ist nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht untersucht. Der Zusammenhang von zirkadianer

Rhythmik und oxidativem Stress in Astrozyten ist für das Verständnis von neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung. In den letzten Jahren wurde die Rolle der Astrozyten im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen bekannt und die Beteiligung von oxidativem Stress an der Ätiologie erforscht.

In der aktuellen Literatur wurde der Einfluss von ROS auf die PER2-Expression in anderen Zellen als Astrozyten betrachtet: Yu Tahara et al. untersuchten 2016 an PER2::LUC-Mäuse-Fibroblasten die Beeinflussung der PER2-Rhythmik durch oxidativen Stress, induziert durch H₂O₂. Sie wiesen nach, dass oxidativer Stress in Fibroblasten zu einer Phasenverschiebung der PER2-Expression führt, wobei die Rhythmik der Expression aufrechterhalten werden konnte (Yu Tahara*, 2016). Dies belegt, dass ROS in anderen Geweben einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik haben. In der vorliegenden Arbeit führte die Induktion von ROS durch Rotenon in der primären Astrozyten-Zellkultur zu einer Abnahme der PER2::LUC-Amplitude, nicht aber zu einer Phasenverschiebung. Die Phasenverschiebung der Fibroblasten durch oxidativen Stress entspräche *in vivo* einer Verschiebung der tageszeitlichen Rhythmik, wie zum Beispiel bei einer Störung des Tag-Nacht-Rhythmus. Die gleichbleibenden Oszillationspunkte der Astrozyten mit einer Abflachung der Kurvenausschläge spiegelt eher eine Beeinflussung der Regulation des Metabolismus wider. Die direkte metabolische Kompetenz scheint nicht beeinflusst, da es zum Zeitpunkt t1 in der Rotenon-Gruppe zu einer höheren PER2::LUC-Expression kommt, als bei der Kontrolle. Zum Zeitpunkt t2 ist die Expression in der Rotenon-behandelten Gruppe niedriger. So scheint Rotenon keinen direkten Einfluss auf die metabolische Kompetenz zu haben, sondern die Regulation des Proteins zu beeinflussen. Dies könnte abstrakt für einen Organismus bedeuten, dass es zu einer geringeren Variation der Aktivität über den Tag kommt, also zu keinem Aktivitäts-Maximum und zu keiner ergiebigen Ruhe-Phase.

Auf neuronaler Ebene konnte in *in vivo*-Studien von SCN Schnittkulturen kein signifikanter Einfluss von ROS, induziert mittels *3-Nitropropionic* (3-NP), auf die PER2::LUC-Amplitude nachgewiesen werden. Bei einigen der behandelten Mäuse kam es in der Tendenz jedoch zu einer Abnahme der PER2::LUC-Amplitude sowie einer Phasenverschiebung (Kudo et al., 2014, Fu et al., 1995). Wie oben diskutiert ist die Rhythmik von SCN-Zellen stabiler, als die Rhythmik anderer Gewebe (Duhart et al., 2013). Auch unter dem Einfluss von ROS scheint die Rhythmik von SCN-Zellen stabiler zu sein, als die der, in dieser Arbeit untersuchten, kortikalen Astrozyten. Spannend ist, dass die von Kudo et al. nachgewiesene Tendenz (Kudo et al., 2014), durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit reproduziert wurden.

Dass es eine andere Einflussgröße auf die PER2-Rhythmik von Astrozyten gibt, belegten

Marpegan et al., die den Einfluss des Vasoaktiven intestinalen Polypeptids (VIP), das von Neuronen für die Kommunikation ausgeschüttet wird, untersuchten. Marpegan et al. wiesen nach, dass VIP zu einem *Reset* der Amplitude und der Phase des PER2::LUC-Rhythmus in Astrozyten führt (Marpegan et al., 2009). Diese Untersuchung demonstriert, dass ROS nicht die einzige Einflussgröße auf die PER2-Rhythmik darstellt. Da es in der vorliegenden Studie abgesehen von der Rotenon-Behandlung, keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Behandlungs-Gruppe gab, ist aber sichergestellt, dass die aufgezeigten Ergebnisse direkte Folgen der Rotenon-Behandlung sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass oxidativer Stress die Rhythmik von PER2 in Astrozyten beeinflusst. In weiteren Versuchen sollte der Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen untersucht werden, hierfür würden sich *in vivo* Studien im Maus-Modell anbieten.

In der Literatur finden sich wenige Untersuchungen zu den Geschlechterunterschieden von Zellen im Umgang mit oxidativem Stress. In der Harderschen Drüse, einer Tränen-Drüse des Syrischen Goldhamsters, sind Unterschiede in der Produktion von antioxidativen Enzymen zwischen Männchen und Weibchen als Reaktion auf ROS nachgewiesen (Coto-Montes et al., 2001). Um Astrozyten in diesem Kontext zu betrachten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Beeinflussung der PER2::LUC-Expression durch Rotenon auf ihren Geschlechterunterschied hin untersucht. Die PER2::LUC-Expression der Astrozyten zwischen den Geschlechtern verhielt sich unter Rotenon-Einfluss äquivalent. So konnten in der vorliegenden Studie, keine Geschlechterunterschiede in der Reaktion auf ROS in Astrozyten nachgewiesen werden.

4.2.3 Real time PCR *per2*

Nach der Diskussion der Protein-Expression von PER2 (diskutiert in 4.2.1 und 4.2.2.) ist es spannend diese Erkenntnisse mit der Gen-Expression von *per2* zu vergleichen. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit eine *real time* PCR der *per2*-Expression zu den Zeitpunkten t1 und t2 durchgeführt und ebenfalls die Beeinflussung der Expression durch Rotenon betrachtet. Äquivalent zur PER2-Expression auf Protein-Ebene kam es zu einer signifikanten Zunahme der *per2*-Expression auf Gen-Ebene vom Zeitpunkt t1 zum Zeitpunkt t2 ($p\text{-Wert} \geq 0,5$). Zum Zeitpunkt t1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied der *per2*-Expression zwischen der Rotenon-behandelten Gruppe verglichen mit der Kontrolle. Äquivalent zur Kontrolle kam es zum Zeitpunkt t2 zu einem signifikanten Anstieg der *per2*-Expression verglichen mit dem Zeitpunkt t1 ($p\text{-Wert} \geq 0,5$). Diese Ergebnisse reproduzieren

auf Gen-Ebene die Beobachtungen der Versuche der vorliegenden Arbeit aus 4.3.2.1 und 4.3.2.2 auf Protein-Ebene. Dies bedeutet, dass die quantitative Regulation des PER2-Proteins auf Gen-Ebene stattfindet.

Was könnten die detektierten Ausschläge der PER2-Oszillation bedeuten? Hastings et al. beschreiben den Start der *per2*-Expression als Beginn des zirkadianen Tages. Über den Tag kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von PER2. Zum Zeitpunkt des PER2-Maximums kommt es zu einer Aktivierung der negativen Rückkopplungsschleife und zu einer Inhibition der Expression von *per2*. Der Beginn der relativen PER2-Expressionsabnahme markiert den Start der zirkadianen Nacht (Hastings et al., 2007). Der in der vorliegenden Studie gewählte Zeitpunkt t1 zum Expressionsminimum von PER2::LUC markiert also den Beginn des zirkadianen Tages. Der Zeitpunkt t2 zum Expressionsmaximum von PER2::LUC beschreibt entsprechend den Beginn der zirkadianen Nacht.

4.3 Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf die mitochondrialen Gene *nd1*, *mfn2* und *fis1*

Die Funktion der Mitochondrien wird maßgeblich reguliert durch ihre Dynamik in Form von Fusion und Fission (Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Die mitochondriale Funktion ist essenziell für einen gesunden Zellmetabolismus und eine Fehlfunktion führt zu diversen Erkrankungen (Liesa et al., 2009). Das Verständnis der Regulation und Beeinflussung des mitochondrialen Metabolismus kann einen Beitrag zum Verständnis mitochondrialer Erkrankungen leisten. Die vorliegende Arbeit kann folgende Erkenntnisse zum Grundverständnis der mitochondrialen Dynamik in Astrozyten beitragen:

- (I) Die Gene der Fusions- und Fissions-Maschinerie *mfn2* und *fis1* werden in Astrozyten nicht in derselben Rhythmik wie das Uhren-Gen *per2* exprimiert.
- (II) Die Expression von *mfn2* und *fis1* wird in Astrozyten nicht durch oxidativen Stress beeinflusst.

Die Atmungskette ist ein essenzieller Bestandteil des mitochondrialen Metabolismus. Das Gen *nd1* kodiert für ein Gen, welches am Aufbau des Komplex I der Atmungskette beteiligt ist (Earley et al., 1987). Folgende Erkenntnisse bezüglich *nd1* können aus der vorliegenden Studie gezogen werden:

- (III) Das mitochondriale Gen *nd1* unterliegt in Astrozyten nicht derselben Rhythmik wie das Uhren-Gen *per2*
- (IV) Die Expression von *nd1* wird in Astrozyten nicht durch oxidativen Stress beeinflusst.

4.3.1 Einfluss auf Gene der Fusions- und Fissions-Maschinerie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Gene der Fusions- und Fissions-Maschinerie *mfn2* und *fis1* zu den zwei Zeitpunkten t1 und t2 untersucht. Die Messung der Expression erfolgte an Genen aus primären Astrozyten-Zellkulturen mittels quantitativer *real time* PCR. Es zeigte sich keine signifikanten Änderungen der Expression zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 und auch keine signifikante Änderung der Expression durch die Behandlung mit Rotenon.

In Astrozyten wurde die Expression von Genen der Fusions- und Fissions-Maschinerie in Abhängigkeit von der Zeit *bis dato* noch nicht untersucht, doch in anderen Geweben ist eine zeitliche Regulation von Genen der Fusions- und Fissions-Maschinerie bekannt.

In Hepatozyten wird *fis1* in Abhängigkeit von *bmal1* reguliert (Jacobi et al., 2015). *Bmal1*, ist wie *per2* ein Teil der molekularen Uhr (Bunger et al., 2000). Dies bringt die Regulation von *fis1* in Hepatozyten in Zusammenhang mit der molekularen Uhr. In Kardiomyozyten von homozygoten *bmal1 knock-out* Mäusen ist eine Änderung des Expressionsmusters von *fis1* und *mfn2* bekannt. So führt die Deletion des Uhren-Gens *bmal1* in Kardiomyozyten zu einer Runterregulation der *mfn2*-Expression und einer Hochregulation der *fis1*-Expression (Kohsaka et al., 2014). Dies demonstriert, dass in Kardiomyozyten die Fusions- und Fissions-Gene in Abhängigkeit von Genen der molekularen Uhr exprimiert werden.

Anders als in der vorliegenden Studie wurde in den Hepatozyten und Kardiomyozyten die Auswirkung der Deletion eines Uhren-Gens, *bmal1*, betrachtet. Es wurde belegt, dass in diesen Zellen die Expression der Gene der Fusion- und Fissions-Maschinerie von einem Uhren-Gen abhängt. Es wurde nicht untersucht, ob dies als Konsequenz eine rhythmische Expression des Gens zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressions-Muster von *fis1* in Abhängigkeit von dem Uhren-Gen *per2* untersucht und keine Schwankung in der Expression nachgewiesen. Trotzdem müssen sich die Ergebnisse nicht mit den Ergebnissen aus Hepato- und Kardiomyozyten widersprechen. Es kann sein, dass auch die Gene der Astrozyten in Abhängigkeit von *bmal1* produziert werden. Was jedoch gezeigt werden konnte ist, dass diese Expression nicht in einer zirkadianen Schwankung der *fis1*- und *mfn2*-mRNA äquivalent zur *per2*-Expression resultiert. Eine Phasenverschiebung der *fis1*- und/oder *mfn2*-Expression im Verhältnis zur *per2*-Expression, könnte eine vorhandene Expression maskieren und wäre im vorliegenden Versuch nicht nachweisbar.

Um ein breiteres Verständnis der Regulation der Fusions- und Fissions-Maschinerie in Astrozyten zu erlangen, wäre es interessant die Expression von *mfn2* und *fis1* in *bmal1 knock-out* Astrozyten zu betrachten.

Für einige Gewebe ist in der Literatur bereits ein Einfluss von oxidativem Stress auf die mitochondriale Dynamik beschrieben: Arnold et al. behandelten Neurone aus Ratten-Kortizes über einen langen Zeitraum von mehreren Wochen mit Rotenon. Sie detektierten mikroskopisch initial eine gesteigerte Mitochondrien-Länge im Vergleich zur Kontrolle und im Verlauf eine gesteigerte Anzahl an Mitochondrien (Arnold et al., 2011). Dies lässt vermuten, dass es initial zu einer Steigerung der Fusion und im Verlauf der Rotenon-Behandlung zu einer Induktion der Fission kommt. Auf Gen-Ebene wäre so initial eine Steigerung der *mfn2*- und im Verlauf eine Steigerung der *fis1*-Expression zu erwarten.

In epithelialen CV-1 und HeLa Zellen führt ROS, induziert durch Piericidin, zu einer gesteigerten Anzahl an Mitochondrien und einer Induktion der Fission. Die Fission wurde anhand von Fluoreszenzmikroskopischen Bildern, welche mit einer mitochondrialen Färbung *Mito Tracer Green*, gefärbt wurden, detektiert.

Arnold et al. und Pletjushkina et al. detektieren einen Einfluss von ROS auf die phänotypische Dynamik der Mitochondrien und interpretieren diesen als ein Einfluss auf die Fusion und Fission. Es darf aber nicht von der phänotypischen Anzahl der Mitochondrien auf die Regulation der Fusion und Fission geschlossen werden, wie Dehesi et al. zeigen. Sie untersuchten ebenfalls den Einfluss von ROS auf die Fusion und Fission in Astrozyten (aus Ratten-Kortizes). Die Beurteilung von Fusion und Fission erfolgte, wie in anderen Arbeiten (Pletjushkina et al., 2006, Arnold et al., 2011), zum einen durch mikroskopische Ausmessung der mitochondrialen Länge sowie der Anzahl der Mitochondrien. Lange Mitochondrien sprächen für eine gesteigerte Fusion und eine hohe Anzahl für eine gesteigerte Fission. Dieses Verfahren ist jedoch sehr ungenau, da lange Mitochondrien sowohl durch gesteigerte Fusion als auch verminderte Fission entstehen kann, und andersrum. Dehesi et al. detektierten zusätzlich Fluoreszenz-Intensitäten der Mitochondrien-Membran und belegten, dass es durch ROS zu einer erhöhten Fluoreszenz-Intensität kommt (Dehesi et al., 2015). Dies bedeutet, dass es durch ROS nicht zu einer Induktion der Fission kommt, wie vorherige Arbeiten es beschreiben (Pletjushkina et al., 2006, Arnold et al., 2011), sondern dass es zu einer Kondensation der Mitochondrien, also einer Änderung ihrer Morphologie kommt, nicht aber zu einer gesteigerten Fission (Dehesi et al., 2015). Die Hypothese von Dehesi et al. passt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, da es durch ROS nicht zu einer Beeinflussung der Gerne der Fusions- und Fissions-Maschinerie kommt.

4.3.2 Einfluss auf *nd1*

Um den Metabolismus von Astrozyten zu verstehen, ist es interessant zu untersuchen, ob das mitochondriale Gen *nd1*, welches für den Komplex I der Atmungskette kodiert (Earley et al., 1987), in seiner Expression zirkadian reguliert ist und ob diese Expression durch oxidativen Stress beeinflusst wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des mitochondrialen Gens *nd1* zu den zwei Zeitpunkten t1 und t2 untersucht. Des Weiteren wurde die Beeinflussung dieser Expression durch oxidativen Stress betrachtet. Die Messung der Expression erfolgte an Genen aus primären Astrozyten-Zellkulturen mittels quantitativer *real time* PCR. Es präsentierten sich keine signifikanten Änderungen der Expression zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 und auch keine signifikante Änderung der Expression durch die Behandlung mit Rotenon.

Simon et al. untersuchten die oxidative Phosphorylierung isolierter Mitochondrien aus Ratten-Kortizes, gemessen am Sauerstoffverbrauch und demonstrierten, dass es hier zu einer Variation über den Tag kommt. Zudem führen sie auf, dass die zeitabhängige oxidative Phosphorylierung durch Rotenon inhibiert wird (Simon et al., 2003). Auf Gen-Ebene kommt es in Hepatozyten junger Mäuse zu einer Regulation der *nd1*-mRNA (*messenger* RNA) über die Zeit (Gong et al., 2015). Im humanen Skelettmuskel dagegen kommt es nicht zu einer Änderung der *nd1*-Expression in Abhängigkeit von der Zeit (van Moorsel et al., 2016).

Wie sich die zirkadiane Rhythmik und oxidativer Stress auf die *nd1*-Expression in Astrozyten auswirkt, wurde bis *dato* nicht untersucht. Da es im ZNS zu einer Änderung der Aktivität der Atmungskette über die Zeit kommt (Simon et al., 2003), wäre es möglich, dass die Regulation dieser Variation auf Gen-Ebene stattfindet und es darum zu einer Schwankung der *nd1*-Expression zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Variation in der *nd1*-Expression zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 belegt werden. Dies könnte daran liegen, dass die Zeitpunkte t1 und t2 in Abhängigkeit von der PER2-Expression gewählt wurden, wenn *nd1* mit einer Phasenverschiebung zu der PER2-Expression schwankt, ließe sich dies in diesem Modell nicht nachweisen. Außerdem wäre es möglich, dass die Regulation der Atmungskette nicht auf Gen-Ebene, sondern durch posttranslationelle Modifikation stattfindet. Zudem untersuchten Simon et al. in ihren Versuchen Ratten-Kortizes und nicht isolierte Astrozyten. Es ist also auch möglich, dass es zentral ausschließlich in Neuronen zu einer zirkadianen Rhythmik der Atmungskette kommt.

Um die Regulation der Atmungskette in Abhängigkeit von der Zeit in Astrozyten ausführlicher zu untersuchen, würde es sich anbieten die *NDI*-Expression zu untersuchen. Dies würde nachweisen, ob es eine Diskrepanz zwischen Gen- und Protein-Ebene in

Astrozyten gibt. Zudem wäre es interessant weitere Gene der Atmungskette in Astrozyten auf ihre zirkadiane Rhythmik und deren Beeinflussung durch oxidativen Stress hin zu untersuchen. Neurodegenerative Erkrankungen sind in ihrer Ätiologie mit einer Pathologie der Astrozyten assoziiert (Maragakis and Rothstein, 2006, Tacconi, 1998) und die Atmungskette ist ein essenzieller Bestandteil des Zellmetabolismus. Das Verständnis ob die Atmungskette in Astrozyten zirkadian reguliert ist, hilft uns deren Metabolismus besser zu verstehen. Wenn diese Rhythmik durch oxidativen Stress beeinflussbar ist, so könnte dies einen Teil der pathologischen Wirkung von ROS bei neurodegenerativen Erkrankungen erklären.

4.4 Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf die antioxidativen Superoxid-Dismutasen

Bei den Superoxid-Dismutasen handelt es sich um antioxidative Enzyme, welche eine wichtige Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress spielen (Fridovich, 1975).

Mutationen in *sod1* sind mit der familiären Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), einer fatalen neurodegenerativen Erkrankung assoziiert. Bis *dato* ist wenig über die Pathogenese dieser Erkrankung und ihre Therapie bekannt, sodass Grundlagenforschung zur zytoplasmatischen SOD1 essenziell zum Verständnis der ALS ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass

- (I) SOD1 einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.
 - (II) es durch oxidativen Stress es zu einer relativen Abnahme der SOD1-Expression zum Zeitpunkt t2 kommt.
 - (III) die Regulation von *sod1* nicht auf Gen-Ebene stattfindet.
- Die vorliegende Arbeit konnte erhärten, dass es Unterschiede in der Regulation der SOD1 und SOD2 in Astrozyten gibt. Die Versuche der vorliegenden Arbeit belegen, dass
- (IV) SOD2 einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.
 - (V) Oxidativer Stress die zirkadiane Rhythmik von SOD2 **nicht** beeinflusst.
 - (VI) Die Regulation von *sod2* findet nicht auf Gen-Ebene stattfindet.

4.4.1 Einfluss von zirkadianer Rhythmik auf SOD1

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf die Superoxid-Dismutase 1 sowohl auf Gen-Ebene als auch auf Protein-Ebene untersucht. Hierzu wurde die relative *sod1*/SOD1-Expression primärer Astrozyten zu den zwei Zeitpunkten t1 und t2 untersucht. Die Messung erfolgte mittels quantitativer *real time* PCR und mittels Western-Blot.

Es zeigte sich auf Gen-Ebene keine signifikante Änderung der *sod1*-Expression zwischen den Zeitpunkten t1 und t2. Auf Protein-Ebene ließ sich dagegen ein signifikanter (p-Wert $\leq 0,05$) Unterschied zwischen t1 und t2 darstellen.

In der vorliegenden Studie konnte also eine signifikante Änderung der relativen SOD1-Expression, äquivalent zu der in 3.2.1 beschriebenen Schwankung des PER2::LUC-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Wie PER2, unterliegt also auch das Protein SOD1 einer zirkadianen Rhythmik. Anders als bei dem Gen *per2*, lässt sich diese Rhythmik bei *sod1* nicht auf Gen-Ebene reproduzieren. So könnten unterschiedliche Regulationsmechanismen für diese Schwankungen verantwortlich sein.

Interessanterweise finden sich in der Literatur ebenfalls Hinweise für eine Diskrepanz von Gen- und Protein-Ebene der *sod1*/SOD1 im Kortex. Die zirkadiane Rhythmik von SOD1/*sod1* in isolierten Astrozyten wurden bis *dato* noch nicht differenziert untersucht.

Äquivalent zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten Martin et al. im Kortex von Ratten keinen signifikanten Unterschied der *sod1*-Expression über den Tag messen (Martin et al., 2003). Im Intestinum und im Zerebellum kam es dagegen über den Tag zu signifikanten Unterschieden der *sod1*-Expression (Martin et al., 2003). So scheint zirkadiane Rhythmik der *sod1*-Expression vom Gewebe abhängig zu sein. Zu beachten ist, dass Martin et al. sämtliche Zellen des Kortex untersuchten, während in der vorliegenden Arbeit Astrozyten isoliert betrachtet wurden.

Auf Protein-Ebene wiesen Diaz-Munoz et al., äquivalent zu den Western-Blot Analysen der vorliegenden Arbeit, in Ratten Kortizes eine Schwankung der SOD Enzym-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit nach (Diaz-Munoz et al., 1985). In der funktionellen Analyse von Diaz-Munoz et al. wird nicht zwischen SOD1 und SOD2 unterschieden. Sie wiesen eine verminderte Enzym-Aktivität in der Licht-Phase (8:00-16:00) und eine verstärkte Enzym-Aktivität in der Dunkel-Phase (20.00-6:00) nach (Diaz-Munoz et al., 1985). Wenn man, wie in 4.1.2 diskutiert, den Zeitpunkt t1 als Beginn des zirkadianen Tages ansieht und t2 als Beginn der zirkadianen Nacht, stimmen die Western-Blot Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Beobachtungen von Diaz-Munoz et al. überein. Zum Zeitpunkt t1, äquivalent zur Licht-Phase, ist die SOD-Expression niedriger als zum Zeitpunkt t2, äquivalent zur Dunkel-Phase von Diaz-Munoz et al. Zu berücksichtigen ist, dass Diaz-Munoz et al. die Aktivität beider SOD in sämtliche Zellen des Kortex und nicht isoliert in Astrozyten untersuchten.

Wie die Gen-Expression, ist auch die SOD-Aktivität gewebeabhängig. Im murinen Lebergewebe, zeigt sich eine zirkadiane Aktivität der Superoxid-Dismutasen (Hodoglugil et

al., 1995), wohingegen es in Ratten-Kardiomyozyten nicht zu tageszeitlichen SOD-Aktivitäts-Schwankungen kommt (Lapenna et al., 1992).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene zirkadiane Rhythmik der SOD1 in Astrozyten, könnte mit ihrer Funktion zum Schutz der Neurone vor oxidativem Stress zusammen hängen (Makar et al., 1994). Eine rhythmische Expression des antioxidativen Enzyms SOD1 könnte für die Astrozyten relevant sein, um rhythmisch anfallende ROS abzuwehren (Hardeland et al., 2003).

In der Zusammenschau der Ergebnisse präsentiert sich eine Diskrepanz der SOD1-Konzentration auf Gen- und Protein-Ebene. Auf Gen-Ebene kommt es über die Zeit zu einer konstanten Expression von *sod1*. Auf Protein-Ebene ist die Expression zum Zeitpunkt t2 doppelt so hoch wie zum Zeitpunkt t1. Wie lässt sich diese Diskrepanz erklären und welche Funktion könnte sie haben?

Die Schwankung der Expression auf Protein-Ebene, bei konstanter Expression auf Gen-Ebene, könnte mit einer Regulation der Proteinbiosynthese erklärt werden. So könnten Posttranslationelle Modifikationen (PTM), wie beispielsweise Ubiquitinierung, für einen verstärkten Abbau der SOD1 zum Zeitpunkt t1 verantwortlich sein (Banks and Andersen, 2019) und so die relative Expression zum Zeitpunkt t2 erhöhen.

Eine Regulation der SOD1 durch PTM und nicht durch Transkription könnte für Astrozyten relevant sein, um schnell auf sich ändernde ROS-Konzentrationen zu reagieren. Wenn es auf Gen-Ebene zu einem hohen Angebot von *sod1* kommt und die intrazelluläre SOD1-Konzentration auf Protein-Ebene durch Abbau überschüssiger SOD1 reguliert wird, kann die Zelle schnell auf ROS reagieren, indem sie den Abbau hemmt. So muss nicht erst die gesamte Proteinbiosynthese aktiviert werden. Eine schnelle Reaktion auf sich ändernde ROS-Verhältnisse ist für Astrozyten sinnvoll, da sie eine entscheidende Rolle in der Abwehr von ROS im ZNS spielen (Makar et al., 1994).

4.4.2 Einfluss von oxidativem Stress auf SOD1

Der Einfluss von oxidativem Stress auf die zirkadiane Rhythmik der Superoxid-Dismutase 1 wurde mittels Behandlung der primären Astrozyten-Zellkultur mit 1 μ M Rotenon zu den Zeitpunkten t1 und t2 untersucht. Die Analyse erfolgte sowohl auf Gen-Ebene als auch auf Protein-Ebene. Auf Gen-Ebene kam es zu keiner signifikante Änderung der *sod1*-Expression durch die Behandlung mit Rotenon. Zum Zeitpunkt t2, nach 32 Std Rotenon-Behandlung, präsentiert sich ein tendenzieller Anstieg des *sod1* im Vergleich zur Kontrolle. Auf Protein-Ebene zeigt sich zum Zeitpunkt t1 keine signifikante Änderung der SOD1-Expression durch die Rotenon-Behandlung. Zum Zeitpunkt t2 kam es zu einer signifikant niedrigeren relativen

Expression ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) der SOD1 durch die Rotenon-Behandlung im Vergleich mit der Kontrolle zum Zeitpunkt t2.

32 Std Rotenon-Behandlung führen also auf Gen-Ebene zu einem Anstieg der *sod1*-Expression (nicht-signifikant); auf Protein-Ebene dagegen zu einem Abfall der SOD1-Expression (signifikant). So kommt es durch oxidativen Stress zu einer signifikant niedrigeren relativen SOD1- Expression zum Zeitpunkt t2.

Martin et al. untersuchte mittels Northern-Blot die *sod1*-RNA von Ratten-Astrozyten und demonstrierten, dass es durch die Induktion von ROS mittels H_2O_2 zu einem signifikanten Anstieg der *sod1*-Expression kam (Martin et al., 2002). Dieses Ergebnis stimmt qualitativ mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit überein, wo es nach 32 Std Rotenon-Behandlung von Astrozyten in der Tendenz zu einem Anstieg der *sod1* kam. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit keine Signifikanz erreicht werden.

Aufgrund der erhöhten Gen-Expression und der Funktion der SOD1 in der Abwehr von oxidativem Stress, würde man durch ROS-Induktion eine erhöhte SOD1-Expression erwarten. Im Gegensatz dazu kam es im Versuch der vorliegenden Arbeit durch 32 Std Rotenon-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der relativen SOD1-Expression ($p\text{-Wert} \leq 0,05$). Interessanterweise steht dieses Ergebnis im Einklang mit der Literatur. So kommt es in Versuchen von Pinteaux et al. an isolierten zerebralen Astrozyten von Ratten durch ROS, induziert durch Xanthine/ Xanthine-Oxidase, ebenfalls zu einem signifikanten Abfall der SOD1-Expression (Pinteaux et al., 1996). Im Unterschied mit der vorliegenden Arbeit, verglichen Pinteaux die SOD1-Expression nicht mit einer Kontrolle und setzen diese nicht in Verbindung mit der zirkadianen Rhythmik von PER2. So konnte die vorliegende Arbeit das Ergebnis von Pinteaux bestätigen, dass ROS zu einer Abnahme der SOD1-Expression in Astrozyten führt und darüber hinaus konnte belegt werden, dass hierdurch die zirkadiane Rhythmik der Astrozyten beeinflusst wird.

Im Gegensatz dazu zeigten Noack et al. in *in vivo* Studien, dass ROS, hier Quin induziert, in Astrozyten zu einer Erhöhung der SOD1-Expression führt (Noack et al., 1998). Dieser Anstieg der SOD1 passt zu der Funktion der Astrozyten in der Abwehr von oxidativem Stress (Makar et al., 1994). Die Abweichung der Ergebnisse könnten damit zu erklären sein, dass es sich hier um eine *in vivo* Studie handelt, wo Astrozyten im Verbund mit Neuronen oxidativem Stress ausgesetzt wurden. So könnten Neurone die SOD1-Expression in Astrozyten mit vermitteln. Alternativ ist es möglich, dass es in den isolierten Astrozyten durch eine hohe ROS-Konzentration insgesamt zu einer Abnahme der Proteinbiosynthese von SOD1 gekommen ist. In der Auswertung wird das untersuchte Protein mit einem

housekeeper, in diesem Fall β -Aktin, in Relation gesetzt. Wenn es zu einer pathologischen Produktionskompetenz der Astrozyten durch Rotenon kommt, könnte die Abnahme der SOD1-Expression auch hierdurch bedingt sein. Die Vitalität der Astrozyten in der Zellkultur wurde mittels Mikroskops überprüft, um einen Zelltod durch die Rotenon-Behandlung für 32 Std auszuschließen.

Aufgrund der Assoziation von Mutationen der SOD1 und der neurodegenerativen Erkrankung ALS, wurde bereits viel über den Einfluss von oxidativem Stress auf die SOD1 geforscht (Chen et al., 2020, Maier and Chan, 2002). Die neue Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die SOD1 in Astrozyten einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Dies könnte für die Therapie der ALS von Interesse sein. Weitere Forschung, zum Beispiel in Form von *in vivo* Studien im Maus-Modell mit tageszeitenabhängiger Applikation von Medikamenten, könnte interessant sein. So könnte durch zeitabhängige Medikation die Nebenwirkungsrate reduziert werden.

4.4.3 Einfluss von zirkadianer Rhythmik auf SOD2

Der Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf die Superoxid-Dismutase 2 wurde an primären Astrozyten zu den zwei Zeitpunkten t1 und t2 untersucht. Nach Lindenau et al. wird die SOD2 vornehmlich in Neuronen und nur in geringer Anzahl in Astrozyten produziert (Lindenau et al., 2000). Nun war es interessant zu beobachten, dass die SOD2 trotzdem auch in Astrozyten zeitabhängig produziert wird. Eine zeitabhängige Regulation demonstriert, dass die SOD2 wichtig für Zellfunktion ist. Um die Regulation zu untersuchen, wurde sowohl die Gen-Ebene als auch die Protein-Ebene betrachtet.

Auf Gen-Ebene kam es äquivalent zu *sod1* nicht zu einer Änderung der *sod2*-Expression zwischen den Zeitpunkten t1 und t2. Dies lässt vermuten, dass die Regulation auf Protein-Ebene stattfindet. Hier ließ sich äquivalent zu SOD1 ein signifikanter ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) Unterschied zwischen t1 und t2 nachweisen. So kam es zum Zeitpunkt t2 zu einer höheren Expression als zum Zeitpunkt t1. Dies beschreibt also eine signifikante Änderung der SOD2, äquivalent zu der in 3.2.1 beschriebenen Schwankung des PER2::LUC-Fusionsproteins sowie der in 4.1.4.1 beschriebenen Schwankung von SOD1. Wie PER2 und SOD1, unterliegt also auch die SOD2 einer zirkadianen Rhythmik.

Anders als bei *per2*, äquivalent zu *sod1* lässt sich diese Rhythmik bei *sod2* nicht auf Gen-Ebene reproduzieren. Die Ergebnisse der Gen-Expression stehen im Einklang mit der Literatur. Martin et al. konnten äquivalent zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Unterschied der *sod2*-Expression über den Tag im Kortex nachweisen. Sie zeigten über den Tag signifikante Unterschiede der *sod2*-Expression im Intestinum, der

Lunge sowie im Zerebellum (Martin et al., 2003). Auch im Lebergewebe wird *sod2* rhythmisch exprimiert (Gong et al., 2015). So scheint die Rhythmizität der *sod2*-Expression gewebeabhängig zu sein. In Astrozyten wurde die zirkadiane Rhythmik von *sod2* bis *dato* noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde belegt, dass *sod2* nicht demselben Expressionsmuster entspricht, wie *per2*. Es ist aber eine andere Rhythmik der Expression möglich, welche im Rahmen dieses Versuchs nicht dargestellt werden konnte.

Interessanterweise unterliegt die Expression von SOD2 dagegen derselben Rhythmik wie PER2. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Literatur. Die für die Protein-Ebene in 4.2.2 diskutierte Untersuchung der SOD-Aktivität von Diaz-Munos et al. schließt die SOD2 mit ein (Diaz-Munoz et al., 1985). In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse von Diaz-Munoz et al. mittels Western-Blot reproduziert werden und belegt werden, dass die beobachteten Expressions-Unterschiede über den Tag sowohl für die SOD1 als auch für die SOD2 gelten.

4.4.4 Einfluss von oxidativem Stress auf SOD2

Der Einfluss von oxidativem Stress auf die Superoxid-Dismutase 2 wurde mittels Behandlung der primären Astrozyten-Zellkultur mit 1 μ M Rotenon untersucht. Es präsentierte sich auf Gen-Ebene keine signifikante Änderung der *sod2*-Expression durch die Behandlung mit Rotenon. In der Tendenz kam es zu einer Abnahme der *sod2*-Expression durch die Rotenon-Behandlung zu beiden Zeitpunkten.

In der Vergangenheit wurde ein Anstieg der *sod2*-mRNA als Reaktion auf Paraquat-induzierte-ROS in Mäuse-Astrozyten (Schmuck et al., 2002) und H₂O₂-induzierte-ROS in Ratten-Astrozyten beschrieben (Rohrdanz et al., 2001). Beide Analysen wurden mittels Northern-Blot durchgeführt, während in der vorliegenden Arbeit eine qPCR durchgeführt wurde. Zudem wurden in den Northern-Blot-Versuchen direkte ROS-Induzierende Toxine gewählt, während in der vorliegenden Arbeit der Atmungsketten-Inhibitor Rotenon verwendet wurde. Diese Unterschiede in der Methodik könnten die Variation der Ergebnisse bedingen.

Auf Protein-Ebene wurde SOD2 zum Zeitpunkt t2 signifikant mehr exprimiert (p-Wert $\leq 0,05$) als in der Kontroll-Gruppe zum Zeitpunkt t1 und unterliegt damit demselben Expressionsmuster der SOD2 ohne Rotenon-Behandlung.

Somit wird die SOD2 trotz Rotenon-Behandlung weiter zirkadian exprimiert. Vergleicht man die Protein-Analysen von SOD1 und SOD2, so zeigt sich durch Rotenon eine Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik von SOD1, nicht aber von SOD2. Die relative SOD2- Expression ist trotz Rotenon-Behandlung signifikant höher als die der Kontrolle.

Sehr interessant ist, dass dieses Ergebnis mit den Analysen von Pinteaux et al. zusammenpasst. Diese induzierten ROS mittels Xanthine/ Xanthine-Oxidase in zerebralen Astrozyten von Ratten. Sie beschreiben einen Anstieg der relativen SOD2-Expression im zeitlichen Verlauf der ROS-Behandlung (Pinteaux et al., 1996). Auch Aguirre-Rueda et al. beobachteten einen Anstieg der SOD2 in Ratten-Kortizes nach A β 1-42-induzierten-ROS (Aguirre-Rueda et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Reaktion der SOD2 auf Rotenon im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Durch diese Differenzierung wird klar, dass es in isolierten Astrozyten auch ohne eine ROS-Induktion über die Zeit zu einem Anstieg der SOD2 kommt. Bei SOD2 kommt es, im Gegensatz zu SOD1, durch oxidativen Stress nicht zu einer Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik. Wie lässt sich die unterschiedliche Reaktion der SOD auf oxidativen Stress erklären? Unterschiede zwischen den SOD liegen in ihrer Lokalisation. Wie bereits beschrieben, ist die SOD1 im Zytoplasma und die SOD2 in den Mitochondrien lokalisiert (Fridovich, 1975). Dieser Lokalisations-Unterschied könnte die Reaktion auf ROS beeinflussen. Durch Inhibition der Atmungskette fallen die ROS initial in den Mitochondrien an, was eine Reaktion der SOD2 notwendig macht, um mitochondriale Strukturen vor ROS zu schützen. Die SOD1 wird in Astrozyten zu einem höheren Anteil exprimiert als in Neuronen, während die SOD2 hauptsächlich in Neuronen vorkommt und nur zu einem geringen Anteil in Astrozyten (Lindenau et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit kann keine Aussage über die quantitativen Verhältnisse der SOD zueinander getroffen werden. Lediglich die relative Expression im Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle kann bestimmt werden. So kann es trotzdem sein, dass auch in der Astrozyten-Zellkultur insgesamt eine höhere Konzentration von SOD1 vertreten ist als von SOD2. Was gesagt werden kann ist, dass Rotenon die Rhythmik der SOD1-Expression beeinflusst und die der SOD2 nicht.

Wichtig ist zu beachten, dass diese Arbeit ausschließlich *in vitro* Versuche berücksichtigt. Lindenau et al. fassen zusammen, dass es zu Variierenden SOD2-Konzentrationen von *in vivo* und *in vitro* Versuchen kommt (Lindenau et al., 2000). So wäre es spannend, in weiteren Versuchen zu überprüfen, ob sich eine zirkadiane Rhythmik der SOD in Astrozyten *in vivo* reproduzieren lässt und wie diese durch oxidativen Stress beeinflusst wird.

Welche Bedeutung könnte die Erkenntnis der zirkadianen Rhythmik der SOD haben? Die Versuche von Xiang et al. von 2019 befassen sich mit der therapeutischen Wirkung der SOD. So kommt es bei zerebraler Ischämie zu Glucose-vermittelter Abnahme der SOD2 in Astrozyten und damit ROS-vermittelt zu neuronaler Schädigung (Xiang et al., 2019). Xiang et al. belegen, dass Bilbobalide, ein gängiges Phyto-Therapeutikum, zu einer erhöhten

Expression von SOD2 führt und schlagen Bilbobalide als ein Therapeutikum des ischämischen Schlaganfalls vor (Xiang et al., 2019). Das Ergebnis dieser Arbeit, dass die SOD2 in einer zirkadianen Rhythmik exprimiert wird, könnte zu weiteren Studien in diesem Feld anstoßen. So könnte durch Simulation der natürlichen Rhythmik, über tageszeitenabhängige Gabe des Medikaments, insgesamt an Arzneimittel eingespart werden. Eine geringstmögliche Dosis von Medikamenten bei optimaler Wirkung ist immer erstrebenswert, um die Nebenwirkungsrate im Verhältnis zur Wirkung möglichst klein zu halten.

4.5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress auf Astrozyten untersucht. Es wurde bestätigt, dass es in Astrozyten zu einer rhythmischen Expression des Fusionsproteins PER2::LUC kommt (Prolo et al., 2005). Zudem konnte belegt werden, dass diese Expression durch oxidativen Stress beeinflusst wird. Geschlechterunterschiede in der PER::LUC-Expression konnten nicht nachgewiesen werden. Aus diesen Untersuchungen lässt sich folgern, dass die zirkadiane Rhythmik von Astrozyten durch oxidativen Stress beeinflusst wird.

Hingegen scheint die Expression von Genen der mitochondrialen Dynamik, *fis1* und *mfn2*, sowie das mitochondriale Gen *nd1*, in ihrer Expression keiner zirkadianen Rhythmik zu unterliegen und auch nicht durch oxidativen Stress beeinflusst zu werden.

Spannenderweise kommt es aber zu einer zirkadianen Expression der antioxidativen Enzyme SOD1 und SOD2. Wobei oxidativer Stress ausschließlich einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik der SOD1 hat und diese in ihrer Expression hemmt, wohingegen die zirkadiane Rhythmik der SOD2 nicht durch oxidativen Stress beeinflusst wird. Die Regulation der SOD1 und SOD2 findet auf Protein- und nicht auf Gen-Ebene statt.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und zirkadianer Rhythmik in murinen Astrozyten nachgewiesen werden. Wichtig ist zu beachten, dass diese Beobachtungen *in vitro* und in einem Maus-Modell getätigt wurden und so die Übertragbarkeit auf den Menschen insgesamt eingeschränkt ist.

Trotzdem ist der Zusammenhang von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress in Astrozyten beachtenswert, da diese, nach Erkenntnissen der letzten Jahre, an der Ursache und den Folgen neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind (Phatnani and Maniatis, 2015). Ein wichtiger ätiopathologischer Faktor neurodegenerativer Erkrankungen ist oxidativer Stress (Simonian and Coyle, 1996). Symptomatisch kommt es in vielen neurodegenerativen Erkrankungen in frühen Stadien zu Schlafstörungen sowie Störungen des Tag-Nacht-Rhythmus (Videnovic et al., 2014). Dieser Zusammenhang von neurodegenerativen Erkrankungen, Astrozyten, oxidativem Stress und zirkadianer Rhythmik ist bis *dato* noch nicht ausführlich untersucht, sodass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Anstoß zu weiteren Untersuchungen in diesem Feld bieten.

Die Erkenntnis dieser Arbeit ist der Zusammenhang von zirkadianer Rhythmik und oxidativem Stress in Astrozyten.

5 Literaturverzeichnis

- ABATI, E., BRESOLIN, N., COMI, G. & CORTI, S. 2020. Silence superoxide dismutase 1 (SOD1): a promising therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Expert Opin Ther Targets*.
- ABCAM(R) Western Blotting- A beginner's guide.
- AGUIRRE-RUEDA, D., GUERRA-OJEDA, S., ALDASORO, M., IRADI, A., OBRADOR, E., ORTEGA, A., MAURICIO, M. D., VILA, J. M. & VALLES, S. L. 2015. Astrocytes protect neurons from Abeta1-42 peptide-induced neurotoxicity increasing TFAM and PGC-1 and decreasing PPAR-gamma and SIRT-1. *Int J Med Sci*, 12, 48-56.
- ALBRECHT, U. & EICHELE, G. 2003. The mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 271-7.
- ALEXANDER, C., VOTRUBA, M., PESCH, U. E., THISELTON, D. L., MAYER, S., MOORE, A., RODRIGUEZ, M., KELLNER, U., LEO-KOTTLER, B., AUBURGER, G., BHATTACHARYA, S. S. & WISSINGER, B. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*, 26, 211-5.
- ANDERSON, B. J., LI, X., ALCANTARA, A. A., ISAACS, K. R., BLACK, J. E. & GREENOUGH, W. T. 1994. Glial hypertrophy is associated with synaptogenesis following motor-skill learning, but not with angiogenesis following exercise. *Glia*, 11, 73-80.
- ARAQUE, A., PARPURA, V., SANZGIRI, R. P. & HAYDON, P. G. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 22, 208-15.
- ARNOLD, B., CASSADY, S. J., VANLAAR, V. S. & BERMAN, S. B. 2011. Integrating multiple aspects of mitochondrial dynamics in neurons: age-related differences and dynamic changes in a chronic rotenone model. *Neurobiol Dis*, 41, 189-200.
- ASCHOFF, J. 1984. Circadian timing. *Ann N Y Acad Sci*, 423, 442-68.
- BAE, K., JIN, X., MAYWOOD, E. S., HASTINGS, M. H., REPERT, S. M. & WEAVER, D. R. 2001. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, 30, 525-36.
- BALSALOBRE, A., DAMIOLA, F. & SCHIBLER, U. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93, 929-37.
- BANKS, C. J. & ANDERSEN, J. L. 2019. Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications. *Redox Biol*, 26, 101270.
- BARRES, B. A., CHUN, L. L. & COREY, D. P. 1990. Ion channels in vertebrate glia. *Annu Rev Neurosci*, 13, 441-74.
- BEREITER-HAHN, J. & VOTH, M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*, 27, 198-219.
- BERNARDINELLI, Y., MULLER, D. & NIKONENKO, I. 2014. Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural Plast*, 2014, 232105.
- BIRVE, A., NEUWIRTH, C., WEBER, M., MARKLUND, S. L., NILSSON, A. C., JONSSON, P. A. & ANDERSEN, P. M. 2010. A novel SOD1 splice site mutation associated with familial ALS revealed by SOD activity analysis. *Hum Mol Genet*, 19, 4201-6.
- BLEAZARD, W., MCCAFFERY, J. M., KING, E. J., BALE, S., MOZDY, A., TIEU, Q., NUNNARI, J. & SHAW, J. M. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol*, 1, 298-304.
- BOLANOS, J. P., ALMEIDA, A., STEWART, V., PEUCHEN, S., LAND, J. M., CLARK, J. B. & HEALES, S. J. 1997. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, 68, 2227-40.

- BONILLA, E., TANJI, K., HIRANO, M., VU, T. H., DIMAURO, S. & SCHON, E. A. 1999. Mitochondrial involvement in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1410, 171-82.
- BORTHWICK, G. M., JOHNSON, M. A., INCE, P. G., SHAW, P. J. & TURNBULL, D. M. 1999. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol*, 46, 787-90.
- BRANCACCIO, M., EDWARDS, M. D., PATTON, A. P., SMYLLIE, N. J., CHESHAM, J. E., MAYWOOD, E. S. & HASTINGS, M. H. 2019. Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science*, 363, 187-192.
- BRANCACCIO, M., PATTON, A. P., CHESHAM, J. E., MAYWOOD, E. S. & HASTINGS, M. H. 2017. Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron*, 93, 1420-1435 e5.
- BUNGER, M. K., WILSBACHER, L. D., MORAN, S. M., CLENDENIN, C., RADCLIFFE, L. A., HOGENESCH, J. B., SIMON, M. C., TAKAHASHI, J. S. & BRADFIELD, C. A. 2000. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103, 1009-17.
- BUTTERFIELD, D. A. & HALLIWELL, B. 2019. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*, 20, 148-160.
- CAO, Q., TAN, C. C., XU, W., HU, H., CAO, X. P., DONG, Q., TAN, L. & YU, J. T. 2020. The Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*, 73, 1157-1166.
- CARMIGNOTO, G. & GOMEZ-GONZALO, M. 2010. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Res Rev*, 63, 138-48.
- CASSINA, P., CASSINA, A., PEHAR, M., CASTELLANOS, R., GANDELMAN, M., DE LEON, A., ROBINSON, K. M., MASON, R. P., BECKMAN, J. S., BARBEITO, L. & RADI, R. 2008. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci*, 28, 4115-22.
- CHAN, D. C. 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 79-99.
- CHANCE, B. 1947. An Intermediate Compound in the Catalase-hydrogen peroxide Reaktion. *Acta Chemica Scandinavica 1 (1947)* 236-267.
- CHEN, H., CHOMYN, A. & CHAN, D. C. 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, 280, 26185-92.
- CHEN, H., DETMER, S. A., EWALD, A. J., GRIFFIN, E. E., FRASER, S. E. & CHAN, D. C. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160, 189-200.
- CHEN, K. H., GUO, X., MA, D., GUO, Y., LI, Q., YANG, D., LI, P., QIU, X., WEN, S., XIAO, R. P. & TANG, J. 2004. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat Cell Biol*, 6, 872-83.
- CHEN, Y., QIN, C., HUANG, J., TANG, X., LIU, C., HUANG, K., XU, J., GUO, G., TONG, A. & ZHOU, L. 2020. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif*, e12781.
- CHEN, Y., VARTIAINEN, N. E., YING, W., CHAN, P. H., KOISTINAHO, J. & SWANSON, R. A. 2001. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *J Neurochem*, 77, 1601-10.
- CHEN, Y., YING, W., SIMMA, V., COPIN, J. C., CHAN, P. H. & SWANSON, R. A. 2000. Overexpression of Cu,Zn superoxide dismutase attenuates oxidative inhibition of astrocyte glutamate uptake. *J Neurochem*, 75, 939-45.

- CHOMYN, A., CLEETER, M. W., RAGAN, C. I., RILEY, M., DOOLITTLE, R. F. & ATTARDI, G. 1986. URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science*, 234, 614-8.
- CHOMYN, A., MARIOTTINI, P., CLEETER, M. W., RAGAN, C. I., MATSUNO-YAGI, A., HATEFI, Y., DOOLITTLE, R. F. & ATTARDI, G. 1985. Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature*, 314, 592-7.
- CLASADONTE, J., SCEMES, E., WANG, Z., BOISON, D. & HAYDON, P. G. 2017. Connexin 43-Mediated Astroglial Metabolic Networks Contribute to the Regulation of the Sleep-Wake Cycle. *Neuron*, 95, 1365-1380 e5.
- COLTON, C. A. & GILBERT, D. L. 1987. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett*, 223, 284-8.
- CORREIA-MELO, C. & PASSOS, J. F. 2015. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim Biophys Acta*, 1847, 1373-9.
- COTO-MONTES, A., BOGA, J. A., TOMAS-ZAPICO, C., RODRIGUEZ-COLUNGA, M. J., MARTINEZ-FRAGA, J., TOLIVIA-CADRECHA, D., MENENDEZ, G., HARDELAND, R. & TOLIVIA, D. 2001. Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med*, 30, 785-92.
- CULOTTA, V. C., KLOMP, L. W., STRAIN, J., CASARENO, R. L., KREMS, B. & GITLIN, J. D. 1997. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 272, 23469-72.
- DARWIN, C. 1859. On the Origin of Species.
- DEGLI ESPOSTI, M. 1998. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta*, 1364, 222-35.
- DEHESHI, S., DABIRI, B., FAN, S., TSANG, M. & RINTOUL, G. L. 2015. Changes in mitochondrial morphology induced by calcium or rotenone in primary astrocytes occur predominantly through ros-mediated remodeling. *J Neurochem*, 133, 684-99.
- DEROUICHE, A., ANLAUF, E., AUMANN, G., MUHLSTADT, B. & LAVIALLE, M. 2002. Anatomical aspects of glia-synapse interaction: the perisynaptic glial sheath consists of a specialized astrocyte compartment. *J Physiol Paris*, 96, 177-82.
- DEROUICHE, A., HASELEU, J. & KORF, H. W. 2015. Fine Astrocyte Processes Contain Very Small Mitochondria: Glial Oxidative Capability May Fuel Transmitter Metabolism. *Neurochem Res*, 40, 2402-13.
- DIAZ-MUNOZ, M., HERNANDEZ-MUNOZ, R., SUAREZ, J. & CHAGOYA DE SANCHEZ, V. 1985. Day-night cycle of lipid peroxidation in rat cerebral cortex and their relationship to the glutathione cycle and superoxide dismutase activity. *Neuroscience*, 16, 859-63.
- DRINGEN, R., KUSSMAUL, L., GUTTERER, J. M., HIRRLINGER, J. & HAMPRECHT, B. 1999. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem*, 72, 2523-30.
- DUARTE, A., PODEROSO, C., COOKE, M., SORIA, G., CORNEJO MACIEL, F., GOTTIFREDI, V. & PODESTA, E. J. 2012. Mitochondrial fusion is essential for steroid biosynthesis. *PLoS One*, 7, e45829.
- DUGAN, L. L. & KIM-HAN, J. S. 2004. Astrocyte mitochondria in in vitro models of ischemia. *J Bioenerg Biomembr*, 36, 317-21.
- DUHART, J. M., LEONE, M. J., PALADINO, N., EVANS, J. A., CASTANON-CERVANTES, O., DAVIDSON, A. J. & GOLOMBEK, D. A. 2013. Suprachiasmatic astrocytes modulate the circadian clock in response to TNF-alpha. *J Immunol*, 191, 4656-64.
- DUNLAP, J. C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96, 271-90.

- EARLEY, F. G., PATEL, S. D., RAGAN, I. & ATTARDI, G. 1987. Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [3H]dihydrorotenone. *FEBS Lett*, 219, 108-12.
- FATO, R., BERGAMINI, C., BORTOLUS, M., MANIERO, A. L., LEONI, S., OHNISHI, T. & LENA, Z. G. 2009. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 384-92.
- FEE, J. A. 1991. Regulation of sod genes in Escherichia coli: relevance to superoxide dismutase function. *Mol Microbiol*, 5, 2599-610.
- FRIDOVICH, I. 1975. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 44, 147-59.
- FU, L., PELICANO, H., LIU, J., HUANG, P. & LEE, C. 2002. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, 111, 41-50.
- FU, Y. T., HE, F. S., ZHANG, S. L. & ZHANG, J. S. 1995. Lipid peroxidation in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid. *Toxicon*, 33, 327-31.
- FURUKAWA, Y. & O'HALLORAN, T. V. 2006. Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 8, 847-67.
- GEORGIU, C. D., PAPAPOSTOULOU, I. & GRINTZALIS, K. 2008. Superoxide radical detection in cells, tissues, organisms (animals, plants, insects, microorganisms) and soils. *Nat Protoc*, 3, 1679-92.
- GIULIAN, D. 1993. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia*, 7, 102-10.
- GOLDSTEIN, J. C., WATERHOUSE, N. J., JUIN, P., EVAN, G. I. & GREEN, D. R. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, 2, 156-62.
- GOMEZ-ABELLAN, P., MADRID, J. A., LUJAN, J. A., FRUTOS, M. D., GONZALEZ, R., MARTINEZ-AUGUSTIN, O., DE MEDINA, F. S., ORDOVAS, J. M. & GARAULET, M. 2012. Sexual dimorphism in clock genes expression in human adipose tissue. *Obes Surg*, 22, 105-12.
- GONG, C., LI, C., QI, X., SONG, Z., WU, J., HUGHES, M. E. & LI, X. 2015. The daily rhythms of mitochondrial gene expression and oxidative stress regulation are altered by aging in the mouse liver. *Chronobiol Int*, 32, 1254-63.
- GORDON, G. R., CHOI, H. B., RUNGTA, R. L., ELLIS-DAVIES, G. C. & MACVICAR, B. A. 2008. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*, 456, 745-9.
- GRIPARIC, L., VAN DER WEL, N. N., OROZCO, I. J., PETERS, P. J. & VAN DER BLIEK, A. M. 2004. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem*, 279, 18792-8.
- GULDNER, F. H. 1983. Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Exp Brain Res*, 50, 373-6.
- GUTTERIDGE, J. M. & HALLIWELL, B. 1989. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol*, 2, 195-256.
- HABER, F. W., J. 1934. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts.
- HALBERG, F. 1959. [Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle]. *Int Z Vitaminforsch Beih*, 10, 225-96.
- HALES, K. G. & FULLER, M. T. 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, 90, 121-9.
- HARDELAND, R., COTO-MONTES, A. & POEGGELER, B. 2003. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int*, 20, 921-62.

- HARMAN, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300.
- HARPER, S. H. & UNDERWOOD, W. G. 1965. The Active Principles of Leguminous Fish-Poison Plants. X. Toxicarol Isoflavone. *J Chem Soc*, 25, 4203-4.
- HASTINGS, M., O'NEILL, J. S. & MAYWOOD, E. S. 2007. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol*, 195, 187-98.
- HATEFI, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, 54, 1015-69.
- HATEFI, Y. & BEARDEN, A. J. 1976. Electron paramagnetic resonance studies on the reduction of the components of complex I and transhydrogenase-inhibited complex I by NADH and NADPH. *Biochem Biophys Res Commun*, 69, 1032-8.
- HATEFI, Y., HAAVIK, A. G., FOWLER, L. R. & GRIFFITHS, D. E. 1962. Studies on the electron transfer system. XLII. Reconstitution of the electron transfer system. *J Biol Chem*, 237, 2661-9.
- HEKIMI, S., LAPOINTE, J. & WEN, Y. 2011. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol*, 21, 569-76.
- HENDRICKSON, A. E., WAGONER, N. & COWAN, W. M. 1972. An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 135, 1-26.
- HERTZ, L. 1965. Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal--neuroglial--neuronal impulse transmission system. *Nature*, 206, 1091-4.
- HERTZ, L., DRINGEN, R., SCHOUSBOE, A. & ROBINSON, S. R. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res*, 57, 417-28.
- HIROI, S., HARADA, H., NISHI, H., SATOH, M., NAGAI, R. & KIMURA, A. 1999. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun*, 261, 332-9.
- HIRST, J., CARROLL, J., FEARNLEY, I. M., SHANNON, R. J. & WALKER, J. E. 2003. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1604, 135-50.
- HODOGLUGIL, U., ONGUN, O., GUNEY, Z., ALTAN, N. & ZENGIL, H. 1995. Temporal variation in hepatic superoxide dismutase activity in mice. *Chronobiol Int*, 12, 152-5.
- ISHIHARA, N., NOMURA, M., JOFUKU, A., KATO, H., SUZUKI, S. O., MASUDA, K., OTERA, H., NAKANISHI, Y., NONAKA, I., GOTO, Y., TAGUCHI, N., MORINAGA, H., MAEDA, M., TAKAYANAGI, R., YOKOTA, S. & MIHARA, K. 2009. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol*, 11, 958-66.
- JACKSON, J. G. & ROBINSON, M. B. 2018. Regulation of mitochondrial dynamics in astrocytes: Mechanisms, consequences, and unknowns. *Glia*, 66, 1213-1234.
- JACOBI, D., LIU, S., BURKEWITZ, K., KORY, N., KNUDSEN, N. H., ALEXANDER, R. K., UNLUTURK, U., LI, X., KONG, X., HYDE, A. L., GANGL, M. R., MAIR, W. B. & LEE, C. H. 2015. Hepatic Bmal1 Regulates Rhythmic Mitochondrial Dynamics and Promotes Metabolic Fitness. *Cell Metab*, 22, 709-20.
- JAMES, D. I., PARONE, P. A., MATTENBERGER, Y. & MARTINOU, J. C. 2003. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem*, 278, 36373-9.
- JENNER, P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-8.
- JIMENEZ-PACHECO, A., FRANCO, J. M., LOPEZ, S., GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M., MAGDALENA LEAL-LASARTE, M., CABALLERO-HERNANDEZ, D. E., CEJUDO-GUILLEN,

- M. & POZO, D. 2017. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Adv Exp Med Biol*, 978, 255-275.
- JOHNSTONE, M., GEARING, A. J. & MILLER, K. M. 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol*, 93, 182-93.
- JONES, T. A. & GREENOUGH, W. T. 1996. Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment. *Neurobiol Learn Mem*, 65, 48-56.
- KADENBACH, B., JARAUSCH, J., HARTMANN, R. & MERLE, P. 1983. Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal Biochem*, 129, 517-21.
- KEILIN, D. H., E. F. 1939. Cytochrome and cytochrome oxydase.
- KIM, G. W., LEWEN, A., COPIN, J., WATSON, B. D. & CHAN, P. H. 2001. The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cortical ischemia in mice. *Neuroscience*, 105, 1007-18.
- KING, D. P., ZHAO, Y., SANGORAM, A. M., WILSBACHER, L. D., TANAKA, M., ANTOCH, M. P., STEEVES, T. D., VITATERNA, M. H., KORNHAUSER, J. M., LOWREY, P. L., TUREK, F. W. & TAKAHASHI, J. S. 1997. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, 89, 641-53.
- KITA, K., OYA, H., GENNIS, R. B., ACKRELL, B. A. & KASAHARA, M. 1990. Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of iron sulfur (Ip) subunit of liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 166, 101-8.
- KLEIN, D. C. M., R. Y.; REPERT, S. M. 1991. Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock. *Oxford University Press*.
- KLINGENBERG, M. 1970. Localization of the glycerol-phosphate dehydrogenase in the outer phase of the mitochondrial inner membrane. *Eur J Biochem*, 13, 247-52.
- KLOEHN, I., PILLAI, S. B., OFFICER, L., KLEMENT, C., GASSER, P. J. & EVANS, J. A. 2016. Sexual Differentiation of Circadian Clock Function in the Adrenal Gland. *Endocrinology*, 157, 1895-904.
- KOHSAKA, A., DAS, P., HASHIMOTO, I., NAKAO, T., DEGUCHI, Y., GOURAUD, S. S., WAKI, H., MURAGAKI, Y. & MAEDA, M. 2014. The circadian clock maintains cardiac function by regulating mitochondrial metabolism in mice. *PLoS One*, 9, e112811.
- KONDO, T., REAUME, A. G., HUANG, T. T., CARLSON, E., MURAKAMI, K., CHEN, S. F., HOFFMAN, E. K., SCOTT, R. W., EPSTEIN, C. J. & CHAN, P. H. 1997. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 17, 4180-9.
- KOTLER, M., RODRIGUEZ, C., SAINZ, R. M., ANTOLIN, I. & MENENDEZ-PELAEZ, A. 1998. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res*, 24, 83-9.
- KOWALD, A. & KIRKWOOD, T. B. 2011. Evolution of the mitochondrial fusion-fission cycle and its role in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 10237-42.
- KRAFT, M. & MARTIN, R. J. 1995. Chronobiology and chronotherapy in medicine. *Dis Mon*, 41, 506-75.
- KREBS, H. A. 1940. The citric acid cycle and the Szent-Gyorgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochem J*, 34, 775-9.
- KRIEGER, D. T. 1975. Rhythms of ACTH and corticosteroid secretion in health and disease, and their experimental modification. *J Steroid Biochem*, 6, 785-91.

- KUDIN, A. P., BIMPONG-BUTA, N. Y., VIELHABER, S., ELGER, C. E. & KUNZ, W. S. 2004. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem*, 279, 4127-35.
- KUDO, T., LOH, D. H., TAHARA, Y., TRUONG, D., HERNANDEZ-ECHEAGARAY, E. & COLWELL, C. S. 2014. Circadian dysfunction in response to in vivo treatment with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *ASN Neuro*, 6, e00133.
- KULJIS, D. A., LOH, D. H., TRUONG, D., VOSKO, A. M., ONG, M. L., MCCLUSKY, R., ARNOLD, A. P. & COLWELL, C. S. 2013. Gonadal- and sex-chromosome-dependent sex differences in the circadian system. *Endocrinology*, 154, 1501-12.
- KUME, K., ZYLKA, M. J., SRIRAM, S., SHEARMAN, L. P., WEAVER, D. R., JIN, X., MAYWOOD, E. S., HASTINGS, M. H. & REPPERT, S. M. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98, 193-205.
- KUSSMAUL, L. & HIRST, J. 2006. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7607-12.
- LAPENNA, D., DE GIOIA, S., MEZZETTI, A., PORRECA, E., CIOFANI, G., MARZIO, L., CAPANI, F., DI ILIO, C. & CUCCURULLO, F. 1992. Circadian variations in antioxidant defences and lipid peroxidation in the rat heart. *Free Radic Res Commun*, 17, 187-94.
- LE MINH, N., DAMIOLA, F., TRONCHE, F., SCHUTZ, G. & SCHIBLER, U. 2001. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J*, 20, 7128-36.
- LEA, P. J. & HOLLENBERG, M. J. 1989. Mitochondrial structure revealed by high-resolution scanning electron microscopy. *Am J Anat*, 184, 245-57.
- LEBOVITZ, R. M., ZHANG, H., VOGEL, H., CARTWRIGHT, J., JR., DIONNE, L., LU, N., HUANG, S. & MATZUK, M. M. 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9782-7.
- LEE, S., JEONG, S. Y., LIM, W. C., KIM, S., PARK, Y. Y., SUN, X., YOULE, R. J. & CHO, H. 2007. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem*, 282, 22977-83.
- LEE, Y. J., JEONG, S. Y., KARBOWSKI, M., SMITH, C. L. & YOULE, R. J. 2004. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*, 15, 5001-11.
- LEITCH, J. M., LI, C. X., BARON, J. A., MATTHEWS, L. M., CAO, X., HART, P. J. & CULOTTA, V. C. 2012. Post-translational modification of Cu/Zn superoxide dismutase under anaerobic conditions. *Biochemistry*, 51, 677-85.
- LÉMERY, N. 1700. Explication physique et chimique des feux souterrains, des tremblements de terre, des ourangans, des éclairs et du tonnerre.
- LENAZ, G., FATO, R., GENOVA, M. L., BERGAMINI, C., BIANCHI, C. & BIONDI, A. 2006. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 1406-20.
- LEWIS, M. R. & LEWIS, W. H. 1914. Mitochondria in Tissue Culture. *Science*, 39, 330-3.
- LIESA, M., PALACIN, M. & ZORZANO, A. 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*, 89, 799-845.
- LIM, A. S., MYERS, A. J., YU, L., BUCHMAN, A. S., DUFFY, J. F., DE JAGER, P. L. & BENNETT, D. A. 2013. Sex difference in daily rhythms of clock gene expression in the aged human cerebral cortex. *J Biol Rhythms*, 28, 117-29.

- LINDAHL, P. E. & OBERG, K. E. 1961. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Exp Cell Res*, 23, 228-37.
- LINDENAU, J., NOACK, H., POSSEL, H., ASAYAMA, K. & WOLF, G. 2000. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia*, 29, 25-34.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOEWENSTEIN, R. J., WEINGARTNER, H., GILLIN, J. C., KAYE, W., EBERT, M. & MENDELSON, W. B. 1982. Disturbances of sleep and cognitive functioning in patients with dementia. *Neurobiol Aging*, 3, 371-7.
- MAGNONE, M. C., LANGMESSER, S., BEZDEK, A. C., TALLONE, T., RUSCONI, S. & ALBRECHT, U. 2014. The Mammalian circadian clock gene *per2* modulates cell death in response to oxidative stress. *Front Neurol*, 5, 289.
- MAIER, C. M. & CHAN, P. H. 2002. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist*, 8, 323-34.
- MAKAR, T. K., NEDERGAARD, M., PREUSS, A., GELBARD, A. S., PERUMAL, A. S. & COOPER, A. J. 1994. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem*, 62, 45-53.
- MANNELLA, C. A., MARKO, M., PENCZEK, P., BARNARD, D. & FRANK, J. 1994. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech*, 27, 278-83.
- MAO, X., MOERMAN-HERZOG, A. M., WANG, W. & BARGER, S. W. 2006. Differential transcriptional control of the superoxide dismutase-2 kappaB element in neurons and astrocytes. *J Biol Chem*, 281, 35863-72.
- MARAGAKIS, N. J. & ROTHSTEIN, J. D. 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*, 2, 679-89.
- MARGULIS, L. 1975. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 21-38.
- MARGULIS, L. 1981. Symbiosis in cell evolution : life and its environment on the early earth
- MARGULIS, L. & BERMUDEZ, D. 1985. Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis*, 1, 101-24.
- MARKLUND, S. L. 1984. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest*, 74, 1398-403.
- MARPEGAN, L., KRALL, T. J. & HERZOG, E. D. 2009. Vasoactive intestinal polypeptide entrains circadian rhythms in astrocytes. *J Biol Rhythms*, 24, 135-43.
- MARTIN, V., SAINZ, R. M., ANTOLIN, I., MAYO, J. C., HERRERA, F. & RODRIGUEZ, C. 2002. Several antioxidant pathways are involved in astrocyte protection by melatonin. *J Pineal Res*, 33, 204-12.
- MARTIN, V., SAINZ, R. M., MAYO, J. C., ANTOLIN, I., HERRERA, F. & RODRIGUEZ, C. 2003. Daily rhythm of gene expression in rat superoxide dismutases. *Endocr Res*, 29, 83-95.
- MCBRIDE, H. M., NEUSPIEL, M. & WASIAK, S. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*, 16, R551-60.
- MEVES, F. 1908. Die Chondriosomen als Träger erblicher Anlagen. Cytologische Studien am Hühnerembryo. *Archiv für mikroskopische Anatomie*.
- MISHRA, P. & CHAN, D. C. 2016. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*, 212, 379-87.

- MISIAK, M., BEYER, C. & ARNOLD, S. 2010. Gender-specific role of mitochondria in the vulnerability of 6-hydroxydopamine-treated mesencephalic neurons. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 1178-88.
- MITCHELL, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-8.
- MOORE, R. Y. & EICHLER, V. B. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42, 201-6.
- MORRISON, R. S. & DE VELLIS, J. 1981. Growth of purified astrocytes in a chemically defined medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7205-9.
- MOTORI, E., PUYAL, J., TONI, N., GHANEM, A., ANGELONI, C., MALAGUTI, M., CANTELLI-FORTI, G., BERNINGER, B., CONZELMANN, K. K., GOTZ, M., WINKLHOFFER, K. F., HRELIA, S. & BERGAMI, M. 2013. Inflammation-induced alteration of astrocyte mitochondrial dynamics requires autophagy for mitochondrial network maintenance. *Cell Metab*, 18, 844-59.
- MOURIER, A., MOTORI, E., BRANDT, T., LAGOUGE, M., ATANASSOV, I., GALINIER, A., RAPPL, G., BRODESSER, S., HULTENBY, K., DIETERICH, C. & LARSSON, N. G. 2015. Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. *J Cell Biol*, 208, 429-42.
- MOZDY, A. D., MCCAFFERY, J. M. & SHAW, J. M. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol*, 151, 367-80.
- MURAKAMI, K., KONDO, T., EPSTEIN, C. J. & CHAN, P. H. 1997. Overexpression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. *Stroke*, 28, 1797-804.
- NAGELHUS, E. A. & OTTERSEN, O. P. 2013. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev*, 93, 1543-62.
- NASS, M. M. 1968. Mitochondrial DNA: advances, problems, and goals. *Science*, 165, 25-35.
- NICOLAIDES, N. C. & CHROUSOS, G. P. 2020. Sex differences in circadian endocrine rhythms: Clinical implications. *Eur J Neurosci*.
- NOACK, H., LINDENAU, J., ROTHE, F., ASAYAMA, K. & WOLF, G. 1998. Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitroergic stress. *Glia*, 23, 285-97.
- NUNNARI, J., MARSHALL, W. F., STRAIGHT, A., MURRAY, A., SEDAT, J. W. & WALTER, P. 1997. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell*, 8, 1233-42.
- OHNISHI, T. 1998. Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim Biophys Acta*, 1364, 186-206.
- OKUN, J. G., LUMMEN, P. & BRANDT, U. 1999. Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *J Biol Chem*, 274, 2625-30.
- OLICHON, A., EMORINE, L. J., DESCOINS, E., PELLOQUIN, L., BRICHESE, L., GAS, N., GUILLOU, E., DELETTRE, C., VALETTE, A., HAMEL, C. P., DUCOMMUN, B., LENAERS, G. & BELENGUER, P. 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett*, 523, 171-6.

- ORKAND, R. K., NICHOLLS, J. G. & KUFFLER, S. W. 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol*, 29, 788-806.
- PANDA, S., ANTOCH, M. P., MILLER, B. H., SU, A. I., SCHOOK, A. B., STRAUME, M., SCHULTZ, P. G., KAY, S. A., TAKAHASHI, J. S. & HOGENESCH, J. B. 2002. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109, 307-20.
- PATEL, M., DAY, B. J., CRAPO, J. D., FRIDOVICH, I. & MCNAMARA, J. O. 1996. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron*, 16, 345-55.
- PEEK, C. B., AFFINATI, A. H., RAMSEY, K. M., KUO, H. Y., YU, W., SENA, L. A., ILKAYEVA, O., MARCHEVA, B., KOBAYASHI, Y., OMURA, C., LEVINE, D. C., BACSIK, D. J., GIUS, D., NEWGARD, C. B., GOETZMAN, E., CHANDEL, N. S., DENU, J. M., MRKSICH, M. & BASS, J. 2013. Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science*, 342, 1243-1247.
- PEREA, G., NAVARRETE, M. & ARAQUE, A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, 32, 421-31.
- PERRY, J. J., SHIN, D. S., GETZOFF, E. D. & TAINER, J. A. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 245-62.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PHATNANI, H. & MANIATIS, T. 2015. Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
- PINTEAUX, E., COPIN, J. C., LEDIG, M. & THOLEY, G. 1996. Modulation of oxygen-radical-scavenging enzymes by oxidative stress in primary cultures of rat astroglial cells. *Dev Neurosci*, 18, 397-404.
- PLETJUSHKINA, O. Y., LYAMZAEV, K. G., POPOVA, E. N., NEPRYAKHINA, O. K., IVANOVA, O. Y., DOMNINA, L. V., CHERNYAK, B. V. & SKULACHEV, V. P. 2006. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 518-24.
- PROLO, L. M., TAKAHASHI, J. S. & HERZOG, E. D. 2005. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *J Neurosci*, 25, 404-8.
- PROSSER, R. A., EDGAR, D. M., HELLER, H. C. & MILLER, J. D. 1994. A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Res*, 643, 296-301.
- RADAD, K., GILLE, G. & RAUSCH, W. D. 2008. Dopaminergic neurons are preferentially sensitive to long-term rotenone toxicity in primary cell culture. *Toxicol In Vitro*, 22, 68-74.
- RAE, T. D., SCHMIDT, P. J., PUFAHL, R. A., CULOTTA, V. C. & O'HALLORAN, T. V. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284, 805-8.
- RAHA, S. & ROBINSON, B. H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*, 25, 502-8.
- RALPH, M. R., FOSTER, R. G., DAVIS, F. C. & MENAKER, M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247, 975-8.
- RAPOPORT, S. M. & MULLER, M. 1974. The influence of methylene blue on the respiratory metabolism of the reticulocyte. *Eur J Biochem*, 46, 335-40.
- RAPS, S. P., LAI, J. C., HERTZ, L. & COOPER, A. J. 1989. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res*, 493, 398-401.

- REITER, R. J. 1998. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol*, 56, 359-84.
- RHEE, S. G., BAE, Y. S., LEE, S. R. & KWON, J. 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE*, 2000, pe1.
- RODRIGUEZ, J. J., TERZIEVA, S., OLABARRIA, M., LANZA, R. G. & VERKHRATSKY, A. 2013. Enriched environment and physical activity reverse astrogliodegeneration in the hippocampus of AD transgenic mice. *Cell Death Dis*, 4, e678.
- ROHRDANZ, E., SCHMUCK, G., OHLER, S. & KAHL, R. 2001. The influence of oxidative stress on catalase and MnSOD gene transcription in astrocytes. *Brain Res*, 900, 128-36.
- ROJO, M., LEGROS, F., CHATEAU, D. & LOMBES, A. 2002. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*, 115, 1663-74.
- ROSE, C. R. & RANSOM, B. R. 1996. Mechanisms of H⁺ and Na⁺ changes induced by glutamate, kainate, and D-aspartate in rat hippocampal astrocytes. *J Neurosci*, 16, 5393-404.
- 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.
- SAUNDERS, B. C. & WATSON, G. H. 1950. Studies in peroxidase action; the oxidation of 4-methoxy-2:6-dimethylaniline. Suggestions for a mechanism. *Biochem J*, 46, 629-33.
- SAZANOV, L. A. & HINCHLIFFE, P. 2006. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*, 311, 1430-6.
- SCHAGGER, H. & PFEIFFER, K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, 19, 1777-83.
- SCHIBLER, U. & SASSONE-CORSI, P. 2002. A web of circadian pacemakers. *Cell*, 111, 919-22.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- SCHMUCK, G., ROHRDANZ, E., TRAN-THI, Q. H., KAHL, R. & SCHLUTER, G. 2002. Oxidative stress in rat cortical neurons and astrocytes induced by paraquat in vitro. *Neurotox Res*, 4, 1-13.
- SCHUBERT, D., SOUCEK, T. & BLOUW, B. 2009. The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide. *Eur J Neurosci*, 29, 1323-34.
- SCHULZ, J. B., HENSHAW, D. R., SIWEK, D., JENKINS, B. G., FERRANTE, R. J., CIPOLLONI, P. B., KOWALL, N. W., ROSEN, B. R. & BEAL, M. F. 1995. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem*, 64, 2239-47.
- SEGAL, A. W. & SHATWELL, K. P. 1997. The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 832, 215-22.
- SHEARMAN, L. P., ZYLKA, M. J., WEAVER, D. R., KOLAKOWSKI, L. F., JR. & REPPERT, S. M. 1997. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 19, 1261-9.
- SHERER, T. B., BETARBET, R., TESTA, C. M., SEO, B. B., RICHARDSON, J. R., KIM, J. H., MILLER, G. W., YAGI, T., MATSUNO-YAGI, A. & GREENAMYRE, J. T. 2003. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 23, 10756-64.
- SHERER, T. B., RICHARDSON, J. R., TESTA, C. M., SEO, B. B., PANOV, A. V., YAGI, T., MATSUNO-YAGI, A., MILLER, G. W. & GREENAMYRE, J. T. 2007. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 100, 1469-79.

- SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M. & AMES, B. N. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10771-8.
- SHIH, A. Y., JOHNSON, D. A., WONG, G., KRAFT, A. D., JIANG, L., ERB, H., JOHNSON, J. A. & MURPHY, T. H. 2003. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci*, 23, 3394-406.
- SIES, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 215, 213-9.
- SIES, H. & CADENAS, E. 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 311, 617-31.
- SIMON, N., PAPA, K., VIDAL, J., BOULAMERY, A. & BRUGUEROLLE, B. 2003. Circadian rhythms of oxidative phosphorylation: effects of rotenone and melatonin on isolated rat brain mitochondria. *Chronobiol Int*, 20, 451-61.
- SIMONIAN, N. A. & COYLE, J. T. 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 83-106.
- SMIRNOVA, E., GRIPARIC, L., SHURLAND, D. L. & VAN DER BLIEK, A. M. 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 12, 2245-56.
- SOHAL, R. S., KU, H. H., AGARWAL, S., FORSTER, M. J. & LAL, H. 1994. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev*, 74, 121-33.
- SONG, Z., GHOCHANI, M., MCCAFFERY, J. M., FREY, T. G. & CHAN, D. C. 2009. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell*, 20, 3525-32.
- STEPHEN, T. L., HIGGS, N. F., SHEEHAN, D. F., AL AWABDH, S., LOPEZ-DOMENECH, G., ARANCIBIA-CARCAMO, I. L. & KITTLER, J. T. 2015. Miro1 Regulates Activity-Driven Positioning of Mitochondria within Astrocytic Processes Apposed to Synapses to Regulate Intracellular Calcium Signaling. *J Neurosci*, 35, 15996-6011.
- SUH, Y. A., ARNOLD, R. S., LASSEGUE, B., SHI, J., XU, X., SORESCU, D., CHUNG, A. B., GRIENDLING, K. K. & LAMBETH, J. D. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 401, 79-82.
- SUN, Z. S., ALBRECHT, U., ZHUCHENKO, O., BAILEY, J., EICHELE, G. & LEE, C. C. 1997. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene. *Cell*, 90, 1003-11.
- SUNDAR BOYALLA, S., BARBARA VICTOR, M., ROEMGENS, A., BEYER, C. & ARNOLD, S. 2011. Sex- and brain region-specific role of cytochrome c oxidase in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated astrocyte vulnerability. *J Neurosci Res*, 89, 2068-82.
- SUNDARESAN, M., YU, Z. X., FERRANS, V. J., IRANI, K. & FINKEL, T. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 270, 296-9.
- SWARNKAR, S., SINGH, S., GOSWAMI, P., MATHUR, R., PATRO, I. K. & NATH, C. 2012. Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochem Res*, 37, 2178-89.
- TACCONI, M. T. 1998. Neuronal death: is there a role for astrocytes? *Neurochem Res*, 23, 759-65.
- TAMARKIN, L., REPPERT, S. M. & KLEIN, D. C. 1979. Regulation of pineal melatonin in the Syrian hamster. *Endocrinology*, 104, 385-9.
- TEI, H., OKAMURA, H., SHIGEYOSHI, Y., FUKUHARA, C., OZAWA, R., HIROSE, M. & SAKAKI, Y. 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature*, 389, 512-6.

- TOMKINS, J., BANNER, S. J., MCDERMOTT, C. J. & SHAW, P. J. 2001. Mutation screening of manganese superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, 12, 2319-22.
- TOWER, D. B. & YOUNG, O. M. 1973. The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem*, 20, 269-78.
- TRAVIS, J. 1994. Glia: the brain's other cells. *Science*, 266, 970-2.
- TSANG, C. K., LIU, Y., THOMAS, J., ZHANG, Y. & ZHENG, X. F. 2014. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun*, 5, 3446.
- TSO, C. F., SIMON, T., GREENLAW, A. C., PURI, T., MIEDA, M. & HERZOG, E. D. 2017. Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior. *Curr Biol*, 27, 1055-1061.
- TURRENS, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552, 335-44.
- UCHIYAMA, Y. 1981. Circadian alterations in tubular structures on the outer mitochondrial membrane of rat hepatocytes. *Cell Tissue Res*, 214, 519-27.
- VAN CAUTER, E., HOLMBACK, U., KNUTSON, K., LEPROULT, R., MILLER, A., NEDELTCHEVA, A., PANNAIN, S., PENEV, P., TASALI, E. & SPIEGEL, K. 2007. Impact of sleep and sleep loss on neuroendocrine and metabolic function. *Horm Res*, 67 Suppl 1, 2-9.
- VAN CAUTER, E., PLAT, L. & COPINSCHI, G. 1998. Interrelations between sleep and the somatotrophic axis. *Sleep*, 21, 553-66.
- VAN DER HORST, G. T., MUIJTJENS, M., KOBAYASHI, K., TAKANO, R., KANNO, S., TAKAO, M., DE WIT, J., VERKERK, A., EKER, A. P., VAN LEENEN, D., BUIJS, R., BOOTSMA, D., HOEIJMAKERS, J. H. & YASUI, A. 1999. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398, 627-30.
- VAN MOORSEL, D., HANSEN, J., HAVEKES, B., SCHEER, F., JORGENSEN, J. A., HOEKS, J., SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B., DUEZ, H., LEFEBVRE, P., SCHAPER, N. C., HESSELINK, M. K. C., STAELS, B. & SCHRAUWEN, P. 2016. Demonstration of a day-night rhythm in human skeletal muscle oxidative capacity. *Mol Metab*, 5, 635-645.
- VERKHRATSKY, A., BUTT, A. 2007. Glial Neurobiology A Textbook. *WILEY*, 1-12; 21-23.
- VERKHRATSKY, A., MARUTLE, A., RODRIGUEZ-ARELLANO, J. J. & NORDBERG, A. 2015. Glial Asthenia and Functional Paralysis: A New Perspective on Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *Neuroscientist*, 21, 552-568.
- VERKHRATSKY, A. & NEDERGAARD, M. 2018. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*, 98, 239-389.
- VIDENOVIC, A., LAZAR, A. S., BARKER, R. A. & OVEREEM, S. 2014. 'The clocks that time us'-circadian rhythms in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*, 10, 683-93.
- VIRCHOW, R. 1858. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische and pathologische Gewebelehre. Zwanzig Vorlesungen gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institut zu Berlin., p. 440.
- VOLTERRA, A., TROTTI, D., TROMBA, C., FLORIDI, S. & RACAGNI, G. 1994. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci*, 14, 2924-32.
- VUJOVIC, N., DAVIDSON, A. J. & MENAKER, M. 2008. Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295, R355-60.
- WARBURG, O. 1928. **Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz.**
- WARBURG, O. 1931. The oxygen-transferring ferment of respiration. *Nobel Lecture*.

- WELSH, D. K., LOGOTHETIS, D. E., MEISTER, M. & REPPERT, S. M. 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14, 697-706.
- WIKSTROM, M. 1984. Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone. *FEBS Lett*, 169, 300-4.
- WONG, E. D., WAGNER, J. A., GORSICH, S. W., MCCAFFERY, J. M., SHAW, J. M. & NUNNARI, J. 2000. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol*, 151, 341-52.
- WU, M., ZHOU, F., CAO, X., YANG, J., BAI, Y., YAN, X., CAO, J. & QI, J. 2018. Abnormal circadian locomotor rhythms and Per gene expression in six-month-old triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 676, 13-18.
- XIANG, J., ZHANG, J., CAI, X., YANG, F., ZHU, W., ZHANG, W., CAI, M., YU, Z., LI, X., WU, T., WANG, G. & CAI, D. 2019. Bilobalide protects astrocytes from oxygen and glucose deprivation-induced oxidative injury by upregulating manganese superoxide dismutase. *Phytother Res*, 33, 2329-2336.
- YAFFE, M. P. 1999. Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol*, 1, E149-50.
- YAGITA, K., TAMANINI, F., VAN DER HORST, G. T. & OKAMURA, H. 2001. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, 292, 278-81.
- YAGITA, K., TAMANINI, F., YASUDA, M., HOEIJMAKERS, J. H., VAN DER HORST, G. T. & OKAMURA, H. 2002. Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *EMBO J*, 21, 1301-14.
- YAMAZAKI, S., NUMANO, R., ABE, M., HIDA, A., TAKAHASHI, R., UEDA, M., BLOCK, G. D., SAKAKI, Y., MENAKER, M. & TEI, H. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288, 682-5.
- YANG, G., CHAN, P. H., CHEN, J., CARLSON, E., CHEN, S. F., WEINSTEIN, P., EPSTEIN, C. J. & KAMII, H. 1994. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 25, 165-70.
- YOO, S. H., YAMAZAKI, S., LOWREY, P. L., SHIMOMURA, K., KO, C. H., BUHR, E. D., SIEPKA, S. M., HONG, H. K., OH, W. J., YOO, O. J., MENAKER, M. & TAKAHASHI, J. S. 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 5339-46.
- YOULE, R. J. & KARBOWSKI, M. 2005. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 657-63.
- YOUNG, M. W. & KAY, S. A. 2001. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet*, 2, 702-15.
- YU TAHARA*, AYA YOKOTA*, TAKUYA SHIRAISHI*, SHUNYA YAMADA*, ATSUSHI HARAGUCHI*, AYAKO SHINOZAKI* AND SHIGENOBU SHIBATA* 2016. In vitro and in vivo Phase Changes of the Mouse Circadian Clock by Oxidative Stress.
- ZEVIANI, M. 2004. Mitochondrial disorders. *Suppl Clin Neurophysiol*, 57, 304-12.
- ZHENG, B., LARKIN, D. W., ALBRECHT, U., SUN, Z. S., SAGE, M., EICHELE, G., LEE, C. C. & BRADLEY, A. 1999. The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature*, 400, 169-73.
- ZUCHNER, S., MERSIYANOVA, I. V., MUGLIA, M., BISSAR-TADMOURI, N., ROCHELLE, J., DADALI, E. L., ZAPPIA, M., NELIS, E., PATITUCCI, A., SENDEREK, J., PARMAN, Y., EVGRAFOV, O., JONGHE, P. D., TAKAHASHI, Y., TSUJI, S., PERICAK-VANCE, M. A., QUATTRONE, A., BATTALOGU, E., POLYAKOV, A. V., TIMMERMAN, V., SCHRODER,

J. M. & VANCE, J. M. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, 36, 449-51.

6 Anhang

Tabelle 6: Puffer und Lösungen in der Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
16 % Medium	42 ml DMEM (<i>High Gluc+ GlutaMax</i>) 8 ml FBS 250 µl Penicillin und Streptomycin
10 mM HEPES Puffer #15630-560, Gibco Thermo Fischer Scientific	154 mM
FCS-DMEM-Medium #10568-010, Gibco Thermo Fischer Scientific	16 %/ 20 % (v/v) FCS DMEM-GlutaMax High Glucose Pyruvat PhenolRed Penicillin Streptomycin
Lyse-Puffer	0,1% (v/v) Trypsin 0,02% (w/v) PBS EDTA
PDL	750 µl PDL 14,25 ml PBS
Präparations-Puffer	5 ml 1 M HEPES Puffer 470,5 ml 0,9 % NaCl 0,9 g Glucose 74,55 mg KCL 0,495 g BSA
Rotenon	Stock Lösung 10 mM Versuchskonzentration 1µM
Versuchs-Medium	47,5 ml 1xMEM 1000 µl NeuroBrew (mit Vitamin A) 500 µl Pyruvat 500 µl GlutaMax 500 µl HEPES 233 µl Glucose
cDNA Synthese Kit, Master Mix	4 µl 5x Reaktionspuffer

	1 µl RNase Inhibitor 2 µl 10 mM dNTP's 1 µl M-MuLV RT Enzym
Check-PCR Master Mix	12,5 µl KAPA 2G Fast Ready mix 1 µl 10 µM Sense-Primer Mouse Mfn2 1 µl 10 µM Antisense-Primer Mouse Mfn2 9,5 µl H ₂ O
Agarose Gel	1,5 % (w/v)
qPCR Master Mix	2x KAPA SYBR Fast 10 µM Sense-Primer 10 µM Antisense-Primer Ultra-Pure H ₂ O
Radio Immuno Precipitation Assay buffer (RIPA Puffer)	150 mM Natriumchlorid 1,0 % Triton X 100 0,5 % Sodium descoxycholate 0,1 % (v/v) Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 50mM Tris, pH 8,0
PAA-Gel Trenngel 12 %, 1 mm	30 % (v/v) Acrylamid-Mix 37,5:1 1,5 M Tris HCL pH 8,8 10 % (v/v) SDS Aqua bidest TEMED 10 % (w/v) APO
PAA-Gel Sammelgel 4 %, 1 mm	30 % (v/v) Acrylamid-Mix 37,5: 1 1 M Tris HCL pH 6,8 10 % (v/v) SDS Aqua bidest TEMED 10 % APO
1M Tris pH 6,8	12,1 g Tris Base/ 100 ml <i>Ultra Pure</i> Wasser titriert mit 37 % HCL
1,5M Tris pH 8,8	55,5 g Tris-Base/ 500 ml <i>Ultra Pure</i> Wasser
1x Blott-Wasch-Puffer (=TBS-Tween)	10 ml 1M Tris 100 ml 1,5M NaCl

	890 ml <i>Ultra Pure</i> Wasser 100 µl-500 µl Tween 20
10x Elektrophorese-Puffer	29 g Tribase 144 g Glycin 10 g SDS ad 1 l <i>Ultra Pure</i> Wasser
25x Blott-Puffer	18,2 g Trisbase 90 g Glycin ad 500 ml <i>Ultra Pure</i> Wasser
Probenpuffer 5x SDS nach Laemmli (1ml Aliquots, gelagert bei -20°C)	1 ml 1M Tris pH 6,8 6,2 ml H ₂ O 3,2 ml Glycerol 3,2 ml 10% SDS 1,6 ml 1 % Bromphenolblau (diNasalz) 800 µl Mercaptoethanol
BCA-Arbeitsreagenz	50 Anteile Reagenz A 1 Anteil Reagenz B (Reagenzien aus Kit entnommen)
Versuchs-Medium	47,5 ml MEM 1000 µl Neurobrew 250 µl Pyruvat 250 µl GlutaMax 250 µl HEPES 233,5 µl 75 % Glucose

Tabelle7: Kits

Bezeichnung	Hersteller
CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay #G8080-82	Promega
KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2x)	ABI Prism
KAPA2G Robust Hot Start ReadyMix Cat.No: 07-KK5701-01	

peqGOLD TriFast #30-2010	Peqlab
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622 Lot 00436218	Thermo Fisher Scientific
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
Cyto Tox 96 ® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay G1780	Promega

Danksagung

An erster Stelle danke ich herzlich Frau Prof. Dr. von Gall für die Möglichkeit der Bearbeitung des interessanten Themas in Ihrem Institut, für Ihre wertvolle wissenschaftliche Beratung und die fürsorgliche Betreuung als Doktormutter.

Ebenfalls möchte ich dem Zweitgutachter Prof. Dr. Sascha Weggen danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Victor für die jahrelange Betreuung und die gute Unterstützung. Durch Deine vielen tollen Ideen, die geduldige Einarbeitung und Offenheit für immer neue Rückfragen und Diskussionen wurde diese Arbeit möglich.

Herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie II der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf bedanken. Insbesondere gilt mein Dank hier Frau Dr. Johann und Frau Dr. Tundo für die wissenschaftliche Beratung sowie Frau Lammersen, Frau Hallenberger, Frau Bellert und Herrn Faßbender für die Unterstützung und Einweisung im Labor sowie die moralische Unterstützung außerhalb der Labore.

Außerdem möchte ich mich bei Leon bedanken. Als Team meistern wir jede Herausforderung.

Zum Schluss möchte ich von ganzen Herzen meinen Eltern für die stete und liebevolle Unterstützung danken. Die Fertigstellung dieser Arbeit wurde durch Euren Beistand in herausfordernden Momenten, Euren Rat und nicht zuletzt durch das wiederholte kritische Korrekturlesen möglich.