

**Auswirkungen von G72 Expression auf kognitive Funktionen  
*in vivo* sowie auf mitochondriale Funktionen *in vitro***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Pamela Frisch**  
aus Luxembourg, Großherzogtum Luxembourg

2014

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Rheinischen  
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Zimmer

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Maier

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.04.2014

Aus dem Institut für Molekulare Psychiatrie, Universität Bonn,  
Direktor: Prof. Dr. A. Zimmer

# 1. Inhaltsverzeichnis

2. Abkürzungsverzeichnis .....	6
3. Einleitung .....	8
3.1 Schizophrenie .....	8
3.1.1 Definition und Historisches.....	8
3.1.2 Diagnostik und Klassifikation .....	9
3.1.3 Symptome und Diagnose.....	10
3.1.4 Epidemiologie.....	11
3.1.5 Ätiologie .....	11
3.1.6 Pathophysiologie der Schizophrenie.....	12
3.1.7 Mitochondriale Dysfunktionen und Schizophrenie .....	14
3.2 Der G72/G30 Locus.....	16
3.2.1 G72-1, ein mitochondriales Protein?.....	18
3.2.2 Ist G72-1 ein DAAO Modulator? .....	19
3.2.3 G72 Splicevarianten.....	20
3.2.4 Das G72/G30 Mausmodell und die Entstehung oxidativen Stresses.....	21
4. Ziel der Arbeit.....	26
5. Material und Methoden .....	27
5.1 Materialien .....	27
5.1.1 Geräte .....	27
5.1.2 Objektträger .....	28
5.2 Enzyme.....	28
5.3 Kits.....	28
5.4 Oligonukleotide .....	29
5.5 Antikörper .....	30
5.6 Plasmide.....	31
5.7 Benutzte Zelllinien .....	31
5.8 Größenstandards .....	32
5.9 Lösungen und Chemikalien .....	32
5.10 Zellkulturmedien .....	33
5.10.1 Eukaryotische Zellkultur .....	33
5.10.2 Nährmedien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	34
5.11 Lösungen für indirekte Immunfärbungen.....	34
5.11.1 Lösungen für DNA-Gelelektrophorese .....	35
5.11.2 Lösungen für Protein-Gelelektrophorese und Western Blot.....	35
5.11.3 Lösungen zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität .....	36
5.12 Tierversuche .....	36
5.12.1 Zucht und Haltung der Mäuse.....	36
5.12.2 Die Furchtkonditionierung .....	37
5.12.3 Tonabhängige Furchtkonditionierung.....	37
5.12.4 Bestimmung der Schmerzreaktion .....	38
5.13 Molekularbiologische Methoden .....	39
5.13.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
5.13.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
5.13.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	42
5.13.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	43
5.13.5 Aufreinigung von DNA nach PCR und Restriktionsverdau .....	43

5.13.6	Fällen von DNA .....	43
5.13.7	Sequenzierung von DNA.....	44
5.13.8	DNA-Restriktion .....	44
5.13.9	Herstellung der Transfektionsvektoren .....	44
5.13.10	Herstellung von blunt-Enden nach Restriktionsverdau .....	45
5.14	Methoden im Umgang mit Bakterien .....	45
5.14.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	45
5.14.2	Transformation und Kultur von <i>E. coli</i> .....	45
5.14.3	Präparation von Plasmid-DNA .....	46
5.15	Zellkultur-Methoden.....	47
5.15.1	Allgemeine Zellkulturmethoden.....	47
5.15.2	Passage von Säugerzellen .....	47
5.15.3	Bestimmung der Zellzahl.....	48
5.15.4	Einfrieren und Lagerung von eukaryotischen Zellen.....	48
5.15.5	Auftauen von Zellen .....	48
5.15.6	Mycoplasmen-Test.....	48
5.15.7	Ausdifferenzierung von Neuroblastomzellen.....	49
5.15.8	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	49
5.15.9	Selektion transfizierter Zellen .....	50
5.16	Immunologische Methoden .....	50
5.16.1	Fixierung von Säugerzellen durch Formaldehyd.....	50
5.16.2	Fixierung von Säugerzellen durch Methanol und Aceton.....	50
5.16.3	Immunfärbung von Säugerzellen .....	50
5.16.4	DAPI-Färbung .....	51
5.16.5	Vitalfärbung von Lysosomen mittels LysoTracker.....	51
5.16.6	Vitalfärbung von Mitochondrien mittels MitoTracker .....	52
5.16.7	Anfärbung von Peroxisomen.....	52
5.16.8	Auswertung am Laser-Scanning-Mikroskop (LSM).....	52
5.17	Proteinbiochemische Methoden .....	52
5.17.1	Isolierung von Proteinen aus Zellen.....	52
5.17.2	Proteinbestimmung .....	53
5.17.3	Protein-Gelelektrophorese und Western Blot denaturierter Proteine.....	53
5.17.4	Blot stripping .....	53
5.17.5	Proteinfällung mit Trichloressigsäure .....	54
5.17.6	Isolierung von Mitochondrien aus Zellkultur zur Western Blot Analyse .....	54
5.18	Aktivität mitochondrialer Enzyme und oxidativer Stress.....	55
5.18.1	Herstellung der Zellhomogenate .....	55
5.18.2	Bestimmung der Aconitase Aktivität.....	55
5.18.3	Bestimmung der Citrat Synthase Aktivität.....	55
5.18.4	Bestimmung der Aktivität von Komplex I der Atmungskette .....	56
5.18.5	Berechnung der enzymatischen Aktivitäten .....	57
5.18.6	Bestimmung der Menge an reduziertem Glutathion.....	57
5.18.7	Messung der endogenen Bildung von Wasserstoffperoxid .....	58
5.19	Statistische Methoden .....	58
5.19.1	Programme zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von G72-1 und G72-4 .....	59
6.	Ergebnisse.....	60
6.1	Furchtkonditionierung G72-transgener Tiere.....	60
6.2	Herstellung der Expressionsvektoren für G72-1 und G72-4.....	64
6.2.1	Überprüfung der Transfektionsvektoren.....	66
6.2.2	Herstellung der Mock Kontrolle .....	67

6.2.3	Herstellung von Transfektionsfragmenten aus den jeweiligen Transfektionsvektoren .....	68
6.3	Überprüfung der Transfektionsrate mit Lipofektamin.....	70
6.4	Nachweis von G72-1 und G72-4 in transfizierten Cos7 Zellen mittels Western Blot.....	71
6.5	Die subzelluläre Lokalisation von G72-1 und G72-4 .....	74
6.5.1	Zusammenfassung der Lokalisation von G72-1 und G72-4 in Cos7 Zellen.....	84
6.5.2	Nachweis der subzellulären Lokalisation von G72-1 und G72-4 im Western Blot.	85
6.5.3	Bioinformatische Identifizierung möglicher Zielmotive und Vorhersage der subzellulären Lokalisation von G72-1 und G72-4.....	87
6.6	Aktivitätsmessung mitochondrialer Enzyme in G72-1 und G72-4-transgenen Cos7 Zellen .....	88
6.6.1	Beeinträchtigung der Enzymaktivitäten durch die Kanamycin/Neomycin Resistenz des Transfektionsvektors.....	89
6.6.2	Mock Transfektion von Cos7 Zellen mit der amplifizierten Transfektionssequenz beeinflusst nicht die bestimmten Enzymaktivitäten .....	90
6.6.3	Aktivität der Citrat Synthase, Aconitase und Komplex I in G72-1 und G72-4-transgenen Cos7 Zellen .....	91
6.6.4	Messung der Wasserstoffperoxidproduktion in G72-transgenen Cos7 Zellen.....	94
6.6.5	Messung der Level an reduziertem Glutathion in G72-transgenen Cos7 Zellen ...	95
7.	Diskussion.....	96
7.1	Furchtkonditionierung G72-transgener Tiere.....	96
7.2	Expression von G72-1 und G72-4 in verschiedenen Zelllinien.....	98
7.3	Die subzelluläre Lokalisation von G72-1 .....	99
7.4	Die zelluläre Lokalisation von G72-4 .....	101
7.5	Aktivitätsmessung mitochondrialer Enzyme und oxidativer Stress in G72-1-transgenen Cos7 Zellen.....	104
7.6	Aktivitätsmessung mitochondrialer Enzyme und oxidativer Stress in G72-4-transgenen Cos7 Zellen.....	107
7.7	Vergleich der Aktivität mitochondrialer Enzyme und des oxidativen Stress in G72-1 und G72-4-transfizierten Cos7 Zellen vs. G72-transgenen Tieren .....	109
7.8	Zusammenfassung: Mitochondriale Veränderungen durch G72 Expression in Cos7 Zellen .....	111
8.	Zusammenfassung und Ausblick .....	112
9.	Anhang.....	114
10.	Literaturverzeichnis.....	115
11.	Danksagung.....	124
12.	Veröffentlichungen .....	125

## 2. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CS	Citrat Synthase
cDNA	<i>copy</i> Desoxiribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
FCS	fötale Kälberserum
G	Guanin
GSH	Glutathion
h	Stunde
Kan	Kanamycin
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny broth
MCS	<i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA

NeoR	G418-Resistenz
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBS-CMF	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung ohne Ca und Mg
pCMV	Zytomegalievirus-Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rotation pro min
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumlaurylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp
Zeo	Zeocin
Zeo <sup>r</sup>	Zeocin Resistenz
ZNS	Zentralnervensystem

### **3. Einleitung**

#### **3.1 Schizophrenie**

Die Schizophrenie gehört zu den endogenen Psychosen. Es kommt zum Auftreten von sehr vielgestaltigen psychopathologischen Krankheitsbildern wie Wahn, Halluzinationen, formalen Denkstörungen, Ich-Störungen, Affektstörungen und psychomotorischen Störungen (Ebert, 2008).

##### **3.1.1 Definition und Historisches**

Emil Kraepelin fasste bereits Ende des 19. Jahrhunderts die diversen Erscheinungsbilder der Schizophrenie unter dem Namen "*Dementia praecox*" (vorzeitige Demenz) zusammen. Diesen Begriff wählte er in Anlehnung an den im Vergleich zur Altersdemenz untypisch frühen Krankheitsbeginn (*praecox*) und den chronisch verlaufenden kognitiven Verfall (*dementia*) (Ebert, 2008). Eugen Bleuler betitelte die Krankheit 1911 erstmals als Schizophrenie (Moskowitz und Heim, 2011). Er erkannte die gemeinsamen Grundsymptome bei allen Formen der Kraepelinschen *Dementia praecox*, aus denen er dann akzessorische Symptome psychodynamisch ableitete (Tab. 1). Er beobachtete, dass weder eine Demenz im üblichen Sinne eintritt, noch ein früher Beginn der Erkrankung zwingend ist und prägte stattdessen den heute gebräuchlichen Begriff der Schizophrenie. Der Begriff setzt sich aus dem griechischen „schizo“ (spalten, gespalten) und „phren“ (Geist, Bewusstsein) zusammen und weist auf die Spaltung, die innere Zerrissenheit des Denkens, Fühlens und Handelns hin. Auch die heutige Klassifikation nach ICD -10 (International Classification of Diseases, World Health Organisation, 2006) und DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 2007) beruht noch größtenteils auf den Ansätzen von Kraepelin (Ebert, 2008).

### 3.1.2 Diagnostik und Klassifikation

Die diagnostischen Merkmale der Schizophrenie werden nach E. Bleuler und K. Schneider zusammengefasst (Tab. 1). E. Bleuler unterscheidet hierbei Grundsymptome von akzessorischen Symptomen. Bei K. Schneider wird zwischen Symptomen des 1. und 2. Ranges unterschieden (Ebert, 2008).

Tab. 1: Grundsymptome und akzessorische Symptome der Schizophrenie, modifiziert nach E. Bleuler sowie Symptome ersten und zweiten Ranges der Schizophrenie nach K. Schneider. Modifiziert nach Ebert, 2008.

<b>E. Bleulers Konzept</b>	<b>K. Schneiders Konzept</b>
<b>Grundsymptome:</b>	<b>Symptome 1. Ranges:</b>
Formale Denkstörungen (v.a. Zerfahrenheit)	Wahnwahrnehmung
Störungen der Affektivität (v.a. Ambivalenz, Affektverflachung)	Akustische Halluzinationen (Dialogisierte, kommentierende Stimmen, Gedankenlautwerden)
Autismus (Loslösung von der Wirklichkeit)	Ich-Störungen (Gedankenentzug, Gedankeneingebung, Gedanken- ausbreitung)
Störungen der Person (Depersonalisation)	Leibeshalluzinationen (Leibliche Beeinflussungserlebnisse)
<b>Akzessorische Symptome:</b>	<b>Symptome 2. Ranges:</b>
Wahn	Sonstige akustische Halluzinationen
Halluzinationen	Sonstige Halluzinationen (optisch, olfaktorisch, gustatorisch)
Andere nicht zu den Grundsymptomen gehörende Symptome wie z.B. katatone Symptome	Zönästhesien
	Wahneinfall, Wahngedanke

Durch die Fülle an klinischen Symptomen wird die Schizophrenie je nach Symptomkombination in verschiedene Subtypen unterteilt. Tab. 2 zeigt die nach ICD-10 und DSM-IV definierten Subtypen der Schizophrenie (Dilling und Freyberger, 2011).

Tab. 2: Subtypen der Schizophrenie nach ICD-10 und DSM-IV.

ICD-10 (F20.0-F20.9)	DSM-IV (295.00-295.90)
Paranoide Schizophrenie	Paranoider Typ
Hebephrene Schizophrenie	Desorganisierter Typ
Katatone Schizophrenie	Katatoner Typ
Undifferenzierte Schizophrenie	Undifferenzierter Typ
Postschizophrene Depression	Residualer Typ
Schizophrenes Residuum	Schizoaffektive Störung
Schizophrenia simplex	Schizophreniforme Störung
Sonstige Schizophrenie	
Schizophrenie, nicht näher bezeichnet	

### 3.1.3 Symptome und Diagnose

Im Vordergrund der Symptomatik bei der Schizophrenie stehen die Störungen des Ich-Erlebens, des Denkens, der Realitätsauffassung und Wahrnehmung sowie Affektveränderungen, wobei das Bewusstsein nicht gestört ist. Da das Erscheinungsbild der Schizophrenie dermaßen vielgestaltig ist, ist eine allgemeine Definition unmöglich. In der Tat können Symptome bei machen Verlaufsformen entweder gar nicht auftreten oder nur sehr leicht oder schwer ausgeprägt sein. Am geläufigsten ist die Einteilung der Symptomatik der Schizophrenie in Positiv- und Negativsymptome (Ebert, 2008). Unter der Positivsymptomatik versteht man Übersteigerungen und starke Fehlinterpretationen des normalen Erlebens. Hierzu gehören Wahnvorstellungen, Halluzinationen und Ich-Erlebnis-Störungen wie Gedankeneingebung und Gedankenentzug, also die Symptome des ersten und zweiten Ranges nach K. Schneider. Unter der Negativsymptomatik versteht man Charakterzüge oder Verhaltensweisen, welche beim Gesunden vorhanden sind, jedoch durch die Erkrankung reduziert werden oder gar nicht mehr vorzufinden sind. Dies sind Symptome wie Alogie, Affektverflachung, Apathie, Anhedonie, Asozialität und Aufmerksamkeitsstörungen. Diese Negativsymptome sind mit denen von Bleuler definierten Grundsymptomen gleichzusetzen (Ebert, 2008).

Die diagnostische Leitlinie der Schizophrenie nach ICD-10 zeigt Tab. 3.

Tab. 3: Diagnostische Leitlinien der Schizophrenie, modifiziert nach ICD-10 (Dilling und Freyberger, 2011).

Mindestens ein eindeutiges Symptom (oder zwei, wenn weniger eindeutig) der <b>Gruppe A:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gedankenlautwerden, Gedankeneingebung, Gedankenentzug, Gedankenausbreitung</li> <li>- Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Gefühl des Gemachten (deutlich bezogen auf Körper- oder Gliederbewegungen oder bestimmte Gedanken, Tätigkeiten oder Empfindungen), Wahnwahrnehmungen</li> <li>- Kommentierende oder dialogische Stimmen</li> <li>- Anhaltender, kulturell unangemessener und völlig unrealistischer Wahn</li> </ul>
Oder mindestens zwei Symptome der <b>Gruppe B:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität, täglich über Wochen und Monate begleitet von Wahngedanken ohne deutliche affektive Beteiligung</li> <li>- Zerfahrenheit oder Danebenreden (Neologismen, Gedankenabreißen...)</li> <li>- Negativsymptome wie auffällige Apathie, Sprachverarmung, Affektverarmung Affektverflachung oder inadäquate Affekte</li> </ul>
Die Symptome sollen mindestens für 4 Wochen die meiste Zeit bestehen, ansonsten sollte die Diagnose einer schizophreniformen Störung gestellt werden
Die Symptome können durch keine organische Störung erklärt werden

### 3.1.4 Epidemiologie

Die Prävalenz der Schizophrenie liegt bei 0,5 bis 1 %. Das durchschnittliche Prädilektionsalter liegt bei Männern bei ungefähr 21 Jahren, bei Frauen bei ungefähr 26 Jahren (Saha et al., 2005). Durch diese frühe Manifestation handelt es sich bei der Schizophrenie um eine Krankheit, die die Betroffenen ein Leben lang begleitet und stark beeinträchtigt. Dies zeigt auch die 10-fach, im Vergleich zur Normalpopulation, erhöhte Suizidrate bei schizophrenen Patienten (Auquier et al., 2006). Lange Zeit wurde angenommen, dass das Erkrankungsrisiko für Frauen und Männer identisch ist. Neuere Studien zeigen jedoch, dass Männer mit einem Erkrankungsrisiko von etwa 1,4 % ein etwas höheres Erkrankungsrisiko als Frauen haben (Aleman et al., 2003, McGrath et al., 2004).

### 3.1.5 Ätiologie

Die Ursachen der Schizophrenie werden seit langem intensiv erforscht. Man geht heutzutage von einer multifaktoriellen Entstehung der Krankheit mit genetischer Komponente aus (Tsuang, 2000). Das Risiko für die Krankheitsentwicklung erhöht sich mit zunehmender genetischer Verwandtschaft (McGuffin et al., 1995, Pedersen und Mortensen,

2001). Das Erkrankungsrisiko liegt bei 1 % in der allgemeinen Bevölkerung, bei Verwandten dritten Grades bereits bei ca. 2 %, bei Verwandten zweiten Grades bei ca. 6 % und bei Verwandten ersten Grades sogar um die 9 % (Tsuang et al., 2001). Zwillingsstudien ergaben Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen von 41 % bis 65 %, verglichen mit 0 % bis 28 % bei dizygoten Zwillingen. Die Schätzungen der Heritabilität reichen in der Tat bis zu 85 % (Tsuang et al., 2001). Neben der genetischen Komponente beeinflussen auch epigenetische und Umweltfaktoren die Krankheitsentstehung. Dazu gehören beispielsweise Urbanität (zwei bis dreifach erhöhtes Risiko) (Pedersen und Mortensen, 2001), Migration (zwei bis dreifach erhöhtes Risiko) (Cantor-Graae und Selten, 2005), pränatale virale Infektionen (Messias et al., 2007), Geburt in den Wintermonaten (1,1 erhöhtes Risiko) (Messias et al., 2007), perinatale Schädigungen wie Sauerstoffmangel (Messias et al., 2007), Cannabiskonsum (zweifaches Risiko) (Moore et al., 2007) und psychosoziale Faktoren (Messias et al., 2007). Von großer Bedeutung für die Ätiologie der Schizophrenie ist das Vulnerabilitäts-Stress-Modell („*two-hit*“-Hypothese), welches von Zubin und Spring 1977 eingeführt und von Nuechterlein und Dawson später weiterentwickelt wurde (Zubin und Spring, 1977, Nuechterlein und Dawson, 1984). Die „*two-hit*“-Hypothese besagt, dass frühe prä- oder perinatale Störungen des zentralnervösen Entwicklungsprozesses („*first-hit*“) Risikofaktoren darstellen und neuronale Entwicklungsvorgänge gestört werden, so dass reife Neurone und Schaltkreise vulnerabel für später folgende zusätzliche Faktoren („*second-hit*“) sind. Diese führen dann letztlich zum Ausbruch der Krankheit (Maynard et al., 2001).

### 3.1.6 Pathophysiologie der Schizophrenie

Im Fokus der Pathogenese der Schizophrenie stehen seit jeher das dopaminerge-, serotonerge und glutamaterge Transmittersystem (Lang et al., 2007). Im Folgenden wird unter anderem kurz auf die Rolle dieser Transmitter in der Schizophrenie eingegangen.

Die Überaktivität des zentralnervösen dopaminergen Systems bei der Schizophrenie wurde bereits in den sechziger Jahren nachgewiesen (Carlsson und Lindqvist, 1963, Carlsson, 1967). Unterstützt wird diese Hypothese unter anderem dadurch, dass fast alle Neuroleptika ihre antipsychotische Aktivität über die Blockade postsynaptischer Dopamin-D2-Rezeptoren entwickeln (Miyamoto et al., 2003a). Limitiert hingegen wird die

Hypothese dadurch, dass klassische Neuroleptika zwar eine Besserung der Positivsymptomatik bewirken, jedoch die negativen Symptome kaum beeinflussen (Meltzer, 1997). Ende der 80er Jahre wurde eine zum Teil modifizierte Dopaminhypothese beschrieben. Diese geht nicht mehr von einem generellen Überangebot an Dopamin aus, sondern es steht eine Imbalance zwischen kortikalen und subkortikalen dopaminergen Systemen im Vordergrund (Davis et al., 1991, Miyamoto et al., 2003a). Die Hyperaktivität des mesolimbischen Dopaminsystems erklärt die Entstehung positiver Symptomatik, die dopaminerge Hypoaktivität im frontalen Bereich ist für die schizophrene Negativsymptomatik verantwortlich (Davis et al., 1991, Miyamoto et al., 2003a). Des Weiteren konnte in molekulargenetischen Studien eine Assoziation des COMT (Catechol-O-Methyltransferase)-Gens mit der Schizophrenie gezeigt werden (Li et al., 2000, Shifman et al., 2002). Die COMT ist, zusammen mit den Monoaminoxidasen (MAO), für den Abbau von Dopamin verantwortlich und spielt somit ebenfalls eine Rolle in der dopaminbasierten Theorie über die Entstehung der Schizophrenie.

Neben dem dopaminergen spielt auch das serotonerge System eine Rolle in der Entstehung der Schizophrenie. In der Tat ist die Anzahl an 5-HT<sub>2A</sub> Rezeptoren im Cortex bei Schizophrenie-Patienten herunterreguliert, 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren sind dagegen hochreguliert (Sawa und Snyder, 2002, Miyamoto et al., 2003a). Assoziationsstudien konnten die Rolle dieser Rezeptoren in der Schizophrenie bestätigen (Lieberman et al., 1998, Harrison, 1999).

Des Weiteren konnte eine Hypofunktion des Glutamatsystems als potentielle Ursache für die Krankheitsentstehung nachgewiesen werden (Coyle, 1996, Abi-Saab et al., 1998, Olney et al., 1999). NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren werden durch die Bindung von Glutamat an die NR2B-Untereinheit aktiviert, wenn gleichzeitig ein allosterischer Co-Aktivatoren, D-Serin oder Glycin, an die NR1-Untereinheit bindet (Dingledine et al., 1999). Fehlerhafte glutamaterge Transmission führt zu dopaminergem Dysregulation in striatalen und prefrontalen Gehirnregionen (Miyamoto et al., 2003a, Lang et al., 2007, Kantrowitz und Javitt, 2012). Glutamaterge Rezeptoren besitzen neben den Bindungsstellen für D-Serin und Glycin auch eine Glutathion (GSH)-sensitive Redox Stelle. Diese verschiedenen Modulationsstellen der NMDA Rezeptoren stellen ebenfalls Ansatzpunkte für die Therapie schizophrener Symptome dar (Kantrowitz und Javitt, 2012).

Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass der D-Serin Spiegel in Schizophrenie-Patienten vermindert ist. Diese D-Serin Dysfunktion kann somit für eine NMDA Rezeptor Hypofunktion verantwortlich sein (Hashimoto et al., 2005). Eine Medikation mit D-Serin zusätzlich zu Risperidon und Olanzapin führte in klinischen Versuchen zu einer Verminderung der positiven sowie negativen Symptome (Heresco-Levy, 2005).

Das pharmakologische Wirkprofil der oft wirkungsvolleren, atypischen Neuroleptika, welche ihre Wirkung auch über serotonerge, acetylcholinerge und noradrenerge Rezeptoren entfalten, deutet dabei auf noch weitaus komplizierterer Fehlfunktionen von unterschiedlichsten Neurotransmittersystemen hin.

### **3.1.7 Mitochondriale Dysfunktionen und Schizophrenie**

Obwohl mitochondriale Dysfunktionen und oxidativer Stress bei der Pathophysiologie verschiedener neuropsychiatrischer, vor allem aber degenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Chorea Huntington, bereits in der Vergangenheit diskutiert wurden (Rezin et al., 2009, Manji et al., 2012, Marazziti et al., 2012, Zhang und Yao, 2013), standen mitochondriale Mechanismen bei der Schizophrenie bislang nicht im Vordergrund. Verschiedene neue Forschungsergebnisse haben allerdings gezeigt, dass oxidativer Stress durchaus eine Rolle bei der Pathogenese der Schizophrenie und bei bipolaren Störungen sowie Depressionen spielt (Prabakaran et al., 2004, Altar et al., 2005, Jou et al., 2009, Manji et al., 2012, Marazziti et al., 2012). Konsens hierbei ist, dass die mitochondriale Dysfunktion zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und zu Neurodegeneration durch Apoptose führt.

Ein wichtiger Hinweis auf eine Rolle mitochondrialer Dysfunktionen bei affektiven Störungen ist die hohe Komorbidität mitochondrialer Erkrankungen wie z.B. mitochondriale Enzephalopathie, Lebers disease sowie Diabetes mellitus mit Depressionen, bipolaren Störungen, Psychosen, Angststörungen und Schizophrenie (Jou et al., 2009).

Neue Forschungsergebnisse deuten ebenfalls auf eine Verbindung auf molekularer Ebene zwischen mitochondrialer Dysfunktion und affektiven Störungen hin. So besitzen Schizophrenie-Patienten geringere Mengen an reduziertem Glutathion (GSH) (Do et al., 2000, Tsai et al., 2013), erhöhte Malondialdehyd Level (Zhang et al., 2007b) und zeigen

Veränderungen der Aktivität verschiedener antioxidativer Enzyme wie der Katalase, der Superoxiddismutase sowie der Glutathionperoxidase (Fendri et al., 2006, Zhang et al., 2006, Tsai et al., 2013). Mehrere Studien konnten neben verminderten GSH Level eine verminderte Aktivität der Glutathionperoxidase im Serum und im ZNS an Schizophrenie erkrankten Patienten belegen (Raffa et al., 2009, Raffa et al., 2011, Tsai et al., 2013, Wu et al., 2013). Ein wichtiger Aspekt der mitochondrialen Dysfunktion ist die gestörte Integrität der Zellmembran durch Lipidoxidation. Instabilität, veränderte Fluidität und Permeabilität der neuronalen Zellmembran können in hohem Maße die neuronale Transmission stören (Fendri et al., 2006, Wu et al., 2013, Zhang und Yao, 2013).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur neuronaler Mitochondrien in Schizophrenie-Patienten legten eine veränderte Morphologie, Größe und Dichte der Mitochondrien im präfrontalen Cortex und Nucleus Caudatus dar (Rezin et al., 2009). Kato et al. konnten des Weiteren durch fMRT Studien einen gestörten Energiestoffwechsel im Gehirn von Schizophrenie-Patienten demonstrieren (Kato, 2005). Bei den untersuchten Patienten wurden verminderte pH Werte, welche auf einen verstärkten Laktatstoffwechsel hindeuten, sowie geringere ATP Level gemessen (Kato, 2005). All dies deutet auf einen verminderten Energiestoffwechsel in den betroffenen Zellen hin. Interessanterweise weisen vermehrt Studien auf ein Zusammenspiel einer Dysfunktion von Komplex I der Atmungskette und resultierendem oxidativen Stress in der Schizophrenie hin (Andreazza et al., 2010, Clay et al., 2011). Es wurden ebenso verminderte RNA- sowie Protein Level von Komplex I und IV betroffener Patienten im präfrontalen Cortex und im Striatum *post-mortem* nachgewiesen (Ben-Shachar und Karry, 2008, Jou et al., 2009). Da die Atmungskette Hauptproduktionsort reaktiver Sauerstoffspezies ist und für eine ausreichende Energieproduktion in den Zellen unabdingbar ist, deuten auch diese Daten auf mitochondriale Dysfunktion als eine der Ursachen für die Genese der Schizophrenie hin.

Auf genetischer Ebene wurden verschiedene *copy number variations* und Deletionen mitochondrialer Gene mit affektiven Störungen assoziiert (Jou et al., 2009, Anglin et al., 2012). Im Zusammenhang mit den oben genannten Studien zeigt uns der klinische Erfolg und die therapeutische Wirksamkeit verschiedener Antioxidantien wie Omega-3-Fettsäuren, Vitamin C und E und N-Acetylcystein in Schizophrenie-Patienten die Be-

deutung dieser neuen pathophysiologischen Erkenntnisse (Sivrioglu et al., 2007, Dean et al., 2011, Zhang und Yao, 2013).

### **3.2 Der G72/G30 Lokus**

Humane Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien lieferten eine große Anzahl an Kandidatengenen die an der Pathophysiologie der Schizophrenie beteiligt sind. Über 1400 Studien lieferten über 780 Gene, die möglicherweise eine Rolle spielen (Allen et al., 2008). Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht der G72/G30 Genloкус, welcher sich in der Region SCZD7 auf dem humanen Chromosom 13q32-q33 (MIM 603176) befindet.

In 24 von 35 Studien fand man eine Assoziation von Mutationen im G72/G30 Gen, ein allein in Primaten vorkommendes Gen, mit der Schizophrenie (Allen et al., 2008). Chumakov et al. konnten 2002 diese Genregion erstmals eingrenzen und in zwei Schizophrenie-Kohorten signifikante Assoziationen mit dem G72/G30 Lokus nachweisen (Chumakov et al., 2002, Abou Jamra et al., 2006). Dies konnte durch mehr als 25 unabhängige Fall-Kontroll und Familien-basierte Studien repliziert werden (Abou Jamra et al., 2006, Detera-Wadleigh und McMahon, 2006). Eine Meta-Analyse konnte hoch signifikante Assoziationen von Schizophrenie mit mehreren genetischen Markern im G72/G30 Lokus nachweisen (Detera-Wadleigh und McMahon, 2006). Neben der Schizophrenie ist der G72/G30 Lokus ebenfalls mit anderen psychiatrischen Erkrankungen wie bipolaren Störungen (Addington et al., 2004, Schumacher et al., 2004, Prata et al., 2008), Panik Störungen (Hamilton et al., 2003) sowie Depressionen (Rietschel et al., 2008) assoziiert. In einer *post-mortem* Studie mit Hirngewebe aus 40 an einer schizophrenen Psychose erkrankten Patienten konnte eine vermehrte Expression von G72 im dorsolateralen und präfrontalen Cortex gezeigt werden (Korostishevsky et al. 2004). Im Plasma erkrankter Patienten konnten im Vergleich zu gesunden Probanden ebenfalls signifikant höhere G72- Protein Level festgestellt werden (Lin et al., 2013). Des Weiteren konnten Goldberg et al. eine starke Assoziation zwischen G72 und neurokognitiven Fähigkeiten nachweisen (Goldberg et al., 2006). G72 spielt ebenfalls eine Rolle in der Ausprägung prodromaler Symptome der Schizophrenie (Mossner et al., 2009) sowie charakteristi-

scher struktureller Veränderungen des ZNS (zentralen Nervensystems) in der Schizophrenie und bei bipolaren Störungen (Zuliani et al., 2009, Hartz et al.). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der G72/G30 Locus mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Pathophysiologie der Schizophrenie beteiligt ist und eine wichtige Rolle in der Progression und der Entwicklung klinischer Symptome spielt. In Abb. 1 ist der humane G72/G30 Locus schematisch dargestellt.

Chr13: 104916217-104941383

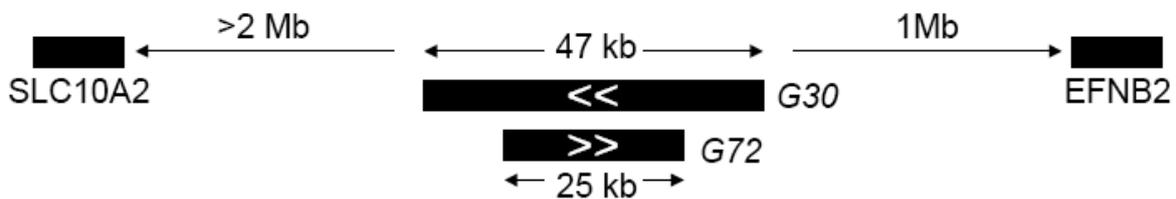


Abb. 1: Der humane G72/G30 Genlocus. Dargestellt sind die beiden benachbarten Gene EFNB2 und SLC10A2 mit den jeweiligen Abständen zum G72/G30 Locus. G72 befindet sich auf einem 25 kb großen Bereich auf dem Vorwärtsstrang, G30 auf einem 47 kb großen Bereich auf dem gegenüberliegenden Rückwärtsstrang (ensembl release, 2012: ensembl genome browser. [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000182346; r=13:106118216-106143383](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000182346; r=13:106118216-106143383). (Zugriffsdatum: 12.10.2012)).

G72 und G30 werden von überlappenden gegenläufigen DNA-Strängen transkribiert (Abou Jamra et al., 2006). Beide Gene sind erst spät in der Evolution entstanden und nur im Genom anthropoider Primaten enthalten (Chumakov et al., 2002). G72 umfasst einen Sequenzbereich von 25 kb und besteht aus 10 Exons, wobei verschiedene Splicevarianten beschrieben sind (Chumakov et al., 2002, Cheng et al., 2013). Mittels Reverse Transkriptionsanalyse (RT-PCR) konnten G72 Transkripte im ZNS und Testis festgestellt werden. Im Menschen wurden bisher lediglich Translationsprodukte von G72-1 im ZNS und Testis gefunden (Chumakov et al., 2002, Abou Jamra et al., 2006, Cheng et al., 2013). G72-1 (LG72), ein 742 bp großes Transkript, ist das längste und bisher am besten analysierte Transkript. Das G72-1 Transkript kommt in der Amygdala, im Nucleus caudatus, Rückenmark und Testis vor. Das Protein G72-1 (LG72, AY138546) besteht aus 153 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 18108 Da. Die Splicevariante G72-4 (nach Otte et al., 2009) ist eine N-terminal verkürzte Version von

G72-1. Die mRNA von G72-4 besteht aus 249 bp; das putative Protein aus 82 Aminosäuren besitzt eine Molekularmasse von 14,7 kDa. Obwohl es noch eine Reihe anderer Splicevarianten gibt, wurden hierzu noch keine Proteine *in vivo* nachgewiesen.

Für G30 (DAOA antisense RNA 1, DAOA-AS1) konnte - im Gegensatz zu G72 - bisher noch kein Translationsprodukt beschrieben werden. Möglicherweise übt G30 eine Regulatorfunktion auf G72 aus und wird selbst nicht transkribiert. Für LG30, das längste Transkript von G30, wurden RNA-Transkripte im Cortex sowie in subcortikalen Regionen nachgewiesen (Chumakov et al. 2002).

Sämtliche G72/G30 Transskripte sind im Menschen schwach exprimiert (Abou Jamra et al., 2006). Gegenwärtig werden zwei mögliche Funktionen von G72-1 diskutiert: Die Modulation der D-Aminosäureoxidase (DAAO) sowie eine mitochondriale Funktion.

### **3.2.1 G72-1, ein mitochondriales Protein?**

G72-1, die längste der G72-Splicevarianten, konnte in Mitochondrien von HeLa Zellen sowie in G72-1-transfizierten Cos7 Zellen und primären hippocampalen Neuronen der Ratte nachgewiesen werden (Kvajo et al., 2007). Das mitochondriale Lokalisationssignal befindet sich laut Kvajo et al. in den ersten 20 bis 50 N-terminalen Aminosäuren von G72-1. Kvajo et al. stellten verschiedene N- und C-terminal verkürzte Formen von G72-1 her und bestimmten deren zelluläre Lokalisation. Eine um 43 C-terminale Aminosäuren verkürzte Form zeigte ebenso wie das unverkürzte Protein eine mitochondriale Lokalisation. Fehlen G72-1 25 beziehungsweise 35 N-terminale Aminosäuren, befand sich das Protein sowohl im Cytoplasma als auch in Mitochondrien. Wurden in dieser Versuchreihe jedoch die 50 N-terminalen Aminosäuren entfernt, beschrieben die Autoren den Abbau des Proteins. Weitere Versuche konnten eine mitochondriale Lokalisation von G72-1 in transgenen Gliazellen nachweisen (Sacchi et al., 2011). Kvajo et al. konnten des Weiteren nachweisen, dass die Mitochondrien G72-1 exprimierender Zellen vermehrt fragmentierte und vesikuläre Formen aufwies. In den untersuchten transfizierten Zellen wurden keine Anzeichen für G72-1 induzierte Apoptose gefunden (Kvajo et al., 2007).

### 3.2.2 Ist G72-1 ein DAAO Modulator?

*Yeast two-hybrid* und biochemische Experimente zeigten eine Protein-Protein Interaktion zwischen G72-1 und DAAO (Chumakov et al., 2002, Sacchi et al., 2008). Wie diese Interaktion die DAAO-Aktivität modelliert, ist zur Zeit noch unklar, da funktionelle Untersuchungen zu widersprüchlichen Ergebnissen gekommen sind (Chumakov et al., 2002, Sacchi et al., 2008).

Chumakov et al. beschrieben G72 als DAAO Aktivator und zeigten in Zellkultur-Experimenten eine Lokalisation von G72-1 im endoplasmatischen Retikulum beziehungsweise im Golgi Apparat transgener Cos7 Zellen (Chumakov et al., 2002). Die Funktion der DAAO ist hinlänglich bekannt: Sie oxidiert unter physiologischen Bedingungen D-Serin, ein allosterischer Co-Aktivator des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Glutamat-Rezeptors.

Sacchi et al. postulierten, dass G72-1 die DAAO Aktivität inhibiert (Sacchi et al., 2008). Immunhistochemische Analysen dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass beide Proteine in humanen Astrozyten des Cortex lokalisiert sind. Es konnte eine Kolo-kalisation von G72-1 und der DAAO sowohl im Cytoplasma als auch an der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen werden (Sacchi et al., 2008, Sacchi et al., 2011). Co-Immunopräzipitation beider Proteine zeigte eine Interaktion von DAAO und G72-1, welche eine Veränderung der DAAO-Tertiärstruktur zur Folge hatte und die Aktivität der DAAO erwies sich als reduziert (Sacchi et al., 2008). Die Autoren schlossen daraus, dass G72-1 bei schizophrenen Patienten vermindert exprimiert sein könnte.

Aus zellbiologischer Sicht ist es umstritten, ob G72-1 die DAAO moduliert. Die DAAO ist ein peroxisomales Enzym und G72-1 konnte bis dato in diesem Kompartiment nicht lokalisiert werden (Sacchi et al., 2008). Des Weiteren haben Otte et al. die Lokalisation der G72-mRNA mit der der DAAO-mRNA im Cerebrum der G72/G30-transgenen Tiere mittels *in-situ*-Hybridisierung bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Transkripte nur in wenigen Zellen co-exprimiert werden (Otte et al., 2009). Die Messung der DAAO-Aktivität mittels spektrometrischer Methoden hat ebenfalls keine Unterschiede zwischen G72-transgenen Tieren und Kontrolltieren gezeigt und die Bestimmung der D-Serin Le-

vel in verschiedenen Hirnarealen ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp und transgenen Tieren (Otte et al., 2009).

### 3.2.3 G72 Splicevarianten

Bis dato sind 10 verschiedene G72 Splicevarianten im Menschen identifiziert (UCSC Datenbank, 2012: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> (Zugriffsdatum: 22.02.2013)), (Otte et al., 2009, Cheng et al., 2013). In Abbildung 2 (modifiziert nach Otte et al., 2009) sind die sechs in den G72-transgenen Tieren exprimierten Varianten dargestellt.

In der hier vorgestellten Dissertation werden die Varianten G72-1 und G72-4 untersucht. Zur funktionellen Untersuchung von G72 *in vivo* wurden transgene Mäuse mit dem humanen G72/G30 Genlocus generiert (Otte et al., 2009). Die transgenen Tiere zeigen Expression verschiedener G72-Splicevarianten (Abb. 2). Im ZNS der transgenen Tiere ist G72 besonders stark im Cerebellum, Hippocampus, Cortex und Bulbus olfaktorius exprimiert. Das G72-1 Protein wurde mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese in cerebellären Lysaten der transgenen Tiere nachgewiesen (Otte et al., 2009). G72-4 wurde im ZNS der transgenen Nagetiere besonders stark exprimiert.



Abb. 2: Dargestellt ist die Exon/Intron-Struktur der in den G72/G30-transgenen Tieren

exprimierten Transkripte. G72-1 bis 4 stellen bereits bekannte humane Splicevarianten dar. Die in den transgenen Tieren neu entdeckten Transkripte wurden G72-5 und G72-6 benannt. G72-1 und G72-4 (mit roten Pfeilen markiert) sind die in dieser Dissertation untersuchten Transkripte. Die translatierten Bereiche von G72-1 und G72-4 sind durch schwarze Balken markiert. Modifiziert nach Otte et al., 2009 .

Abb. 3 zeigt die Aminosäuresequenzen von G72-1 und G72-4. Bei G72-1 handelt es sich um ein 153 Aminosäuren großes Protein mit einem möglichen mitochondrialen Lokalisationssignal am N-Terminus (Kvajo et al., 2007). Chumakov et al. identifizierten eine putative Bindungsstelle für die D-Aminosäureoxidase (DAAO) an 89 Aminosäuren im C-terminalen Bereich von G72-1 (Chumakov et al., 2002). G72-4 ist eine N-terminal verkürzte Variante des Proteins.

```

G72-1  MLEKLMGADSLQLFRSRYTLGKIYFIGFQKSILLSKSENSLNSIA
      MLEKLMGADSLQLFRSRYTLGKIYFIGFQKSILLSKSENSLNSIA
G72-1  KETEEGRETVTRKEGWKRRHEDGYLEMAQRHLQRSLCPWV
G72-4  MAQRHLQRSLCPWV
G72-1  SYLPQPYAELEEVS SHVGVKVF MARNYEFLAYEASKDRRQPLE
G72-4  SYLPQPYAELEEVS SHVGVKVF MARNYEFLAYEASKDRRQPLE
G72-1  RMWTCNYNQQKDQSCNHKEITSTKAE
G72-4  RMWTCNYNQQKDQSCNHKEITSTKAE

```

Abb. 3: Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von G72-1 (153 Aminosäuren) und G72-4 (82 Aminosäuren). Das putative mitochondriale Lokalisationssignal von G72-1 ist durch einen roten Balken markiert. Der blaue Balken kennzeichnet die mögliche Bindungsstelle für die D-Aminosäureoxidase (DAAO) im C-terminalen Bereich von G72-1 und G72-4.

### 3.2.4 Das G72/G30 Mausmodell und die Entstehung oxidativen Stresses

Von Otte et al., 2009 hergestellte G72/G30-transgene Mäuse zeigen einen mit Schizophrenie assoziierten Phänotyp in verschiedenen Verhaltensexperimenten (Otte et al., 2009). Dazu gehören Defizite bei kognitiven Leistungen, der Motorkoordination, der Präpulsinhibition, bei der Diskriminierung olfaktorischer Signale sowie ein erhöhtes kompulsives Verhalten. Die Tiere zeigen zudem eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten PCP (Phencyclidin), der beim Menschen psychotische Symptome induziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von

G72/G30 vermutlich neuronale Veränderungen verursacht, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Pathomechanismen der Schizophrenie relevant sind. Proteom-Analysen mit Gehirnproben von G72-exprimierenden transgenen Tieren zeigten, dass Proteine des zellulären Glutathion Antioxidationsystems, wie zum Beispiel die Glutathion-S-Transferase, in Anwesenheit von G72 stärker exprimiert werden als in Kontrolltieren (Otte et al., 2011). Die Glutathion-S-Transferase besitzt neben der zentralen Rolle bei der Entgiftung von Giftstoffen (Xenobiotika) auch die Fähigkeit, oxidierte Lipide zu reduzieren (Fariss et al., 2005).

Biochemische Analysen zeigen, dass eine erniedrigte oder fehlerhafte Aktivität des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zu verstärktem oxidativem Stress führt (Kushnareva et al., 2002; Sharma et al., 2009). Die Dysfunktion von Komplex I und der dadurch resultierende oxidative Stress steht vermutlich mit der Genese psychiatrischer Erkrankungen eng im Zusammenhang (Prabakaran et al., 2004, Fariss et al., 2005, Rezin et al., 2009, Otte et al., 2011). Komplex I (NADH-Dehydrogenase oder NADH: Coenzym Q Oxidoreduktase) katalysiert die Oxidation von NADH und die Reduktion von Coenzym Q mit der Translokation von Protonen in den Intermembranraum des Mitochondriums. Ein wichtiger Indikator für oxidativen Stress ist die mitochondriale Aconitase (Flint et al., 1993, Gardner et al., 1994, Bulteau et al., 2003, Francisconi et al., 2006). Im Citratzyklus wandelt die Aconitase Citrat in Isocitrat und Aconitat um. Die Aktivität der mitochondrialen Aconitase wird aufgrund des 4Fe-4S-Cluster durch Sauerstoffradikale mit hoher Sensitivität inhibiert. Als Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet man Superoxid-anion-Radikale ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikale ( $OH\cdot$ ). Wasserstoffperoxid entsteht in der Zelle vorwiegend an Komplex I und III (Murphy, 2009), durch die Superoxiddismutase (SOD) welche Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid umwandelt (Murphy, 2009) und durch die Deaktivierung von Eisen-Schwefel Cluster durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Fariss et al., 2005) (Abb. 4).

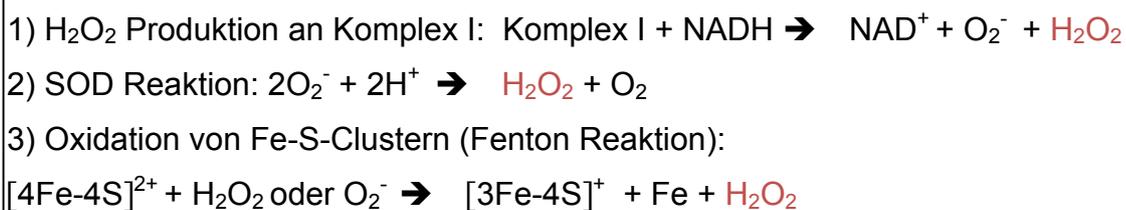


Abb. 4: Wasserstoffperoxidproduktion in der Zelle.

In der Zelle reagiert  $\text{H}_2\text{O}_2$  in unterschiedlichsten Reaktionen mit anderen Molekülen und Enzymen wie in Abb. 5 dargestellt. Die Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit der Katalase, Peroxidase und GSH-Peroxidase führt zum Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reduziertes Glutathion (GSH) hat eine freie Thiolgruppe und kann Elektronen auf ROS übertragen und diese somit reduzieren. Jeweils zwei oxidierte GSH Moleküle verbinden sich unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zu einem Glutathion-Disulfid (GSSG) (Schulz et al., 2000, Wu et al., 2004, Lei et al., 2007, Forman et al., 2009). Durch Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Eisen und Superoxidanion-Radikalen kommt es zur Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle.

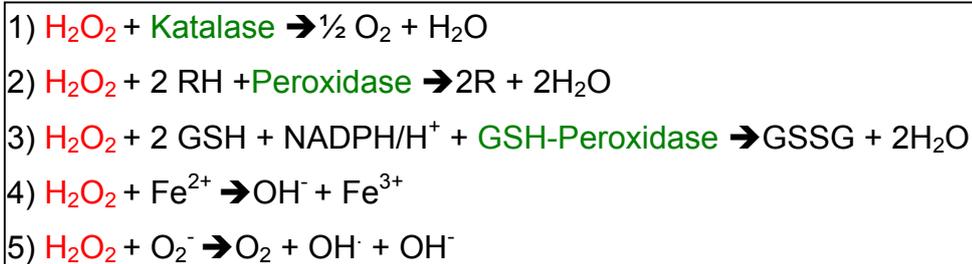


Abb. 5: Reaktionen und Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Zelle.

Interessanterweise konnten in G72-transgenen Tieren eine erhöhte Protein- und Lipidperoxidation sowie reduzierte Glutathion (GSH) Spiegel gefunden werden (Otte et al., 2011). Glutathionperoxidasen katalysieren die Glutathion-abhängige Reduktion von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid. Hierdurch sinkt die Menge an reduziertem Glutathion (GSH). Durch die GSH Reduktase können wiederum aus einem GSSG-Dimer unter Verbrauch von NADPH wieder zwei reduzierte GSH hergestellt werden (Schulz et al., 2000, Wu et al., 2004, Lei et al., 2007, Forman et al., 2009). Abb. 6 zeigt die Reduktion oxidierten Moleküle sowie die Wasserstoffperoxidreduktion durch GSH. Werden in einer Zelle vermehrt ROS weggefiltert, sinkt somit der GSH Gehalt in der Zelle und die Menge an GSSG steigt an.

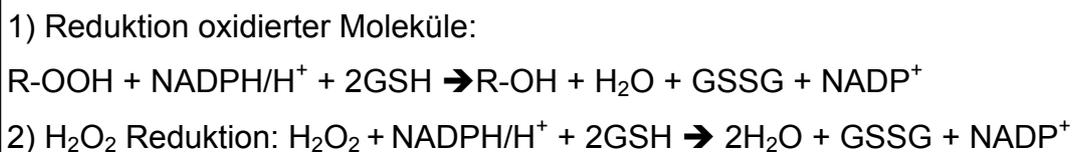


Abb. 6: Reduktionsreaktionen durch Glutathion (GSH), katalysiert durch die GSH-Peroxidase.

Ein mögliches Modell der Interaktion von G72 mit mitochondrialen Proteinen wie z.B. Komplex I und die daraus resultierenden Folgen (z. B. oxidativer Stress) ist in Abb. 7 schematisch dargestellt (modifiziert nach Otte et al. 2009). Da in den G72/G30-transgenen Tieren jedoch verschiedene Splicevarianten von G72 exprimiert werden (Abb. 2), konnten die beobachteten Effekte auf mitochondrialer Ebene bislang keinem einzelnen Protein zugeordnet werden.

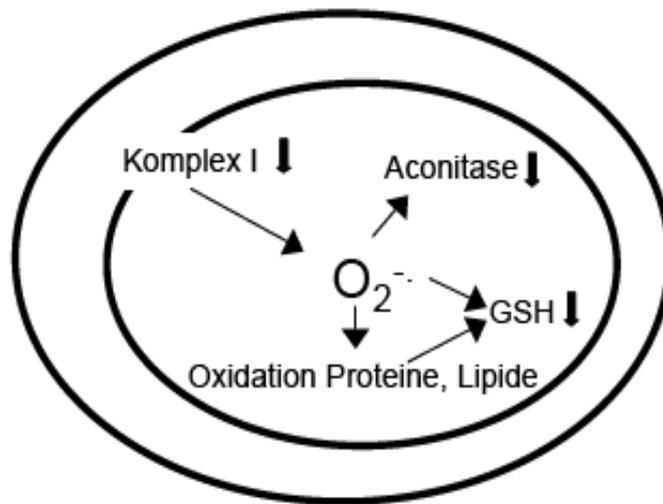


Abb. 7: Putatives Modell der Wirkung von G72 auf die mitochondriale Funktion im G72-Mausmodell. GSH, reduziertes Glutathion. GSSG, Dimer aus zwei oxidierten Glutathion Molekülen.

Um herauszufinden, ob in G72-transgenen Tieren die synaptische Aktivität durch die mitochondriale Dysfunktion beeinträchtigt ist, wurde die synaptische Transmission getestet. Die Messungen zeigten eine verminderte synaptische Kurzzeit-Plastizität (paired-pulse facilitation) und eine reduzierte Aktivität nach tetanischer Stimulation (Otte et al., 2011).

Proteomanalysen im ZNS G72-transgener Tiere zeigten eine geminderte Expression des mitochondrialen Glutamattransporters 1 (Slc25a22) und eine verstärkte Expression der Glutathion S-Transferase1 (Filiou et al., 2012). Die Aktivität der Katalase, einem wichtigen antioxidativen Protein, war im Cerebellum der untersuchten G72-transgenen

Tiere herabgesetzt (Filiou et al., 2012). Dies konnte ebenfalls in Schizophrenie-Patienten nachgewiesen werden (Sehgal et al., 2013).

Kürzlich wurde ein weiteres G72/G30 Mausmodell veröffentlicht. Cheng et al. konnten in den transgenen Tieren ebenfalls ein verändertes Verhalten feststellen. Die Tiere zeigten eine verstärkte Reaktivität in der Präpulsinhibition sowie Anhedonie im Zucker-Präferenz Test, zwei Modelle für die Symptomatik der Schizophrenie im Mausmodell (Cheng et al., 2013). Cheng et al. konnten des weiteren Veränderungen im Transkriptom der transgenen Tiere nachweisen welche vermutlich im Zusammenhang mit dem veränderten Verhalten der untersuchten Tiere in diesem Schizophrenie-Modell stehen.

#### 4. Ziel der Arbeit

In der hier vorgestellten Dissertation wird die Funktion des Gens G72 untersucht. Neben der Phänotypisierung G72-transgener Mäuse soll insbesondere die biologische Funktion des Proteins G72-1 und einer weiteren Splicevariante von G72 (G72-4) in Zellkultur analysiert werden. G72-1 ist die bislang am besten untersuchte Variante. G72-4 war am stärksten in G72/G30-transgenen Tieren exprimiert (Otte et al., 2009). Wir vermuten, dass die beiden Proteine in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind und unterschiedliche Funktionen ausüben. Die eigentliche Funktion von G72-1 wird bisher kontrovers diskutiert; zu G72-4 wurden bis dato noch keine Untersuchungen durchgeführt.

Verhaltensbiologische Experimente mit G72/G30-transgenen Tiere zeigten einen Einfluss der G72 Expression auf das murine Verhalten (Otte et al., 2009). Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Phänotypisierung G72-transgener Mäuse wird die Untersuchung kognitiver Funktionen mit dem Paradigma der Furchtkonditionierung durchgeführt.

Untersuchungen zur Funktion von G72 zeigten Veränderungen der mitochondrialen Biochemie in den G72/G30-transgenen Tieren (Otte et al., 2011). Da in den transgenen Tieren jedoch verschiedene Splicevarianten in einer heterogenen Zellpopulation exprimiert werden, konnte die Frage, welche der resultierenden Proteine für den beschriebenen Phänotyp verantwortlich ist, nicht eindeutig beantwortet werden. Neben der genauen subzellulären Lokalisation der Proteine stehen in dieser Arbeit Untersuchungen zu mitochondrialen Funktionen im Vordergrund. Die Expression der beiden Proteine in einer homogenen Zellpopulation wird es ermöglichen, beobachtete Veränderungen einem Protein zuordnen zu können und wird genauere Aussagen über die eigentliche biologische Funktion der beiden Splicevarianten möglich machen. Es werden Aktivitätsmessungen verschiedener mitochondrialer Enzyme sowie Untersuchungen zum oxidativen Stress durchgeführt. Im Vordergrund stehen die Untersuchung der Aconitase und der Citrat Synthase des Citratzyklus, des Komplex I der Atmungskette, des Glutathion Systems sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Geräte

Analysenwaage	BP 121 S, Sartorius
Aufsichtmikroskop	Axiovert 200, Zeiss
Baktérienschüttler	Innova 4200 Incubator shaker, New Brunswick Scientific
Begasungsbrutschrank	CB 210, Binder
CCD Kamera	KY-F75U, JVC
Dampfsterilisator	Varioklav 25T, H+P Labortechnik
Digitale Geldokumentation	ChemiDocSyst CCIR, Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories
Entwicklermaschine	X-OMAT 1000, Kodak
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2, Carl Zeiss
Konfokales Mikroskop	TCS-4D-Laser-Scanning-Mikroskop, Leica GmbH, Bensheim
Heizmagnetührer	MR 3001 K, Heidolph, Fisher
Homogenisator	T8 ultra-Turra , IKA
Ultraschallhomogenisator	GEX-600
Hybridisierungsinubator	OV 5, Biometra
Neubauer-Zählkammer	Bright-Line, Hausser Scientific
PCR iCycler	iCycler, Bio-Rad Laboratories
pH-Meter	inoLab, WTW
Schüttler	KL2, Edmund Bühler
Dry Blotter	IBlot, Invitrogen
Spektralphotometer	91-ND-1000 UV/Vis, Nanodrop Aminco DW 2000, SLM Instruments
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker 2400, Stratagene
UV-Handlampe	UVM-57, Upland

Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Zentrifugen	Biofuge fresco, pico, stratos, Heraeus Instruments. Sorvall Evolution RC, Kendro
Fluoreszenz Messgerät	Spectra MAX Gemini, Molecular Devices
Röntgenfilm	GE Healthcare

### 5.1.2 Objektträger

Für die Immunfärbungen wurden die Zellen auf Lysin-beschichteten 12 mm runden Deckgläschen (BD) kultiviert und anschließend auf SuperFrost Plus Objektträger von der Firma Menzel eingebettet.

### 5.2 Enzyme

Pfx-DNA-Polymerase	Invitrogen
Phusion-DNA-Polymerase	Finnzymes
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs
Pfu-DNA-Polymerase	Promega

### 5.3 Kits

BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific  
 PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit I, Peqlab  
 PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit, Invitrogen  
 PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit, Invitrogen  
 Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare  
 High Pure PCR Product Purification Kit, Roche  
 Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells, Thermo Scientific

## 5.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen.

Sequenzierprimer:

Name		Sequenz 5' - 3'
pEGFPN1 Sequencing rev	antisense	GTCGCCGTCCAGCTCGACCAG

Tab. 4: In der vorliegenden Arbeit verwendete Primer. Dargestellt ist jeweils der Name des Primers und des vervielfachten Fragments, der replizierte Strang (*sense* oder *antisense*) sowie die Sequenz. Blau: *XhoI* Schnittstelle. Violett: *HindIII* Schnittstelle. Grün: Startcodon. Rot: Stopcodon. Gelb: 6x His.

Name	Fragment	sense + antisense -	Sequenz 5' - 3'
Fwd G72-1 pEGFPN1	G72-1	+	AACTCGAGATGCTGGAAAAGCT GATGGG
Fwd G72-1 Stop	G72-1	-	TTTAAGCTTTCATTCAGCTTTGG TAGAAGTTA
Rev G72-1-His	G72-1-His	-	TTTAAGCTTTCAGTGGTGGTGG TGGTGGTGTTCAGCTTTGGTAG AAGTTA
Rev G72-1-GFP pEGFPN1	G72-1-GFP	-	TTTAAGCTTTCAGCTTTGGTAG AAGTTA
Fwd G72-4 pEGFPN1	G72-4	+	AACTCGAGATGGCACAGAGGC ATTTACA
Rev G72-4 Stop	G72-4	-	TTTAAGCTTTCATTCAGCTTTGG TAGAAGTTA
Rev G72-4-His	G72-4-His	-	TTTAAGCTTTCAGTGGTGGTGG TGGTGGTGTTCAGCTTTGGTAG AAGTTA
Rev G72-4-GFP pEGFPN1	G72-4-GFP	-	TTTAAGCTTTCAGCTTTGGTAG AAGTTA
Fwd CMV pEGFPN1	pEGFPN1 Insert	+	CGCCRTGCATTAGTTATTAATAG
Rev PolyA pEGFPN1	pEGFPN1 Insert	-	AGATACATTGATGAGTTTGGAC

## 5.5 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Angegeben sind die Bezugsquellen und die verwendeten Verdünnungen.

Tab. 5: Verwendete Antikörper mit jeweiliger Verdünnung, Fluoreszenzmarkierung und Herkunft.

Antikörper	Beschreibung	Herkunft
	<b>Primärantikörper</b>	
Anti-His-HRP	HRP gekoppelter Antikörper gegen His-Tag, Western Blot 1:500	Invitrogen
Anti-GFP	Polyklonaler Antikörper gegen GFP, Western Blot 1:200	Abcam
Anti-His	Maus Antikörper gegen His-Tag, Western Blot 1:200, Immunfluoreszenzfärbung 1:200	Roche
Anti-G72 N15	Ziege Antikörper gegen das N-terminale Ende von G72-1, Western Blot 1:200, Immunfluoreszenzfärbung 1:200	Santa Cruz
Anti-Prohibitin	Ziege Antikörper gegen Prohibitin, Western Blot 1:200	Abcam
	<b>Sekundärantikörper</b>	
Anti-Maus-HRP	Hase anti Maus HRP gekoppelter IgG Antikörper, Western Blot 1:12000	Sigma
Anti-Ziege-HRP	Esel anti Ziege HRP gekoppelter IgG Antikörper, Western Blot 1:1000	Jackson
Anti-Ziege-Alexa 488	Esel anti Ziege IgG Antikörper, Alexa488 gekoppelt, grüne Emission, Immunfluoreszenzfärbung 1:200	Invitrogen
Anti-Maus-Alexa 488	Ziege anti Maus IgG Antikörper, Alexa488 gekoppelt, grüne Emission, Immunfluoreszenzfärbung 1:200	Invitrogen
Anti-Hase-Cy3	Esel anti Hase IgG Antikörper, Cy gekoppelt, rote Emission, Immunfluoreszenzfärbung 1:200	Invitrogen

Anmerkung: Zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Versuche existierte kein direkter Antikörper gegen G72-4.

## 5.6 Plasmide

Tab. 6: Verwendete und hergestellte Transfektionsvektoren.

Vektor	Beschreibung	Herkunft
pEGFPN1	Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> Expressionsvektor mit CMV Promotor und GFP Sequenz	BD Biosciences Clontech
G72-1-GFP pEGFPN1	pEGFPN1 Expressionsvektor welcher G72-1-GFP (GFP C-terminal) produziert	Diese Arbeit
G72-1-Stop pEGFPN1	pEGFPN1 Expressionsvektor welcher G72-1 ohne Tag produziert	Diese Arbeit
G72-1-His pEGFPN1	pEGFPN1 Expressionsvektor welcher G72-1-His (His C-terminal) produziert	Diese Arbeit
G72-4-GFP pEGFPN1	pEGFPN1 Expressionsvektor welcher G72-4-GFP (GFP C-terminal) produziert	Diese Arbeit
G72-4-Stop pEGFPN1	pEGFPN1 Expressionsvektor welcher G72-4 ohne Tag produziert	Diese Arbeit
G72-4-His pEGFPN1	pEGFPN1 Expressionsvektor welcher G72-4-His (His C-terminal) produziert	Diese Arbeit
pEGFPN1 ohne GFP	pEGFPN1 Expressionsvektor mit herausgeschnittenem GFP (Mock Kontrolle)	Diese Arbeit
pCMV-DS-Red-SKL	Zeo <sup>r</sup> Expressionsvektor welcher ein rot-fluoreszierendes peroxisomales Protein unter dem Rosa26 Promotor produziert	Dr. D. M. Otte

## 5.7 Benutzte Zelllinien

Eukaryotische Linien:

Tab. 7: Beschreibung und Herkunft der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	
Cos7	Grüne Meerkatze, Fibroblasten, Niere	Laborinterne Kryostocks
Hek293	Mensch, Fibroblasten, Niere	Laborinterne Kryostocks
1321N-1 Astrozyten	Mensch, Astrozytomzellen	Laborinterne Kryostocks
Neuro2a (N2a)	Maus, Neuroblastomazellen	Laborinterne Kryostocks

Prokaryotische Linien: *Escherichia coli*- Bakterienstamm: K12 (Invitrogen).

## 5.8 Größenstandards

Es wurde die 1 kb DNA-Leiter von Invitrogen benutzt. Die Leiter enthält Wiederholungen eines 1018-bp Fragments. Zusätzlich zu den 12 Banden beinhaltet die Leiter Vektor DNA Fragmente von 75 bis 1636 bp. Die 1636 bp Bande ist in der Färbung stärker ausgeprägt als die anderen Banden.

Die 100 bp DNA-Leiter von Invitrogen besteht aus 15 Fragmenten zwischen 100 und 1500 bp in Vielfachen von 100 bp und einem zusätzlichen Fragment mit 2072 bp Größe. Die 600 bp Bande ist zur besseren Orientierung zwei- bis dreimal stärker in der Färbung als die anderen Banden.

Die 50 bp DNA-Leiter von Invitrogen besteht aus 16 Fragmenten zwischen 50 und 800 bp in Vielfachen von 50 bp.

Der The Novex<sup>®</sup> Sharp Prestained Protein Standard von Invitrogen wurde bei der Auftrennung von Proteinen im Western Blot benutzt. Dieser Standard besteht aus 12 Proteinen mit unterschiedlichen Massen im Bereich von 3.5 bis 260 kDa mit jeweils unterschiedlichen Färbungen zur optimalen Differenzierung.

## 5.9 Lösungen und Chemikalien

Agarose	Sigma
Albumin, Bovine Fraction V	BSA, Sigma Chemie GmbH
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol, Roche
Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) (10x)	Gibco
Entwicklerlösung	Thermo Scientific
Fluoromount	Sigma
Fötale Kälberserum (FCS), 100 mM Konzentrat	Promo Cell
G418	Invitrogen
Glycerin (wasserfrei)	Merck

Isocitrat Dehydrogenase	Boehringer
Kanamycin	Sigma
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Lysotracker red DND-99	Invitrogen
Mitotracker Orange CMTM Ros	Invitrogen
Monochlorobiman	Molecular Probes
Mounting Medium	Vectashield HardSet, Linaris
Na-Pyruvat 100 mM	Gibco
Paraformaldehyd	Merck
PBS ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>	Gibco
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Gibco
Retinoinsäure	Sigma
Rotiblock	Merck
Trypsin/EDTA 25 %	Gibco
Tween 20	Merck
Ultrapur H <sub>2</sub> O	Biochrom KG
Zeocin	Invitrogen

Für die Herstellung aller Lösungen wurde über eine Reinstwasseranlage (Academic A10, Millipore) entsalztes und filtriertes Wasser oder ultraPURE destilliertes Wasser (DNAse, RNAse-frei, Invitrogen) verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Lösungen bei Raumtemperatur gelagert.

## **5.10 Zellkulturmedien**

### **5.10.1 Eukaryotische Zellkultur**

Eukaryotisches Zellkulturmedium: Dulbecco's Modified Eagles Medium (D-MEM) wurde mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde G418 in einer Endkonzentration von 3 mg/ml zugegeben.

### 5.10.2 Nährmedien für die Kultivierung von *E. coli*

- Luria Bertani (LB) Medium: Bactotrypton 1 % (w/v), Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v), NaCl 0,5 % (w/v). Der pH wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt und das Medium autoklaviert. Gegebenenfalls wurde Kanamycin zur Selektion (30 µg/ml) zugefügt.

- Luria Bertani (LB) 1,5 %iger Agar: Bactotrypton 1 % (w/v), Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v), NaCl 0,5 % (w/v), Agar 1,5 % (w/v). Mit NaOH wurde der pH auf 7,5 eingestellt und der Agar anschließend autoklaviert. Der LB Agar wurde vor Gebrauch in der Mikrowelle verflüssigt und langsam auf 60 °C abgekühlt. Gegebenenfalls wurde Kanamycin zur Selektion (30 µg/ml) zugefügt und jeweils 20 ml in eine Petrischale gegossen, in welcher der Agar aushärtete.

- *Low-salt* Medium: Transfizierte Bakterien, welche ein Plasmid mit Zeocin Resistenz exprimieren, wurden in *low-salt* Medium angezüchtet. 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, auf 1 Liter mit A. dest. auffüllen. Der pH wurde auf 7 eingestellt und das Medium autoklaviert. Anschließend wurde nun 30 µg/ml Zeocin zugefügt und die Inkubation mit den Bakterien im Dunkeln durchgeführt.

- *Low-salt* Agar: Transfizierte Bakterien, welche ein Plasmid mit Zeocin Resistenz exprimieren, wurden auf *low-salt* Agar angezüchtet. 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar, auf 1 Liter mit A. dest. auffüllen. Der pH wurde auf 7 eingestellt und der Agar autoklaviert. Der LB Agar wurde vor Gebrauch in der Mikrowelle verflüssigt und langsam auf 60 °C abgekühlt. Anschließend wurde nun 30 µg/ml Zeocin zugefügt, jeweils 20 ml in eine Petrischale gegossen, in welcher der Agar aushärtete und die Inkubation mit den Bakterien im Dunkeln durchgeführt.

### 5.11 Lösungen für indirekte Immunfärbungen

- 10x PBS: NaCl 1,4 M, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 81 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17 mM pH-Wert auf 7,4 einstellen, mit A.dest auf 1 Liter auffüllen.

- Ammoniumchlorid-Lösung: NH<sub>4</sub>Cl 0,27 % in 1x PBS gelöst.

- (DAPI)-Stammlösung (50x): DAPI 50 g/ml.

- Blockierungslösung für Immunfärbungen: Rinderserum–Albumin 1 % (w/v) in 1x PBS-CMF.
- Permeabilisierungslösung: Triton-X 100 0,1 % (v/v) in 1x PBS.
- Formaldehyd-Lösung: 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4, filtrieren.

### **5.11.1 Lösungen für DNA-Gelelektrophorese**

- PCR 6x Probenpuffer: Glycerol 50 % (v/v), EDTA 0,002 mM, Bromphenol-Blau 0,0025 % (w/v), Xylene-Cyanol 0,0025 % (w/v).
- TAE-Gelelektrophoresepuffer: EDTA 0,5 mM, Tris-Acetat 40 mM.

### **5.11.2 Lösungen für Protein-Gelelektrophorese und Western Blot**

- Tris-HCl (1M, pH 7,4): 30,3 g Tris-Base in 150 ml H<sub>2</sub>O gelöst, pH Wert einstellen und auf 250 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt dann autoklavieren.
- 4x Protein-Probenpuffer: Tris-HCl, pH 6,8 200 mM, SDS 8 % (w/v), Glycerol 40 % (v/v), Bromphenol-Blau 0,01 % (w/v), 1 M DTT 40 % (v/v).
- Ponceau-Färbelösung: Essigsäure 5 % (v/v), Ponceau-Rot 0,1 % (w/v).
- Coomassie-Färbelösung: Coomassie-Blau 0,2 % (w/v), Essigsäure 10 % (v/v), Methanol 45 % (v/v).
- Stripping Puffer: 0,2M Glycin in PBS, 0,1 % SDS w/v, 1 % Tween 20 v/v, pH auf 2,4 mit HCl.
- PBST: 1x PBS, 5 % Tween.
- Ripa Puffer: 25 mM Tris HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % Natrium-Deoxycholat, 0.1 % SDS. Kurz vor Gebrauch Protease Inhibitor Mix zugeben.

### 5.11.3 Lösungen zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität

- Homogenisierungspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,6 mM  $\text{MnCl}_2$ .
- MTP Medium: 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 60 mM KCl, 60 mM Tris-HCl, 110 mM Mannitol, 0,5 mM EDTA, pH 7,4.
- Aconitase Puffer: 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM Natrium Citrat.
- TRA/EDTA Puffer: 0,5 M Triethanolamin ( $\text{Cl}^-$  frei), 5 mM EDTA , pH 7.4 mit NaOH eingestellt.
- KCl-Tris Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM KCl, 1 mM EDTA.
- Monochlorobimane (MCB) Stock: 0,02 M MCB in DMSO.
- 10 mM  $\text{CoQ}_1$  Lösung: 10 mM  $\text{CoQ}_1$  in 96 % Alkohol gelöst.
- 1 mM DTNB Lösung: 1 mM 5,5'-Dithio-bis 2-Nitrobenzoesäure in 1M Tris-HCl (pH 8.1) gelöst.
- 50 mM Oxalacetat: 50 mM Oxalacetat in TRA/EDTA Puffer gelöst.
- 2 mM Rotenon: 2 mM Rotenon in 96 % Alkohol gelöst.
- 15 mM NADH Lösung: 15 mM NADH in 1 %  $\text{NaHCO}_3$  gelöst.

## 5.12 Tierversuche

### 5.12.1 Zucht und Haltung der Mäuse

Für die durchgeführten Tierversuche wurden G72-transgene und Wildtyp Mäuse aus einer laboreigenen CD1-Mauslinie gezüchtet. Verpaarungen wurden durch die gemeinsame Haltung von einem Männchen mit einem oder zwei Weibchen angesetzt. Die Nachkommen wurden 21-23 Tage nach Geburt von den Elterntieren getrennt. Die Tiere wurden in Gruppen von 2-5 Tieren in einem konstanten Tag-Nacht-Rhythmus (Beleuchtung von 9-19 Uhr) mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Die in dieser Arbeit be-

schriebenen Tierversuche wurden nach Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes, nach vorheriger Genehmigung durch die Bezirksregierung Köln, durchgeführt (Aktenzeichen: 87-51.04.2011.A041).

### **5.12.2 Die Furchtkonditionierung**

Die Furchtkonditionierung wird zur klassischen Konditionierung nach Pawlow gezählt. Bei der hier durchgeführten Furchtkonditionierung wird ein unkonditionierter Stimulus (UCS, Fußschock) mit einem konditionierten Reiz (CS, Ton) assoziiert. Nach erfolgreicher Konditionierung löst der konditionierte Stimulus (Ton) in einem späteren Test eine Furchtreaktion (konditionierte Reaktion) aus. Durch die Messung der Furchtstarre während der Präsentation des konditionierten Stimulus wird das Furchtgedächtnis untersucht.

### **5.12.3 Tonabhängige Furchtkonditionierung**

Die Verhaltensexperimente wurden mit einem computerunterstützten Furchtkonditionierungssystem der Firma TSE (Startle Response System, Version 02-11) ausgeführt. Dabei wurden die Mäuse in einen Metallkäfig (Dimensionen: 9 cm x 4,5 cm x 5 cm, Länge x Breite x Höhe) gesetzt, dessen Boden aus einem Gitter rostfreien Stahls bestand. Das Gitter war mit einer Steuereinheit verbunden, die elektrischen Strom definierter Intensität (0,7 mA) und Dauer (2 s) erzeugte. Der Kammer ist mit Bewegungssensoren beziehungsweise Erschütterungssensoren ausgestattet. Die Kammer befand sich in einem schalldichten Gehäuse mit Lautsprecher. Für das Training der tonabhängigen Furchtkonditionierung wurden die Tiere jeweils 90 s lang zur Akklimation in den Metallkäfig gesetzt. Danach folgte zunächst für 20 s ein Ton (9 kHz, 80 dB), und direkt im Anschluss ein 2 s andauernder elektrischer Fußschock mit einer Intensität von 0,7 mA. Um das tonabhängige, assoziative Lernen zu analysieren, wurden die Tiere 24 h später für den Gedächtnistest in eine für sie unbekannte Versuchsbox (neuer Kontext; Glasbehälter anstatt Metallkäfig) gebracht. Nachdem die Tiere diesen neuen Kontext für 90 s erkundet hatten, wurde für weitere 180 s der Ton präsentiert (Abb. 8). Als Maß für konditionierte Furcht wurde dokumentiert, ob die Tiere erstarren (keine Bewegung für mindestens 2 Sekunden) sowie die Anzahl der Sprünge als Maß für Fluchtverhalten bestimmt.

Erstarren ist eine bei Nagern typische Furchtreaktion (Laxmi et al., 2003). Die Zeit, in der sich die Tiere in dem Status der Starre befanden, wurde prozentual zum gemessenen Zeitraum gesetzt. Zur Bestimmung der Reaktion der Tiere auf den Ton allein (ohne vorangegangene Konditionierung) wurde eine Gruppe an Tieren als Kontrollgruppe (Basalwerte), wie oben beschrieben getestet, jedoch ohne einen Fußschock zu verabreichen.

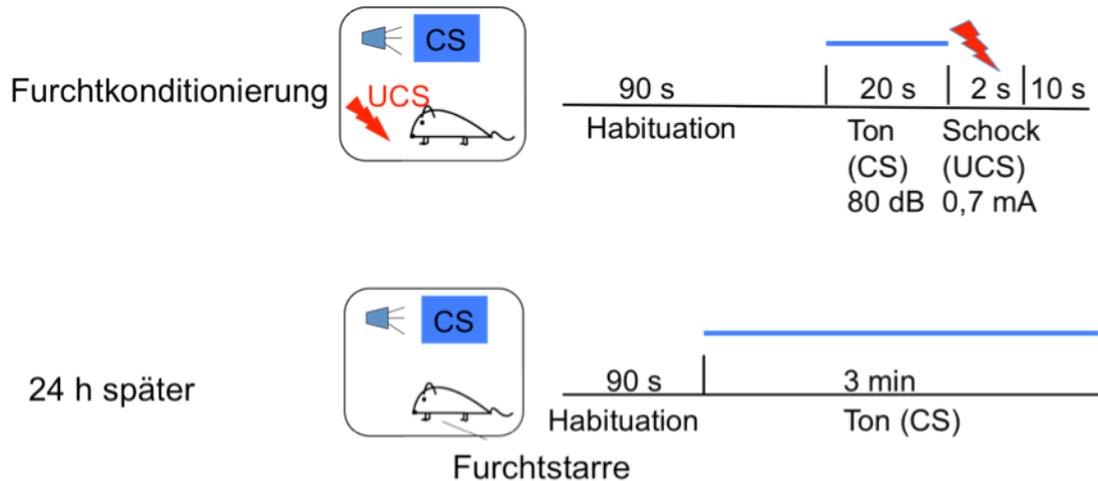


Abb. 8: Schematische Darstellung der Furchtkonditionierung. Am ersten Versuchstag wurde die Verknüpfung des konditionierten Stimulus (CS, Ton) mit dem unkonditionierten Stimulus (UCS, Schock) durchgeführt. Imminent nach Präsentation des Tones erhielten die Tiere einen kurzen Fußschock. Nach 24 h wurde der Erfolg der Konditionierung bestimmt. Es wurde die Furchtreaktion der Tiere auf alleinige Präsentation des konditionierten Stimulus (Ton) gemessen. Als Parameter galt hier die Reaktion der Tiere in Form von Erstarren sowie die Anzahl der Sprünge.

#### 5.12.4 Bestimmung der Schmerzreaktion

Zur Bestimmung der Schmerzreaktion auf den Fußschock wurde die Anzahl der Sprünge während der Präsentation des Fußschocks (2 Sekunden) gemessen. Als Sprung wurde jede Erschütterung der Kammer über 35G gewertet und alle 10 ms automatisiert gezählt.

## 5.13 Molekularbiologische Methoden

### 5.13.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit dem NanoDrop ND1000 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Für die Konzentrationsberechnungen von Nukleinsäurelösungen gelten folgende Zusammenhänge: 1 OD (260 nm) doppelsträngiger DNA entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml. Bei einzelsträngiger RNA entspricht 1 OD gleich 37 µg/ml (Cryer et al., 1975). Für die Reinheit der DNA gilt zusätzlich, dass bei 230 nm der Absorptionsbereich von Salzen liegt, bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Für eine hinreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäuren gelten dabei folgende Richtwerte:  $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$  und  $OD_{260}/OD_{230} \geq 2,2$  (Marmur et al., 1961).

### 5.13.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wird zur Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen *in vitro* genutzt. Eine DNA-Polymerase synthetisiert anhand einer DNA Matrize den dazu komplementären Gegenstrang. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer wurden synthetisch hergestellt (Metabion). Sie leiten sich aus den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz ab, so dass das vervielfältigte Fragment zwischen ihnen liegt. Einer der beiden Oligonukleotidprimer ist komplementär zum Plus-Strang, der zweite komplementär zum minus-Strang der DNA-Zielsequenz. Zunächst wurde der DNA-Doppelstrang durch hohe Temperaturen (94°C) denaturiert. Anschließendes Abkühlen auf 50-60°C ermöglichte die Hybridisierung der im großen Überschuss (um den Faktor  $10^6$  gegenüber der Zielsequenz) eingesetzten synthetischen Oligonukleotidprimer mit der komplementären Matrizen-DNA. Dieser Vorgang wird als *Annealing* bezeichnet. Die dafür verwendete *Annealing*-Temperatur ist u.a. von der Sequenz der Oligonukleotidprimer abhängig. Im dritten Schritt, der Elongationsphase, synthetisiert die DNA-Polymerase von dem 3'terminale Ende dieser Oligonukleotidprimer ausgehend jeweils in 5' - 3'- Richtung bei 72°C den komplementären DNA-Gegenstrang. Die Zahl der PCR-Produkte wächst exponentiell

mit der Zykluszahl, da sich ihre Anzahl in jedem Zyklus verdoppelt. Nach 20 PCR-Zyklen ergibt sich eine theoretische Vervielfachung um den Faktor  $10^6$ .

Die *Touch-Down*-PCR dient der Erhöhung der Ausbeute des spezifischen PCR-Produktes. Man versteht darunter eine PCR, bei der im Laufe der zunehmenden Zahl an Zyklen die *Annealing*-Temperatur schrittweise gesenkt wird. In dieser Arbeit wurde mit einer hohen *Annealing*-Temperatur (60°C) begonnen und diese für 2 Zyklen beibehalten (sog. *step delay*). So ist die PCR zu Anfang möglichst stringent und die Amplifikation unspezifischer Produkte wird schon zu Beginn unterbunden. Nachfolgend wird die *Annealing*-Temperatur alle 2 Zyklen um 1°C abgesenkt (sog. *step size*), bis man die *Annealing*-Temperatur erreicht hat, die für die Sensitivität der PCR optimal ist. In dieser Arbeit wurde ein *Touch-Down* von 60-55°C gewählt, wobei alle 2 Zyklen die *Annealing*-Temperatur um 1°C gesenkt wurde, bis sie zum Schluss für 25 Zyklen bei 55°C gehalten wurde (Tab. 8). Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert und anschließend sofort in den auf 94°C vorgeheizten Thermocycler gestellt ('Hotstart' zur Vermeidung von Primer-Fehlpaarung bei niedrigeren Temperaturen). Als Negativkontrolle dienen Ansätze ohne DNA-Matrize.

Tab. 8: Reaktionsansatz der *Touch-Down* PCR.

Komponente	Endkonzentration	Volumen
DNA-Vorlage	100ng	x µl
Primer sense	20µM	2 µl
Primer antisense	20µM	2 µl
DNA-Polymerase 10x Puffer	1x	5 µl
dNTP-Mischung	25nM	0,5 µl
Pfx, Pfu-DNA-Polymerase	1U	1 µl
mit dH <sub>2</sub> O auf 50 µl auffüllen		

Bei mehr als einer PCR-Reaktion mit identischen Primer-Paaren wurde grundsätzlich ein Master-Mix hergestellt, bestehend aus dem Vielfachen der jeweiligen o.g. Komponenten ohne DNA, und diese dann in entsprechenden Aliquots zur DNA pipettiert.

Tab. 9: Das *Touch-Down*-PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

Initiale Denaturierung	94°C	5min	
Denaturierung	94°C	45s	} 2 Zyklen
<i>Annealing</i>	60°C	45s	
DNA-Synthese	72°C	2min	
Denaturierung	94°C	45s	} 2 Zyklen
<i>Annealing</i>	59°C	45s	
DNA-Synthese	72°C	2min	
Denaturierung	94°C	45s	} 2 Zyklen
<i>Annealing</i>	58°C	45s	
DNA-Synthese	72°C	2min	
Denaturierung	94°C	45s	} 2 Zyklen
<i>Annealing</i>	57°C	45s	
DNA-Synthese	72°C	2min	
Denaturierung	94°C	45s	} 2 Zyklen
<i>Annealing</i>	56°C	45s	
DNA-Synthese	72°C	2min	
Denaturierung	94°C	45s	} 25 Zyklen
<i>Annealing</i>	55°C	45s	
DNA-Synthese	72°C	2min	
Terminale DNA-Synthese	72°C	10min	
Kühlung auf 4 °C	∞		

PCR Reaktion mit der Phusion-DNA-Polymerase:

Zur Vervielfältigung der Sequenz (CMV Promotor, einklonierter ORF bis Poly A Ende) aus den Transfektionsvektoren wurde die Phusion-DNA-Polymerase (Finnzymes) benutzt. Tab. 10 zeigt den PCR-Reaktionsansatz mit der Phusion-DNA-Polymerase.

Tab. 10: PCR-Reaktionsansatz mit der Phusion-DNA-Polymerase.

Komponente	Endkonzentration	Volumen
DNA-Matrize (Transfektionsplasmid)	5 ng	x $\mu$ l
Primer sense	20 $\mu$ M	2 $\mu$ l
Primer antisense	20 $\mu$ M	2 $\mu$ l
DNA-Polymerase 10x Puffer	1x	5 $\mu$ l
dNTP-Mischung	25 nM	0,5 $\mu$ l
Pfx-DNA-Polymerase	1 U	0,5 $\mu$ l
mit dH <sub>2</sub> O auf 50 $\mu$ l auffüllen		

Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

Initiale Denaturierung	98°C	5min	
Denaturierung	98°C	45s	} 30 Zyklen
<i>Annealing</i>	55°C	45s	
DNA-Synthese	72°C	2min	
Terminale DNA-Synthese	72°C	10min	
Kühlung auf 4 °C	$\infty$		

### 5.13.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurden horizontale Agarose-Gele mit einer Konzentration von 1,5 % (w/v) an Agarose verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer erhitzt und gelöst. Nach dem Gießen und Erkalten der Agarose wurde die zu analysierende DNA mit DNA-Probenpuffer vermischt und in die jeweiligen Geltaschen pipetiert. Die Elektrophorese fand je nach Agarosekonzentration bei 60-100V für 1-2h bei Raumtemperatur statt. Nach 10-minütiger Inkubation in einer Ethidiumbromidlösung wurde das Gel auf dem Transilluminator mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid emittiert dabei eine Fluoreszenz, welche die DNA-Banden sichtbar macht.

#### **5.13.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Die herausgetrennten DNA-Fragmente wurden in 1,5 ml EppendorfGefäße überführt und jeweils das gleiche Volumen (in  $\mu\text{l}$ ) wie das Gewicht des Gelfragments (in mg) an Puffer 3 zugegeben. Die Proben wurden 30 min bei 60 °C auf dem Proben-schüttler inkubiert. Anschließend wurden die GFX MicroSpin Säulchen mit den gelösten Gelfragmenten beladen. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Säulchen bei 13000 RPM für 3 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer 1 und erneuter Zentrifugation der beladenen Säulen bei 13000 RPM für 30 Sekunden konnte die DNA eluiert werden. Die Elution erfolgte mit 30  $\mu\text{l}$  MilliQ Wasser. Die Eluate wurden bei -20 °C gelagert.

#### **5.13.5 Aufreinigung von DNA nach PCR und Restriktionsverdau**

Zur Aufreinigung von DNA nach PCR und Restriktionsverdau wurde die DNA entweder mit Natriumacetat gefällt (siehe unten) oder das *High Pure PCR Product Purification Kit* von Roche benutzt. Zu 100  $\mu\text{l}$  PCR Produkt wurde 500  $\mu\text{l}$  Bindepuffer gegeben, nach gründlichem Mischen wurden die Elutionssäulchen beladen und 30 Sekunden bei 13000 RPM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer auf die beladenen Säulen gegeben. Nach einem einminütigen Zentrifugationsschritt wurde der Durchfluss erneut verworfen und der Waschschrift mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer wiederholt. Anschließend wurde die DNA mittels 50  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer eluiert.

#### **5.13.6 Fällen von DNA**

Zur DNA-Fällung wurde die Natriumacetat-Methode angewendet. Hierbei wurde 1/10 Volumen Natriumacetat (3M; pH 5,2) und 3 Volumen eiskaltes Ethanol absolut zur DNA-Lösung gegeben. Der gut durchmischte Ansatz wurde zur Präzipitation 30 min bei -80°C inkubiert. Das Präzipitat wurde anschließend sedimentiert (30 min, 4°C, 13000 RPM), mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in 30  $\mu\text{l}$  *ultra-pure* Wasser gelöst.

### 5.13.7 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Plasmiden wurden von der Firma Macrogen in Seoul (Korea) durchgeführt.

### 5.13.8 DNA-Restriktion

Reaktionsanalysen wurden mit Restriktionsenzymen und den entsprechenden Puffern gemäß den Herstellerangaben (New England BioLabs) für einen 20-60 µl Ansatz durchgeführt.

Zur Überprüfung der hergestellten Transfektionsvektoren wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt. Benutzt wurden die Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII* welche beide in der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Vektors schneiden und das inklonierte Fragment ausschneiden. Eingesetzt wurde jeweils 200-500 ng DNA mit je 5 Units Enzym / µg DNA. Der Verdau wurde bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden 200 ng des verdauten Vektors gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle diente unverdauter Vektor.

### 5.13.9 Herstellung der Transfektionsvektoren

Zur Herstellung von Transfektionsvektoren wurden das pEGFPN1 Plasmid mit 1-2 Units der Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII* an der multiplen Klonierungsstelle geschnitten. Die Verdauansätze der jeweiligen Inserts enthielten in einem Endvolumen von 50 µl, 2-3 µg aufgereinigte DNA, die für die eingesetzten Restriktionsenzyme vorgegebenen Puffer und die Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII* (1-2 U). Nach erneuter Aufreinigung der DNA wurden die Inserts in das linearisierte pEGFPN1 ligiert. Die Ligationsansätze enthielten 30 ng Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 20 µl, die 10fache Menge an einzuklonierendem Fragment, Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Die Ligation kohäsiver Enden erfolgte für 2 h bei RT.

Als Negativkontrolle für die Immunfluoreszenzfärbungen und für die Western Blot Versuche wurde ein Mock-Vektor hergestellt. Hierzu wurde aus dem pEGFPN1 Transfektionsvektor die GFP-Sequenz herausgeschnitten. Der pEGFPN1 Vektor wurde mit den Re-

striktionsenzymen *NotI* und *XhoI* verdaut und so die GFP Sequenz entfernt. Anschließend wurde nach Herstellung von glatter Enden an den Schnittstellen das Plasmid religiert. Die Ligation glatter Enden erfolgte für 24 h im Kühl-Thermo-Mixer bei 14°C. Nach einem Aufreinigungsschritt konnte die DNA zur Elektroporation in elektrokompetente Bakterien genutzt werden.

#### **5.13.10 Herstellung von blunt-Enden nach Restriktionsverdau**

Zur Herstellung von blunt-Enden nach einem Restriktionsverdau wurde die Pfu-DNA-Polymerase von Promega eingesetzt. Ein 50 µl Ansatz enthielt den entsprechenden 1x Pfu-Puffer, 25 nM dNTPs, 500 ng DNA sowie 3 U Pfu-DNA-Polymerase.

### **5.14 Methoden im Umgang mit Bakterien**

Zur Vervielfältigung der Expressionsvektoren wurden elektrokompetente *E. coli* Zellen mit der entsprechenden DNA transformiert und in Kultur vermehrt.

#### **5.14.1 Kultivierung von *E. coli***

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in Flüssigkulturen und auf Agarplatten bei einer Temperatur von 37°C. Um einen effektiven Gasaustausch zu ermöglichen, wurden die Flüssigkulturen in LB Medium mit 220 RPM geschüttelt. Die Nährmedien wurden in einem Wasserdampfhochdruckautoklaven für 20 min bei 121°C und 10<sup>5</sup> Pa Überdruck sterilisiert. Die Verfestigung von Nährmedien für Agarplatten erfolgte durch Zugabe von 15 g/l Agar.

#### **5.14.2 Transformation und Kultur von *E. coli***

Kompetente *E. coli* Bakterien wurden durch Elektroporation mit Plasmiden transformiert. Es wurden 50 µl der bei -80°C gelagerten, kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit dem entsprechenden Ligationsansatz zusammen pipettiert. Parallel wurden Kontrollen ohne Vektor und mit religiertem Vektor ohne Insert durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 250 µl LB-Medium für 1 h bei 37 °C und 200 RPM auf einem Schüttelinkubator in Kultur gehalten. Da die Plasmide Resistenzgene für Antibio-

tika enthalten, konnten jene Bakterien selektiert werden, welche die DNA aufgenommen hatten. Es wurden Agarplatten verwendet, die 30 µg/ml Kanamycin beziehungsweise Zeocin enthielten. Jeweils 50, 100, 150 oder 250 µl der Bakteriensuspension wurde auf den Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet bis einzelne Kolonien sichtbar wurden. Die Ausstriche auf den Agarplatten wurden falls nötig bei 4 °C gelagert.

### 5.14.3 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Plasmidpräparation zu analytischen Zwecken wurden 2 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Klons eingesetzt. Die Isolation der Plasmide erfolgte über Spinsäulchen (Miniprep Kit, Peqlab) gemäß Herstellerprotokoll. Zwei ml einer Übernachtskultur wurden bei 13000 RPM für 5 Minuten bei 4 °C in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 205 µl Lösung I / RNase A und sorgfältigem Resuspendieren. Anschließend wurde 250 µl Lösung II hinzugegeben und die Zentrifugenröhrchen 10 mal invertiert, bis ein klares Lysat entstand. Das Lysat wurde mit 350 µl Lösung III versetzt und die Lösung erneut durch Invertieren gemischt, bis sich ein flockiges Präzipitat bildete. Die Zentrifugenröhrchen wurden anschließend für 5-10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der klare Überstand in die DNA Bindsäulchen gefüllt. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 500 µl Waschpuffer. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Elutionssäulchen wurden durch eine Zentrifugationsschritt bei 13000 RPM für zwei min getrocknet. Die Elution erfolgte schließlich mit 50 µl *ultra-pure* Wasser durch Zentrifugation für eine Minute bei 750 RPM.

Für die Präparation größerer Plasmidmengen wurden 25-50 ml (für Midiprep) / 200 ml (für Maxiprep) einer Übernachtskultur eingesetzt. Die Isolation der Plasmide erfolgte über Kieselgelsäulen (Midiprep Kit, Maxiprep Kit, Invitrogen) gemäß Herstellerangaben. In einem ersten Schritt wurden die entsprechenden Kieselgelsäulen mit 10 ml (für Midiprep) / 30 ml (für Maxiprep) Equilibrationspuffer versetzt und durch die Säulen durchlaufen gelassen. Die Bakterienkultur wurde bei 500 RPM für 10 min pelletiert und das Bakterienpellet mit 4 ml (für Midiprep) / 10 ml (für Maxiprep) Resuspensionpuffer versetzt und gelöst. Nach Zugabe von 4 ml (für Midiprep) / 10 ml (für Maxiprep) Lysepuffer und vorsichtigem Mischen wurde das Gemisch für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 4 ml

(für Midiprep) / 10 ml (für Maxiprep) Präzipitationspuffer zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 13000 RPM für 10 min wurde der Überstand auf die vorbereiteten Säulen gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen zweimal mit je 10 ml (für Midiprep) / 60 ml (für Maxiprep) Waschpuffer versetzt. Zur Elution der DNA wurden die Säulen mit 5 ml (für Midiprep) / 15 ml (für Maxiprep) Elutionspuffer versetzt. Das Eluat wurde aufgefangen und mit 3 ml Isopropanol vermischt. Nach Zentrifugation bei 13000 RPM für 30 min bei 4 °C konnte die DNA pelletiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut mit 3 ml 70 % Ethanol gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (13000 RPM für 4 min bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die DNA getrocknet. Anschließend konnte die DNA in 200 µl (für Midiprep) / 500 µl (für Maxiprep) *ultra-pure* Wasser aufgenommen werden.

## **5.15 Zellkultur-Methoden**

### **5.15.1 Allgemeine Zellkulturmethoden**

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C in einem Begasungsbrutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die adherent wachsenden Zellen wurden in Gewebekulturschalen von 6, 10 oder 15 cm Durchmesser oder auf Lysin-beschichteten Deckgläsern kultiviert. Das Zellkulturmedium (siehe 6.10.1) wurde zweimal wöchentlich erneuert. Tabelle 7 zeigt die in dieser Arbeit benutzten Zelllinien und ihre jeweilige Herkunft.

### **5.15.2 Passage von Säugerzellen**

Zur Passage von konfluent gewachsenen Zellen wurde das Medium vollständig von den Zellen entfernt, die Zellen mit 1x PBS ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> gewaschen und durch eine 3-minütige Inkubation bei 37°C in einer Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) vom der Schale abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von D-MEM Zellkulturmedium inaktiviert und die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren dissoziiert. Die Zellen wurden in ein Falcon-Röhrchen überführt, durch Zentrifugation (1000 RPM, 4 min) pelletiert, in Medium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung ausgesät.

### **5.15.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl pro ml berechnete sich aus der Zahl der Zellen in 4 Großquadraten, multipliziert mit dem Kammerfaktor. Dieser ergibt sich aus dem Volumen der Zählkammer und beträgt bei der in dieser Arbeit verwendeten Zählkammer  $2,5 \times 10^3$ .

### **5.15.4 Einfrieren und Lagerung von eukaryotischen Zellen**

Zum Einfrieren wurden  $5-6 \times 10^6$  Zellen von der Kulturschale gelöst, dissoziiert und pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 1,5 ml D-MEM Zellkulturmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden möglichst schonend eingefroren, indem sie zunächst über Nacht bei  $-80\text{ °C}$  und anschließend in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert wurden ( $-196\text{ °C}$ ).

### **5.15.5 Auftauen von Zellen**

Der Auftauvorgang wurde möglichst zügig durchgeführt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, mit Nährmedium versetzt und durch 4-minütige Zentrifugation bei 1000 RPM pelletiert. Das Zellpellet wurde in D-MEM Zellkulturmedium resuspendiert, je nach gewünschter Zelldichte ausgesät und bei Standardbedingungen kultiviert.

### **5.15.6 Mycoplasmen-Test**

Mycoplasmen sind die kleinsten bekannten Prokaryoten. Sie sind zellwandlos und parasitieren häufig auf der Plasmamembran tierischer Zellen. Eventuelle Kontaminationen mit Mycoplasmen sollten in der Zellkultur regelmäßig überprüft werden, weil sie wegen ihrer Flexibilität und geringen Größe (100–250 nm) die benutzten Sterilfilter mit einer Porengröße von  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  passieren können. Zum Nachweis von Mycoplasmen wurden die Überstände der verwendeten Zellkulturen mittels PCR auf das Vorhandensein von Mycoplasmen-DNA analysiert.

### 5.15.7 Ausdifferenzierung von Neuroblastomzellen

Neuroblastomzellen wurden zu Neuronen ausdifferenziert. Hierzu wurden die Zellen über 4 Tage in Zellkulturmedium (D-MEM mit 1 % FCS) mit 20  $\mu$ M Retinolsäure inkubiert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Nach Ausdifferenzierung wurden die Zellen 3 weitere Tage in Medium ohne Retinolsäure gehalten und konnten anschließend mittels Immunfärbung untersucht werden.

### 5.15.8 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmiden erfolgte durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine 2000* von Invitrogen gemäß den Angaben des Herstellers. Im Falle von Kotransfektionen wurden die Mengen an Lipofektamin konstant gehalten und die jeweiligen Plasmide zusammen in dem jeweiligen Ansatz inkubiert. Bei der Lipofektion bindet die DNA an kationische Lipide in Liposomen. Diese Komplexe werden von den Zellen aufgenommen und die eingesetzte Vektor-DNA gelangt in die eukaryotischen Zellen. Die jeweiligen eukaryotischen Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in D-MEM ohne Antibiotikum ausplattiert, so, dass am Transfektionstag eine Konfluenz von 90-95 % bestand. Das Lipofectamine wurde wie in folgender Tabelle in D-MEM Zellkulturmedium ohne FCS und ohne Antibiotika verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde ebenfalls wie unten angegeben mit D-MEM Zellkulturmedium ohne FCS und ohne Antibiotika verdünnt und anschließend der Lipofectaminemischung zugegeben. Diese DNA-Lipofectamine-D-MEM Lösung wurde anschließend zu den eukaryotischen Zellen gegeben und durch leichtes Schütteln der Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Tab. 11: Verdünnungsvolumen bei der Lipofektion mit *Lipofectamine 2000* von Invitrogen

Kulturschale	Menge D-MEM in der Schale	DNA Menge und D-MEM Verdünnungsvolumen	<i>Lipofectamine 2000</i> Menge und D-MEM Verdünnungsvolumen
12-well	1 ml	1,6 $\mu$ g in 100 $\mu$ l	4 $\mu$ l in 100 $\mu$ l
10 cm Schale	15 ml	24 $\mu$ g in 1,5 ml	60 $\mu$ l in 1,5 ml

### **5.15.9 Selektion transfizierter Zellen**

Die Selektion transfizierter Zellen wurde mittels G418-versetztem Medium (3mg/ml) durchgeführt. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. G418 (Geneticin) ermöglicht die Selektion von allen Zellen, die eine Neomycin-Resistenz aufweisen, d.h., mit einem Plasmid transfiziert wurden, welches diese Resistenz trägt.

## **5.16 Immunologische Methoden**

### **5.16.1 Fixierung von Säugerzellen durch Formaldehyd**

Die mit den eukaryotischen Zellen bewachsenen Deckgläser wurden zunächst mit PBS gewaschen und 20 min in 4 % Formaldehyd-Lösung getaucht. Im Anschluss daran wurden die Deckgläser für weitere 5 min in eine Ammoniumchlorid-Lösung gegeben. Es folgte ein kurzer Waschschrift in PBS und anschließend konnten die Zellen permeabilisiert werden (siehe Kapitel 5.16.3).

### **5.16.2 Fixierung von Säugerzellen durch Methanol und Aceton**

Die bewachsenen Deckgläser wurden zuerst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie zunächst für 5 min in eiskaltes Methanol und dann kurz in eiskaltes Aceton getaucht. Die so behandelten Deckgläser wurden zum Trocknen auf Whatman-Papier abgelegt.

### **5.16.3 Immunfärbung von Säugerzellen**

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die Zellen auf sterilen, mit Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Zwei Tage vor der Immunfärbung wurden ca.  $5 \times 10^4$  Zellen auf die Deckgläschen ausgesät und bei 37 °C in einem Begasungsbrutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am Färbetag wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA/PBS oder Methanol-Aceton fixiert. Die Zellen wurden durch Inkubation mit 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS-CMF für 10 min permeabilisiert. Die Deckgläschen wurden anschließend in einer feuchten Kammer auf Parafilm gelegt und für 1 h bei RT mit Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei RT mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in

PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen zunächst 3 x für 5 min mit Waschlösung gewaschen, gefolgt von einer 60-minütigen Inkubation bei RT mit dem Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung in PBS. Dann wurden die Deckgläschen 3 x 5 min mit PBS gespült und anschließend konnte zur Darstellung der Zellkerne eine DAPI-Färbung angeschlossen werden (siehe 5.16.4). Im Falle der Trockeneinbettung wurden die Zellen durch einen kurzen Waschschrift mit 100 % Ethanol getrocknet, eingebettet (mit Fluoromount) , mikroskopisch analysiert und dokumentiert.

#### **5.16.4 DAPI-Färbung**

Durch die Bindung von DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) an doppelsträngige DNA können Zellkerne auf einfache Weise gefärbt werden. Nach der Fixierung mit PFA wurden die Zellen 5 min in einer 0,01 µg/ml DAPI-Methanol Lösung inkubiert. Es folgte ein kurzer Waschschrift in reinem Methanol. Bei der Methanol-Aceton Fixierung wurde mit DAPI versetztes Methanol eingesetzt. Es folgte ein kurzer Waschschrift in reinem Methanol, bevor die Deckgläschen kurz in Aceton getaucht wurden und anschließend an der Luft getrocknet wurden.

#### **5.16.5 Vitalfärbung von Lysosomen mittels LysoTracker**

Zur Darstellung von Lysosomen wurde der LysoTracker Red DND-99 von Invitrogen benutzt. Dieses Fluorochrom diffundiert bei neutralem pH-Wert frei in lebende Zellen. Die Fluorochrome verlieren durch Protonierung in sauren Kompartimenten der Zelle ihre Membrangängigkeit und reichern sich in den Lysosomen an. Auf diese Weise können Lysosome mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Zwei Tage vor der Vitalfärbung wurden ca.  $5 \times 10^4$  Zellen auf beschichteten Deckgläsern ausgesät und bei 37 °C in einem Begasungsbrutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am Färbetag wurden die Zellen mit 60 nM LysoTracker in D-MEM 10 % FCS für 1h inkubiert. Die Anfärbung der Vesikel wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

### **5.16.6 Vitalfärbung von Mitochondrien mittels MitoTracker**

Zur Anfärbung von Mitochondrien wurde der MitoTracker Orange CMTMRos von Invitrogen genutzt. Dieses Fluorochrom diffundiert in lebende Zellen und reichert sich in aktiven Mitochondrien an. Auf diese Weise können Mitochondrien mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Auch hier wurden zwei Tage vor der Vitalfärbung ca.  $5 \times 10^4$  Zellen auf beschichteten Deckgläsern ausgesät und bei 37 °C in einem Be- gasungsbrutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am Färbetag wurden die Zellen mit 200 nM MitoTracker in D-MEM Zellkulturmedium mit 10 % FCS für 30 min inkubiert. Die Anfärbung der Mitochondrien wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

### **5.16.7 Anfärbung von Peroxisomen**

Um Peroxisomen sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit dem pCMV-DS-Red-SKL Expressionsvektor kotransfiziert. Dieser Expressionsvektor ermöglicht die Translation eines rot-fluoreszierenden Proteins (RFP), an welches ein peroxisomales Lokalisationssignal (PTS1) gebunden ist. Das Lokalisationssignal schleust das RFP in die Peroxisomen ein, welche dann durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden können.

### **5.16.8 Auswertung am Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)**

Die Untersuchungen der behandelten Zellen wurden an einem TCS-4D-Laser-Scanning-Mikroskop (Leica GmbH, Bensheim) durchgeführt.

## **5.17 Proteinbiochemische Methoden**

### **5.17.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen**

Circa  $7 \times 10^6$  Zellen wurden in Ripa Puffer unter Anwesenheit des *Complete mini Protease Inhibitor Cocktails* (Roche Diagnostics) mit einem Ultraschallhomogenisator 30 s über 5 Zyklen bei einer Leistung von 100 % behandelt. Die so isolierten Proteine konnten eingefroren aufbewahrt werden.

### 5.17.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt einer Probe wurde mit Hilfe des BCA Protein-Assays (Thermo Fischer) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines Multiwellenphotometers bestimmt.

### 5.17.3 Protein-Gelelektrophorese und Western Blot denaturierter Proteine

Zu den Proteinproben (40 µg Protein) wurde 1x Protein Probenpuffer zugegeben, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend elektrophoretisch getrennt. Zur Kontrolle der Proteingrößen wurde ein Proteinstandard aufgetragen. Bei den benutzten Gelen handelte es sich um NuPage Novex Bis-Tris mini Gele von Invitrogen. Als Laufpuffer diente der NuPage MES SDS oder NuPage MOPS SDS-Laufpuffer von Invitrogen. Geblottet wurde mit dem *iBlot Dry Blotting System*, ebenfalls von Invitrogen, nach Herstellerangaben. Zur Blockierung unspezifischer gebundener Antikörper wurde die Membran für 1 h bei RT in 1x Rotiblock (Merck) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 1x Rotiblock. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min in PBS gewaschen und dann 1 h mit einem HRP- (*Horseradish Peroxidase*) konjugierten Sekundärantikörper bei RT in 1x Rotiblock inkubiert. Die Membran wurde erneut 3 x 10 min in PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Membran für 5 min mit 4 ml Entwicklerlösung (Thermo Scientific) inkubiert, abgetropft und zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Überschüssige Lösung wurde entfernt. Im Dunkeln wurde in einer Filmkassette ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und je nach Intensität der Signale für 1–5 min belichtet. Der Film wurde dann mit einer Entwicklermaschine entwickelt.

### 5.17.4 Blot stripping

Durch das *Strippen* der Blotmembran ist es möglich, gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend kann dann ein zweiter primärer Antikörper auf den gleichen Blot aufgetragen werden. Dazu wurde die Membran 2 x 5 min in PBST bei RT gewaschen, anschließend 2 x 30 min in *stripping* Puffer bei RT geschüttelt und noch einmal 3 x 5 min in PBST gewaschen. Zur Kontrolle, ob alle Antikörper abgewaschen worden sind, wurde

die Membran erneut mit Entwicklerlösung inkubiert und entwickelt. War das Strippen erfolgreich, sind keine Banden mehr zu sehen. Nach zwei kurzen Waschschritten in PBS konnte die Membran wie gewohnt in Rotiblock blockiert werden und wie unter 5.17.3 beschrieben mit dem gewünschten Antikörper inkubiert werden.

#### **5.17.5 Proteinfällung mit Trichloressigsäure**

Zur Fällung von Proteinen wurde 1 ml 20 % Trichloressigsäure zum Proteineluat gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurde die Mischung 30 min bei 13000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml kaltem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in der gewünschten Menge Tris-HCl Puffer (pH 8) aufgenommen.

#### **5.17.6 Isolierung von Mitochondrien aus Zellkultur zur Western Blot Analyse**

Zur Isolierung der Mitochondrien aus eukaryotischen Zellen wurde das *Mitochondria Isolation Kit* von Thermo Scientific nach Herstellerangaben benutzt. Reagenz A und C wurden mit dem *Complete mini Protease Inhibitor Cocktail* (Roche Diagnostics) komplettiert. Zuerst wurden etwa 20 Millionen Zellen geerntet und bei 500 RPM für 2 min zentrifugiert und pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 800 µl Reagenz A in einem 2 ml Zentrifugengefäß gelöst. Das Gemisch wurde dann 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Reagenz B hinzugefügt und gründlich gevortext. Nach Zugabe von 800 µl Reagenz C wurden die Zentrifugengefäße mehrmals invertiert (nicht gevortext) und das Gemisch bei 700 RPM für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Gefäß überführt und bei 6000 RPM für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (= cytosolische Fraktion) wurde in ein neues 2 ml Gefäß überführt und zu einem späteren Zeitpunkt zur Western Blot Analyse benutzt. Das Pellet enthält die isolierten Mitochondrien. Zu dem Pellet wurden 500 µl Reagenz C gegeben und das Gemisch ein letztes Mal bei 13000 RPM für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet konnte für die Western Blot Analyse mitochondrialer Proteine verwendet werden.

## **5.18 Aktivität mitochondrialer Enzyme und oxidativer Stress**

Die Aktivitätsbestimmung mitochondrialer Enzyme wurde in einer Kollaboration mit Prof. Dr. Kunz und Dr. Kudin (Universität Bonn, NeuroCognition, Abteilung Neurochemie) durchgeführt. Untersucht wurden G72-1-pEGFPN1 sowie G72-4-His-pEGFPN1 transfizierte Cos7 Zellen. Cos7 Zellen, die lediglich mit dem pEGFPN1 Leervektor transfiziert wurden, dienten als Kontrollgruppe (Mock).

### **5.18.1 Herstellung der Zellhomogenate**

Für die enzymatischen Untersuchungen sowie zur Bestimmung der Glutathion Menge wurden etwa  $7 \times 10^6$  Zellen mit Trypsin aus den Kulturschalen gelöst, bei 1500 RPM für zwei min pellettiert und nach mehreren Waschschritten in 1x PBS ohne  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils  $7 \times 10^6$  Zellen in 460  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer pro 100 mg Probengewicht 2 mal für 20 s mechanisch und anschließend für 15 s mittels Ultraschall bei einer Amplitude von 14 % homogenisiert. Die Messung der Produktion von Wasserstoffperoxid wurde an lebenden Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschreiben gewaschen, und schnellstmöglich analysiert.

### **5.18.2 Bestimmung der Aconitase Aktivität**

Die Aconitase wandelt Citrat in Isocitrat und Aconitat um. Die Aconitatkonzentration wurde photometrisch bei 240 nm und 30°C bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von Aconitat bei 240 nm beträgt  $4,88 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Das Reaktionsgemisch enthielt 500  $\mu\text{l}$  Aconitase-Puffer, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM Natriumcitrat, 1  $\mu\text{l}$  0,3 M  $\text{MnCl}_2$ , 0,24 mM  $\text{NADP}^+$ , 5  $\mu\text{l}$  Isocitrat Dehydrogenase (0,1 mg/ml), 10  $\mu\text{l}$  10 % Dodecyl-Maltosid, 6  $\mu\text{l}$  20 mM NADP und 20  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Zellhomogenats. Als Referenz diente ein Ansatz ohne Zellhomogenat. Es wurden Duplikate gemessen.

### **5.18.3 Bestimmung der Citrat Synthase Aktivität**

Die Aktivität der Citrat Synthase als ein mitochondriales Leitenzym wurde als Marker für den Mitochondriengehalt der untersuchten Zellen benutzt. Es ist üblich, die Aktivität an-

derer mitochondrialer Enzyme gegen die Aktivität der Citrat Synthase zu normieren (Kudin et al., 2002; Otte et al., 2011). Gemessen wurde die Reduktion von DNTB. Diese Reduktion ist gekoppelt an die Reduktion von CoA durch die Citrat Synthase-Reaktion in Anwesenheit von Oxalacetat. CoA bildet mit DTNB einen photometrisch detektierbaren Farbkomplex. Die Messungen erfolgten photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm bei 30 °C. Der Extinktionskoeffizient der Citrat Synthase beträgt  $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Das Reaktionsgemisch enthielt 800  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{l}$  0,1 mM DTNB, 30  $\mu\text{l}$  12 mM Acetyl-Coenzym A, 50  $\mu\text{l}$  50 mM Oxalacetat und 20  $\mu\text{l}$  Zellhomogenisat. Es wurden Duplikate gemessen.

Folgende Gleichungen sind Grundlage des hier benutzten Messverfahrens:



#### 5.18.4 Bestimmung der Aktivität von Komplex I der Atmungskette

Komplex I (NADH-Coenzym Q-Oxidoreduktase) der mitochondrialen Atmungskette katalysiert die Reaktion  $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{Q} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2$ . Bei der Bestimmung der Komplex I Aktivität wurde die Abnahme von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  gemessen, welches als Substrat zugegeben wurde. Neben der Rotenon-sensitiven NADH-Coenzym Q-Oxidoreduktase befindet sich in den Mitochondrien auch eine Rotenon-insensitive NADH-Coenzym Q-Oxidoreduktase, welche keine Protonenpumpaktivität besitzt. In dieser Arbeit wurde lediglich die Aktivität der Rotenon-sensitiven NADH-Coenzym Q-Oxidoreduktase bestimmt. Die Aktivitätswerte der Rotenon-insensitiven NADH-Coenzym Q-Oxidoreduktase wurden der Gesamtaktivität der NADH-Coenzym Q-Oxidoreduktase abgezogen. Die Messung erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 340-380 nm bei 30 °C. Der Extinktionskoeffizient beträgt  $5,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Der Versuchsansatz enthielt 460  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 5  $\mu\text{l}$  10mM CoenzymQ1, 5  $\mu\text{l}$  4 mM KCN, + 5  $\mu\text{l}$  15 mM NADH und 20  $\mu\text{l}$  Zellhomogenisat, beim zweiten Messdurchlauf ebenfalls 5  $\mu\text{l}$  2 mM Rotenon. Es wurden Duplikate gemessen.

### 5.18.5 Berechnung der enzymatischen Aktivitäten

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde die lineare Zu- oder Abnahme der Absorption (dE) über eine Minute gemessen. Anschließend wurde die Enzymaktivität mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Enzymaktivität (Units)} = (\text{dE} / \text{Extinktionskoeffizient}) * \text{GV}$$

$$\text{Enzymaktivität (Units/mg Protein)} = (\text{dE} / \text{Extinktionskoeffizient}) * (\text{GV} / \text{HV}) * (1 / \text{K})$$

Normierte Enzymaktivität: Enzymaktivität / Enzymaktivität Citrat Synthase

dE = Extinktionsveränderung in der Zeit

Extinktionskoeffizient in  $\text{mM}^{-1}/\text{cm}$

GV = Gesamtvolumen in der Küvette

HV = Volumen des zugesetzten Homogenisats

K = Proteinkonzentration des Homogenisats (mg/ml)

Die internationale Enzymeinheit (Units, U) entspricht dem Umsatz von 1  $\mu\text{mol}$  Substrat pro min. Der Proteingehalt der jeweiligen Probe und die Aktivität der Citrat Synthase dienen als Bezugsgrößen für die gewonnenen Messwerte. Die Normierung der Messwerte durch die Aktivität der Citrat Synthase ermöglicht es, die Proben zu normieren. Die Aktivität der Citrat Synthase korreliert zum einen mit dem Mitochondriengehalt der Probe (Schwerzmann et al., 1989), zum anderen können Aktivitätsminderungen der Enzyme einer Probe, die lediglich durch Fehler in der Probenvorbereitung entstanden sind, normiert werden. Die gemessenen Aktivitäten wurden prozentual in Bezug zur Mock Kontrolle (100 %) gesetzt. Als Mock Kontrolle dienten Zellen die lediglich mit GFP transfiziert wurden.

### 5.18.6 Bestimmung der Menge an reduziertem Glutathion

Glutathion (GSH), eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien, ist in der Lage, reaktive Sauerstoffradikale sowie Wasserstoffperoxid und oxidierte Proteine und Lipide zu reduzieren. Dabei wird GSH zum Dimer GSSG oxidiert. Die Bestimmung von Glutathion erfolgte unter Verwendung von Monochlorobiman (MCB), welches mit GSH ein fluores-

zierendes Konjugat bildet. Die Reaktion wird unter Zugabe der Glutathion-S-Transferase gestartet. Die Glutathion-S-Transferase katalysiert die Bindung von Glutathion an Xenobiotika (Forman et al., 2009), in diesem Versuchsansatz an MCB.



Zur Messung der Menge an reduziertem Glutathion (GSH) wurde in einem ersten Schritt 470  $\mu\text{l}$  MTP Medium, 7,05  $\mu\text{l}$  Glutathion-S-Transferase (Aktivität 1 Unit/ml), 2,5  $\mu\text{l}$  Monochlorobimban (0,02 M) und 30  $\mu\text{l}$  Zellhomogenisat vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde der Reaktionsansatz bei 14,000 RPM für 7 min zentrifugiert und die Fluoreszenz des Überstands bei folgenden Wellenlängen  $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$  bestimmt. Als Eichstandard wurden GSH-Konzentrationen von 0 bis 75  $\mu\text{M}$  in MTP Medium verwendet. Bei allen Proben wurden Duplikate gemessen.

#### **5.18.7 Messung der endogenen Bildung von Wasserstoffperoxid**

Eine weitere Methode zur Bestimmung von oxidativem Stress in Zellen besteht darin, die Menge an gebildetem Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu messen. Wasserstoffperoxid reagiert mit dem Amplex Red Reagenz (10-Acetyl-3,7-Dihydroxy-Phenoxazin) mit Meretichperoxidase (HRP) als Katalysator zu  $\text{H}_2\text{O}$  und Resorufin, einem fluoreszierenden Produkt. Die Fluoreszenz von Resorufin wird bei einer Extinktion bei 560 nm und einer Emission bei 590 nm gemessen. Als Leerwert wurde die Fluoreszenz des Versuchsansatz ohne die Zugabe von Peroxidase bestimmt. Ein Reaktionsansatz enthielt 1  $\mu\text{M}$  Amplex Red Reagenz, 20 U/ml HRP in Sauerstoff gesättigtem MTP Medium (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 60 mM KCl, 60 mM Tris-HCl, 110 mM Mannitol und 0.5 mM EDTA (pH 7,4)). Die Versuchsansätze wurden bei 30°C inkubiert. Bei allen Proben wurden Duplikate gemessen.

### **5.19 Statistische Methoden**

Die deskriptive Statistik erfolgte anhand von Mittelwerten und deren Standardfehlern (SEM). Die Rohdaten wurden mit der Statistiksoftware Prism 4 (GraphPad Software) ausgewertet. Paarweise Mittelwertsvergleiche wurden mit dem Students t-Test auf stati-

stische Signifikanz überprüft. Die statistische Auswertung der Furchtkonditionierung wurde anhand einer zwei-Weg-ANOVA und anschließendem Tukey post-hoc Test durchgeführt. Bei den jeweiligen Testverfahren wurden Unterschiede als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % war.

### **5.19.1 Programme zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von G72-1 und G72-4**

Um Hinweise auf die Anwesenheit von Signalpeptiden der untersuchten G72 Splicevarianten zu bekommen wurden deren Aminosäuresequenzen mittels folgender bioinformatischer Programme untersucht.

- PSORTII, psort.org, 1999: PSORT II Prediction. <http://psort.hgc.jp/form2.html> (Zugriffsdatum: 23.12.2010).

- TargetP, Center for Biological Sequence Analysis CBS, 2010: TargetP 1.1 Server. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> (Zugriffsdatum: 23.12.2010), (Emanuelsson et al., 2000).

- Ipsort, Laboratory of DNA Information Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 2010. <http://ipsort.hgc.jp/> (Zugriffsdatum: 23.12.2010), (Bannai et al., 2002).

- HSLpred, Bioinformatics Centre, Institute of Microbial Technology, Chandigarh, INDIA, 2010: A SVM based Method for the Subcellular Localization of Human Proteins. <http://www.imtech.res.in/raghava/hslpred/> (Zugriffsdatum: 23.12.2010), (Garg et al., 2005).

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Furchtkonditionierung G72-transgener Tiere

Zur Charakterisierung kognitiver Fähigkeiten G72-transgener Tiere wurde die Fähigkeit des Furchterlernens (Furchtkonditionierung) untersucht. Bei der erfolgreichen Konditionierung eines Tons mit einem aversiven Stimulus zeigt sich eine Furchtreaktion (bei Nagern typischerweise Erstarren) auf erneutes Präsentieren dieses konditionierten Stimulus (Ton).

Abb. 9 zeigt, dass G72-transgene Tiere im Gegensatz zu Wildtyp Tieren ein Defizit im Erlernen der Furchtreaktion, d.h. in der Furchtkonditionierung, aufwiesen. An Tag 1 wurden der Ton und der Schmerzreiz gekoppelt präsentiert. An Tag 2 des Versuches wurde lediglich der Ton präsentiert, hier zeigten sich deutliche Reaktionsunterschiede zwischen den Mausstämmen. Bei Wildtyp Tieren war die Furchtkonditionierung erfolgreich, d.h. Wildtyp Tiere haben den Ton mit dem Schmerzreiz verknüpft und zeigten daher wie erwartet verstärktes Erstarren bei Präsentation konditionierten Reizes (Wt Basalwert vs. Wt nach Konditionierung,  $p < 0,001$ ). Bei den G72-transgenen Tiere hingegen war bei Präsentation des Tons an Tag 2 keine Furchtreaktion zu beobachten (G72 Basalwert vs. G72 nach Konditionierung,  $p > 0,05$ ). Die statistische Analyse der Daten mittels zwei-Weg-ANOVA zeigte einen signifikanten Genotyp-Effekt ( $F_{(1,27)} = 7,341$ ;  $p < 0,05$ ) sowie einen signifikanten Behandlungs-Effekt (Behandlung = Konditionierung) ( $F_{(1,27)} = 12,44$ ;  $p < 0,01$ ). Die Interaktion beider Faktoren (Genotyp x Behandlung) war ebenfalls signifikant ( $F_{(1,27)} = 8,890$ ;  $p < 0,01$ ); Wildtyp Tiere verhielten sich somit nach Konditionierung signifikant unterschiedlich zu G72-transgenen Tieren.

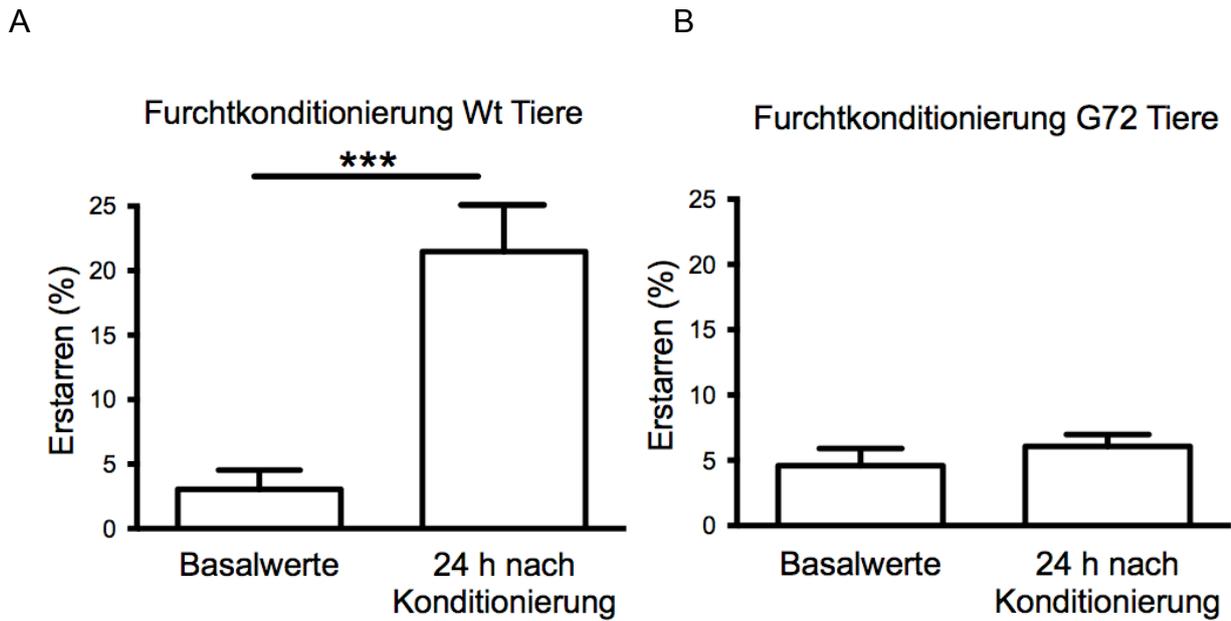


Abb. 9: Furchtkonditionierung bei Wildtyp Tieren (A) und transgenen G72 Tieren (B). Wildtyp Tiere zeigten eine Ton-Schmerzassoziation. Wt Tiere zeigten eine signifikant verstärkte Furchtreaktion auf Präsentieren des konditionierten Stimulus (Ton). G72-transgene Mäuse zeigten dagegen keine Furchtkonditionierung. Dargestellt ist der Anteil der Schreckstarre prozentual zur gesamten Versuchszeit (3 min) (Mittelwerte + SEM). Wt Basalwert n=8, G72 Basalwert n=7, Wt 24 h n=10, G72 24 h n=6. Tukey post-hoc Test \*\*\*p<0,001 Wt Basalwert vs. Wt nach Konditionierung.

Da die Dauer der Bewegungslosigkeit auf Messungen der Stärke der Erschütterung der Kammer beruht, wurde das Körpergewicht der Tiere am ersten Versuchstag gemessen und verglichen. Abb. 10 zeigt, dass kein Unterschied im Gewicht der untersuchten Tiere bestand.

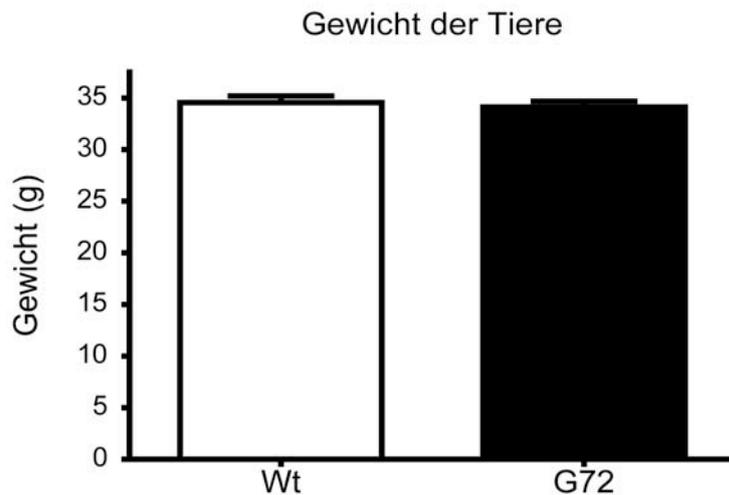


Abb. 10: Körpergewicht der untersuchten Wildtyp und G72-transgenen Tiere. Zwischen den Gruppen ist kein signifikanter Unterschied im Gewicht festzustellen. Students t-Test  $p > 0,05$ . Wt  $n=19$ , G72  $n=14$ . Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM.

Des Weiteren wurde die Schmerzreaktion von Wildtyp und G72-transgenen Tieren bestimmt. Hierzu wurde die Anzahl der Sprünge während des aversiven Reizes ausgewertet und verglichen. Als Sprung wurde jede Erschütterung der Kammer über 35G gewertet und alle 10 ms automatisiert gezählt. Abb. 11 zeigt, dass G72 Tiere signifikant stärker auf den Fußschock reagieren als Wildtyp Tiere.

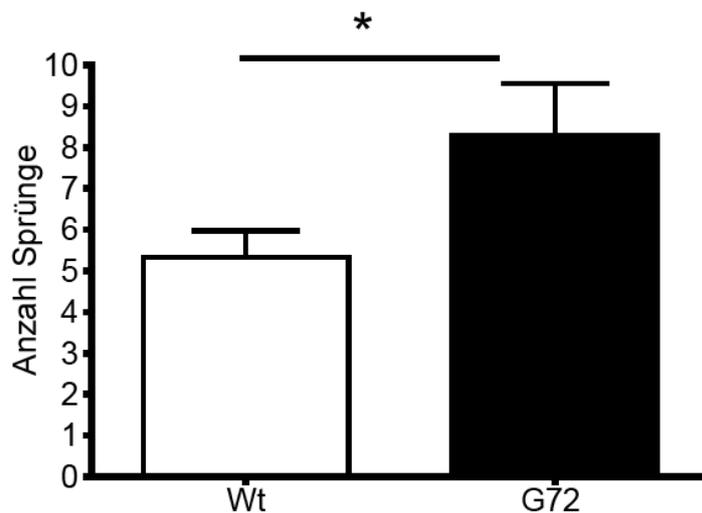


Abb. 11: Bestimmung der Schmerzreaktion auf einen aversiven Stimulus (Fußschock, Dauer 2 s). G72-transgene Tiere reagieren signifikant stärker auf den Schmerzreiz. Wildtyp  $n=10$ , G72  $n=7$ . Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Students t-Test  $*p > 0,05$  Wt vs. G72-transgene Tiere.

Um die Reaktion der G72 Tiere auf den konditionierten Stimulus noch genauer zu untersuchen, wurde, als Maß für die Aktivität beziehungsweise als Maß für die unternommenen Fluchtversuche der Tiere, die Anzahl an Sprüngen während der Ton Präsentation (Dauer 3 min) 24 h nach Konditionierung im Vergleich zu den Basalwerten bestimmt (Abb. 12). Sowohl Wildtyp Tiere als auch G72 Tiere zeigen nach Konditionierung weniger Sprünge im Vergleich zu den Basalwerten. Dieser Unterschied war signifikant im Tukey post-hoc Test bei den Wildtyp Tieren (Wt Basalwert vs. Wt nach Konditionierung,  $p < 0,05$ ). Die statistische Analyse der Daten mittels zwei-Weg-ANOVA zeigte einen signifikanten Behandlungs-Effekt (Behandlung = Konditionierung) ( $F_{(1,27)} = 14,31$ ;  $p < 0,001$ ) jedoch keinen Genotyp-Effekt ( $F_{(1,27)} = 2,412$ ;  $p > 0,05$ ). Die Interaktion beider Faktoren (Genotyp x Behandlung) war wie erwartet nicht signifikant ( $F_{(1,27)} = 0,2197$ ;  $p > 0,05$ ). Das Sprungverhalten der Wildtyp Tiere nach Konditionierung ist somit nicht signifikant unterschiedlich zu den untersuchten G72-transgenen Tieren.

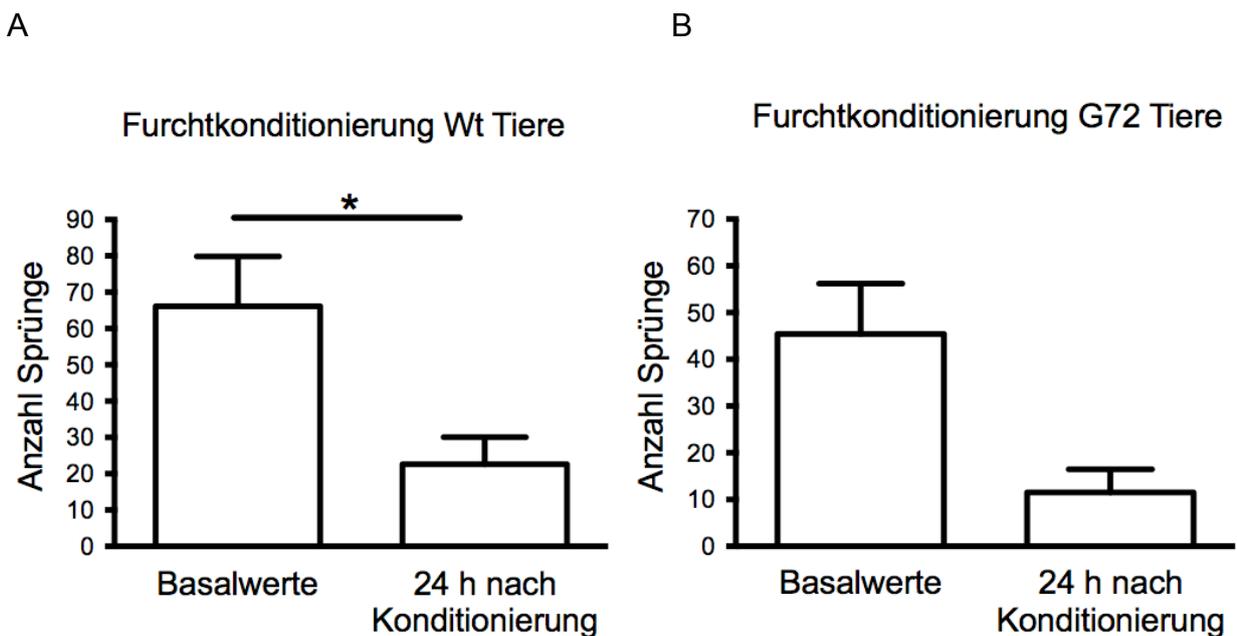


Abb. 12: Anzahl der Sprünge während der Ton-Präsentation nach Konditionierung im Vergleich zu den Basalwerten. Gemessen wurde die Anzahl an Sprüngen über einen Zeitraum von 3 min. A, Wildtyp. B, G72 Tiere. Sowohl Wildtyp als auch G72-transgene Tiere zeigen weniger Sprünge nach erfolgter Konditionierung. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Wt Basalwert  $n=8$ , G72 Basalwert  $n=7$ , Wt 24 h  $n=10$ , G72 24 h  $n=6$ . Tukey post-hoc Test  $*p < 0,05$  Wt Basalwert vs. Wt nach Konditionierung.

## 6.2 Herstellung der Expressionsvektoren für G72-1 und G72-4

Zur Herstellung G72-exprimierender Zellen wurden die ORFs von G72-1 und G72-4 in den pEGFP-N1-Expressionsvektor (BD Biosciences Clontech) kloniert (Abb. 13). Die Primer zur Vervielfältigung der ORFs wurden so gewählt, dass jeweils ein GFP-Fusionsprotein, ein His-Tag-Fusionsprotein, oder G72-1 bzw. G72-4 ohne Tag, kloniert wird (Siehe Kapitel 6.4).

### pEGFP-N1 Vector Information

GenBank Accession #U55762

PT3027-5

Catalog #6085-1

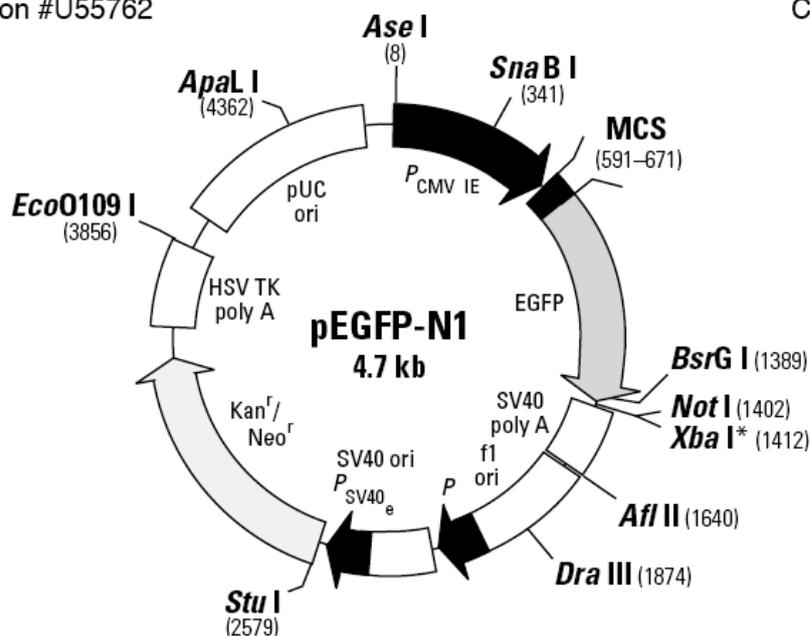


Abb. 13: Klonierungsvektor pEGFPN1 (BD Biosciences Clontech). Es handelt sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor mit einem Kanamycin-Neomycin Resistenzgen sowie der Sequenz von EGFP (enhanced green fluorescent protein). Die multiple Klonierungssequenz (MCS) befindet sich zwischen CMV-Promotor und der EGFP Sequenz. Durch die in MCS klonierte Gene resultieren somit EGFP Fusionsproteine sofern kein Stop Codon dazwischen liegt.

Die zur Amplifikation der jeweiligen Inserts benutzten Vorwärts-Primer besitzen eine *XhoI* Schnittstelle, die Rückwärts-Primer eine *HindIII*-Schnittstelle. Somit können die amplifizierten Sequenzen in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des pEGFPN1 Vektors integriert werden.

In Abb. 14 sind die hergestellten Transformationsvektoren dargestellt.

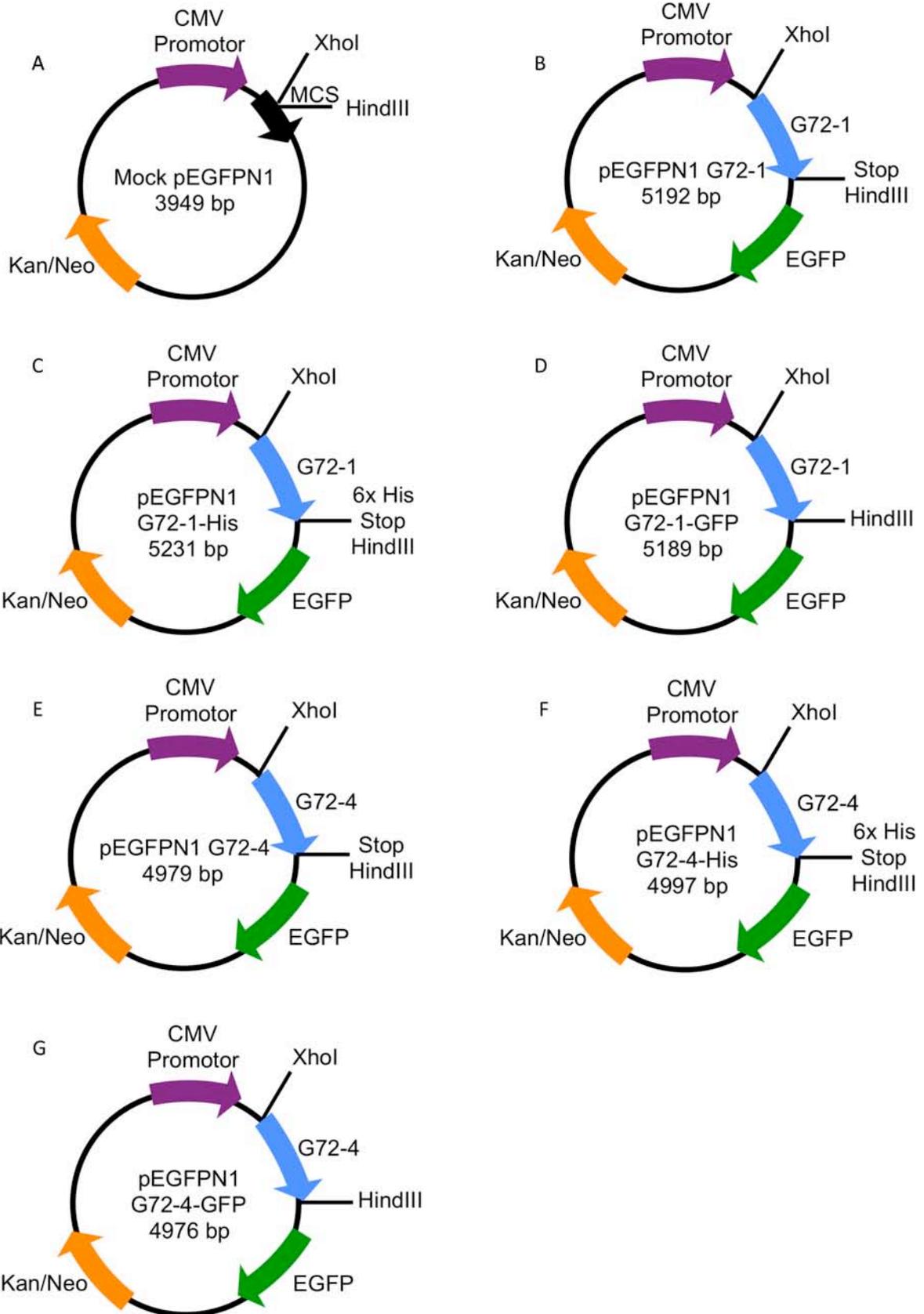


Abb. 14: Plasmidkarten der in dieser Arbeit hergestellten Expressionsvektoren. (A) Mock Vektor ohne Insert und ohne GFP Sequenz. (B) G72-1 pEGFPN1 Vektor mit G72-1 Insert gefolgt von einer Stop Sequenz. (C) G72-1-His pEGFPN1 Vektor mit His-tagged G72-1 Insert. (D) G72-1-GFP pEGFPN1 Vektor mit G72-1 Insert ohne Stop Codon, so dass ein G72-1-GFP Fusionsprotein entsteht. (E) G72-4 pEGFPN1 Vektor mit G72-4 Insert gefolgt von einer Stop Sequenz. (F) G72-4-His pEGFPN1 Vektor mit His-tagged G72-4 Insert. (G) G72-4-GFP pEGFPN1 Vektor mit G72-4 Insert ohne Stop Codon, so dass ein G72-4-GFP Fusionsprotein entsteht. Lila: CMV Promotor-Sequenz, Blau: Insert-Sequenz (G72-1 beziehungsweise G72-4), Grün: EGFP-Sequenz, Orange: Kanamycin/Neomycin Resistenz-Sequenz.

### 6.2.1 Überprüfung der Transfektionsvektoren

Nach Plasmidisolierung wurde die Vektor DNA mittels Restriktionsverdau verifiziert. Abb. 15 zeigt die Analyse der Vektoren G72-1 pEGFPN1, G72-1-His pEGFPN1 und G72-1-GFP pEGFPN1. Dargestellt sind die jeweiligen Inserts für G72-1, G72-1-His und G72-1-GFP. Der Vektor wurde mit *HindIII* und *XhoI* verdaut. Die Restriktionsschnittstellen flankieren das Insert und trennen dieses heraus. Die Auftrennung der DNA ( $\approx 200$  ng) erfolgte in einem 1,5 % Agarosegel. Als Kontrolle diente unverdauter Vektor (4,7 kb). Die herausgeschnittenen Fragmente entsprechen den erwarteten Banden bei  $\approx 460$  bp.

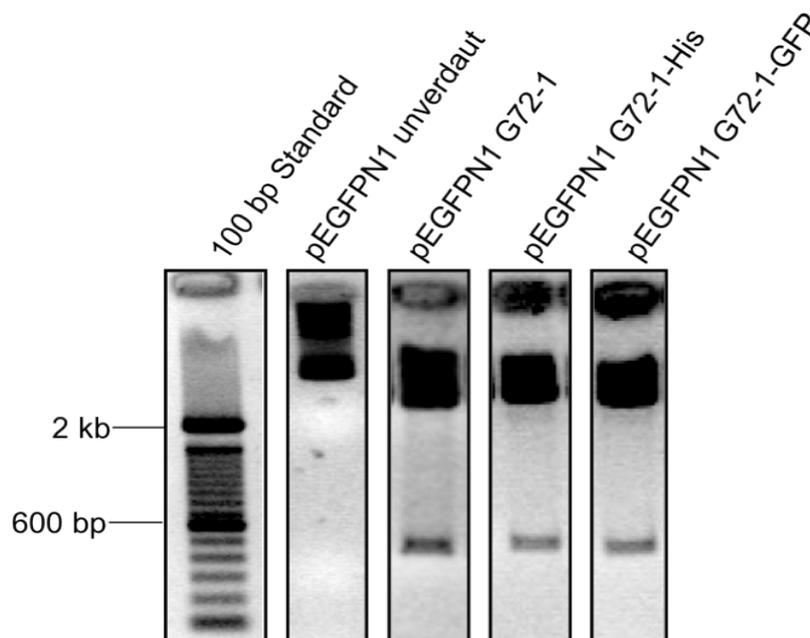


Abb. 15: Verifikation der Klonierungsvektoren mit Insert (G72-1). Restriktionsverdau mit *HindIII* und *XhoI* und anschließender Auftrennung der DNA ( $\approx 200$  ng) in einem 1,5 % Agarosegel. Als Kontrolle diente unverdauter Vektor (4,7 kb). Die herausgeschnittenen

Fragmente entsprechen den erwarteten Banden bei  $\approx 460$  bp.

Auch die Vektoren mit den G72-4 Inserts wurden wie oben beschrieben mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XhoI* geschnitten (Abb. 16). Wie erwartet entstanden hierbei Restriktionsfragmente von 4700 bp des Vektors an sich und Fragmente von ungefähr 250 bp der jeweiligen Inserts.

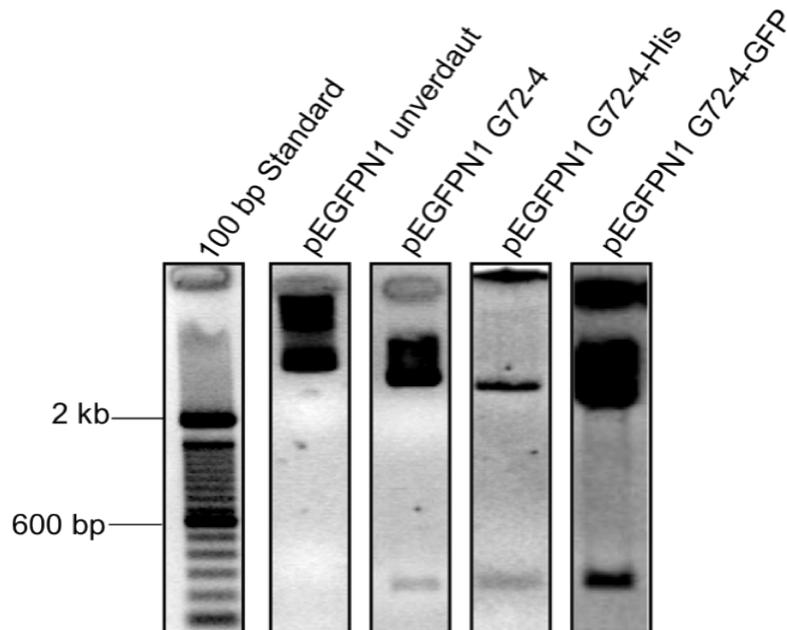


Abb. 16: Verifikation des Klonierungsvektors mit Insert (G72-4). Der Vektor wurde mit *HindIII* und *XhoI* verdaut. Dargestellt sind die Inserts für G72-4, G72-4-His und G72-4-GFP. Die Auftrennung der DNA ( $\approx 200$  ng) erfolgte in einem 1,5 % Agarosegel. Als Kontrolle diente unverdauter Vektor (4,7 kb). Die herausgeschnittenen Fragmente entsprechen den erwarteten Banden bei  $\approx 250$  bp.

### 6.2.2 Herstellung der Mock Kontrolle

Als Negativkontrolle für die Immunfluoreszenzfärbungen und für die Western Blot Versuche wurde ein Mock-Vektor hergestellt. Der pEGFPN1 Vektor wurde mit den Restriktionsenzyme *NotI* und *XhoI* verdaut und so die GFP Sequenz entfernt. Anschließend wurde nach Herstellung von blunt-Enden an den Schnittstellen das Plasmid religiert und mittels Gelelektrophorese überprüft. Der entstandene Mock-Vektor exprimiert somit kein Protein.

Abb. 17 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung des verdauten pEGFPN1 Vektors sowie die Kontrolle des Mock Expressionsvektors nach erfolgter Ligation.

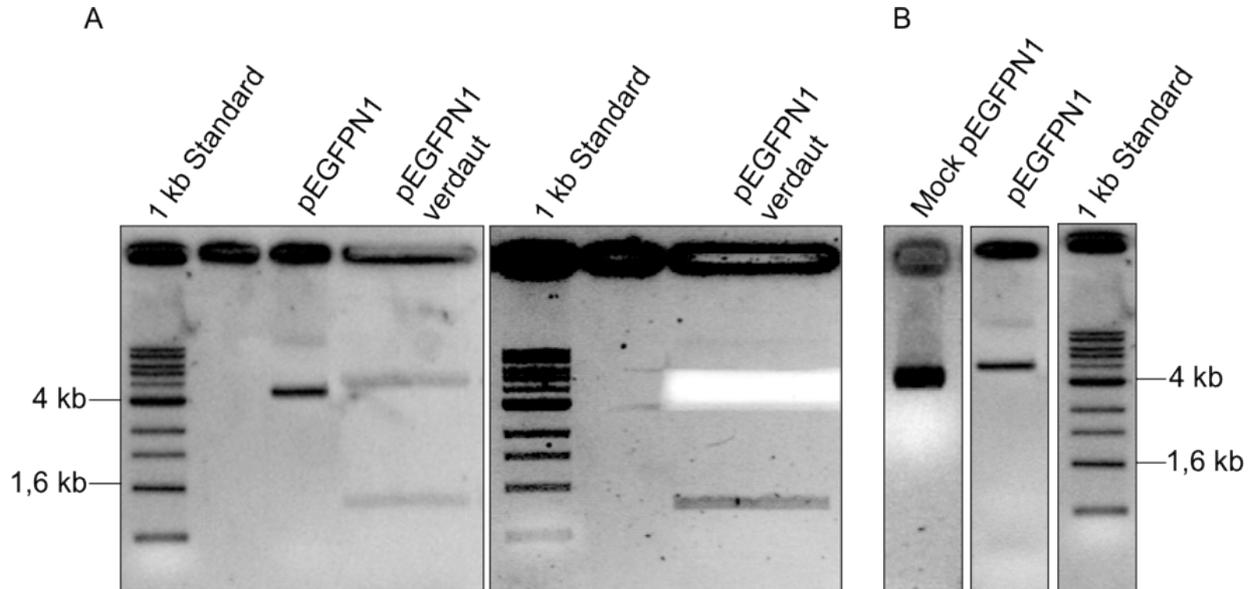


Abb. 17. Herstellung und Kontrolle des pEGFPN1 Mock-Vektors (Mock pEGFPN1). A, Verdau von pEGFPN1 mit *XhoI* und *NotI* mit Exszision des Fragments mit der für GFP kodierenden Sequenz ( $\approx 730$  bp). Der resultierende pEGFPN1 Vektor ohne GFP (4 kb) wurde aus dem Gel herausgeschnitten. B, Kontrolle des hergestellten Mock-Kontrollvektors (pEGFPN1 ohne GFP Sequenz). Der Mock Vektor wurde mit *NotI* linearisiert und durch Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt. Die Länge des linearisierten Mock Vektors liegt wie erwartet bei  $\approx 4$  kb. Als Vergleich wurde nicht modifizierter pEGFPN1 Vektor aufgetragen ( $\approx 4,7$  kb). Die Auftrennung der DNA ( $\approx 200$  ng) erfolgte in einem 1,5 % Agarosegel.

Zusätzlich zum Restriktionsverdau wurden alle Vektoren mittels Sequenzierung (Macrogen, Korea) überprüft. So konnte die Orientierung und Basenabfolge des Inserts bestimmt werden. Es wurden anschließend nur diejenigen Kolonien weiterverwendet, die das fehlerfreie Insert im Klonierungsvektor enthielten.

### 6.2.3 Herstellung von Transfektionsfragmenten aus den jeweiligen Transfektionsvektoren

Da die von den Transfektionsvektoren exprimierte Kanamycin-Neomycin Resistenz die mitochondriale Aktivität der transfizierten Zellen beeinträchtigte, wurden die Sequenzen der jeweiligen Inserts zusammen mit dem CMV Promotor und der Poly-A Sequenz aus

den jeweiligen Transfektionsvektoren mittels PCR amplifiziert und als lineare DNA in die Zellen lipofektiert. Die so hergestellten Zellen exprimieren somit nur den amplifizierten Teil des Vektors und enthalten nicht den gesamten pEGFPN1 Vektor. Die hierfür benutzten Primer sind in Tab. 4 aufgelistet.

Abb. 18 zeigt die Lokalisation der Primer zur Amplifikation der Sequenz vom CMV Promotor bis zum Poly-A Sequenz der modifizierten pEGFPN1 Vektoren.

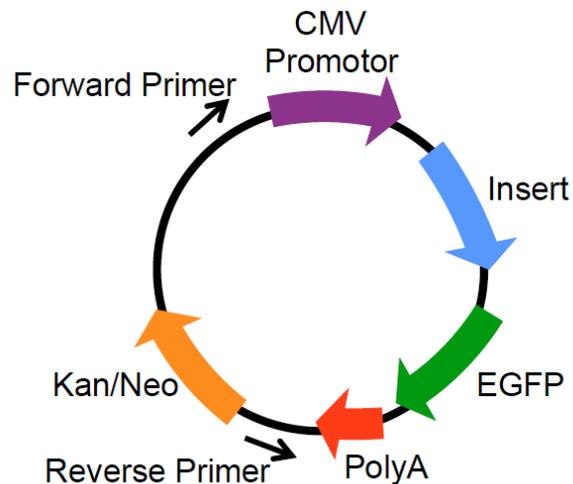


Abb. 18: Lokalisation der PCR Primer zur Amplifikation der klonierten Fragmente der Transfektionsvektoren. Dargestellt ist der pEGFPN1 Transfektionsvektor mit beliebigem Insert (blau). Die beiden schwarzen Pfeile symbolisieren die Primer die zur Amplifikation der gegebenen Sequenz dienen. Lila: CMV Promotor-Sequenz, Blau: Insert-Sequenz (G72-1 beziehungsweise G72-4), Grün: EGFP-Sequenz, Rot: Poly-A Sequenz, Orange: Kanamycin/Neomycin Resistenz-Sequenz.

In Abb. 19 sind die mit dem oben dargestellten Primern amplifizierten Sequenzen der hergestellten Transfektionsvektoren nach gelelektrophoretischer Auftrennung dargestellt.

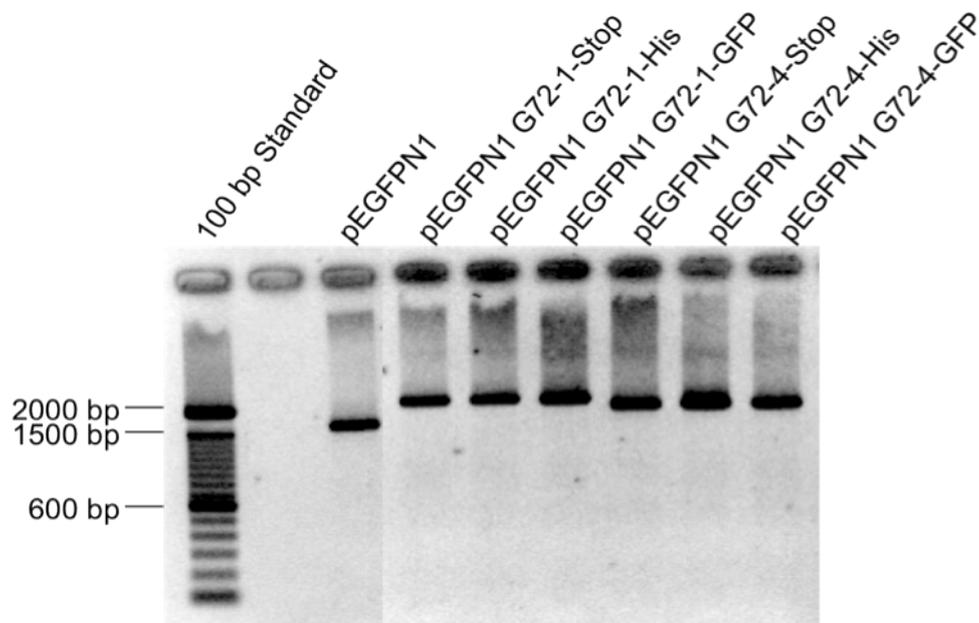


Abb. 19: Amplifikation der jeweiligen Transfektionsfragmente ausgehend von den hergestellten Transfektionsvektoren. Dargestellt sind die amplifizierten PCR Fragmente. Die Auftrennung der DNA ( $\approx 200$  ng) erfolgte in einem 1,5 % Agarosegel. Die amplifizierten Fragmente entsprechen den erwarteten Banden bei  $\approx 2000$  bp. Das amplifizierte Fragment des nicht modifizierten pEGFPN1 Vektors ist wie erwartet etwas kleiner ( $\approx 1500$  bp).

### 6.3 Überprüfung der Transfektionsrate mit Lipofektamin

72 Stunden nach Transfektion mit Lipofektamin wurde die Transfektionsrate bestimmt. Wie in Abb. 20 gezeigt, wurden sowohl durch Transfektion der Zellen mit dem zirkulären Plasmid als auch mit den amplifizierten Teilfragmenten Transfektionsraten von um die 80 % erzielt. In Abb. 20 ist die Transfektionsrate nach Transfektion mit pEGFPN1 dargestellt. Zur Bestimmung der Transfektionsrate wurde die prozentuale Menge an GFP-produzierenden Zellen bestimmt.

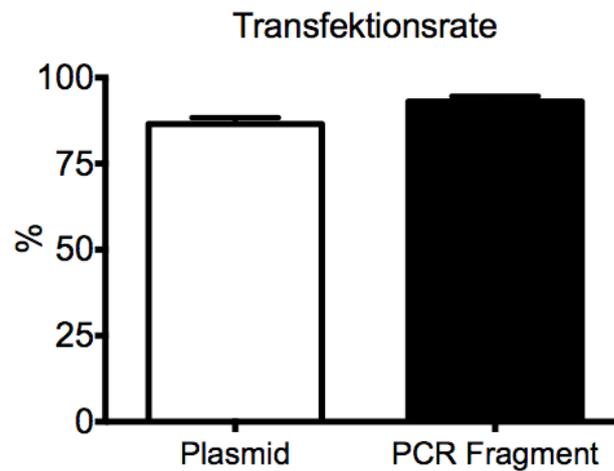


Abb. 20: Transfektionsraten mit zirkulärem pEGFPN1 Plasmid und dem amplifiziertem Teilfragment des Vektors. Dargestellt sind die Transfektionsraten von Cos7 Zellen. Es wurde die prozentuale Anzahl an GFP produzierenden Cos7 Zellen bestimmt. Anzahl der Wiederholungen n=4. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM.

#### **6.4 Nachweis von G72-1 und G72-4 in transfizierten Cos7 Zellen mittels Western Blot**

In einem ersten Schritt wurden Hek293 Zellen mit den entsprechenden Vektoren transfiziert und die Zellen 72 h später auf Expression der Proteine im Western Blot untersucht. Als Mock Kontrolle diente pEGFPN1 ohne GFP Sequenz. Zur Detektion wurden Antikörper gegen G72-1, His-Tag, und gegen GFP eingesetzt. Wie in Abb. 21 und 22 dargestellt, stimmen die beobachteten Größen von G72-1 (18 kDa), G72-1-His (18 kDa) sowie G72-1-GFP (45 kDa) mit den erwarteten Banden überein.

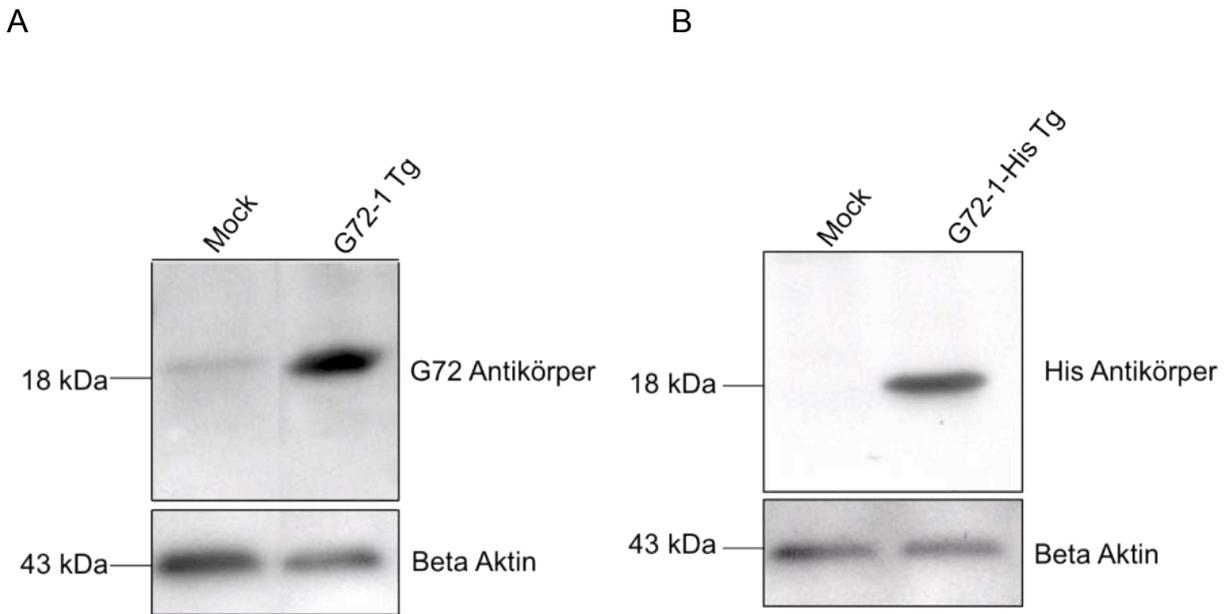


Abb. 21: Nachweis der Proteine G72-1 (A) und G72-1-His (B) mittels Western Blot 72 h nach Transfektion von Hek293 Zellen. Zum Nachweis wurden G72-1 und His-Antikörper benutzt. G72-1: 18 kDa, G72-1-His: 18 kDa. Aufgetragen wurde jeweils 30  $\mu$ g der isolierten Proteine der G72-1-transgenen Cos7 Zellen und Mock-transfizierten Zellen (Mock) 72 h nach Transfektion. Als Nachweis, dass in allen Taschen die gleiche Menge Protein aufgetragen wurde, dient die  $\beta$ -Aktin Kontrolle.

In Abb. 22 ist der Western Blot Nachweis von G72-1-GFP aus transfizierten Hek293 Zellen dargestellt. Zur Detektion wurden Antikörper gegen GFP eingesetzt. Die beobachtete Größe von G72-1-GFP (45 kDa) stimmt mit der erwarteten Bande überein. Unterhalb der Bande von G72-1-GFP bei 45 kDa ist eine vermutlich unspezifische Bande detektiert worden.

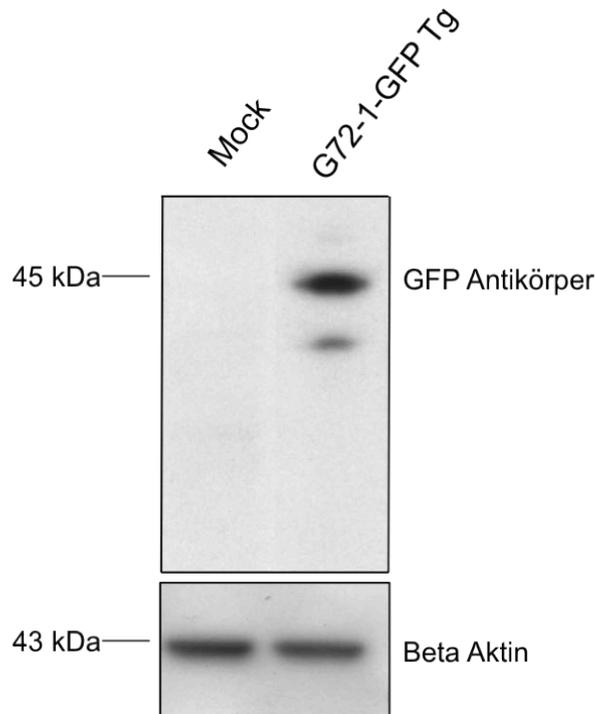


Abb. 22: Nachweis von G72-1-GFP mittels Western Blot 72 h nach Transfektion von Hek293 Zellen. Zum Nachweis wurde ein GFP-Antikörper benutzt. G72-1-GFP: 45 kDa. Aufgetragen wurde jeweils 30 µg der isolierten Proteine der G72-1-GFP-transgenen Hek293 Zellen und Mock-transfizierten Zellen (Mock) 72 h nach Transfektion. Als Nachweis, dass in allen Taschen die gleiche Menge Protein aufgetragen wurde, dient die  $\beta$ -Aktin Kontrolle. Unterhalb der eigentlichen Bande von G72-1-GFP wurde eine unspezifische Bande schwach detektiert.

In Abb. 23 ist der Western Blot Nachweis von G72-4-His und G72-4-GFP aus transfizierten Hek293 Zellen dargestellt. Zur Detektion wurden Antikörper gegen His-Tag und gegen GFP eingesetzt. Die beobachteten Größen von G72-4-His (14,7 kDa) und G72-4-GFP (41,6 kDa) stimmen mit den erwarteten Banden überein.

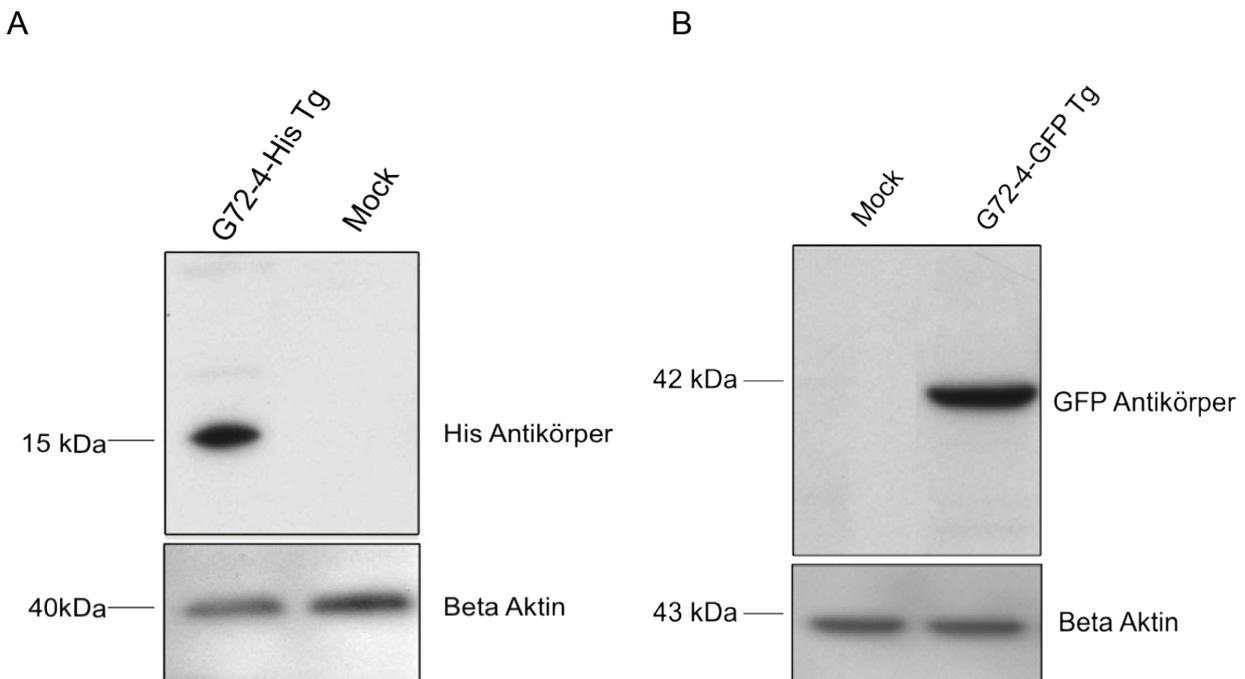


Abb. 23: Nachweis der Proteine G72-4-His (A) und G72-4-GFP (B) mittels Western Blot 72 h nach Transfektion von Hek293 Zellen. Benutzt wurde ein His- Tag und ein GFP-Antikörper. Die Banden von G72-4-His (15 kDa) und des Fusionsproteins G72-4-GFP (42 kDa) entsprachen den erwarteten Größen. Aufgetragen wurde jeweils 30  $\mu$ g der isolierten Proteine der G72-4-transgenen Zellen und Mock-transfizierten Zellen (Mock) 72 h nach Transfektion. Als Nachweis, dass in allen Taschen die gleiche Menge Protein aufgetragen wurde, dient die Beta-Aktin Kontrolle.

## 6.5 Die subzelluläre Lokalisation von G72-1 und G72-4

Um die zelluläre Lokalisation von G72-1 und G72-4 zu bestimmen, wurden in einem ersten Schritt 72 h nach Transfektion Immunfluoreszenzfärbungen G72-1 beziehungsweise G72-4 exprimierender Zellen angefertigt. Untersucht wurden neben Cos7 Zellen auch Hek293 Zellen, Astrozyten, undifferenzierte N2a Zellen sowie ausdifferenzierte Neurone. Untersucht wurde eine mögliche Kolo-kalisation von G72 mit Mitochondrien, Lysosomen und Peroxisomen. Zur Darstellung von Mitochondrien und Lysosomen wurde ein rot-fluoreszierender Farbstoff verwendet. Die Markierung von Peroxisomen wurde durch Kotretransfektion mit dem pCMV-DS-Red-SKL Vektor erreicht. Dieser Vektor exprimiert ein rot-fluoreszierendes peroxisomales Protein.

In Tab. 12 sind alle transformierten Zelllinien mit der jeweiligen subzellulären Lokalisation von G72-1, G72-1-GFP, G72-4-His und G72-4-GFP angegeben. Zur quantitativen Auswertung der subzellulären Lokalisation wurden jeweils 25 Zellen nach Immunhistochemie mikroskopisch ausgewertet und die Anzahl der Zellen mit der jeweiligen Lokalisation der transgenen Proteine bestimmt.

In Cos7 Zellen war G72-1 und G72-1-GFP vorwiegend mitochondrial lokalisiert und wurde in einem geringen Anteil der Zellen (etwa 10 %) im Cytosol gefunden. G72-4-His und G72-4-GFP waren nur in einem Viertel der Zellen rein mitochondrial zu finden und wurden im Gegensatz zu G72-1 vorwiegend im Cytosol bestimmt. In wenigen Cos7 Zellen war G72-1 und G72-1-GFP sowie G72-4-His und G72-4-GFP in beiden Kompartimenten zugleich lokalisiert. In einem sehr geringen Anteil der transgenen Cos7 Zellen konnte eine punktuelle Kolo-kalisation von G72-1 und G72-4-GFP mit Peroxisomen und Lysosomen nachgewiesen werden. Im Großteil der Zellen wurde jedoch weder eine peroxisomale noch eine lysosomale Lokalisation von G72-1 und G72-4-GFP beobachtet.

In transfizierten Hek293 Zellen wurde G72-1-GFP in 80 % der Zellen ebenfalls rein mitochondrial nachgewiesen, in wenigen Zellen war G72-1-GFP im Cytosol lokalisiert oder wurde in beiden Kompartimenten vorgefunden. G72-4-GFP hingegen war hingegen in 100 % der Hek293 Zellen im Cytosol lokalisiert.

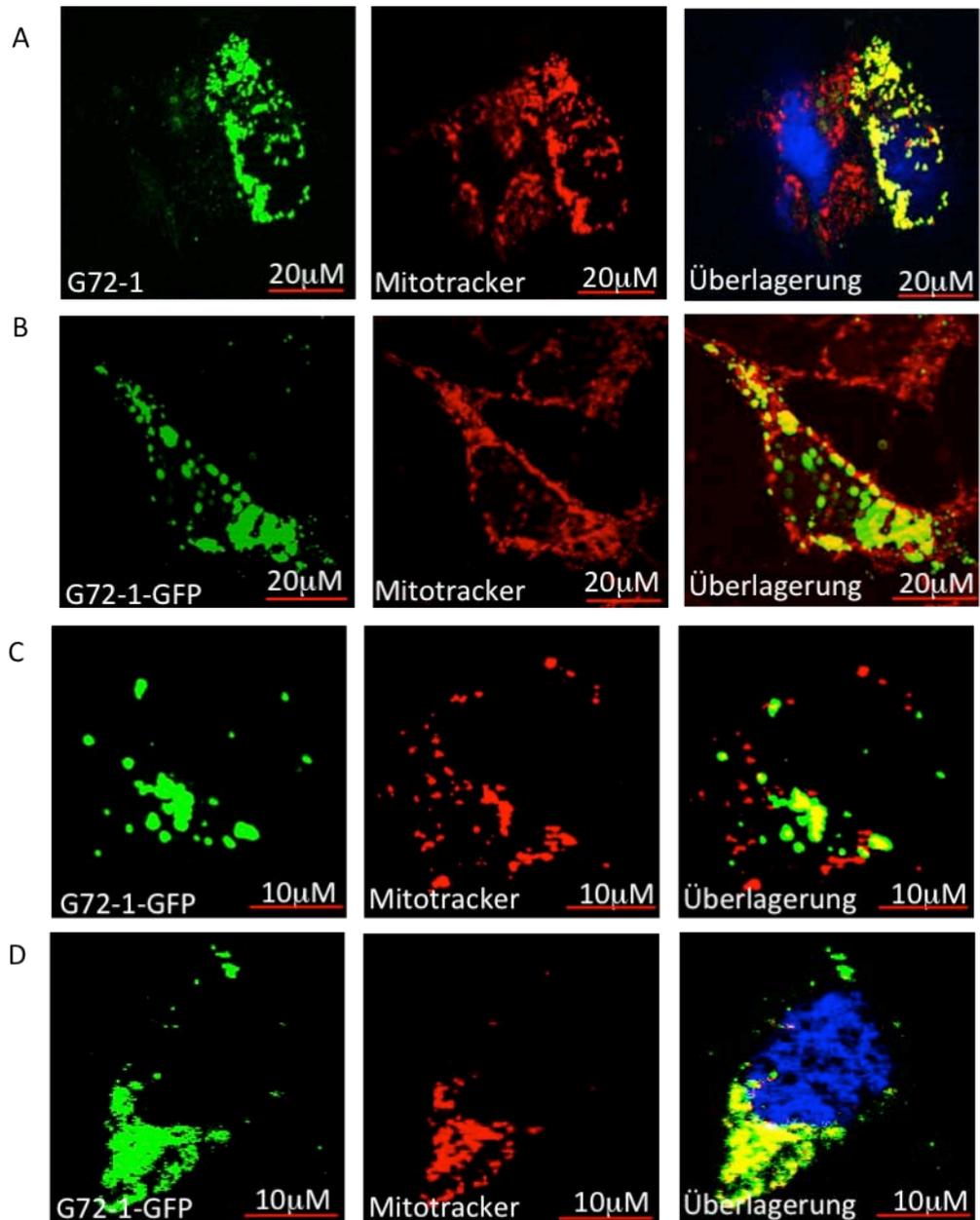
In N2a Zellen war G72-1-GFP vorwiegend sowohl mitochondrial als auch cytoplasmatisch lokalisiert, in einem geringen Anteil der transgenen N2a Zellen wurde G72-1-GFP rein mitochondrial oder rein cytosolisch nachgewiesen. Wie auch in den Hek293 Zellen war G72-4-GFP in N2a Zellen rein cytoplasmatisch lokalisiert. In den untersuchten ausdifferenzierten N2a Zellen, welche Dendriten-bildend sind, wurde G72-1-GFP ebenfalls vorwiegend in beiden Kompartimenten gefunden. In wenigen Zellen konnte eine rein mitochondriale oder rein cytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden. G72-4-GFP war auch hier rein cytoplasmatisch vorzufinden.

G72-1-GFP konnte in den transfizierten Astrozyten wie in den transgenen N2a Zellen hauptsächlich sowohl im Cytoplasma als auch in den Mitochondrien nachgewiesen werden. In einem kleinen Anteil der G72-1-GFP produzierenden Astrozyten wurde G72-1-GFP allein im Cytosol oder einzig in den Mitochondrien vorgefunden.

Tab. 12: Übersicht über alle untersuchten Zelllinien und die jeweilige subzelluläre Lokalisation von G72-1, G72-1-GFP, G72-4-His und G72-4-GFP. Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen mit der jeweiligen subzellulären Lokalisation. Es wurden jeweils 25 Zellen ausgewertet.

Zelltyp	Kompartiment	Protein	Lokalisation %
Cos7	Mitochondrien	G72-1	80
		G72-1-GFP	84
		G72-4-His	24
		G72-4-GFP	20
	Cytosol	G72-1	8
		G72-1-GFP	4
		G72-4-His	64
		G72-4-GFP	72
	Mitochondrien + Cytosol	G72-1	12
		G72-1-GFP	12
		G72-4-His	12
		G72-4-GFP	8
Peroxisome	G72-1	8	
	G72-4-GFP	8	
Lysosome	G72-1	8	
	G72-4-GFP	12	
Hek293	Mitochondrien	G72-1-GFP	80
		G72-4-GFP	0
	Cytosol	G72-1-GFP	8
		G72-4-GFP	100
	Mitochondrien + Cytosol	G72-1-GFP	12
		G72-4-GFP	0
N2a	Mitochondrien	G72-1-GFP	20
		G72-4-GFP	0
	Cytosol	G72-1-GFP	8
		G72-4-GFP	100
	Mitochondrien + Cytosol	G72-1-GFP	72
		G72-4-GFP	0
Neurone	Mitochondrien	G72-1-GFP	24
		G72-4-GFP	0
	Cytosol	G72-1-GFP	8
		G72-4-GFP	100
	Mitochondrien + Cytosol	G72-1-GFP	68
		G72-4-GFP	0
Astrozyten	Mitochondrien	G72-1-GFP	8
	Cytosol	G72-1-GFP	20
	Mitochondrien + Cytosol	G72-1-GFP	72

Abb. 24 zeigt die mitochondriale Lokalisation von G72-1 in Cos7 Zellen (A, B), Hek293 (C) Zellen, Astrozyten (D), N2a Zellen (E) sowie ausdifferenzierten Neuronen (F). Untersucht wurde die Lokalisation von nativem Protein und G72-1-GFP. G72-1 und G72-1-GFP konnte in den untersuchten Zelllinien mitochondrial nachgewiesen werden. Dies ist durch die Überlagerung (gelbe Darstellung) der rot gefärbten Mitochondrien (Mitotracker) und der grünen Fluoreszenz von G72-1 und G72-1-GFP zu erkennen.



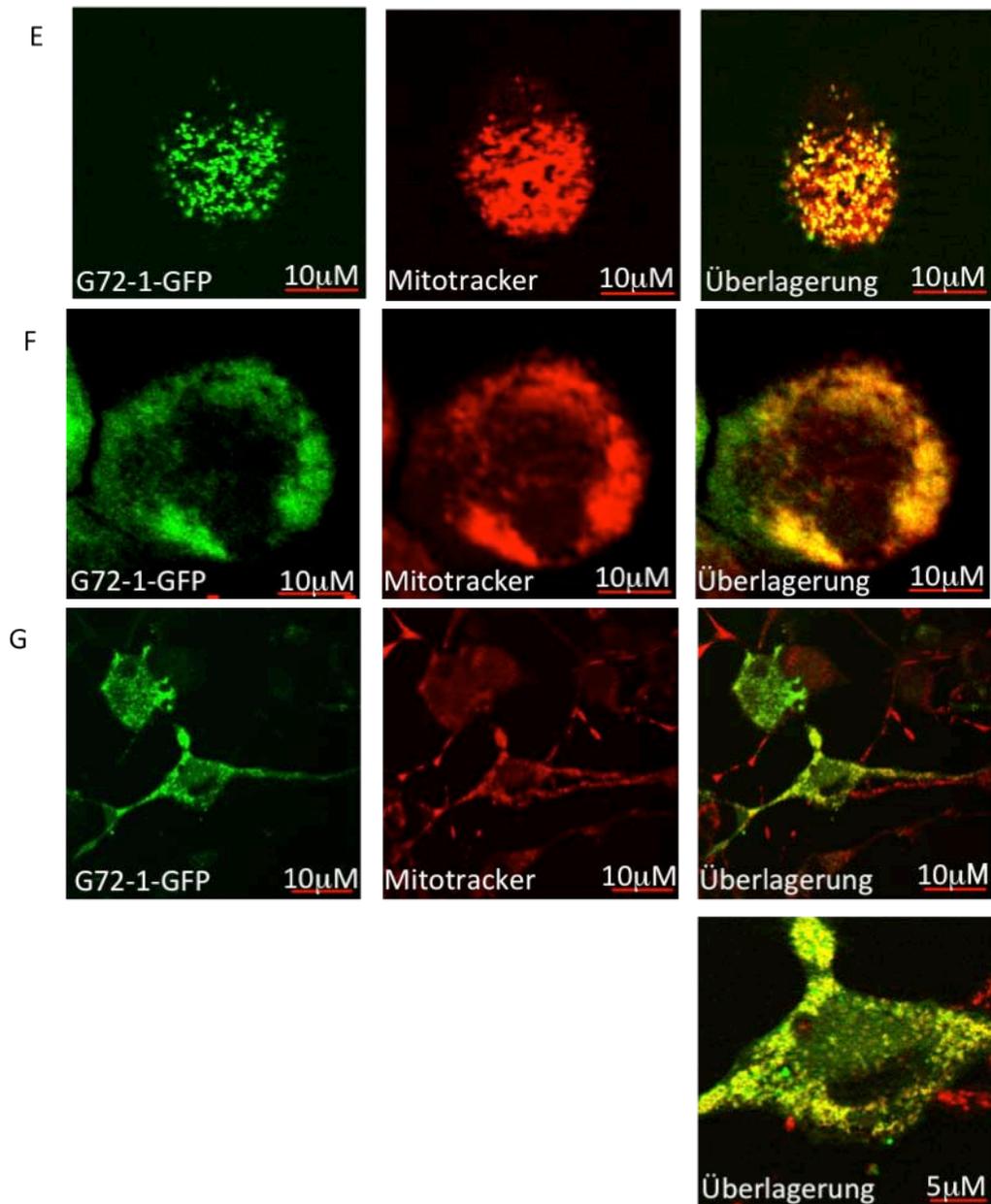


Abb. 24: G72-1 ist in den Mitochondrien der transgenen Zellen lokalisiert. Untersucht wurden Cos7 Zellen (A,B), Hek293 Zellen (C), Astrozyten (D), N2a Zellen (E,F) sowie ausdifferenzierte N2a Zellen (Dendriten-bildenend) (G) 72 h nach Transfektion. G72-1 wurde mit einem primären G72-Antikörper und einem sekundären grün-fluoreszierendem Antikörper nachgewiesen. G72-1-GFP konnte durch die Eigenfluoreszenz von GFP direkt nachgewiesen werden. Die Mitochondrien wurden mit rot-fluoreszierendem Mitotracker markiert. In A und D sind die Zellkerne durch DAPI-Färbung blau markiert, Zellkern allein hier nicht dargestellt. Eine Kolokalisation stellt sich in den Überlagerungen als gelbe Färbung dar.

Um eine lysosomiale oder peroxysomale Lokalisation von G72-1 in Cos7 Zellen zu untersuchen, wurden weitere Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. In Abb. 25 A, B ist zu sehen, dass G72-1 (grüne Fluoreszenz) in 92 % der untersuchten Zellen weder lysosomal noch peroxysomal lokalisiert war; in den Überlagerungsbildern ist in keine Gelbfärbung, d.h. keine Kolo­kalisierung zu sehen. Lysosomen sowie Peroxisomen kennzeichnen sich durch rote Fluoreszenz. In 8 % der untersuchten Cos7 Zellen konnte eine punktuelle Kolo­kalisierung von G72-1 mit Peroxisomen und Lysosomen nachgewiesen werden (siehe Abb. 25 C, D).

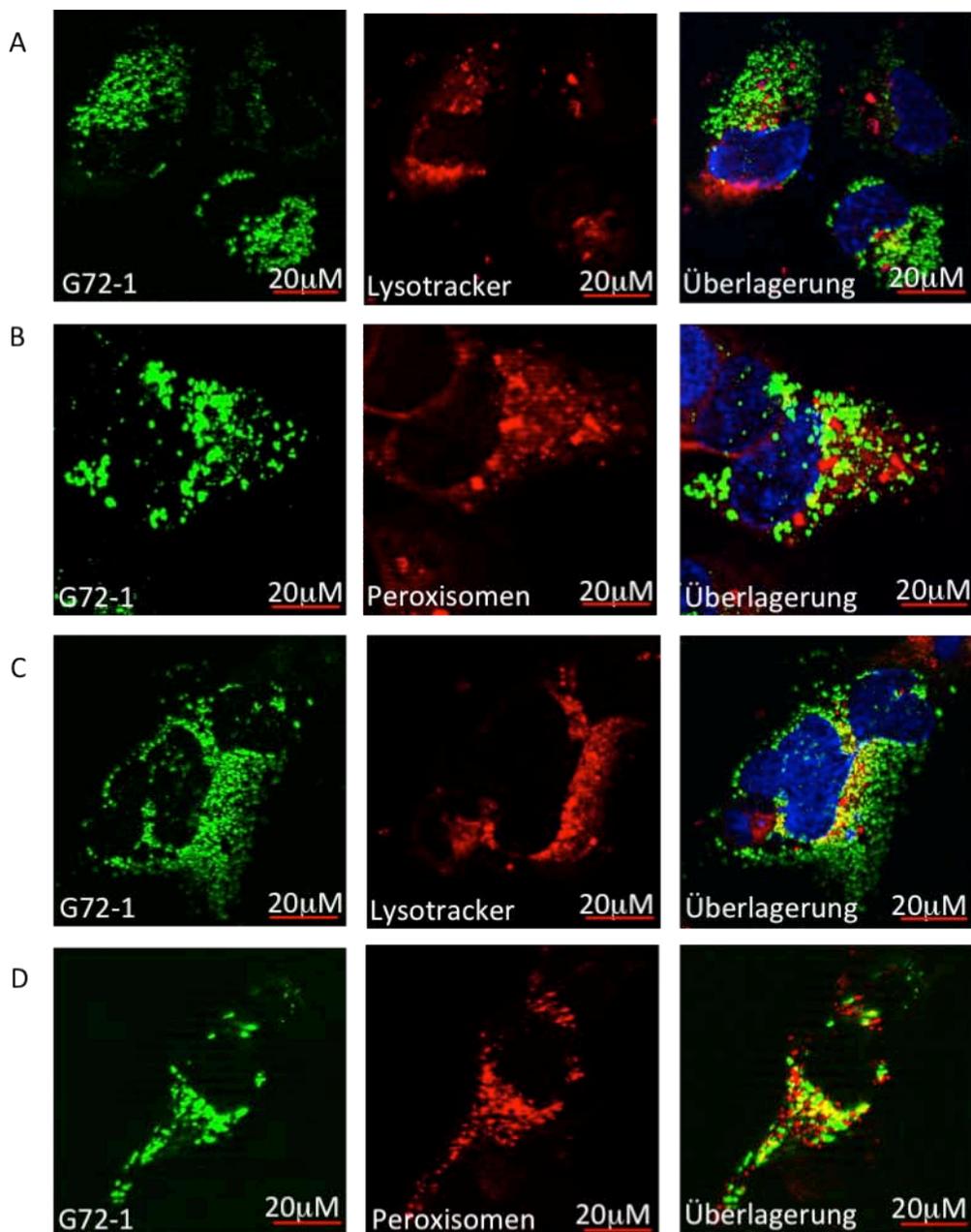
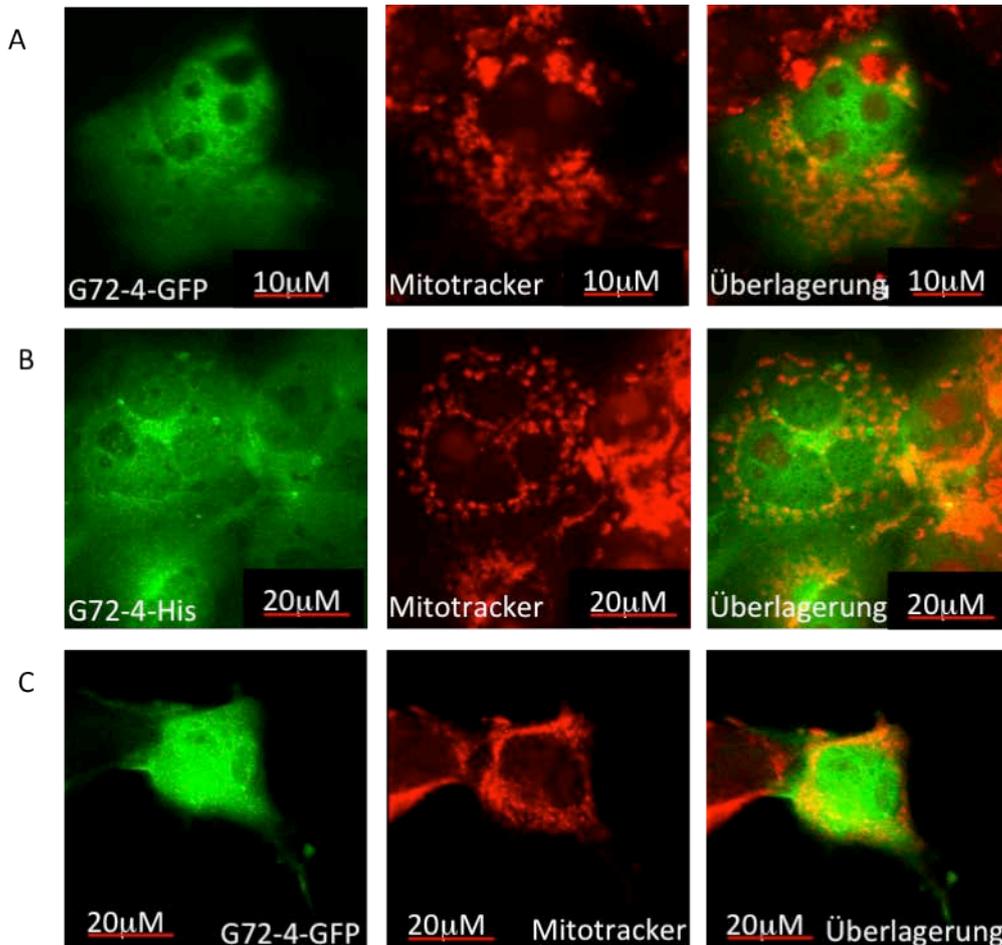


Abb. 25: G72-1 kolokalisiert in 92 % weder mit Lysosomen (A) noch mit Peroxisomen (B). In 8 % der untersuchten Zellen wurden punktuelle Kolokalisationen von G72-1 mit Lysosomen (C) und Peroxisomen (D) gesehen. Dargestellt sind G72-1 transfizierte Cos7 Zellen 72 h nach Transfektion. G72-1 wurde mit dem spezifischen primären G72-Antikörper gekoppelt an einen grün-fluoreszierendem sekundär-Antikörper nachgewiesen. Die Lysosomen wurden mit rot-fluoreszierendem LysoTracker, die Peroxisomen wurden durch Kotretransfektion mit rot-fluoreszierendem RFP-PTS1 markiert. In A, B und C wurden die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt, Zellkern allein hier nicht dargestellt. Eine Kolokalisation stellt sich in den Überlagerungen als gelbe Färbung dar.

Die zweite untersuchte Splicevariante G72-4 war, im Gegensatz zu G72-1, in den untersuchten Zelllinien zum größten Teil cytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 26). Untersucht wurden transgene Cos7 Zellen (A,B), Hek293 Zellen (C,D), N2a Zellen (E) sowie ausdifferenzierte Neurone (F) jeweils 72 h nach Transfektion.



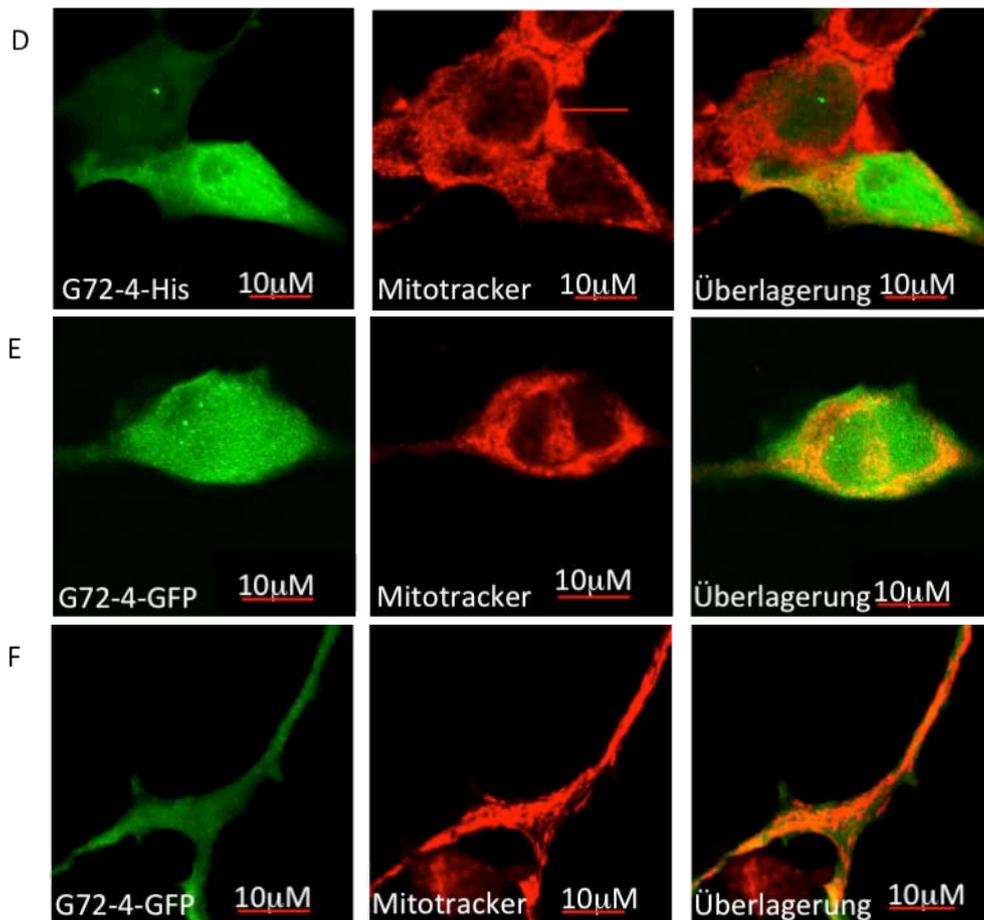


Abb. 26: G72-4 war überwiegend cytosolisch lokalisiert. Untersucht wurden Cos7 Zellen (A,B), Hek293 Zellen (C,D), Neuroblastom Zellen (E) sowie ausdifferenzierte Neurone (F). Abgebildet sind G72-4-His sowie G72-4-GFP-transgene Zellen 72 h nach Transfektion. G72-4-His wurde mit einem primären His-Tag Antikörper gekoppelt an einen grün-fluoreszierenden sekundären Antikörper nachgewiesen. Die Mitochondrien wurden mit rot-fluoreszierendem Mitotracker markiert. Eine Kolokalisation stellt sich in den Überlagerungen als gelbe Färbung dar.

In etwa einem Viertel der untersuchten Cos7 Zellen war G72-4 ebenfalls mitochondrial lokalisiert, wie in Abb. 27 zu sehen. Dies war nicht für die anderen untersuchten Zelltypen der Fall. In den Cos7 Zellen konnte in einem Teil der untersuchten Zellen eine deutliche Überlagerung (gelbe Fluoreszenz) von G72-4 (grüne Fluoreszenz) und den rot-fluoreszierenden Mitochondrien bestimmt werden.

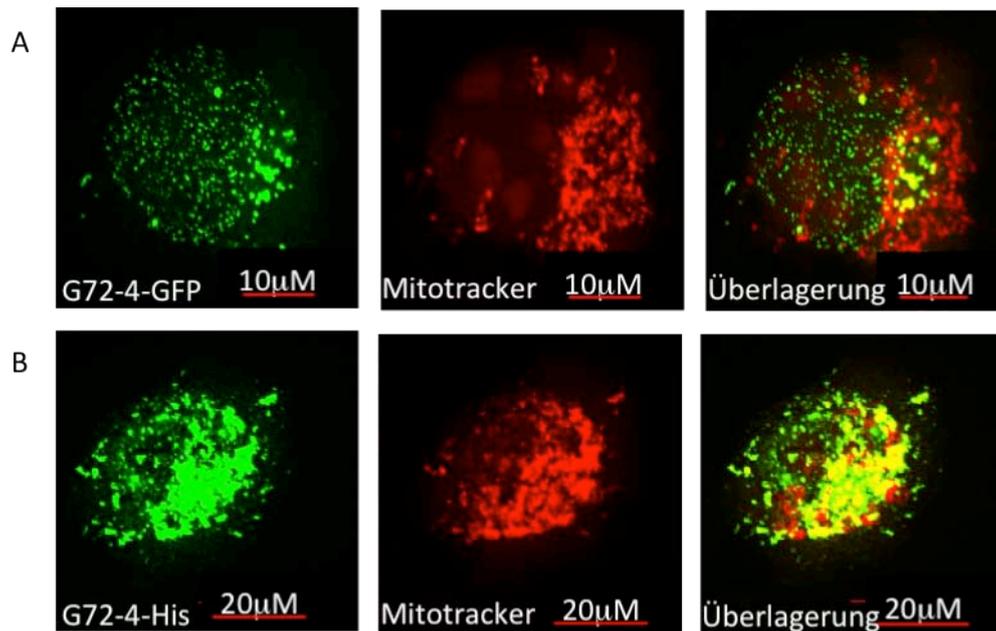


Abb. 27: In 25 % der Cos7 Zellen war G72-4 ebenfalls mitochondrial lokalisiert. Dargestellt sind G72-4-His und G72-4-GFP-transgene Cos7 Zellen 72 h nach Transfektion. G72-4-His wurde mit einem primären His-Tag Antikörper nachgewiesen, gekoppelten an einen grün-fluoreszierenden sekundären Antikörper. Die Mitochondrien wurden mit rot-fluoreszierendem Mitotracker markiert. Wie durch die gelbe Fluoreszenz in den Überlagerungen zu sehen, ist in den abgebildeten Zellen Cos7 Zellen G72-4 mitochondrial lokalisiert.

Zur Vollständigkeit wurde auch eine lysosomale und eine peroxisomale Lokalisation von G72-4-GFP untersucht.

Abbildung 28 A zeigt beispielhaft eine Cos7 Zelle ohne Kolokalisation von G72-4-GFP mit Lysosomen. Dies war in 88 % der untersuchten Cos7 Zellen der Fall. Es wurde keine gelbe Fluoreszenz in der Überlagerung d.h. keine Kolokalisation festgestellt. In 12 % der untersuchten Cos7 Zellen konnte eine partielle Kolokalisation von G72-4-GFP mit Lysosomen beobachtet werden. Dies ist in Abbildung 28 B dargestellt.

In 92 % aller untersuchten Cos7 Zellen konnte ebenfalls keine peroxisomale Lokalisation von G72-4-GFP beobachtet werden (Abb. 28 C, D). Abbildung 28 D zeigt eine Cos7 Zelle mit cytosolischem aber auch in Organellen gelagertem G72-4-GFP. In 8 % der Zellen wurde eine punktuelle Überlagerung von G72-4-GFP mit den rot-fluoreszierenden Peroxysomen bestimmt (Abb. 28 E).

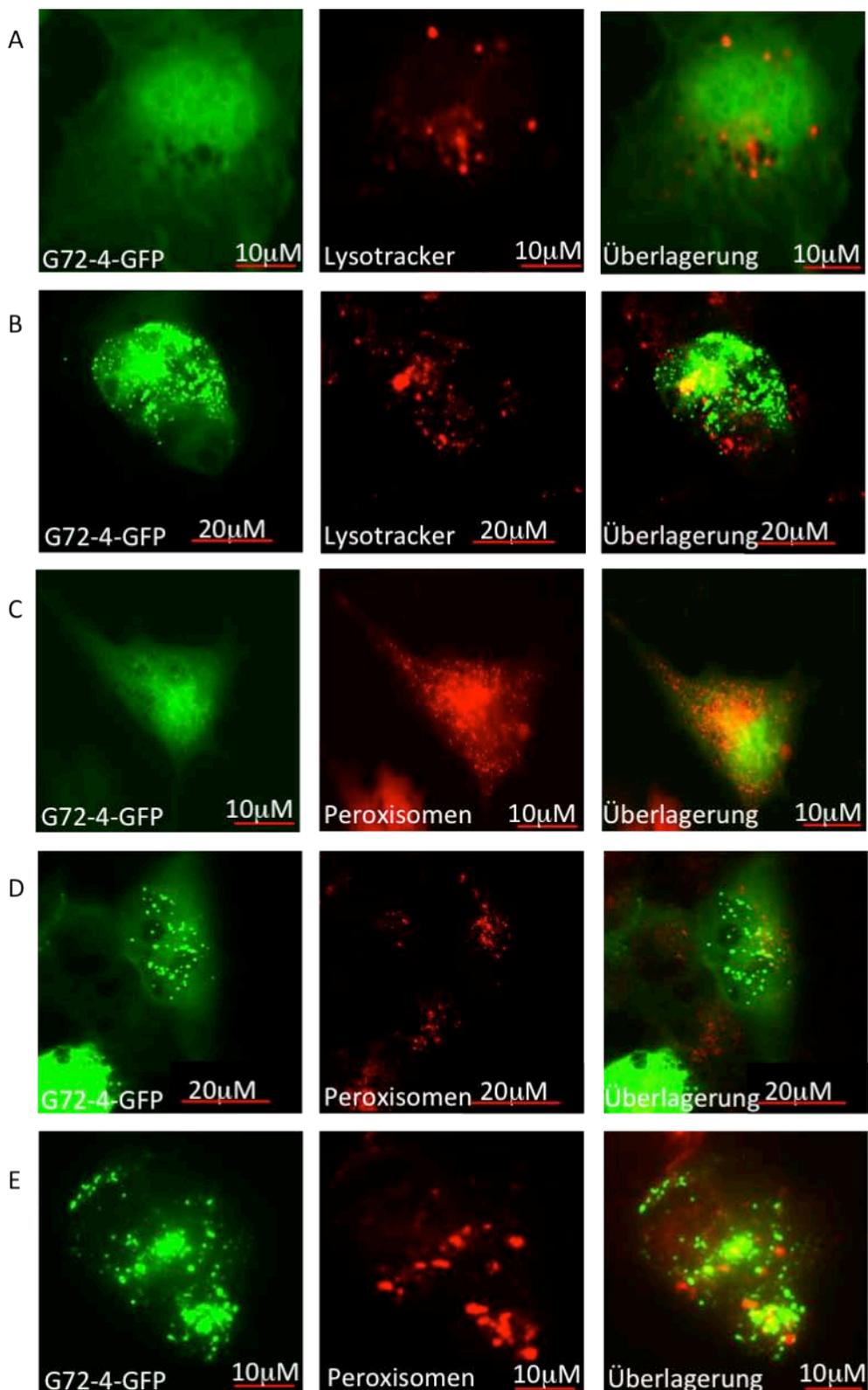


Abb. 28: G72-4-GFP war in 88 % der untersuchten Cos7 Zellen nicht lysosomal (A) und in 92 % der Zellen nicht peroxisomal (C,D) lokalisiert. 12 % der Cos7 Zellen konnten punktuelle G72-4-GFP Proteine in einzelnen Lysosomen nachgewiesen werden (B). In 8

% der Cos7 Zellen wurde G72-4-GFP ebenfalls punktuell peroxisomal beobachtet (E). Dargestellt sind G72-4-GFP transfizierte Cos7 Zellen 72 h nach Transfektion. Die Peroxisomen wurden durch Kotransfektion mit rot fluoreszierendem RFP-PTS1 markiert.

### **6.5.1 Zusammenfassung der Lokalisation von G72-1 und G72-4 in Cos7 Zellen**

Die Lokalisation von G72-1 und G72-4-His wurde quantitativ noch genauer ausgewertet. Aus verschiedenen Bereichen der bewachsenen Deckgläser wurden jeweils 50 Zellen von 5 durchgeführten Immunfärbungen ausgezählt. Es wurde die Menge an Zellen mit mitochondrialer, cytosolischer und gemischter Lokalisation von G72-1 und G72-4-His gezählt. Die Anzahl an Zellen mit der jeweiligen Lokalisation wurde prozentual zur Gesamtzahl der Zellen gesetzt.

In Abb. 29 ist die quantitative Bestimmung der Lokalisation der beiden untersuchten G72-abgeleiteten Proteine in transgenen Cos7 Zellen 72 h nach Transfektion dargestellt. G72-1 war in 80 % der Zellen mitochondrial lokalisiert. In 15 % der Zellen war G72-1 sowohl im Cytosol als auch in Mitochondrien zu finden. In 5 % der Zellen war G72-1 rein cytosolisch aufzuweisen.

G72-4 war in 63 % der Cos7 Zellen im Cytosol zu finden, in 23 % war G72-4-His mitochondrial lokalisiert. In 13 % der Cos7 Zellen konnte eine Lokalisation sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien determiniert werden.

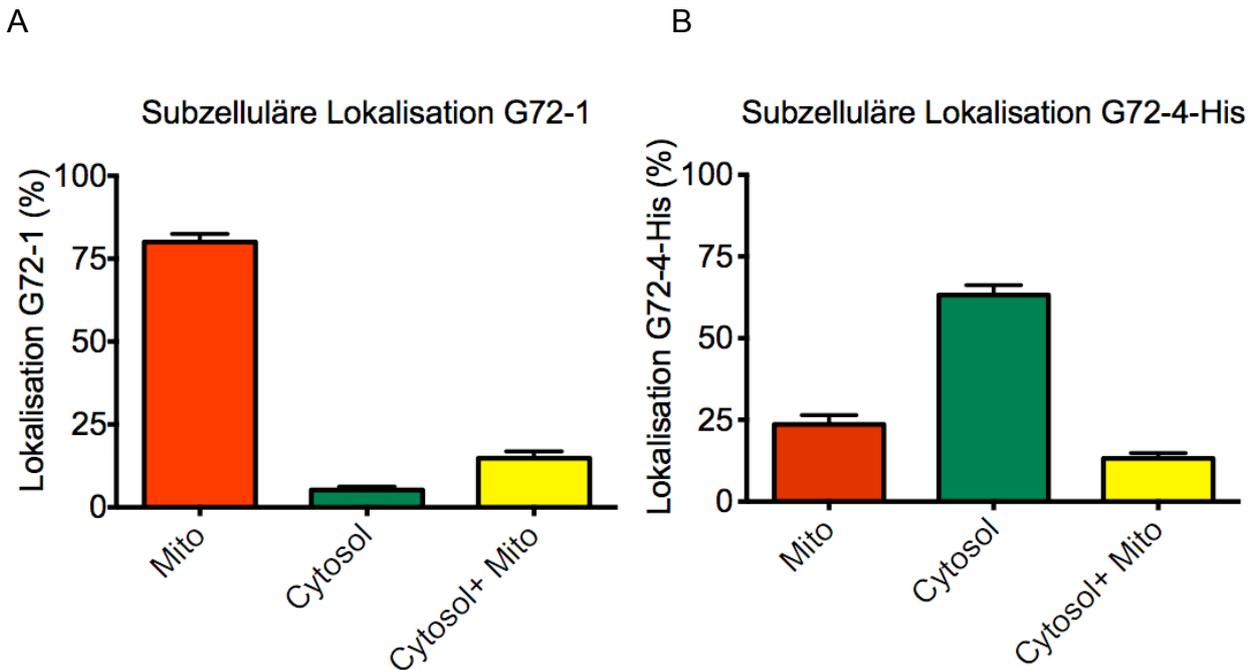


Abb. 29: Zusammenfassung der subzellulären Lokalisation von G72-1 (A) und G72-4-His (B) in transgenen Cos7 Zellen 72 h nach Transfektion. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen mit der Lokalisation des Proteins in den Mitochondrien, im Cytosol und in beiden Kompartimenten. G72-1 war zu über 80 % in den Mitochondrien lokalisiert. G72-4-His hingegen ist in etwa 75 % der Zellen im Cytosol zu finden. Mito=mitochondrial. Es wurden jeweils 50 Zellen aus 5 durchgeführten Immunfärbungen ausgezählt.

### 6.5.2 Nachweis der subzellulären Lokalisation von G72-1 und G72-4 im Western Blot

Neben der Bestimmung der subzellulären Lokalisation von G72-1 und G72-4 durch Immunfluoreszenzfärbung ist die Bestätigung dieser Lokalisation auch im Western Blot gelungen. Hierzu wurde anhand eines mitochondrialen Isolationskits (Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells, Thermo Scientific) die mitochondriale von der cytoplasmatischen Fraktion transfizierter Cos7 Zellen getrennt und die jeweiligen Fraktionen im Western Blot auf die Präsenz von G72-1 und G72-4 untersucht. Abb. 30 zeigt, dass G72-1 sowie G72-1-GFP einzig in der mitochondrialen Zellfraktion zu finden ist (A). Weder G72-1 noch G72-1-GFP wurde in der cytosolischen Fraktion nachgewiesen (B). Als Kontrolle für die erfolgreiche Isolation der mitochondrialen Fraktion wurde Prohibitin, ein mitochondriales Protein (McClung et al., 1995) nachgewiesen. Als Reinheitsnachweis

der gewählten Isolationsmethode diente die Abwesenheit von Beta Aktin in der mitochondrialen Fraktion sowie die Abwesenheit von Prohibitin in der cytosolischen Fraktion. Als Mock Kontrolle dienten mit dem Mock Leervektor (pEGFPN1 ohne GFP Sequenz) transfizierte Cos7 Zellen.

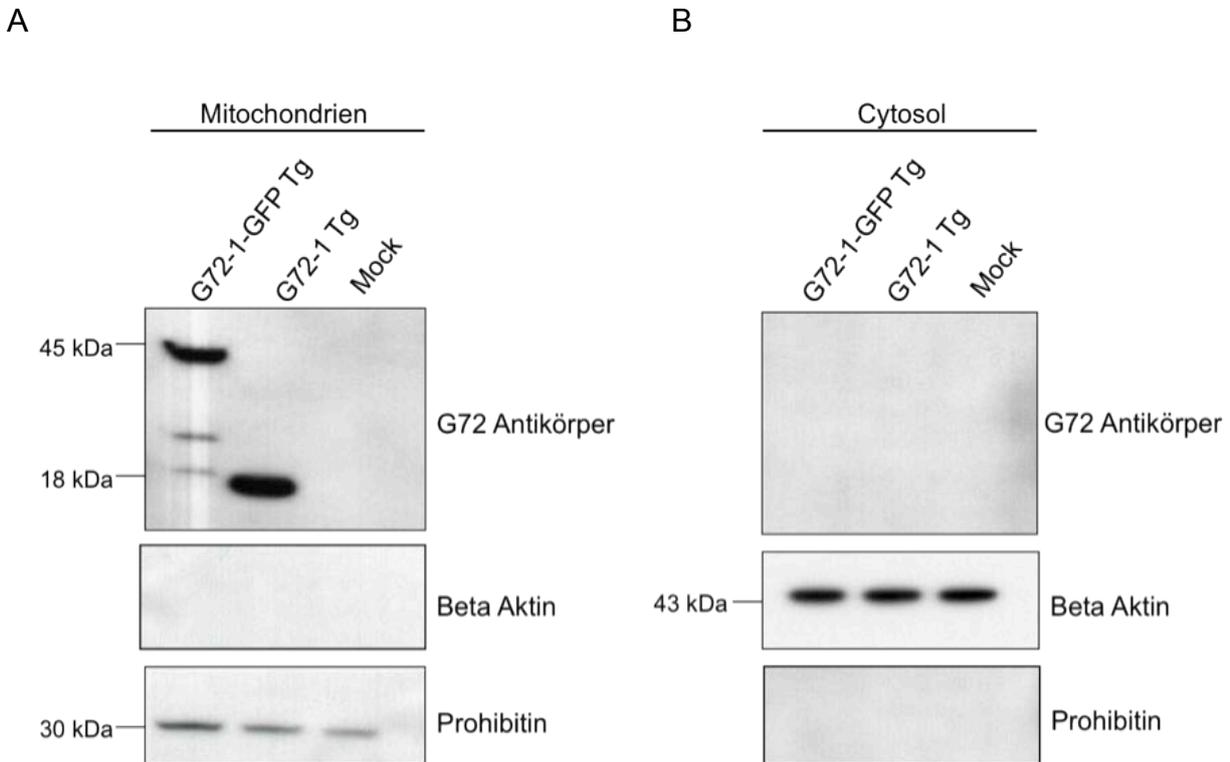


Abb. 30: Nachweis von G72-1 und G72-1-GFP in isolierten Mitochondrien transfizierter Cos7 Zellen mittels Western Blot (A). Weder G72-1 noch G72-1-GFP wurde in der cytosolischen Fraktion nachgewiesen (B). G72-1 wurde durch einen G72 Antikörper gekoppelt an einen HRP-markierten Sekundärantikörper detektiert. Die Höhe der Banden von G72-1 (18 kDa) und des Fusionsproteins G72-1-GFP (45 kDa) stimmten mit den theoretischen Größen der Proteine einher (A). Bei den beiden schwachen Banden bei 20 und 30 kDa beim Nachweis von G72-1-GFP handelt es sich möglicherweise um abgebautes G72-1-GFP. Der Prohibitinnachweis dient als Nachweis für eine gelungene Mitochondrienisolierung. Als Ladekontrolle für die cytosolische Fraktion wurde Beta Aktin verwendet. Als Mock Kontrolle diente der pEGFPN1 Leervektor ohne GFP Sequenz.

Abb. 31 zeigt den Western Blot Nachweis von G72-4-GFP mit Lokalisation sowohl in den isolierten Mitochondrien als auch im Cytoplasma transfizierter Cos7 Zellen.

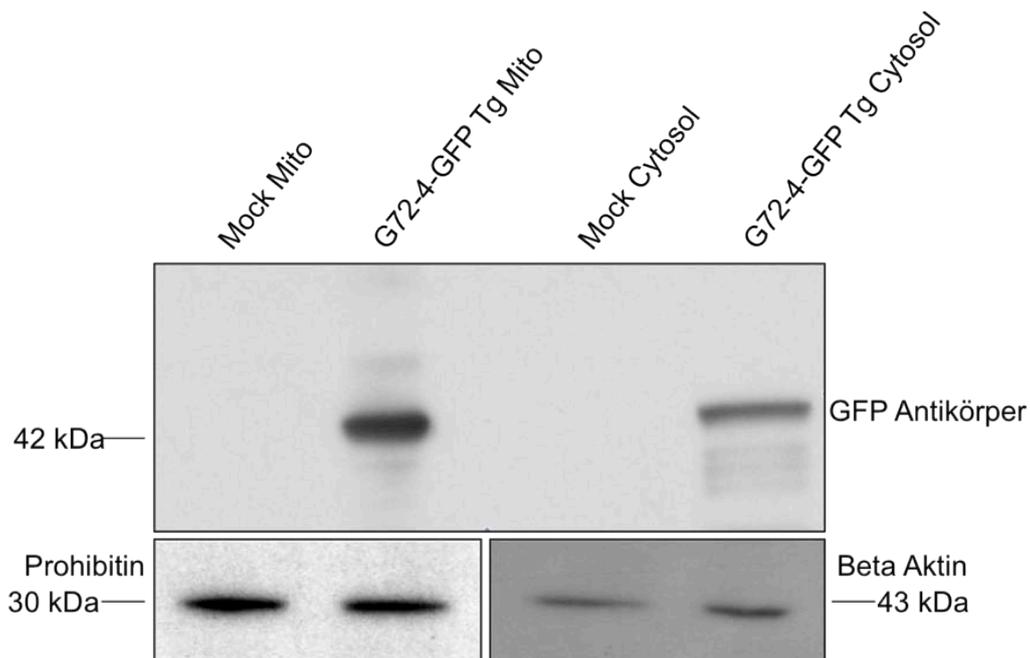


Abb. 31: Nachweis von G72-4-GFP in isolierten Mitochondrien und dem Cytosol transfizierter Cos7 Zellen mittels Western Blot. Detektion durch einen GFP-Antikörper gekoppelt an einen HRP markierten Sekundärantikörper. Die Höhe der Banden von G72-4-GFP (42 kDa) stimmten mit den theoretischen Größen der Proteine einher. Der Prohibitinnachweis dient als Nachweis für eine gelungene Mitochondrienisolation. Als Ladekontrolle wurde Beta Aktin verwendet. Als Mock Kontrolle diente der pEGFPN1 Leervektor ohne GFP Sequenz. Mito: mitochondriale Fraktion, Cytosol: cytosolische Fraktion.

### 6.5.3 Bioinformatische Identifizierung möglicher Zielmotive und Vorhersage der subzellulären Lokalisation von G72-1 und G72-4

Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation von G72-1 und G72-4 wurden ebenfalls bioinformatische Methoden angewendet. Beide Proteine wurden mit Hilfe der Onlineprogramme PSORTII, Hslpred, TargetP und iPSORT untersucht. Diese Programme analysieren die Aminosäuresequenz eines Proteins auf bekannte Lokalisationssignale.

Folgende Tabelle fasst die bioinformatischen Ergebnisse zusammen. G72-1 wurde mehrfach als mitochondriales Protein bestimmt. Für G72-4 konnte eine mögliche cytosolische und mitochondriale Lokalisation bestätigt werden.

Tabelle 13: Zusammenfassung der bioinformatischen Aminosäuresequenzanalyse von G72-1 und G72-4 und die putative subzelluläre Lokalisation, beziehungsweise die Präsenz eines mitochondrialen Lokalisationssignals. Die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Lokalisation wird in Prozent angegeben.

		Lokalisation (Wahrscheinlichkeit)	Mitochondriales Lokalisationssignal
Target P	G72-1		Vorhanden
	G72-4		Vorhanden
iPSORT	G72-1		Vorhanden
	G72-4		Nicht vorhanden
PsortII	G72-1	Nukleär (82 %) Mitochondrial (17 %)	
	G72-4	Mitochondrial (56 %)	
Hslpred	G72-1	Mitochondrial (51 %)	
	G72-4	Cytosolisch (51 %)	

## 6.6 Aktivitätsmessung mitochondrialer Enzyme in G72-1 und G72-4-transgenen Cos7 Zellen

Um die biologische Funktion von G72-1 und G72-4 näher zu untersuchen, wurden funktionelle Analysen zur mitochondrialen Funktion der transgenen Zellen durchgeführt. In einer Kollaboration mit Prof. Dr. Kunz (Uniklinikum Bonn, NeuroCognition, Abteilung Neurochemie) wurde die Aktivität der Citrat Synthase (CS), des Komplex I und der Aconitase untersucht. Wie bereits oben beschrieben, reagiert die Aconitase sehr sensibel mit Aktivitätsminderung auf oxidativen Stress. Der Mitochondriengehalt der untersuchten Zellen geht mit der Aktivität der Citrat Synthase, dem wichtigsten mitochondrialen Leitenzym, einher. Durch die Normierung der gemessenen Enzymaktivitäten auf den Mitochondriengehalt über die Aktivität der Citrat Synthase und die Angabe als CS-normierte Aktivität wurden die Aktivitäten der untersuchten Enzyme (Komplex I und Aconitase) unabhängig vom Mitochondriengehalt dargestellt.

Als Negativkontrollen wurden einzig mit Lipofektamin behandelte Zellen sowie mit dem pEGFPN1 Expressionsvektor transfizierte Zellen (Mock) benutzt. Diese Mock-transfizierten Zellen produzieren GFP.

### 6.6.1 Beeinträchtigung der Enzymaktivitäten durch die Kanamycin/Neomycin Resistenz des Transfektionsvektors

Im Rahmen eines Vorversuches wurden Wildtyp Cos7 Zellen, welche lediglich mit Lipofektamin behandelt wurden, mit Mock-transfizierten Zellen 72 h nach Transfektion verglichen (Abb. 32). Hier zeigte sich, dass die Mock-transfizierten Zellen eine signifikante Aktivitätsminderung der untersuchten Enzyme aufzeigten. Die Transfektionsrate der Mock-transfizierten Zellen lag bei über 90 Prozent.

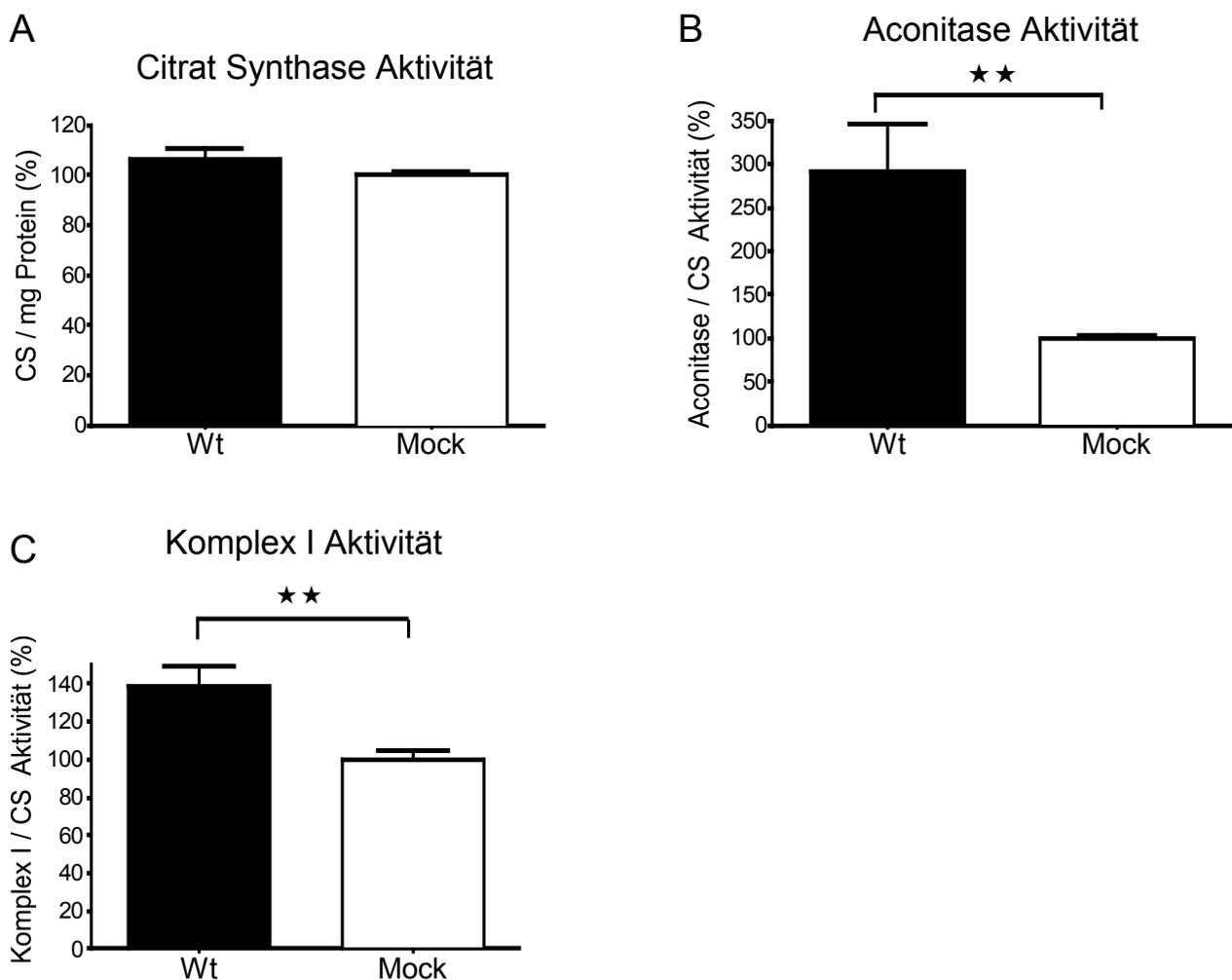


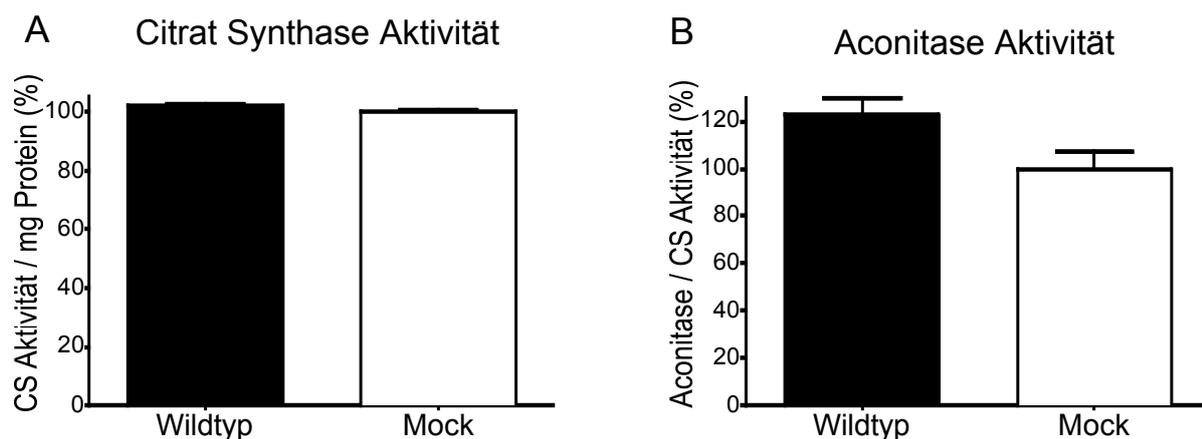
Abb. 32: Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität durch den Transfektionsvektor pEGFPN1. Aktivitätsbestimmung der Citrat Synthase (A), Aconitase (B) und des Komplex I (C) in Wildtyp (Wt) und Mock-transfizierten Cos7 Zellen. Die Enzymaktivitäten der Mock-transfizierten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. Die Transfektion mit dem Mock Vektor minderte die Aktivität der Aconitase (B) und des Komplex I (B) signifikant. n=6 pro Gruppe. \*\*p<0,005, Students t-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent +

SEM. Die Citrat Synthase Aktivität wurde gegen die Proteinmenge normiert, die Aconitase und Komplex I Aktivität wurde gegen die Citrat Synthase Aktivität normiert.

Die beobachteten Aktivitätsminderungen in den Mock-transfizierten Zellen gehen möglicherweise auf die Präsenz der Kanamycin/Neomycin Resistenz im pEGFPN1 Vektor zurück (Kommunikation Prof. Kunz). Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen erneut transfiziert, diesmal jedoch allein mit dem amplifizierten Segment, welches den CMV Promotor, das jeweilige Insert und die Poly A Sequenz enthält. Nach Aufreinigung des PCR Produktes konnten die Zellen lipofektiert und untersucht werden. Wie in Abb. 20 dargestellt, war die Transfektionsrate mit dem PCR Fragment genauso hoch wie mit dem ganzen pEGFPN1 Plasmid.

### 6.6.2 Mock Transfektion von Cos7 Zellen mit der amplifizierten Transfektionssequenz beeinflusst nicht die bestimmten Enzymaktivitäten

Wie in Abb. 33 dargestellt, war in den mit dem Mock-Fragment (mit GFP Sequenz) transfizierten Cos7 Zellen, verglichen mit Wildtyp Zellen, kein signifikanter Unterschied in der Citrat Synthase, der Aconitase und der Komplex I Aktivität zu sehen. Die erfolgreiche Transfektion der Zellen mit dem Mock Fragment wurde durch die GFP Fluoreszenz der Mock-transfizierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop überprüft und lag bei über 90 %.



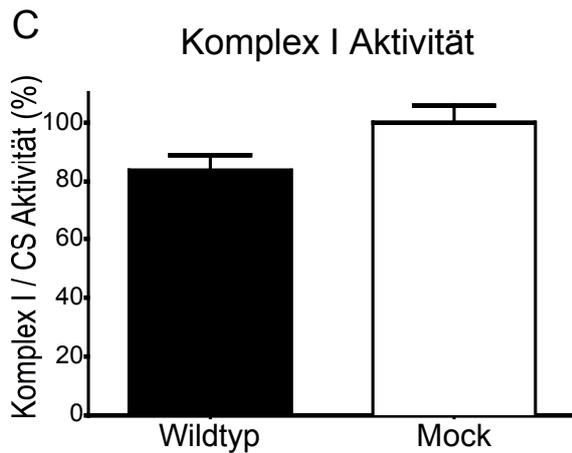


Abb. 33: Aktivitätsbestimmung von Citrat Synthase (CS) (A), Aconitase (B) und Komplex I (B) in Wildtyp und Mock-transfizierten Cos7 Zellen. Die Transfektion mit dem Mock PCR Fragment (GFP Sequenz) minderte weder die Aktivität der Aconitase, der Citrat Synthase noch des Komplex I.  $p > 0,05$ , Students t-Test.  $n = 6$  pro Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent + SEM. Die Citrat Synthase Aktivität wurde gegen die Proteinmenge normiert, die Aconitase und Komplex I Aktivität wurde gegen die Citrat Synthase Aktivität normiert. Die Mock Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

Dies entspricht den Erwartungen, dass die Mock Transfektion allein die Enzymaktivität eines bestimmten Proteins nicht beeinflussen sollte (Kommunikation Prof. Kunz). In allen weiteren Versuchen wurden die Zellen mit den jeweiligen PCR Fragmenten transfiziert und 72 h nach Transfektion untersucht.

### **6.6.3 Aktivität der Citrat Synthase, Aconitase und Komplex I in G72-1 und G72-4-transgenen Cos7 Zellen**

Die Citrat Synthase ist ein wichtiges Leitenzym des Citratzyklus und reguliert dessen Geschwindigkeit. Die Citrat Synthase Aktivität wurde zudem genutzt um die Menge an funktionsfähigen Mitochondrien abzuschätzen und die weiteren Enzymaktivitäten zu normieren. Die Aktivität der Citrat Synthase wurde 72 h Stunden nach erfolgreicher Transfektion der Cos7 Zellen mit G72-1 und G72-4-His photometrisch bestimmt.

Weder die Expression von G72-1 noch von G72-4-His beeinflusste die Aktivität der Citrat Synthase (Abb. 34).

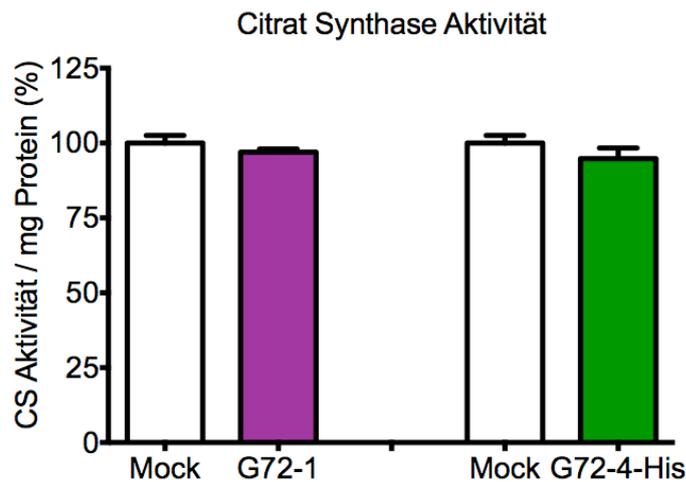


Abb. 34: Aktivität der Citrat Synthase (CS) in G72-1 und G72-4-His transfizierten Cos7 Zellen. Die Aktivität der Citrat Synthase wurde nicht durch die Expression von G72-1 oder G72-4-His in Cos7 Zellen verändert.  $p > 0,05$ , Students t-Test Mock vs G72-1 und Mock vs G72-4. Mock  $n=3$ , G72-1  $n=6$ , G72-4-His  $n=6$ . Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent + SEM. Die Citrat Synthase Aktivität wurde gegen die Proteinmenge normiert. Die Mock Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

Des Weiteren wurde die Aktivität der Aconitase in den G72-1 und G72-4-His exprimierenden Cos7 Zellen 72 h nach Transfektion untersucht. Die Aconitase katalysiert die Umwandlung von Citrat in Isocitrat im Citratzyklus. Die Bestimmung der Aconitase erfolgte ebenfalls photometrisch.

Abb. 35 zeigt, dass die Expression von G72-1 in Cos7 Zellen die Aktivität der Aconitase im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen signifikant erhöhte ( $p < 0,05$ ). In G72-4-His exprimierenden Cos7 Zellen war die Aconitase Aktivität nicht signifikant verändert.

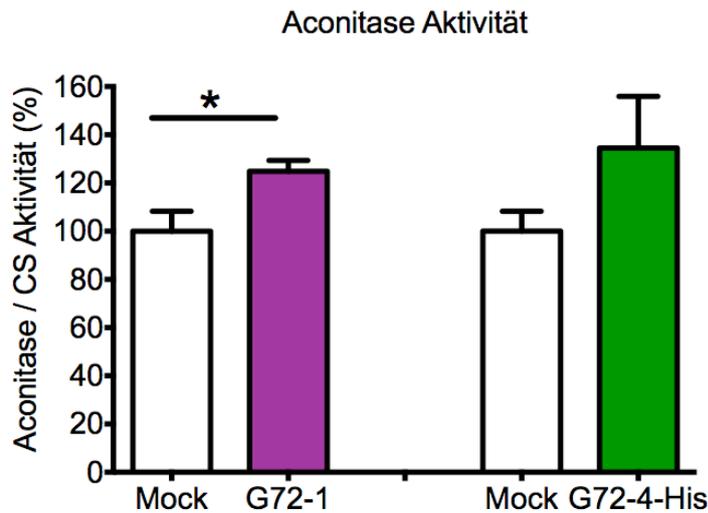


Abb. 35: Aktivität der Aconitase in G72-1 und G72-4-His-transfizierten Cos7 Zellen. G72-1 Expression verstärkte die Aktivität der Aconitase signifikant. \* $p < 0,05$ , Students t-Test. Mock  $n=3$ , G72-1  $n=6$ , G72-4-His  $n=6$ . Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent + SEM. Die Aconitase Aktivität wurde gegen die Citrat Synthase (CS) Aktivität normiert. Die Mock Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

Als weiteres Enzym wurde die Aktivität von Komplex I der Atmungskette bestimmt. Auch hier erfolgte die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität 72 h nach erfolgreicher Transfektion von Cos7 Zellen. G72-4-His Expression, nicht aber G72-1 Expression, verstärkte signifikant die Komplex I Aktivität in Cos7 Zellen (Abb. 36).

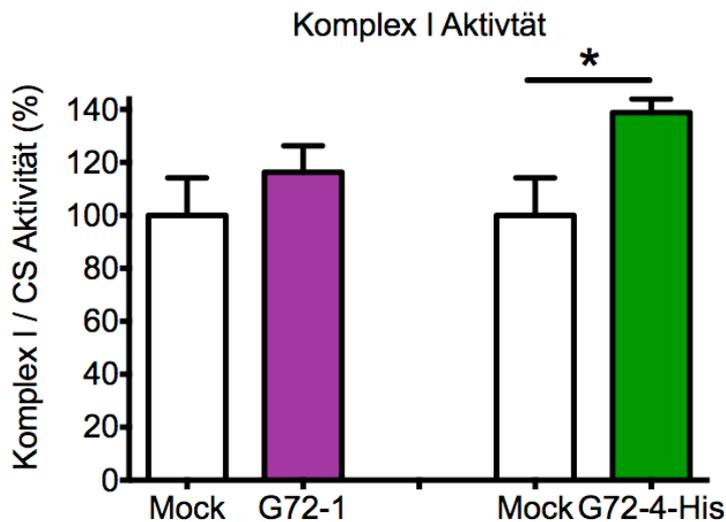


Abb. 36: Aktivität von Komplex I in G72-1 und G72-4-His-transfizierten Cos7 Zellen. In

G72-4-His exprimierenden Zellen war eine signifikant verstärkte Komplex I Aktivität zu finden. \* $p < 0,05$ , Students t-Test. Mock  $n=3$ , G72-1  $n=6$ , G72-4-His  $n=6$ . Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent + SEM. Die Komplex I Aktivität wurde gegen die Citrat Synthase (CS) Aktivität normiert. Die Mock Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

#### 6.6.4 Messung der Wasserstoffperoxidproduktion in G72-transgenen Cos7 Zellen

Es wurden ebenfalls Versuche zur Bestimmung des oxidativen Stresses in den transgenen Zellen durchgeführt. Hierzu wurde die Menge an produziertem Wasserstoffperoxid in lebenden G72-1 und G72-4-His-transgenen Cos7 Zellen gemessen. Die Bestimmung der produzierten Mengen an Wasserstoffperoxid erfolgte photometrisch 72 h nach erfolgreicher Transfektion.

Abb. 37 zeigt, dass in G72-4-His-transfizierten Cos7 Zellen die Produktion von Wasserstoffperoxid im Vergleich zur Mock Kontrolle signifikant verstärkt war ( $p < 0,005$ ). Die Expression von G72-1 hingegen hatte keinen Effekt auf die endogene Wasserstoffperoxidproduktion der Zellen.

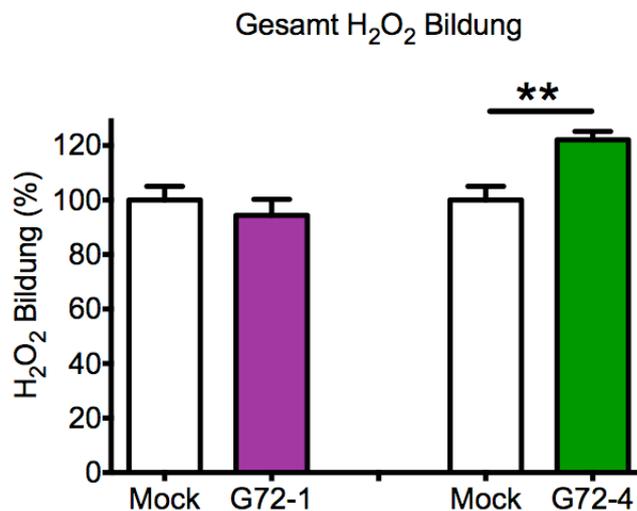


Abb. 37: Messung der endogenen Wasserstoffperoxid-Produktion in G72-1 und G72-4-His-transfizierten Cos7 Zellen. In G72-4-His exprimierenden Zellen war eine signifikant verstärkte  $H_2O_2$  Produktion zu finden. \*\* $p < 0,005$ , Students t-Test. Mock  $n=4$ , G72-1  $n=4$ , G72-4-His  $n=4$ . Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent + SEM. Die Mock Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

### 6.6.5 Messung der Level an reduziertem Glutathion in G72-transgenen Cos7 Zellen

Um die Menge an reduziertem Glutathion zu bestimmen, wurden auch hier transfizierte Cos7 Zellen 72 h nach Transfektion photometrisch untersucht.

Wir konnten nachweisen, dass G72-1 exprimierende Cos7 Zellen signifikant verminderte GSH Mengen aufwiesen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 38). Die Expression von G72-4-His hingegen hatte keinen Effekt auf die GSH Level.

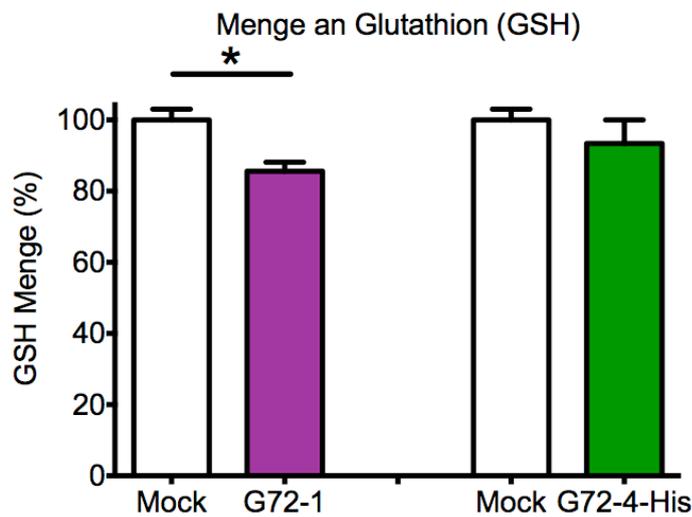


Abb. 38: Messung der Menge an reduziertem Glutathion (GSH) in G72-1 und G72-4-His-transfizierten Cos7 Zellen. In G72-1 exprimierenden Zellen waren signifikant verminderte GSH Mengen zu finden.  $*p < 0,05$ , Students t-Test. Mock  $n=3$ , G72-1  $n=6$ , G72-4-His  $n=6$ . Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent + SEM. Die Mock Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

## 7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass G72/G30 Tiere im Gegensatz zu Wildtyp Tieren Defizite im Erlernen der konditionierten Furchtreaktion zeigten. Die Ergebnisse der Versuche zur mitochondrialen Funktion von G72-1 und G72-4 konnten zeigen, dass beide Proteine die Aktivität mitochondrialer Enzyme verändern und vermutlich eine wichtige Rolle im Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies spielen. Es konnte ebenfalls die mitochondriale Lokalisation von G72-1 bestätigt werden. G72-1 Expression modulierte das Glutathion-System und steigerte die Aktivität der mitochondrialen Aconitase. G72-4 wurde sowohl cytosolisch als auch mitochondrial nachgewiesen. G72-4 modulierte in denen in dieser Arbeit hergestellten transgenen Cos7 Zellen die Aktivität des Komplex I was vermutlich zu vermehrter Wasserstoffperoxidproduktion führt. Weder G72-1 noch G72-4 modulierten die Aktivität der Citrat Synthase, das Maß für die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien und wichtiger Regulationspunkt des Citratzyklus.

### 7.1 Furchtkonditionierung G72-transgener Tiere

Zur Untersuchung kognitiver Fähigkeiten G72/G30-transgener Tiere wurde die Fähigkeit des tonabhängigen Furchterlernens untersucht. Im Gegensatz zur kontextuellen Konditionierung, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, ist die tonabhängige Furchtkonditionierung nicht vom Hippocampus abhängig, sondern wird von der Amygdala reguliert (Kim und Fanselow, 1992, Phillips und LeDoux, 1992, Fanselow und LeDoux, 1999). G72/G30 Tiere konnten im Gegensatz zu Wildtyp Tieren nicht auf den aversiven Reiz konditioniert werden. Die transgenen Tiere zeigten deutlich weniger Erstarren nach der Konditionierung im Vergleich zu den Wildtyp Tieren.

Man unterscheidet verschiedene Phasen der Furchtreaktion (Fanselow, 1980, Blanchard et al., 1997, Laxmi et al., 2003). In einer ersten Phase kann man die Unterbrechung der Aktivität, Orientierung zur Reizquelle hin und sensorische Exploration der Umgebung beobachten. Dies ist vor allem bei potentiellen Gefahren einer neuen Umgebung der Fall. Bei imminent, sehr nahen Bedrohungsreizen wird entweder die Flucht oder eine Verhaltensstarre ausgelöst. Dabei spielt die Existenz von Fluchtwegen sowie

die Spezies des Räubers eine Rolle. Eine Verhaltensstarre tritt vor allem auf, wenn es keine Fluchtwege gibt oder die Bedrohung sehr nah und imminently ist. Dies trifft für den hier verwendeten Versuchsaufbau der Furchtkonditionierung zu. Der Versuchsaufbau ist so gestaltet, dass es keine Fluchtmöglichkeit gibt und die Maus gelernt haben soll, einen Tonstimulus mit einem imminently aversiven Fußschock zu verbinden. Die beobachtete Verhaltensstarre ist dabei gelegentlich von Fluchtversuchen (z.B. durch Sprünge) unterbrochen.

Um zu untersuchen, ob die G72-transgenen Tiere vielleicht nur auf eine andere Art und Weise als Wildtyp Tiere auf den konditionierten Stimulus reagieren, so zum Beispiel weniger durch Erstarren als möglicherweise in Form von Fluchtversuchen durch Sprünge, wurde auch die Anzahl der Sprünge nach Konditionierung gemessen. Wildtyp Tiere zeigten signifikant weniger Sprünge nach Konditionierung, dies geht einher mit der Tatsache, dass sich diese Tiere vermehrt in der Furchtstarre befanden. G72-transgene Tiere zeigten weder ein verstärktes Erstarren, noch eine gesteigerte Sprungbereitschaft nach Konditionierung.

Die beobachtete fehlende Konditionierung der transgenen Tiere ist im Einklang mit Publikationen, in denen G72 beim Menschen mit Defiziten kognitiver Fähigkeiten wie dem verbalen und motorischem Arbeitsgedächtnis und der Aufmerksamkeit assoziiert wurde (Abou Jamra et al., 2006, Goldberg et al., 2006, Jansen et al., 2009). Mehrere Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) des G72/G30 Gens zeigten eine Assoziation mit einer herabgesetzten Aufmerksamkeit, mit Defiziten des Arbeitsgedächtnisses sowie des episodischen Erinnerungsvermögens (Abou Jamra et al., 2006, Goldberg et al., 2006, Jansen et al., 2009). Weitere Studien konnten Mutationen im G72 Gen mit einem reduzierten Volumen des linken Temporallappens sowie der Amygdala in Patienten mit bipolarer Störung assoziieren (Zuliani et al., 2009). Kognitive Defizite G72-transgener Tiere wurden bereits in vorangegangenen Versuchen zum sensimotorischen Gating der Präpulsinhibition nachgewiesen (Otte et al., 2009). Die Präpulsinhibition (PPI) eines akustischen Schreckreflexes gilt als operationales Maß für einen unbewussten attentionalen Filterprozess (Swerdlow und Geyer, 1998, Koch et al., 2000, Swerdlow et al., 2006, Walters und Owen, 2007) und wird durch ein cortico-striato-pallido-pontines Netzwerk reguliert (Swerdlow und Geyer, 1998). Die PPI gilt als Maß für das sensorimotorische

Gating d.h. früher attentionaler Filterfunktionen. An Schizophrenie erkrankte Patienten zeigen eine sogenannte Filterstörung, diese ist objektivierbar durch Versuche zur PPI (Swerdlow und Geyer, 1998). Neurophysiologische und neuropsychologische Verfahren zeigten bei Schizophrenie-Patienten Störungen der Informationsverarbeitung von der Reizaufnahme bis hin zu komplexen kognitiven Leistungen. Zusammen mit der Kenntnis des subjektiven Erlebens präpsychotischer Zustände betroffener Personen, die eine Reizüberflutung und eine Überstimulation erleben, wurde das Konzept der Schizophrenie als eine „Filterstörung“ beziehungsweise Störung der Informationsverarbeitung festgelegt (Tamminga und Holcomb, 2005).

Weitere Hinweise auf defizitäre kognitive Fähigkeiten in den G72/G30 Tieren lieferten die Versuche im Morris water maze (Otte et al., 2011). Hier zeigen die G72/G30 Tiere ein starkes Defizit im räumlichen Lernvermögen. G72/G30 Tiere benötigten im Vergleich zu Wildtyp Tieren signifikant länger, um die sich im Wasser befindende Plattform wiederzufinden. Wichtig hierbei ist, dass die Schwimmgeschwindigkeit der beiden Mausstämmen sich nicht unterschied (Otte et al., 2011).

Das in dieser Arbeit nachgewiesene Defizit in der tonabhängigen Furchtkonditionierung ist nicht durch eine geringere Sensibilität der G72/G30 Tiere auf den Fußschock zu erklären. G72/G30 Tiere reagieren sogar stärker auf den gebotenen aversiven Reiz. Die Anzahl der Sprünge während des Reizes, als Maß für die Reaktion der Tiere, sind bei G72/G30 Tieren höher als bei Wildtyp Tieren. Hyperaktivität konnte nicht bei G72-transgenen Tieren festgestellt werden (Otte et al., 2011). Da der benutzte Versuchsausrüstung auf Messungen der Erschütterungen beruht, wurde im Vorhinein nachgewiesen, dass sich die untersuchten Tiergruppen nicht im Gewicht unterscheiden.

Interessant wäre es an dieser Stelle, die umgebungsabhängige Furchtkonditionierung G72-transgener Mäuse zu untersuchen.

## **7.2 Expression von G72-1 und G72-4 in verschiedenen Zelllinien**

In dieser Arbeit wurden Transfektionsvektoren für natives, His-getagtes und GFP-gebundenes G72-1 und G72-4 hergestellt. Alle hergestellten Transfektionsvektoren

wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Neben der Kontrolle der Proteinexpression durch Immunfluoreszenz wurden die exprimierten G72 Proteine ebenfalls im Western Blot nachgewiesen und auf ihre richtige Größe überprüft.

### **7.3 Die subzelluläre Lokalisation von G72-1**

Die subzelluläre Lokalisation von G72-1 in den transfizierten Zellen wurde sowohl durch Immunfluoreszenz als auch mittels Western Blot ermittelt. In den Immunfluoreszenzfärbungen wurde in allen untersuchten Zelllinien (Hek293, Cos7, N2a und 1321N-1 Astrozyten) eine mitochondriale Lokalisation gefunden. Bei der quantitativen Auswertung war G72-1 in über 80 % der Cos7 und Hek293 Zellen rein mitochondrial lokalisiert. In etwa 20 % der Cos7 Zellen und 12 % der Hek293 Zellen wurde G72-1 sowohl in Mitochondrien als auch im Cytosol gefunden. Bei diesen Zellen handelt es sich möglicherweise um Zellen, bei denen das im Cytosol translatierte G72-1 noch nicht vollständig in die Mitochondrien transportiert wurde. Eine weitere Interpretation der Ergebnisse wäre, dass es sich bei G72-1 um ein Protein handelt, welches in beiden Kompartimenten eine Rolle spielt. Bei den untersuchten N2a Zellen und den Astrozyten befand sich G72-1 vorwiegend sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien. Hier ist eine doppelte Funktion von G72-1 zu vermuten. In unter 10 % der untersuchten Zellen wurde G72-1 rein cytosolisch vorgefunden.

Nach Isolation der Mitochondrien aus transfizierten Cos7 Zellen und Untersuchung der erhaltenen Zellfraktionen im Western Blot konnte die mitochondriale Lokalisation von G72-1 bestätigt werden. Die Lokalisation von G72-1 stimmte mit der von Prohibitin, einem mitochondrialen Protein überein. In der cytosolischen Fraktion war kein G72-1 Protein nachweisbar. Obwohl in den Immunfluoreszenzfärbungen in wenigen Zellen G72-1 cytosolisch aufzufinden war, war diese Menge möglicherweise zu gering, als dass man sie im Western Blot nachweisen konnte. Sowohl die Immunfluoreszenzfärbungen als auch die Western Blot Analysen stehen in Einklang mit den von Kvajo et al. publizierten Daten. Diese Arbeitsgruppe konnte eine mitochondriale Lokalisation von G72-1 in transfizierten Cos7 Zellen, humanen Gliomazellen, primären Rattenneuronen und humanen

Astrozyten nachweisen (Kvajo et al., 2007). Des Weiteren wurde G72-1 in etwa 0,1 Prozent nativer HeLa Zellen nachgewiesen und wies dort ebenfalls eine mitochondriale Lokalisation auf (Kvajo et al., 2007). Auch Sacchi et al. konnten 2011 die mitochondriale Lokalisation von G72-1 in transgenen Gliazellen bestätigen (Sacchi et al., 2011). In Anbetracht dieser Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass G72-1 ein, vom Zelltyp unabhängig, vorwiegend mitochondriales Protein ist.

Andere Arbeitsgruppen fanden abweichende Lokalisationen von G72-1. Chumakov et al. lokalisierten G72-1 in transfizierten Cos7 Zellen im Golgi Apparat (Chumakov et al., 2002). Dies wurde allein durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Sacchi et al. untersuchten 2008 primäre humane Astrozyten und wiesen G72-1 hauptsächlich cytosolisch nach (Sacchi et al., 2008). In den in dieser Arbeit untersuchten Astrozyten wurde G72-1 in über 70 % der Zellen sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien nachgewiesen. In 20 % der Astrozyten war G72-1 rein cytosolisch lokalisiert. Bei den untersuchten Zellen in der Arbeit von Sacchi et al. 2008 handelt es sich jedoch um eine primäre Kultur humaner Astrozyten, in dieser Arbeit wurde hingegen eine humane Astrozytom Zelllinie benutzt, in welcher G72-1 überexprimiert wurde. Möglicherweise ist dies der Grund, warum in dieser Arbeit neben der Lokalisation im Cytosol ebenfalls eine mitochondriale Lokalisation von G72-1 nachgewiesen wurde. In einer späteren Publikation wiesen Sacchi et al. G72-1 in einer transgenen Gliazelllinie auch mitochondrial nach (Sacchi et al., 2011).

Beide Arbeitsgruppen postulieren eine Rolle von G72-1 in der Modulation der D-Aminosäureoxidase (DAAO) (Chumakov et al., 2002, Sacchi et al., 2008). Eine Funktion von G72-1 als Modulator der DAAO bleibt jedoch umstritten. Die DAAO ist ein peroxisomales Protein (Kitano und Morimoto, 1975, Perotti et al., 1987, Moreno et al., 1999) und kommt lediglich in geringen Mengen cytoplasmatisch vor (Sacchi et al., 2008). G72-1 kam in unseren Versuchen, wie auch in denen von Kvajo et al. vorwiegend mitochondrial vor. Eine Rolle von G72-1 im Stoffwechsel von D-Serin bleibt somit umstritten. Sacchi et al. postulierten, dass G72-1 möglicherweise mit der DAAO interagiert bevor die DAAO peroxisomal lokalisiert ist, also in einem frühen Zeitpunkt nach der Translation (Sacchi et al., 2011). In dieser Publikation wurde eine Lokalisation von G72-1 an der äußeren mitochondrialen Membran vermutet (Sacchi et al., 2011). In der Tat wurde

G72-1 in dieser Arbeit in allen untersuchten Zelllinien ebenfalls cytoplasmatisch nachgewiesen, eine potentielle Interaktion von G72-1 und der DAAO im Cytoplasma ist somit nicht ausgeschlossen. Zu dieser Fragestellung wurden in der hier vorliegenden Arbeit jedoch keine Versuche durchgeführt.

In weiteren Versuchen wurde in dieser Arbeit die Kolo-kalisation von G72-1 mit Lysosomen und Peroxisomen in Cos7 Zellen überprüft. In etwa 10 % der transgenen Cos7 Zellen konnte eine punktuelle lysosomale Lokalisation von G72-1 in den immunchemischen Versuchen nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Zellen, bei denen lysosomaler Abbau von G72-1 stattfindet.

In 8 % der transgenen Cos7 Zellen konnte ebenfalls eine Lokalisation von G72-1 in einzelnen Peroxisomen nachgewiesen werden. Wie oben beschrieben, wurde von anderen Arbeitsgruppen eine Funktion von G72-1 in der Modulation der DAAO postuliert. Die DAAO ist ein peroxisomales Protein und eine Interaktion von G72-1 und der DAAO in Cos7 Zellen ist somit nicht vollkommen ausgeschlossen, bleibt jedoch umstritten, da G72-1 sowohl in unseren Versuchen wie auch in denen von Kvajo et al. vorwiegend mitochondrial vorkommt. Sacchi et al. sowie Chumakov et al. haben bis dato keine lysosomale oder peroxisomale Lokalisation von G72-1 beschrieben (Chumakov et al., 2002, Sacchi et al., 2008, Sacchi et al., 2011).

#### **7.4 Die zelluläre Lokalisation von G72-4**

G72-4 weist in denen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien eine heterogene subzelluläre Lokalisation auf. G72-4 ist in Hek293 sowie nicht ausdifferenzierten und ausdifferenzierten N2a Zellen rein cytoplasmatisch lokalisiert. Immunfluoreszenzfärbungen transgener Cos7 Zellen zeigten hingegen, dass G72-4 in den untersuchten Cos7 Zellen vorwiegend sowohl cytoplasmatisch als auch mitochondrial vorkommt. In etwa 25 % der Cos7 Zellen ist G72-4 rein mitochondrial lokalisiert. Dies konnte nach Isolation der Mitochondrien aus G72-4-transfizierten Cos7 Zellen und Untersuchung der erhaltenen Zellfraktionen im Western Blot bestätigt werden. Zu vermuten ist somit, dass G72-4, im Gegensatz zu G72-1, in verschiedenen Zelllinien eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation hat und somit auch unterschiedliche Funktionen hat. Während neben einer Funk-

tion im Cytoplasma, eine mitochondriale Funktion von G72-4 in Cos7 Zellen wahrscheinlich ist, wurde G72-4 in den anderen Zelllinien nicht mitochondrial nachgewiesen und hat hier allein eine cytoplasmatische Aufgabe. Ein anderes mit Schizophrenie assoziiertes Protein, welches seine Funktion in unterschiedlichen Zellkompartimenten ausübt und lokalisiert ist, ist zum Beispiel DISC1 (disrupted in schizophrenia1) (Chubb et al., 2008). Auch hier wurden unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen in verschiedenen Zelllinien gefunden (Chubb et al., 2008).

Quantitativ ist G72-4 in Hek293 und N2a Zellen zu 100 % cytoplasmatisch lokalisiert. In Cos7 Zellen ist G72-4 in etwa 65 % der Zellen allein im Cytosol zu finden. In etwa 25 % der Cos7 Zellen ist G72-4 rein mitochondrial lokalisiert. In etwa 10 % der Cos7 Zellen konnte eine Lokalisation von G72-4 sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zur Lokalisation von G72-4 stehen im Einklang mit Versuchen von Kvajo et al.. In Experimenten mit trunkierten Versionen von G72-1 konnte nachgewiesen werden, dass eine um 25 beziehungsweise 35 N-terminale Aminosäuren verkürzte Version von G72-1 sich sowohl im Cytoplasma als auch in den Mitochondrien befand (Kvajo et al., 2007). Wurden die 50 N-terminalen Aminosäuren entfernt, beschrieben die Autoren den Abbau des Proteins welches immunologisch nicht mehr nachweisbar war (Kvajo et al., 2007). G72-4 ist in der Tat eine um 71 Aminosäuren N-terminal verkürzte Version von G72-1. In den Versuchen dieser Arbeit konnte die Expression von G72-4 in Immunfluoreszenzfärbungen und im Western Blot nachgewiesen werden. Kvajo et al. postulierten ein mitochondriales Lokalisationssignal in den 20 bis 50 N-terminalen Aminosäuren. In unseren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass auch bei G72-4, einem um mehr als 50 Aminosäuren verkürzten Version von G72-1, eine mitochondriale Lokalisation in einem Teil der transfizierten Cos7 Zellen zu finden war. Das mitochondriale Transportsignal muss sich somit entweder über einen längeren Bereich als die ersten 50 Aminosäuren erstrecken, oder aber eher mittig im Protein lokalisiert sein. Auch eine unterschiedliche Tertiärstruktur von G72-4 im Vergleich zur Tertiärstruktur des von Kvajo et al. untersuchten trunkierten Proteins kann die beobachtete partielle mitochondriale Lokalisation von nativem G72-4 ermöglichen.

Im Gegensatz zu Targetingsignalen für andere zelluläre Kompartimente gibt es bei mitochondrialen Proteinen kein einheitliches Aminosäuremotiv, welches als Erkennungssi-

gnal dient. Mitochondriale Proteine, die in den Membranen oder im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert sind, können ihr Zielsignal sowohl N-terminal, C-terminal aber auch teilweise innerhalb des Proteins tragen und besitzen zumeist zusätzlich einen hydrophoben Abschnitt (Hammen et al., 1994, Neupert, 1997, Schmidt et al.). In den untersuchten Cos7 Zellen wurde G72-4 sowohl cytoplasmatisch als auch mitochondrial beobachtet. Möglicherweise besitzt ein Teil der in den Cos7 Zellen gebildeten G72-4 Proteine eine veränderte Tertiärstruktur, welche das mitochondriale Lokalisationssignal verdeckt, so, dass ein großer Teil der Moleküle im Cytoplasma verbleibt. In den anderen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien wurde G72-4 rein cytoplasmatisch beobachtet. Auch hier könnte die Tertiärstruktur durch posttranslationelle Modifikationen von G72-4 verändert sein, so dass das mitochondriale Lokalisationssignal nicht mehr funktionsfähig ist.

In weiteren Kollokalisationsversuchen konnte in 12 % der G72-4 exprimierenden Cos7 Zellen eine Überlagerung von G72-4 mit Lysosomen festgestellt werden. Auch hier liegt die Vermutung eines lysosomalen Abbaus von G72-4 nahe. In 8 % G72-4 exprimierender Cos7 Zellen wurde ebenfalls eine partielle peroxisomale Lokalisation von G72-4 nachgewiesen. Eine peroxisomale Funktion von G72-4 ist somit zu diesem Zeitpunkt nicht vollkommen auszuschließen, jedoch in Anbetracht der nur sehr geringfügigen Kollokalisation eher unwahrscheinlich.

Da es bis dato weder zur Funktion noch zur Lokalisation von G72-4 publizierte Daten gibt, beinhalten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse erste wichtige Informationen zu einer im G72-Mausmodell von Otte et al., 2009 hoch exprimierten Splicevariante von G72.

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen subzellulären Lokalisationen von G72-1 und G72-4 konnten durch bioinformatische Software bestätigt werden. Hierfür wurden die Programme iPSORT, TargetP, Hslpred und PSORTII verwendet. Diese untersuchen die Primärstruktur von Proteinen hinsichtlich bekannter mitochondrialer Targetingsignale, der Aminosäureabfolge, deren Ladungsverhältnisse und potentieller Spaltungsmotive. G72-1 und G72-4 können laut den Ergebnissen der benutzten Software mitochondrial lokalisiert sein. G72-4 kann wie in unseren Versuchen beobachtet ebenfalls cytosolisch

vorliegen. iPSORT gibt ein putatives mitochondriales Lokalisationssignal in den ersten 30 N-terminalen Aminosäuren von G72-1 an. Kvajo et al. postulierten in ihrer Arbeit ein mitochondriales Lokalisation in den ersten 20-50 N-terminalen Aminosäuren von G72-1. TargetP, PsortII und Hslpred geben keine Angaben zur Lokalisation etwaiger Signalpeptide im Protein an. Wie anhand der Ergebnisse der bioinformatischen Analyse zur subzellulären Lokalisation zu sehen, unterschieden sich die Vorhersagen der Proteinlokalisierung je nach Software. Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass eine mitochondriale Lokalisation von G72-1 bioinformatisch wahrscheinlich ist und G72-4 sowohl mitochondrial als auch cytosolisch lokalisiert sein kann.

## **7.5 Aktivitätsmessung mitochondrialer Enzyme und oxidativer Stress in G72-1-transgenen Cos7 Zellen**

G72-1 wurde in dieser Arbeit als mitochondriales Protein identifiziert. Auch G72-4 war in den untersuchten Cos7 Zellen zum Teil mitochondrial lokalisiert. Um erste Hinweise auf eine mögliche mitochondriale Funktion der beiden Proteine zu finden, untersuchten wir mitochondriale Veränderungen, welche durch die Expression von G72-1 und G72-4 in Cos7 Zellen hervorgerufen werden. Es wurde die Aktivität verschiedener mitochondrialer Proteine bestimmt und Messungen zum oxidativen Stress in den transfizierten Zellen durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Aktivität der Citrat Synthase bestimmt. Der Citratzyklus dient hauptsächlich dem oxidativen Abbau organischer Stoffe zum Zweck der Energiegewinnung und der Bereitstellung von Zwischenprodukten für Biosynthesen und wird in der Zelle streng reguliert. Regulationspunkte stellen vor allem exogene Teilschritte dar, wie die Citrat-Synthese durch die Citrat Synthase, die Ketoglutarat-Bildung und die Bildung des Succinyl-CoA (Williamson und Cooper, 1980, Fernie et al., 2004). Die Citrat Synthase katalysiert die Bildung von Citrat ausgehend von Oxalacetat und Acetyl-CoA im Citratzyklus und ist ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Citrat Synthase Aktivität in G72-1 exprimierenden Zellen, im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen, festgestellt werden. Die Expression von G72-

1 beeinträchtigt somit nicht die Geschwindigkeit des Citratzyklus. Die Aktivität der Citrat Synthase war ebenfalls in den G72-transgenen Tieren nicht verändert (Otte et al, 2011).

Als wichtiger Bestandteil der Atmungskette wurde auch die Aktivität des Komplex I bestimmt. Es wurden keine Veränderungen der Komplex I Aktivität in den G72-1-transfizierten Zellen gemessen. Es ist bekannt, dass G72-1 an Kohlehydrate wie FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) und FMN (Flavin-Mononucleotid) bindet (Chumakov et al., 2002, Pollegioni et al., 2007). In G72/G30-transgenen Tieren wurde eine geminderte Aktivität von Komplex I nachgewiesen (Otte et al., 2011, Drews et al., 2012). In an Schizophrenie-Patienten konnten ebenfalls sowohl im Blut als auch im ZNS verminderte Komplex I Aktivitäten bestimmt werden (Karry et al., 2004, Gubert et al., 2013).

Es wurde ebenfalls die Aktivität der Aconitase in den hergestellten transgenen Zellen gemessen. Im Citratzyklus wandelt die Aconitase Citrat in Isocitrat und Aconitat um. Bei oxidativem Stress reagiert dieses Enzym sehr sensitiv mit einer Aktivitätsminderung (Bulteau et al., 2003, Fariss et al., 2005) und kann aus diesem Grund als Sensor für die Belastung der Zellen durch Sauerstoffradikale genutzt werden. Die Eisen-Schwefel Cluster der Aconitase werden durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert, dies führt zur Freisetzung von Eisen und zur Dysfunktion des Enzyms. Durch die Aktivitätsminderung der Aconitase wird sodann der Krebs Zyklus verlangsamt, die Energieproduktion der Zellen gemindert und die betroffenen Zellen noch weiter geschädigt (Fariss et al., 2005). G72-1-transfizierte Zellen zeigten eine signifikant verstärkte Aktivität der Aconitase im Vergleich zur Mock Kontrolle. Es ist bekannt, dass die Aconitase durch Dephosphorylierung sowie durch die Präsenz ihres Substrates, Citrat, aktiviert wird (Bulteau et al., 2003, Zhang et al., 2007a).

Die Messungen der Wasserstoffproduktion der Zellen zeigten hingegen keine Veränderungen in G72-1-transfizierten Zellen. Es wurden hingegen signifikant verminderte Level an reduziertem Glutathion (GSH) in den G72-1-transgenen Zellen gemessen. GSH ist in Zellen vermindert, in denen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies oder oxidierte Moleküle reduziert werden (Forman et al., 2009). Dies ist zum Einen in Zellen mit gesteigertem oxidativen Stress der Fall, zum Anderen kann auch ein gesteigerter GSH-GSSG Turnover eine Reduktion von GSH zur Folge haben (Wu et al., 2004, Conrad et al., 2007,

Forman et al., 2009). Käme es durch übermäßige G72-1 Expression zu verstärktem oxidativen Stress in den Zellen, würden die entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies vom Glutathion System entfernt werden und die Menge an GSH würde sich verringern. Dies wäre vergleichbar mit den Ergebnissen im G72 Mausmodell (Otte et al., 2011, Drews et al.). In den transgenen G72 Tieren wurden bei erhöhtem oxidativen Stress verminderte GSH Level nachgewiesen. Verminderte GSH Level wurden ebenfalls wiederholt in Schizophrenie-Patienten im Blut sowie auch im ZNS bestimmt (Raffa et al., 2009, Raffa et al., 2011, Pandya et al., 2013, Wu et al., 2013). Da in den G72-1-transgenen Cos7 Zellen keine erhöhten Werte an Wasserstoffperoxid gemessen wurden, wäre es an dieser Stelle interessant, die Konzentrationen weiterer ROS zu bestimmen. Die Aktivität der Aconitase wäre laut dieser Hypothese gegenregulatorisch hochreguliert (Kommunikation Prof. Kunz). Gegenregulatorische Steigerung der Aconitase Aktivität wurde bereits in anderen Publikationen in Zusammenhang mit oxidativem Stress nachgewiesen (Francisconi et al., 2006). Die Aktivität der Aconitase war in den G72 Mausmodell nicht gegenregulatorisch hochreguliert, sondern gemindert (Otte et al., 2011, Drews et al., 2012).

Die in G72-1 exprimierenden Cos7 Zellen beobachteten Veränderungen können hingegen auch durch die Hypothese der Aktivierung des GSH-Metabolismus durch G72-1 erläutert werden. Möglicherweise aktiviert G72-1 das GSH-System und dient in der physiologischen Situation dazu, den Katabolismus reaktiver Sauerstoffspezies zu regulieren. Durch einen schnelleren Turnover von GSH zu GSSG würde der Gehalt an GSH in den betroffenen Zellen sinken und es würden vermehrt ROS entfernt (Bulteau et al., 2003, Zhang et al., 2007a). Dies würde die gesteigerte Aconitase Aktivität ebenfalls erklären.

Weitere interessante Versuche wären an dieser Stelle noch die Menge an oxidierten Glutathiondimeren (GSSG) sowie das Verhältnis von GSH zu GSSG zu bestimmen. Ein putativer Ansatzpunkt von G72-1 wäre möglicherweise die direkte oder indirekte Aktivierung von Glutathionperoxidasen. Die Proteinfamilie der Glutathionperoxidasen katalysiert die Oxidation zweier GSH Moleküle zu einem GSSG Dimer mit gleichzeitiger Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (Forman et al., 2009). Die Familie der Glutathionperoxidasen besteht aus sechs Glutathionperoxidasen (GLPx1-6) mit Lokalisation in multi-

plen Organen sowie unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation (Reeves und Hoffmann, 2009). GLPx1 und GLPx4 sind ubiquitär exprimiert und sowohl cytosolisch als auch mitochondrial lokalisiert (Schweizer et al., 2004, Conrad et al., 2007, Reeves und Hoffmann, 2009). Die Glutathionperoxidase wird physiologisch durch anfallende ROS aber auch durch Phosphorylierung, durch cytosolische c-Abl- und Arg-Tyrosinkinasen sowie durch erhöhte Level an Adenosin und Selen aktiviert (Miyamoto et al., 2003b, Lei et al., 2007). Weitere Untersuchungen zum Glutathion Regelkreis sowie die Bestimmung von Bindungspartnern von G72-1 wären hier nötig, um genauere Aussagen treffen zu können. Anzumerken ist, dass die gemessene Menge an Wasserstoffperoxid in den G72-1-transgenen Zellen konstant blieb. Bei einer putativen schützenden Rolle von G72-1 vor oxidativem Stress hätte man verminderte Wasserstoffperoxid Level vermutet. Weiterführende Versuche wären hier die Menge anderer ROS wie Hydroxylradikale und Sauerstoffradikale zu messen.

## **7.6 Aktivitätsmessung mitochondrialer Enzyme und oxidativer Stress in G72-4-transgenen Cos7 Zellen**

Es konnten, wie in den G72-1-transgenen Zellen, ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Citrat Synthase Aktivität in G72-4 exprimierenden Zellen im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen festgestellt werden. Dies geht einher mit den Ergebnissen des G72 Mausmodells (Otte et al, 2011). Die Geschwindigkeit des Citratzyklus ist somit nicht durch G72-4 Expression in Cos7 Zellen beeinträchtigt.

G72-4 Expression hat des Weiteren keine signifikanten Veränderungen der Aconitase Aktivität in den transgenen Cos7 Zellen hervorgerufen. Obwohl G72-4 nur in etwa einem Viertel der untersuchten Zellen mitochondrial lokalisiert war, konnten dennoch, wie im Folgenden erläutert, eindeutige Veränderungen auf mitochondrialer Ebene durch G72-4 Expression festgestellt werden.

Die Expression von G72-4 steigerte die Aktivität von Komplex I signifikant. Es konnte in der Vergangenheit bereits nachgewiesen werden, dass G72-1 an Kohlehydrate wie FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) und FMN (Flavin-Mononucleotid) bindet (Chumakov et al., 2002, Pollegioni et al., 2007). Obwohl keine Veränderung in der Aktivität von Komplex I

in G72-1 transgenen Zellen zu beobachten war, ist es nicht auszuschließen, dass G72-4 an dieser Stelle eine Funktion ausübt und mitochondriale Flavin-haltige Moleküle (wie Komplex I und Komplex II) bindet und deren Aktivität reguliert. Humane Studien konnten wiederholt eine veränderte Komplex I Aktivität in Schizophrenie-Patienten nachweisen (Ben-Shachar et al., 1999, Andreazza et al., 2010, Clay et al., 2011).

In den G72-4-transgenen Zellen wurde zudem eine signifikant gesteigerte Wasserstoffperoxidproduktion gemessen. Möglicherweise steht diese in Verbindung mit der gesteigerten Komplex I Aktivität. In der Tat ist Komplex I der mitochondrialen Atmungskette Hauptproduktionsort reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle (Kushnareva et al., 2002, Liu et al., 2002, Kudin et al., 2004). Dysfunktion des Komplex I führt zu verstärkter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Adam-Vizi und Chinopoulos, 2006, Starkov, 2008, Sharma et al., 2009). In den hier vorgestellten *in vitro* Versuchen könnte die übermäßige Steigerung der Komplex I Aktivität und daraus resultierende Dysfunktion des Komplexes die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies hervorrufen. Mehrere Studien konnten eine geminderte Aktivität von Komplex I in Verbindung mit oxidativer Schädigung mitochondrialer Proteine sowohl im ZNS als auch im peripheren Blut in Schizophrenie-Patienten nachweisen (Karry et al., 2004, Gubert et al., 2013). Im Gegensatz dazu wurden hingegen auch erhöhte Komplex I Aktivitäten in Blutplättchen von Schizophrenie-Patienten nachgewiesen (Ben-Shachar et al., 1999). Hier wären weitere Versuche zur Integrität und Funktionsweise des Komplex I in unserem transgenen Zellmodell interessant. Obwohl die Menge an  $H_2O_2$  in G72-4 exprimierenden Zellen gesteigert war, war die Menge an reduziertem Glutathion (GSH) konstant. Möglicherweise kommen hier andere antioxidative Mechanismen zum tragen. Zu nennen wären hier zum Beispiel die Katalase oder die Peroxidase, welche Wasserstoffperoxid katabolisieren (Schulz et al., 2000, Chelikani et al., 2004). Um diese Hypothese zu bestätigen, wären noch weitere Versuche zu den antioxidativen Mechanismen der transfizierten Zellen nötig.

Die Aktivität der Aconitase ist durch G72-4 Expression nicht verändert.

In den G72-4-transgenen Zellen ist folglich zusammenfassend zu vermuten, dass durch eine übermäßige gesteigerte Komplex I Aktivität die Menge an produziertem Wasserstoffperoxid signifikant gesteigert wurde. Die anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies

wurden unseren Ergebnissen nach nicht durch das Glutathion System eliminiert, da hier keine Veränderungen in den G72-4 exprimierenden Zellen festzustellen waren. G72/G30 Expression im Mausmodell führte hingegen zu einer Inaktivierung von Komplex I bei nachgewiesener gesteigerter Lipidoxidation (Otte et al, 2011).

### **7.7 Vergleich der Aktivität mitochondrialer Enzyme und des oxidativen Stress in G72-1 und G72-4-transfizierten Cos7 Zellen vs. G72-transgenen Tieren**

Abb. 39 zeigt die schematische Zusammenfassung der beobachteten Veränderungen mitochondrialer Enzyme und der Marker für oxidativen Stress in den untersuchten transfizierten Cos7 Zellen und in den G72-transgenen Tieren (Otte et al., 2011). Die Citrat Synthase war weder in den G72-transgenen Tieren noch in G72-1 und G72-4-transfizierten Cos7 Zellen verändert. Die Aconitase Aktivität war in den G72-transgenen Tieren vermindert, in G72-1 exprimierenden Cos7 Zellen hingegen verstärkt und in G72-4 exprimierenden Zellen nicht verändert. Auch bei der Aktivität von Komplex I gehen die beobachteten Veränderungen in G72-transgenen Tieren und G72-1 bzw. G72-4-transgenen Cos7 Zellen nicht in die gleiche Richtung. Während auch hier eine geringere Aktivität von Komplex I in den transgenen Tieren zu beobachten war, war die Aktivität von Komplex I durch G72-4 Expression in Cos7 Zellen gesteigert. G72-1 Expression hatte keinen Effekt auf die Aktivität von Komplex I *in vitro*. Sowohl G72-transgene Tiere als auch G72-1 exprimierende Cos7 Zellen wiesen verminderte Mengen an reduziertem Glutathion auf. G72-4 Expression hatte *in vitro* keinen Effekt auf die gemessenen GSH Level. Die Menge an produziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde in den G72-transgenen Tieren nicht gemessen, jedoch zeigten diese erhöhte Level an oxidierten Lipiden als Marker für erhöhten oxidativen Stress. *In vitro* Expression von G72-4 in Cos7 Zellen führte zu einer verstärkten Wasserstoffperoxid Produktion. G72-1 Expression hatte keinen Effekt auf die Menge an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Cos7 Zellen.

	72 h nach Transfektion		
	G72-1 transgene Cos7 Zellen	G72-4 transgene Cos7 Zellen	G72-transgene Tiere
Citrat Synthase	↔	↔	↔
Aconitase	↑ *p<0,05	↔	↓ **p<0,005
Komplex I	↔	↑ *p<0,05	↓ *p<0,05
Glutathion (GSH)	↓ *p<0,05	↔	↓ *p<0,05
Wasserstoffperoxid	↔	↑ **p<0,005	

Abb. 39: Zusammenfassung der mitochondrialen Enzymaktivitäten und Messungen zum oxidativen Stress in G72-1 und G72-4-transgenen Cos7 Zellen im Vergleich zu den G72-transgenen Tieren. Diese Arbeit und Otte et. al 2011 (Otte et al., 2011). Die Richtung der Pfeile zeigt die Veränderung der gemessenen Parameter im Vergleich zur Mock Kontrolle mit den jeweiligen Signifikanzen an. Die Menge an produziertem  $H_2O_2$  wurde in den G72-transgenen Tieren nicht gemessen.

Beim Vergleich der *in vitro* Ergebnisse mit denen der transgenen Mäuse müssen folgenden Tatsachen berücksichtigt werden. Die transgenen Tiere exprimierten über einen sehr langen Zeitraum neben G72-1 und G72-4 noch 4 weitere Splicevarianten. Wir vergleichen somit eine akute Expression einer einzelnen Splicevariante in Zellkultur mit einer chronischen Expression diverser Splicevarianten im Mausmodell. Des Weiteren darf nicht vergessen werden, dass es sich bei Cos7 Zellen um Primatenzellen aus der Niere handelt, im Mausmodell handelt es sich dagegen um eine murine Mischpopulation an Zellen. Die chronische Überexpression von G72 im Mausmodell rief den mit schizophrenie assoziierten Phänotyp der Mäuse hervor. Vermutlich war die mitochondriale Feinregulation reaktiver Sauerstoffspezies in den Tieren gestört. Es kam zu vermehrt oxidati-

vem Stress und zur Schädigung der betroffenen Zellen. Dies ist der akuten Überexpression von G72-1 und G72-4 im *in vitro* System entgegen zu stellen.

## **7.8 Zusammenfassung: Mitochondriale Veränderungen durch G72 Expression in Cos7 Zellen**

Zusammenfassend kann man aus denen in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen folgern, dass G72-1 vermutlich den Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies reguliert. Die Expression von G72-1 in Cos7 Zellen führte zu verminderten Level an reduziertem Glutathion (GSH). Um auf neuronaler Ebene schwerwiegende dauerhafte Schäden zu verhindern, ist dies besonders in schnell wachsenden Neuronen sowie in Zellpopulationen mit einem hohen Energiestoffwechsel, wie im ZNS, wichtig. Es konnte nachgewiesen werden, dass G72-1 Expression die Morphologie der Mitochondrien zu einem eher fragmentierten Typus verändert und die entsprechenden Neurone vermehrt Dendriten ausbilden (Kvajo et al., 2007).

G72-4 besitzt vermutlich unterschiedliche Funktionen je nach subzellulärer Lokalisation. Mitochondriales G72-4 modifiziert möglicherweise die Effizienz der Atmungskette, indem es mit Komplex I interagiert. Es ist weitgehend bekannt, dass in der Schizophrenie sowie in anderen psychiatrischen Erkrankungen wie bipolaren Störungen der zelluläre oxidative Energiegewinn gestört ist (Videbech, 2000, Stork und Renshaw, 2005, Young, 2007) und mit einer gestörten Funktionalität von Komplex I einher gehen kann (Ben-Shachar et al., 1999, Karry et al., 2004, Gubert et al., 2013).

Die beiden untersuchten Proteine spielen somit vermutlich eine Rolle in der Energieproduktion und dem ROS Metabolismus, zwei mitochondriale Vorgänge, die eng miteinander gekoppelt sind. Eine Dysregulation wie in der pathophysiologischen Situation in der Schizophrenie, kann zu einer verringerten mitochondrialen Funktionsfähigkeit und verstärktem oxidativem Stress führen und die betroffenen Zellen schädigen (Jou et al., 2009, Rezin et al., 2009, Pandya et al., 2013, Zhang und Yao, 2013).

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

In der hier vorgestellten Dissertation wurde die Funktion des Gens G72 untersucht. Neben *in vivo* Versuchen zu kognitiven Defiziten G72/G30-transgener Mäuse wurde die biologische Funktion des Proteins G72-1 und einer weiteren Splicevariante von G72 (G72-4) *in vitro* analysiert.

Zur Untersuchung kognitiver Fähigkeiten G72-transgener Tiere wurde die Fähigkeit des tonabhängigen Furchterlernens untersucht. G72/G30 Tiere zeigten im Gegensatz zu Wildtyp Tieren Defizite im Erlernen der konditionierten Furchtreaktion. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen bezüglich kognitiver Fähigkeiten G72-transgener Tiere sowie mit erwiesenen Assoziationen von G72 mit kognitiven Fähigkeiten im Menschen. Bis dato wird die Funktion von G72-1 kontrovers diskutiert. Die in dieser Arbeit hergestellten transgenen Zellen konnten wichtige Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation und der mitochondrialen Funktion liefern. G72-4 wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal überhaupt untersucht. Die mitochondriale Lokalisation von G72-1 in Zellen aus unterschiedlichsten Spezies sowie unterschiedlichster geweblicher Herkunft unterstützt die Hypothese der mitochondrialen Funktion dieses bisher kontrovers diskutierten Proteins. Vermutlich spielt G72-1 eine wichtige Rolle in der Regulation des oxidativen Stress in den Zellen. Es konnten in dieser Arbeit Veränderungen im Glutathion-System sowie eine gesteigerte Aktivität der mitochondrialen Aconitase beobachtet werden. G72-4 hingegen war in den transgenen Cos7 Zellen sowohl cytosolisch als auch mitochondrial lokalisiert. G72-4 modulierte in Cos7 Zellen die Aktivität des Komplex I. Die verstärkte Komplex I Aktivität führte in unserem Zellsystem vermutlich zu vermehrter Wasserstoffperoxidproduktion. Weder G72-1 noch G72-4 modulierten die Aktivität der Citrat Synthase, das Maß für die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien und die Geschwindigkeit des Citratzyklus. Die Ergebnisse deuten insgesamt auf eine Feinregulierung der mitochondrialen Funktion, vor allem des Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies, durch G72 hin.

Die hergestellten Transfektionsvektoren werden momentan genutzt, um die Funktionen von G72-1 und G72-4 noch weiter einzugrenzen. Zurzeit werden Bindungspartner von

G72-1 und G72-4 in Zellkultur identifiziert. Geplant ist ebenfalls den Glutathion Regelkreis sowie Parameter für oxidativen Stress in den transgenen Zellen genauer zu untersuchen. Um die Folgen der akuten versus chronischen G72-1 und G72-4 Expression zu untersuchen, sollen G72-1 und G72-4-transgene Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden.

## 9. Anhang

### Kodierende Sequenz von G72-1

5'ATGCTGGAAAAGCTGATGGGTGCTGATTCTCTCCAGCTTTTCAGATCCAGATATA  
CATTGGGTAAAATCTACTTCATAGGTTTTCAAAGGAGCATTCTTCTGAGCAAATCTG  
AAAACCTCTCTAAACTCTATTGCAAAGGAGACAGAAGAAGGAAGAGAGACGGTAACA  
AGGAAAGAAGGATGGAAGAGAAGGCATGAGGACGGCTATTTGGAAATGGCACAGA  
GGCATTACAGAGATCATTATGTCCTTGGGTCTCTTACCTTCCTCAGCCCTATGCAG  
AGCTTGAAGAAGTAAGCAGCCATGTTGGAAAAGTCTTCATGGCAAGAACTATGAG  
TTCCTTGCCTATGAGGCCTCTAAGGACCGCAGGCAGCCTCTAGAACGAATGTGGA  
CCTGCAACTACAACCAGCAAAAAGACCAGTCATGCAACCACAAGGAAATAACTTCT  
ACCAAAGCTGAATGA 3'

### Kodierende Sequenz von G72-4

5'ATGGCACAGAGGCATTTACAGAGATCATTATGTCCTTGGGTCTCTTACCTTCCTC  
AGCCCTATGCAGAGCTTGAAGAAGTAAGCAGCCATGTTGGAAAAGTCTTCATGGCA  
AGAAACTATGAGTTCCTTGCCTATGAGGCCTCTAAGGACCGCAGGCAGCCTCTAGA  
ACGAATGTGGACCTGCAACTACAACCAGCAAAAAGACCAGTCATGCAACCACAAGG  
AAATAACTTCTACCAAAGCTGAATGA 3'

### Aminosäuresequenz von G72-1

MLEKLMGADSLQLFRSRYTLGKIYFIGFQKSILLSKSENSLNSIAKETEEGRETVTRKEG  
WKRRHEDGYLEMAQRHLQRSLCPWWSYLPQPYAELEEVS SHVGKVF MARNYEF LAY  
EASKDRRQPLERMWTCNYNQQKDQSCNHKEITSTKAE

### Aminosäuresequenz von G72-4

MAQRHLQRSLCPWWSYLPQPYAELEEVS SHVGKVF MARNYEF LAYEASKDRRQPLER  
MWTCNYNQQKDQSCNHKEITSTKAE

Quelle: NCBI, 2012: NCBI National Center for Biotechnology Information.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression/> (Zugriffsdatum: 02.01.2011)

## 10. Literaturverzeichnis

- Abi-Saab WM, D'Souza DC, Moghaddam B, Krystal JH. The NMDA antagonist model for schizophrenia: promise and pitfalls. *Pharmacopsychiatry* 1998; 31 Suppl 2: 104-109
- About Jamra R, Schmael C, Cichon S, Rietschel M, Schumacher J, Nothen MM. The G72/G30 gene locus in psychiatric disorders: a challenge to diagnostic boundaries? *Schizophr Bull* 2006; 32: 599-608
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in pharmacological sciences* 2006; 27: 639-645
- Addington AM, Gornick M, Sporn AL, Gogtay N, Greenstein D, Lenane M, Gochman P, Baker N, Balkissoon R, Vakkalanka RK, Weinberger DR, Straub RE, Rapoport JL. Polymorphisms in the 13q33.2 gene G72/G30 are associated with childhood-onset schizophrenia and psychosis not otherwise specified. *Biological psychiatry* 2004; 55: 976-980
- Aleman A, Kahn RS, Selten JP. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Archives of general psychiatry* 2003; 60: 565-571
- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet* 2008; 40: 827-834
- Altar CA, Jurata LW, Charles V, Lemire A, Liu P, Bukhman Y, Young TA, Bullard J, Yokoe H, Webster MJ, Knable MB, Brockman JA. Deficient hippocampal neuron expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial genes in multiple schizophrenia cohorts. *Biological psychiatry* 2005; 58: 85-96
- Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Archives of general psychiatry* 2010; 67: 360-368
- Anglin RE, Mazurek MF, Tarnopolsky MA, Rosebush PI. The mitochondrial genome and psychiatric illness. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012; 159B: 749-759
- Auquier P, Lancon C, Rouillon F, Lader M, Holmes C. Mortality in schizophrenia. *Pharmacoepidemiology and drug safety* 2006; 15: 873-879
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2002; 18: 298-305
- Ben-Shachar D, Karry R. Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *PLoS one* 2008; 3: e3676
- Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Reshef A, Sheinkman A, Klein E. Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. *Int J Neuropsychopharmacol* 1999; 2: 245-253
- Blanchard RJ, Griebel G, Henrie JA, Blanchard DC. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 1997; 21: 783-789
- Bulteau AL, Ikeda-Saito M, Szweda LI. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* 2003; 42: 14846-14855

- Cantor-Graae E, Selten JP. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *The American journal of psychiatry* 2005; 162: 12-24
- Carlsson A. Neurohumoral transmission and neuropsychiatric disorders. *Int J Psychiatry* 1967; 4: 218-219
- Carlsson A, Lindqvist M. Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1963; 20: 140-144
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 192-208
- Cheng L, Hattori E, Nakajima A, Woehrle NS, Opal MD, Zhang C, Grennan K, Dulawa SC, Tang YP, Gershon ES, Liu C. Expression of the G72/G30 gene in transgenic mice induces behavioral changes. *Molecular psychiatry* 2013; epub ahead of print
- Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. The DISC locus in psychiatric illness. *Molecular psychiatry* 2008; 13: 36-64
- Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essioux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, Primas G, Saumier M, Boubkiri N, Martin-Saumier S, Nasroune M, Peixoto H, Delaye A, Pinchot V, Bastucci M, Guillou S, Chevillon M, Sainz-Fuertes R, Meguenni S, Aurich-Costa J, Cherif D, Gimalac A, Van Duijn C, Gauvreau D, Ouellette G, Fortier I, Raelson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham PC, Straub RE, Weinberger DR, Cohen N, Cohen D. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 13675-13680
- Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2011; 29: 311-324
- Conrad M, Schneider M, Seiler A, Bornkamm GW. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biological chemistry* 2007; 388: 1019-1025
- Coyle JT. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harv Rev Psychiatry* 1996; 3: 241-253
- Cryer DR, Eccleshall R, Marmur J. Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol* 1975; 12: 39-44
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and re-conceptualization. *The American journal of psychiatry* 1991; 148: 1474-1486
- Dean OM, van den Buuse M, Berk M, Copolov DL, Mavros C, Bush AI. N-acetyl cysteine restores brain glutathione loss in combined 2-cyclohexene-1-one and d-amphetamine-treated rats: relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience letters* 2011; 499: 149-153
- Detra-Wadleigh SD, McMahon FJ. G72/G30 in schizophrenia and bipolar disorder: review and meta-analysis. *Biological psychiatry* 2006; 60: 106-114
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7-61

- Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Kruger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, Holsboer F, Boesiger P, Cuenod M. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *The European journal of neuroscience* 2000; 12: 3721-3728
- Drews E, Otte DM, Zimmer A. Involvement of the primate specific gene G72 in schizophrenia: From genetic studies to pathomechanisms. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2012; 176-185
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of molecular biology* 2000; 300: 1005-1016
- Ensembl release, 2012: ensembl genome browser. [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000182346;r=13:106118216-106143383](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000182346;r=13:106118216-106143383) (Zugriffsdatum: 12.10.2012).
- Fanselow MS. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *The Pavlovian journal of biological science* 1980; 15: 177-182
- Fanselow MS, LeDoux JE. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 1999; 23: 229-232
- Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv* 2005; 5: 94-111
- Fendri C, Mechri A, Khiari G, Othman A, Kerkeni A, Gaha L. [Oxidative stress involvement in schizophrenia pathophysiology: a review]. *Encephale* 2006; 32: 244-252
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current opinion in plant biology* 2004; 7: 254-261
- Filiou MD, Teplytska L, Otte DM, Zimmer A, Turck CW. Myelination and oxidative stress alterations in the cerebellum of the G72/G30 transgenic schizophrenia mouse model. *J Psychiatr Res* 2012; 46: 1359-1365
- Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH. The inactivation of Fe-S cluster containing hydrolyases by superoxide. *J Biol Chem* 1993; 268: 22369-22376
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine* 2009; 30: 1-12
- Francisconi S, Codenotti M, Ferrari Toninelli G, Uberti D, Memo M. Mitochondrial dysfunction and increased sensitivity to excitotoxicity in mice deficient in DNA mismatch repair. *Journal of neurochemistry* 2006; 98: 223-233
- Gardner PR, Nguyen DD, White CW. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 12248-12252
- Garg A, Bhasin M, Raghava GP. Support vector machine-based method for subcellular localization of human proteins using amino acid compositions, their order, and similarity search. *J Biol Chem* 2005; 280: 14427-14432
- Goldberg TE, Straub RE, Callicott JH, Hariri A, Mattay VS, Bigelow L, Coppola R, Egan MF, Weinberger DR. The G72/G30 gene complex and cognitive abnormalities in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 2022-2032
- Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, Panizzutti BS, Rezin GT, Massuda R, Streck EL, Gama CS, Kapczinski F, Kunz M. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res* 2013; 47: 1396-1402
- Hamilton SP, Fyer AJ, Durner M, Heiman GA, Baisre de Leon A, Hodge SE, Knowles JA, Weissman MM. Further genetic evidence for a panic disorder syndrome map-

- ping to chromosome 13q. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 2550-2555
- Hammen PK, Gorenstein DG, Weiner H. Structure of the signal sequences for two mitochondrial matrix proteins that are not proteolytically processed upon import. *Biochemistry* 1994; 33: 8610-8617
- Harrison PJ. Neurochemical alterations in schizophrenia affecting the putative receptor targets of atypical antipsychotics. Focus on dopamine (D1, D3, D4) and 5-HT<sub>2a</sub> receptors. *Br J Psychiatry Suppl* 1999; 12-22
- Hartz SM, Ho BC, Andreasen NC, Librant A, Rudd D, Epping EA, Wassink TH. G72 influences longitudinal change in frontal lobe volume in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010; 153B: 640-647
- Hashimoto K, Engberg G, Shimizu E, Nordin C, Lindstrom LH, Iyo M. Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 767-769
- Heresco-Levy U. Glutamatergic neurotransmission modulators as emerging new drugs for schizophrenia. *Expert Opin Emerg Drugs* 2005; 10: 827-844
- HSLpred, Bioinformatics Centre, Institute of Microbial Technology, Chandigarh, INDIA, 2010: A SVM based Method for the Subcellular Localization of Human Proteins. <http://www.imtech.res.in/raghava/hslpred/> (Zugriffsdatum: 23.12. 2010)
- Ipsort, Laboratory of DNA Information Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 2010. <http://ipsort.hgc.jp/> (Zugriffsdatum; 23.12.2010)
- Jansen A, Krach S, Krug A, Markov V, Eggermann T, Zerres K, Thimm M, Nothen MM, Treutlein J, Rietschel M, Kircher T. Effect of the G72 (DAOA) putative risk haplotype on cognitive functions in healthy subjects. *BMC Psychiatry* 2009; 9: 60
- Jou SH, Chiu NY, Liu CS. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Chang Gung Med J* 2009; 32: 370-379
- Kantrowitz J, Javitt DC. Glutamatergic transmission in schizophrenia: from basic research to clinical practice. *Curr Opin Psychiatry* 2012; 25: 96-102
- Karry R, Klein E, Ben Shachar D. Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: a postmortem study. *Biological psychiatry* 2004; 55: 676-684
- Kato T. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: from 31P-magnetic resonance spectroscopic findings to their molecular mechanisms. *Int Rev Neurobiol* 2005; 63: 21-40
- Kent WJ et al., 2002: The human genome browser at UCSC. <http://genome.ucsc.edu/> (Zugriffsatum: 02.01.2011)
- Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 1992; 256: 675-677
- Kitano R, Morimoto S. Isolation of peroxisomes from the dog kidney cortex. *Biochimica et biophysica acta* 1975; 411: 113-120
- Koch M, Fendt M, Kretschmer BD. Role of the substantia nigra pars reticulata in sensorimotor gating, measured by prepulse inhibition of startle in rats. *Behavioural brain research* 2000; 117: 153-162
- Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 2004; 279: 4127-4135

- Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *The Biochemical journal* 2002; 368: 545-553
- Kvajo M, Dhillia A, Swor DE, Karayiorgou M, Gogos JA. Evidence implicating the candidate schizophrenia/bipolar disorder susceptibility gene G72 in mitochondrial function. *Molecular psychiatry* 2007; 685-696
- Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J. Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 687-702
- Laxmi TR, Stork O, Pape HC. Generalisation of conditioned fear and its behavioural expression in mice. *Behavioural brain research* 2003; 145: 89-98
- Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annual review of nutrition* 2007; 27: 41-61
- Li T, Ball D, Zhao J, Murray RM, Liu X, Sham PC, Collier DA. Family-based linkage disequilibrium mapping using SNP marker haplotypes: application to a potential locus for schizophrenia at chromosome 22q11. *Molecular psychiatry* 2000; 5: 77-84
- Lieberman JA, Mailman RB, Duncan G, Sikich L, Chakos M, Nichols DE, Kraus JE. Serotonergic basis of antipsychotic drug effects in schizophrenia. *Biological psychiatry* 1998; 44: 1099-1117
- Lin CH, Chang HT, Chen YJ, Lin CH, Huang CH, Tun R, Tsai GE, Lane HY. Distinctively higher plasma G72 protein levels in patients with schizophrenia than in healthy individuals. *Molecular psychiatry* 2013; epub ahead of print
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry* 2002; 80: 780-787
- Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M, Chen G. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nature reviews* 2012; 13: 293-307
- Marazziti D, Baroni S, Picchetti M, Landi P, Silvestri S, Vatteroni E, Catena Dell'Osso M. Psychiatric disorders and mitochondrial dysfunctions. *European review for medical and pharmacological sciences* 2012; 16: 270-275
- Marmur J, Anderson WF, Matthews L, Berns K, Gajewska E, Lane D, Doty P. The effects of ultraviolet light on the biological and physical chemical properties of deoxyribonucleic acids. *J Cell Comp Physiol* 1961; 58(3)Pt 2: 33-55
- Maynard TM, Sikich L, Lieberman JA, LaMantia AS. Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull* 2001; 27: 457-476
- McClung JK, Jupe ER, Liu XT, Dell'Orco RT. Prohibitin: potential role in senescence, development, and tumor suppression. *Experimental gerontology* 1995; 30: 99-124
- McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC medicine* 2004; 2: 13
- McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE. Genetic basis of schizophrenia. *Lancet* 1995; 346: 678-682
- Meltzer HY. Treatment-resistant schizophrenia--the role of clozapine. *Curr Med Res Opin* 1997; 14: 1-20
- Messias EL, Chen CY, Eaton WW. Epidemiology of schizophrenia: review of findings and myths. *Psychiatr Clin North Am* 2007; 30: 323-338
- Miyamoto S, LaMantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv* 2003a; 3: 27-39

- Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biological chemistry* 2003b; 384: 567-574
- Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M, Lewis G. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet* 2007; 370: 319-328
- Moreno S, Nardacci R, Cimini A, Ceru MP. Immunocytochemical localization of D-amino acid oxidase in rat brain. *Journal of neurocytology* 1999; 28: 169-185
- Moskowitz A, Heim G. Eugen Bleuler's Dementia praecox or the group of schizophrenias (1911): a centenary appreciation and reconsideration. *Schizophr Bull* 2011; 37: 471-479
- Mossner R, Schuhmacher A, Wagner M, Quednow BB, Frommann I, Kuhn KU, Schwab SG, Rietschel M, Falkai P, Wolwer W, Ruhrmann S, Bechdorf A, Gaebel W, Klosterkötter J, Maier W. DAOA/G72 predicts the progression of prodromal syndromes to first episode psychosis. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2009; 209-215
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 2009; 417: 1-13
- NCBI, 2012: NCBI National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression/> (Zugriffsdatum: 02.01.2011)
- Neupert W. Protein import into mitochondria. *Annual review of biochemistry* 1997; 66: 863-917
- Nuechterlein KH, Dawson ME. A heuristic vulnerability/stress model of schizophrenic episodes. *Schizophr Bull* 1984; 10: 300-312
- Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 1999; 33: 523-533
- Otte DM, Bilkei-Gorzo A, Filiou MD, Turck CW, Yilmaz O, Holst MI, Schilling K, Abou-Jamra R, Schumacher J, Benzel I, Kunz WS, Beck H, Zimmer A. Behavioral changes in G72/G30 transgenic mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2009; 19: 339-348
- Otte DM, Sommersberg B, Kudin A, Guerrero C, Albayram O, Filiou MD, Frisch P, Yilmaz O, Drews E, Turck CW, Bilkei-Gorzo A, Kunz WS, Beck H, Zimmer A. N-acetyl cysteine treatment rescues cognitive deficits induced by mitochondrial dysfunction in G72/G30 transgenic mice. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 2233-2243
- Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 46: 214-223
- Pedersen CB, Mortensen PB. Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. *Archives of general psychiatry* 2001; 58: 1039-1046
- Perotti ME, Gavazzi E, Trussardo L, Margaretti N, Curti B. Immunoelectron microscopic localization of D-amino acid oxidase in rat kidney and liver. *The Histochemical journal* 1987; 19: 157-169
- Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral neuroscience* 1992; 106: 274-285
- Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, Pilone MS, Molla G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 1373-1394
- Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JT, Griffin JL, Wayland M, Freeman T, Dudbridge F, Lilley KS, Karp NA, Hester S, Tkachev D, Mimmack ML, Yolken RH, Webster MJ, Torrey EF, Bahn S. Mitochondrial dysfunction in schizo-

- phrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Molecular psychiatry* 2004; 9: 684-697, 643
- Prata D, Breen G, Osborne S, Munro J, St Clair D, Collier D. Association of DAO and G72(DAOA)/G30 genes with bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B: 914-917
- PSORTII, psort org, 1999: PSORT II Prediction. <http://psort.hgc.jp/form2.html> (Zugriffsdatum: 23.12.2010)
- Raffa M, Atig F, Mhalla A, Kerkeni A, Mechri A. Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naïve first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry* 2011; 11: 124
- Raffa M, Mechri A, Othman LB, Fendri C, Gaha L, Kerkeni A. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33: 1178-1183
- Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2457-2478
- Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res* 2009; 34: 1021-1029
- Rietschel M, Beckmann L, Strohmaier J, Georgi A, Karpushova A, Schirmbeck F, Boesshenz KV, Schmal C, Burger C, Jamra RA, Schumacher J, Hofels S, Kumsta R, Entringer S, Krug A, Markov V, Maier W, Propping P, Wust S, Kircher T, Nothen MM, Cichon S, Schulze TG. G72 and its association with major depression and neuroticism in large population-based groups from Germany. *The American journal of psychiatry* 2008; 165: 753-762
- Sacchi S, Bernasconi M, Martineau M, Mothet JP, Ruzzene M, Pilone MS, Pollegioni L, Molla G. pLG72 modulates intracellular D-serine levels through its interaction with D-amino acid oxidase: Effect on schizophrenia susceptibility. *J Biol Chem* 2008; 8: 22244-22256
- Sacchi S, Cappelletti P, Giovannardi S, Pollegioni L. Evidence for the interaction of D-amino acid oxidase with pLG72 in a glial cell line. *Molecular and cellular neurosciences* 2011; 48: 20-28
- Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS medicine* 2005; 2: e141
- Sawa A, Snyder SH. Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science* 2002; 296: 692-695
- Schizophrenia Research Forum, 2011: Gene overview of all published SZ-association studies for DAOA. <http://www.szgene.org/geneoverview.asp?geneid=289> (Zugriffsdatum: 02.01.2011)
- Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 655-667
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European journal of biochemistry / FEBS* 2000; 267: 4904-4911
- Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, Tullius M, Kovalenko S, Bogaert AV, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S. Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Molecular psychiatry* 2004; 9: 203-207
- Schweizer U, Brauer AU, Kohrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 45: 164-178

- Schwerzmann K, Hoppeler H, Kayar SR, Weibel ER. Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86: 1583-1587
- Sehgal SA, Khattak NA, Mir A. Structural, phylogenetic and docking studies of D-amino acid oxidase activator (DAOA), a candidate schizophrenia gene. *Theoretical biology & medical modelling* 2013; 10: 3
- Sharma LK, Lu J, Bai Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Current medicinal chemistry* 2009; 16: 1266-1277
- Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L, Schiffer R, Kotler M, Strous RD, Swartz-Vanetik M, Knobler HY, Shinar E, Beckmann JS, Yakir B, Risch N, Zak NB, Darvasi A. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 1296-1302
- Sivrioglu EY, Kirli S, Sipahioglu D, Gursoy B, Sarandol E. The impact of omega-3 fatty acids, vitamins E and C supplementation on treatment outcome and side effects in schizophrenia patients treated with haloperidol: an open-label pilot study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31: 1493-1499
- Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1147: 37-52
- Stork C, Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Molecular psychiatry* 2005; 10: 900-919
- Swerdlow NR, Geyer MA. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull* 1998; 24: 285-301
- Swerdlow NR, Light GA, Cadenhead KS, Sprock J, Hsieh MH, Braff DL. Startle gating deficits in a large cohort of patients with schizophrenia: relationship to medications, symptoms, neurocognition, and level of function. *Archives of general psychiatry* 2006; 63: 1325-1335
- Tamminga CA, Holcomb HH. Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Molecular psychiatry* 2005; 10: 27-39
- TargetP, Center for Biological Sequence Analysis CBS, 2010: TargetP 1.1 Server. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> (Zugriffsdatum: 23.12.2010)
- Tsai MC, Liou CW, Lin TK, Lin IM, Huang TL. Changes in oxidative stress markers in patients with schizophrenia: The effect of antipsychotic drugs. *Psychiatry research* 2013; epub ahead of print
- Tsuang M. Schizophrenia: genes and environment. *Biological psychiatry* 2000; 47: 210-220
- Tsuang MT, Stone WS, Faraone SV. Genes, environment and schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl* 2001; 40: 18-24
- UCSC Datenbank, 2012: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> (Zugriffsdatum: 22.02.2013)
- Videbech P. PET measurements of brain glucose metabolism and blood flow in major depressive disorder: a critical review. *Acta psychiatrica Scandinavica* 2000; 101: 11-20
- Walters JT, Owen MJ. Endophenotypes in psychiatric genetics. *Molecular psychiatry* 2007; 12: 886-890

- Williamson JR, Cooper RH. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett* 1980; 117 Suppl: K73-85
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition* 2004; 134: 489-492
- Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 46: 200-206
- Young LT. Is bipolar disorder a mitochondrial disease? *J Psychiatry Neurosci* 2007; 32: 160-161
- Zhang SJ, Sandstrom ME, Lanner JT, Thorell A, Westerblad H, Katz A. Activation of aconitase in mouse fast-twitch skeletal muscle during contraction-mediated oxidative stress. *American journal of physiology* 2007a; 293: C1154-1159
- Zhang XY, Tan YL, Cao LY, Wu GY, Xu Q, Shen Y, Zhou DF. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophrenia research* 2006; 81: 291-300
- Zhang XY, Tan YL, Zhou DF, Cao LY, Wu GY, Haile CN, Kosten TA, Kosten TR. Disrupted antioxidant enzyme activity and elevated lipid peroxidation products in schizophrenic patients with tardive dyskinesia. *The Journal of clinical psychiatry* 2007b; 68: 754-760
- Zhang XY, Yao JK. Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 46: 197-199
- Zubin J, Spring B. Vulnerability--a new view of schizophrenia. *Journal of abnormal psychology* 1977; 86: 103-126
- Zuliani R, Moorhead TW, Job D, McKirdy J, Sussmann JE, Johnstone EC, Lawrie SM, Brambilla P, Hall J, McIntosh AM. Genetic variation in the G72 (DAOA) gene affects temporal lobe and amygdala structure in subjects affected by bipolar disorder. *Bipolar disorders* 2009; 11: 621-627

## 11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Psychiatrie der Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Zimmer angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Geduld und wertvolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Doktorarbeit.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung für das herzliche und angenehme Arbeitsklima, aber auch für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld, danken. Besonderen Dank gilt meinem Betreuer Dr. David M. Otte und Öznur Yilmaz für ihr großes Engagement, die stetige Hilfe und den die Arbeit sehr erleichternden Humor und Witz. Ein großes Dankeschön gilt ebenfalls Prof. Dr. Kunz und Dr. Kudin für die Durchführung der Versuche bezüglich mitochondrialer Aktivität.

Prof. Dr. Maier, Direktor der Klinik für Psychiatrie möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferats danken.

Ebenfalls großer Dank gilt dem Bonfor Forschungsförderprogramm der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn für die Förderung dieser Arbeit durch ein Bonfor Promotionsstipendium.

Besonders will ich mich an dieser Stelle bei meinem Mann Stefan für seine immerwährende Unterstützung und Geduld bedanken. Größten Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer unterstützten und mir meine Studien ermöglicht haben.

## 12. Veröffentlichungen

**Frisch P**, Bilkei-Gorzó A, Rácz I, Zimmer A. *Modulation of the CRH system by substance P/NKA in an animal model of depression*. Institute of Molecular Psychiatry, University of Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn, Germany. Behav Brain Res. 2010; 213: 103-108.

Otte DM, Sommersberg B, Kudin A, Guerrero C, Albayram O, Filiou MD, **Frisch P**, Yilmaz O, Drews E, Turck CW, Bilkei-Gorzo A, Kunz WS, Beck H, Zimmer A. *N-acetyl cysteine treatment rescues cognitive deficits induced by mitochondrial dysfunction in G72/G30 transgenic mice*. Neuropsychopharmacology 2011; 36: 2233-2243.