

Aus dem Institut für experimentelle und klinische
Pharmakologie und Toxikologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger

Rolle des Stickstoffmonoxids für den Glukosemetabolismus in Astrozyten in Abhängigkeit vom Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck
der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Britta Brix geb. Oschmann aus München



Lübeck 2011

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Dezember 2008 bis November 2011 am Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Lübeck) unter der Betreuung von PD. Dr. Olaf Jöhren angefertigt.

- 1. Berichterstatter : PD. Dr. Olaf Jöhren
- 2. Berichterstatter : Prof. Dr. Thomas Peters

Datum der mündlichen Prüfung : 24.01.2012
Prüfungsvorsitzender : Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann
Zum Druck genehmigt : 31.01.2012

gez. Prof. Dr. Jürgen Prestin
– Vorsitzender der MINT-Sektionen –

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass ich nicht zuvor oder gleichzeitig anderorts einen Zulassungsantrag gestellt und mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen habe.

(Britta Brix)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Astrozyten	1
1.1.1	Energiemetabolismus von Astrozyten	2
1.1.2	Energiemetabolismus des Gehirns	3
1.1.3	Einfluss von Astrozyten auf die neurovaskuläre Kopplung . .	4
1.1.4	Spielt der Gehirnmetabolismus eine Rolle für die Entstehung von Adipositas?	7
1.2	HIF-1 α und HIF-Zielgene	8
1.2.1	Struktur und Regulation von HIF	8
1.2.2	HIF-1 Zielgene	11
1.2.3	Sauerstoff-unabhängige Regulation von HIF-1 α	12
1.3	Stickstoffmonoxid (NO)	13
1.4	Die Maus als Modellorganismus	16
1.4.1	Das Cre-LoxP System	16
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Hersteller	19
2.2	Geräte	20
2.3	Chemikalien	21
2.4	Gebrauchsmaterialien	22
2.5	Zelllinien	23
2.6	Nukleinsäuren	23
2.7	Medien	26
2.7.1	Zellkulturmedien	26
2.7.2	Bakterienkulturmedien	27
2.8	Kits	27
2.9	Antikörper	28
2.10	Transfektionsreagenzien	28
2.11	Enzyme	29
2.12	Puffer und Lösungen	29

2.12.1	Selbsthergestellte Puffer und Lösungen	29
2.12.2	Kommerzielle Puffer und Gele	31
2.13	Mauslinien	32
2.14	Tierdiäten	32
2.15	Zellbiologische Arbeiten	32
2.15.1	Allgemeine Techniken	32
2.15.2	Präparation primärer muriner corticaler Astrozyten	32
2.15.3	Präparation primärer muriner corticaler Neurone	33
2.15.4	Präparation primärer muriner Endothelzellen aus Hirn-Kapillaren	34
2.15.5	Kultivierung von bEnd.3 Zellen und CHO Zellen	34
2.15.6	Behandlung von primären Astrozyten	35
2.15.7	Kokultur unter Verwendung eines Transwell-Systems	35
2.15.8	Transfektion von Zellen mit Lipofectamine TM 2000	36
2.15.9	Reportergenassay	37
2.15.10	Immunfluoreszenzfärbung	37
2.15.11	Laktat Assay	38
2.15.12	Nitrat/Nitrit Assay	39
2.16	Mikrobiologische Methoden	39
2.16.1	Transformation kompetenter Bakterien	39
2.16.2	Anlegen von Glycerinkulturen	40
2.16.3	Präparation von Plasmiden aus Bakterien	40
2.17	Molekularbiologische Arbeiten	40
2.17.1	Isolation von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	40
2.17.2	Ethanol-Fällung von DNA	40
2.17.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	41
2.17.4	Isolation von RNA aus Zellkulturen und Geweben	41
2.17.5	Konzentrationsbestimmung von RNA	41
2.17.6	Reverse Transkription von RNA	41
2.17.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.17.8	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR)	43
2.17.9	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	43
2.17.10	Elution von DNA aus Agarosegelen	44
2.17.11	Restriktionsverdau von Plasmiden	44
2.17.12	TOPO-TA Klonierung	44
2.17.13	Nicht-radioaktive <i>in situ</i> -Hybridisierung mit DIG-markierten Oligonukleotid-Sonden	45
2.18	Methoden im Umgang mit proteinanalytischen Arbeiten	47
2.18.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	47

2.18.2	Western Blot Analyse	47
2.19	Manipulation und Zucht von Mäusen	48
2.19.1	Schwanzbiopsien	50
2.19.2	Hypoxie bei Mäusen	50
2.19.3	Generierung einer Astrozyten-spezifischen HIF-1 α <i>knock-out</i> - Mauslinie	50
2.19.4	Fütterungsversuche mit Astrozyten-spezifischen HIF-1 α <i>knock</i> - <i>out</i> -Mäusen	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Genexpressionsanalyse in Astrozyten und Neuronen	53
3.1.1	Etablierung von cortikalen astrozytären und neuronalen Pri- märkulturen	53
3.1.2	Analyse der mRNA-Expression von glykolytischen Enzymen in astrozytären und neuronalen corticalen Primärkulturen .	54
3.2	HIF-1 α unter Normoxie	55
3.2.1	Stabilisierung von HIF-1 α in murinem Gewebe bei Normoxie und Hypoxie	58
3.2.2	Lokalisation von HIF-1 α -mRNA im murinen Gehirn	58
3.3	NO-induzierte HIF-1 α -Stabilisierung in Astrozyten	60
3.3.1	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der NO-vermittelten HIF- 1 α -Stabilisierung	60
3.3.2	Stabilisierung von HIF-1 α durch NO in Astrozyten, aber nicht in Neuronen	61
3.3.3	Lokalisation des durch NO stabilisierten HIF-1 α im Zellkern	61
3.4	NO-induziert PI3K/AKT/mTor- und MAPK-Signalwege	62
3.5	NO-regulierte mRNA-Expression in Astrozyten	67
3.5.1	NO-vermittelte Regulation der Genexpression glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter in primären Astro- zyten	67
3.5.2	NO-induzierte MCT4-Promotoraktivität	71
3.5.3	NO-vermittelte Steigerung der Laktatfreisetzung in Astrozyten	72
3.6	HIF-1 α siRNA <i>knock-down</i>	73
3.6.1	HIF-1 α siRNA <i>knock-down</i>	73
3.6.2	Inhibition der NO-vermittelten Steigerung der Genexpression glykolytischer Enzyme durch einen HIF-1 α <i>knock-down</i>	74

3.6.3	Verminderung der NO-abhängigen Laktatfreisetzung durch den HIF-1 α -siRNA <i>knock-down</i> in Astrozyten	76
3.7	Kokultur	76
3.7.1	Messung der NO-Produktion in verschiedenen Zellkulturen .	77
3.7.2	Abhängigkeit der basalen NO-Produktion in Endothelzellen von der eNOS	77
3.7.3	Kokultur-induzierte HIF-1 α -Stabilisierung	78
3.7.4	Kokultur-abhängige Laktatproduktion in Astrozyten	80
3.8	Effekt eines HIF-1 α <i>knock-outs</i> in Astrozyten <i>in vivo</i>	84
3.8.1	Genotypisierung von Mäusen	84
3.8.2	Genexpressionsanalyse in Astrozyten-spezifischen HIF-1 α <i>knock-out</i> -Mäusen	85
3.8.3	Einfluss einer hochkalorischen Diät auf die Gewichtsentwicklung von Astrozyten-spezifischen HIF-1 α <i>knock-out</i> - und Kontroll-Mäusen	87
3.8.4	Einfluss des Astrozyten-spezifischen HIF-1 α - <i>knock-outs</i> auf die metabolische Rate, Futteraufnahme und Bewegung	87
4	Diskussion	91
4.1	Differentielle Expression glykolytischer Enzyme in Astrozyten und Neuronen	91
4.2	NO-induzierte HIF-1 α -vermittelte Glykolyse in Astrozyten	92
4.2.1	Regulation der Glykolyse in Astrozyten durch Kokultur . . .	96
4.2.2	Modell zur Regulation der Glykolyse in Astrozyten	98
4.3	Astrozyten-spezifischer HIF-1 α <i>knock-out in vivo</i>	101
4.4	Ausblick	103
5	Zusammenfassung	105
	Literaturverzeichnis	107
A	Appendix	131
A.1	Abkürzungsverzeichnis	131
A.2	Vektorkarten	137
A.2.1	MCT4-Promotor in <i>sense</i> -Orientierung im pGeneBLazer-Topo Vektor	137
A.2.2	MCT4-Promotor in <i>antisense</i> -Orientierung im pGeneBLazer-Topo Vektor	138
A.3	Lebenslauf	139
A.4	Publikationsliste	141

A.5 Danksagung	143
--------------------------	-----

Einleitung und Zielsetzung

1.1 Astrozyten

Das ZNS besteht zu 90 % aus nicht-erregbaren Gliazellen und nur zu 10 % aus erregbaren Neuronen. Virchow beschrieb 1858 Gliazellen als 'Nervenkitt' oder Bindegewebe, welches ausschließlich als Fundament für das neuronale Netzwerk dient [143]. Seitdem hat sich die Sichtweise auf Gliazellen massiv geändert und es wird deutlich, dass Gliazellen weit mehr Aufgaben im Gehirn erfüllen, als nur als Leitstruktur für Neurone zu dienen.

Gliazellen teilen sich auf in Makroglia, die ektodermalen Ursprungs sind, und Mikroglia, welche aus mesodermalen Makrophagen entstehen. Zu den Makroglia gehören die sternförmigen Astrozyten und die myelinbildenden Oligodendrozyten [91].

Astrozyten bilden ein funktionelles Synzytium, indem sie über *gap junctions*, die für kleine Moleküle bis 1000 Da durchlässig sind, miteinander kommunizieren [146]. Wird ein Astrozyt z.B. durch Neurotransmitter oder ATP stimuliert, wird IP_3 gebildet, das zu einer Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern führt [58, 44]. Ca^{2+} und IP_3 können durch die *gap junctions* diffundieren und lösen damit astrozytäre Ca^{2+} -Wellen aus, die von hoher Wichtigkeit für die Signalweitergabe und Plastizität im zentralen Nervensystem (ZNS) sind [58, 132]. Die Inaktivierung der *gap junction*-bildenden Connexine 30 und 43 in Astrozyten führt zu einer verminderten synaptischen Transmission in CA1 Pyramidal-Neuronen. Dies verdeutlicht die Rolle des astrozytären Netzwerks als Kalium- und Glutamatpuffer während der neuronalen Aktivität [199, 130, 189]. Ein einzelner Astrozyt umschließt mit seinen Fortsätzen 4 - 6 neuronale Zellkörper und ca. 160.000 Synapsen. Dabei überlappen die Kontaktbereiche von verschiedenen Astrozyten nicht. Ein einzelner Astrozyt integriert also die Signale einer Vielzahl von Neuronen [63, 9]. Umgekehrt moduliert die Freisetzung von Gliotransmittern durch einen einzelnen Astrozyt die synaptische Aktivität einer Vielzahl von Neuronen. In Abhängigkeit des freigesetzten Gliotransmitters kann die synaptische Aktivität angeregt (Glutamat) oder inhibiert werden

(ATP) [95, 102].

Neuere Arbeiten implizieren, dass Astrozyten nicht nur an der Regulation der neuronalen Aktivität und der interstitiären Ionenkonzentration, sondern auch an der Immunabwehr des ZNS beteiligt sind. Astrozyten exprimieren *toll-like* Rezeptoren (TLR), deren Aktivierung durch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) von verschiedenen Organismen (Bakterien, Viren, Pilze, Hefen, Parasiten) zu einer Stimulation des angeborenen Immunsystems führt [31]. Des Weiteren spielen Astrozyten auch im verletzten oder degenerativen Gehirn eine große Rolle für die Reperaturmechanismen [39, 68].

1.1.1 Energiemetabolismus von Astrozyten

Astrozyten nehmen mit Hilfe des Glukosetransporter 1 (Glut1) Endothelzellen-vermittelt Glukose aus dem Blut auf [131, 187]. Diese wird zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert, sodass sie die Zelle nicht mehr verlassen kann. Astrozyten haben als einzige Zellen des ZNS die Eigenschaft nicht nur Glykolyse und vollständige Oxidation von Glukose zu betreiben, sondern auch Glykogen zu synthetisieren, zu speichern und zu metabolisieren [32, 133, 141]. Glykogen wird in vielen Geweben, wie zum Beispiel in Leber- und Muskelzellen, als Speicherstoff für Glukose synthetisiert und gelagert. Steht dem Körper nicht ausreichend Glukose zur Verfügung, wird in der Glukoneogenese aus Glykogen Glukose synthetisiert. Die Glukose kann dann entweder von der Zelle selber verstoffwechselt (Muskel), oder in das Blut exportiert (Leber) werden. Die in Astrozyten gelagerte Glykogenmenge (6-12 μmol) ist um ein Vielfaches kleiner als die in der Leber gelagerte (100-500 μmol) [41, 117]. Dies legt nahe, dass das in Astrozyten gelagerte Glykogen nur den lokalen Energieverbrauch bei hypoglykämischen Verhältnissen abpuffern kann und nicht wie in der Leber an das Blut abgegeben wird [24]. Dennoch sind die Glykogenspeicher der Astrozyten in Abwesenheit von Glukose binnen weniger Minuten verbraucht [25]. Es wird daher angenommen, dass die Glykogenspeicher der Astrozyten nicht nur bei Hypoglykämie [35], sondern auch bei einem transient erhöhten Energieverbrauch, der von der anwesenden Glukose nicht gedeckt werden kann, als Energiepuffer dienen [26, 41].

Neben der Glykogensynthese weisen Astrozyten im Vergleich zu Neuronen weitere Unterschiede im metabolischen Profil auf. Astrozyten generieren ATP aus der aeroben Glykolyse und geben Laktat in den extrazellulären Raum ab [45, 135, 18, 163]. Gleichzeitig findet in Astrozyten auch eine vollständige oxidative Phosphorylierung von Glukose statt. Im Unterschied zu Neuronen werden dem Citratzyklus jedoch Zwischenprodukte entzogen. Zum Beispiel ist die Synthese von Glutamin aus dem α -Ketoglutarat des Citratzyklus von größter Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung des astrozytären-neuronalen Glutamat-Glutamin-Zyklus [183, 127, 73]. Der astrozytäre

Stoffwechsel ist also vor allem auf Synthesen und cataplerotische Stoffwechselwege ausgelegt [72]. Neurone dagegen weisen einen aeroben mitochondrialen Stoffwechsel auf, der sie auf Hypoxie weitaus sensibler reagieren lässt als Astrozyten [59].

1.1.2 Energiemetabolismus des Gehirns

Obwohl das menschliche Gehirn nur 2 % des Körpergewichts ausmacht, konsumiert es 20 % der im Ruhezustand produzierten Energie [172]. Frühe Versuche haben gezeigt, dass der zerebrale, respiratorische Quotient, der das Verhältnis von verbrauchtem Sauerstoff zu produziertem Kohlenstoffdioxid beschreibt, etwa 1,0 beträgt. Der Quotient aus Sauerstoffverbrauch/Glukoseverbrauch liegt bei ca. 5,5 [123]. Diese Werte entsprechen den erwarteten Werten für eine vollständige Oxidation von Kohlenhydraten und führten zu der Annahme, dass Glukose die wichtigste, wenn nicht sogar einzige Energiequelle für das Gehirn darstellt [172]. Eine Ausnahme stellt die Verwendung von Laktat und Ketonkörpern im Falle der Entwicklung, des Hungerns und des Diabetes [126] dar. Glukose und Sauerstoff werden dem Gehirn durch das Blut bereitgestellt. Glukose wird von den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke aufgenommen und in das Interstitium abgegeben. Klassische Lehrbücher vermitteln, dass Astrozyten und Neurone die jeweils benötigte Menge Glukose mit Hilfe zellspezifischer Glukosetransporter (Glut1, Glut3) aufnehmen und vollständig oxidieren. Dieser klassischen Darstellung widerspricht, dass Neurone zu 90 % - 95 % zum Gesamtenergieverbrauch beitragen, während Astrozyten nur zu 5 % - 10 % beteiligt sind [11]. Entsprechend würde man erwarten, dass die Glukoseaufnahme der jeweiligen Zelltypen ähnlich verteilt ist. Tatsächlich konnte aber gezeigt werden, dass 50 % - 80 % der Glukoseaufnahme in Astrozyten stattfindet [188]. Dies führte zu der Hypothese, dass Astrozyten ein metabolisches Zwischenprodukt freisetzen, welches von Neuronen aufgenommen und oxidiert werden kann [152]. Wie bereits erwähnt (Kapitel 1.1.1), weisen Astrozyten eine erhöhte glykolytische Aktivität auf und können Laktat freisetzen. Pellerin und Magistretti zeigten 1994, dass Glukoseaufnahme und Laktatfreisetzung, in Abhängigkeit von der Na^+/K^+ -ATPase, steigt [136]. Auf dieser Beobachtung basierend entwickelten sie die Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle-Hypothese (ANLSH), welche die neuronale Aktivität an die Bereitstellung von Energie in Form von Laktat koppelt. Abbildung 1.1 stellt die ANLSH dar. Es ist wichtig zu beachten, dass diese Hypothese Glukose nicht als Energielieferanten für Neurone ausschließt, sondern lediglich Laktat als möglichen zusätzlichen Energielieferanten in Betracht zieht. Seit der Veröffentlichung der ANLSH wird diese Hypothese kontrovers diskutiert. Insbesondere die Frage nach dem Ort der Laktatsynthese und -aufnahme, sowie die Frage, in wieweit Laktat unter physiologischen Bedingungen die neuronale Aktivität aufrechterhalten kann, sind

seither Gegenstand vieler *in vivo*-, *in vitro*- und *in silico*- Untersuchungen. *In silico*-Analysen verschiedener Arbeitsgruppen, welche K_M -Werte, Transportkapazitäten und Verteilung der Glukose- und Laktattransporter, sowie die im Gehirn gemessenen Glukose- und Laktatkonzentrationen in Betracht ziehen, liefern kontroverse Ergebnisse [174, 12]. Einerseits wird die ANLSH durch die mathematische Modellierung des Laktatstoffwechsels unterstützt [12], andererseits führt ein alternatives mathematisches Modell zu der Annahme, dass Neurone die primäre Laktatquelle darstellen [174].

Basierend auf dieser mathematischen Modellierung, sowie *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wurde eine der ANLSH entgegenstehende Hypothese postuliert: die Neuronen-Astrozyten Laktatshuttle Hypothese. In diesem Modell haben Astrozyten im Vergleich zu Neuronen eine erhöhte Kapazität zur Laktataufnahme, wenn Laktat in erhöhten Mengen im Interstitium vorliegt. Laktat wird bei der verstärkten Glykolyse in aktiven Neuronen produziert und über den Monocarboxylattransporter 2 (MCT2) in das Interstitium abgegeben. Das über die Monocarboxylattransporter 4 und 1 (MCT4, MCT1) in Astrozyten aufgenommene Laktat wird über *gap junctions* im astrozytären Synzytium verteilt und schließlich an das Blut abgegeben, wo es zu einer Vasodilation führt [54, 111]. In deutlichem Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen beispielsweise die Ergebnisse von Boumezbeur et al. aus dem humanen Gehirn *in vivo* [22]. Diese Gruppe konnte mit Hilfe von C13-Laktat zeigen, dass es einen Netto-Fluss von Laktat aus dem Blut in das Gehirn gibt. Sie zeigen außerdem, dass dieses Laktat primär von Neuronen konsumiert wird. Unter Berücksichtigung der hohen Affinität der astrozytären Laktattransporter für Laktat wird vermutet, dass Astrozyten als Laktat-Shuttle zwischen Blut zu den Neuronen dienen [50]. Aktuelle Versuche an Ratten zeigen zudem erstmals *in vivo*, dass Laktat als Energiequelle für Neurone dienen kann [198]. In einer weiteren Arbeit wurde außerdem *in vivo* an Mäusen gezeigt, dass Laktat, welches von Astrozyten durch MCT4 und MCT1 freigesetzt wird und von Neuronen durch MCT2 aufgenommen wird, für die Etablierung des Langzeitgedächtnis notwendig ist [178]. Diese Arbeiten liefern erste wichtige Hinweise, dass Laktat *in vivo* eine zentrale Rolle im Gehirnstoffwechsel spielt und unterstützen die ANLSH. Dennoch wird die metabolische Interaktion zwischen Astrozyten und Neuronen intensiv diskutiert [110, 135]. In diesem Zusammenhang wird derzeit auch die Regulation des lokalen zerebralen Blutflusses während neuronaler Aktivität intensiv erforscht.

1.1.3 Einfluss von Astrozyten auf die neurovaskuläre Kopplung

Mit zunehmendem Wissen über die Interaktionen zwischen Neuronen und Astrozyten rückt auch die Interaktion zu den Mikrogefäßen des Gehirns in den Fo-

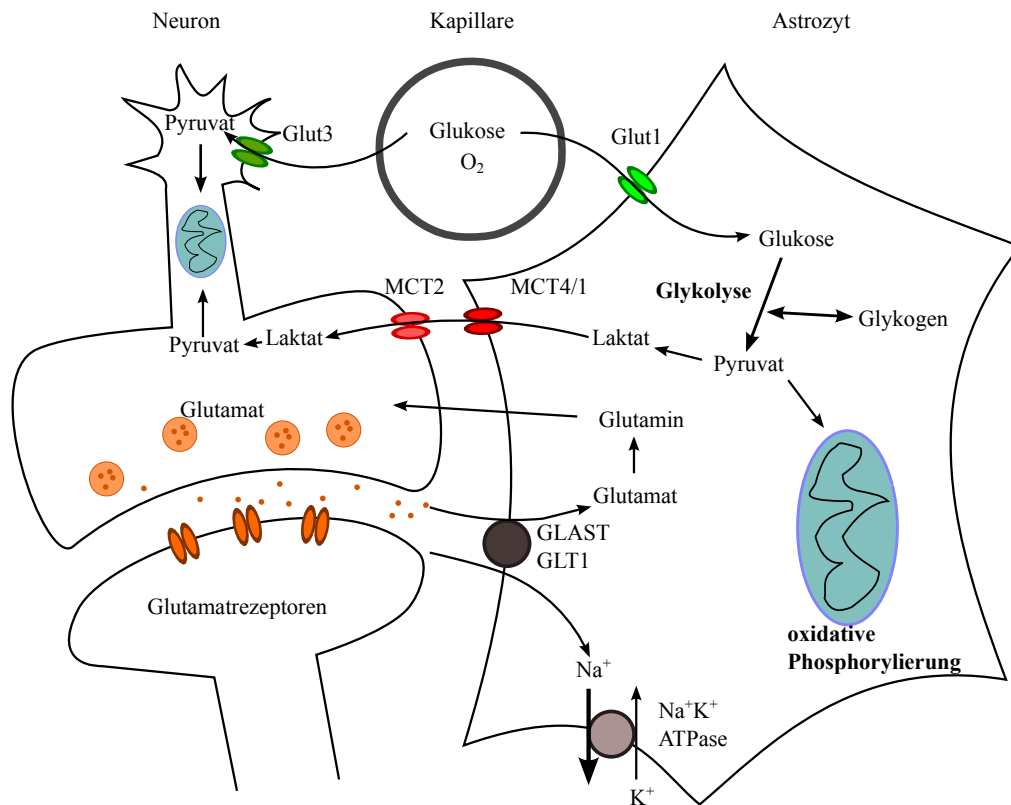


Abbildung 1.1: Darstellung der Astrozyten-Neuron-Laktat-Shuttle Theorie. Sowohl unter basalen Bedingungen, als auch während neuronaler Aktivität nehmen Astrozyten und Neurone Glukose durch den Glukosetransporter 1 (Glut1) bzw. 3 (Glut3) auf. Die Glukose kann in beiden Zelltypen oxidativ phosphoryliert werden. An der glutamatergen Synapse wird das bei Aktivität freigesetzte Glutamat durch Glutamatttransporter (GLAST, GLT) in Neurone und Astrozyten aufgenommen, um Glutamat im synaptischen Spalt zu eliminieren. Glutamat wird mit Na^+ kotransportiert, sodass auf Grund der steigenden intrazellulären Na^+ -Konzentration die Na^+K^+ ATPase aktiviert wird. Die Aktivierung der Na^+K^+ ATPase stimuliert die Glykolyse. Das während der Glykolyse gebildete Laktat wird mit Hilfe der Monocarboxylattransporter 1 und 4 (MCT1/4) von den Astrozyten in das Interstitium freigesetzt. Der neuronale Monocarboxylattransporter 2 (MCT2) nimmt Laktat auf, welches den Neuronen, die während der Aktivierung gesteigerte Energiebedürfnisse haben, als zusätzlicher Energielieferant dient. Astrozyten können als einzige Zellen im Gehirn Glukose in Form von Glykogen speichern. Wird während der neuronalen Aktivität Glukose vom Blut/Interstitium nicht ausreichend bereitgestellt, kann der Glykogenspeicher mobilisiert werden. Dies ist auch für die energieaufwendige Konvertierung des Glutamats zu Glutamin essentiell.

kus. Astrozyten, Neurone und Mikrogefäße sind in so genannten neurovaskulären Einheiten (*neurovascular units*) organisiert [78]. Des Weiteren wird vorgeschlagen, dass innerhalb der neurovaskulären Einheit eine gliavaskuläre Einheit (*gliavascular unit*) gebildet wird. Diese besteht aus einem einzelnen Astrozyt und den Neuronen und Endothelzellen der Blut-Hirnschranke, die von diesem Astrozyt umgeben sind [1]. Die Interaktion zwischen Astrozyten und den Gehirn-Endothelzellen spielt eine wichtige Rolle für die physikalischen und metabolischen Eigenschaften der Blut-Hirnschranke sowie deren Entwicklung [153, 67, 66]. Die Endothelzellen der Blut-Hirnschranke bilden mit Hilfe von komplexen *tight junctions* eine physikalische Barriere, sodass, abgesehen von Gasen und kleinen lipophilen Molekülen (< 500 Da), der molekulare Transport transzellulär stattfinden muss [195]. Im Vergleich zu peripherem Endothel weist das Endothel der Blut-Hirnschranke verminderte Endozytose/Transzytose auf. Dies betont die Eigenschaft als stringente Transport-Barriere. Makromoleküle können die Blut-Hirnschranke mit Hilfe von ATP-angetriebenen spezifischen Transportern wie dem Glut1 oder durch Rezeptor-vermittelte bzw. adsorptive Transzytose passieren. Transporter wie zum Beispiel der Glut1 arbeiten bidirektional und können an der luminalen und abluminalen Membran differentiell verteilt sein [175]. Interessanterweise ist der Glut1 an astrozytären Endfüßen, die in Kontakt zu den Endothelzellen stehen, ebenfalls hochexprimiert, sodass hier ein Glukose-Shuttle vermutet wird [104]. Es konnte gezeigt werden, dass diese hochspezifischen Eigenschaften der Endothelzellen durch den engen Kontakt zu Astrozyten induziert werden. Beispielsweise induzieren der von Astrozyten freigesetzte *transforming growth factor* β (TGF- β) und der *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) Eigenschaften des Blut-Hirnschranken-spezifischen Phänotyps in Endothelzellen [79, 103]. Umgekehrt können Endothelzellen durch die Freisetzung des *leucemia inhibitory factor* (LIF) die Differenzierung von Astrozyten induzieren [121]. Neuere Arbeiten untersuchen nicht nur den Einfluss von Endothelzellen und Astrozyten auf die gegenseitige Entwicklung, sondern auch den Einfluss von Astrozyten und (aktiven) Neuronen auf den lokalen zerebralen Blutfluss ('neurovaskuläre Kopplung'). Neuronale Aktivität steigert den lokalen Verbrauch an Sauerstoff und Glukose. Durch eine lokale Vasodilatation der Kapillaren und ein dadurch gesteigertes Angebot an Nährstoffen kann der gesteigerte Energiebedarf gedeckt werden [173, 40]. Trotz intensiver Forschung wurde eine direkte Interaktion zwischen Neuronen und lokalen Kapillaren bisher nicht nachgewiesen. Für eine Vielzahl von Substanzen, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO) oder Laktat, wurde gezeigt, dass sie den zerebralen Blutfluss lokal regulieren können. Dennoch ist die molekulare Regulation des Blutflusses durch Neurone bisher nicht belegt. Es wird daher vermutet, dass neben den Neuronen weitere Zellen an der Regulation des zerebralen lokale Blutflusses beteiligt sind. Die Lokalisation der Astrozyten zwischen Neuronen und Kapillaren führte zu

der Hypothese, dass Astrozyten eine metabolische 'Brücke' zwischen neuronaler Aktivität und zerebralem Blutfluss darstellen [202, 201, 57]. Eine wichtige Rolle könnte dabei die ANLSH spielen. Wie unter Kapitel 1.1.2 erläutert führt die Aufnahme von Glutamat in Astrozyten zu einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Es wird vermutet, dass Astrozyten in Abhängigkeit von Ca^{2+} Signalmoleküle freisetzen, die zu einer Vasodilatation führen [180]. Inhibitoren der Cyclooxygenase (COX), die Prostaglandine synthetisiert, hemmen die Vasodilatation als Antwort auf neuronale Aktivität. Daher werden derzeit Prostaglandine, besonders PGE2, in diesem Zusammenhang untersucht [202, 17]. Trotz der in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse, sind die molekularen Abläufe der Interaktion zwischen (aktiven) Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen (bzw. Kapillaren) noch nicht vollständig aufgeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Die Frage nach der molekularen Regulation des Energieflusses zum Gehirn und innerhalb des Gehirns ist nicht nur für die Gedächtnisbildung und die Funktionalität des Gehirns relevant, sondern spielt auch eine Rolle für neurodegenerative Erkrankungen und bei Ischämien [101]. Des Weiteren könnte die Regulation des Gehirnergiehaushalts auch eine Auswirkung auf die Regulation des Energiehaushalts des Gesamtorganismus haben [140].

1.1.4 Spielt der Gehirnmotabolismus eine Rolle für die Entstehung von Adipositas?

Trotz der Tatsache, dass Übergewicht und die damit verbundenen sekundären Erkrankungen wie beispielsweise Diabetes Typ 2 ein immer größeres gesellschaftsökonomischen Problem darstellen, ist die Behandlung von Adipositas bislang oft nicht erfolgreich [122, 3, 30]. Neben einer gezielten Verhaltenstherapie (Einhalten einer Diät, Steigerung der körperlichen Aktivität) spielt die medikamentöse Behandlung eine immer größer werdende Rolle. Um neue Behandlungsstrategien entwickeln zu können, werden derzeit die genetischen und molekularen Ursachen für Adipositas und deren Folgeerkrankungen intensiv untersucht [145, 90].

Einen neuen Ansatz in der Adipositas-Forschung liefert die *Selfish Brain*-Theorie. Nach der *Selfish Brain*-Theorie liegt die Ursache für die Entstehung von Adipositas in einer Störung der zerebralen Energieversorgung [140]. Im Rahmen dieser Theorie könnte eine Unterversorgung von Neuronen mit Energie, z.B. durch einen defekten Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle, zu einer gesteigerten Energieaufnahme führen. Dies könnte eine Zunahme des Körpergewichtes und möglicherweise Diabetes Typ 2 verursachen, da auf Grund des Defektes in der Energielieferkette die zusätzlich aufgenommene Energie vom Gehirn nicht registriert wird [138]. Die Energieversorgung von Neuronen ist demnach nicht nur entscheidend für die Gedächtniskonsoli-

dierung [118, 96], sondern spielt auch eine Rolle für den Energiemetabolismus des Gesamtorganismus. Obwohl es Hinweise auf die in der Theorie vorgestellte Mechanismen gibt [138], ist die *Selfish Brain*-Theorie derzeit nicht bestätigt.

Die Aufklärung der molekulare Regulation der Glykolyse in Astrozyten, die für die Versorgung der Neurone mit Energie entscheidend sein könnte, ist für weitere Untersuchungen zur ANLSH und der *Selfish Brain*-Theorie von großer Wichtigkeit. Ein Faktor, der für die Regulation der Glykolyse in Zellen bekannt ist, ist der Hypoxie-induzierbare Faktor 1α (HIF- 1α) [34, 193].

1.2 HIF- 1α und HIF-Zielgene

E. Newton Harvey postulierte 1928, dass der Sauerstoff-Partialdruck, in dem Zellen einer Sphäre überleben, eine quadratische Funktion des Radius des Gewebes ist: $F = V \times r^2 / 6K$ (F = Sauerstoff-Partialdruck an der Oberfläche, V = Sauerstoff-Verbrauch des Gewebes, K = Diffusionskonstante) [65]. Physiologisch bedeutet dies, dass das Absterben von Zellen mit Zunahme der Distanz zu einer Sauerstoff-Quelle zunimmt. Daher ist es für das Überleben von Zellen wichtig, dass diese sich einer chronisch oder latent hypoxischen Umgebung anpassen zu können. Eine Adaptation an Hypoxie beinhaltet eine Umstellung des Metabolismus von aerober zu anaerober Glykolyse, eine Erhöhung der Sauerstoff-Transportkapazität des Blutes und Neovaskularisierung durch die Expression angiogener Faktoren [164]. Diese Adaptationen ermöglichen das Expandieren von Gewebe in Regionen, welche die lokale Vaskularisierung überschreiten. Dies spielt beispielsweise in der Entwicklung eine wichtige Rolle. Andererseits führen Fehlregulationen dieser Mechanismen auch zur Vaskularisierung von malignen Tumoren, was ein essentieller Schritt bei der Entstehung eines invasiven, metastasierenden Tumors ist [167]. Hauptregulatoren der zellulären Adaptation an Hypoxie sind die ubiquitär exprimierten Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF).

1.2.1 Struktur und Regulation von HIF

HIF-1 wurde durch seine Bindung an das *hypoxia response element* (HRE) im Promoter des Gens für Erythropoetin (EPO) identifiziert. EPO ist ein Hormon, das Hypoxie-induziert transkribiert wird und die Erythrozyten-Proliferation stimuliert [170]. Weitere Studien haben gezeigt, dass HIF ein heterodimerer Transkriptionsfaktor ist, der sich aus einer HIF- α Untereinheit und HIF- 1β zusammensetzt. HIF- 1β war bereits zuvor als *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) bekannt [190]. HIFs gehören in die Superfamilie der basischen Helix-Loop-Helix PAS-Proteine, die nach den zuerst identifizierten Proteinen Per, ARNT und Sim benannt

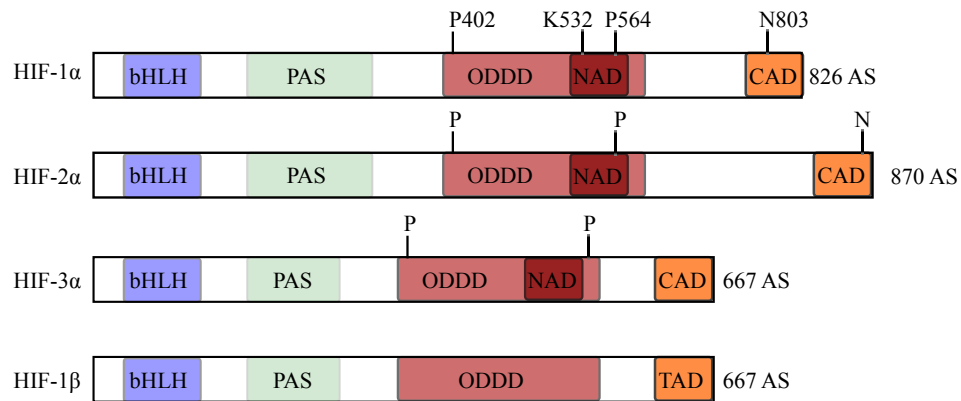


Abbildung 1.2: Domänen-Struktur von HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) und HIF-1 β . Die HIFs gehören zu der Familie der PAS und bHLH Transkriptionsfaktoren. Die Hydroxylierung von zwei Prolinresten und die Acetylierung eines Lysins innerhalb der ODDD reguliert die sauerstoffabhängige Stabilisierung von HIF- α . HIF-1 α und HIF-2 α besitzen zwei Transaktivierungsdomänen (CAD und NAD), während HIF-1 β nur eine TAD besitzt. Aus [89]

ist (Abbildung 1.2). Die PAS-Domäne und das bHLH-Motiv vermitteln die Dimerisierung von HIF- α und HIF-1 β . Das bHLH-Motiv ist außerdem essentiell für die Bindung von HIF an die HRE-Sequenz der Zielgene. Derzeit sind drei HIF-Isoformen der α -Klasse bekannt: HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α . Während HIF-1 α ubiquitär exprimiert wird, konnte HIF-2 α vor allem in der Lunge und im Endothel nachgewiesen werden [47, 182]. Die mögliche Rolle von HIF-3 α als negativer Regulator von HIF-1 α wird derzeit diskutiert [109]. Neben dem bHLH- und dem PAS-Motiv besitzen HIF-1 α und HIF-2 α eine C-terminale und eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (CAD, NAD). Diese sind für die Rekrutierung der Transkriptions-Coaktivatoren CBP/p300 und SRC-1 verantwortlich [8]. HIF-1 α und HIF-1 β werden konstitutiv transkribiert und translatiert. HIF-1 β transloziert in den Nukleus und wird nicht durch Sauerstoff reguliert. Im Gegensatz dazu weist HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen eine Halbwertszeit von $t_{1/2} < 5$ min auf und kann in normoxischen Zellen nicht nachgewiesen werden [190]. Bei Hypoxie wird HIF-1 α stabilisiert und transloziert vom Cytoplasma in den Zellkern, wo es mit HIF-1 β dimerisiert (Abbildung 1.3). Die Cofaktoren für die Transkription werden rekrutiert und HIF-1 bindet an die HREs der Zielgene um die Transkription zu induzieren. Die Stabilisierung und die darauf folgende transaktivierende Funktion von HIF- α wird durch post-translationale Modifikationen, wie Hydroxylierung, Ubiquitinierung, Acetylierung und Phosphorylierung streng reguliert. Diese Modifikationen sind über verschiedene Domänen verteilt. Neusynthetisiertes HIF- α wird von Prolylhydroxylasen (PHD) in Abhängigkeit von 2-Oxoglutarat (2-OG), Sauerstoff, Fe^{2+} und Ascorbin-

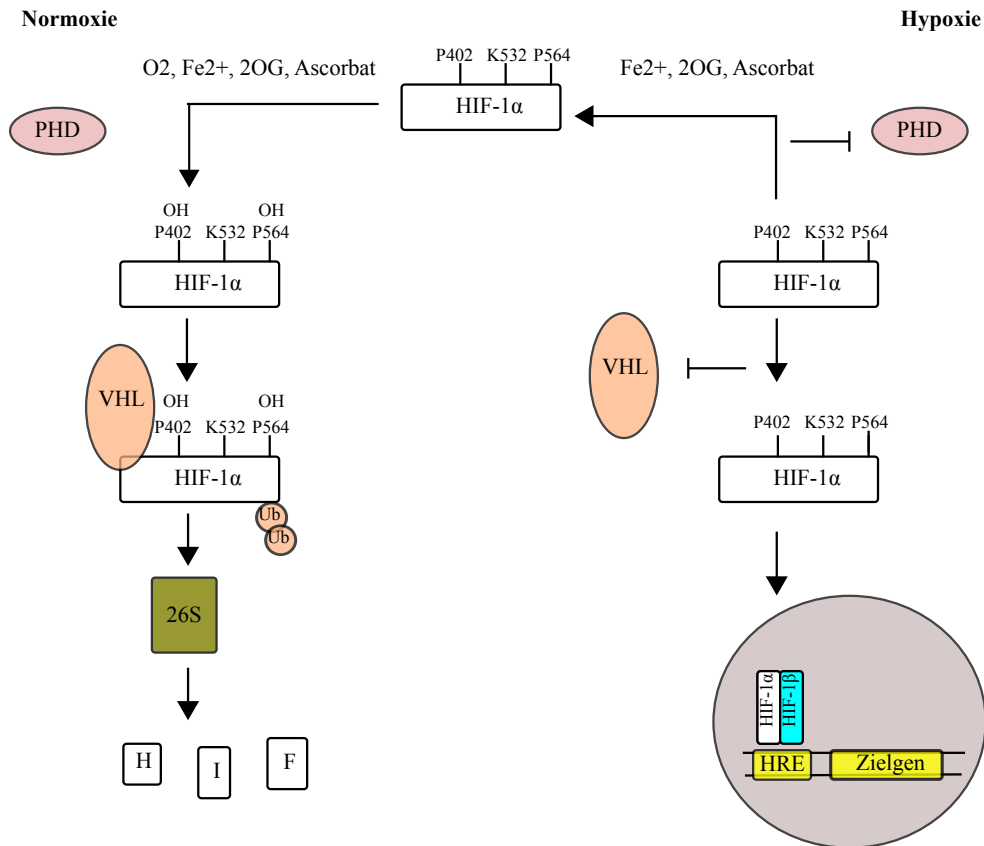


Abbildung 1.3: Sauerstoffabhängige Regulation von HIF-1 α . Wenn Sauerstoff vorhanden ist, hydroxylieren Prolylhydroxylasen (PHD) die Prolinreste 402 und 564 von HIF-1 α . Cofaktoren für diese Reaktion sind Eisenionen (Fe^{2+}), 2-Oxoglutarat (2-OG) und Ascorbat. Die Hydroxylierung der Proline führt zu einer Bindung des von-Hippel-Lindau Proteins (pVHL), einer E3-Ubiquitinligase. Die Markierung von HIF-1 α mit Ubiquitin (Ub) induziert den Abbau durch das 26S Proteasom (26S). Ist kein Sauerstoff verfügbar, kann keine Prolin-Hydroxylierung stattfinden und HIF-1 α wird nicht proteolytisch degradiert (nach [89]).

säure an Prolin 402 und Prolin 530 hydroxyliert [161]. Die absolute Notwendigkeit von Sauerstoff für diese Hydroxylierung legt die Vermutung nahe, dass die PHDs die eigentlichen Sauerstoff-Sensoren der Zellen sind. Die durch PHDs hydroxylierten Prolinreste befinden sich in der *oxygen dependent degradation domain* (ODDD). Die Hydroxylierung markiert HIF- α für die Bindung an das von-Hippel-Lindau Protein (pVHL). Dieser Multiprotein E3 Komplex polyubiquitiniert HIF-1 α und induziert damit die Degradation von HIF-1 α durch das 26S Proteasom [85]. Die Stabilisierung von HIF-1 α wird außerdem Sauerstoff-unabhängig durch die Acetylierung von Lysin 532 reguliert. Die Acetylierung von Lysin 532 führt zu einer verstärkten Bindung zwischen pVHL und HIF-1 α , was gesteigerte Destabilisierung bewirkt [83]. Die transkriptionelle Aktivität von HIF- α wird durch die Modifikationen in der NAD und der CAD reguliert. Die Asparaginyl Hydroxylase *factor inhibiting HIF-1* (FIH-1), die ebenso wie die PHDs Fe²⁺, Sauerstoff und 2-OG abhängig ist, hydroxyliert Asparagin 803, das in der CAD lokalisiert ist. Als Folge dessen kann der transkriptionelle Coaktivator CBP/p300 nicht rekrutiert werden [99]. Ein weiterer Mechanismus für die Regulation der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 ist die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalkaskade-vermittelte Phosphorylierung von Threonin 796. Diese führt zu einer verminderten Dimerisierung mit HIF-1 β [62].

1.2.2 HIF-1 Zielgene

Bis heute wurden mehr als 100 HIF-1 Zielgene charakterisiert, die gewebespezifisch reguliert werden und die Adaptation der Zellen bzw. des Organismus an Hypoxie steuern [116]. HIF-1 aktiviert die Transkription dieser Gene durch die Bindung an HREs, die im *enhancer* und Promoter der Zielgene lokalisiert sind. HIF-1 bindet direkt an die Konsensussequenz (A/G)CGTG, während weitere Transkriptionsfaktoren an die invertierte Wiederholung der Sequenz rekrutiert werden [93].

HIF-1 Zielgene sind unter anderem beteiligt an der Erythropoese, dem Eisenstoffwechsel, der Angiogenese, der Zellproliferation und dem Zellüberleben, der Apoptose und dem extrazellulären Matrix-Metabolismus (siehe Tabelle 1.1). HIF-1-vermittelte Signalwege sind daher für die Entwicklung und Physiologie essentiell. Entsprechend kann HIF-1 bei Krankheiten, wie zum Beispiel der Ischämie, protektiv wirken. Dagegen ist eine gestörte HIF-1-Regulation an der Entstehung von Krankheiten wie Krebs essentiell beteiligt [168].

In der vorliegenden Arbeit steht die Regulation der Glykolyse durch HIF-1 im Vordergrund. Unter hypoxischen Bedingungen wird der Glukosemetabolismus vom Sauerstoff-abhängigen Citratzyklus auf die Sauerstoff-unabhängige Glykolyse umgestellt. Da während der Glykolyse nur 2 ATP produziert werden, und keine 38 ATP wie während des Citratzyklus, wird die ATP-Produktion hypoxischer Zellen

durch eine erhöhte Glukoseaufnahme bestimmt. HIF-1 induziert die Genexpression vieler glykolytischer Enzyme, sowie von Glut1 und Glut3 [34, 193]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch der MCT4 durch HIF-1 reguliert wird. MCT4 ist für den Transport von Laktat oder Pyruvat, welche bei der Glykolyse entstehen, verantwortlich [185, 43].

Tabelle 1.1: Auswahl an HIF-1 α Zielgene (nach [89]).

Funktion	Zielgen	Referenz
Erythropoese	Erythropoetin	[170]
	Transferrin	[150]
Angiogenese	<i>Vascular endotheliale growth factor</i> (VEGF)	[106]
	<i>transforming growth factor-β3</i> (TGF- β 3)	[160]
Gefäße	Stickstoffmonoxid Synthase 2 (NOS2)	[119]
	Endothelin 1 (ET1)	[76]
Matrix-Metabolismus	Matrix Metalloproteasen (MMPs)	[15]
	Collagen Prolylhydroxylase	[179]
Glukose Metabolismus	Aldolase-A,C	[169]
	Carboanhydrase-9	[197]
	Enolase-1	[169]
	Glukose Transporter-1,3	[34]
	Hexokinase 1,2	[115]
	Laktatdehydrogenase-A	[169]
	Pyruvatkinase M	[169]
	Phosphofruktokinase L	[169]
	Phosphoglyceratkinase 1	[169]
Zellproliferation	Insulin-like growth factor-2	[49]
	Transforming growth factor- α	[98]
Apoptose	Nip3-like protein X	[27]

1.2.3 Sauerstoff-unabhängige Regulation von HIF-1 α

HIF-1 α kann nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch eine Reihe verschiedener Substanzen unter normoxischen Bedingungen stabilisiert werden. Eisenchelatoren wie Deferoxamine (DFO) inhibieren die Aktivität der PHDs und führen so auch unter Normoxie zu einer HIF-1 α -Stabilisierung [191]. Neben diesen Chemika-

lien werden zunehmend auch physiologische Substanzen identifiziert, welche HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen regulieren. Proinflammatorische Cytokine wie TNF- α , Interleukin-1 β und Interleukin-18 können zu einer Stabilisierung von HIF-1 α führen [70, 92, 186]. Diese HIF-1 α -Aktivierung ist Transkriptions-abhängig, wie die Behandlung der Zellen mit Actinomycin D, einem Inhibitor der Transkription, zeigt. Zunehmend wird auch eine Aktivierung von HIF-1 α durch TLR-vermittelte Signalwege diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass Lipopolysaccharide (LPS) unter normoxischen Bedingungen HIF-1 α über den TLR4/myD88/NF- κ B-Signalweg in Makrophagen aktiviert. Im Vergleich zur HIF-1 α -Stabilisierung unter Hypoxie weist die LPS-induzierte Stabilisierung eine verzögerte und verlängerte Kinetik auf [21], was auf einen alternativen Regulationsmechanismus schließen lässt. Die LPS-induzierte, aber auch die TNF- α -induzierte HIF-1 α -Stabilisierung wird sowohl transkriptionell, als auch translational in Abhängigkeit von der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) reguliert [21, 186]. Neuere Studien weisen auf eine posttranskriptionelle Regulation von HIF-1 α , welche durch microRNAs vermittelt wird, hin. Beispielsweise reduziert der Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) die microRNA miR-519c. miR-519c bindet an die 3'-UTR von HIF-1 α und verhindert somit die Translation. Die HGF-vermittelte Reduktion von miR-519c führt zu einem gesteigerten HIF-1 α -Proteinniveau [33]. Auch Hormone wie Angiotensin II, können zellspezifisch zu einer HIF-1 α -Stabilisierung führen [148]. Die Stabilisierung wird dabei durch *reactive oxygen species* (ROS), welche von Mitochondrien und der NADPH-Oxidase synthetisiert werden, vermittelt. ROS/H₂O₂ inhibiert einerseits die PHD-abhängige Prolinhydroxylierung [128], andererseits wird die Translation von HIF-1 α PI3K/p70S6 Kinase-vermittelt gesteigert [100].

Physiologische Relevanz könnte auch die Stabilisierung von HIF-1 α durch Kohlenstoffmonoxid (CO) und NO haben. Sowohl NO, als auch CO können unter normoxischen Bedingungen HIF-1 α über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg und Inhibition der PHDs stabilisieren [36, 87]. Dagegen führen CO und NO unter hypoxischen Bedingungen zu einer Destabilisierung von HIF-1 α [77]. Die genauen molekularen Mechanismen dieser paradoxen Regulation von HIF-1 α durch NO und CO sind nicht aufgeklärt. Die hier aufgeführten Beispiele für eine normoxische HIF-1 α -Stabilisierung zeigen, dass HIF-1 α , neben der Adaptation an Sauerstoffmangel, auch unter Normoxie in die Regulation zellspezifischer Funktionen involviert sein kann.

1.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Furchgott und Zawadzki zeigten 1980, dass Endothelzellen eine wesentliche Rolle bei der Gefäßdilataion spielen [53]. Im folgenden wurde eine kontinuierlich freige-

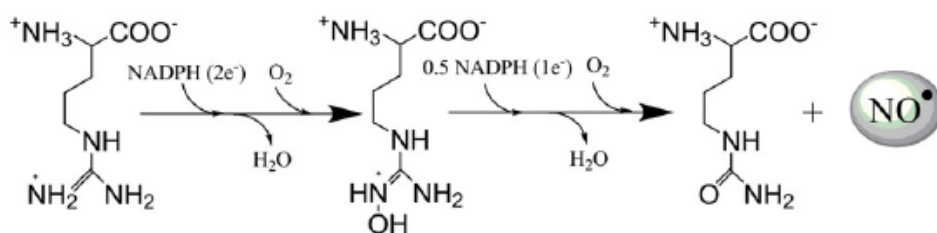
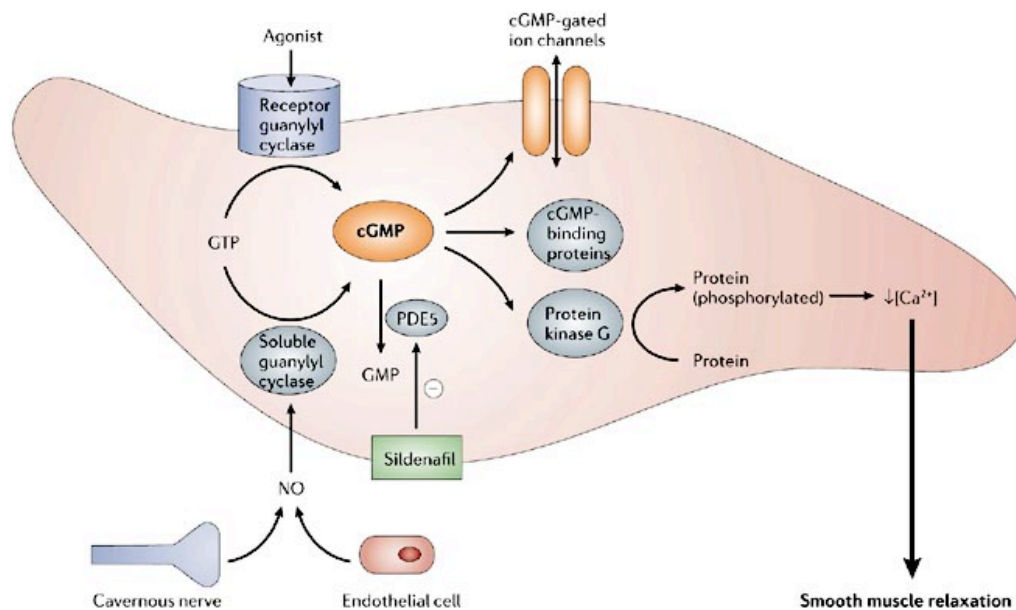


Abbildung 1.4: Die katalytischen Schritte der NO-Synthese. Im ersten Schritt wird L-Arginin unter Verbrauch eines Sauerstoffmoleküls und eines Elektrons (0,5 NADPH) zu N ω -hydroxylarginin (NOHA) hydroxyliert. Anschließend wird NOHA zu Citrullin oxidiert, wobei ein weiteres Sauerstoffmolekül sowie ein Elektron (0,5 NADPH) verbraucht wird. Es entstehen außerdem NO und 2 Moleküle H₂O. Aus [158].

setzte Substanz entdeckt, welche die Endothel-abhängige Gefäßerweiterung vermittelt. Zunächst erhielt diese Substanz den Namen *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF), wurde jedoch 1987 als NO identifiziert [80]. NO ist ein gasförmiges, labiles Radikal, das mit einer Halbwertszeit von etwa 2-3 Sekunden in biologischen Systemen etwa 200 μm frei diffundieren kann [64]. NO entsteht bei der katalytischen Umsetzung von L-Arginin zu NO, Citrullin und Wasser durch NO-Synthasen (NOS) (Abbildung 1.4). Seit seiner Entdeckung als ein den Blutfluss regulierendes Signalmolekül im kardiovaskulären System, wurden viele weitere Funktionen bekannt. Im ZNS dient NO als Transmitter, der lang- und kurzzeitige Änderungen der Synapsenfunktion vermittelt [4, 75]. NO spielt außerdem eine Rolle als nicht-cholinerg und nicht-adrenerger Transmitter im peripheren Nervensystem, wie im Verdauungs- und Urogenitaltrakt. Auch von Makrophagen oder Mikroglia im ZNS kann NO synthetisiert werden, wobei es in diesem Fall für die Immunabwehr entscheidend ist [69]. Für diese Arbeit ist die Rolle von NO als Modulator des Energiestoffwechsels einzelner Zellen von besonderer Bedeutung. Almeida et al. zeigten, dass NO in Astrozyten, aber nicht in Neuronen zu einer gesteigerten glykolytischen Aktivität führt [7].

Die NO-Synthese wird von 3 differentiell exprimierten NO-Synthasen katalysiert. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) wird konstitutiv im vaskulären Endothel des Gehirns und der Peripherie exprimiert und weist eine Calcium/Calmodulin-abhängige Aktivität auf [176, 165, 51]. Die Aktivität der im ZNS vorhandenen NO-Synthase (nNOS) ist ebenfalls Calcium/Calmodulin-abhängig [200]. Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten eNOS und nNOS wird die induzierbare NO-Synthase (iNOS) durch Induktion der Transkription reguliert. Die iNOS ist Ca^{2+} unabhängig. Sie wird von Gliazellen und Makrophagen exprimiert [94].

Die lösliche Guanylatcyclase (sGC) ist derzeit der einzig bekannte Rezeptor für NO [142]. Die sGC ist ein Heterodimer bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die für die NO-Bindung verantwortliche prosthetische Häm-Gruppe ist in der β -



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Abbildung 1.5: Der cGMP Signalweg. cGMP wird nach der Bindung von NO an die sGC freigesetzt. Anschließend aktiviert cGMP die Proteinkinase G, die wiederum eine Vielzahl zellulärer Signalwege steuert. cGMP kann auch direkt an Ionenkanäle binden und dadurch die Kanäle öffnen (nach [56]).

Untereinheit lokalisiert. Die Bindung von NO und dem Substrat GTP an die sGC führt zu einer Konformationsänderung in der katalytischen Domäne [192], die sich aus beiden Untereinheiten zusammensetzt. Als Folge dieser Konformationsänderung wird die Aktivität der katalytischen Domäne erhöht und cGMP und Pyrophosphat werden freigesetzt.

cGMP dient als *second Messenger*, der einerseits indirekt über die Aktivierung der Proteinkinase G und andererseits durch die direkte Bindung an Kationenkanäle eine Vielzahl zellulärer Signalwege aktivieren kann (Abbildung 1.5). Neben der Aktivierung der sGC kann NO auch durch seine chemische Reaktivität gegenüber vielen Molekülen biologische Prozesse steuern. Beispielsweise ist die Inhibition viraler (HIV) und parasitärer (*Leishmania infantum*) Proteasen durch die NO-abhängige S-Nitrosylierung von Cysteinen für die mikrobielle Abwehr von großer Bedeutung [137, 157].

1.4 Die Maus als Modellorganismus

Die Maus hat in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung als Tiermodell in der Forschung gewonnen. Dank des *Mouse Genome Sequencing Consortiums* ist die Maus neben dem Menschen das genetisch am besten charakterisierte Säugetier [38]. Die Sequenzierung des Mausgenoms hat gezeigt, dass das Genom der Maus, ähnlich dem Genom des Menschen, 27000 bis 30500 Gene umfasst. 99 % der dabei identifizierten Gene der Maus finden ein Pendant im menschlichen Genom, das zu 96 % sogar in ähnlicher Umgebung lokalisiert ist. Da die Maus nicht nur genetisch, sondern auch in ihrer Entwicklung und ihrem Metabolismus dem Menschen ähnelt, lassen sich an ihr sowohl physiologische als auch pathologische Vorgänge gut untersuchen. Die Möglichkeiten zur Manipulation des Mausgenoms haben sich in den letzten Jahrzehnten enorm gesteigert und vereinfacht, sodass derzeit eine große Anzahl an mutierten Mausstämmen existiert. Die mit 21 Tagen relativ kurze Generationsfolge, die geringe Größe und die Anspruchslosigkeit in der Haltung ermöglichen ein effizientes Arbeiten in gut kalkulierbaren Zeiträumen.

1.4.1 Das Cre-LoxP System

Um Genfunktionen *in vivo* untersuchen zu können wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Einerseits können z.B. durch Pronukleusinjektion von Transgen-DNA, die ungerichtet in das Genom integriert wird, transgene Tiere erzeugt werden [61]. Andererseits können in embryonalen Stammzellen gerichtet Gene entfernt (*knock-out*) oder Reportergene eingefügt werden (*knock-in*). Bei einem klassischen *knock-out* ist jede Körperzelle von dem Fehlen des entfernten Proteins betroffen, sodass nur eine Aussage über die Relevanz des Proteins für den Gesamtorganismus möglich ist. Zusätzlich ist die Sterblichkeit solcher klassischen *knock-out*-Tiere relativ hoch [97]. Daher wurde eine Möglichkeit entwickelt einen gezielten *knock-out* in selektiven Körperzellen zu generieren. Für den sog. konditionellen *knock-out* eines Proteins hat sich das Cre-LoxP-System durchgesetzt [159]. Das Cre-LoxP-System besteht aus zwei Komponenten: der Cre-Rekombinase, die aus dem Bakteriophagen P1 isoliert wurde, und den LoxP-Sequenzen. Wenn zwei homologe LoxP-Erkennungssequenzen einen DNA-Abschnitt flankieren, kann die Cre-Rekombinase an diese LoxP-Sequenzen binden und eine konservative Rekombination des flankierten DNA-Abschnitts katalysieren. Bei dieser Rekombination wird der flankierte DNA-Abschnitt deletiert und es bleibt eine LoxP-Erkennungssequenz erhalten, die sich aus den beiden initialen LoxP-Sequenzen zusammensetzt. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass die Cre-Rekombinase keine weiteren Cofaktoren benötigt. Die Rekombination ist dadurch unabhängig vom Organismus in dem sie stattfindet [2].

Um im Tiermodell einen zellspezifischen Cre-LoxP-vermittelten *knock-out* zu erzeugen, werden zwei Mauslinien generiert. In eine Linie wird ein Transgen eingebracht, welches für die Cre-Rekombinase codiert. Um hierbei eine zellspezifische Expression der Cre-Rekombinase zu gewährleisten, wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines zellspezifischen Promotors exprimiert. In der zweiten Linie wird ein Gen oder ein Teil eines Gens mit LoxP-Sequenzen flankiert (ein solches Gen wird als ‘gefloxt’ bezeichnet). Die LoxP-Sequenzen sollten dabei nicht mit der normalen Expression des Gens interferieren. Diese beiden Mauslinien werden gekreuzt, wodurch doppeltransgene Nachkommen entstehen. Ziel weiterer Verpaarungen sind Mäuse, die homozygot für das mit den LoxP-Sequenzen flankierte Gen sind und das Transgen für die Cre-Rekombinase enthalten. In diesen Mäusen findet in den Zellen, welche die Cre-Rekombinase exprimieren, der Cre-vermittelte *knock-out* des LoxP-Sequenzen flankierten Gens statt, während in allen anderen Körperzellen das Zielgen unverändert exprimiert werden kann.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Astrozyten weisen im Vergleich zu Neuronen eine erhöhte glykolytische Aktivität auf [18, 108]. Dies ist für die Regulation des zerebralen Glukosemetabolismus von großer Bedeutung. In der Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle Hypothese (ANLSH) setzten Astrozyten in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität in der Glykolyse synthetisiertes Laktat frei, welches dann von Neuronen als zusätzlicher Energielieferant aufgenommen und verstoffwechselt wird [136]. In dieser Arbeit sollte der molekulare Hintergrund des glykolytischen Profils der Astrozyten untersucht werden. Eine vergleichende Genexpressionsanalyse von primär-kultivierten murinen kortikalen Astrozyten und Neuronen mit Hilfe von qRT-PCR sollte Aufschluss über eine mögliche differentielle Expression glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter liefern bzw. bestätigen. Ausgehend von dem Ergebnis sollte die molekulare Regulation der Expression glykolytischer Enzyme in Astrozyten untersucht werden. Da der Transkriptionsfaktor HIF-1 α als Regulator für glykolytische Enzyme und Glukose-/Laktattransporter bekannt ist, sollte die Hypothese untersucht werden, dass HIF-1 α auch in Astrozyten unter Normoxie an der Regulation der Expression glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransportern beteiligt ist. Zunächst sollte die Stabilisierung und die Lokalisation von HIF-1 α in Gehirn normoxischer Mäuse bestätigt werden. Ein Stabilisator von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen ist NO, welches im Gehirn von verschiedenen Zelltypen synthetisiert wird [23]. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob NO unter normoxischen Bedingungen in Astrozyten zu einer Stabilisierung von HIF-1 α und einer HIF-1 α -

abhängigen Regulation der mRNA-Expression glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter führt. Im weiteren sollte die Hypothese untersucht werden, dass NO aus astrozytenumgebenden Zelltypen, wie Astrozyten, Neurone oder Endothelzellen, an der Stabilisierung von HIF-1 α in Astrozyten beteiligt sein können. Diese Arbeit sollte zu einer Aufklärung der molekularen Mechanismen des Glukosestoffwechsels in Astrozyten führen.

Im Rahmen der *Selfish Brain*-Theorie wird vermutet, dass eine Unterbrechung der Energieversorgung von Neuronen zu einer gesteigerten Energieaufnahme des Individuums führt. Auf Grund der Hypothese, dass HIF-1 α eine Rolle für die Glykolyse in Astrozyten und damit für die Energieversorgung von Neuronen spielt, sollte eine Astrozyten-spezifische HIF-1 α *knock-out*-Mauslinie generiert werden. Mit dieser Mauslinie sollte anhand von Fütterungsversuchen die Rolle des astrozytären HIF-1 α für die Gewichtsentwicklung der Mäuse *in vivo* untersucht werden.

Material und Methoden

2.1 Hersteller

Im Folgenden sind die Firmensitze der Lieferanten aufgeführt und werden im weiteren Verlauf nicht mehr angegeben, um Mehrfachnennungen zu vermeiden:

abcam (Cambridge, UK), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Applied Biosystems (Freiburg, Deutschland), B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Biochrom AG (Berlin), Biometra (Göttingen, Deutschland), Biorad (München, Deutschland), Biosciences (St. Louis, MO, USA), BMG Labtech (Cary, NY, USA), Brand (Wertheim, Deutschland), Brandt (Ludwigshafen, Deutschland), Calbiochem (Darmstadt, Deutschland), Cayman Chemicals (Tallin, Estland), Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), Dägerwerke (Lübeck, Deutschland), Enzo Lifesciences (Lausanne, Schweiz), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Fluka (Buchs, Deutschland), GE Healthcare (München, Deutschland), Gibco (Karlsruhe, Deutschland), Gilson (Bad Camberg, Deutschland), Greiner (Frickenhäusen, Deutschland), Heidolph (Schwabach, Deutschland), Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland), Hettich (Tuttlingen, Deutschland), Hoefer (San Francisco, CA, USA), IKA (Staufen, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Jackson Laboratory (Göttingen), Leica (Wetzlar, Deutschland), Lonza (Verviers, Belgien), Merck (Darmstadt, Deutschland), Millipore (Schwalbach, Deutschland), PAA (Pasching, Österreich), Peqlab (Erlangen, Deutschland), Perkin-Elmer (Boston, MA, USA), Phase (Lübeck, Deutschland), Pierce (Rockford, IL, USA), Promega (Mannheim, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Riboxx (Radebeul, Deutschland), Roche (Basel, Schweiz), Research Diets (New Brunswick, USA), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Sartorius (Göttingen, Deutschland), Schott (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Stratagene (Santa Clara, Kanada), Thermo Labsystems (Helsinki, Finnland), Werner Hassa GmbH (Lübeck, Deutschland), Whatman (Dassel,

Deutschland), Zeiss (Jena, Deutschland), zell-kontakt (Nörten-Hardenberg, Deutschland).

2.2 Geräte

Name	Hersteller
6100 Nucleic Acid Prepstation	Applied Biosystems
ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Ascensia Elite XL	Bayer
CO ₂ Water Jacketed Inkubator	Forma Scientific
D21002 Pumpe	Drägerwerke
Dispergiergerät Ultra-Turrax	IKA
Elektroporationsapparatur Gene Amp II	Biorad
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop DMI 6000B	Leica
Platereader FluoStar OPTIMA	BMG Labtec
Geldokumentationsanlage für Agarosegele CellCam	Phase
Geldokumentationsanlage für Western Blot	BioRad
Gelkammer für Polyacrylamid-Gele (10 cm × 10,5 cm)	Invitrogen
Gelkammer für Agarose-Gele	BioRad
Glashomogenisator	Sigma
Mikroskop TCS S5P	Leica
Mikrowelle M817	Cortina
Netzgerät PowerEase 500	Invitrogen
Netzgerät Power Pac 300	BioRad
PCR-Block T-Gradient	Biometra
PCR-Block T-3	Biometra
Phenomaster	TSE
pH-Meter Lab 850	Schott
Pipettierhilfe Pipetman	Eppendorf
Reinstwassersystem Millipore	Millipore System
Schüttelinkubator 303	GFL
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus Instruments
Spektrometer SmartSpec 3000	BioRad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vakuum-Pumpe	Werner Hassa GmbH
Vortexer REAX TOP	Heidolph

Waage SBA 41	ScalTec
Wasserbad W22	Sörk-Tronik
Wipper WT 17	Biometra
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Universal 320	Hettich

2.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten, sofern es nicht anders angegeben ist, den Reinheitsgrad *pro analysi*.

Name	Hersteller
1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4, 3-a]quinoxalin-1-one (ODQ)	Sigma
Agarose	Cambrex
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumacetat	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1)	Roth
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck
50 x Denhards Solution	Sigma
50 % Dextransulfat	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (EtBr)	Gibco
EDTA	Sigma
Formamid	Sigma
Glyzerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Harnstoff	Roth
Hoechst 33342 Farbstoff	Invitrogen
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Lipofectamine 2000	Invitrogen
LY294002 (LY)	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma

Methanol	Roth
Milchpulver	Fluka
Natriumacetat (CH_3COONa)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Paraformaldehyd	Fluka
PD98059 (PS)	Sigma
Pentobarbital	Sigma
Rapamycin (Rap)	Sigma
Salzsäure (HCl)	Merck
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tris pH 7,5	Sigma
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Trypanblau	Invitrogen
α , α , α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris)	Merck

2.4 Gebrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Blottpapier GB003 (3 mm)	Whatman
Einmalinjektionskanülen (21G),(23 G), (25 G)	B. Braun Melsungen AG
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner
Einmalreaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Einmalröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner
Einmalspitzen (10 μl , 200 μl , 1000 μl)	Sarstedt
Einmalspritzen (5 ml)	Becton Dickinson
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Biorad
Elite Sensoren für Blutzuckerbestimmung	Bayer
Gewebekulturflaschen (75 cm^2)	Greiner
Gewebekulturplatten (6, 24, 96 <i>well</i>)	Greiner
Gewebekulturplatten für die Fluoreszenzmikroskopie (<i>Imaging Plate</i> , 24 <i>well</i>)	zell-kontakt
Transwell-System (12 <i>well</i>)	BD
Immobilon-P- / PVDF-Membran (0,45 μm)	Millipore

Kryo-Röhrchen	Greiner
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	Brandt
Petrischalen (10 cm)	Sarstedt

2.5 Zelllinien

Name	Ursprung	Vertreiber
bEnd.3 Zellen	murines, cortikales Kapillarendothel	ATCC
CHO Zellen	Zellen aus einem Ovarialkarzinom des chinesischen Hamsters	Institut für molekulare Medizin, Universität zu Lübeck

2.6 Nukleinsäuren

Die hier aufgeführten Nukleinsäuren wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Invitrogen synthetisiert und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt.

Primerpaare für *real-time* PCR

Primerpaar	Sequenz (5'- 3')	Amplikon (bp)
mAGL	<i>forward</i> TGGTTGCAGAGGAGCGATTT <i>revers</i> TGGAGCCTATTGATGGCACAT	117x
m β -Aktin	<i>forward</i> ATGGAATCCTGTGGCATCCAT <i>revers</i> TTCTGCATCCTGTCAGCAATG	239
mAldo A	<i>forward</i> GGCCATCATGGAAAATGCC <i>revers</i> TCAAGTCATGGTCCCCATCAG	112
mEno 1	<i>forward</i> AGATCCCTTTGACCAGGACGA <i>revers</i> AGCCTTGG CAATCCGCTTA	111
meNOS	<i>forward</i> TGCAAACCGTGCAGAGAATTC <i>revers</i> GCGCAATGTGAGTCCGAAAA	124
mGFAP	<i>forward</i> CGCTCAATGCTGGCTTCAA <i>revers</i> GCCTTGTTTTGCTGTTCCAGG	117

mGlut 1	<i>forward</i> ACCTCTTCCGAACCGACAGAT <i>revers</i> TCTGGAGCCATCAAAGTCCTG	96
mGlut 2	<i>forward</i> TTCCGGAAGAAGAGTGGTTCG <i>revers</i> TGGTCGGTTCCTCGGTTTTAG	113
mGlut 3	<i>forward</i> CACCTTCTTCAAAGTCCCGGA <i>revers</i> ATGCTGTTCAACTCCACACCG	113
mGPh BB	<i>forward</i> AAGACAAATGGCATCACGCC <i>revers</i> TCACTTGGCTCAGATCGGTCA	111
mGS	<i>forward</i> TGCCCATGTCTTCACTACCGT <i>revers</i> TTCACATTCAGCCCGTTGG	109
mHIF-1 α	<i>forward</i> CCCAAAGACAATAGCTTCGCA <i>revers</i> ACAGTCACCTGGTTGCTGCAA	111
mHK 1	<i>forward</i> CATTGTCTCCTGCATCTCCGA <i>revers</i> ATTCCGCAATCTAGGCTCGTC	113
mHK 2	<i>forward</i> CTTGCGAATATGGTTGCCTCA <i>revers</i> CCTCCCAATGCCTGATCTGAT	102
mLDH A	<i>forward</i> CAAAGTCCAAGATGGCAACCC <i>revers</i> AGCACCAACCCCAACAACCTGT	100
mLDH B	<i>forward</i> ATTGCGTCCGTTGCAGATG <i>revers</i> TCCCAGAATGCTGATGGCA	101
mMCT1	<i>forward</i> TGTGACCCACGACATCCAAA <i>revers</i> TGAACACCCGGTAGGTTTTCC	100
mMCT 2	<i>forward</i> AAAACCCACGCACTTGCTCA <i>revers</i> GCCAAGGTCTGGAATGCAGA	118
mMCT 4	<i>forward</i> GCCTGGTGGTCTTTTGCATCT <i>revers</i> TGGAGAACTTCTGAGTGCCCA	101
mNefh α	<i>forward</i> CTGCCCTCACCAAACAGGAAT <i>revers</i> CGACATACATCACGTTCGTTCGGCT	140
mPDK 1	<i>forward</i> TTACGGATTGCCCATATCACG <i>revers</i> CCCGGTCACTCATCTTCACAGT	111
mPFKFB3	<i>forward</i> TTCTCAGGTTTTTGC GGAGAAC <i>revers</i> GTG CACATGTATGAGCTGGCA	113
mPFKL	<i>forward</i> AACGCTGCAATGGAGAGTTGT <i>revers</i> TCAAAGACGTAGGCAGCATCG	108

mPGK1	<i>forward</i> TTTGGACAAGCTGGACGTGAA <i>revers</i> GCTTGGAACAGCAGCCTTGAT	114
-------	---	-----

Primerpaare für die Genotypisierungs-PCR

Primerpaar	Sequenz (5'- 3')	Amplikon (bp)
HIF-1 α	<i>forward</i> GCAGTTAAGAGCACTAGTTG <i>revers</i> GGAGCTATCTCTCTAGACC	wt 200 fl 250
GCTx	<i>forward</i> CAGGTTGGAGAGGAGACGCATCA <i>revers</i> CGTTGCATCGACCGGTAATGCAGGC	500

Primerpaare für die Amplifikation des murinen MCT4-Promotors

Primerpaar	Sequenz (5'- 3')
mMCT-Prom	<i>forward</i> GGTACCTCCCTAAGGATCGAAGCCCC <i>reverse</i> AAGCTTAGCCGCTGTATCTGCCTCTGTCC

antisense Oligonukleotid-Sonden

Ziel	<i>antisense</i> Oligonukleotid-Sonde
mHIF-1 α	CTGCTGGGGCAGTCAATGGATGAGAGTGGATTACCAC AGCTGGACCAGT
mOrex 1	TTCGTAGAGACGGCAGGAACACGTCTTCTTCTGGCGA CAGGAGTCGGGCAG

siRNA

Ziel	siRNA Sequenz (5'- 3')	Hersteller
mHIF-1 α	<i>siRNA</i> CAAGCAGCAGGAAUUGGAACAUAU <i>Kontrolle</i> CAACGAGGAUAAGGUCAAUAGCUAU	Invitrogen
meNOS	<i>siRNA</i> GGGGGUGCAUGGAUGAGUAUGAU <i>Kontrolle</i> UAAGCACGAAGCUCAGAGUCCCCC	RiBOXX

Plasmide

Plasmid	Hersteller
pGeneBLazer	Invitrogen

2.7 Medien

Alle Medien wurden bei 4 °C gelagert.

2.7.1 Zellkulturmedien

Name	Bestandteil	Hersteller
DMEM mit Zusätzen	DMEM high Glucose	Gibco
	10 % FKS	Biochrom AG
	1 % Antibiotic-Antimycotic	Invitrogen
Neurobasal Vollmedium	Neurobasal Medium	GIBCO
	2,6 ml 50 x B-27 serum-free supplement	Invitrogen
	326 µl L-Glutamine(100 x)	Invitrogen
CHO Medium	DMEM/Hams F12 mit L-Glutamin 5 % FKS	GIBCO Biochrom AG
Arbeitsmedium (Endothelzellen)	20 ml DMEM ohne Glukose	GIBCO
	200 µl L-Glutamine(100 x)	Invitrogen
	200 µl Penicillin/Streptomycin	PAA
Verdaumedium (Endothelzellen)	20 ml DMEM ohne Glukose	GIBCO
	16 000 U DNase I	Roche
	0,147 µg/ml Tosyllysine Chloromethyl Keton (TCA)	Sigma
	1 mg/ml Collagenase/Dispase	Roche
	200 µl Penicillin/Streptomycin	PAA
Kulturmedium (Endothelzellen)	50 ml DMEM F12	GIBCO

500 μ l L-Glutamine(100 x)	Invitrogen
500 μ l Antibiotic Antimycotic	Invitrogen
500 μ l ECGS	Invitrogen
750 U Heparin	Ratiopharm

2.7.2 Bakterienkulturmedien

Name	Bestandteil	Hersteller
LB-Agar mit Ampicillin	16 g Agar	Invitrogen
	500 ml H ₂ O	
	autoklavieren	
	50 μ g/ml Ampicillin	
LB-Medium mit Ampicillin	16 g LB Broth Base	Invitrogen
	500 ml H ₂ O	
	autoklavieren	
	50 μ g/ml Ampicillin	

2.8 Kits

Name	Hersteller
Advantage GC 2 Polymerase Mix PCR Kit	Clontech
Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2 nd Generation	Roche
DNeasy Blood and Tissue Kit	Quiagen
Nitrat/Nitrite Fluorometric Assay Kit	Cayman Chemicals
LyticBLazer TM -FRET B/G	Invitrogen
NucleoSpin Plasmid quick Pure Kit	Macherey & Nagel
NucleoBond PC 500 Kit	Macherey & Nagel
pGeneBLazer TM TOPORTA Expression Kit	Invitrogen
Platinum SYBR Green qPCR SiperMix	Invitrogen
QuantiT TM RiboGreen RNA Assay Kit	Invitrogen
QiaQuick Gel Extraction Kit	Quiagen
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate	Pierce
Tyramid Signal Amplification Kit	PerkinElmer

2.9 Antikörper

Primär-Antikörper	Hersteller
anti-HIF-1 α (Kaninchen, polyclonal)	Cayman Chemicals
anti-GFAP (Maus, polyclonal)	Sigma
anti-GFAP (Kaninchen, polyclonal)	Invitrogen
anti-Nefh (Kaninchen, monoclonal)	abcam
anti- β -Aktin (Ziege, monoclonal)	Santa Cruz
anti-AKT (Kaninchen, monoclonal)	Cell Signaling
anti-phospho AKT (Ser 473) (Kaninchen, monoclonal)	Cell Signaling
anti-p70S6K (Thr389) (Kaninchen, monoclonal)	Cell Signaling
anti-phospho-p70S6K (Thr389)(Kaninchen, monoclonal)	Cell Signaling
anti-eIF4E (Ser209) (Kaninchen, polyclonal)	Cell Signaling
anti-phospho-eIF4E (Ser209) (Kaninchen, polyclonal)	Cell Signaling
anti- p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) (Kaninchen, monoclonal)	Cell Signaling
anti-phospho-Erk (E4) (Maus, monoclonal)	Santa Cruz
anti-Digoxigenin-POD (Schaf, Fab fragments)	Roche

Sekundär-Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor ^R 488 anti-Maus (Ziege, polyclonal)	Invitrogen
Alexa Fluor ^R 488 anti-Kaninchen (Ziege, polyclonal)	Invitrogen
Alexa Fluor ^R 555 anti-Maus (Ziege, polyclonal)	Invitrogen
Alexa Fluor ^R 555 anti-Kaninchen (Ziege, polyclonal)	Invitrogen
HRP-anti-Kaninchen (Ziege, polyclonal)	DAKO
HRP-anti-Ziege (Kaninchen, polyclonal)	DAKO

2.10 Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenz	Hersteller
Lipofectamine TM 2000	Invitrogen

2.11 Enzyme

Alle Enzyme wurden bei -20°C gelagert und bei Verwendung auf Eis gekühlt.

Name	Einheiten/ml	Enzym	Hersteller
DNAzyme	20 000	DNA-Polymerase	Finzymes
Glutamat-Pyruvat- Transaminase	24	Transaminase	Roche
Laktatdehydrogenase (LDH)	400	Dehydrogenase	Roche
BglII	10 000	Restriktionsendonuklease	NEB
Proteinase K Solutions	20 mg/ml	Proteinase	AB

2.12 Puffer und Lösungen

2.12.1 Selbsthergestellte Puffer und Lösungen

Das Ansetzen aller Lösungen und Puffer erfolgte stets mit doppelt-distilliertem Wasser.

Name	Bestandteile
8 M Urea Puffer	8 M Urea 9,5 M Glycerin 1 % SDS (w/v) 1 M DTT 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 22 mM Aprotinin 2,2 mM Leupeptin 1,46 mM Pepstatin
Blockierungspuffer I	5% Milchpulver (w/v) in PBS-Waschpuffer
Blockierungspuffer II	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20 (v/v) 1% BSA (w/v) 10 mM NaF 2 mM Na_3VO_4

	5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
Collagen	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Collagen in 0,05 N HCl
DEPC- H_2O	0,1% DEPC (v/v) in H_2O autoklavieren
Dextran (18 %)	18 % Dextran in PBS aufkochen
Folin Reagenz	33 % Folin 66 % NaCl 0,9 %
Hybridisierungspuffer	20 mM Tris pH 7,5 50 % Formamid 0,3 M NaCl 1 mM EDTA 1 x 50x Denhards Solution 10 % Dextran Sulfat
Ladepuffer (6 x)	1 % 2,5 % Xylen-Cyanol in DEPC- H_2O 600 μl Glycerol ad 2000 μl DEPC- H_2O
Laktat Assay Puffer	250 nM Tris-Glutamat pH 8,75 3,6 nM NAD^+
Laktat Assay Enzym-Lösung	400 U/ml LDH 24 U/ml GPT in 0,1 mM TRIS Puffer
Lowry Mix	7 mM Na_2CO_3 1 mM Na-K-Tartrat 400 μM $\text{Cu}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 0,1N NaOH
MES-Laufpuffer (20 x)	50 mM MES 50 mM Bis-Tris 70 mM SDS 1 mM EDTA pH 7,3

NuPAGE Transferpuffer (20 x)	25 mM Bicine 25 mM Bis-Tris 1mM EDTA pH 7,2
PBS-Glukose	1 l PBS (steril) 6,5 g Glukose mit 0,22 μ m Stericup (Mil- lipore) filtrieren
PBS-Waschpuffer	65 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 25 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 100 mM NaCl 0,1 %Tween 20 (v/v) pH 7,5
Poly-L Ornithin (100 x)	66,7 ml Aqua bidest. 100 mg Poly-L-Ornithin mit 0,22 μ m Stericup (Mil- lipore) filtrieren
TAE Puffer (50 x)	2 M Tris-HCl 0,25 M Natriumacetat 0,05 M EDTA, pH 7,8

2.12.2 Kommerzielle Puffer und Gele

Name	Hersteller
4 % - 12 % BIS-Tris Gel	Invitrogen
4 x NuPAGE LDS Puffer	Invitrogen
10 % Reducing Agent	Invitrogen
Antioxidant	Invitrogen
Nucleic acid Purification Elution Solution	Applied Biosystems
Nucleic acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems
RNA Purification Wash solution 1	Applied Biosystems
RNA Purification Wash solution 2	Applied Biosystems
SSC (20x)	Sigma

2.13 Mauslinien

Name	Genotyp	Herkunft
B6.129-HIF1a ^{tm3Rsjo} /J	homozygot für Exon 2 gefloxtes HIF-1 α	T. Cramer, Charite Berlin
FVB-Tg(GFAP-cre)25Mes/J	hemizygot für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors (Transgen)	Jackson Laboratory
C57/Bl6	Wildtyp	Jackson Laboratory

2.14 Tierdiäten

Diät	Fettgehalt	Herkunft
Hochfett-Diät	60 % kcal Fett	Research Diets
Kontroll-Diät	15 % kcal Fett	Research Diets

2.15 Zellbiologische Arbeiten

2.15.1 Allgemeine Techniken

Alle Arbeiten zur Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer *Laminar-Flow*-Werkbank durchgeführt. Zelllinien wurden mittels PCR regelmäßig auf Mykoplasmenfreiheit untersucht. Alle Zellkulturen wurden in Zellinkubatoren bei 5% CO₂ und 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

2.15.2 Präparation primärer muriner corticaler Astrozyten

Für die Präparation primärer muriner corticaler Astrozyten wurden D1 C57/Bl6 Mäuse dekapitiert. Das Gehirn wurde durch das Entfernen der Kopfhaut und der Schädelknochen freigelegt und in eine Petrischale mit 3 ml DMEM mit Zusätzen auf Eis überführt. Die Bulbi Olfactori und das Cerebellum wurden entfernt und die beiden Hirnhemisphären getrennt. Durch Entfernen des Hippocampus und der Substantia alba wurde der Cortex isoliert. Anschließend wurden die Meningen vom

Cortex abgelöst und verworfen. Alle präparierten Cortices wurden in 3 ml DMEM mit Zusätzen auf Eis gesammelt. Um die Astrozyten mechanisch zu dissoziieren wurden die Cortices jeweils dreimal durch eine 20G, eine 21G und eine 25G Kanüle in eine 5 ml Spritze aufgezogen. Die Zellsuspension wurde mit DMEM mit Zusätzen auf 45 ml pro Gehirn aufgefüllt. Die Astrozyten wurden wie in Tabelle 2.19 angegeben ausgebracht, wobei *24-well Imaging Plates* mit gasdurchlässigem Boden verwendet wurden. Die primären Astrozyten wurden 21 Tage (+/- 2 Tage) kultiviert, wobei ein Mediumwechsel alle 3-4 Tage stattfand.

Tabelle 2.19: Aussatbedingungen für primäre Astrozyten

Zellkulturplatte	Zellsuspension
24- <i>well</i>	1ml
Insert eines <i>well</i> Transwellplatte	1ml
12- <i>well</i>	2 ml

2.15.3 Präparation primärer muriner corticaler Neurone

Für die Präparation primärer muriner corticaler Neurone wurden Tag 17-18 trächtige C57/Bl6 Mäuse durch zervikale Dyslokation getötet und die Embryonen freigelegt. Die Embryonen wurden dekapitiert und die Köpfe auf Eis gelagert. Die Sezierung der Cortices erfolgte wie unter Kapitel 2.15.2 beschrieben in 3 ml PBS-Glukose Lösung. Für die Zelldissoziation wurden die gesammelten Cortices in 10 ml PBS-Glukose zehnmal durch eine Pasteurpipette, deren Spitze durch eine Flamme verkleinert worden war, auf und ab pipettiert. Nach 5 min Inkubation wurde der Überstand in ein weiteres 10 ml Reaktionsgefäß überführt und auf 10 ml mit PBS-Glukose Lösung aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde weitere zehnmal mit der Pasteurpipette aufgezogen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml 37°C warmem Neurobasal Vollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden 1 : 1 mit Trypanblau verdünnt und die Zahl der lebenden Zellen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt. Die Neurone wurden wie in Tabelle 2.20 angegeben auf Zellkulturplatten, die am Tag zuvor mit 1x Poly-L-Ornithin-Lösung beschichtet worden waren, ausgesät. Die primären Neurone wurden 7 Tage kultiviert.

Tabelle 2.20: Aussatbedingungen für primäre Neurone

Zellkulturplatte	Zellzahl
24- <i>well</i>	150 000 Zellen
12- <i>well</i>	300 000 Zellen

2.15.4 Präparation primärer muriner Endothelzellen aus Hirn-Kapillaren

Primäre Endothelzellen aus Maushirn-Kapillaren wurden aus 12 Wochen alten C57/-BL6-Mäusen isoliert. Die Mäuse wurden dekapitiert und die Köpfe bis zur Hirnentnahme in 70 % Ethanol gelagert. Die Hirne wurden entnommen und die Meningen durch Rollen auf sterilem Whatman-Papier entfernt. Die Großhirne wurden in 5 ml Arbeitsmedium in einen Gewebehomogenisator überführt. Die Homogenisierung erfolgte mit 30 Stößen mit einem Pistill, das 0,09 - 0,165 mm Abstand zur Gefäßwand hat, und 25 Stößen mit einem Pistill, welches einen Abstand zur Gefäßwand von 0,03 - 0,09 mm hat. Das Homogenat wurde auf 10 ml mit Arbeitsmedium aufgefüllt und 10 min bei 600 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 18% Dextran-Lösung resuspendiert und bei 10.000 x g zentrifugiert, um das Homogenat von Myelin zu befreien. Das Zellpellet wurde in 10 ml Verdaumedium für 1 Stunde 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in Kulturmedium aufgenommen. Pro *well* einer 12 *well*-Platte wurde die Zellsuspension eines Gehirns in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und ausgesät. Um Endothelzellen aus dem Homogenat zu selektionieren wurden 40 µg/ml Puromycin zugesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 und 48 Stunden, wobei nach 48 Stunden auf Puromycin verzichtet wurde. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von Konfluenz kultiviert.

2.15.5 Kultivierung von bEnd.3 Zellen und CHO Zellen

Die bEnd.3 Zellen wurden in DMEM high Glukose Medium mit 10% FKS, die CHO-Zellen in CHO-Medium in T75 Zellkulturflaschen kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde zweimal pro Woche durchgeführt. Hatte sich ein konfluenter Zellrasen gebildet, wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurden Zellen 1 x mit PBS gewaschen und 10 Minuten (bEnd.3 Zellen) bzw. 1 Minute (CHO Zellen) mit 6 ml Trypsin (0,5 mg/ml) bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde entfernt und die Reaktion durch Zugabe von 8 ml Medium gestoppt. Die Subkultivierung erfolgte 1 : 2 bzw. 1 : 4.

2.15.6 Behandlung von primären Astrozyten

Die primären Astrozyten wurden wie angegeben (Kapitel 2.15.2) präpariert und für 21 Tage auf *Imaging Plates* kultiviert. Um die Wirkung von NO auf Astrozyten zu untersuchen wurde der NO-Donor DetaNONOate (Deta), der NO kontinuierlich über 24 Stunden hinweg freisetzt, verwendet. Die Astrozyten wurden, wenn nicht anders angegeben, für 12 Stunden mit 0,8 mM Deta vor der jeweiligen Analyse behandelt. Zur Untersuchung von NO-induzierten Zellsignalwegen wurden zusätzlich spezifische Inhibitoren der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)- und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalkaskaden eingesetzt. Die Astrozyten wurden mit diesen Inhibitoren 1 Stunde vor Zugabe des Deta prä-inkubiert. Die Inhibitoren, die eingesetzten Konzentrationen und ihre jeweiligen spezifischen Zielproteine sind in Tabelle 2.21 aufgelistet.

Tabelle 2.21: Verwendete Inhibitoren zellulärer Signalkaskaden

Inhibitor	μM	Zielprotein
LY294002 (LY)	20	Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)
PD98059 (PD)	25	mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase (MEK1)
Rapamycin (Rap)	0,1	<i>mammalian target of rapamycin</i> (mTOR)
1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ)	20	lösliche Guanylatzyklase (sGC)

2.15.7 Kokultur unter Verwendung eines Transwell-Systems

Für Kokultur Experimente wurde ein 12-*well* Transwell-System von BD Falcon verwendet. Das verwendete *Insert* hatte eine PET-Membran mit 0,4 μm Porengröße, bei einer Porendichte von $2,0 \pm 0,2 \times 10^6 / \text{cm}^2$. Der Abstand zwischen der Membran des *Inserts* und dem Boden der Zellkultuplatte betrug 0,9 mm. Die im Verlauf des Experiments analysierten Astrozyten wurden in den *Inserts* für 21 Tage kultiviert. Astrozyten, primäre Endothelzellen, primäre Neurone und bEnd.3 Zellen, die mit den in den *Inserts* kultivierten Astrozyten kokultiviert wurden, wurden auf dem Boden der 12-*well* Zellkulturplatten kultiviert. Um auf dem Boden der Zellkulturplatten zum Zeitpunkt der Kokultur gleiche Zellzahlen zu erhalten, wurden 3×10^5 Neurone/ *well* einer 12-*well* Zellkulturplatte ausgesät und für 1 Woche vor der Kokultur kultiviert. bEnd.3 Zellen und primäre Endothelzellen wurden 24 Stunden vor der Kokultur trypsiniert und 3×10^5 Zellen/12-*well* ausgebracht. $3,75 \times 10^4$ primäre

Astrozyten wurden 3 Wochen vor der Kokultur pro *well* einer 12-*well* Zellkulturplatte ausgesät. Bei einer Verdopplungszeit von 1 Woche liegen zum Zeitpunkt der Kokultur 3×10^5 Astrozyten/*well* vor. Für die Kokultur Experimente wurden die jeweiligen Medien erneuert und 500 μM L-Arginin zugesetzt. Anschließend wurden die *Inserts* mit den Astrozyten für 12 Stunden in die bewachsenen Zellkulturplatten eingesetzt. Wurden die bEnd.3 Zellen oder die primären Endothelzellen mit 100 μM L-NAME behandelt, so wurden sie 1 Stunde vor der Zugabe der *Inserts* mit L-NAME prä-inkubiert. Nach dem Ablauf der 12 Stunden Kokultur, wurden die in den *Inserts* gewachsenen Astrozyten entsprechenden den Protokollen für eine Western Blot Analyse (Kapitel 2.18.2) oder eine RNA-Isolation (Kapitel 2.17.4) lysiert.

2.15.8 Transfektion von Zellen mit LipofectamineTM 2000

Unter einer Transfektion versteht man das Einbringen fremder DNA in eukaryotische Zellen. Eine Transfektion kann unter Zuhilfenahme von chemischen, physikalischen oder biologischen Methoden durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden Zellen mit Hilfe von LipofectamineTM 2000 transient transfiziert. LipofectamineTM 2000 bildet eine kationische Lipidhülle um die negativ geladene DNA, sodass eine Aufnahme durch Endozytose ermöglicht wird. Die Transfektion erfolgte an zu 80% konfluenten Zellen gemäß den Angaben des Herstellers. Das Transfektionsreagenz und die zu transfizierende Nukleinsäure wurden wie in Tabelle 2.22 gezeigt in OptiMEM-Medium verdünnt, 5 Minuten bei Raumtemperatur prä-inkubiert und anschließend zu gleichen Teilen vermischt. Während der folgenden 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit ihrem entsprechenden Medium ohne Zusätze gewaschen und mit 400 μl des Mediums überschichtet. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μl Transfektionsgemisch/24-*well* versetzt und 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin fand ein Mediumwechsel zu Medium mit FKS statt und die Zellen wurden weitere 20 Stunden im Zellinkubator kultiviert.

Tabelle 2.22: Transfektionsgemisch

Nukleinsäure	Konzentration	Volumen Opti- MEM	Lipofectamine TM 2000	Volumen Opti- MEM
siRNA	20 pmol	50 μl	2 μl	48 μl
DNA	400 ng	50 μl	2 μl	48 μl

2.15.9 Reportergenassay

Ein Reportergenassay dient der Bestimmung von Promotoraktivität. Dazu wird der Promotor von Interesse in einen Vektor kloniert, sodass ein Reportergen unter der Kontrolle dieses Promotors exprimiert wird. Reportergene codieren für Enzyme, welche eine Reaktion katalysieren, bei der Chemielumineszenz freigesetzt wird. Das am häufigsten verwendete Reportergen ist die *renilla reniformis* Luziferase. Das Reporterkonstrukt aus Promotor und Reportergen wird in Zellen transfiziert, die dann weiteren Behandlungen z.B. mit einem Aktivator des Promotors ausgesetzt werden können. Ist der Promotor aktiv, so wird das Reportergen transkribiert und translatiert. Wird dem Zelllysate das Substrat des Reporterproteins zugesetzt, so kann über die bei der Reaktion freiwerdende Lumineszenz die Konzentration des Reporterproteins im Zelllysate bestimmt werden. Die Lumineszenz ist also ein direktes Maß für die Promotoraktivität. In dieser Arbeit wurde als Reportergen die β -Laktamase gewählt, da diese im Gegensatz zur Luziferase nicht durch NO reguliert wird [48]. Der Reportergenassay wurde mit dem LyticBLazerTM-FRET B/G Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Astrozyten wurden dazu in 24-well Imaging Plates kultiviert und wie jeweils angegeben behandelt. Für den Reportergenassay wurden die Zellen in 100 μ l 1 x Lyse Puffer lysiert. Das Zelllysate wurde für 12 Stunden mit je 0,5 μ l 1 x LyticBLazer-Lösung in einer schwarzen 96-well Platte im Dunkeln bei RT inkubiert. Ist die β -Laktamase im Zelllysate verfügbar, schneidet sie das im Puffer enthaltene FRET-basierte LyticBLazerTM-FRET B/G Substrat. Das ungeschnittene Substrat hat bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und eine Emissionswellenlänge bei 530 nm, während das von der β -Laktamase geschnittene Substrat bei 460 nm emittiert. Je mehr β -Laktamase in dem Zelllysate vorhanden ist, desto mehr blaues Licht und desto weniger grünes Licht wird emittiert. Das sogenannte *response ratio*, das als Wert für die Promotoraktivität verwendet wird, wurde wie folgt berechnet:

$$\text{response ratio} = (530 \text{ nm} / 460 \text{ nm der Probe}) / (530 \text{ nm} / 460 \text{ nm der Kontrolle})$$

Der Wert für die Kontrolle ist immer 1, während *response ratios* von >1 eine Aktivität des Promotors darstellen.

2.15.10 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung von Zellen mit Hilfe eines antigenspezifischen Primär- und eines fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpers ermöglicht die Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen.

Dazu wurden die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen und für 15 Minuten mit eiskaltem 4 % Formaldehyd in PBS fixiert. Im Folgenden wurden die Zellen nach je-

dem Inkubationsschritt dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 10 Minuten mit 0,3 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden unspezifische Epitope 1 Stunde mit 1 % BSA in PBST gesättigt. Der primäre Antikörper wurde gemäß Tabelle 2.23 in 1 % BSA in PBST verdünnt und 1 Stunde mit den Zellen inkubiert. Für die Detektion des gebundenen primären Antikörpers wurden die Zellen 1 Stunde in Dunkeln mit dem fluorophorgekoppelten sekundären Antikörper (Tabelle 2.24) in 1% BSA in PBS inkubiert. Der Verdünnung des sekundären Antikörpers wurde außerdem 0,2 μ M DAPI zugesetzt, welches an die doppelsträngige DNA im Zellkern bindet und so die Detektion der Zellkerne bei einer Anregung von 355 nm und einer Emission bei 465 nm ermöglicht. Wurde die Färbung mit Astrozyten in *Imaging Plates* durchgeführt, wurden die Zellen mit PBS bedeckt und im Anschluss mit Hilfe des konfokalen *laser scanning* Mikroskops TCS S5P analysiert.

Tabelle 2.23: Primär-Antikörper Verdünnungen für Immundetektion

Primär-Antikörper	Verdünnung in Blockierungspuffer
anti-HIF-1 α (Kaninchen, polyclonal)	1 : 500
anti-GFAP (Maus, polyclonal)	1 : 1000
anti-GFAP (Kaninchen, polyclonal)	1 : 1000
anti-Nefh (Kaninchen, monoclonal)	1 : 500

Tabelle 2.24: Sekundär-Antikörper Verdünnungen für Immundetektion

Sekundär-Antikörper	Verdünnung in 1% BSA in PBS
Alexa Fluor ^R 488 anti-Maus (Ziege, polyclonal)	1 : 2000
Alexa Fluor ^R 488 anti-Kaninchen (Ziege, polyclonal)	1 : 2000
Alexa Fluor ^R 555 anti-Maus (Ziege, polyclonal)	1 : 2000
Alexa Fluor ^R 555 anti-Kaninchen (Ziege, polyclonal)	1 : 2000

2.15.11 Laktat Assay

Der Laktat Assay beruht auf zwei enzymatischen Reaktionen. Zunächst setzt die Laktatdehydrogenase (LDH) das Laktat der Probe unter Verwendung von NAD⁺ zu Pyruvat und NADH um. Da das Gleichgewicht dieser Reaktion auf der Seite

des Laktats liegt, wird der LDH-Reaktion Pyruvat entzogen, indem es durch die Glutamat-Pyruvat-Transaminase zu Alanin und α -Ketoglutarat umgesetzt wird.

Um die Laktatfreisetzung von Astrozyten im Zellkulturüberstand zu messen wurde das Medium erneuert und zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Zum Enteiweißen wurden 100 μ l Medium für 5 Minuten mit 500 μ l 0.3 M HClO_4 inkubiert. Anschließend wurde die Probe 5 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. 450 μ l des klaren Überstandes wurden mit 100 μ l einer gesättigten KHCO_3 -Lösung neutralisiert. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 13.000 x g wurde der klare Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert. 150 μ l der Probe wurden mit 650 μ l Laktat Assay Puffer und 15 μ l Laktat Assay Enzyme-Lösung für 30 min bei RT inkubiert. Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte über die Messung der Zunahme der Absorption des bei der Umsetzung von Laktat entstehenden NADH unter Zuhilfenahme einer Laktatstandards (2 mM Laktat). Die Messung der Absorption wurde bei 340 nm im Spektral Photometer durchgeführt.

2.15.12 Nitrat/Nitrit Assay

Stickstoffmonoxid wird *in vivo* vor allem in die stabilen Produkte Nitrat und Nitrit abgebaut. Diese sind mit Hilfe des fluoreszenz-basierten *Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay kits* im Zellkulturüberstand messbar.

Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei 50 μ l Zellkulturüberstand eingesetzt wurden. Die Messung der Fluoreszenz wurde in einem Plattenlesegerät mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 430 nm durchgeführt.

2.16 Mikrobiologische Methoden

2.16.1 Transformation kompetenter Bakterien

Pro Reaktion wurde ein Aliquot One Shot^{TR} TOP10 chemisch kompetente *E.coli* Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 μ l Ligationsansatz (Kapitel 2.17.12) wurden die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42°C für 30 s durchgeführt.

Alternativ wurde ein Aliquot One Shot^{TR} TOP10 elektrokompetente *E.coli* Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1 μ l Ligationsansatz (Kapitel 2.17.12) wurden die Bakterien bei 1,8 KV, 200 Ohm und 25 μ F transformiert. Es wurden 250 μ l 37°C -warmes SOC Medium zugesetzt und 1 Stunde bei 37°C und 200 min^{-1} inkubiert. Um einzelne Klone zu selektionieren, wurden 50 μ l bzw. 200 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Selektionsplatten mit Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) ausgestrichen.

chen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.16.2 Anlegen von Glycerinkulturen

Um transformierte Bakterien bei –80 °C langfristig lagern zu können, wurden 200 µl Flüssigkultur in LB-Selektionsmedium mit 100 µg/ml Ampicillin mit 200 µl Glycerin versetzt und bei –80 °C gelagert.

2.16.3 Präparation von Plasmiden aus Bakterien

Die Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA (15 µg) beruht auf der Bindung von DNA an eine Silikamembran.

Dafür wurde je eine Bakterienkolonie von LB-Agarplatten mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator wurden die Plasmide mit dem NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Grosse Plasmid-Mengen (bis 500 µg) werden mit Hilfe eines Ionenaustauschers präpariert.

Dazu wurden 50 ml LB-Selektionsmedium mit 5 µl eines Glycerolstocks angeimpft. Die Aufreinigung und Präzipitation der Plasmide wurde mit dem NucleoBond PC 500 Kit bzw. dem NucleoBond Finalizer Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.17 Molekularbiologische Arbeiten

2.17.1 Isolation von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Die Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien (ca. 0,5 cm) erfolgte mit Hilfe des *DNAeasy Blood and Tissue Kit* gemäß des Handbuchs des Herstellers, wobei die Lyse des Gewebes über Nacht bei 56 °C im Schüttelinkubator erfolgte.

2.17.2 Ethanol-Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 des Volumens Natriumacetat und dem doppelten des Volumens kaltem 100 % Ethanol 1 Stunde bei –20 °C inkubiert. Die DNA wurde 30 Minuten bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris (pH 8,5) resuspendiert.

2.17.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Dabei wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times F \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$$

$$F = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$$

Zur Abschätzung des Verunreinigungsgrades einer Lösung wurde die optische Dichte auch beim Absorptionsmaximum von Proteinen (280 nm) bestimmt. Der 230 nm/280 nm-Quotient einer ausreichend reinen DNA-Lösung beträgt 1,5 - 2,0.

2.17.4 Isolation von RNA aus Zellkulturen und Geweben

Um die Gesamt-RNA aus Zellkulturen zu gewinnen wurden die Zellen wie in Kapitel 2.15.2 und Kapitel 2.15.3 beschrieben in 24-*well* Platten ausgebracht. Nach Abschluß des Versuchs wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 500 μl 1 x Lysepuffer in PBS lysiert.

Gewebeproben wurden in 500 μl 1 x Lysepuffer mit einem Dispergiergerät (Ultra-Turrax) homogenisiert. Anschließend erfolgte ein Verdau mit 0,4 mg Proteinase K für 1 Stunde bei 37 °C.

Die weitere Isolation wurde mit der *6100 Nucleic acid Prepstation* im *RNACell* bzw. Tissue Programm nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Lösung wurde bei -80 °C gelagert.

2.17.5 Konzentrationsbestimmung von RNA

Der Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen interkaliert in RNA und kann dann bei 485 nm angeregt werden, sodass die Emission, welche proportional zur RNA-Konzentration ist, bei 530 nm gemessen werden kann.

Die Konzentration einer RNA-Lösung wurde daher fluoreszenzbasiert mit dem *Quant-iTTM RiboGreen RNA Assay Kit* nach Angaben des Herstellers mit einem Plattenlesegerät bestimmt.

2.17.6 Reverse Transkription von RNA

Um das Expressionsniveau eines Genes mit Hilfe von quantitativer *real-time* PCR (Kapitel 2.17.8) quantifizieren zu können, wurde die zelluläre Gesamt-RNA zunächst mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das *Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Zunächst wurde folgender Ansatz 5 min bei 65 °C inkubiert:

Tabelle 2.25: Präinkubationsmix für die cDNA-Synthese

Bestandteil	Menge
Oligo(dT) ₂ (50 μ M)	1 μ l
dNTP Mix (10 mM)	2 μ l
zelluläre Gesamt-RNA	9 μ l

Anschließend wurden 8 μ l des folgenden Reaktionsmixes zugegeben und 1 Stunde bei 55 °C inkubiert:

Tabelle 2.26: Reaktionsmix für die cDNA-Synthese

Bestandteil	Menge
5 x <i>Buffer</i>	4 μ l
DTT (0,1 M)	1 μ l
DEPC-H ₂ O	1 μ l
RNaseOut TM	1 μ l
<i>Cloned AMV RT</i>	1 μ l

Die Reaktion wurde 10 Minuten bei 85 °C gestoppt. Die cDNA wurde 1 : 1 mit DEPC-H₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.17.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde standardmäßig nach Angaben des Herstellers mit der DNazyme Polymerase im T-Gradient Cyclo in einem Volumen von 20 μ l durchgeführt. Tabelle 2.27 führt die Protokolle auf, die zur Genotypisierung der Mauslinien verwendet wurden.

Tabelle 2.27: Bedingungen für die Genotypisierungs-PCR

Primer	Zyklen	Anlagerungs- temperatur	Amplikon (bp)
HIF-1 α	35	58 °C	wt 500 fl 250
Cre	30	60 °C	500

Konnte mit der DNazyme Polymerase in speziellen Fällen kein Amplifikat er-

zeugt werden, wurde das *Advantage GC 2 Polymerase* Kit verwendet, welches für die Vervielfältigung GC-reicher Sequenzen optimiert ist. Die PCRs mit diesem Kit wurden wie im Herstellerhandbuch beschrieben optimiert.

2.17.8 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Primerdesign für die qRT-PCR

Die für die qRT-PCR eingesetzten Primerpaare wurden mit Hilfe der entsprechenden mRNA-Sequenzen und dem Programm Primer Express entworfen.

Durchführung der qRT-PCR

Im Gegensatz zur konventionellen *end-point* PCR ermöglicht die *real-time* PCR eine quantitative Bestimmung der initial eingesetzten Zielgen-DNA. Die qRT-PCR wurde mit dem *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix* nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Tabelle 2.28 und Tabelle 2.29). Pro Reaktion wurden 2 μl einer cRNA-Probe (Kapitel 2.17.6) eingesetzt. Zur Analyse wurden die in Tabelle 2.6 aufgeführten Primer verwendet. Als Referenz wurde jeweils eine genspezifische Standardreihe mit 10^7 - 10^3 Kopien des Zielgens mitgeführt. Anhand der Standardreihe konnte für jede Probe die eingesetzte Kopienzahl des Zielgens errechnet werden. Die Messergebnisse wurden auf die Gesamt-RNA normiert.

Tabelle 2.28: Reaktionsmix für qRT-PCR

Bestandteil	Menge
<i>SYBR Green qPCR Supermix</i>	12,5 μl
Primer f (10 μM)	0,75 μl
Primer r (10 μM)	0,75 μl
cDNA	2 μl
H ₂ O	9 μl

2.17.9 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Um DNA-Fragmente zwischen 0,1 und 15 kb ihrer Größe nach elektrophoretisch aufzutrennen wurden 1-2 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde dazu in 1 x TAE Puffer unter Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (2 μg / 100 ml) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, sodass diese mit Hilfe eines UV-Illuminators sichtbar gemacht werden kann. Die Proben wurden 1 : 5 in 6 x Ladepuf-

Tabelle 2.29: qRT-PCR Programm mit anschließender Schmelzkurvenanalyse

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	50 °C	2 min
1	95 °C	2 min
40	95 °C	15 sec
	60 °C	1 min
1	95 °C	15 sec
1	60 °C	20 sec
1	95 °C	15 sec

fer für Agarose-Gele verdünnt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE Puffer. Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Gelkammer bei 10 V/cm². Als Größenmarker diente entweder der *DNA Molekular Weight Marker XIV oder X* (Roche).

2.17.10 Elution von DNA aus Agarosegelen

Um PCR-Produkte oder Produkte eines Restriktionsverdaus (Kapitel 2.17.11) für eine Klonierung aufzureinigen wurde die DNA mit einem Agarosegel wie unter Kapitel 2.17.9 beschrieben aufgetrennt.

Die aufzureinigende Bande wurde unter UV-Licht (356 nm) ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *QIAQuick Gel Extraction Kit* (Quiagen).

2.17.11 Restriktionsverdau von Plasmiden

Für einen Restriktionsverdau wurden 500 ng Plasmid mit 100 U der jeweils angegebenen Restriktionsendonukleasen nach Anweisungen des Herstellers in einem 20 µl Ansatz mit entsprechendem Puffer für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Enzyme wurden bei 65 °C inaktiviert.

2.17.12 TOPO-TA Klonierung

Es wurde ein Vektor verwendet, welcher linearisiert vorliegt und an dessen freien Enden eine die Ligation vermittelnde Topoisomerase kovalent gebunden ist. Die Ligation wurde wie im Handbuch des pGeneBLazer TOPO TA Expression Kits beschrieben durchgeführt.

2.17.13 Nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung mit DIG-markierten Oligonukleotid-Sonden

Die *in situ*-Hybridisierung dient dem Nachweis und der Lokalisation von mRNA in Gewebe. Dazu wird eine RNA- oder Oligonukleotid-Sonde, die *antisense* zur Ziel-mRNA orientiert ist, auf das Gewebe gegeben, sodass eine Hybridisierung stattfindet. Die Sonden können auf verschiedene Weisen markiert und nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden nicht-radioaktive Oligonukleotid-Sonden verwendet. Der Nachweis der Sonden erfolgte durch eine Markierung mit Digoxigenin (DIG) und einem anti-DIG Antikörper, an welchen eine Peroxidase gekoppelt war. Das Fluoreszenzsignal wurde mit Hilfe der Tyramid Signal Amplifikations (TSA) Technologie erzeugt. Die immobilisierte Peroxidase katalysiert den Niederschlag des fluorophor-gekoppelten *tyramide amplification reagent* in seiner unmittelbaren Umgebung. Das Fluoreszenzsignal wird dadurch um ein Vielfaches verstärkt.

Perfusionsfixieren von Mäusen

Die Mäuse wurden mit 15 μ l Pentobarbital anästhesiert und anschließend durch die aufsteigende Aorta zunächst mit 0,9 % NaCl und dann mit eiskaltem 4 % Paraformaldehyd in DEPC-PBS perfundiert. Das entnommene Gehirn wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd in DEPC-PBS postfixiert. Die fixierten Gehirne wurden bei 4 °C über Nacht in 20 % Saccharose-Lösung (in PBS) inkubiert, mit *Tissue Tek OCT compound* Eindeckmedium eingebettet und bei –80 °C gelagert.

Anfertigen von Gehirnschnitten

Die Gehirne wurden bei –20 °C mit dem Kryotom 20 μ m dick geschnitten. Die Gehirnschnitte wurden auf Objektträger aufgenommen und kurz bei 40 °C getrocknet bevor die Schnitte bei –80 °C gelagert wurden.

DIG-Markierung der Oligonukleotid-Sonden

100 pmol der Oligonukleotid-Sonden wurden mit dem *DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation* nach dem 'Protokoll des Herstellers für kurze DIG-Anhänge' mit DIG markiert.

In situ-Hybridisierung

Die Gehirnschnitte wurden 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Es wurde zweimal 1 Minute mit PBS gewaschen. Die

Dehydratisierung der Schnitte erfolgte durch eine einminütige Inkubation mit 70 % Ethanol, gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation mit 95 % Ethanol. Pro Objektträger wurden 150 μ l Hybridisierungsmix (Tabelle 2.30) eingesetzt. Die Hybridisierung mit den Oligonukleotid-Sonden erfolgte über Nacht bei 42 °C. Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte mit 1 x SSC 5 Minuten bei Raumtemperatur, 30 Minuten bei 55 °C und 1 Minute bei Raumtemperatur gewaschen. Ein abschließender Waschschrift wurde mit 0,1 x SSC für 1 Minute durchgeführt. Als Kontrolle für die Hybridisierung wurde die DIG-markierte Sonde mit 50-fachem Überschuss an nicht-markierter Sonde versetzt, sodass eine spezifische Verdrängungsreaktion stattfinden kann.

Tabelle 2.30: Hybridisierungsmix

Bestandteil	Konzentration
Oligonukleotid-Sonde	100 ng
Ribomix	20 μ l
Hybridisierungspuffer	900 μ l

TSA Amplifikation

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Gehirnschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit TNB-Puffer in einer feuchten Kammer blockiert. Die Inkubation mit dem in TNB-Puffer verdünnten anti-Digoxigenin-POD Antikörper erfolgte ebenfalls in einer feuchten Kammer bei 4 °C. Die Schnitte wurden dreimal für 5 Minuten mit TNT-Puffer gewaschen. Für die Signalamplifikation wurde Cy3- bzw. Cy5-Tyramid 1 : 100 in *Amplification Diluent* verdünnt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit den Schnitten im Dunkeln inkubiert. Die Zellkerne wurden während des folgenden 15-minütigen Waschschriffs mit TNT-Puffer mit 0,2 μ M DAPI gefärbt. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit TNT-Puffer wurden die Schnitte mit DAKO Eindeckmedium und einem Deckgläschen bedeckt, wenn im Anschluss keine immunhistochemische Färbung durchgeführt wurde.

Immunhistochemische Färbung

Die Gehirnschnitte wurden für 30 Minuten mit 10 % BSA blockiert und anschließend 1 Stunde mit dem 1 : 500 verdünnten Kaninchen anti-GFAP Antikörper inkubiert. Nach 3 Waschschriffen mit PBS wurde der primäre Antikörper 1 Stunde mit einem anti-Kaninchen Alexa488 Antikörper gebunden. Es folgten 3 weitere Waschschriffe mit PBS. Die Schnitte wurden mit DAKO Eindeckmedium bedeckt und bei 4 °C gelagert.

2.18 Methoden im Umgang mit proteinanalytischen Arbeiten

2.18.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Um die Proteinkonzentration von Lösungen zu bestimmen wurde die Methode nach Lowry verwendet. Zunächst wurden 200 μl der Proteinlösung mit 800 μl Lowry Mix für 10 Minuten inkubiert. Es findet eine Bioretreaktion statt, wobei ein quadratisch-planarere Komplex zwischen den Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen gebildet wird. Die Zugabe von 100 μl Folin-Reagenz induziert die zweite Reaktion, bei der das gelbe Folin-Reagenz zu Molybdänblau reduziert wird. Die Absorption wurde bei 540 nm gemessen. Eine Standardreihe von 0 - 160 $\mu\text{g/ml}$ Albumin in 0,9 % NaCl wurde bei jeder Messung mitgeführt.

2.18.2 Western Blot Analyse

Probenherstellung für die Western Blot Analyse

Zellen, die in einem 24-*well* oder einem 12-*well Insert* kultiviert wurden, wurden in 33,3 μl 8 M Ureapuffer lysiert. Gewebeproben wurden in 500 μl 8 M Ureapuffer mit Hilfe des Ultra-Turaxx lysiert. Die Proben wurden durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 x g) in einem *Qiashredder* Röhrchen homogenisiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration wie unter Abschnitt 2.18.1 beschrieben bestimmt und die Proben 10 Minuten bei 70 °C in 4 x NuPAGE LDS Puffer und 10 % *reducing agent* denaturiert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 4 % - 12 % BIS-Tris Gele (Invitrogen) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftrag 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Pro Probe wurden 10 μg Protein auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelkammer bei 140 V für 180 Minuten unter Verwendung eines adäquaten Größenmarkers. Als Laufpuffer diente 1 x MES Laufpuffer mit 0,25 % Antioxidans.

Elektrotransfer von Proteinen

Der Elektrotransfer der Proteine von einem BIS-Tris Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer vertikalen Blotapparatur. Dazu wurde die PVDF-Membran zunächst mit 100 % Methanol aktiviert und anschließend mit 1 x Transferpuffer mit 20 %

Methanol und 0,2 % Antioxidans äquilibriert. Der Aufbau der Blotkammer war wie folgt:

(-) Anode

3 Lagen in 1 x Transferpuffer getränkte Blotschwämme

1 Lage in 1 x Transferpuffer getränktes Whatman Papier

BIS-Tris Gel

PVDF-Membran

1 Lage in 1 x Transferpuffer getränktes Whatman Papier

3 Lagen in 1 x Transferpuffer getränkte Blotschwämme

(+) Kathode

Der Transfer erfolgte bei 30 V für 90 Minuten mit 1 x Transferpuffer mit 20 % Methanol und 0,2 % Antioxidans.

Immundetektion

Zum quantitativen Nachweis eines Proteins auf einer PVDF-Membran wurden ein antigenspezifischer Primär-Antikörper und ein Enzym-gekoppelter Sekundär-Antikörper verwendet (Tabelle 2.31, Tabelle 2.32, Tabelle 2.33). Die PVDF-Membran wurde zunächst 1 Stunde in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. In Abhängigkeit von dem zu detektierenden Protein wurde entweder Blockierungspuffer I oder II verwendet (Tabelle 2.31, Tabelle 2.32). Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem in Blockierungspuffer verdünnten Primär-Antikörper auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde 3 x mit Waschpuffer gewaschen und für 1 Stunde mit dem Merrettich Peroxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Nachdem die Membran weitere 3 x mit Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte der indirekte Nachweis des Proteins mit Hilfe des *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity* Substrates in einer 1 : 5 Verdünnung. Das Substrat wird von der gebundenen HRP umgesetzt, wobei die bei der Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form freiwerdende Chemilumineszenz mit der *Detection Unit* (Bio-Rad) detektiert wurde. Zur Quantifizierung der Banden wurde das Programm *Image J* verwendet. Die Proben wurden entweder auf das *House keeping Gene* β -Aktin oder auf ihre nicht-phosphorylierte Form normalisiert.

2.19 Manipulation und Zucht von Mäusen

Im Alter von 3 Wochen wurden die Tiere von ihren Müttern getrennt und mit Hilfe eines Ohrstanzgerätes individuell markiert. Um den Tierbestand zu verwalten wurden Excel Tabellen und ein von Cor de Wit (Institut für Physiologie, Universität

Tabelle 2.31: Primär-Antikörper Verdünnungen in Blockierungspuffer I für Immundetektion

Antikörper	Verdünnung in Blockierungspuffer I
anti-HIF-1 α (Kaninchen, polyclonal)	1 : 500
anti-AKT (Kaninchen, monoclonal)	1 : 1000
anti-p70S6K (Thr389) (Kaninchen, monoclonal)	1 : 1000
anti- p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) (Kaninchen, monoclonal)	1 : 1000
anti-eIF4E (Ser209) (Kaninchen, polyclonal)	1 : 1000

Tabelle 2.32: Primär-Antikörper Verdünnungen in Blockierungspuffer II für Immundetektion

Antikörper	Verdünnung in Blockierungspuffer II
anti-phospho AKT (Ser 473) (Kaninchen, monoclonal)	1 : 1000
anti-phospho-p70S6K (Thr389)(Kaninchen, monoclonal)	1 : 1000
anti-phospho-eIF4E (Ser209) (Kaninchen, polyclonal)	1 : 1000
anti-phospho-Erk (E4) (Maus, monoclonal)	1 : 500

Tabelle 2.33: Sekundär-Antikörper Verdünnungen für Immundetektion

Antikörper	Verdünnung in Waschpuffer
HRP-anti-Kaninchen (Ziege, polyclonal)	1 : 2000
HRP-anti-Ziege (Kaninchen, polyclonal)	1 : 2000

zu Lübeck) generiertes Datenbankprogramm verwendet.

2.19.1 Schwanzbiopsien

Im Anschluß an die Markierung der Mäuse und dem Absetzen von der Mutter, wurden Schwanzbiopsien entnommen. Es wurden ca. 0,5 cm lange Schwanzstücke mit einem Skalpell entfernt und bei -20°C bis zur DNA-Isolation gelagert (Kapitel 2.17.1).

2.19.2 Hypoxie bei Mäusen

Die Mäuse wurden in einer geschlossenen Kammer 3 Stunden einer systemischen normobarischen Hypoxie ausgesetzt. Der Sauerstoffdruck wurde von 130 mmHg auf 65 mmHg reduziert, indem Sauerstoff durch Stickstoff unter Verwendung einer D21002 Pumpe ersetzt wurde. Der Sauerstoffdruck und die Tiere wurden über den gesamten Verlauf des Experiments beobachtet. Die Mäuse wurden unverzüglich nach Ende der Hypoxie dekapitiert und das Gewebe in 8 M Urea Puffer lysiert.

2.19.3 Generierung einer Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out*-Mauslinie

Um Astrozyten-spezifische HIF-1 α *knock-out*-Mäuse zu generieren wurden B6.129-HIF1a^{tm3Rsjo}/J und FVB-Tg(GFAP-cre)25Mes/J Mäuse gekreuzt. Das Exon 2 des HIF-1 α -Gens ist in B6.129-HIF1a^{tm3Rsjo}/J Mäusen mit Cre-LoxP-Sequenzen flankiert ([154]). Die FVB-Tg(GFAP-cre)25Mes/J Mäuse besitzen ein Transgen, welches für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Astrozyten-spezifischen humanen GFAP-Promotors codiert. Dabei ist zu beachten, dass die für das Cre-Rekombinase-Transgen homozygoten Nachkommen nicht überlebensfähig sind ([196]). Nachkommen beider Mauslinien, die sowohl das von Cre-LoxP-Sequenzen flankierte HIF-1 α -Gen, also auch das transgen für die Cre-Rekombinase besitzen, sollten einen Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out* aufweisen (Kapitel 1.4). Für die geplanten Tierversuche wurden Tiere benötigt, die homozygot für das gefloxt HIF-1 α Allel sind und das Transgen für die Cre-Rekombinase aufweisen. Als Kontrolltiere wurden Tiere verwendet, welche homozygot für das gefloxt HIF-1 α -Gen waren, aber keine Cre-Rekombinase aufwiesen. Diese Tiere wurden bei der Kreuzung der 3. Generation erzeugt (Abbildung 2.1).

P0	HIF(fl/fl)	X	Cre(+/-)
E1	50% HIF(fl/wt) Cre(+/-)		50% HIF(fl/wt) Cre(-/-)
P1	HIF(fl/wt) Cre(+/-)	X	HIF(fl/wt) Cre(+/-)
E2	25 % HIF(fl/wt) Cre(+/-)		25 % HIF(fl/wt) Cre(-/-)
	12,5 % HIF(fl/fl) Cre(-/-)		12,5 % HIF(wt/wt) Cre(-/-)
	12,5 % HIF(fl/fl) Cre(+/-)		12,5 % HIF(wt/wt) Cre(+/-)
P2	HIF(fl/wt) Cre(+/-)	X	HIF(fl/fl)Cre(+/-)
E3	25 % HIF(fl/fl) Cre(+/-)		25 % HIF(fl/wt) Cre(+/-)
	25 % HIF(fl/wt) Cre(-/-)		12,5 % HIF(fl/fl) Cre(-/-)
P3	HIF (fl/fl)Cre(+/-)	X	HIF (fl/fl)Cre(+/-)
E4	50 % HIF (fl/fl)Cre(+/-)		50% HIF (fl/fl)Cre(-/-)

Abbildung 2.1: Verpaarungsstrategie zur Generierung von Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out*-Mäusen. Ausgehend von B6.129-HIF1 $\alpha^{tm3Rsj0}/J$ (HIF(fl/fl)) und FVB-Tg(GFAP-cre)25Mes/J (Cre+/-) Mäusen wurden durch Kreuzen der Nachkommen Astrozyten-spezifische HIF-1 α *knock-out*-Mäuse, sowie Kontroll-Tiere ohne Cre-Rekombinase erzeugt.

2.19.4 Fütterungsversuche mit Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out*-Mäusen

Die Mäuse wurden im Alter von 4 Wochen in 4 Untersuchungsgruppen aufgeteilt und mit einer Hochfett-Diät bzw. einer Kontroll-Diät und Wasser ad libidum gefüttert (Tabelle 2.34). Das Futter wurde wöchentlich erneuert und die Tiere gewogen. Eine Blutzuckermessung mit dem Ascensia Elite Xl Blutzuckermessgerät wurde nach 21 Wochen Fütterung durchgeführt. Dazu haben die Tiere 24 Stunden vor der Blutentnahme gefastet. Das Blut aus der Schwanzvene der Tiere entnommen.

Tabelle 2.34: Versuchsgruppen für die Mausfütterungsversuche

Genotyp	Diät
HIF (fl/fl) Cre (+/-)	Hochfettdiät
HIF (fl/fl) Cre (-/-)	Hochfettdiät
HIF (fl/fl) Cre (+/-)	Kontrolldiät
HIF (fl/fl) Cre (-/-)	Kontrolldiät

Zur Bestimmung des respiratorischen Quotienten ($V(\text{CO}_2) \cdot \text{dt}^{-1} / V(\text{O}_2) \cdot \text{dt}^{-1}$), der Futteraufnahme und der Bewegung wurden die Mäuse nach 21 Wochen der Behandlung mit dem TSE Phenomaster untersucht. Dazu wurden die Tiere für 24 Stunden an Untersuchungskäfige gewöhnt und anschließend wurden über 24 Stunden hinweg die verschiedenen Parameter aufgezeichnet.

Ergebnisse

3.1 Expression glykolytischer Enzyme in astrozytären und neuronalen Primärkulturen

Das Gehirn von Säugetieren nimmt nur 2 % der Körpermasse ein, trägt aber unter Ruhebedingungen 25 % zum Gesamtenergieverbrauch bei [171]. 80 % der vom Gehirn verbrauchten Energie wird von aktiven Neuronen benötigt [152]. Es wurde jedoch gezeigt, dass Neurone nur ca. 50 % der vom Gehirn resorbierten Glukose aufnehmen, also weniger als ihr Verbrauch vermuten ließe. Astrozyten nehmen Glukose in gleichen Mengen auf wie Neurone [188]. In beiden Zellarten wird Glukose zur Energiegewinnung oxidativ phosphoryliert. Astrozyten weisen jedoch zusätzlich im Vergleich zu Neuronen eine erhöhte glykolytische Aktivität auf. Vor allem während neuronaler Aktivität findet in Astrozyten Glykolyse statt, wobei Laktat freigesetzt wird [105, 73]. Die molekularen Ursachen für diese erhöhte glykolytische Aktivität wurde bisher noch nicht eingehend untersucht. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten Unterschiede in der Expression glykolytischer Enzyme, sowie Glukose- und Laktattransportern in primär-kultivierten cortikalen Astrozyten und Neuronen identifiziert werden.

3.1.1 Etablierung von cortikalen astrozytären und neuronalen Primärkulturen

Um Unterschiede in der mRNA-Expression von glykolytischen Enzymen, sowie Glukose- und Laktattransportern, in Astrozyten und Neuronen differentiell untersuchen zu können, wurde zunächst die Kultivierung von primären Astrozyten und Neuronen aus murinen Cortices wie unter Kapitel 2.15.2 und 2.15.3 beschrieben etabliert und auf Reinheit untersucht. Als Astrozyten-spezifischer Zellmarker diente das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Zur Identifizierung von Neuronen wurde ein *neurofilament, heavy peptide* (Nefh)-spezifischer Antikörper bzw. Primer verwendet.

Für die immuncytochemische Färbung wurden beide Primärkulturen mit dem

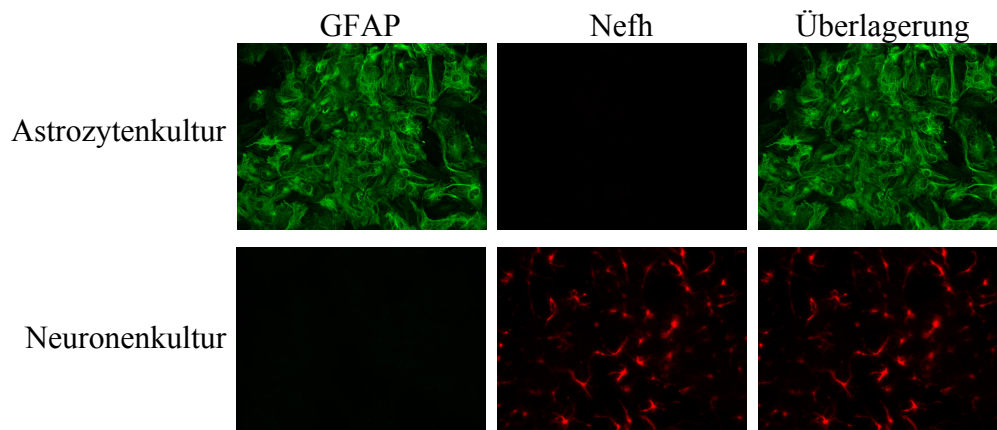


Abbildung 3.1: Immunocytochemische Färbung der astrozytären und neuronalen Primärkulturen. Die Primärkulturen wurden mit dem Astrozyten-spezifischen Kaninchen anti-GFAP Antikörper und dem Neuronen-spezifischen Maus anti-Nefh Antikörper immunocytochemisch gefärbt. Die primären Antikörper wurden mit Hilfe adäquater, Fluorophor-gekoppelter, sekundärer Antikörper visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am konfokalen *laser scanning* Mikroskop LSM TCS S5P. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt.

Kaninchen anti-GFAP Antikörper, der mit Hilfe eines entsprechenden Alexa 488-gekoppelten sekundären Antikörpers visualisiert wurde, und dem Maus anti-Nefh Antikörper, der mit einem Alexa 555-gekoppelten sekundären Antikörper gebunden wurde, doppeltgefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 3.1).

Diese Fluoreszenzfärbung zeigt, dass die astrozytäre und die neuronale Primärkultur weitgehend rein sind. Die Analyse der mRNA-Expressionsniveaus von GFAP und Nefh in den Primärkulturen mit Hilfe von qRT-PCR bestätigt dieses Ergebnis (Abbildung 3.2)

3.1.2 Analyse der mRNA-Expression von glykolytischen Enzymen in astrozytären und neuronalen corticalen Primärkulturen

Nachdem die Kulturbedingungen für murine corticale Astrozyten und Neurone etabliert waren, wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse mit Hilfe der qRT-PCR durchgeführt. Die bei der qRT-PCR verwendeten spezifischen Primer für glykolytische Enzyme, Glukose- und Laktattransporter sind in Kapitel 2.6 aufgelistet.

Die vergleichende Expressionsanalyse glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter (Abbildung 3.3) zeigt, dass die Glukosetransporter 1 und 2 (Glut1/2) in Astrozyten signifikant höher exprimiert werden, als in Neuronen. Im Gegensatz dazu wird der Glukosetransporter 3 (Glut3) in Neuronen höher exprimiert. Eine große Anzahl glykolytischer Enzyme wie die Hexokinase 2 (HK2), 6-Phosphofrukto-

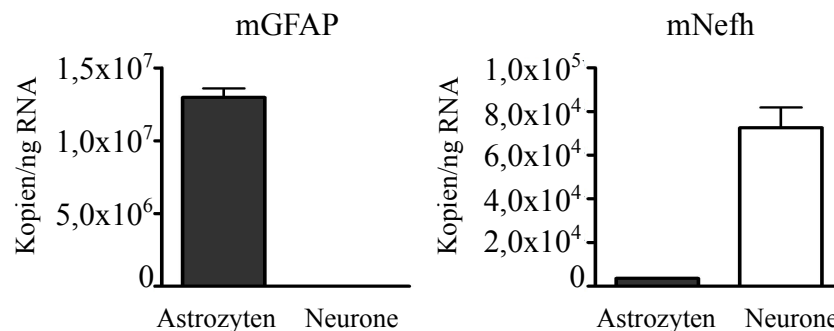


Abbildung 3.2: mRNA-Expressionsniveaus von mGFAP und mNefh in primären Astrozyten- und Neuronenkulturen. Die primären Astrozyten bzw. Neurone wurden 21 bzw. 7 Tage kultiviert. Anschließend wurde eine qRT-PCR Analyse zur Bestimmung des Astrozyten-spezifischen GFAP und des Neuronen-spezifischen Nefh mRNA-Niveaus durchgeführt.

2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3 (PFKFB3), Aldolase A (Aldo A), Enolase 1 (Eno1), Laktatdehydrogenase B (LDH B) und Phosphofruktokinase L (PFKL), sowie die Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1) zeigen in Astrozyten ein signifikant höheres Expressionsniveau als in Neuronen. Im Gegensatz dazu wird die Hexokinase 1 (HK1) in Neuronen stärker exprimiert. Die Laktatdehydrogenase A (LDH A) und Pyruvatdehydrogenasekinase 1 (PDK1) werden hingegen nicht differentiell exprimiert. Der Monocarboxylattransporter 2 (MCT2) wird in Neuronen stärker exprimiert, während die Monocarboxylattransporter 4 und 1 (MCT4, MCT1) in Astrozyten bevorzugt exprimiert werden. Enzyme der Glykogensynthese und des Glykogenabbaus wie die Glykogensynthase (GS), die Glykogenphosphatase (GPH BB) und das *debranching enzyme* (AGL) werden ebenso wie der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer-Faktor 1 α (HIF-1 α) nicht differentiell exprimiert.

3.2 Nachweis von HIF-1 α im murinen Gehirn unter normoxischen Bedingungen

Nachdem im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, dass Astrozyten eine Vielzahl glykolytischer Enzyme sowie Glukose-/Laktattransporter höher exprimieren als Neurone, stellt sich die Frage nach der transkriptionellen Regulation dieses Expressionsmusters. Es fällt auf, dass die meisten der in Astrozyten hochexprimierten Enzyme und Transporter bekannte Zielgene des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α (HIF-1 α) sind [89, 169, 185]. Es wurde daher im Folgenden untersucht, ob HIF-1 α eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter in Astrozyten spielt.

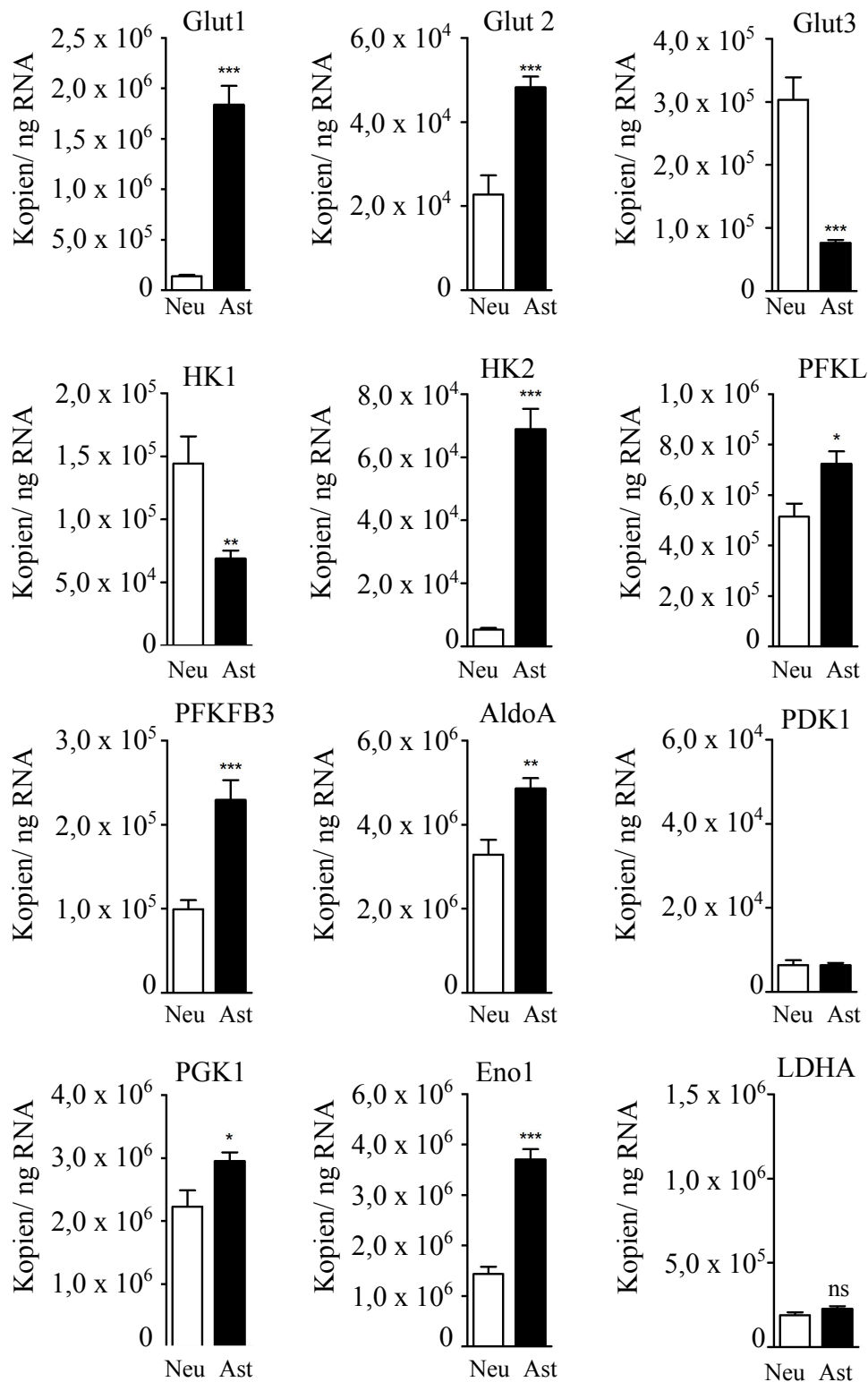


Abbildung 3.3: Differentielle Expressionsanalyse primärer Astrozyten und Neurone. Astrozyten (Ast) und Neurone (Neu) wurden aus jeweils 6 Tieren präpariert und pro Tier separat kultiviert. Anschließend wurden eine qRT-PCR Analyse durchgeführt. Glukosetransporter 1,2,3 (Glut1/2/3), Hexokinase 1/2 (HK1/2), Phosphofruktokinase L (PFKL), 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3 (PFKFB3), Aldolase A (Aldo A), Pyruvatdehydrogenasekinase 1 (PDK1), Enolase 1 (Eno1), Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1), Laktatdehydrogenase A (LDH A). Es wurde ein Student's t-test durchgeführt (n = 6, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant)

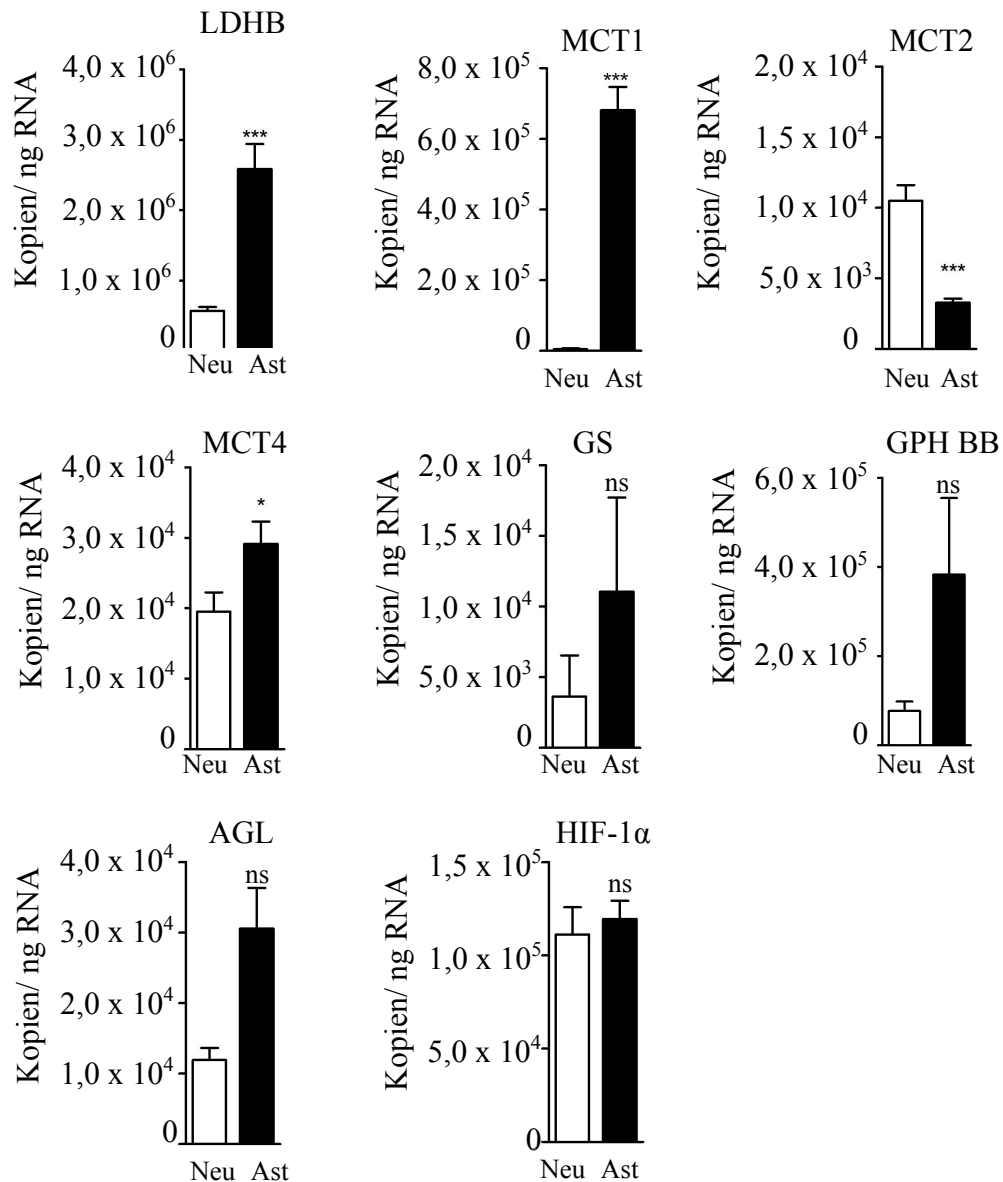


Abbildung 3.4: Fortsetzung Abbildung 3.3. Laktatdehydrogenase B (LDHB), Monocarboxylattransporter 1,2,4 (MCT 1/2/4), Glykogensynthase (GS), Glykogenphosphatase (GPH BB), *debranching enzyme* (AGL), Hypoxie-induzierbarer-Faktor 1 α (HIF-1 α). Es wurde ein Student's t-test durchgeführt (n = 6, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).



Abbildung 3.5: HIF-1 α -Stabilisierung in murinem Gewebe. Die Mäuse wurden für 3 Stunden einer normobaren Hypoxie (HOX) bzw. einer Normoxie (NOX) ausgesetzt. Das entnommene Gewebe (Cortex (C), Cerebellum (Ce), Leber (L), Niere (N)) wurde schnellstmöglich in 8 M Ureapuffer lysiert. Es wurden 100 ng Protein in die Western Blot Analyse mit einem HIF-1 α -spezifischen Antikörper eingesetzt. Als Kontrolle für die Western Blot Analyse wurde ein Lysat aus Astrozyten, die mit einer stabilen HIF-1 α -Mutante transfiziert worden waren, mitgeführt (M). Es wurden 2 unabhängige Versuche durchgeführt.

3.2.1 Stabilisierung von HIF-1 α in murinem Gewebe bei Normoxie und Hypoxie

Mit Hilfe einer Western Blot Analyse sollte die Stabilisierung von HIF-1 α im Gehirn von normoxischen Mäusen nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurden Mäuse wie unter Kapitel 2.19.2 beschrieben für 3 Stunden hypoxischen Verhältnissen ausgesetzt. Anschließend wurden die normoxischen und hypoxischen Mäuse schnellstmöglich dekapitiert, Gehirn, Leber und Niere entnommen und diese in 8 M Ureapuffer homogenisiert. Abbildung 3.5 zeigt eine Western Blot Analyse des Gewebes eines hypoxischen Tieres (HOX) und eines normoxischen Tieres (NOX). Als Kontrolle für das Funktionieren der Western Blot Analyse wurde Zelllysate aus mit einer stabilen HIF-1 α -Mutante transfizierten Astrozyten eingesetzt (M).

Unter Hypoxie wird HIF-1 α im Cortex (C), Cerebellum (Ce), Leber (L) und Niere (N) stabilisiert. Unter Normoxie wird stabilisiertes HIF-1 α -Protein im Cortex und im Cerebellum, nicht aber in Leber und Niere detektiert.

3.2.2 Lokalisation von HIF-1 α -mRNA im murinen Gehirn

Die Lokalisation der HIF-1 α -mRNA sollte im murinen Gehirn mit Hilfe einer nicht-radioaktiven *in situ*-Hybridisierung bestimmt werden. Als Positivkontrolle für die *in situ*-Hybridisierung dienten Oligonukleotid Orexin-Sonden, für die bereits gezeigt wurde, dass sie spezifische Neurone im lateralen Hypothalamus markieren [156].

Die spezifische Markierung durch die Orexin-Sonde von Neuronen im lateralen Hypothalamus zeigt, dass diese Methode erfolgreich durchgeführt wurde (Abbildung 3.6 A). Abbildung 3.6 B und C zeigen, dass das mit der HIF-1 α -Sonde erhaltene Signal nicht höher als der unspezifische Hintergrund ist. Ein Grund dafür könnte eine zu geringe basale mRNA-Expression von HIF-1 α im Gehirn sein.

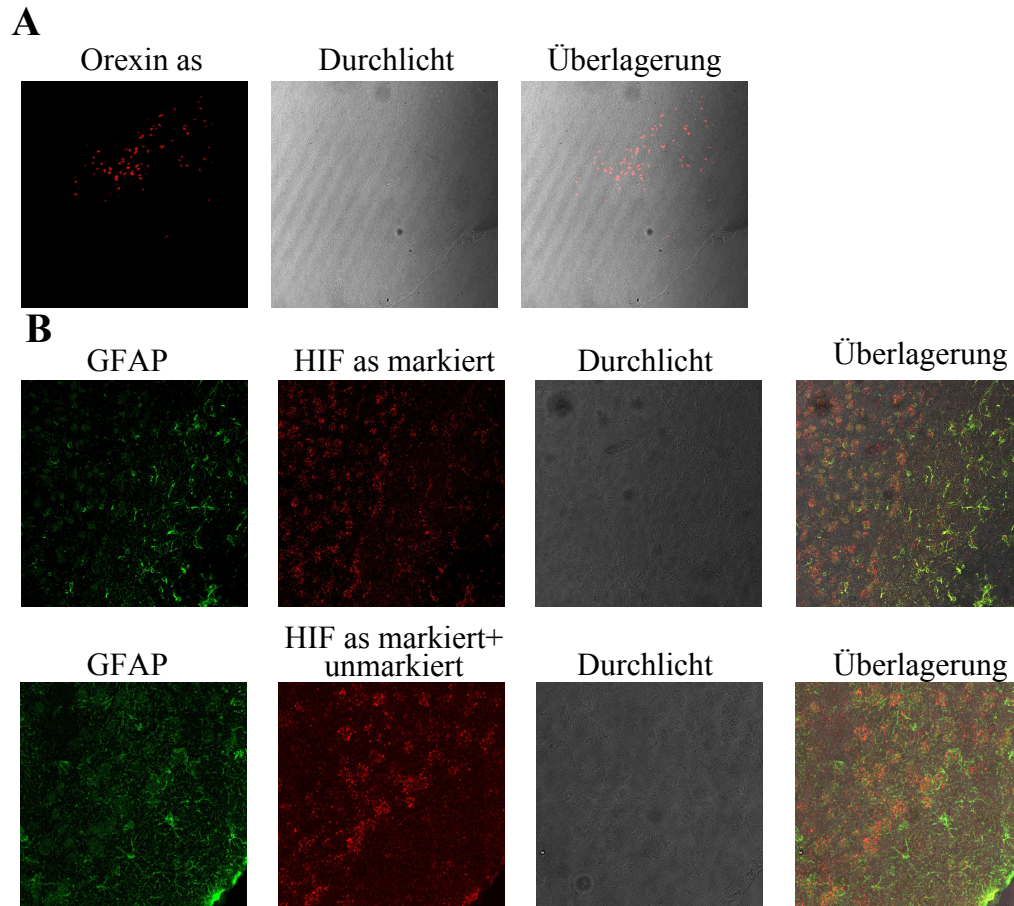


Abbildung 3.6: Nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung mit Orexin- und HIF-1 α -spezifischen Oligonukleotid-Sonden. A) Die *in situ*-Hybridisierung wurde mit Orexin-spezifischen DIG-markierten Oligonukleotid-Sonden als Positivkontrolle durchgeführt. Die Visualisierung des Signals erfolgte mit dem TSA Cy5 Amplifikations Kit. B) Die *in situ*-Hybridisierung wurde mit HIF-1 α -spezifischen DIG-markierten Oligonukleotid-Sonden durchgeführt. Die Visualisierung des Signals erfolgte mit dem TSA Cy3 Amplifikations Kit. Um die Spezifität des Signals zu untersuchen, wurde die markierte Sonde mit unmarkierter Sonde im Überschuss versetzt (unten). Im Anschluss an die *in situ*-Hybridisierung wurden die Astrozyten mit einem GFAP-spezifischen Antikörper und einem Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte am konfokalen *laser scanning* Mikroskop LSM TCS S5P. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt.

3.3 NO-induzierte HIF-1 α -Stabilisierung in primären Astrozyten

Nachdem die Stabilisierung von HIF-1 α unter Normoxie im Gehirn bestätigt wurde, sollte im nächsten Schritt untersucht werden ob der bekannte HIF-1 α -Stabilisator NO im Gehirn an der Stabilisierung von HIF-1 α beteiligt sein könnte [28]. Da in Versuchen des Kooperationspartners Luc Pellerin DetaNONOate (Deta), welches NO kontinuierlich über 24 Stunden hinweg freisetzt, als ein effektiver NO-Donor identifiziert wurde [112], wurde in dieser Arbeit Deta als NO-Donor verwendet.

3.3.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der NO-vermittelten HIF-1 α -Stabilisierung

Zunächst wurden Bedingungen identifiziert, die zu einer Stabilisierung von HIF-1 α in primären Astrozyten führen. Um eine Hypoxie am Boden der Zellkulturplatten auszuschließen, wurden *Imaging Plates* mit Sauerstoff-durchlässigem Boden für die Kultivierung der primären Astrozyten verwendet. Die Astrozyten wurden mit 0 - 1,2 mM NO-Donor Deta für 0 - 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt.

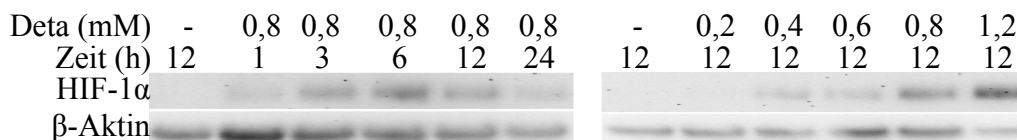


Abbildung 3.7: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Deta-vermittelten HIF-1 α -Stabilisierung. Astrozyten wurden mit dem NO-Donor DetaNONOate (Deta) (0 - 1,2 mM) für 1 - 24 Stunden (h) behandelt. Für die Detektion von HIF-1 α und β -Aktin in der anschließenden Western Blot Analyse wurden Primär- und Sekundärantikörper entsprechend den Tabellen 2.31 und 2.33 eingesetzt. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist einer aus 2 unabhängigen Versuchen.

Bereits nach 1 Stunde Inkubation der Astrozyten mit 0,8 mM Deta wird eine HIF-1 α -Stabilisierung beobachtet, welche nach 6 Stunden ihren Höhepunkt erreicht und nach 24 Stunden abnimmt. Die Stabilisierung von HIF-1 α ist zudem abhängig von der Deta-Konzentration. Die maximale Stabilisierung wird mit 1,2 mM Deta erreicht (Abbildung 3.7). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Astrozyten in den nachfolgenden Versuchen für 12 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt.

3.3.2 Stabilisierung von HIF-1 α durch NO in Astrozyten, aber nicht in Neuronen

Astrozyten und Neurone wurden für 12 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt.

In der anschließenden Western Blot Analyse wird eine NO-induzierte Stabilisierung von HIF-1 α in Astrozyten, aber nicht in Neuronen beobachtet (Abbildung 3.8).

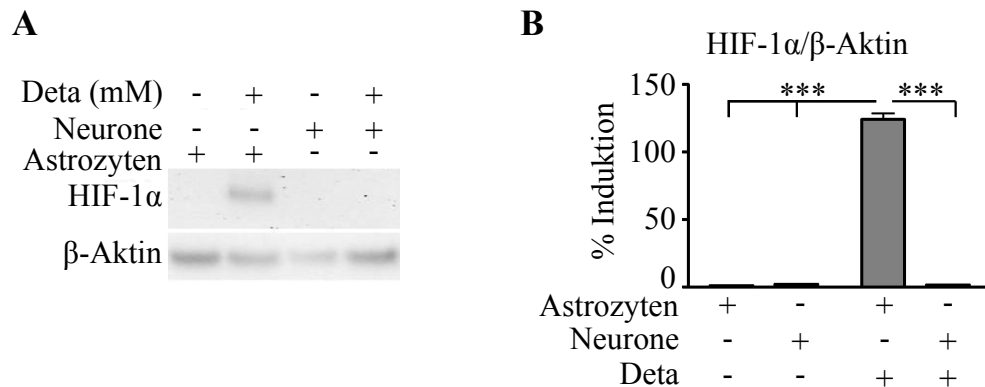


Abbildung 3.8: NO-induzierte HIF-1 α -Stabilisierung in Astrozyten und Neuronen. Astrozyten und Neurone wurden mit 0,8 mM Deta für 12 Stunden behandelt. Anschließend wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Für die Detektion von HIF-1 α und β -Aktin in der anschließenden Western Blot Analyse wurden Primär- und Sekundärantikörper entsprechend den Tabellen 2.31 und 2.33 eingesetzt. Gezeigt ist ein beispielhafter Western Blot (A) und eine Quantifizierung über 2 unabhängige Versuche (B). HIF-1 α wurde auf die Ladekontrolle β -Aktin normiert und anschließend auf unbehandelte Astrozyten (=1) bezogen. Es wurde ein 2-way ANOVA mit einem Bonferroni Post-test durchgeführt (n = 2, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

3.3.3 Lokalisation des durch NO stabilisierten HIF-1 α im Zellkern

Da stabilisiertes HIF-1 α als Transkriptionsfaktor im Zellkern wirkt, wurde die Lokalisation von HIF-1 α nach Deta-Behandlung untersucht. Dazu wurden Astrozyten 12 Stunden mit 0,8 mM Deta inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von HIF-1 α durchgeführt (Abbildung 3.9).

Dieser Versuch belegt, dass NO nicht nur zu einer Stabilisierung, sondern auch zu einer Lokalisation von HIF-1 α im Zellkern führt.

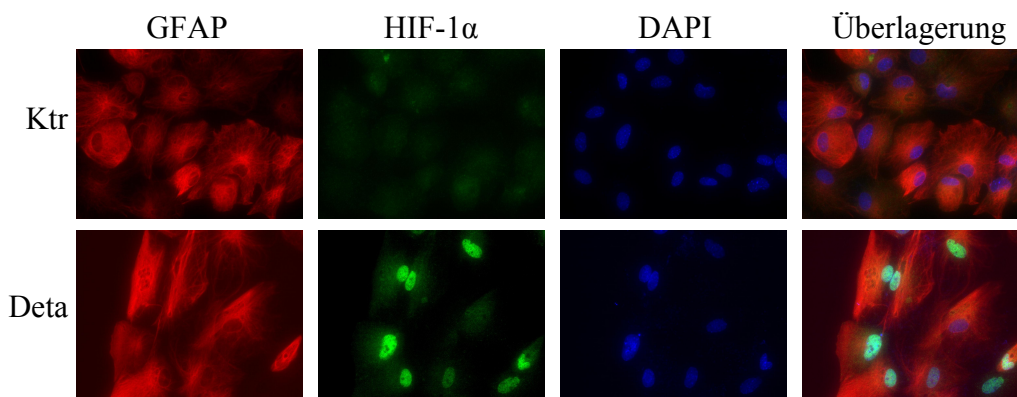


Abbildung 3.9: Lokalisation von HIF-1 α in Deta-behandelten Astrozyten. Astrozyten wurden 12 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt. Für die Immunfärbung wurden Antikörper entsprechend den Tabellen 2.23 und 2.24 eingesetzt. Der Astrozyten-spezifische Marker GFAP ist rot zu sehen, während HIF-1 α grün dargestellt ist. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert (blau). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am Leica Fluoreszenzmikroskop DMI 6000B. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt.

3.4 Abhängigkeit der NO-induzierten HIF-1 α -Stabilisierung von PI3K/AKT/mTOR- und MAPK-Signalwegen in primären Astrozyten

Nachdem gezeigt wurde, dass HIF-1 α mit Hilfe des NO-Donors DetaNONOate in primären corticalen, murinen Astrozyten stabilisiert werden kann, wurden die involvierten zellulären Signalwege untersucht. Der bisher einzige bekannte intrazelluläre Rezeptor für NO ist die lösliche Guanylatcyclase (sGC) ([142]). Daher sollte zunächst untersucht werden, ob die NO-induzierte HIF-1 α -Stabilisierung durch eine initiale Bindung des NO an die sGC vermittelt wird. Dazu wurden die primären Astrozyten mit 20 μ M sGC-Inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4, 3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) 1 Stunde vor der Zugabe von 0.8 mM Deta prä-inkubiert. Die Stabilisierung von HIF-1 α wurde mit Hilfe einer Western Blot Analyse untersucht.

Die NO-vermittelte HIF-1 α -Stabilisierung wird durch ODQ, den Inhibitor der sGC, nicht beeinflusst (Abbildung 3.10).

Es bleibt unklar, an welchen Rezeptor NO primär in der Zelle bindet. Daher wurden verschiedene Signalwege untersucht, für die bekannt ist, dass sie in die Stabilisierung von HIF-1 α involviert sein können. Für den PI3K/AKT/mTOR- und den MAPK-Signalweg wurde gezeigt, dass sie zur HIF-1 α Stabilisierung in verschiedenen Zelllinien beitragen [87, 36]. Die Proteinkinasen des PI3K/AKT/mTOR- und des MAPK-Signalwegs werden durch Phosphorylierung aktiviert.

Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde untersucht, ob und welche der an den

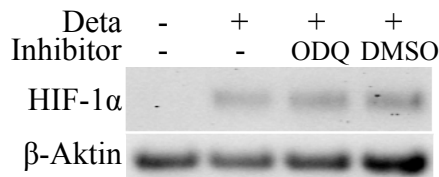


Abbildung 3.10: Inhibition der löslichen Guanylatcyclase (sGC). Astrozyten wurden 1 Stunde vor der Zugabe von 0,8 mM Deta mit 20 μ M ODQ, das in 1 μ l DMSO gelöst war, behandelt. Um einen Einfluss des Lösungsmittels DMSO auszuschließen, wurden zur Kontrolle Zellen mit Deta und 1 μ l DMSO behandelt. Im Anschluss an die 12-stündige Inkubation wurde eine Analyse nach Western durchgeführt. Für die Detektion von HIF-1 α und β -Aktin, das als Ladekontrolle diente, wurden Primär- und Sekundär-Antikörper entsprechend den Tabellen 2.31 und 2.33 eingesetzt.

Signalwegen beteiligten Proteinkinasen in Folge einer Deta-Behandlung der Astrozyten phosphoryliert und damit aktiviert werden. Zusätzlich wurden spezifische Inhibitoren der Kinasen eingesetzt. Hiermit konnte untersucht werden, ob eine Inhibition einer in der Signalkaskade übergeordnete Kinase die NO-induzierte Phosphorylierung einer folgenden Kinase unterbindet. Die Inhibitoren, ihre Zielkinasen, sowie die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 2.21 aufgeführt.

Die Western Blot Analysen belegen, dass die Serin/Threonin Kinase AKT bei Zugabe von Deta phosphoryliert vorliegt. Die Inhibition der PI3K, die in der Signalkaskade AKT übergeordnet ist, hebt die NO-induzierte AKT Phosphorylierung auf (Abbildung 3.11 A). Im Gegensatz dazu, konnte keine NO-vermittelte Phosphorylierung der Map-Kinase Kinase (ERK) nachgewiesen werden (Abbildung 3.11 B).

Der Elongationsfaktor 4E (eIF4E) sowie die p70S6-Kinase (pS6K) sind essentielle Faktoren bei der Initiation der Translation und werden sowohl durch den MAPK-Signalweg als auch durch den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg aktiviert [36].

Anhand der Western Blot Analysen in Abbildung 3.12 A ist gezeigt, dass eIF4E durch die Behandlung mit Deta in Astrozyten nicht verstärkt phosphoryliert wird, sondern im Gegenteil eine verringerte Phosphorylierung aufweist. Die pS6K weist dagegen eine NO-induzierte gesteigerte Phosphorylierung auf. Diese wird durch Inhibition der in der Signalkaskade oberhalb liegenden PI3K, mTOR und MEK1 signifikant reduziert (Abbildung 3.12 B).

Die in Abbildungen 3.11 und 3.12 gezeigten Untersuchungen belegen, dass Deta zu einer Aktivierung des PI3K-Signalweges und einer Induktion der Translation führt. Auf Grund dessen wurde anschließend untersucht, ob eine Inhibition des PI3K- und des MAPK-Signalwegs Einfluss auf die NO-abhängige HIF-1 α -Stabilisierung hat.

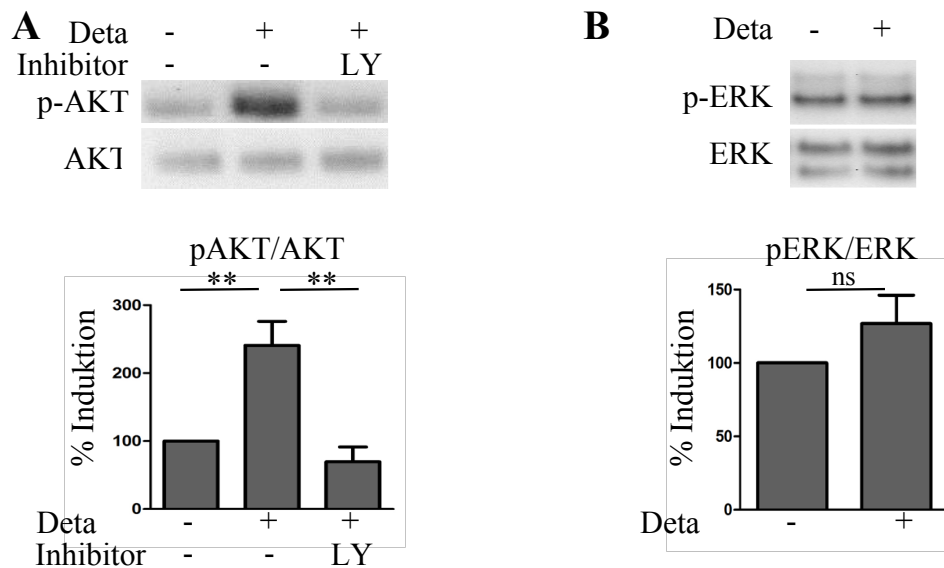


Abbildung 3.11: NO-induzierte Phosphorylierung von AKT und der Map Kinase (ERK). A) Vor der Behandlung mit 0.8 mM Deta für 12 Stunden wurden die Astrozyten für 1 Stunde mit 20 μ M LY294002 prä-inkubiert. Die Antikörper zur Detektion von phosphoryliertem AKT und Gesamt-AKT, das als Ladekontrolle diente, wurden wie in Tabelle 2.31 und 2.32 angegeben verdünnt und mit adäquaten sekundären Antikörpern visualisiert (Tabelle 2.33). B) Die Astrozyten wurden für 12 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt. Phosphoryliertes ERK und die Ladekontrolle ERK-Gesamt wurden mit Hilfe der in Tabelle 2.31, 2.32 und 2.33 aufgeführten spezifischen Antikörper in der Western Blot Analyse detektiert. Die Signalstärke der Banden wurde mit Hilfe des Programms ImageJ quantifiziert und auf die Ladekontrolle normiert. Die Werte wurden auf die unbehandelten Astrozyten (100 %) des jeweiligen Versuches bezogen. Gezeigt sind jeweils ein beispielhafter Western Blot und die Quantifizierung über 4 unabhängige Versuche. Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde ein 1way ANOVA mit einem Bonferroni Post-test durchgeführt (n = 4, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

Tatsächlich wird die NO-induzierte Stabilisierung von HIF-1 α durch die Verwendung der Kinase-Inhibitoren LY, Rap und PD signifikant vermindert (Abbildung 3.13).

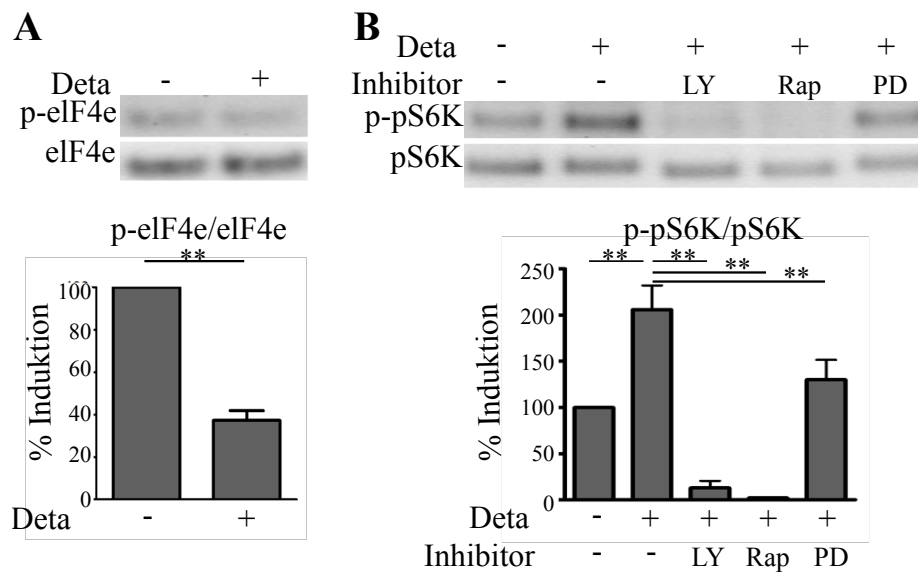


Abbildung 3.12: Phosphorylierung der Translationsfaktoren eIF4E und p70S6K. Die Astrozyten wurden mit 0,8 mM Deta für 12 Stunden behandelt. B) Vor der Zugabe des Deta wurden die Zellen für 1 Stunde mit 20 μ M LY294002 (LY), 25 μ M PD98059 (PD) und 0,1 μ M Rapamycin (Rap) prä-inkubiert. Die phosphorylierten Formen des Elongationsfaktor 4E (eIF4E) und der p70S6-Kinase (pS6K), sowie Gesamt-eIF4E bzw. -p7S6K, wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper (Tabelle 2.31, 2.32 und 2.33) in der Western Blot Analyse detektiert. Die Signalstärke der Banden wurde mit Hilfe des Programms ImageJ quantifiziert und auf die Ladekontrolle normiert. Die Werte wurden auf die unbehandelten Astrozyten (100 %) bezogen. Gezeigt sind jeweils ein beispielhafter Western Blot und die Quantifizierung über 4 unabhängige Versuche. Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde ein 1way ANOVA mit einem Bonferroni Post-test durchgeführt (n = 4, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

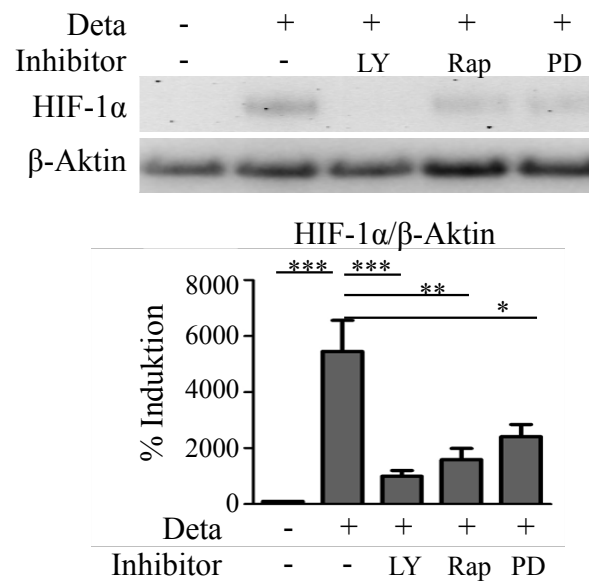


Abbildung 3.13: Reduktion der NO-induzierten HIF1- α -Stabilisierung durch Inhibition des PI3K/AKT/mTOR- und des MAPK-Signalwegs. Die primären Astrozyten wurden vor dem Zusatz von 0,8 mM Deta für 1 Stunde mit 20 μ M LY294002 (LY), 25 μ M PD98059 (PD), 0,1 μ M Rapamycin (Rap) prä-inkubiert. Die Detektion von HIF-1 α und der Ladekontrolle β -Aktin erfolgte mit adäquaten Antikörpern (Tabelle 2.31, 2.32 und 2.33). Die Signalstärke der Banden wurde mit Hilfe des Programms ImageJ quantifiziert und auf die Ladekontrolle normiert. Gezeigt ist ein beispielhafter Western Blot und die Quantifizierung über 4 unabhängige Versuche. Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde ein 1way ANOVA mit einem Bonferroni Post-test durchgeführt (n = 4, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

3.5 NO-regulierte mRNA-Expression und Laktatproduktion in Astrozyten

Die vorhergehenden Versuche haben gezeigt, dass glykolytische Enzyme und Glukose-/Laktattransporter in primären Astrozyten- und Neuronenkulturen differentiell exprimiert werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 α , welcher die Transkription glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter reguliert (Kapitel 1.2.2), auch bei Normoxie im Gehirn von Mäusen stabilisiert vorliegt. Zudem kann *in vitro* das Signalmolekül NO in Astrozyten HIF-1 α stabilisieren. Dies führt zu einer Translokation des Proteins in den Zellkern.

Im Folgenden wurde daher untersucht, ob NO auch zu einer gesteigerten Transkription glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter und damit zu einer gesteigerten Glykolyse in Astrozyten führt.

3.5.1 NO-vermittelte Regulation der Genexpression glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter in primären Astrozyten

Die NO-vermittelte Regulation der mRNA-Genexpression verschiedener Enzyme, wurde überprüft, indem Astrozyten für 0, 6, 12 und 24 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt wurden. Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA transkribiert und eine qRT-PCR Analyse durchgeführt. Die genspezifischen Primer sind in Kapitel 2.6 aufgelistet.

Die Expression des Glut1 und 3, nicht aber die des Glut 2, wird NO-vermittelt hochreguliert. Das gleiche gilt für die glykolytischen Enzyme HK2, PFKL, AldoA, PGK1, Eno1, wobei auch Enzyme betroffen sind, die basal in Astrozyten und Neuronen nicht differentiell exprimiert werden, z.B. PDK 1. Die Expression des Astrozyten-spezifischen MCT4 wird versuchsabhängig 20 - 50-fach durch NO induziert. Im Gegensatz dazu wird der MCT1, der ebenfalls von Astrozyten exprimiert wird, nicht durch NO reguliert. Das mRNA-Niveau der GS wird NO-abhängig gesteigert, wohingegen das der GPH BB reduziert wird. Die Induktion der glykolytischen Enzyme und Glukose-/Laktattransporter ist spezifisch, da zum Beispiel β -Aktin oder der MCT1 nicht in ihrer Expression beeinflusst werden (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15).

Analog zu dem Ergebnis, dass NO in primären Neuronen nicht zu einer HIF-1 α -Stabilisierung führt (Kapitel 3.3.2), reguliert die Deta-Behandlung von Neuronen die Expression von Glut1, HK2 und MCT4 nicht (Abbildung 3.16).

Die Behandlung der primären Astrozyten mit Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-

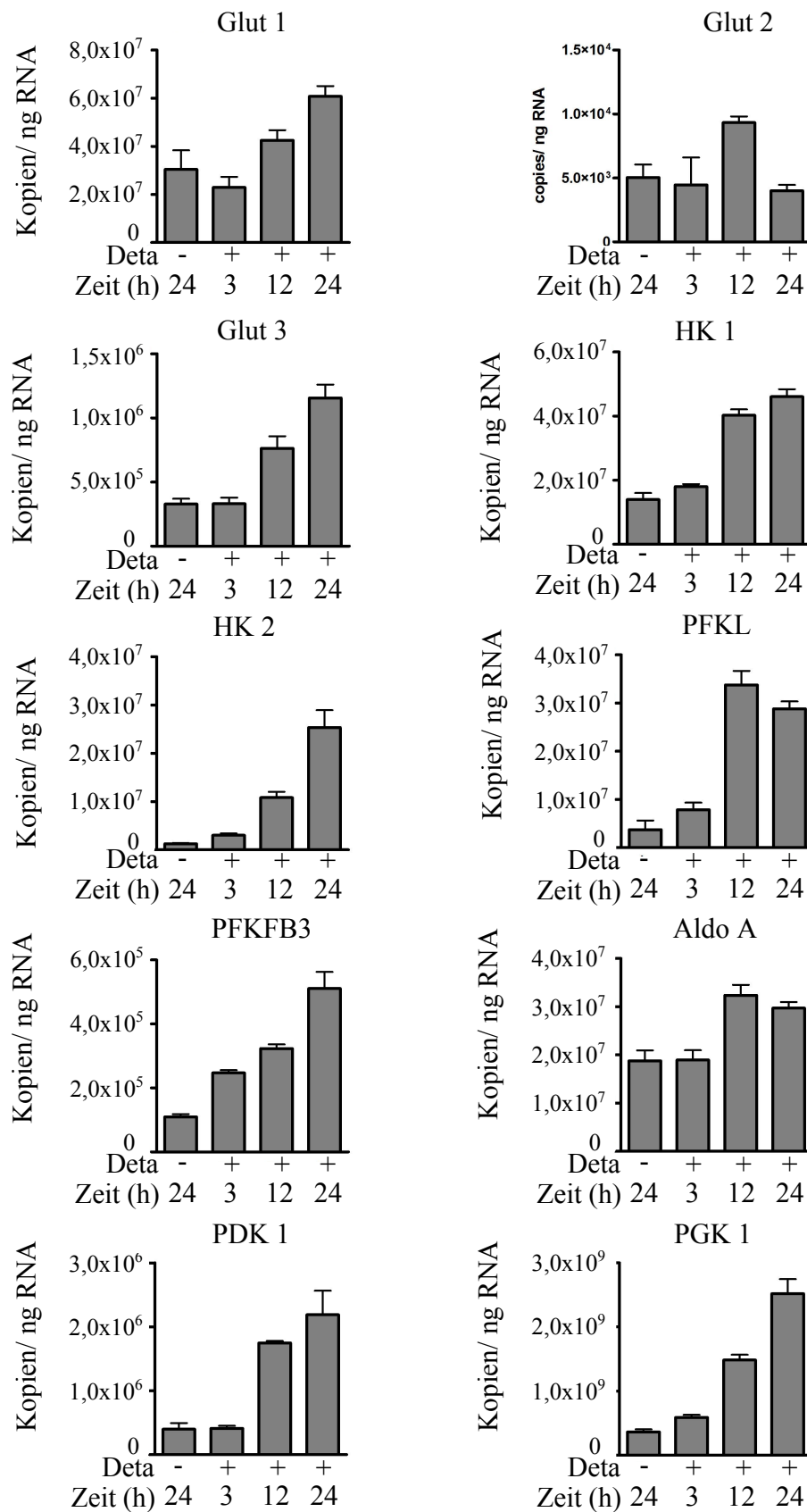


Abbildung 3.14: Genexpressionsanalyse in Deta-behandelten Astrozyten. Die primären Astrozyten wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 0,8 mM Deta behandelt. Im Folgenden wurde ein qRT-PCR zur Analyse durchgeführt. Gezeigt ist einer von 3 unabhängigen Versuchen

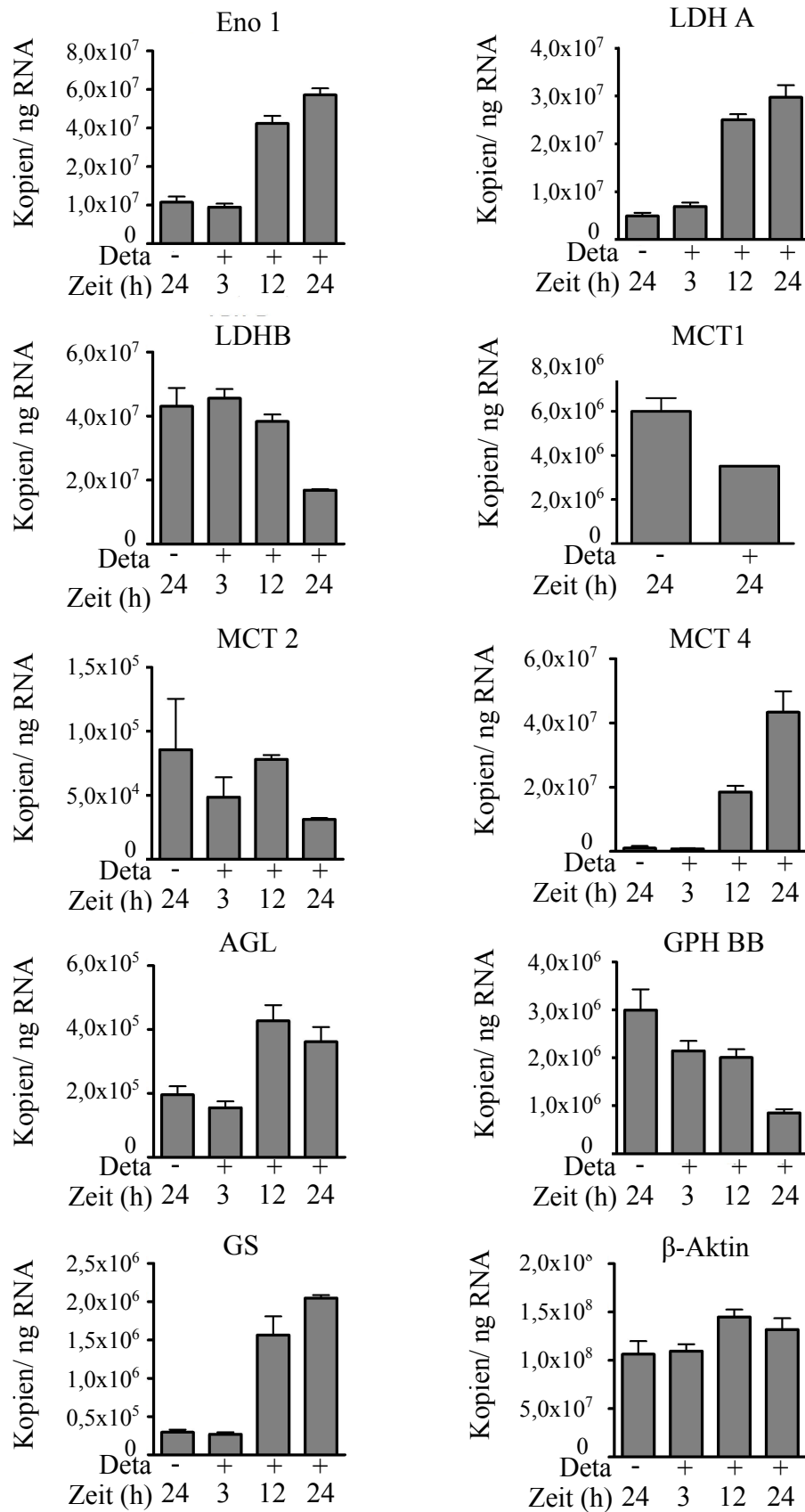


Abbildung 3.15: Abbildung 3.14 Fortsetzung

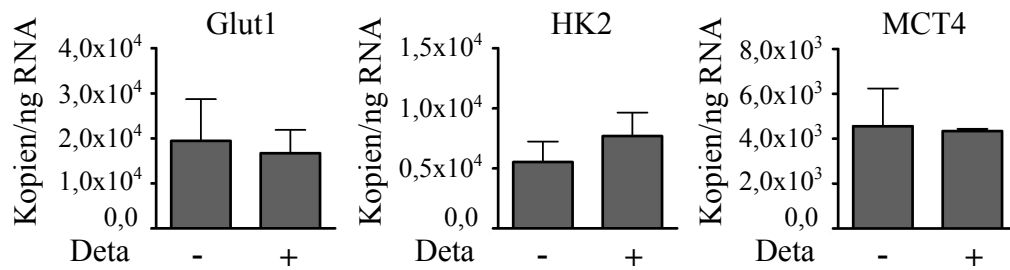


Abbildung 3.16: Genexpressionsanalyse in Deta-behandelten Neuronen. Die primären Neurone wurden 12 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt. Im Folgenden wurde ein qRT-PCR durchgeführt.

und des MAPK-Signalwegs vor der Zugabe von Deta, führt zu einer Reduktion der Deta-induzierten Genexpression von Glut1, HK2 und MCT4. β -Aktin wird weder durch Deta, noch durch die Inhibitoren oder DMSO reguliert (Abbildung 3.17).

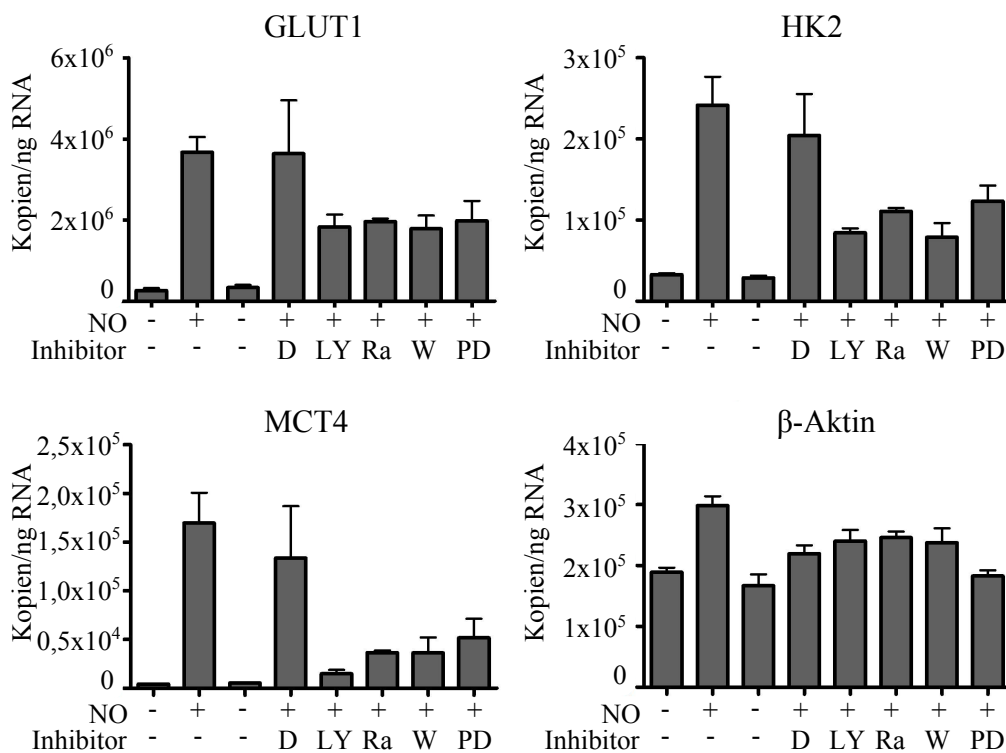


Abbildung 3.17: Genexpressionsanalyse in primären Astrozyten nach Behandlung mit Signalweg-Inhibitoren. Die primären Astrozyten wurden vor dem Zusatz von 0,8 mM Deta für 1 Stunde mit 20 μ M LY294002 (LY), 25 μ M PD98059 (PD), 0,1 μ M Rapamycin (Ra) oder Wortmannin (W) prä-inkubiert. Da die Inhibitoren in DMSO (D) gelöst waren, wurde Astrozyten zur Kontrolle mit DMSO behandelt. Es wurde ein qRT-PCR durchgeführt. Gezeigt ist einer von 3 unabhängigen Versuchen.

3.5.2 NO-induzierte MCT4-Promotoraktivität

Ein Reporterassay, mit welchem die Aktivität eines Promotors tatsächlich auf transkriptioneller Ebene in Abhängigkeit einer Deta-Behandlung untersucht werden kann, wurde zur weiteren Bestätigung der Induktion des MCT4 durch NO eingesetzt. Klassischerweise wird die Luziferase als Reporter gen verwendet. In Vorversuchen wurde daher der murine MCT4-Promotor in den pGL4.19 Vektor kloniert, der für das Gen der Luziferase kodiert. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Luziferase durch die Behandlung der Astrozyten mit Deta reguliert wird, sodass keine Aussage möglich war. Diese Beobachtung deckt sich mit Befunden aus der Literatur ([48]). Es wurde daher für die folgenden Experimente ein Reporterassaysystem verwendet, bei dem β -Laktamase als Reporter dient.

Klonierung des murinen MCT4-Promotors

Der MCT4-Promotor wurde ausgehend von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien mittels PCR unter Verwendung des GC-Melt Kits (Primer siehe Tabelle 2.7) amplifiziert und in einem Agarosegel aufgereinigt. Der aufgereinigte Promotor wurde in den pGeneBLazer TOPO-TA Vektor kloniert, welcher für die β -Laktamase codiert. Anschließend erfolgte eine Transformation von One Shot^{TR} TOP10 chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien und eine Selektion transformierter Klone auf Agarplatten. Von 9 Kolonien wurden Plasmidpräparationen angelegt. Die Plasmide wurden in einem Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease BglII auf die Orientierung des MCT4-Promotors hin überprüft (Abbildung 3.18).

BglII schneidet in dem Konstrukt aus pGeneBLazer und MCT4-Promotor dreimal. Liegt der MCT4-Promotor in *sense* Orientierung vor, werden DNA-Bandengrößen von 4180 bp, 1774 bp und 1453 bp erwartet. Ist der Promotor *antisense* orientiert, ergeben sich DNA-Fragmente von 4180 bp, 2770 bp und 457 bp. Jeweils ein Plasmid wurde sequenziert und für die folgenden Versuche verwendet.

Reporterassay

Für die Bestimmung der MCT4-Promotoraktivität basal und nach Zugabe von Deta wurden Astrozyten mit 400 ng des pGeneBLazer-MCT4 *sense*- bzw. dem pGeneBLazer-MCT4 *antisense*-Konstrukts als Kontrolle transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Astrozyten für 12 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt. Der β -Laktamase Reporterassay mit dem LyticBLazerTM-FRET B/G Kit wurde direkt im Anschluss durchgeführt.

Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (*response ratio* = 1) weist der MCT4-Promotor eine basale Aktivität auf. Die Inkubation der Astrozyten mit Deta führt zu einer

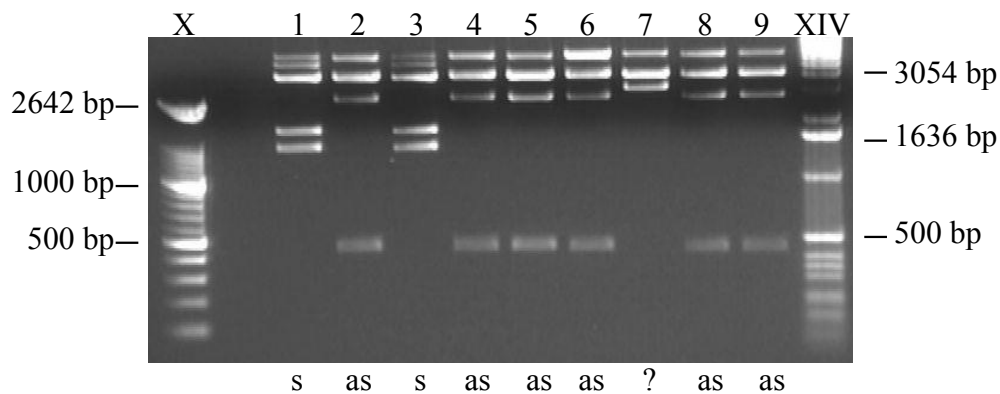


Abbildung 3.18: Agarosegel des Restriktionsverdaus des pGeneBLAzer-MCT4-Promotor Konstrukts mit BglII. Die 9 isolierten pGeneBLAzer-MCT4-Promotor Konstrukte (1-9) wurden mit der Restriktionsendonuklease BglII verdaut, um die Orientierung des MCT4-Promotors zu überprüfen. BglII schneidet das pGeneBLAzer-MCT4-Promotor Konstrukt dreimal. Liegt der MCT4-Promotor in *sense* Orientierung vor, entstehen 3 DNA-Fragmente mit den Größen 4180 bp, 1774 bp und 1453 bp. Liegt der MCT4-Promotor in *antisense* Orientierung vor, betragen die DNA-Fragmente 4180 bp, 2770 bp und 457 bp. Als Größenmarker im Agarosegel wurden die Marker X und XIV der Firma Roche eingesetzt.

signifikanten Steigerung der MCT4-Promotoraktivität (Abbildung 3.19).

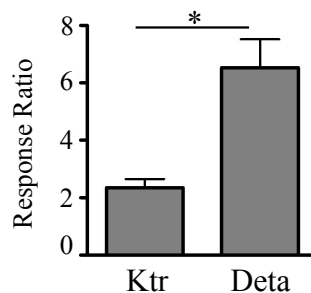


Abbildung 3.19: MCT4-Promotor Reportergenassay. Astrozyten wurden mit dem pGeneBLAzer-MCT4-Promotor *sense* bzw. dem *antisense* Konstrukt transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0,8 mM Deta für 12 Stunden behandelt. Als Kontrolle (Ktr) dienten unbehandelte Astrozyten. Anschließend wurde der LyticBLAzerTM-FRET B/G Reportergenassay durchgeführt. Die mit dem *antisense* Konstrukt transfizierten Zellen wurden als Negativ-Kontrolle verwendet. Da das *response ratio* der Negativ-Kontrolle immer 1 ist, ist sie in der Abbildung nicht gezeigt. Es wurde ein Student's t-test durchgeführt (n = 3, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05).

3.5.3 NO-vermittelte Steigerung der Laktatfreisetzung in Astrozyten

Es ist bekannt, dass primäre Astrozyten in Kultur basal Laktat, das glykolytischen Ursprungs ist, freisetzen [113]. Um zu untersuchen, ob die durch NO gesteigerte Expression glykolytischer Enzyme funktional zu einer verstärkten Laktatfreisetzung

führt, wurde der Zellkulturüberstand von Astrozyten enzymatisch gemessen. Die Inkubation von primären Astrozyten mit 0,8 mM Deta führt nach 24 Stunden zu einer Verdopplung der Laktatfreisetzung in das Medium (Abbildung 3.20).

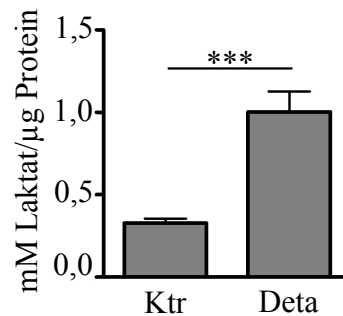


Abbildung 3.20: Laktatmessung im Medium kultivierter Astrozyten. Astrozyten wurden kultiviert und für 24 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt. Als Kontrolle (Ktr) dienten unbehandelte Astrozyten. Der Zellkulturüberstand wurde entweißt und Laktat mit Hilfe eines enzymatischen Assays bestimmt. Es wurde ein Student's t-test durchgeführt (n = 2, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

3.6 Inhibition der NO-abhängigen mRNA-Expression in Astrozyten durch einen siRNA-vermittelten HIF-1 α *knock-down*

Eine Möglichkeit, die Abhängigkeit der durch NO gesteigerten Genexpression und Laktatproduktion in Astrozyten von HIF-1 α nachzuweisen, ist ein HIF-1 α *knock-down* mit Hilfe einer spezifischen siRNA. Die spezifische siRNA hybridisiert mit der HIF-1 α mRNA. Der RNA-Doppelstrang wird vom *RNA induced silencing complex* (RISK) erkannt und abgebaut [88]. Folglich kann keine Translation der Ziel-mRNA stattfinden und das Zielprotein wird nicht mehr synthetisiert.

3.6.1 HIF-1 α siRNA *knock-down*

Zunächst wurde die Effizienz des siRNA-vermittelten HIF-1 α *knock-downs* ermittelt. Astrozyten wurden mit einer spezifischen, gegen HIF-1 α gerichteten, siRNA und einer Kontroll-siRNA, welche die gleiche Basenzusammensetzung aber in zufälliger Sequenz aufweist, transfiziert. Der *knock-down* wurde mittels qRT-PCR, Western Blot Analyse und Immunfluoreszenzfärbung verifiziert.

Die Transfektion der Astrozyten mit der HIF-1 α -spezifischen-siRNA führt zu einer Reduktion des mRNA-Expressionsniveaus in Astrozyten um 90 % (Abbildung

!h

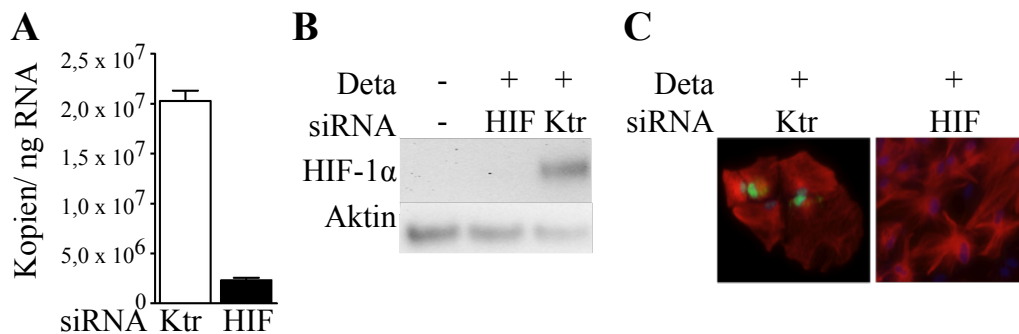


Abbildung 3.21: siRNA-vermittelter HIF-1 α knock-down. Die primären Astrozyten wurden mit einer HIF-1 α -spezifischen- und einer Kontroll-siRNA transfiziert. A) Das HIF-1 α mRNA-Expressionsniveau wurde mit Hilfe spezifischer Primer durch qRT-PCR ermittelt. B) / C) 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Astrozyten mit 0,8 mM Deta für 12 Stunden inkubiert. B) Die Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins wurde in der Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper untersucht. β -Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt. C) Die Immunfluoreszenzfärbung der Astrozyten wurde mit einem HIF-1 α - (grün) und einem GFAP (rot)- spezifischen Antikörper und adäquaten fluoreszenzgekoppelten Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte mit dem Leica Fluoreszenzmikroskop DMI 6000B. Gezeigt ist jeweils ein beispielhafter Versuch aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

3.21 A). Im Gegensatz zu Kontroll-siRNA-transfizierten Astrozyten wird in Zellen, die mit der HIF-1 α -siRNA transfiziert wurden, keine Stabilisierung und Kerntranslokation des HIF-1 α -Proteins in Folge der Deta-Behandlung beobachtet (Abbildung 3.21 B und C).

3.6.2 Inhibition der NO-vermittelten Steigerung der Genexpression glykolytischer Enzyme durch einen HIF-1 α knock-down

Das mRNA-Expressionsniveau glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter wurde mit Hilfe der qRT-PCR in Deta-behandelten primären Astrozyten, die mit der HIF-1 α -spezifischen- oder der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, untersucht.

Der siRNA-vermittelte HIF-1 α knock-down vermindert die durch NO gesteigerte Expression glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Die Hochregulation des mRNA-Niveaus durch NO der glykolytischen Enzymen HK2, PFKL, PFKFB3, Aldo A, PDK1, PGK1, Eno1, LDHA, sowie das der Glukose-/Laktattransporter Glut1 und MCT4 und das der Enzyme des Glykogenmetabolismus GS und AGL wird mit der HIF-1 α -spezifischen-siRNA

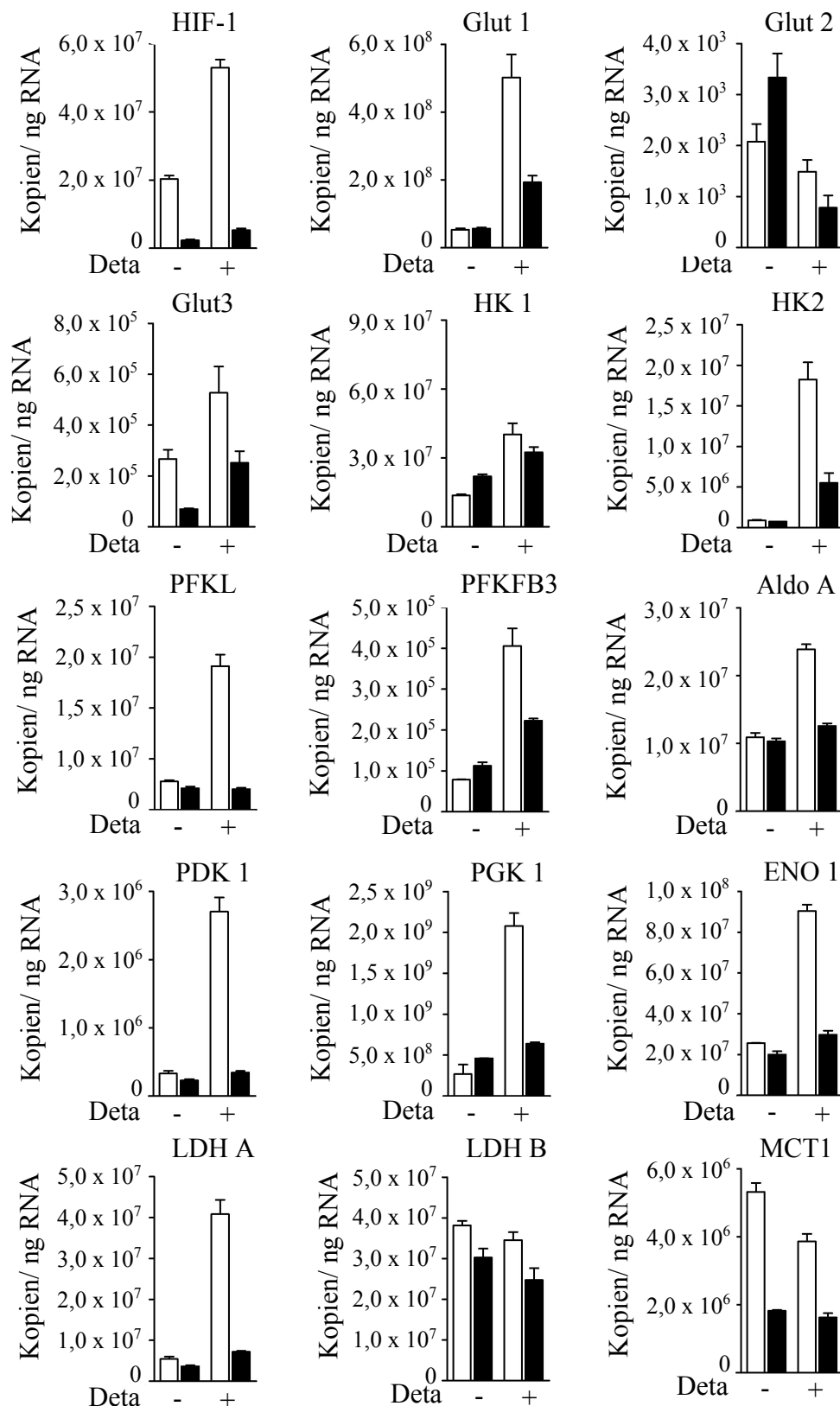


Abbildung 3.22: Genexpressionsanalyse von HIF-1 α -siRNA transfizierten primären Astrozyten. Die Astrozyten wurden mit einer Kontroll-siRNA (weiße Balken) oder einer HIF-1 α -spezifischen-siRNA (schwarze Balken) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 12 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt. Anschließend wurde eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR durchgeführt. Gezeigt ist einer aus 3 unabhängigen Versuchen.

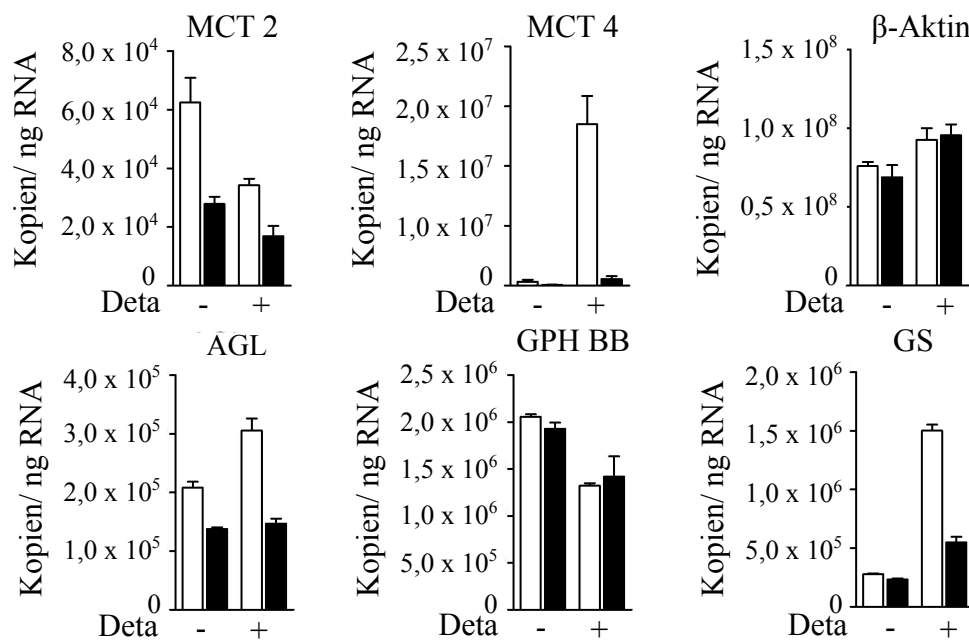


Abbildung 3.23: Fortsetzung Abbildung 3.22

reduziert. Im Gegensatz dazu wird das Expressionsniveau von β -Aktin, LDH B und GPH BB weder durch NO noch durch den *knock-down* von HIF-1 α reguliert. Die MCT1-Expression wird durch den *knock-down* von HIF-1 α reduziert, aber nicht von NO beeinflusst.

3.6.3 Verminderung der NO-abhängigen Laktatfreisetzung durch den HIF-1 α -siRNA *knock-down* in Astrozyten

Zusätzlich zur Expression glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter wurde der Einfluss des siRNA-vermittelten HIF-1 α *knock-downs* auf die Steigerung der Laktatproduktion durch NO untersucht.

Der *knock-down* von HIF-1 α vermindert die durch Deta gesteigerte Laktatfreisetzung der primären Astrozyten in das Medium nach 24 Stunden (Abbildung 3.24)

3.7 HIF-1 α -Stabilisierung und Induktion der Genexpression glykolytischer Enzyme in Astrozyten durch Kokultur

In den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Glykolyse in primären Astrozyten mittels NO in Abhängigkeit von HIF-1 α induziert werden kann. Dabei wurde ein artifizieller NO-Donor eingesetzt. Daher sollte nun untersucht wer-

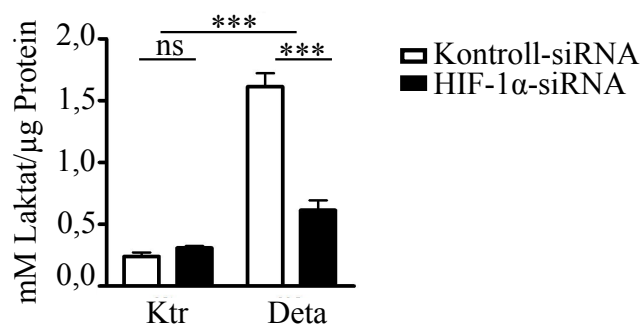


Abbildung 3.24: Laktatmessung im Medium siRNA-transfizierter Astrozyten. 24 Stunden nach der Transfektion mit HIF-1 α - bzw. Kontroll-siRNA wurden die Astrozyten für 24 Stunden mit 0,8 mM Deta behandelt. Der Zellkulturüberstand wurde enteiwieft und Laktat mit Hilfe eines enzymatischen Assays bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde eine 2-way ANOVA Analyse mit einem Bonferroni Post-test durchgeführt (n = 2, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

den, ob die Kokultur von Astrozyten mit NO-produzierenden Zellen ebenfalls zu einer HIF-1 α -Stabilisierung führen kann. *In vivo* wird im Gehirn NO von verschiedenen Zellen freigesetzt. Neurone exprimieren nNOS. Endothelzellen der Kapillaren exprimieren eNOS und regulieren unter anderem den zerebralen Blutfluss durch die Freisetzung von NO. Auch für Astrozyten konnte gezeigt werden, dass sie mit Hilfe der iNOS NO synthetisieren können [23].

3.7.1 Messung der NO-Produktion in verschiedenen Zellkulturen

Zunächst sollte bestimmt werden, ob und in welcher Zellkultur unter basalen Bedingungen NO produziert wird. Dazu wurde in verschiedenen Zelllinien und primären Zellkulturen die NO-Produktion mit Hilfe des *Nitrate/Nitrite Fluorometric assays* gemessen.

Die endotheliale Zelllinie bEnd.3, die aus murinen Gehirnkapillaren isolierte wurde, sowie die primären Endothelzellen, die aus den Gehirnkapillaren adulter Mäuse präpariert wurden, produzieren im Vergleich zu primären Astrozyten und Neuronen signifikant mehr NO. CHO Zellen, die als Negativkontrolle dienten, produzieren keine mit dem verwendeten Assay messbaren Mengen an NO (Abbildung 3.25).

3.7.2 Abhängigkeit der basalen NO-Produktion in Endothelzellen von der eNOS

Um die Abhängigkeit der basalen NO-Produktion in bEnd.3 Zellen und primären Endothelzellen von der eNOS zu überprüfen, wurden die Zellen für 12 Stunden

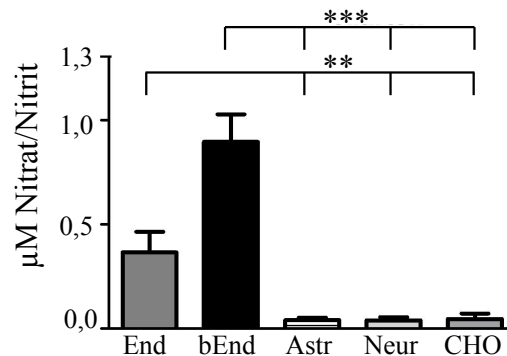


Abbildung 3.25: Nitrat/Nitrit Messung im Medium verschiedener Zellkulturen. Die verschiedenen Zelllinien und Primärkulturen wurden in gleicher Zellzahl in 24-well Zellkulturplatten ausgebracht. Die NO-Endprodukte Nitrat und Nitrit wurden nach 12 Stunden im Zellkulturüberstand mit Hilfe des *Nitrate/Nitrite Fluorometric assays* bestimmt. primäre Endothelzellen (End); murine Gehirnkapillar-Endothel Zelllinie (bEnd.3); primäre Astrozyten (Astr); primäre Neurone (Neur); *chinese hamster ovary cells* (CHO). Es wurde ein 1-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-test zur Berechnung des Signifikanzniveaus durchgeführt (n = 3, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

mit 100 μ M L-NAME behandelt. L-NAME ist ein L-Arginin Analogon, welches als reversibler Inhibitor der NOS fungiert [147].

Die Inhibition der eNOS in bEnd.3 Zellen bzw. primären Endothelzellen mittels L-NAME reduziert die basale NO-Produktion (Abbildung 3.26). Ein siRNA-vermittelter *knock-down* der eNOS in bEnd.3-Zellen, der ebenfalls zu einer verminderten basalen NO-Produktion führt (Abbildung 3.27), bestätigt die Abhängigkeit der basalen NO-Produktion in bEnd.3 Zellen von der Expression der eNOS. Auch primäre Endothelzellen wurden mit eNOS-spezifischer siRNA transfiziert, in diesen Zellen erwies sich die Effizienz des *knock-outs* jedoch als nicht ausreichend.

3.7.3 HIF-1 α -Stabilisierung und Zielgeninduktion in Astrozyten nach Kokultur mit bEnd.3-Zellen oder primären Endothelzellen

Kokultur Experimente wurden durchgeführt, um den Einfluss des basal produzierten NO aus Astrozyten, Neuronen und primären Endothelzellen auf die HIF-1 α -Stabilisierung und die Induktion von HIF-1 α -Zielgenen zu untersuchen. Die Kokulturen wurden mit Hilfe eines Transwell-Systems durchgeführt, da es dieses System ermöglicht im Anschluss an die Kokultur die Zellen getrennt voneinander zu analysieren. Zur Vermeidung einer Hypoxie - und damit einer NO-unabhängigen HIF-1 α -Stabilisierung - wurden die zu analysierenden Astrozyten auf der Membran der *Inserts* des Transwell-Systems kultiviert. Die Zellen, mit denen diese auf den *In-*

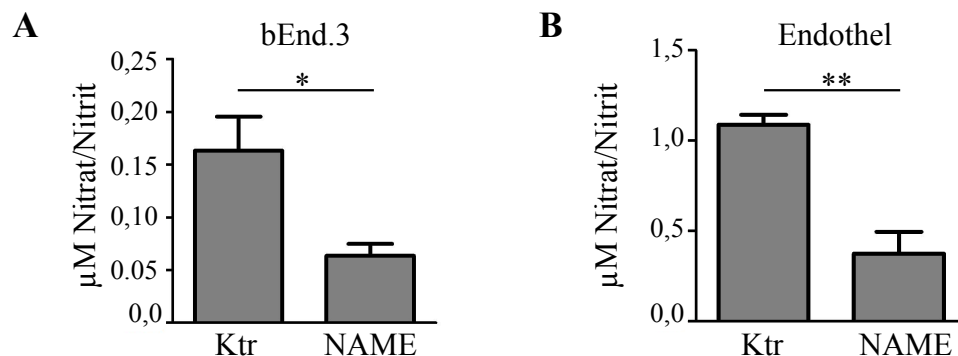


Abbildung 3.26: Nitrat/Nitrit Messung im Überstand von bEnd.3 Zellen und primären Endothelzellen. bEnd.3 Zellen (A) bzw. primäre Endothelzellen (B) wurden in 24-well Zellkulturplatten kultiviert. Die Zellen wurden für 12 Stunden vor der Nitrat/Nitrit Messung im Zellkulturüberstand mit 100 μM L-NAME inkubiert. Es wurde ein Student's t-test durchgeführt ($n = 2$, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant).

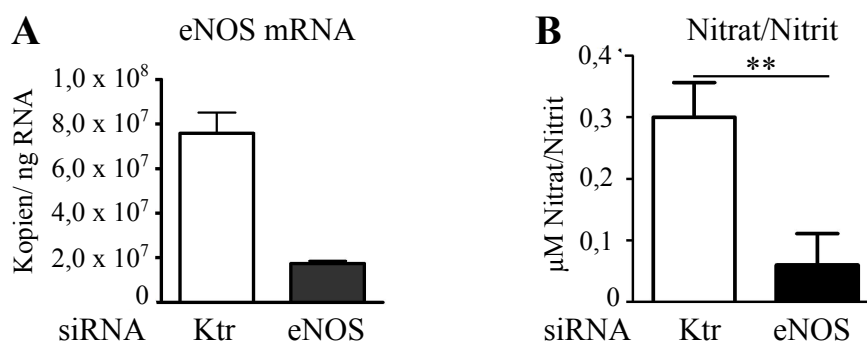


Abbildung 3.27: eNOS knock-down in bEnd.3 Zellen. bEnd.3 Zellen wurden mit eNOS-spezifischer bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde A) eine qRT-PCR zur Überprüfung der Effizienz des knock-downs und B) eine Nitrat/Nitrit Messung in vor der Lyse der Zellen entnommenem Medium durchgeführt. Es wurde ein Student's t-test durchgeführt ($n = 3$, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant.)

serts-gewachsenen Astrozyten kokultiviert wurden, wurden dagegen auf dem Boden der entsprechenden Transwell-Zellkulturplatten kultiviert. Die Astrozyten in den *Inserts* wurden für 12 Stunden mit den angegebenen Zellen kokultiviert.

Kokultivierung von Astrozyten mit bEnd.3 Zellen führt zu einer Stabilisierung des HIF-1 α Proteins in Astrozyten. Diese Stabilisierung kann durch die Inhibition der eNOS der bEnd.3 Zellen mit L-NAME reduziert werden. Im Gegensatz dazu führt die Kokultur von Astrozyten mit primären Astrozyten oder primären Neuronen zu einer geringeren HIF-1 α -Stabilisierung (Abbildung 3.28 A). Eine Stabilisierung von HIF-1 α in Astrozyten wird auch durch eine Kokultivierung mit primären Endothelzellen induziert (Abbildung 3.28 B).

Die Analyse der mRNA-Expressionsniveaus von HIF-1 α -Zielgenen in Astrozyten zeigt, dass Kokultur mit bEnd.3 Zellen (Abbildung 3.29) oder primären Endothelzellen (Abbildung 3.30), nicht aber mit primären Neuronen oder Astrozyten in Astrozyten zu einer gesteigerten Genexpression von Glut1, HK2, PGK1 und MCT4 führt. Ebenso wie β -Aktin wird der nicht durch NO-regulierbare MCT1 durch die Kokultur nicht in seiner Expression beeinflusst. Die Induktion der mRNA-Expression von Glut1, HK2, PGK1 und MCT4 durch die Kokultur mit primären Endothelzellen oder bEnd.3 Zellen wird durch L-NAME gehemmt.

3.7.4 Kokultur-abhängige Laktatproduktion in Astrozyten

Zur funktionellen Analyse von kokultivierten primären Astrozyten wurde ein Laktatassay durchgeführt. Dazu wurden die Astrozyten für 12 Stunden mit Hilfe des Transwell-Systems mit primären Endothelzellen, primären Neuronen oder primären Astrozyten kokultiviert. Anschließend wurden die in den *Inserts* kultivierten Astrozyten mit neuem frischem Medium für 6 Stunden ohne weitere Zellen inkubiert. Das Medium wurde in den Laktatassay eingesetzt und die Proteinmenge/*Insert* bestimmt.

Abbildung 3.31 zeigt, dass die Kokultur von Astrozyten mit primären Endothelzellen zu einer gesteigerten Laktatfreisetzung der Astrozyten in das Medium führt. Diese gesteigerte Laktatfreisetzung wird durch die Zugabe von L-NAME zu den primären Endothelzellen inhibiert.

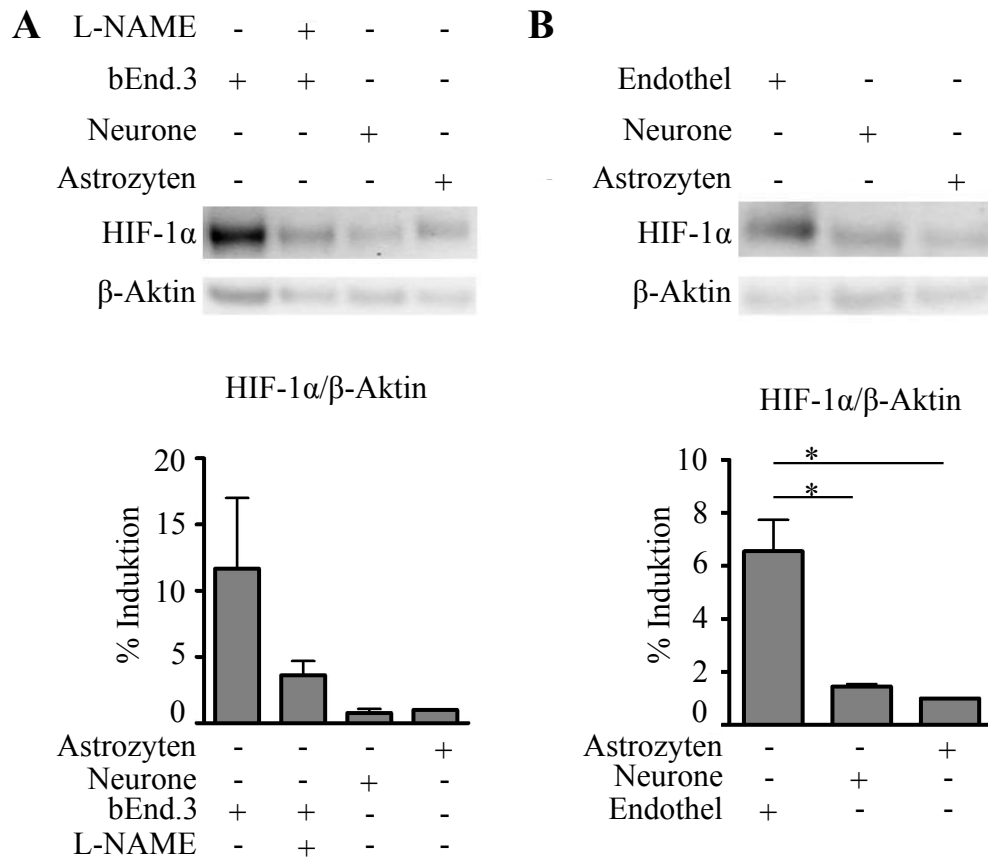


Abbildung 3.28: HIF-1 α -Stabilisierung in kokultivierten Astrozyten. Astrozyten wurden auf der Membran von 12-well *Inserts* kultiviert. Primäre Neurone, primäre Endothelzellen, primäre Astrozyten und bEnd.3 Zellen wurden in gleichen Zellzahlen in 12-well Zellkulturplatten ausgesät und kultiviert. Die auf den *Inserts* kultivierten Astrozyten wurden für 12 Stunden mit den Zellen auf dem Boden der 12-well Zellkulturplatten kokultiviert. Gegebenenfalls wurden die bEnd.3 Zellen 1 Stunde vor Zugabe der auf den *Inserts* gewachsenen Astrozyten mit 100 μ M L-NAME prä-inkubiert (A). Im Anschluss an die Kokultur wurden die Astrozyten in den *Inserts* für die Western Blot Analyse lysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot (oben) und eine Quantifizierung über 3 unabhängige Versuche (unten). Dazu wurde das HIF-1 α auf die Ladekontrolle β -Aktin normiert und auf Astrozyten, die mit Astrozyten kultiviert wurden (=1) normiert. Es wurde ein 1-way ANOVA mit einem Bonferroni Post-test durchgeführt (n = 3 (A), n = 2 (B), *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant.)

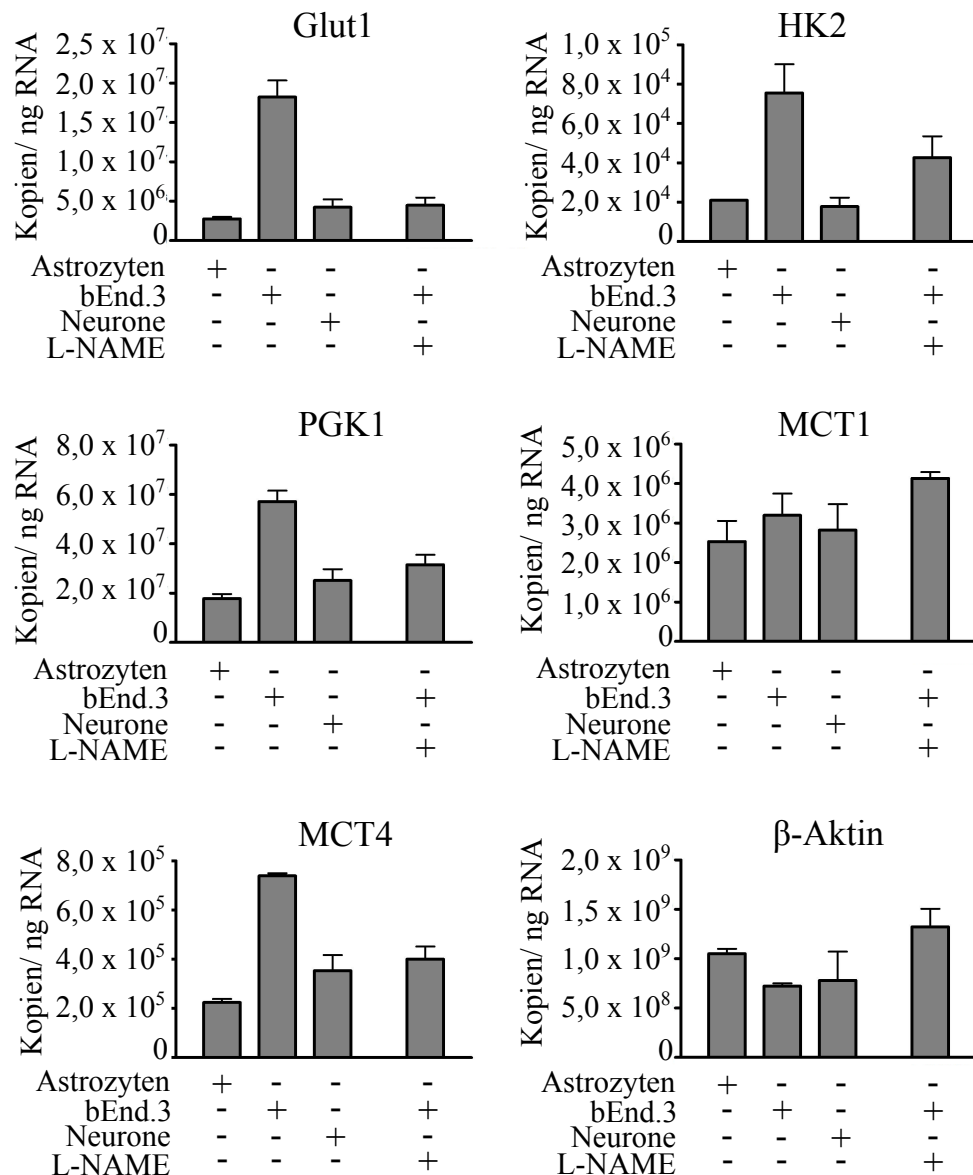


Abbildung 3.29: Genexpressionsanalyse in kokultivierten Astrozyten. Astrozyten wurden auf der Membran von 12 -well Inserts kultiviert. Primäre Neurone, bEnd.3 Zellen und primäre Astrozyten wurden in gleichen Zellzahlen in 12-well Zellkulturplatten ausgesät und kultiviert. Die auf den Inserts kultivierten Astrozyten wurden für 12 Stunden mit den angegebenen Zellen auf dem Boden der 12-well Zellkulturplatten kokultiviert. Gegebenenfalls wurden die primären Astrozyten bzw. bEnd.3 Zellen 1 Stunde vor Zugabe der auf den Inserts gewachsenen Astrozyten mit 100 μ M L-NAME prä-inkubiert. Die Astrozyten in den Inserts wurden für die RNA-Isolation lysiert. Im Anschluss an die *in vitro* Transkription wurde ein qRT-PCR durchgeführt. Gezeigt ist einer von 3 unabhängigen Versuchen.

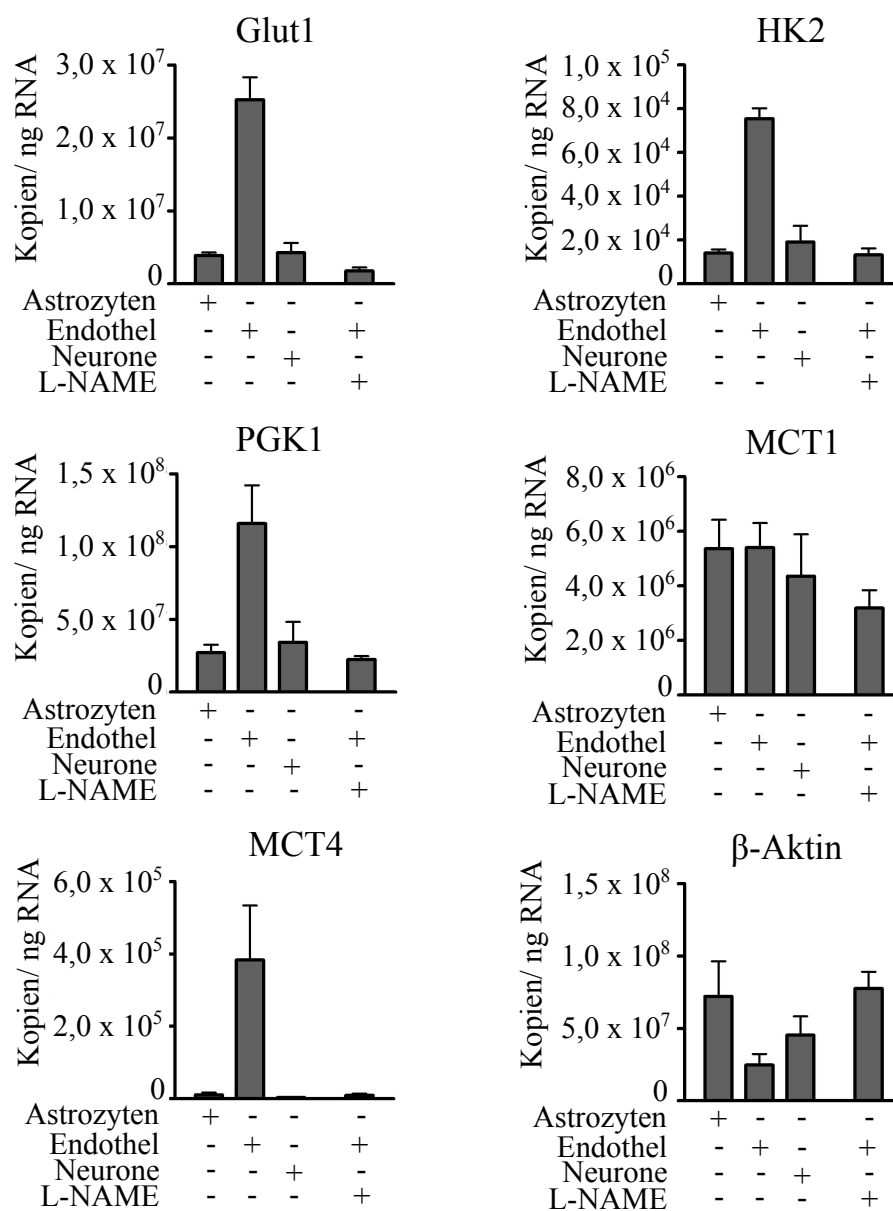


Abbildung 3.30: Genexpressionsanalyse in kokultivierten Astrozyten. Astrozyten wurden auf der Membran von 12-well Inserts kultiviert. Primäre Neurone, primäre Endothelzellen und primäre Astrozyten wurden in gleichen Zellzahlen in 12-well Zellkulturplatten ausgesät und kultiviert. Die auf den Inserts kultivierten Astrozyten wurden für 12 Stunden mit den angegebenen Zellen auf dem Boden der 12-well Zellkulturplatten kokultiviert. Gegebenenfalls wurden die primären Endothelzellen 1 Stunde vor Zugabe der auf den Inserts gewachsenen Astrozyten mit 100 μ M L-NAME prä-inkubiert. Die Astrozyten in den Inserts wurden für die RNA-Isolation lysiert. Im Anschluss an die *in vitro* Transkription wurde ein qRT-PCR durchgeführt. Gezeigt ist einer von 3 unabhängigen Versuchen.

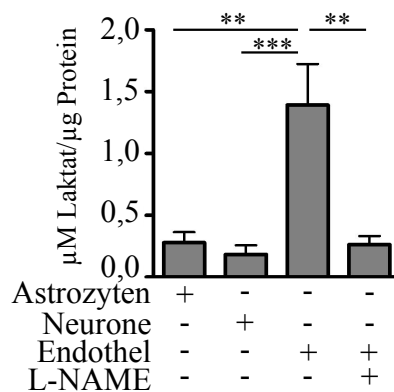


Abbildung 3.31: Gesteigerte Laktatproduktion in kokultivierten Astrozyten.

Astrozyten wurden auf der Membran von 12-well *Inserts* kultiviert. Primäre Neurone, primäre Endothelzellen und primäre Astrozyten wurden in gleichen Zellzahlen in 12-well Zellkulturplatten ausgesät und kultiviert. Die auf den *Inserts* kultivierten Astrozyten wurden für 12 Stunden mit den Zellen auf dem Boden der 12-well Zellkulturplatten kokultiviert. Gegebenenfalls wurden die primären Endothelzellen 1 Stunde vor Zugabe der auf den *Inserts* gewachsenen Astrozyten mit 100 μM L-NAME prä-inkubiert. Die Astrozyten in den *Inserts* wurden für 6 Stunden mit frischem Medium in Einzelkultur inkubiert. Das Medium wurde in den Laktatassay eingesetzt. Es wurde ein 1-way ANOVA durchgeführt ($n = 2$, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant).

3.8 Effekt eines HIF-1 α *knock-outs* in Astrozyten *in vivo*

In den vorhergehenden Kapiteln konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 α in primären Astrozytenkulturen eine entscheidende Rolle für die NO-induzierte Glykolyse spielt. Die Laktatfreisetzung der primären Astrozyten hängt entsprechend ebenfalls von der Stabilisierung von HIF-1 α durch NO ab. In der Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle Hypothese (ANLSH) ist von Astrozyten freigesetztes Laktat essentiell für die Versorgung der (aktiven) Neurone mit Energie ([136]). Die *Selfish Brain*-Theorie besagt, dass eine Unterversorgung von Neuronen mit Energie im Gehirn zu einer Gewichtszunahme des Organismus führt. Damit verbundene sekundäre Erkrankungen wie Typ 2 Diabetes können ebenfalls entstehen [138].

In diesem Teil der Arbeit sollte daher die Auswirkung eines Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-outs* auf Gewicht und Blutzucker in Mäusen untersucht werden.

3.8.1 Genotypisierung von Mäusen

Ausgehend von B6.129-HIF1a^{tm3Rsjo}/J Mäusen, die homozygot für das mit LoxP-Sequenzen flankierte Exon 2 des HIF-1 α -Gens waren, und Mäusen der Linie FVB-

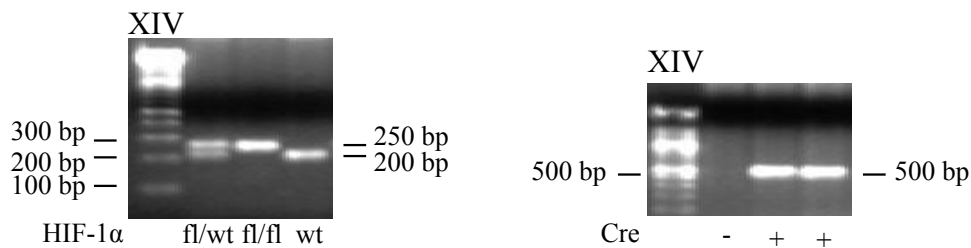


Abbildung 3.32: Genotypisierung von Mäusen. Den Mäusen wurden Schwanzbiopsien entnommen, aus denen genomische DNA isoliert wurde. Die genomische DNA wurde in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde mit einem 2 % Agarosegel analysiert. Das gefloxt HIF-1 α -Gen führt zu einem 250 bp großen Amplifikat, während das wildtyp (wt)-Allel ein 200 bp großes Amplifikat ergibt. Das Vorhandensein des Cre-Rekombinase-kodierenden Transgen wird durch eine Bande bei 500 bp nachgewiesen.

Tg(GFAP-cre)25Mes/J, die hemizygot für ein Transgen, welches für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des GFAP-Promotors kodiert, waren, wurde ein Astrozyten-spezifisches *knock-out* Mausmodell generiert (Abbildung 2.1).

Abbildung 3.32 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Genotypisierung von 3 Mäusen. Wird das Exon 2 des HIF-1 α -Gens von LoxP-Sequenzen flankiert, so wird in der PCR ein 250 bp großes Amplifikat vervielfältigt. Im Gegensatz dazu führt das wildtyp (wt)-Allel zu einem 200 bp großen PCR-Produkt. In Abbildung 3.32 ist jeweils ein Beispiel für eine homozygot gefloxt Maus, eine für das gefloxt Allel heterozygote Maus und eine wt-Maus zu sehen. Das Transgen, welches für die Cre-Rekombinase kodiert, ergibt in einer entsprechenden PCR ein Amplifikat von 500 bp.

3.8.2 Genexpressionsanalyse in Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out*-Mäusen

Es wurde eine Genexpressionsanalyse mit Hilfe der qRT-PCR in Cortex und Cerebellum Astrozyten-spezifischer HIF-1 α *knock-out*-Mäuse durchgeführt. Als Kontrolle dienten Tiere, die ebenfalls homozygot für das LoxP-flankierte HIF-1 α -Gen waren, aber das Cre-Rekombinase exprimierende Transgen nicht aufwiesen.

Das mRNA-Niveau von HIF-1 α ist im Gegensatz zum Cortex im Cerebellum von Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out*-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren signifikant reduziert. Die Expression von MCT4, HK2 und Glut1 zeigen dagegen keine signifikante Regulation in Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out*-Mäusen (Abbildung 3.33).

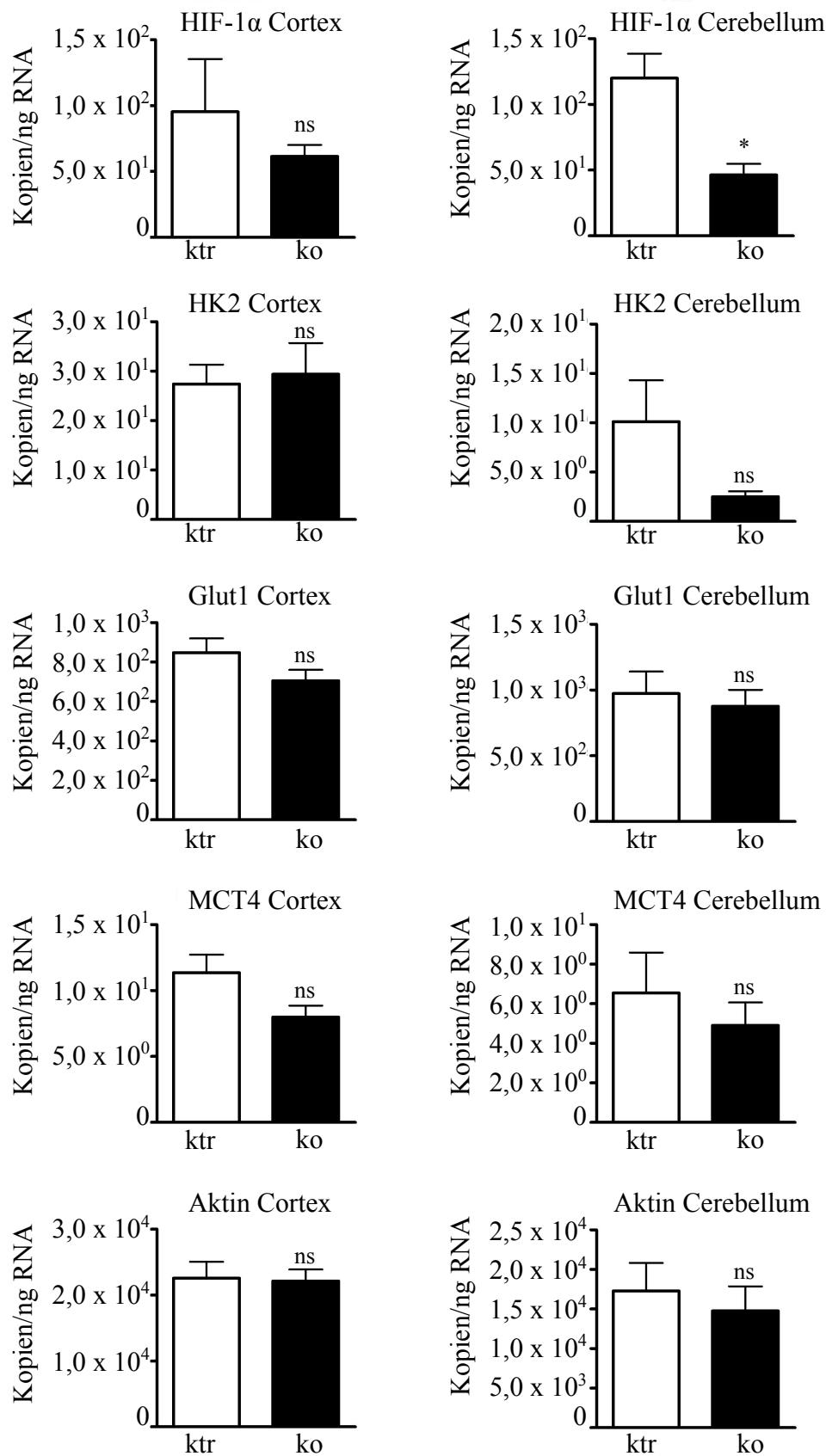


Abbildung 3.33: Genexpressionsanalyse in Astrozyten-spezifischen HIF-1α knock-out-Mäusen. Das Gewebe wurde in 500 µl 1 x Lysepuffer lysiert, es wurde RNA isoliert und anschließend eine *in vitro* Transkription und eine qRT-PCR durchgeführt. Zur Berechnung der Signifikanz wurde ein Student's t-test durchgeführt (n (ko) = 5, n (ktr) = 8, *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant)

3.8.3 Einfluss einer hochkalorischen Diät auf die Gewichts-entwicklung von Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out*- und Kontroll- Mäusen

Um der Frage nachzugehen, ob eine mangelhafte Energieversorgung von Neuronen zu einer Beeinflussung der homöostatischen Kontrolle der Nahrungsaufnahme führt, wurden Astrozyten-spezifische HIF-1 α *knock-out*-Mäuse, sowie entsprechende Kontroll-Tiere, welche ebenfalls homozygot für das gefloxt HIF-1 α -Gen waren, aber nicht das Transgen für die Cre-Rekombinase aufwiesen, mit einer Hochfettdiät bzw. einer Kontrolldiät gefüttert. Die Diäten wurden ab der 4. Woche verabreicht und es fand eine wöchentliche Gewichtskontrolle statt. Nach 21 Wochen wurden die Tiere final gewogen und im Anschluss wurde die nüchterne Blutglukose mit dem Ascensio Elite Blutzuckermessgerät bestimmt.

Die Hochfettdiät führt zu einer signifikanten Gewichtszunahme in Kontroll- und HIF-1 α -*knock-out*-Mäusen im Vergleich zu mit der Kontrolldiät gefütterten Mäusen (Abbildung 3.34 A, B, C und D). Analog dazu hat die Art der Diät auch einen signifikanten Einfluss auf die Blutzuckerwerte der Tiere. Der Blutzuckerspiegel der mit der Hochfettdiät gefütterten Tiere ist signifikant höher als der, der kontrollgefütterten Tiere (Abbildung 3.34 E und F). Es werden keine signifikanten Unterschiede zwischen den HIF-1 α -*knock-out*-Tieren und den Kontroll-Tieren beobachtet.

3.8.4 Einfluss des Astrozyten-spezifischen HIF-1 α -*knock-outs* auf die metabolische Rate, Futteraufnahme und Bewegung

Die männlichen Mäuse aus dem oben vorgestellten Fütterungsversuch (Kapitel 3.8.3) wurden mit dem TSE Phenomaster untersucht. Dazu wurden die Mäuse einzeln in die Untersuchungskäfige gesetzt und für 24 Stunden akklimatisiert. Anschließend wurde über 24 Stunden hinweg die Futteraufnahme, der respiratorische Quotient und die Quadrantenwechsel (Bewegung) bestimmt.

Abbildung 3.36 zeigt den zeitlichen Verlauf des respiratorischen Quotienten, der Futteraufnahme und der Bewegung. Die grau unterlegte Fläche stellt die Dunkelphase dar. Um den Einfluss des Genotyps auf die zeitliche Änderung der untersuchten Parameter zu untersuchen, wurde ein 2-way ANOVA mit einem Bonferroni Post-test durchgeführt, wobei die Kontroll- und die HIF-1 α -*knock-out*-Mäuse unter der jeweils gleichen Diät verglichen wurden. Es wird kein signifikanter Einfluss des HIF-1 α -*knock-outs* auf den respiratorischen Quotient, die Nahrungsaufnahme oder die Bewegung nachgewiesen.

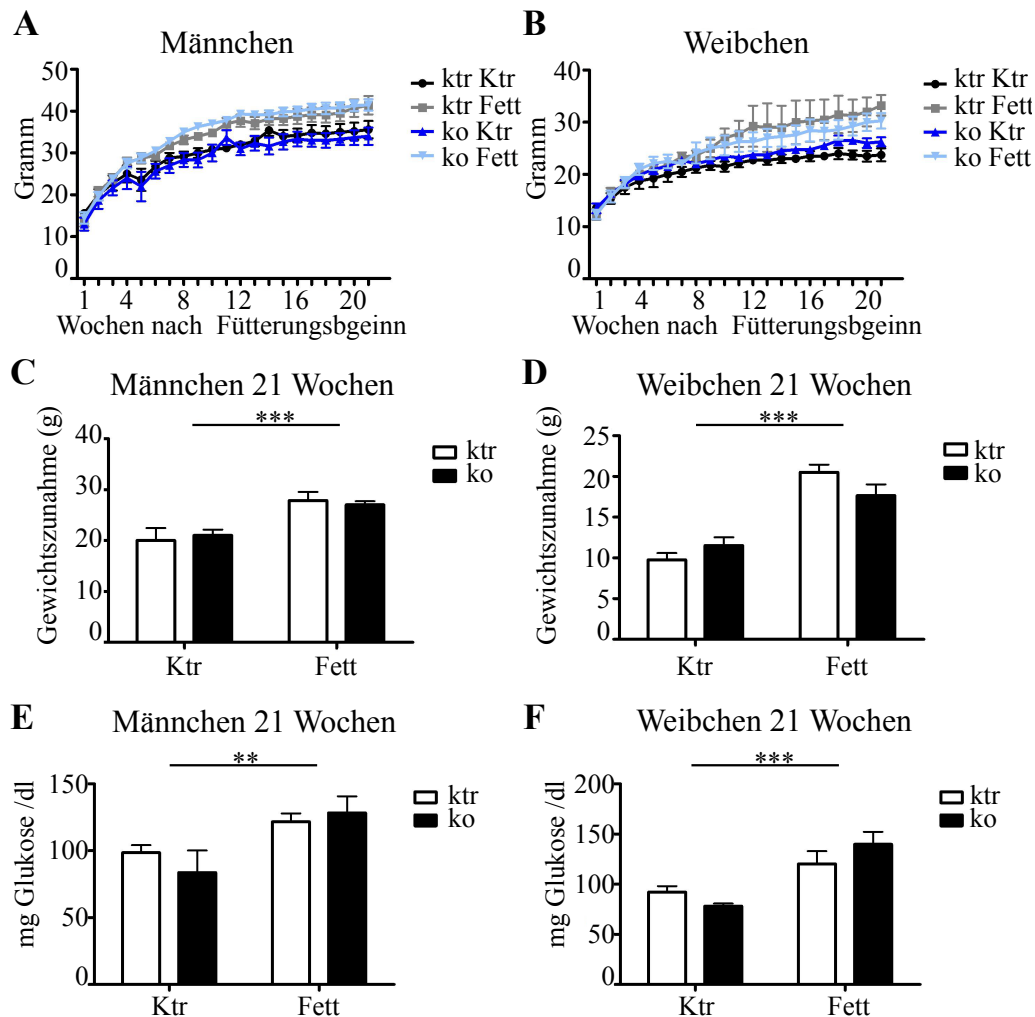


Abbildung 3.34: Gewichtsentwicklung nach Zugabe einer hochkalorischen Diät in Astrozyten-spezifischen HIF-1 α -*knock-out*-Mäusen. Die Hochfettdiät (Fett) bzw. die entsprechende Kontrolldiät (Ktr) wurden HIF-1 α *knock-down*-Mäusen (ko) und den Kontroll-Tieren (ktr) ab der 4. Woche verfüttert. Es wurde eine wöchentliche Gewichtskontrolle durchgeführt (A und B). Nach 21 Wochen wurde die Gewichtszunahme (C und D) und die nüchterne Blutglukose (E und F) der Tiere ermittelt. Männchen: ktr Ktr n= 4, ktr Fett n=6, ko Ktr n=3, ko Fett n=7. Weibchen: ktr Ktr n= 4, ktr Fett n=4, ko Ktr n=4, ko Fett n=7 Ein 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-test wurde durchgeführt (*** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

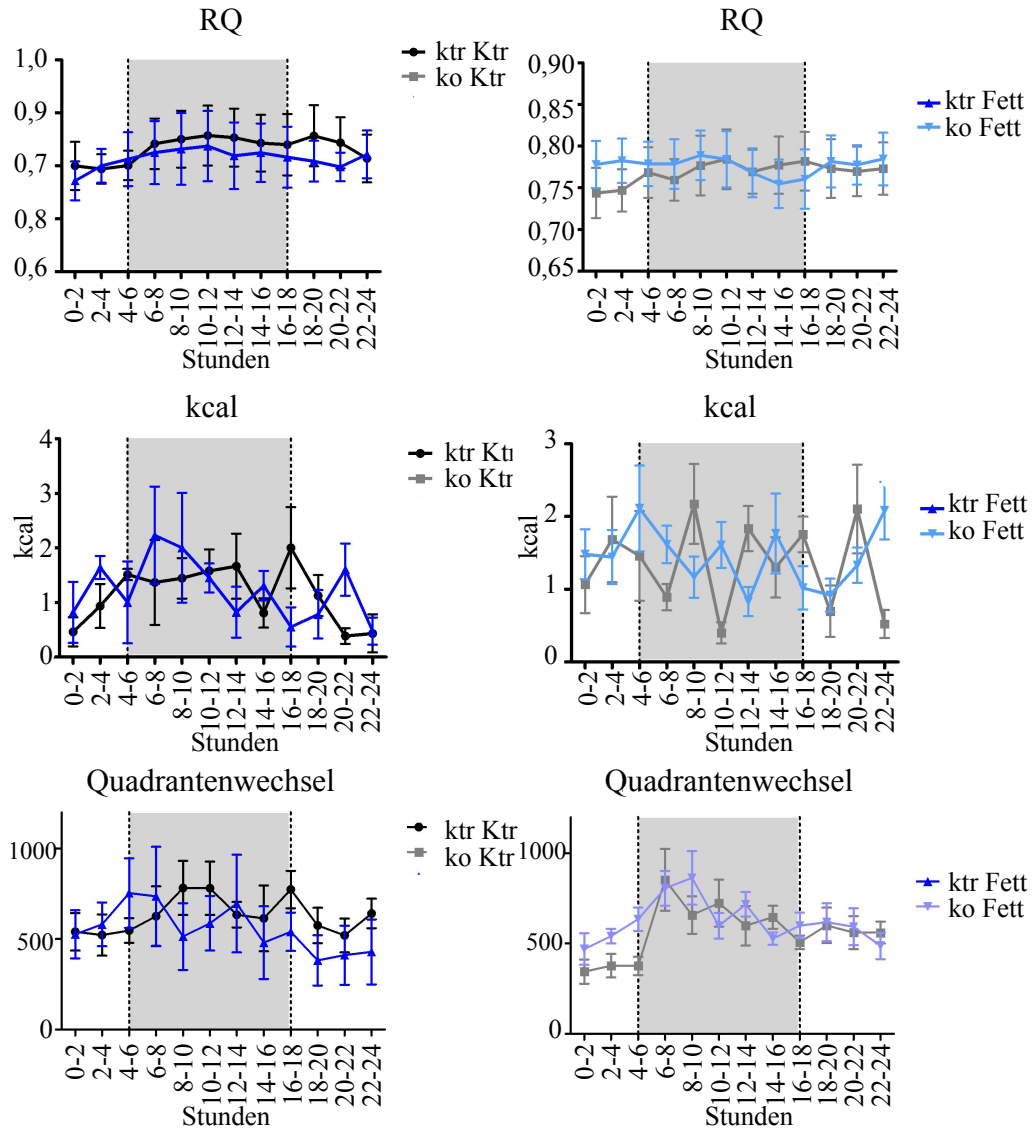


Abbildung 3.35: Vorversuch zur Bestimmung verschiedener metabolischer Parameter mit dem TSE Phenomaster. Die Astrozyten-spezifischen HIF-1 α -*knock-out*-Mäuse wurden für die Untersuchung mit dem TSE Phenomaster einzeln in den Untersuchungskäfigen gehalten. Nach einer 24-stündigen Gewöhnungsphase, wurden die Futteraufnahme, der respiratorische Quotient (RQ) und die Quadrantenwechsel (QW) über 24 Stunden hinweg dokumentiert. HIF-1 α *knock-out* Maus-(ko); Kontroll-Maus (ktr); Hochfett-Diät (Fett); Kontroll-Diät (Ktr). Die grau unterlegte Fläche deutet die Dunkelphase an. Ein 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-test wurde durchgeführt (ktr Ktr n= 4, ktr Fett n=6, ko Ktr n=3, ko Fett n=7; *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

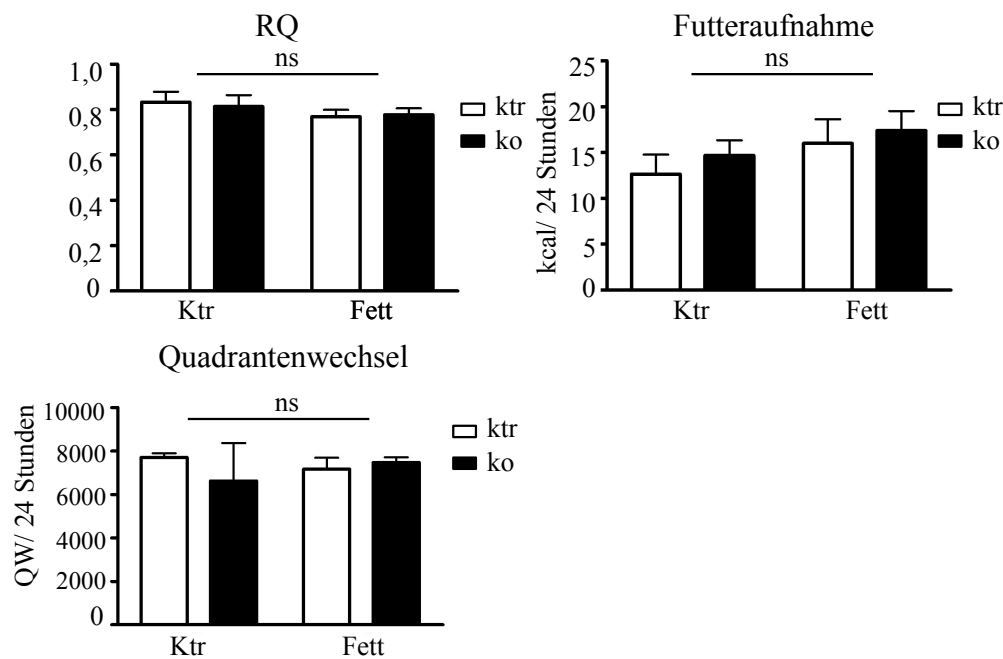


Abbildung 3.36: Versuch zur Bestimmung verschiedener metabolischer Parameter mit dem TSE Phenomaster. Die Astrozyten-spezifischen HIF-1 α -*knock-out*- und die Kontroll-Mäuse wurden für die Untersuchung mit dem TSE Phenomaster einzeln in den Untersuchungskäfigen gehalten. Nach einer 24-stündigen Gewöhnungsphase, wurden die Futteraufnahme, der respiratorische Quotient (RQ) und die Quadrantenwechsel (QW) über 24 Stunden hinweg dokumentiert. Dargestellt ist der Mittelwert des RQ nach 24 Stunden, sowie die Summen der Futteraufnahme und der QW nach 24 Stunden. HIF-1 α *knock-out*-Maus (ko); Kontroll-Maus (ktr); Hochfett-Diät (Fett); Kontroll-Diät (Ktr). Die grau unterlegte Fläche deutet die Dunkelphase an. Ein 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-test wurde durchgeführt (ktr Ktr n= 4, ktr Fett n=6, ko Ktr n=3, ko Fett n=7; *** p < 0,001; ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = nicht signifikant).

Diskussion

4.1 Differentielle Expression glykolytischer Enzyme in Astrozyten und Neuronen

Die metabolischen Profile von Astrozyten und Neuronen unterscheiden sich deutlich voneinander [108]. Während Neurone ihre Energie vor allem aus der oxidativen Phosphorylierung gewinnen, haben Astrozyten unter basalen Bedingungen eine erhöhte glykolytische Aktivität. Dies zeigt sich in der basalen Synthese und Freisetzung von Laktat [136, 108]. *In vitro* und *in vivo* Experimente zeigen zudem, dass Astrozyten ihre glykolytische Aktivität und Laktatfreisetzung als Antwort auf neuronale Aktivität steigern können [37, 86, 178]. Dennoch bestätigen Transkriptom-Analysen in frisch isolierten adulten Astrozyten und Neuronen, dass Astrozyten nicht nur Enzyme der Glykolyse, sondern auch die des oxidativen Glukosemetabolismus exprimieren, während Neurone vorwiegend Enzyme des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung aufweisen [108, 29, 151]. Diese differentielle Verteilung der am Energiemetabolismus beteiligten Enzyme führte zu der Annahme, dass der Energiemetabolismus in Astrozyten und Neuronen kompartimentiert vorliegt [108]. Beispiele für kompartimentierte Stoffwechselvorgänge d.h. Stoffwechselwege, die zum einen Teil in Astrozyten und zum anderen Teil in Neuronen stattfinden, sind der Glutamat/Glutamin-Kreislauf und der Laktatstoffwechsel [82, 13].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse für glykolytische Enzyme und Glukose-/Laktattransporter zwischen primär-kultivierten corticalen Astrozyten und Neuronen durchgeführt. Einige glykolytische Enzyme wie die Hexokinase 2 (HK2), die Enolase 1 (Eno1), die Aldolase (AldoA) oder die 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) werden in der astrozytären Kultur signifikant höher exprimiert als in der neuronalen Kultur. Die Laktatdehydrogenase B (LDHB), welche die Konversion von Pyruvat zu Laktat katalysiert, wird in Astrozyten ebenfalls im Vergleich zu Neuronen hoch exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass auch *in vitro* die differentielle Genexpression für eine Kompartimentierung des Laktatstoffwechsels erhalten bleibt. Die Ergebnis-

se der Genexpressionsanalyse bestätigen außerdem die differentielle Expression der Glukose-/Laktattransporter unter *in vitro*-Bedingungen (Glut1: Astrozyten, Glut3: Neurone, MCT1: Astrozyten, MCT2: Neurone, MCT4: Astrozyten). Es fällt auf, dass der MCT4 in der Astrozytenkultur zwar geringfügig höher exprimiert wird als in Neuronen, der Unterschied ist aber deutlich geringer als *in vivo* gezeigt wurde [134, 144]. Auf Grund dieser Beobachtung wurde hier postuliert, dass *in vivo* ein externes Signal zu einer Induktion des MCT4 in Astrozyten führt. Ein externes Signal, welches in Astrozyten zu einer vermehrten Expression des MCT4 und damit zu einer gesteigerten Laktattransportkapazität führt, könnte auch an der Regulation der Laktatproduktion in Astrozyten beteiligt sein. Es stellte sich daher die Frage, ob an der Glykolyse und dem Transport von Glukose und Laktat beteiligte Enzyme in Astrozyten *in vitro* konstitutiv exprimiert, oder ebenfalls durch externes Signal reguliert werden. Dies wurde bisher nicht untersucht.

4.2 Regulation der astrozytären Glykolyse durch NO in Abhängigkeit von dem Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 α

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Hypoxie-induzierbare-Faktor 1 α (HIF-1 α) eine Rolle für die Expression glykolytischer Enzyme in Astrozyten spielt. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α wird ubiquitär exprimiert, unter normoxischen Bedingungen jedoch proteasomal abgebaut ($t_{1/2} < 5$ Minuten) [89]. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α stabilisiert und transloziert in den Zellkern, wo es ein Heterodimer mit HIF-1 β bildet. Das Heterodimer bindet in der Promotorregion von Zielgenen an *hypoxia responsive elements* (HRE) und initiiert so deren Transkription [190, 166]. Zielgene von HIF-1 α sind unter anderem an der Vaskularisierung, der Erythropoethinsynthese und dem Energiestoffwechsel beteiligt. Für diese Arbeit war von großer Relevanz, dass auch glykolytische Enzyme, sowie Glut1 und MCT4 durch HIF-1 α reguliert werden [34, 185]. Die Hypothese, dass HIF-1 α an der Regulation des Glukosestoffwechsels in Astrozyten beteiligt sein könnte, wird unterstützt durch den Befund, dass im Gegensatz zu allen anderen Organen, HIF-1 α im murinen Gehirn unter Normoxie stabilisiert vorliegt [177].

Dieser Befund wird in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Eine HIF-1 α -Stabilisierung wird in Cortex und Cerebellum, nicht aber in Leber und Niere, normoxischer Mäuse detektiert. In Leber und Niere von Mäusen, die zuvor einer Hypoxie ausgesetzt worden waren, konnte dagegen HIF-1 α -Stabilisierung nachgewiesen werden. Eine nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung von Gehirnschnitten zur Lokalisation

des Expressionsortes von HIF-1 α im Gehirn führte jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis. Dies könnte entweder in der Spezifität der Sonde, oder einer nicht ausreichenden Sensitivität der Methode für gering exprimierte Gene begründet sein [42]. Bisher wurde HIF-1 α mRNA ausschließlich durch die sensitivere radioaktive *in situ*-Hybridisierung in Tumorgewebe nachgewiesen [181].

Da HIF-1 α im Gehirn stabilisiert vorliegt, ist eine Regulation der astrozytären Glykolyse durch HIF-1 α denkbar. Unter Normoxie können verschiedene Substanzen zu einer Stabilisierung von HIF-1 α führen [92, 186]. Ein bekannter Stabilisator von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen ist Stickstoffmonoxid (NO) [28, 87]. Tatsächlich ist NO unter physiologischen Bedingungen im Gehirn anwesend. Es spielt zum Beispiel in der interzellulären Kommunikation im Nervensystem eine entscheidende Rolle, zum Beispiel als Modulator prä- und postsynaptischer Aktivität [55]. Das gasförmige NO beeinflusst dabei die synaptische Aktivität als Volumentransmitter in einem Radius von etwa 200 μ m um den Syntheseort [162].

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von NO auf die Stabilisierung von HIF-1 α und die Glykolyse in Astrozyten zunächst mit Hilfe eines chemischen NO-Donors untersucht. Das verwendete DetaNONOate (Deta) hat eine Halbwertszeit von 20 Stunden und setzt NO im Vergleich zu anderen NO-Donatoren wie PAPANONOate kontinuierlich in geringen Mengen frei. Die physiologische NO-Konzentration wird in der aktuellen Literatur mit 100 pM - 5 nM angegeben [64]. Die eingesetzte Deta-Konzentration von 800 μ M führt zu einer Freisetzung von ungefähr 6 nM NO/Sekunde und befindet sich damit in einem nahezu physiologischen Bereich. Die Behandlung von primären corticalen Astrozyten mit Deta verursacht eine konzentrations- und zeitabhängige Stabilisierung von HIF-1 α . Des Weiteren wurde in Folge der Deta-Behandlung eine Translokation von HIF-1 α in den Zellkern, also den Ort der Transkription, dokumentiert. Der Befund, dass Deta zu einer Stabilisierung von HIF-1 α in Astrozyten, nicht aber in Neuronen führt, ist im Einklang mit der früheren Beobachtung, dass NO in Astrozyten und nicht in Neuronen die Glykolyse induziert [7]. Dies lässt vermuten, dass die Glykolyse in Astrozyten und Neuronen zellspezifisch reguliert wird.

Die NO-induzierte HIF-1 α -Stabilisierung ist PI3K/AKT/mTOR- und MAPK-vermittelt

Es ist bekannt, dass NO HIF-1 α über den PI3K/AKT/mTOR- und den MAPK-Signalweg, also eine Induktion der Translation, stabilisieren kann [87].

In dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der NO-induzierten HIF-1 α -Stabilisierung in primären corticalen Astrozyten von dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg bestätigt.

Die Inhibition der HIF-1 α -Stabilisierung durch den MAP Kinase Kinase Inhibitor PD98059 deutet darauf hin, dass auch dieser Signalweg an der NO-induzierten Stabilisierung von HIF-1 α beteiligt ist. Interessanterweise führt eine Inhibition der löslichen Guanylatcyclase (sGC), die der einzige bisher beschriebene zelluläre Rezeptor für NO ist [55], nicht zu einer verminderten HIF-1 α -Stabilisierung. Der sGC/cGMP-Signalweg scheint also für die Stabilisierung von HIF-1 α durch NO in Astrozyten keine Rolle zu spielen. Es wird angenommen, dass ein alternativer, sGC-unabhängiger NO-induzierter Signalweg involviert sein könnte.

In Astrozyten wurde gezeigt, dass NO die mitochondriale Respiration durch die Inhibition der Cytochrom C Oxidase hemmt [6]. Die Inhibition der Cytochrom C Oxidase durch NO führt zur Produktion von Superoxid Anionen, welche durch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Transkription steigern können [129]. Dieser Signalweg wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Luc Pellerin (Département de Physiologie, Université de Lausanne, Schweiz) untersucht. In diesen Experimenten wurden Astrozyten mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂), das als alternative Quelle für Sauerstoffradikale diente, behandelt. In Folge der Behandlung wird keine Induktion der Genexpression des HIF-1 α -Zielgens MCT4 beobachtet, obwohl NF- κ B im Zellkern vorliegt [112]. Diese Experimente liefern Hinweise darauf, dass eine Inhibition der Cytochrom C Oxidase und die Freisetzung von ROS nicht an der Stabilisierung von HIF-1 α in Astrozyten beteiligt sind. Neben der Induktion der Translation durch den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, könnte auch eine NO-vermittelte Inhibition der Prolylhydroxylasen zu der HIF-1 α -Stabilisierung beitragen [120, 16]. Zusätzlich wäre auch eine Regulation von HIF-1 α durch eine NO-induzierte S-Nitrosylierung von HIF-1 α denkbar [107]. Dies könnte in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

NO-induzierte HIF-1 α -abhängige Genexpression in Astrozyten

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass NO nicht nur zu einer Stabilisierung von HIF-1 α führt, sondern auch eine zeitabhängige Induktion der Genexpression glykolytischer Enzyme sowie des GLUT1 und des MCT4 bewirkt. Die Expression glykolytischer Enzyme, die in Astrozyten höher exprimiert werden als in Neuronen, werden zusätzlich induziert. Beispiele dafür sind unter anderen HK2, PFKL und AldoA. Der Glut1 wird ebenfalls NO-abhängig induziert, sodass vermutet werden kann, dass die Kapazität zur Glukoseaufnahme der Astrozyten gesteigert wird.

Die Deta-Behandlung der Astrozyten führt auch zu einer Induktion der Expression von PFKFB3. PFKFB3 reguliert die Fruktose-2,6-Bisphosphat (F2,6BP)-Konzentration der Zelle. Bei PFKFB handelt es sich um bifunktionelle Enzyme,

die sowohl eine Kinase- als auch eine Phosphatasedomäne besitzen, die eine Phosphorylierung bzw. eine Dephosphorylierung von Fruktose-6-Phosphat bzw. F2,6BP katalysieren. Die PFK2-Funktion der PFKFB wird durch eine hohe Konzentration an Fruktose-6-Phosphat in einem *feedforward*-Mechanismus stimuliert, sodass gesteigert F2,6BP synthetisiert wird. F2,6BP wiederum ist ein starker Aktivator der Phospho-fruktokinase-1 (PFK-1), welche einen der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Glykolyse katalysiert. Unter den 5 PFKFB-Subtypen ist die PFKFB3 diejenige, die als der stärkster Aktivator der Glykolyse gilt [155, 14]. Eine Steigerung der Expression von PFKFB3 durch NO führt vermutlich auch zu einer gesteigerten PFK-1 Aktivität und damit zu einer gesteigerten Glykolyse. Interessanterweise wird die PFKFB3 in Neuronen zum einen nur gering exprimiert und zum anderen kontinuierlich proteasomal abgebaut [71]. Dies könnte ein weiterer Grund für die im Vergleich zu Astrozyten geringe glykolytische Aktivität der Neurone sein.

Die Genexpression der Pyruvatdehydrogenasekinase 1 (PDK1) wird ebenfalls durch NO induziert. Die PDK1 ist ein Inhibitor der Pyruvatdehydrogenase, welche die Schlüsselreaktion (die Konversion von Pyruvat zu Acetyl-CoA) für den Eintritt in den Citratzyklus katalysiert. Die gesteigerte Expression des Inhibitors der Pyruvatdehydrogenase impliziert, dass nicht nur die Glykolyse durch NO induziert wird, sondern gleichzeitig auch der Fluss von Pyruvat aus der Glykolyse in den Citratzyklus inhibiert wird. Dies ist im Einklang mit dem Befund, dass NO durch eine Inhibition der Cytochrom C Oxidase die Respiration in Astrozyten inhibiert [6]. Die Inhibition der Cytochrom C Oxidase und die Induktion der Glykolyse durch eine gesteigerte Genexpression könnten eine zeitliche Regulation des Metabolismus darstellen. Die Inhibition der Cytochrom C Oxidase erfolgt innerhalb von Minuten, während die Induktion der Genexpression erst nach 3 - 6 Stunden einsetzt. NO könnte also ein Regulator sein, der einerseits eine schnelle, transiente Modulation des Glukosestoffwechsels bewirkt und andererseits durch die Steigerung der Expression glykolytischer Enzyme und Transporter einen langanhaltenden Effekt auf den Glukosemetabolismus haben kann.

Es fällt auf, dass die Genexpression des MCT4 durch NO stark (bis zu 50-fach) induziert wird. Zusätzlich wird auch anhand eines Reportergenassays die Aktivierung des MCT4-Promotors durch NO in Astrozyten erstmals nachgewiesen. Interessanterweise wird das mRNA-Niveau des MCT1 in Astrozyten nicht durch NO reguliert. Diese differentielle Regulation von MCT4 und MCT1 in Astrozyten deckt sich mit den Ergebnissen des Kooperationspartners Luc Pellerin [112]. Der MCT4 weist im Vergleich zum MCT1 zwar eine geringe Affinität für Laktat auf ($K_m = 34$ mM), hat aber dafür eine hohe Laktat-Transportkapazität [46, 52]. Diese Eigenschaften lassen vermuten, dass der MCT4 für den Export für Laktat verantwortlich ist, wenn dieses in gesteigerten Mengen synthetisiert wird, wie zum Beispiel während der Glykolyse.

Auch die an der Glykogensynthese beteiligte Glykogensynthase (GS) wird in Abhängigkeit von NO gesteigert exprimiert. Im Gegensatz dazu wird die glykogenabbauende Glykogenphosphorylase (GPH BB) nicht gesteigert exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass NO-stimulierte Astrozyten die vermehrt aufgenommene Glukose nicht nur in der Glykolyse zu Laktat umsetzen, sondern auch in Form von Glykogen speichern.

Eine Induktion der Genexpression von Glut1, HK2 und MCT4 wird in Übereinstimmung mit der zellspezifischen NO-induzierten HIF-1 α -Stabilisierung in Astrozyten, aber nicht in Neuronen detektiert. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit früheren Befunden, die zeigen, dass Neurone, im Gegensatz zu Astrozyten, nicht mit einer Induktion der Glykolyse auf NO reagieren [5].

Ein siRNA-vermittelter HIF-1 α *knock-down* in primären Astrozyten verhindert die NO-induzierte HIF-1 α -Stabilisierung und Kerntranslokation. Entsprechend führt der *knock-down* von HIF-1 α in Deta-behandelten Astrozyten auch zu einer Reduktion der NO-induzierten Genexpression glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter. Zusätzlich wird übereinstimmend mit der Arbeitsgruppe von Luc Pellerin [112] eine verstärkte Laktatfreisetzung in das Medium von Deta-behandelten Astrozyten beobachtet. Dies deutet auch auf funktionaler Ebene auf eine Induktion der astrozytären Glykolyse durch NO hin. Der *knock-down* von HIF-1 α in Astrozyten führt zu einer Verminderung der Laktatfreisetzung in Deta-behandelten Astrozyten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit erstmals die Abhängigkeit der NO-induzierten Glykolyse in Astrozyten von HIF-1 α .

4.2.1 Regulation der Glykolyse in Astrozyten durch Kokultur

Der NO-Donor DetaNONOate setzt zwar geringe Mengen NO über einen Zeitraum von 20 Stunden kontinuierlich frei, stellt aber keine physiologische NO-Quelle dar. Daher stellte sich in dieser Arbeit die Frage nach einem möglichen physiologischen NO-Syntheseort im Gehirn. Im ZNS wird NO von 3 NO-Synthasen (NOS) produziert. Die nNOS wird in Neuronen exprimiert, die iNOS in aktivierten Astrozyten und die eNOS in Endothelzellen [23, 51]. Endotheliales NO ist in die Regulation des lokalen zerebralen Blutflusses (Vasodilatation), die Proliferation glatter Muskelzellen sowie die Leukozyten-Endothel-Interaktion involviert [10]. Neuronales NO ist unter anderem als ein Modulator der Langzeit- und Kurzzeit Plastizität im ZNS bekannt [4, 75]. In Astrozyten spielt die Aktivierung der iNOS eine wichtige Rolle für die Immunabwehr im ZNS [84]. Da in der neurovaskulären Einheit die drei NO-produzierenden Zellarten, Endothelzellen, Astrozyten und Neurone, in sehr engem Kontakt miteinander organisiert sind [78], wurde in dieser Arbeit untersucht, ob NO aus einer dieser Zellen die HIF-1 α -abhängige Induktion der Glykolyse in Astrozyten

vermitteln kann.

Die konstitutive NO-Produktion von primären Endothelzellen aus murinen Gehirnkapillaren und der murinen endothelialen Zelllinie bEnd.3 ist signifikant höher als in primären Astrozyten und Neuronen. Die Inhibition der eNOS durch L-NAME und einen siRNA-vermittelten eNOS *knock-down* bestätigt, dass diese hohe basale NO-Produktion in Endothelzellen abhängig von der Aktivität der eNOS ist. Da NO-Produktion in Zellkultur detektiert wurde, wurden Kokultur Experimente durchgeführt. Dabei wurden die zu untersuchenden primären Astrozyten auf der Membran eines Transwell-*Insert*-Systems und die Zellen mit welchen kokultiviert werden sollte auf dem Boden der Transwell-Zellkulturplatte kultiviert. Das Transwell-System hat den Vorteil, dass die beiden kokultivierten Zelltypen im Anschluss getrennt voneinander analysiert werden können. Der gewählte Versuchsaufbau sollte außerdem eine Hypoxie in den zu untersuchenden Astrozyten vermindern.

Die Kokultur von primären Astrozyten mit primären Endothelzellen oder bEnd.3 Zellen stabilisiert HIF-1 α in den primären Astrozyten. Im Gegensatz dazu führt eine Kokultur mit primären Neuronen oder primären Astrozyten nur zu einer geringen Stabilisierung von HIF-1 α in primären Astrozyten. Diese geringe HIF-1 α -Stabilisierung in den Astrozyten, könnte, trotz des bewusst gewählten Versuchsaufbaus, durch eine Hypoxie in den Astrozyten verursacht werden. Der NOS-Inhibitor L-NAME vermindert die Endothelzellen-vermittelte HIF-1 α Stabilisierung in primären Astrozyten. Dies legt nahe, dass es sich auch in Kokultur bei dem HIF-1 α -stabilisierende Faktor um NO handelt.

Kokultur mit Endothelzellen induziert in Astrozyten nicht nur die Stabilisierung von HIF-1 α , sondern auch die Expression der Zielgene Glut1, HK2, PDK1 und MCT4. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ergebnissen wird die Expression des MCT1, der nicht durch NO reguliert wird, auch durch die Kokultur mit Endothelzellen in Astrozyten nicht induziert. Die Behandlung der Endothelzellen mit dem NOS-Inhibitor L-NAME vermindert die Endothelzellen-vermittelte Steigerung der Genexpression von Glut1, HK2, PDK1 und MCT4, sodass auch in diesem Fall eine NO-vermittelte Induktion der Gene wahrscheinlich ist. Analog zu den Ergebnissen zur Stabilisierung von HIF-1 α in kokultivierten Astrozyten, führt Kokultur mit primären Neuronen oder primären Astrozyten nicht zu einer gesteigerten Expression von Glut1, HK2, PDK1 und MCT4. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass HIF-1 α in Astrozyten durch in Endothelzellen synthetisiertes NO stabilisiert werden kann und die Genexpression glykolytischer Enzyme gesteigert wird. Basierend auf den vorhergehenden Untersuchungen wird angenommen, dass dies auch zu einer gesteigerten Glykolyse in Astrozyten führt. Dies wird durch die Steigerung der Laktatfreisetzung von Astrozyten nach der Kokultur mit Endothelzellen untermauert.

ert.

Obwohl in dieser Arbeit eine NO-abhängige Induktion der Genexpression glykolytischer Enzyme und Glukose-/Laktattransporter in Astrozyten nur durch die Kokultur mit Endothelzellen erzielt wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Neurone und Astrozyten in Abhängigkeit von ihrer Aktivität oder Stimulation NO in höheren Konzentrationen produzieren können, die ausreichen um HIF-1 α in Astrozyten der Umgebung zu stabilisieren. Ähnlich wie für die Rolle des NO in der synaptischen Plastizität [4, 75], könnte auch in der neurovaskulären Einheit eine zwei-phasige Stimulation der Astrozyten durch NO möglich sein. Eine tonische Stimulation der Astrozyten durch endotheliales NO versetzt die Astrozyten in einen erhöhten glykolytischen Status und erhält diesen. Eine phasische Stimulation mit NO durch verschiedene Zellen in Abhängigkeit von deren Aktivität oder Stimulation, würde die glykolytische Aktivität der Astrozyten zusätzlich erhöhen z.B. durch eine schnelle Inhibition der Cytochrom C Oxidase [6].

4.2.2 Modell zur Regulation der Glykolyse in Astrozyten

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde ein neues Modell für den basalen Glukosemetabolismus in der neurovaskulären Einheit erstellt (Abbildung 4.1). Dieses wird im folgenden erläutert.

Das von Endothelzellen produzierte NO induziert eine lokale Vasodilatation der Gefäße [81]. Dies führt zu einem gesteigerten Blutfluss und damit auch zu einem Anstieg an lokal verfügbarer Glukose. Das endotheliale NO führt gleichzeitig zu einer Stabilisierung von HIF-1 α in Astrozyten der direkten Umgebung. Die geringe Diffusionsweite des NO limitiert also die Regulation von HIF-1 α auf endothelzell-nahe Astrozyten. Die Stabilisierung von HIF-1 α führt in den Astrozyten zu einer gesteigerten Expression des Glut1. Die Astrozyten können somit verstärkt Endothelzellen-vermittelt Glukose aufnehmen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Glukoseaufnahme ins Gehirn liegt nicht in der Transportkapazität der Endothelzellen, sondern wird durch die Expression der Glukosetransporter in Astrozyten und Neuronen reguliert [187]. Die Stabilisierung von HIF-1 α in den Astrozyten, führt auch zu einer gesteigerten Genexpression glykolytischer Enzyme, sodass in NO-stimulierten Astrozyten verstärkt Glykolyse und Laktatsynthese abläuft. Gleichzeitig wird der Fluss von Pyruvat in den Citratzyklus durch die Aktivität der PDK1 inhibiert. Der ebenfalls hochregulierte MCT4, der im Vergleich zu dem MCT1 eine hohe Transportkapazität für Laktat aufweist, setzt das in der Glykolyse produzierte Laktat in das Interstitium frei. Dieses Modell beschreibt erstmals eine mögliche Regulation des basalen astrozytären Glukosestoffwechsels durch das in Endothelzellen produzierte NO.

Das Modell der Regulation der astrozytären Glykolyse kann auch als Erweiterung zur klassischen Astrozyten-Neurone-Laktat-Shuttle Hypothese (ANLSH) verstanden werden. Die ANLSH ist ein Modell, welches die neuronale Aktivität an den lokalen Glukoseverbrauch im Gehirn koppelt. Das während der synaptischen Aktivität freigesetzte Glutamat wird von Astrozyten im Kotransport mit Na⁺ aufgenommen. Dies führt zu einer gesteigerten Glykolyse und Laktatfreisetzung in den Astrozyten. Die ANLSH beschreibt, dass das von Astrozyten freigesetzte Laktat von Neuronen aufgenommen wird, um den während der Aktivität gesteigerten Energiebedarf zu decken [136]. Obwohl diese Hypothese umstritten ist [54, 174, 111], gibt es zunehmend *in vivo* Hinweise auf die Existenz und eine essentielle Rolle des ANLS im Gehirn [178, 198, 22]. Die in dieser Arbeit gezeigte Kopplung der astrozytären Glykolyse an die basale NO-Produktion in Endothelzellen kann als Voraussetzung für die schnelle glykolytische Antwort der Astrozyten auf die neuronale Aktivität verstanden werden. Da sich die Astrozyten mit stabilisiertem HIF-1 α bereits basal in einem glykolytischen Status befinden, kann der Astrozyt schnell mit einer Laktatfreisetzung auf die neuronale Glutamatfreisetzung reagieren. Durch die hier vorgeschlagenen Mechanismen in der gliavaskulären Einheit, sollten Astrozyten die Energieversorgung aller Gehirnzellen sicherstellen können.

Eine offene Frage in diesem Modell stellt die Regulation der basalen NO-Produktion in Endothelzellen dar. Es ist bekannt, dass neuronale Aktivität zu einer NO-vermittelten Vasodilatation der lokalen Gefäße führen kann [114]. Dies ist für der Versorgung der Zellen mit zusätzlichem Sauerstoff und Glukose von großer Wichtigkeit. Eine direkte Interaktion zwischen Neuronen oder neuronalem NO und Endothelzellen wurde bisher jedoch nicht nachgewiesen. Daher wird auf Grund der Lokalisation der Astrozyten zwischen Neuronen und Endothelzellen angenommen, dass Astrozyten eine entscheidende Rolle für die neurovaskuläre Kopplung spielen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass neuronale Aktivität in Astrozyten zu einer Ca²⁺-abhängig Aktivierung der Cyclooxygenase führt. Die Hemmung der Cyclooxygenase inhibiert die Vasodilatation der Gefäße [180, 202]. Prostaglandin E₂, ein Produkt der Cyclooxygenase induziert in Endothelzellen die Aktivität der eNOS [125]. Eine Initiation der endothelialen NO-Produktion in Abhängigkeit der neuronalen Aktivität wäre also denkbar.

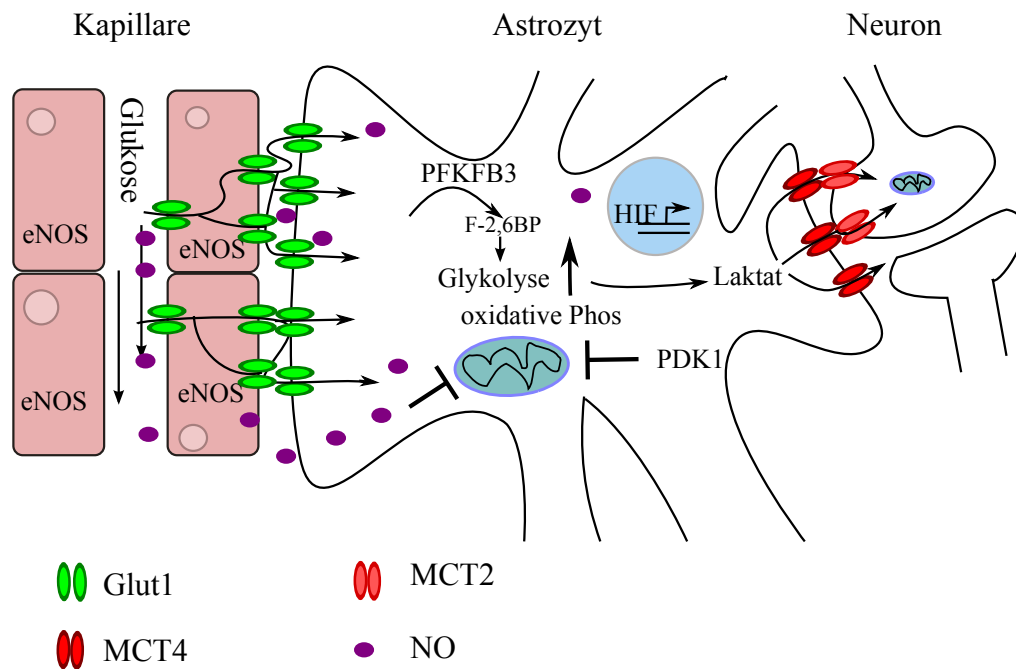


Abbildung 4.1: Modell zur Regulation der HIF-1 α -abhängigen Glykolyse in Astrozyten. In Endothelzellen synthetisiertes NO führt zu einer Vasodilatation der lokalen Kapillaren und erhöht damit das lokale Glukoseangebot. Gleichzeitig führt eine Stabilisierung von HIF-1 α in Astrozyten der unmittelbaren Umgebung zu einer erhöhten Transkription von Glut1, sodass Glukose vermehrt aufgenommen werden kann. Zusätzlich induziert die Stabilisierung von HIF-1 α die Glykolyse durch die gesteigerte Transkription der glykolytischen Enzyme, wie zum Beispiel HK2, AldoA und Eno1. Die oxidative Phosphorylierung wird einerseits durch NO direkt, andererseits wird HIF-1 α -induziert der Fluss von Pyruvat in den Citratzyklus durch die PDK1 inhibiert. Das während der Glykolyse synthetisierte Laktat wird durch den HIF-1 α -abhängigen MCT4 freigesetzt und kann dann von Neuronen als zusätzlicher Energielieferant aufgenommen werden.

4.3 Astrozyten-spezifischer HIF-1 α *knock-out in vivo*

In der *Selfish Brain*-Theorie wird angenommen, dass eine fehlerhafte Energieversorgung von Neuronen zu einer gesteigerten Energieaufnahme des Individuums aus der Umgebung führt, sodass eine Adipositas entsteht [139]. Auf molekularer Ebene legen die *in vitro* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, dass HIF-1 α an der Regulation des astrozytären Glukosestoffwechsels maßgeblich beteiligt sein könnte. Dies könnte im Zusammenhang mit der ANLSH auch von Bedeutung für die ausreichende Versorgung von Neuronen mit Energie (in Form von Laktat) sein. Daher wurde ein Astrozyten-spezifisches HIF-1 α *knock-out*-Mausmodell generiert, mit dem Fütterungsversuche durchgeführt wurden.

Das Füttern der männlichen und weiblichen Mäuse mit einer Hochfettdiät (60 kcal % Fett) für 21 Wochen führt zu einer signifikanten Gewichtszunahme im Vergleich zu Tieren, die mit einer Kontrolldiät (10 kcal % Fett) gefüttert wurden. Signifikante Unterschiede in der Gewichtszunahme zwischen den Kontroll-Tieren und den HIF-1 α *knock-out*-Mäusen sind nicht zu erkennen. Dies könnte in einem nicht ausreichender Rekombinationseffizienz liegen. So zeigen Genexpressionsanalysen in HIF-1 α *knock-out*-Mäusen, dass ein signifikanter HIF-1 α *knock-out* im Cerebellum, nicht aber im Cortex der Mäuse erreicht wird. Als Folge liegt in den Gehirnen der HIF-1 α *knock-out*-Mäuse im Vergleich zu Kontroll-Tieren keine signifikante Verminderung der Expression von Glut1, HK2 und PDK1 vor. Die geringe Rekombination im Cortex ist in Übereinstimmung mit einer früheren Publikation, die zeigt, dass eine GFAP-Promotor-vermittelte Rekombination vor allem im Cerebellum stattfindet [74]. Es muss allerdings beachtet werden, dass mRNA aus dem Gesamtlysat der angegebenen Gehirnregion extrahiert wurde und nicht nur aus Astrozyten. Um eine höhere *knock-out*-Effizienz zu erreichen, könnte ein HIF-1 α *knock-out*-Modell generiert werden, bei welchem die Rekombinase unter der Kontrolle des GLAST-Promotors steht. Dieser ist im Gegensatz zu dem hier verwendeten GFAP-Promotor in Astrozyten aller Hirnregionen aktiv [124].

Männliche Tiere wurden im TSA Phenomaster metabolisch charakterisiert. Dabei werden keine Unterschiede im respiratorischen Quotient (RQ) in Abhängigkeit von der Diät oder dem Genotyp der Tiere beobachtet. Wird vorwiegend Fett verstoffwechselt, liegt der RQ bei 0,7, werden dagegen vorwiegend Kohlenstoffe verbrannt liegt er bei 1. Der gleiche RQ von ungefähr 0,8-0,9 der Versuchstiere zeigt, dass die mit der Hochfettdiät gefütterten Tiere das Fett der Nahrung nicht verstoffwechseln. Dies ist im Einklang mit der Zunahme des Gewichtes der Hochfettdiät-gefütterten Tiere bei gleichbleibender Aktivität. Obwohl keine Signifikanz der Futteraufnahme

in kcal in einem Zeitraum von 24 Stunden beobachtet wird, könnte die angedeutete Mehraufnahme an Kalorien sich über einen Zeitraum von mehreren Wochen zu einer signifikanten Mehraufnahme an Kalorien kumulieren. Dies würde die Gewichtszunahme der Mäuse nach Fütterung mit der Hochfettdiät über 21 Wochen hinweg erklären. Eine höhere Anzahl von Tieren könnte Unterschiede in den verschiedenen Behandlungsgruppen deutlicher werden lassen, so werden üblicherweise Gruppengrößen von mindestens 8 Tieren/Gruppe verwendet.

4.4 Ausblick

Weitere zukünftige *in vitro* und *in vivo* Experimente sollten das Modell zur Regulation der Glykolyse in Astrozyten unterstützen.

Es könnten Endothelzellen-spezifische eNOS *knock-out*-Mäuse generiert werden. Eine Schwierigkeit dabei stellt dar, dass es bisher keine Mauslinie mit einem von LoxP-Sequenzen flankierten eNOS-Gen gibt, sodass diese Mäuse zunächst erzeugt werden müssten. Die Endothelzellen der Gehirn-Kapillaren dieser Tiere könnten kultiviert und für weitere Versuche mit dem Kokultursystem eingesetzt werden, um die Rolle der eNOS für die HIF-1 α -Stabilisierung in Astrozyten zu verifizieren. Des Weiteren könnten die Gehirne dieser Tiere auf eine normoxische HIF-1 α -Stabilisierung hin untersucht werden. Ist das vorgeschlagene Modell richtig, sollte keine Stabilisierung von HIF-1 α im normoxischen Gehirn vorliegen.

Um die physiologische Relevanz des endothelialen NO und astrozytären HIF-1 α zu untersuchen sind verschiedene *in vivo* Experimente an transgenen Mauslinien vorstellbar. Eine Methode, die für *in vivo* Beobachtungen im Gehirn zunehmend an Bedeutung gewinnt, ist die 2-Photonenmikroskopie. Diese Methode hat den Vorteil, dass lokale zerebrale Vorgänge im Cortex bis zu einer Tiefe von 200 μm *in vivo* am anästhesierten Tier untersucht werden können. So wäre es denkbar, eine Laktat-Sonde zu etablieren, die in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Laktats ihre Fluoreszenz ändert. Ein ähnliches System wurde bereits für die Messung von Glukose in einzelnen Zellen etabliert [19] und in Zellkultur und Gehirnschnitten verwendet [20]. Mit Hilfe einer ähnlichen Laktat-Sonde könnten Laktatfreisetzung und -aufnahme *in vivo* unter Stimulation und basalen Bedingungen in Endothelzellen-spezifischen eNOS *knock-out*-Mäusen und Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out*-Mäusen beobachtet werden.

Alternativ könnte aber auch ein lokaler eNOS-spezifischer *knock-down in vivo* in Gehirn-Endothelzellen induziert werden. Dazu könnten Mäuse verwendet werden, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Gehirnendothel-spezifischen SLCO1C1-Promotors exprimieren [149]. Diesen Tieren könnte ein rekombinanter adeno-assoziiierter Virus (AAV), der für eine eNOS-spezifische shRNA codiert, in spezifische Gehirnregionen stereotaktisch injiziert werden [194]. Der Sequenz der shRNA sollte ein STOP-Codon vorangestellt sein, welches von LoxP-Sequenzen flankiert ist. In den Cre-exprimierenden Endothelzellen würde dann mit Hilfe der shRNA ein eNOS-spezifischer *knock-down* erfolgen. Es könnte dann *in vivo* die Aufnahme von Glukose in Astrozyten in Abhängigkeit von der eNOS unter Verwendung des fluoreszierenden Glukoseanalogon 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-Deoxyglukose (2-NBDG) [184] und eines 2-Photonenmikroskops untersucht werden. Analog könnte auch ein lokaler HIF-1 α *knock-down* in Astrozyten von Mäusen, wel-

che die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des GLAST-Promotors exprimieren, erzeugt werden.

In der Literatur wird beschrieben, dass die astrozytäre Glykogenolyse und die damit verbundene Laktatfreisetzung für die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses essentiell ist [60]. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass die Laktatfreisetzung von Astrozyten durch MCT1 und MCT4 und die Laktataufnahme in Neurone durch MCT2 ebenfalls zur Etablierung des Langzeit-Gedächtnisses beitragen [178]. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass HIF-1 α an der Laktatfreisetzung in Astrozyten beteiligt ist. Einerseits führt die HIF-1 α -regulierte Steigerung der Glykolyse zu einer erhöhten Laktatproduktion und andererseits wird der MCT4 massiv induziert, sodass Laktat verstärkt freigesetzt werden kann. Basierend auf diesen Ergebnissen, kann spekuliert werden, dass astrozytäres HIF-1 α auch eine Rolle für die Gedächtnisbildung spielen kann. Um dies zu überprüfen, könnten Astrozyten-spezifische HIF-1 α *knock-out*-Mäuse Gedächtnis- und Lerntests unterzogen werden. Beispielsweise könnte zur Untersuchung des Langzeitgedächtnisses ein *Inhibitory Avoidance* Test mit den verschiedenen Mausmodellen durchgeführt werden [178].

Zusammenfassung

Astrozyten und Neurone weisen unterschiedliche metabolische Profile auf. Beide Zellarten nehmen Glukose als primären Energielieferanten auf. Während Neurone Glukose nicht speichern, sondern direkt mittels oxidativer Phosphorylierung in Energie umwandeln, können Astrozyten zusätzlich Glykogen speichern und verstärkt aerobe Glykolyse betreiben. Dieses glykolytische Profil der Astrozyten zeigt sich unter anderem durch die Freisetzung von Laktat. Laktat kann im Gehirn als zusätzliche Energiequelle dienen, wenn die lokale Glukose während neuronaler Aktivität aufgebraucht ist. Die Glykolyse der Astrozyten spielt also eine wichtige Rolle für die Versorgung anderer Gehirnzellen mit Energie. Die molekulare Regulation der astrozytären Glykolyse wurde bisher nicht untersucht. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro* Regulationsmechanismen der astrozytären Glykolyse in primär-kultivierten murinen corticalen Astrozyten untersucht.

Eine vergleichende Expressionsanalyse in primären Astrozyten und Neuronen zeigte, dass eine Vielzahl glykolytischer Enzyme sowie Glukose-/Laktattransporter in Astrozyten höher exprimiert werden als in Neuronen. Glykolytische Enzyme sind bekannte Zielgene des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1α (HIF- 1α). HIF- 1α wird unter Normoxie proteasomal abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF- 1α stabilisiert und in den Kern transportiert, wo die Transkription der Zielgene induziert wird. Im Gegensatz zu anderen Geweben konnte in dieser Arbeit HIF- 1α im Gehirn auch unter normoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Ein bekannter Stabilisator von HIF- 1α unter Normoxie ist Stickstoffmonoxid (NO), welches auch im Gehirn eine wichtige Rolle als Volumentransmitter spielt. Die Behandlung von primären Astrozyten mit dem NO-Donor DetaNONOate führte zu einer HIF- 1α -Stabilisierung und Kerntranslokation. Diese Stabilisierung war unabhängig vom klassischen sGC-cGMP-Signalweg, aber abhängig von dem PI3K/AKT/mTOR- und dem MAPK-Signalweg. Die Behandlung der Astrozyten mit DetaNONOate steigerte konzentrations- und zeitabhängigen spezifisch die mRNA-Expression glykolytischer Enzyme sowie Glukose- und Laktattransporter in primären Astrozyten, nicht aber in primären Neuronen. Die Abhängigkeit dieser NO-induzierten Genexpression

von HIF-1 α wurde durch einen siRNA-vermittelten HIF-1 α *knock-down* gezeigt. Die durch NO, in Abhängigkeit von HIF-1 α , gesteigerte Laktatfreisetzung der Astrozyten bestätigte die Induktion der Glykolyse auf funktionaler Ebene.

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit lassen vermuten, dass HIF-1 α eine Rolle für die astrozytäre Laktatproduktion spielt. In Mäusen mit einem Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out* sollten daher Neurone nicht ausreichend mit Energie versorgt werden. Dieses Tier-Modell wurde für die Untersuchung der *Selfish Brain*-Theorie, die eine gestörte Energieversorgung von Neuronen im Gehirn als Auslöser von Adipositas in Betracht zieht, eingesetzt. Ein Unterschied in der Gewichtsentwicklung, dem Blutzucker und der Nahrungsaufnahme von Astrozyten-spezifischen HIF-1 α *knock-out*-Mäusen und den entsprechenden Kontroll-Tieren wurde jedoch nicht beobachtet.

NO wird im Gehirn von Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen freigesetzt. *In vitro* produzierten Endothelzellen signifikant mehr NO als Astrozyten und Neurone. Die Kokultur von Astrozyten mit primären Endothelzellen aus Gehirnkapillaren oder einer Endothelzelllinie führte in Astrozyten zu einer Stabilisierung von HIF-1 α . Dies wurde nicht bei Kokultur von Astrozyten mit Astrozyten oder Neuronen beobachtet. Die Kokultur der Astrozyten mit Endothelzellen induzierte außerdem die Expression von glykolytischen Enzymen und Glukose-/Laktattransportern in Astrozyten. Sowohl die Endothelzellen-vermittelte HIF-1 α -Stabilisierung, als auch die Induktion der Genexpression glykolytischer Enzyme und Transporter wurde durch die Inhibition der endothelialen NO-Synthase reduziert. Auf funktioneller Ebene wurde außerdem eine gesteigerte Laktatproduktion in mit Endothelzellen kokultivierten Astrozyten nachgewiesen.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde ein neues Modell für den Glukosemetabolismus in der neurovaskulären Einheit erstellt. In diesem Modell reguliert endotheliales NO einerseits den lokalen zerebralen Blutfluss und andererseits die basale glykolytische Aktivität der Astrozyten durch eine Stabilisierung von HIF-1 α . Dieses Modell trägt zum besseren Verständnis der metabolischen Interaktionen in der neurovaskulären Einheit bei.

Literaturverzeichnis

- [1] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7(1):41–53, 2006.
- [2] K. Abremski and R. Hoess. Bacteriophage p1 site-specific recombination. purification and properties of the cre recombinase protein. *J Biol Chem*, 259(3):1509–1514, 1984.
- [3] R. S. Ahima. Digging deeper into obesity. *J Clin Invest*, 121(6):2076–2079, 2011.
- [4] N. Akgoeren, P. Dalgaard, and M. Lauritzen. Cerebral blood flow increases evoked by electrical stimulation of rat cerebellar cortex: relation to excitatory synaptic activity and nitric oxide synthesis. *Brain Res*, 710(1-2):204–214, 1996.
- [5] A. Almeida, J. Almeida, J. P. Bolanos, and S. Moncada. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated atp in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26):15294–15299, 2001.
- [6] A. Almeida, P. Ciudad, M. Delgado-Esteban, E. Fernandez, P. Garcia-Nogales, and J.P. Bolanos. Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide: its role in glucose metabolism and neuroprotection. *J Neurosci Res*, 79(1-2):166–171, 2005.
- [7] A. Almeida, M. Delgado-Esteban, J. P. Bolanos, and J. M. Medina. Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem*, 81(2):207–217, 2002.
- [8] Z. Arany, L. E. Huang, R. Eckner, S. Bhattacharya, C. Jiang, M. A. Goldberg, H. F. Bunn, and D. M. Livingston. An essential role for p300/cbp in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23):12969–12973, 1996.
- [9] A. Araque. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol*, 4(1):3–10, 2008.

- [10] D.N. Atochin and P.L. Huang. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. *Pflügers Arch*, 460(6):965–974, 2010.
- [11] D. Attwell and S. B. Laughlin. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(10):1133–1145, 2001.
- [12] A. Aubert and R. Costalat. Interaction between astrocytes and neurons studied using a mathematical model of compartmentalized energy metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(11):1476–1490, 2005.
- [13] A. Aubert and R. Costalat. Compartmentalization of brain energy metabolism between glia and neurons: insights from mathematical modeling. *Glia*, 55(12):1272–1279, 2007.
- [14] H. Bando, T. Atsumi, T. Nishio, H. Niwa, S. Mishima, C. Shimizu, N. Yoshioka, R. Bucala, and T. Koike. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/pfkfb3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res*, 11(16):5784–5792, 2005.
- [15] Y. Ben-Yosef, N. Lahat, S. Shapiro, H. Bitterman, and A. Miller. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res*, 90(7):784–791, 2002.
- [16] U. Berchner-Pfannschmidt, S. Tug, B. Trinidad, F. Oehme, H. Yamac, C. Wotzlaw, I. Flamme, and J. Fandrey. Nuclear oxygen sensing: induction of endogenous prolyl-hydroxylase 2 activity by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*, 283(46):31745–31753, 2008.
- [17] P. Bezzi, G. Carmignoto, L. Pasti, S. Vesce, D. Rossi, B. L. Rizzini, T. Pozzan, and A. Volterra. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, 391(6664):281–285, 1998.
- [18] C.X. Bittner, A. Loaiza, I. Ruminot, V. Larenas, T. Sotelo-Hitschfeld, R. Gutierrez, A. Cordova, R. Valdebenito, W. B. Frommer, and L. F. Barros. High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front Neuroenergetics*, 2, 2010.
- [19] C.X. Bittner, A. Loaiza, I. Ruminot, V. Larenas, T. Sotelo-Hitschfeld, R. Gutierrez, A. Cordova, R. Valdebenito, W. B. Frommer, and L. F. Barros. High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front Neuroenergetics*, 2, 2010.
- [20] C.X. Bittner, A. Loaiza, I. Ruminot, V. Larenas, T. Sotelo-Hitschfeld, R. Gutierrez, A. Cordova, R. Valdebenito, W. B. Frommer, and L. F. Barros. Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K^+ and a delayed and persistent effect of glutamate. *J Neurosci*, 31(12):4709–4713, 2011.

- [21] C.C. Blouin, E.L. Page, G.M. Soucy, and D.E. Richard. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood*, 103(3):1124–1130, 2004.
- [22] F. Boumezbeur, K. F. Petersen, G. W. Cline, G. F. Mason, K. L. Behar, G. I. Shulman, and D. L. Rothman. The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci*, 30(42):13983–13991, 2010.
- [23] D. S. Bredt, P. M. Hwang, and S. H. Snyder. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347(6295):768–770, 1990.
- [24] A. M. Brown. Brain glycogen re-awakened. *J Neurochem*, 89(3):537–552, 2004.
- [25] A. M. Brown and B. R. Ransom. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55(12):1263–1271, 2007.
- [26] A. M. Brown, S. B. Tekkok, and B. R. Ransom. Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J Physiol*, 549(Pt 2):501–512, 2003.
- [27] R. K. Bruick. Expression of the gene encoding the proapoptotic nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(16):9082–9087, 2000.
- [28] B. Brüne and J. Zhou. The role of nitric oxide (no) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (hif-1alpha). *Curr Med Chem*, 10(10):845–855, 2003.
- [29] J. D. Cahoy, B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. A. Krieg, S. A. Krupenko, W. J. Thompson, and B. A. Barres. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*, 28(1):264–278, 2008.
- [30] A. J. Cameron, J. E. Shaw, and P. Z. Zimmet. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 33(2):351–75, table of contents, 2004.
- [31] P. A. Carpentier, D. S. Duncan, and S. D. Miller. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun*, 22(2):140–147, 2008.
- [32] A. M. Cataldo and R. D. Broadwell. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental

- conditions. ii. choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J Neurocytol*, 15(4):511–524, 1986.
- [33] S. Cha, P. Chen, G. Johansson, C. Chu, M. Wang, Y. Jeng, S. Yu, J. Chen, K. Chang, S. Jee, C. Tan, M. Lin, and M. Kuo. MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1 α expression and tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 70(7):2675–2685, 2010.
- [34] C. Chen, N. Pore, A. Behrooz, F. Ismail-Beigi, and A. Maity. Regulation of glut1 mrna by hypoxia-inducible factor-1. interaction between h-ras and hypoxia. *J Biol Chem*, 276(12):9519–9525, 2001.
- [35] I. Choi and R. Gruetter. In vivo ^{13}C nmr assessment of brain glycogen concentration and turnover in the awake rat. *Neurochem Int*, 43(4-5):317–322, 2003.
- [36] Y. K. Choi, C. Kim, H. Lee, D. Jeoung, K. Ha, Y. Kwon, K. Kim, and Y. Kim. Carbon monoxide promotes vegf expression by increasing hif-1 α protein level via two distinct mechanisms, translational activation and stabilization of hif-1 α protein. *J Biol Chem*, 285(42):32116–32125, 2010.
- [37] J. Chuquet, P. Quilichini, E. A. Nimchinsky, and G. Buzsaki. Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J Neurosci*, 30(45):15298–15303, 2010.
- [38] Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915):520–562, 2002.
- [39] M. L. Cotrina and M. Nedergaard. Astrocytes in the aging brain. *J Neurosci Res*, 67(1):1–10, 2002.
- [40] S. B. Cox, T. A. Woolsey, and C. M. Rovainen. Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13(6):899–913, 1993.
- [41] N. F. Cruz and G. A. Dienel. High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(12):1476–1489, 2002.
- [42] I. A. Darby, A. Desmouliere, and T. D. Hewitson. Using in situ hybridisation to localize renal gene expression in tissue sections. *Methods Mol Biol*, 466:119–132, 2009.

- [43] F. Perez de Heredia, I. S. Wood, and P. Trayhurn. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (mct1, mct2, and mct4) expression in human adipocytes. *Pflugers Arch*, 459(3):509–518, 2010.
- [44] J. W. Deitmer, A. J. Verkhratsky, and C. Lohr. Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium*, 24(5-6):405–416, 1998.
- [45] G. A. Dienel and L. Hertz. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J Neurosci Res*, 66(5):824–838, 2001.
- [46] K. S. Dimmer, B. Friedrich, F. Lang, J. W. Deitmer, and S. Broer. The low-affinity monocarboxylate transporter mct4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J*, 350 Pt 1:219–227, 2000.
- [47] M. Ema, S. Taya, N. Yokotani, K. Sogawa, Y. Matsuda, and Y. Fujii-Kuriyama. A novel bhlh-pas factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the vegf expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9):4273–4278, 1997.
- [48] X. Fan, E. Roy, L. Zhu, T. C. Murphy, M. Kozlowski, M. S. Nanes, and J. Rubin. Nitric oxide donors inhibit luciferase expression in a promoter-independent fashion. *J Biol Chem*, 278(12):10232–10238, 2003.
- [49] D. Feldser, F. Agani, N. V. Iyer, B. Pak, G. Ferreira, and G. L. Semenza. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, 59(16):3915–3918, 1999.
- [50] C. R. Figley. Lactate transport and metabolism in the human brain: implications for the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *J Neurosci*, 31(13):4768–4770, 2011.
- [51] U. Foerstermann, J. S. Pollock, H. H. Schmidt, M. Heller, and F. Murad. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(5):1788–1792, 1991.
- [52] J. E. Manning Fox, D. Meredith, and A. P. Halestrap. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J Physiol*, 529 Pt 2:285–293, 2000.
- [53] R. F. Furchgott and J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789):373–376, 1980.

- [54] G. K. Gandhi, N. F. Cruz, K. K. Ball, and G. A. Dienel. Astrocytes are poised for lactate trafficking and release from activated brain and for supply of glucose to neurons. *J Neurochem*, 111(2):522–536, 2009.
- [55] J. Garthwaite. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*, 27(11):2783–2802, 2008.
- [56] H. A. Ghofrani, F. Rose, R. T. Schermuly, H. Olschewski, R. Wiedemann, N. Weissmann, C. Schudt, H. Tenor, W. Seeger, and F. Grimminger. Amplification of the pulmonary vasodilatory response to inhaled iloprost by subthreshold phosphodiesterase types 3 and 4 inhibition in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med*, 30(11):2489–2492, 2002.
- [57] C. Giaume, A. Koulakoff, L. Roux, D. Holcman, and N. Rouach. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*, 11(2):87–99, 2010.
- [58] C. Giaume and L. Venance. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*, 24(1):50–64, 1998.
- [59] H. M. Gibbons and M. Dragunow. Adult human brain cell culture for neuroscience research. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(6):844–856, 2010.
- [60] M. E. Gibbs, D. G. Anderson, and L. Hertz. Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chickens. *Glia*, 54(3):214–222, 2006.
- [61] J. W. Gordon and F. H. Ruddle. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 214(4526):1244–1246, 1981.
- [62] K. Gradin, C. Takasaki, Y. Fujii-Kuriyama, and K. Sogawa. The transcriptional activation function of the hif-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*, 277(26):23508–23514, 2002.
- [63] M. M. Halassa, T. Fellin, H. Takano, J. Dong, and P. G. Haydon. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*, 27(24):6473–6477, 2007.
- [64] C. N. Hall and J. Garthwaite. What is the real physiological no concentration in vivo? *Nitric Oxide*, 21(2):92–103, 2009.
- [65] E. N. Harvey. The oxygen consumption of luminous bacteria. *J Gen Physiol*, 11(5):469–475, 1928.

- [66] R. F. Haseloff, I. E. Blasig, H. C. Bauer, and H. Bauer. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol*, 25(1):25–39, 2005.
- [67] Y. Hayashi, M. Nomura, S. Yamagishi, S. Harada, J. Yamashita, and H. Yamamoto. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*, 19(1):13–26, 1997.
- [68] S. J. R. Heales, A. A. J. Lam, A. J. Duncan, and J. M. Land. Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res*, 29(3):513–519, 2004.
- [69] R. P. Hellendall and J. P. Ting. Differential regulation of cytokine-induced major histocompatibility complex class ii expression and nitric oxide release in rat microglia and astrocytes by effectors of tyrosine kinase, protein kinase c, and camp. *J Neuroimmunol*, 74(1-2):19–29, 1997.
- [70] T. Hellwig-Bürgel, K. Rutkowski, E. Metzen, J. Fandrey, and W. Jelkmann. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate dna binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*, 94(5):1561–1567, 1999.
- [71] A. Herrero-Mendez, A. Almeida, E. Fernandez, C. Maestre, S. Moncada, and J. P. Bolanos. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by apc/c-cdh1. *Nat Cell Biol*, 11(6):747–752, 2009.
- [72] L. Hertz and E. Hertz. Cataplerotic tca cycle flux determined as glutamate-sustained oxygen consumption in primary cultures of astrocytes. *Neurochem Int*, 43(4-5):355–361, 2003.
- [73] L. Hertz, L. Peng, and G. A. Dienel. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(2):219–249, 2007.
- [74] P. G. Hirrlinger, A. Scheller, C. Braun, J. Hirrlinger, and F. Kirchhoff. Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible dna recombinase variant creert2. *Glia*, 54(1):11–20, 2006.
- [75] R. A. Hopper and J. Garthwaite. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, 26(45):11513–11521, 2006.

- [76] J. Hu, D. J. Discher, N. H. Bishopric, and K. A. Webster. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(3):894–899, 1998.
- [77] L. E. Huang, W. G. Willmore, J. Gu, M. A. Goldberg, and H. F. Bunn. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem*, 274(13):9038–9044, 1999.
- [78] C. Iadecola. Neurovascular regulation in the normal brain and in alzheimer’s disease. *Nat Rev Neurosci*, 5(5):347–360, 2004.
- [79] Y. Igarashi, H. Utsumi, H. Chiba, Y. Yamada-Sasamori, H. Tobioka, Y. Kamimura, K. Furuuchi, Y. Kokai, T. Nakagawa, M. Mori, and N. Sawada. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 261(1):108–112, 1999.
- [80] L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24):9265–9269, 1987.
- [81] L. J. Ignarro, G. Cirino, A. Casini, and C. Napoli. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, 34(6):879–886, 1999.
- [82] Y. Itoh, T. Esaki, K. Shimoji, M. Cook, M. J. Law, E. Kaufman, and L. Sokoloff. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8):4879–4884, 2003.
- [83] J. W. Jeong, M. K. Bae, M. Y. Ahn, S. H. Kim, T. K. Sohn, M. H. Bae, M. A. Yoo, E. J. Song, K. J. Lee, and K. W. Kim. Regulation and destabilization of hif-1 α by ard1-mediated acetylation. *Cell*, 111(5):709–720, 2002.
- [84] E. Juettler, E. Bonmann, M. Spranger, V. Kolb-Bachofen, and C. V. Suschek. A novel role of interleukin-1-converting enzyme in cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: Implications for neuroinflammatory diseases. *Mol Cell Neurosci*, 34(4):612–620, 2007.
- [85] T. Kamura, S. Sato, K. Iwai, M. Czyzyk-Krzeska, R. C. Conaway, and J. W. Conaway. Activation of hif1 α ubiquitination by a reconstituted von

- hippel-lindau (vhl) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19):10430–10435, 2000.
- [86] K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, P. J. Fisher, W. R. Zipfel, and W. W. Webb. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science*, 305(5680):99–103, 2004.
- [87] K. Kasuno, S. Takabuchi, K. Fukuda, S. Kizaka-Kondoh, J. Yodoi, T. Adachi, G. L. Semenza, and K. Hirota. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on mapk and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem*, 279(4):2550–2558, 2004.
- [88] T. Kawamata and Y. Tomari. Making risc. *Trends Biochem Sci*, 35(7):368–376, 2010.
- [89] Q. Ke and M. Costa. Hypoxia-inducible factor-1 (hif-1). *Mol Pharmacol*, 70(5):1469–1480, 2006.
- [90] P. J. Kenny. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron*, 69(4):664–679, 2011.
- [91] Kettenmann. *Neuroglia*. Oxford Press, 2005.
- [92] J. Kim, Y. Shao, S. Kim, S. Kim, H. Song, J. Jeon, H. Suh, J. Chung, S. Yoon, Y. Kim, and I. Choi. Hypoxia-induced il-18 increases hypoxia-inducible factor-1 α expression through a rac1-dependent nf-kappab pathway. *Mol Biol Cell*, 19(2):433–444, 2008.
- [93] H. Kimura, A. Weisz, T. Ogura, Y. Hitomi, Y. Kurashima, K. Hashimoto, F. D’Acquisto, M. Makuuchi, and H. Esumi. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*, 276(3):2292–2298, 2001.
- [94] H. Kleinert, P. M. Schwarz, and U. Foerstermann. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem*, 384(10-11):1343–1364, 2003.
- [95] S. Koizumi, K. Fujishita, and K. Inoue. Regulation of cell-to-cell communication mediated by astrocytic atp in the cns. *Purinergic Signal*, 1(3):211–217, 2005.
- [96] D. L. Korol and P. E. Gold. Glucose, memory, and aging. *Am J Clin Nutr*, 67(4):764S–771S, 1998.

- [97] C. H. Kos. Cre/loxp system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev*, 62(6 Pt 1):243–246, 2004.
- [98] B. Krishnamachary, S. Berg-Dixon, B. Kelly, F. Agani, D. Feldser, G. Ferreira, N. Lyer, J. LaRusch, B. Pak, P. Taghavi, and G. L. Semenza. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*, 63(5):1138–1143, 2003.
- [99] D. Lando, D. J. Peet, J. J. Gorman, D. A. Whelan, M. L. Whitelaw, and R. K. Bruick. Fih-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, 16(12):1466–1471, 2002.
- [100] M. Lauzier, E. L. Page, M. D. Michaud, and D. E. Richard. Differential regulation of hypoxia-inducible factor-1 through receptor tyrosine kinase transactivation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 148(8):4023–4031, 2007.
- [101] C. Lecrux and E. Hamel. The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiol (Oxf)*, 203(1):47–59, 2011.
- [102] C. J. Lee, G. Mannaioni, H. Yuan, D. H. Woo, M. B. Gingrich, and S. F. Traynelis. Astrocytic control of synaptic nmda receptors. *J Physiol*, 581(Pt 3):1057–1081, 2007.
- [103] Sae-Won Lee, Woo Jean Kim, Yoon Kyung Choi, Hyun Seok Song, Myung Jin Son, Irwin H Gelman, Yung-Jin Kim, and Kyu-Won Kim. Ssecks regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med*, 9(7):900–906, 2003.
- [104] R. L. Leino, D. Z. Gerhart, A. M. van Bueren, A. L. McCall, and L. R. Drewes. Ultrastructural localization of glut 1 and glut 3 glucose transporters in rat brain. *J Neurosci Res*, 49(5):617–626, 1997.
- [105] G. C. Leo, B. F. Driscoll, R. P. Shank, and E. Kaufman. Analysis of [1-13c]d-glucose metabolism in cultured astrocytes and neurons using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Dev Neurosci*, 15(3-5):282–288, 1993.
- [106] A. P. Levy, N. S. Levy, S. Wegner, and M. A. Goldberg. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*, 270(22):13333–13340, 1995.
- [107] F. Li, P. Sonveaux, Z. N. Rabbani, S. Liu, B. Yan, Q. Huang, Z. Vujaskovic,

- M. W. Dewhirst, and C. Li. Regulation of hif-1 α stability through s-nitrosylation. *Mol Cell*, 26(1):63–74, 2007.
- [108] D. Lovatt, U. Sonnewald, H. S. Waagepetersen, A. Schousboe, W. He, J. C. Lin, X. Han, T. Takano, S. Wang, F. J. Sim, S. A. Goldman, and M. Nedergaard. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci*, 27(45):12255–12266, 2007.
- [109] Y. Makino, A. Kanopka, W. J. Wilson, H. Tanaka, and L. Poellinger. Inhibitory pas domain protein (ipas) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *J Biol Chem*, 277(36):32405–32408, 2002.
- [110] S. Mangia, M. DiNuzzo, F. Giove, A. Carruthers, I. A. Simpson, and S. J. Vannucci. Response to 'comment on recent modeling studies of astrocyte-neuron metabolic interactions': much ado about nothing. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(6):1346–1353, 2011.
- [111] S. Mangia, I. A. Simpson, S. J. Vannucci, and A. Carruthers. The in vivo neuron-to-astrocyte lactate shuttle in human brain: evidence from modeling of measured lactate levels during visual stimulation. *J Neurochem*, 109 Suppl 1:55–62, 2009.
- [112] F. Marcillac, B. Brix, C. Repond, O. Joehren, and L. Pellerin. Nitric oxide induces the expression of the monocarboxylate transporter mct4 in cultured astrocytes by a cgmp-independent transcriptional activation. *Glia*, 2011.
- [113] M. Martin, P. Canioni, and M. Merle. Analysis of carbon metabolism in cultured cerebellar and cortical astrocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 43(5):631–643, 1997.
- [114] M. R. Matea and E. A. Newman. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci*, 26(11):2862–2870, 2006.
- [115] S. P. Mathupala, A. Rempel, and P. L. Pedersen. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type ii hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem*, 276(46):43407–43412, 2001.
- [116] P. H. Maxwell. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol*, 90(6):791–797, 2005.
- [117] M. C. McKenna, H. S. Waagepetersen, A. Schousboe, and U. Sonnewald. Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer

- of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools. *Biochem Pharmacol*, 71(4):399–407, 2006.
- [118] E. C. McNay. The impact of recurrent hypoglycemia on cognitive function in aging. *Neurobiol Aging*, 26 Suppl 1:76–79, 2005.
- [119] G. Melillo, T. Musso, A. Sica, L. S. Taylor, G. W. Cox, and L. Varesio. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med*, 182(6):1683–1693, 1995.
- [120] E. Metzen, J. Zhou, W. Jelkmann, J. Fandrey, and B. Brüne. Nitric oxide impairs normoxic degradation of hif-1 α by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell*, 14(8):3470–3481, 2003.
- [121] H. Mi, H. Haerberle, and B. A. Barres. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci*, 21(5):1538–1547, 2001.
- [122] A. Misra and L. Khurana. The metabolic syndrome in south asians: epidemiology, determinants, and prevention. *Metab Syndr Relat Disord*, 7(6):497–514, 2009.
- [123] K. Mori, N. Cruz, G. Dienel, T. Nelson, and L. Sokoloff. Direct chemical measurement of the lambda of the lumped constant of the [14c]deoxyglucose method in rat brain: effects of arterial plasma glucose level on the distribution spaces of [14c]deoxyglucose and glucose and on lambda. *J Cereb Blood Flow Metab*, 9(3):304–314, 1989.
- [124] Tetsuji Mori, Kohichi Tanaka, Annalisa Buffo, Wolfgang Wurst, Ralf Kuehn, and Magdalena Goetz. Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia*, 54(1):21–34, 2006.
- [125] S. Namkoong, S. J. Lee, C. K. Kim, Y. M. Kim, H. T. Chung, H. Lee, J. A. Han, K. S. Ha, Y. G. Kwon, and Y. M. Kim. Prostaglandin e2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cgmp pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Mol Med*, 37(6):588–600, 2005.
- [126] A. Nehlig and A. Pereira de Vasconcelos. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol*, 40(2):163–221, 1993.
- [127] M. D. Norenberg and A. Martinez-Hernandez. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*, 161(2):303–310, 1979.
- [128] E. L. Page, D. A. Chan, A. J. Giaccia, M. Levine, and D. E. Richard. Hypoxia-

- inducible factor-1 α stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Mol Biol Cell*, 19(1):86–94, 2008.
- [129] M. Palacios-Callender, M. Quintero, V. S. Hollis, R. J. Springett, and S. Moncada. Endogenous no regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(20):7630–7635, 2004.
- [130] U. Pannasch, L. Vargova, J. Reingruber, P. Ezan, D. Holcman, C. Giaume, E. Sykova, and N. Rouach. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(20):8467–8472, 2011.
- [131] W. M. Pardridge. Blood-brain barrier transport of glucose, free fatty acids, and ketone bodies. *Adv Exp Med Biol*, 291:43–53, 1991.
- [132] V. Parpura and P. G. Haydon. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15):8629–8634, 2000.
- [133] G. Pellegrini, C. Rossier, P. J. Magistretti, and J. L. Martin. Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Brain Res Mol Brain Res*, 38(2):191–199, 1996.
- [134] L. Pellerin, L. H. Bergersen, A. P. Halestrap, and K. Pierre. Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res*, 79(-2):55–64, 2005.
- [135] L. Pellerin, A. Bouzier-Sore, A. Aubert, S. Serres, M. Merle, R. Costalat, and P. J. Magistretti. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*, 55(12):1251–1262, 2007.
- [136] L. Pellerin and P. J. Magistretti. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(22):10625–10629, 1994.
- [137] T. Persichini, M. Colasanti, G. M. Lauro, and P. Ascenzi. Cysteine nitrosylation inactivates the hiv-1 protease. *Biochem Biophys Res Commun*, 250(3):575–576, 1998.
- [138] A. Peters. The selfish brain: Competition for energy resources. *Am J Hum Biol*, 23(1):29–34, 2011.
- [139] A. Peters, B. Kubera, C. Hubold, and D. Langemann. The selfish brain: stress and eating behavior. *Front Neurosci*, 5:74, 2011.

- [140] A. Peters, U. Schweiger, L. Pellerin, C. Hubold, K. M. Oltmanns, M. Conrad, B. Schultes, J. Born, and H. L. Fehm. The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(2):143–180, 2004.
- [141] B. Pfeiffer-Guglielmi, B. Fleckenstein, G. Jung, and B. Hamprecht. Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J Neurochem*, 85(1):73–81, 2003.
- [142] T. L. Poulos. Soluble guanylate cyclase. *Curr Opin Struct Biol*, 16(6):736–743, 2006.
- [143] Virchow R. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. Berlin Hirschwald, 1858.
- [144] A. Rafiki, J. L. Boulland, A. P. Halestrap, O. P. Ottersen, and L. Bergersen. Highly differential expression of the monocarboxylate transporters mct2 and mct4 in the developing rat brain. *Neuroscience*, 122(3):677–688, 2003.
- [145] S. Ramachandrappa and I. S. Farooqi. Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest*, 121(6):2080–2086, 2011.
- [146] J. E. Rash, T. Yasumura, F. E. Dudek, and J. I. Nagy. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci*, 21(6):1983–2000, 2001.
- [147] D. D. Rees, R. M. Palmer, R. Schulz, H. F. Hodson, and S. Moncada. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 101(3):746–752, 1990.
- [148] D. E. Richard, E. Berra, and J. Pouyssegur. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 275(35):26765–26771, 2000.
- [149] D.A. Ridder, M. Lang, S. Salinin, J.-P. Roederer, M. Struss, C. Maser-Glitzh, and M. Schwaninger. Tak1 in brain endothelial cells mediates fever and sickness behaviour. *submitted*, 2011.
- [150] A. Rolfs, I. Kvietikova, M. Gassmann, and R. H. Wenger. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem*, 272(32):20055–20062, 1997.
- [151] M. J. Rossner, J. Hirrlinger, S. P. Wichert, C. Boehm, D. Newrzella, H. Hie-misch, G. Eisenhardt, C. Stuenkel, O. von Ahsen, and K. Nave. Global transcriptome analysis of genetically identified neurons in the adult cortex. *J Neurosci*, 26(39):9956–9966, 2006.

- [152] D. L. Rothman, N. R. Sibson, F. Hyder, J. Shen, K. L. Behar, and R. G. Shulman. In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the relationship between the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle and functional neuroenergetics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1387):1165–1177, 1999.
- [153] L. L. Rubin, K. Barbu, F. Bard, C. Cannon, D. E. Hall, H. Horner, M. Janatpour, C. Liaw, K. Manning, and J. Morales. Differentiation of brain endothelial cells in cell culture. *Ann N Y Acad Sci*, 633:420–425, 1991.
- [154] H. E. Ryan, M. Poloni, W. McNulty, D. Elson, M. Gassmann, J. M. Arbeit, and R. S. Johnson. Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res*, 60(15):4010–4015, 2000.
- [155] R. Sakakibara, M. Uemura, T. Hirata, N. Okamura, and M. Kato. Human placental fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: its isozymic form, expression and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61(11):1949–1952, 1997.
- [156] T. Sakurai, A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, G. P. Kozlowski, S. Wilson, J. R. Arch, R. E. Buckingham, A. C. Haynes, S. A. Carr, R. S. Annan, D. E. McNulty, W. S. Liu, J. A. Terrett, N. A. Elshourbagy, D. J. Bergsma, and M. Yanagisawa. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and g protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(5):1 page following 696, 1998.
- [157] L. Salvati, M. Mattu, M. Colasanti, A. Scalone, G. Venturini, L. Gradoni, and P. Ascenzi. No donors inhibit leishmania infantum cysteine proteinase activity. *Biochim Biophys Acta*, 1545(1-2):357–366, 2001.
- [158] J. Santolini. The molecular mechanism of mammalian no-synthases: a story of electrons and protons. *J Inorg Biochem*, 105(2):127–141, 2011.
- [159] B. Sauer and N. Henderson. Site-specific dna recombination in mammalian cells by the cre recombinase of bacteriophage p1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(14):5166–5170, 1988.
- [160] A. Scheid, R. H. Wenger, L. Schäffer, I. Camenisch, O. Distler, A. Ferenc, H. Cristina, H. E. Ryan, R. S. Johnson, K. F. Wagner, U. G. Stauffer, C. Bauer, M. Gassmann, and M. Meuli. Physiologically low oxygen concentrations in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor-beta3. *FASEB J*, 16(3):411–413, 2002.

- [161] C. J. Schofield and Z. Zhang. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 9(6):722–731, 1999.
- [162] H. Schulman. Nitric oxide: a spatial second messenger. *Mol Psychiatry*, 2(4):296–299, 1997.
- [163] A. Schurr. Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(1):142–152, 2006.
- [164] T. N. Seagroves, H. E. Ryan, H. Lu, B. G. Wouters, M. Knapp, P. Thibault, K. Laderoute, and R. S. Johnson. Transcription factor hif-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 21(10):3436–3444, 2001.
- [165] B. Seidel, A. Stanarius, and G. Wolf. Differential expression of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in blood vessels of the rat brain. *Neurosci Lett*, 239(2-3):109–112, 1997.
- [166] G. L. Semenza. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol*, 59(1):47–53, 2000.
- [167] G. L. Semenza. Hypoxia, clonal selection, and the role of hif-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35(2):71–103, 2000.
- [168] G. L. Semenza. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*, 7(8):345–350, 2001.
- [169] G. L. Semenza, B. H. Jiang, S. W. Leung, R. Passantino, J. P. Concordet, P. Maire, and A. Giallongo. Hypoxia response elements in the aldolase a, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271(51):32529–32537, 1996.
- [170] G. L. Semenza, M. K. Nejfelt, S. M. Chi, and S. E. Antonarakis. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(13):5680–5684, 1991.
- [171] Siesjö. Brain energy metabolism. *Wiley*, 1978.
- [172] B.K. Siesjoe. *Brain Energy Metabolism*. John Wiley & Sons, 1978.
- [173] A. C. Silva, S. P. Lee, C. Iadecola, and S. G. Kim. Early temporal characteristics of cerebral blood flow and deoxyhemoglobin changes during somatosensory stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20(1):201–206, 2000.

- [174] I. A. Simpson, A. Carruthers, and S. J. Vannucci. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(11):1766–1791, 2007.
- [175] I. A. Simpson, S. J. Vannucci, M. R. DeJoseph, and R. A. Hawkins. Glucose transporter asymmetries in the bovine blood-brain barrier. *J Biol Chem*, 276(16):12725–12729, 2001.
- [176] A. Stanarius, I. Töpel, S. Schulz, H. Noack, and G. Wolf. Immunocytochemistry of endothelial nitric oxide synthase in the rat brain: a light and electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Acta Histochem*, 99(4):411–429, 1997.
- [177] D. M. Stroka, T. Burkhardt, I. Desbaillets, R. H. Wenger, D. A. Neil, C. Bauer, M. Gassmann, and D. Candinas. Hif-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J*, 15(13):2445–2453, 2001.
- [178] A. Suzuki, S. A. Stern, O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti, and C. M. Alberini. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 144(5):810–823, 2011.
- [179] Y. Takahashi, S. Takahashi, Y. Shiga, T. Yoshimi, and T. Miura. Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (i) in cultured cells. *J Biol Chem*, 275(19):14139–14146, 2000.
- [180] T. Takano, G. Tian, W. Peng, N. Lou, W. Libionka, X. Han, and M. Nedergaard. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci*, 9(2):260–267, 2006.
- [181] K. L. Talks, H. Turley, K. C. Gatter, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and A. L. Harris. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors hif-1alpha and hif-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*, 157(2):411–421, 2000.
- [182] H. Tian, S. L. McKnight, and D. W. Russell. Endothelial pas domain protein 1 (epas1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, 11(1):72–82, 1997.
- [183] M. Tsacopoulos and P. J. Magistretti. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci*, 16(3):877–885, 1996.
- [184] V. Tsytsarev, K. I. Maslov, J. Yao, A. R. Parameswar, A. V. Demchenko, and

- L. V. Wang. In vivo imaging of epileptic activity using 2-nbdg, a fluorescent deoxyglucose analog. *J Neurosci Methods*, 2011.
- [185] M. S. Ullah, A. J. Davies, and A. P. Halestrap. The plasma membrane lactate transporter mct4, but not mct1, is up-regulated by hypoxia through a hif-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 281(14):9030–9037, 2006.
- [186] P. van Uden, N. S. Kenneth, and S. Rocha. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nf-kappab. *Biochem J*, 412(3):477–484, 2008.
- [187] S. J. Vannucci, F. Maher, and I. A. Simpson. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*, 21(1):2–21, 1997.
- [188] C. Vega, J. Martiel, D. Drouhault, M. Burckhart, and J. A. Coles. Uptake of locally applied deoxyglucose, glucose and lactate by axons and schwann cells of rat vagus nerve. *J Physiol*, 546(Pt 2):551–564, 2003.
- [189] W. Walz. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int*, 36(4-5):291–300, 2000.
- [190] G. L. Wang, B. H. Jiang, E. A. Rue, and G. L. Semenza. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-pas heterodimer regulated by cellular o2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12):5510–5514, 1995.
- [191] G. L. Wang and G. L. Semenza. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 dna-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*, 82(12):3610–3615, 1993.
- [192] B. Wedel, P. Humbert, C. Harteneck, J. Foerster, J. Malkewitz, E. Böhme, G. Schultz, and D. Koesling. Mutation of his-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(7):2592–2596, 1994.
- [193] R. H. Wenger. Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and o2-regulated gene expression. *FASEB J*, 16(10):1151–1162, 2002.
- [194] M. D. White, R. V. J. Milne, and M. F. Nolan. A molecular toolbox for rapid generation of viral vectors to up- or down-regulate neuronal gene expression in vivo. *Front Mol Neurosci*, 4:8, 2011.
- [195] H. Wolburg and A. Lippoldt. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*, 38(6):323–337, Jun 2002.

- [196] www.jaxmice.jax.org.
- [197] C. C. Wykoff, N. J. Beasley, P. H. Watson, K. J. Turner, J. Pastorek, A. Sibtain, G. D. Wilson, H. Turley, K. L. Talks, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and A. L. Harris. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*, 60(24):7075–7083, Dec 2000.
- [198] M. T. Wyss, R. Jolivet, A. Buck, P. J. Magistretti, and B. Weber. In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *J Neurosci*, 31(20):7477–7485, May 2011.
- [199] L. Xu, L. Zeng, and M. Wong. Impaired astrocytic gap junction coupling and potassium buffering in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Neurobiol Dis*, 34(2):291–299, May 2009.
- [200] Li Zhou and Dong-Ya Zhu. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, 20(4):223–230, Jun 2009.
- [201] N. Zhou, G. R. J. Gordon, D. Feighan, and B. A. MacVicar. Transient swelling, acidification, and mitochondrial depolarization occurs in neurons but not astrocytes during spreading depression. *Cereb Cortex*, 20(11):2614–2624, Nov 2010.
- [202] M. Zonta, M. C. Angulo, S. Gobbo, B. Rosengarten, K.-A. Hossmann, T. Pozzan, and G. Carmignoto. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*, 6(1):43–50, Jan 2003.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung der Astrozyten-Neuron-Laktat-Shuttle Theorie.	5
1.2	Domänen-Struktur von HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) und HIF-1 β	9
1.3	Sauerstoffabhängige Regulation von HIF-1 α	10
1.4	Die katalytischen Schritte der NO-Synthese.	14
1.5	Der cGMP Signalweg.	15
2.1	Verpaarungsstrategie zur Generierung von Astrozyten-spezifischen HIF-1 α <i>knock-out</i> -Mäusen.	51
3.1	Immuncytochemische Färbung der astrozytären und neuronalen Primärkulturen.	54
3.2	mRNA-Expressionsniveaus von mGFAP und mNefh in primären Astrozyten- und Neuronenkulturen.	55
3.3	Differentielle Expressionsanalyse primärer Astrozyten und Neurone.	56
3.4	Fortsetzung Abbildung 3.3	57
3.5	HIF-1 α -Stabilisierung in murinem Gewebe.	58
3.6	Nicht-radioaktive <i>in situ</i> -Hybridisierung mit Orexin- und HIF-1 α -spezifischen Oligonukleotid-Sonden.	59
3.7	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Deta-vermittelten HIF-1 α -Stabilisierung.	60
3.8	NO-induzierte HIF-1 α -Stabilisierung in Astrozyten und Neuronen.	61
3.9	Lokalisation von HIF-1 α in Deta-behandelten Astrozyten.	62
3.10	Inhibition der löslichen Guanylatcyclase (sGC).	63
3.11	NO-induzierte Phosphorylierung von AKT und der Map Kinase Kinase (ERK).	64
3.12	Phosphorylierung der Translationsfaktoren eIF4E und p70S6K.	65
3.13	Reduktion der NO-induzierten HIF1- α -Stabilisierung durch Inhibition des PI3K/AKT/mTOR- und des MAPK-Signalwegs.	66
3.14	Genexpressionsanalyse in Deta-behandelten Astrozyten.	68
3.15	Abbildung 3.14 Fortsetzung	69
3.16	Genexpressionsanalyse in Deta-behandelten Neuronen.	70

3.17 Genexpressionsanalyse in primären Astrozyten nach Behandlung mit Signalweg-Inhibitoren.	70
3.18 Agarosegel des Restriktionsverdaus des pGeneBLAzer-MCT4-Promotor Konstrukts mit BglII.	72
3.19 MCT4-Promotor Reportergenassay.	72
3.20 Laktatmessung im Medium kultivierter Astrozyten.	73
3.21 siRNA-vermittelter HIF-1 α <i>knock-down</i>	74
3.22 Genexpressionsanalyse von HIF-1 α -siRNA transfizierten primären Astro- zyten.	75
3.23 Fortsetzung Abbildung 3.22	76
3.24 Laktatmessung im Medium siRNA-transfizierter Astrozyten.	77
3.25 Nitrat/Nitrit Messung im Medium verschiedener Zellkulturen.	78
3.26 Nitrat/Nitrit Messung im Überstand von Endothelzellen Zellen.	79
3.27 eNOS <i>knock-down</i> in bEnd.3 Zellen.	79
3.28 HIF-1 α -Stabilisierung in kokultivierten Astrozyten.	81
3.29 Genexpressionsanalyse in kokultivierten Astrozyten.	82
3.30 Genexpressionsanalyse in kokultivierten Astrozyten.	83
3.31 Gesteigerte Laktatproduktion in kokultivierten Astrozyten.	84
3.32 Genotypisierung von Mäusen.	85
3.33 Genexpressionsanalyse in Astrozyten-spezifischen HIF-1 α <i>knock-out</i> - Mäusen.	86
3.34 Gewichtsentwicklung nach Zugabe einer hochkalorischen Diät in Astro- zyten-spezifischen HIF-1 α - <i>knock-out</i> -Mäusen.	88
3.35 Vorversuch zur Bestimmung verschiedener metabolischer Parameter mit dem TSE Phenomaster.	89
3.36 Versuch zur Bestimmung verschiedener metabolischer Parameter mit dem TSE Phenomaster.	90
4.1 Modell zur Regulation der HIF-1 α -abhängigen Glykolyse in Astrozy- ten.	100

Tabellenverzeichnis

1.1	Auswahl an HIF-1 α Zielgene (nach [89]).	12
2.19	Aussatbedingungen für primäre Astrozyten	33
2.20	Aussatbedingungen für primäre Neurone	34
2.21	Verwendete Inhibitoren zellulärer Signalkaskaden	35
2.22	Transfektionsgemisch	36
2.23	Primär-Antikörper Verdünnungen für Immundetektion	38
2.24	Sekundär-Antikörper Verdünnungen für Immundetektion	38
2.25	Präinkubationsmix für die cDNA-Synthese	42
2.26	Reaktionsmix für die cDNA-Synthese	42
2.27	Bedingungen für die Genotypisierungs-PCR	42
2.28	Reaktionsmix für qRT-PCR	43
2.29	qRT-PCR Programm mit anschließender Schmelzkurvenanalyse . .	44
2.30	Hybridisierungsmix	46
2.31	Primär-Antikörper Verdünnungen in Blockierungspuffer I für Immun- detektion	49
2.32	Primär-Antikörper Verdünnungen in Blockierungspuffer II für Im- mundetektion	49
2.33	Sekundär-Antikörper Verdünnungen für Immundetektion	49
2.34	Versuchsgruppen für die Mausfütterungsversuche	52

A.1 Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen erläutert. Bei englisch-sprachigen Abkürzungen ist die Erläuterung ebenfalls in englischer Sprache angegeben und soweit diese im deutschen Sprachgebrauch vorhanden ist, durch eine deutsche Übersetzung ergänzt.

2-OG	2-Oxoglutarat
3'-UTR	3' untranslatierte Region
AKT	Proteinkinase B
AldoA	Aldolase A
ANLSH	Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle Hypothese
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bHLH	basische Helix-loop-Helix Domäne
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovin serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CAD	C-terminale Transaktivierungsdomäne
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX	Cyclooxygenase
Deta	DetaNONOate
DFO	Deferoxamin
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

ECGS	<i>endothelial cell growth supplement</i> , Wachstumszusatz für Endothelzellen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF4E	Elongationsfaktor 4E
Eno1	Enolase 1
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPO	Erythropoetin
Erk	extrazellulär regulierte Kinase
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
F-2,6BP	Fructose-2,6-Bisphosphat
Fe	Eisen
FIH	<i>factor inhibiting HIF-1</i>
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GDNF	<i>glial-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
Glut1	Glukosetransporter 1
Glut2	Glukosetransporter 3
Glut3	Glukosetransporter 3
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i> , Hypoxie-induzierbarer Faktor
HK1	Hexokinase 1
HK2	Hexokinase 2
HOX	Hypoxie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
H₂O	Wasser
IC₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die zur halbmaximalen Inhibition der gemessenen Reaktion führt
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LIF	<i>leucemia inhibitory factor</i>
L-NAME	L-NG-Nitroarginine Methylester

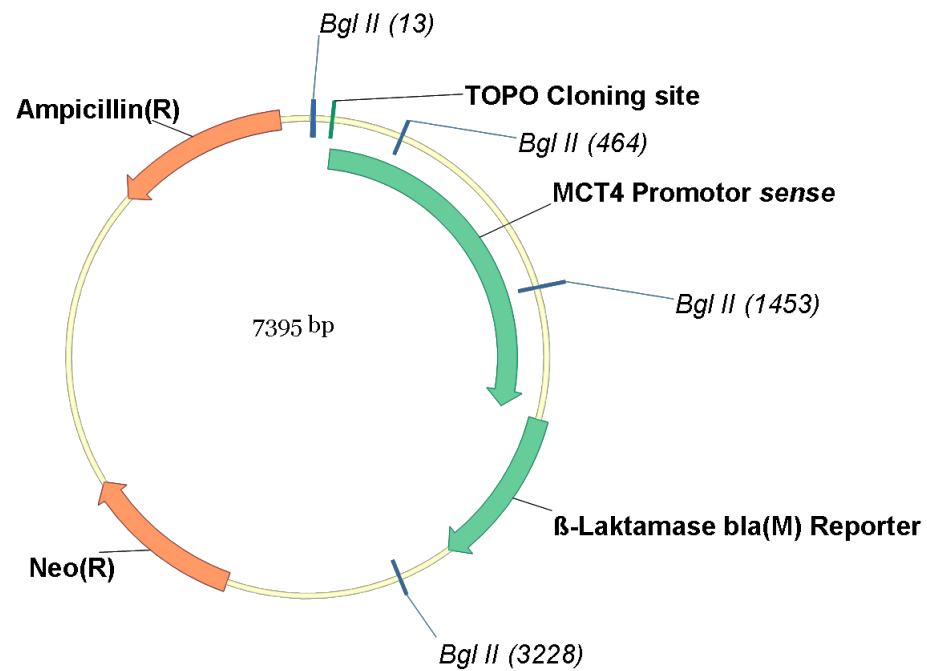
LPS	Lipopolysaccharid
IgG	Immunglobulin G
K	Lysin
kcal	Kilokalorie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	<i>knock-out</i>
Ktr	Kontrolle
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LDHB	Laktatdehydrogenase B
LPS	Lipopolysaccharid
LY	LY290049
MAP	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mol	Mol
M	Mol pro Liter
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCT1	Monocarboxylattransporter 1
MCT2	Monocarboxylattransporter 2
MCT4	Monocarboxylattransporter 4
MgCl₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mM	Millimol pro Liter
miRISC	<i>micro ribonucleic acid loaded RNA induced silencing complex</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Vorläufer-Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Na₂HPO₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaAsO₂	Natriumarsenit
NaCl	Natriumchlorid
NAD	N-terminale Transaktivierungsdomäne
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
Nefh	<i>neurofilament, heavy polypeptide</i>
nNOS	neuronale NO-Synthase
nmol	Nanomol
nM	Nanomol pro Liter
NO	Stickstoffmonoxid

NOX	Normoxie
OD	optische Dichte
ODDD	<i>oxygen dependent degradation domain</i>
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4, 3-a]quinoxalin-1-one
P	Prolin
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphat-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD	PD98059
PDK1	Pyruvatdehydrogenasekinase
PFK1	Phosphofruktokinase 1
PFKFB3	6-Phosphofrukto-2-kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
PHD	Prolylhydroxylase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
pmol	Pikomol
pM	Pikomol pro Liter
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PGE2	Prostaglandin E2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVHL	von-Hippel-Lindau Protein
qRT-PCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Rap	Rapamycin
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse Transkription
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfat</i> Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sGC	lösliche Guanylatcyclase
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
ss	<i>single-stranded</i> , einzelsträngig
t_{1/2}	Halbwertszeit eines Stoffes
TAD	<i>transactivation domain</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure

TE	Tris-EDTA
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>toll-like receptors</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
W	Watt
wt	wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
ZNS	zentrales Nervensystem
μmol	Mikromol
μM	Mikromol pro Liter

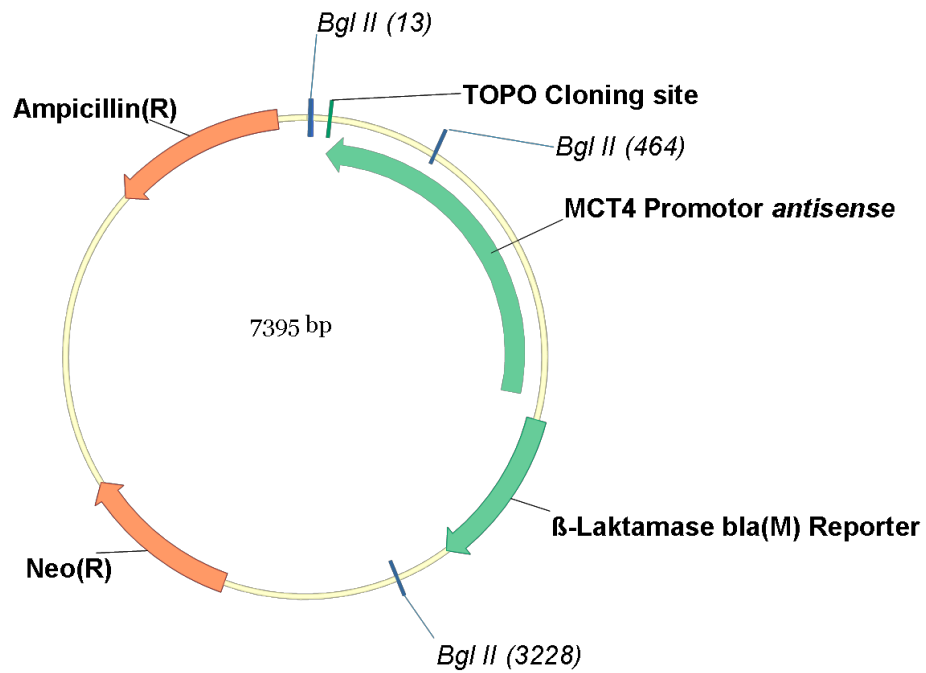
A.2 Vektorkarten

A.2.1 MCT4-Promotor in *sense*-Orientierung im pGeneBLazer-Topo Vektor



mMCT4 Prom *sense*-pGeneBLazer

A.2.2 MCT4-Promotor in *antisense*-Orientierung im pGeneBLazer-Topo Vektor



mMCT4 Prom *antisense*-pGeneBLazer

A.3 Lebenslauf

Britta Brix geb. Oschmann



Persönliche Daten

Geburtsdatum **07. November 1983**
Geburtsort **München**
Familienstand **verheiratet**
Nationalität **deutsch**

Ausbildung

seit 12/2008 **Wissenschaftliche Angestellte (Doktorandin)**
Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, UKSH und Universität zu Lübeck

2006 – 2008 **Studium Molecular Life Science**
Universität zu Lübeck, Master of Science, Gesamtnote 1,5 (sehr gut)

07 – 08/2007 **Forschungspraktikum**
Institut für Neuro/Gastroenterologie, University College Cork, Irland

2003 – 2006 **Studium Molecular Life Science**
Universität zu Lübeck, Bachelor of Science, Gesamtnote 2,0 (gut)

1991 – 2003 **Schulausbildung**
Eduard-Spranger-Gymnasium, Abitur, Gesamtnote 1,6 (sehr gut)

A.4 Publikationsliste

Teile dieser Arbeit haben zu den folgenden Publikationen beigetragen.

Originalartikel

F. Marcillac, **B. Brix**, C. Repond, O. Jöhren, L. Pellerin. Nitric oxide induces the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured astrocytes by a cGMP-independent transcriptional activation. *Glia*, 2011.

A. Urbanska, P. Sokolowska, A. Woldan-Tambor, K. Bieganska, **B. Brix**, O. Jöhren, M. Namiecinska, J.B. Zwilska. Orexins/Hypocretins acting at G(i) protein-coupled OX(2) receptors inhibit cyclic AMP Synthesis in primary neuronal cultures. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2011

A.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Dissertation anzufertigen und maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben. Ganz besonders danke ich:

- **PD. Dr. Olaf Jöhren** – für die überaus interessante Themenstellung und die sehr zeitintensive und persönliche Betreuung in allen Phasen dieser Dissertation.
- **Prof. Dr. Thomas Peters** und **Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann** – für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen bzw. den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.
- **Prof. Dr. Luc Pellerin** vom Departement de Physiology, Universite Lausanne (Lausanne, Schweiz) – für die sehr fruchtbare Kooperation und die ebenso lehrreichen wie auch sympathischen Zusammentreffen.
- **allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie** und im Speziellen **Christine Eichholz, Gudrun Vierke** und **Cornelia Magnussen** – für ihre Hilfsbereitschaft und das sehr angenehme und persönliche Arbeitsklima.
- **meinen Mit-Doktoranden/innen** – für die gute Laune und die gegenseitige moralische Unterstützung.
- **den Mädels** und besonders **Biene** – für das Fokussieren auf die wirklich wichtigen Dinge im Leben.
- **meinen Eltern** – für ihre uneingeschränkte Unterstützung auf dem Weg zu meinem eigenen Doktorhut.
- **Torben** – für die Kraft, die er mir täglich gibt und das nie langweilig werdende gemeinsamen Leben