

Aus der Klinik für Neurologie  
(Prof. Dr. med. M. Bähr)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Der Einfluss der Fettsäuresynthese  
auf die neuronale Schädigung  
nach Hypoxie und zerebraler Ischämie

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Lisa Marie Janssen  
aus  
Oberhausen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

**Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: Prof. Dr. med. T. R. Döppner, M. Sc.

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

**Prüfungskommission**

Referent/in: Prof. Dr. med. T. R. Döppner, M. Sc.

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 20.04.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel »Der Einfluss der Fettsäuresynthese auf die neuronale Schädigung nach Hypoxie und zerebraler Ischämie« eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

**Janssen L**, Ai X, Zheng X, Wei W, Caglayan AB, Kilic E, Wang Y, Hermann DM, Venkataramani V, Bähr M, Doeppner TR (2021): Inhibition of fatty acid synthesis aggravates brain injury, reduces blood-brain barrier integrity and impairs neurological recovery in a murine stroke model. *Front Cell Neurosci* 15, 733973

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie und Definition des Schlaganfalls . . . . .	1
1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls . . . . .	2
1.3 Energiemetabolismus in Neuronen . . . . .	3
1.4 Fettsäuresynthese . . . . .	5
1.5 Inhibition der Fettsäuresynthese . . . . .	8
1.6 Hypothese und experimentelle Strategie . . . . .	10
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Materialien . . . . .	11
2.1.1 Geräte und Instrumente . . . . .	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien . . . . .	12
2.1.3 Chemikalien . . . . .	12
2.1.4 Lösungen . . . . .	13
2.2 Methoden in vitro . . . . .	14
2.2.1 Gewinnung von primären Cortezellen . . . . .	14
2.2.2 Kultur der SH-SY5Y-Zelllinie . . . . .	15
2.2.3 Versuchsaufbau der Zelleexperimente . . . . .	15
2.2.4 Zellvitalität . . . . .	16
2.2.5 Fettsäureanalyse . . . . .	16
2.2.6 NAD/NADH-Analyse . . . . .	17
2.3 Methoden in vivo . . . . .	18
2.3.1 Versuchstierhaltung . . . . .	18
2.3.2 Middle cerebral artery occlusion (MCAO) . . . . .	18
2.3.3 Infarkt volumetrie . . . . .	19
2.3.4 Fettsäureanalyse . . . . .	19
2.3.5 NAD/NADH-Analyse . . . . .	20

---

2.3.6	Immunhistochemie . . . . .	20
2.3.7	In-situ-Detektion von Apoptose . . . . .	20
2.3.8	Western Blot . . . . .	21
2.3.9	Verhaltenstests . . . . .	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	Aggravation des Zelltods durch Inhibition der Fettsäuresynthese . . .	24
3.2	Neuronale Schädigung durch Inhibition der Fettsäuresynthese in vivo	25
3.3	Analyse des postischämischen neurologischen Defizits . . . . .	27
3.4	Untersuchung der Fettsäuresynthese . . . . .	29
3.5	Einfluss der Fettsäuresynthese auf das Redoxpotenzial . . . . .	30
3.6	Mikrogliale und gliale Antwort auf die Inhibition der Fettsäuresynthese	32
3.7	Pro- und antiapoptotische Signalkaskaden . . . . .	34
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>43</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Pathophysiologie des Schlaganfalls . . . . .	2
Abb. 2	Schematische Darstellung der Fettsäuresynthese . . . . .	6
Abb. 3	Standardkurve zur Bestimmung der Fettsäuremenge . . . . .	17
Abb. 4	Aggravation des Zelltods bei SH-SY5Y-Zellen durch Inhibition der Fettsäuresynthese . . . . .	24
Abb. 5	Aggravation des Zelltods bei primären Cortezellen durch Inhi- bition der Fettsäuresynthese . . . . .	25
Abb. 6	Neuronale Schädigung durch Inhibition der Fettsäuresynthese in vivo . . . . .	26
Abb. 7	Akuter Zellschaden nach MCAO und Inhibition der Fettsäure- synthese . . . . .	26
Abb. 8	Analyse des postischämischen neurologischen Defizits . . . . .	28
Abb. 9	Untersuchung der Fettsäuresynthese in vitro . . . . .	29
Abb. 10	Untersuchung der Fettsäuresynthese in vivo . . . . .	30
Abb. 11	Einfluss der Fettsäuresynthese auf das Redoxpotenzial in vitro .	31
Abb. 12	Auswirkungen des Cerulenin auf das Redoxpotenzial nach MCAO	32
Abb. 13	Mikrogliale und gliale Antwort auf die Inhibition der Fettsäu- resynthese . . . . .	33
Abb. 14	Detektion pro-/antiapoptotischer Proteine/Signalkaskaden . . .	34

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Geräte und Instrumente . . . . .	11
Tab. 2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	12
Tab. 3	Chemikalien . . . . .	12
Tab. 4	Lösungen . . . . .	13
Tab. 5	Score zur Auswertung des Tight-rope-Tests . . . . .	23

# Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BSS	<i>buffered salt solution</i>
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Iba-1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i>
MTT	<i>3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TOFA	<i>5-(Tetradecyloxy)-2-furoic acid</i>
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Definition des Schlaganfalls

Mit rund 293 000 Fällen im Jahr stellt der Schlaganfall eine der häufigsten Erkrankungen in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt 2015). Bei bis zu 40% derer, die dieses Ereignis überleben, bleiben Behinderungen zurück, die eine Einschränkung bei der Bewältigung des Alltags und in der Konsequenz eine erhöhte Pflegebedürftigkeit zur Folge haben (Robert Koch-Institut 2018). Zwar rangiert der Schlaganfall mit in den letzten Jahren deutlich rückläufigen Todeszahlen hierzulande nicht mehr unter den zehn häufigsten Todesursachen, trotzdem steigt im Zuge der demographischen Entwicklung die Zahl der Fälle insgesamt an. Damit verbunden lässt sich zudem ein Anstieg der Kosten für Diagnostik und Behandlung verzeichnen, die zuletzt bei rund 10 Milliarden Euro lagen (Statistisches Bundesamt 2015).

Im Gegensatz zum hämorrhagischen Schlaganfall, der mit der Ruptur einer Arterie einhergeht, kommt es mit 80-85% Anteil wesentlich häufiger zum ischämischen Schlaganfall. Die Ursachen hierfür sind äußerst heterogen: neben thromboembolischen Ereignissen, die vor Ort oder andernorts (z. B. im Vorhofflimmern) entstehen können, ist die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque mit konsekutiver Einschwemmung atheromatösen Materials zu nennen. Zusätzlich findet sich in der Minderperfusion durch eine hochgradige Stenose eines der zuführenden Gefäße (*Arteria (A.) carotis interna*, *A. basilaris*) eine Genese zerebraler Ischämie (Levine 2004).

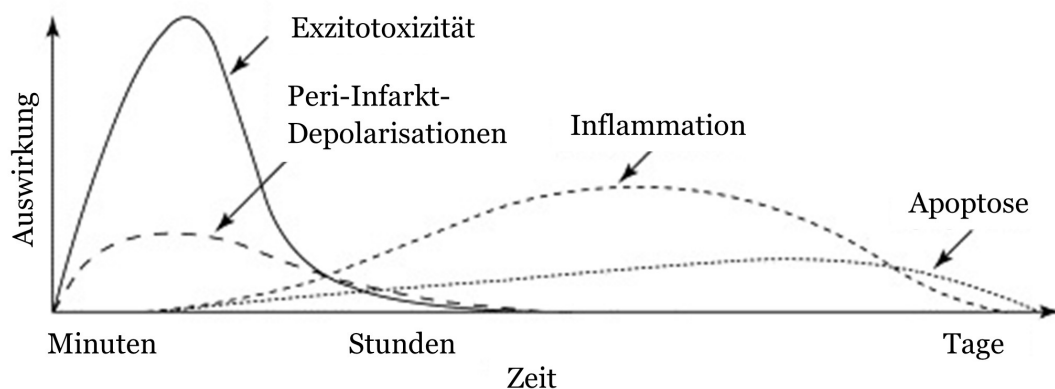
Hier zeigt sich deutlich die hohe Relevanz der optimalen Einstellung der kardiovaskulären Risikofaktoren, vor allem des arteriellen Hypertonus, Diabetes mellitus, der Hyperlipidämie sowie Nikotinkarenz und Gewichtsreduktion bei Adipositas, um Schlaganfällen vorzubeugen. Ebenso trägt eine effektive Antikoagulation bei Vorhofflimmern zu einer deutlichen Senkung des Schlaganfallrisikos bei (Wang und Feuerstein 2004).

Neben der lokalen Hypoxie und Hypoglykämie distal des Gefäßverschlusses ist es initial vor allem der verminderte Blutfluss und damit die reduzierte Eliminierung toxischer Substanz, die zur Schädigung führt, sowie die Adhäsion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten.

Die Symptome können sich auf äußerst verschiedenartige Weise präsentieren und sind abhängig vom betroffenen Areal. Es kann dabei zu Defiziten in den Bereichen Kognition, Motorik, Sensorik, Sehen, Sprache und Sprachverständnis sowie der Psyche kommen, sowohl separat als auch in Kombination (Levine 2004).

## 1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls

Neurone beziehen ihre Energie fast ausschließlich aus aerober Glykolyse, welche stagniert, sobald der zerebrale Perfusionsdruck unter 30 mmHg fällt (Dirnagl et al. 1999). Hierdurch werden Energiereserven in Form von Adenosintriphosphat (ATP) und Phosphokreatin aufgebraucht, es folgt die Akkumulation von Adenosindiphosphat und Adenosinmonophosphat. Durch den Mangel an ATP kommt die Funktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zum Erliegen, die eine Repolarisation und Wiederherstellung des Ruhepotentials sicherstellt (Levine 2004). Der Verlust des Membranpotentials fördert die Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Diese impliziert eine anhaltende Exzitation und Freisetzung von Glutamat aus präsynaptischen Vesikeln, welche die Exzitotoxizität zur Folge hat – den Zelltod von Neuronen in Folge einer Überstimulation durch das Freiwerden großer Mengen an Glutamat.



**Abb. 1: Pathophysiologie des Schlaganfalls.** Dirnagl et al, 1999. Putative cascade of damaging events in focal cerebral ischaemia. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

Da die energieabhängige Wiederaufnahme nicht gewährleistet werden kann, resultiert eine Akkumulation von Glutamat im synaptischen Spalt. Die Öffnung einwertiger Ionenkanäle begünstigt den Einstrom von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in das Neuron, dem osmotisch bedingt Wasser folgt, wodurch es zur Ödembildung kommt (Dirnagl et al. 1999). Da sich erst dann, ca. 2-3 h nach Ischämie, im Sinne einer Schwellung und Schrumpfung von Neuronen erste dezente histologische Korrelate zeigen, ist kaum eine genaue Abgrenzbarkeit zum gesunden Gewebe möglich (Back et al. 2004).

Zur Energiegewinnung betreiben die Neuronen in diesem Stadium vor allem anaerobe Glykolyse, die jedoch eine Akkumulation von Laktat mit sich bringt und mit sinkendem pH zur Azidose führt. Diese fördert die Synthese freier Radikale, die wiederum eine Schädigung der Mitochondrien provozieren (Levine 2004). Kommt es zur Destruktion der Mitochondrien und Freisetzung von Cytochrom C als essenziellem Teil der Atmungskette, induziert dies je nach Grad der Schädigung die prompte Nekrose oder im Verlauf die Apoptose (Dirnagl et al. 1999; Sugawara et al. 2004). Somit im Zytoplasma vorliegendes Cytochrom C initiiert die Caspase-Kaskade, die u. a. DNA-

sen aktiviert, wodurch Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespalten wird (Sugawara et al. 2004). Parallel führt der erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel zur Lipolyse und Proteolyse (Levine 2004). Durch sogenannte neuronale „ghost cells“ zeigen sich jetzt erstmals auch histologisch die Folgen durch den ischämischen Schaden (Back und Schüler 2004).

Den Infarktkern umgibt die Penumbra, in der ein Teil des zerebalen Blutflusses erhalten geblieben ist, wodurch zunächst noch eine Repolarisation möglich ist. Dennoch kommt es auch hier immer wieder zu fokalen Hypoxien. Zudem begünstigen erhöhte Glutamat- und Kaliumkonzentrationen spontane Depolarisationen, durch die ein beeinträchtigter Metabolismus hervorgerufen oder bei Vorbestehen weiter aggraviert werden kann (Dirnagl et al. 1999; Levine 2004). Diese Umstände haben zur Folge, dass sich der Infarktkern im Laufe der ersten sieben Tage um über 20% vergrößern und ehemaliges Penumbragebiet beanspruchen kann (Back und Schüler 2004).

Über den Transkriptionsfaktor Nekrosefaktor  $\kappa$ B fördert Hypoxie die Expression proinflammatorischer Gene. Durch Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche können neutrophile Granulozyten das Infarktareal infiltrieren, nach ca. 5-7 Tagen folgen Monozyten und Makrophagen (Dirnagl et al. 1999). Die Aktivierung ortsständiger Zellen, i. e. Mikrogliazellen, Astrozyten und Endothelzellen, impliziert eine zusätzliche Expression und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (Muir et al. 2007). Die resultierende Entzündungsreaktion wird von einer Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke begleitet. Mit steigender Permeabilität entwickelt sich zusätzlich zum bereits bestehenden zytotoxischen Ödem durch die Nekrose ein vasogenes Ödem. Schwellung wie zelluläre Infiltration führen zu einer weiteren Minderperfusion und Ausbreitung des Infarktkerns (Levine 2004). Dennoch zeigt sich klinisch eine Symptombesserung, da sich das neurologische Defizit initial auf Infarktkern und Penumbra bezieht und mit Regeneration der Penumbra das Gesamtvolumen des betroffenen Areals abnimmt (Dirnagl et al. 1999).

### 1.3 Energiemetabolismus in Neuronen

Im Gehirn wird Energie vor allem für die Signalübertragung, Wiederherstellung und Aufrechterhaltung der Membranpotenziale, den axonalen und dendritischen Transport sowie die Synthese von Neurotransmittern benötigt (Schönfeld und Reiser 2017). Da axonaler Energietransport per diffusionem vom Soma bis zu den Synapsen zu lange dauern würde und die De- und Repolarisation in kurzen Zeitfenstern stattfinden, kann die Energie am ehesten von ortsständigen Mitochondrien bereitgestellt werden. Entsprechend ist ein Großteil der Mitochondrien in den Dendriten und Axonen lokalisiert (Panov et al. 2014). Mit ihrer hohen Dichte an exzitatorischen glutamatergen Synapsen hat die graue Masse den höchsten Verbrauch an ATP. Über

90% des benötigten ATPs wird aus oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien über die Atmungskette generiert. Somit ist der Stoffwechsel der Neuronen vor allem aerob geprägt. Die neuronale Glykolyse ist jedoch durch eine geringere Aktivität der Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) limitiert (Schönfeld und Reiser 2013; Schönfeld und Reiser 2017). In ihrem dephosphorylierten Zustand katalysiert sie die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-2,6-phosphat, einem wichtigen Aktivator der Phosphofruktokinase 1, die das Schlüsselenzym der Glykolyse darstellt (Rassow 2006). Als weiteres Substrat steht daher vor allem Laktat zur Verfügung.

Die Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle-Hypothese besagt, dass die während ausgeprägter neuronaler Aktivität durch Glutamat in Astrozyten stimulierte Glykolyse mit der Gewinnung von Laktat dessen Abgabe in den Extrazellularraum nach sich zieht. Dort wird das Laktat über Monocarboxylat-Transporter 2 durch die Neuronen aufgenommen, mittels der Laktatdehydrogenase 1 zu Pyruvat konvertiert und in den Citratzyklus eingeschleust (Panov et al. 2014; Falkowska et al. 2015). Das beschriebene Prinzip bietet den Neuronen insofern einen Vorteil, als dass Neurone gegenüber Glutamat deutlich sensitiver sind als Astrozyten, wodurch hohe Mengen an Glutamat zytotoxisch wirken und die Aufnahme des Glutamats durch die Astrozyten einen wirksamen Schutz bietet. Gleichzeitig kann den Neuronen das Glutamat für die Wiederverwertung als Neurotransmitter durch den Transport über das Glutamin-Glutamat-Shuttle wieder zur Verfügung gestellt werden.

Die Energiegewinnung aus Laktat ist außerdem von Nutzen, da Neurone über ein geringes antioxidatives Potenzial verfügen. Unter anderem während der Glykolyse und in der Atmungskette fallen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) an, die durch Glutathion neutralisiert werden. Glutathion wiederum kann mit Nikotinamidadeninukleotidphosphat (NADP) als Reduktionsmittel regeneriert werden. Durch die Nutzung von Laktat als Energieträger kann mehr Glukose dem Pentosephosphatweg zugeführt werden, über den neben Nukleotiden NADP synthetisiert wird (Schönfeld und Reiser 2013; Molavian et al. 2016).

Ergänzend unterstützen Astrozyten Neurone, da sie Glykogenspeicher vorhalten, welche durch die dephosphorylierte und damit aktive Form der Glykogensynthase gebildet werden. In Regionen hoher synaptischer Dichte findet sich eine entsprechend größere Quantität an Glykogen. Im Bedarfsfall wird dieses zu Laktat abgebaut, wodurch transienten Hypoglykämien effektiv begegnet werden kann (Falkowska et al. 2015).

Über Glukose und Laktat hinaus gibt es weitere Substrate, die zur Abdeckung des Energiebedarfs herangezogen werden. Speziell im heranwachsenden bzw. reifen Gehirn und unter den veränderten metabolischen Bedingungen während des Fastens werden in der Leber synthetisierte Ketonkörper genutzt. Diese überwinden die Blut-Hirn-Schranke über den Monocarboxylat-Transporter und stehen nach

Konversion zu Acetyl-CoA im Zytosol der Einschleusung in die Mitochondrien oder der Fettsäuresynthese zur Verfügung (Schönfeld und Reiser 2013; Falkowska et al. 2015). Glutamat kann zusammen mit Pyruvat durch Transaminierung mittels der Alanin-Aminotransferase zu Alanin und  $\alpha$ -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, umgebaut und so in diesen integriert werden (Rassow 2006; Panov et al. 2014).

Fettsäuren können prinzipiell für die  $\beta$ -Oxidation oder nach Veresterung für den Einbau in die Zellmembran genutzt werden. Es wird geschätzt, dass sie speziell während der Gehirnentwicklung bis zu 20% des Energiebedarfs abdecken können. Carnitin dient dem Transport langkettiger Fettsäuren über die Mitochondrienmembran. Dessen Vorkommen in Neuronen lässt darauf schließen, dass Fettsäuren für den Zellmetabolismus genutzt werden.

Jedoch wird durch die Bindung von Fettsäuren an die Komplexe der Atmungskette der Protonenfluss verlangsamt. Auf diese Weise wird der Protonengradienten zwischen innerer und äußerer Membran der Mitochondrien gesenkt, dies führt zu Einschränkungen bis hin zum Stillstand der Atmungskette. Gleichzeitig wird die Bildung von ROS gefördert, die bei dem bereits erwähnten eingeschränkten antioxidativen Potenzial der Neurone zu Zellschäden führen können.

Da Fettsäuren von ihren Speichern und veresterten Formen nicht schnell genug mobilisiert werden können, um den Energiebedarf in aktiven Hirnregionen abzudecken, wird davon ausgegangen, dass sie als Energieträger im Gehirn eine eher untergeordnete Rolle (Schönfeld und Reiser 2013).

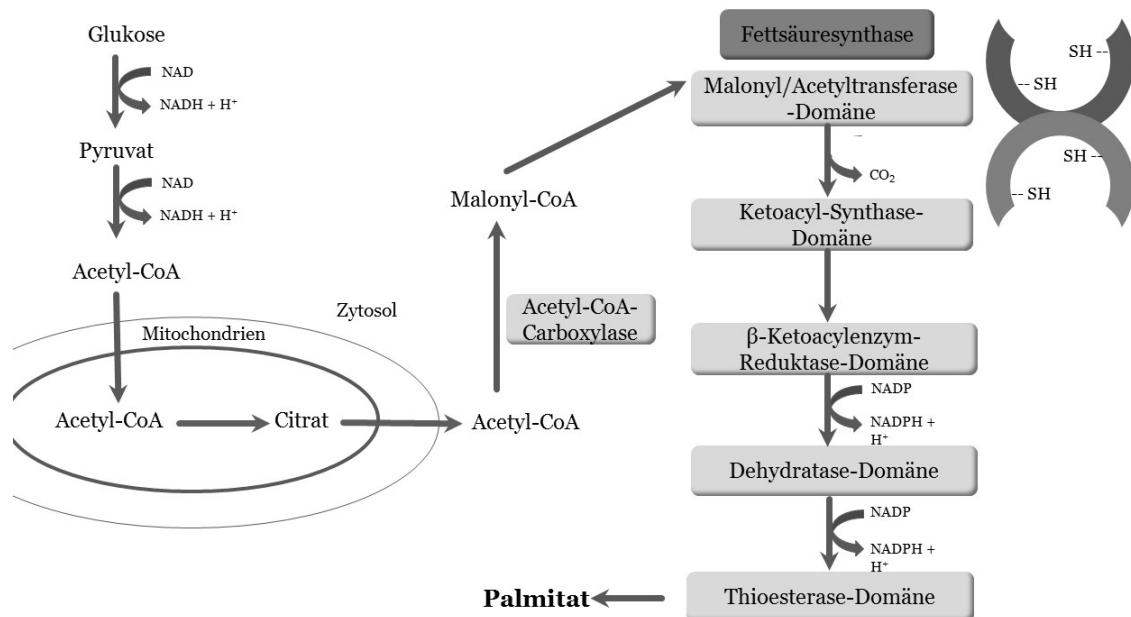
## 1.4 Fettsäuresynthese

Fettsäuren werden im Zellzytosol und vornehmlich in der Leber synthetisiert. Da in ihrer langkettigen Struktur viele Elektronen gebunden sind, stellen sie einen wichtigen Energiespeicher für den Stoffwechsel dar. Zudem sind sie Bestandteil von Membranlipiden und bilden mit ihren apolaren Kohlenstoffketten den hydrophoben Kern von Membranen. Diese spielen eine zentrale Rolle in Bezug auf die Außen Grenzen und Stabilität der Zelle sowie bei der Bildung von Zellkompartimenten und damit der Trennung von Reaktionsräumen.

Glukose wird in der Zelle im Rahmen der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut, aus dem über die Pyruvatdehydrogenase Acetyl-CoA gebildet wird. Für diesen Schritt muss das Pyruvat in die Mitochondrien eingeschleust werden. Dort entsteht im Weiteren aus dem Acetyl-CoA über die Citratsynthase als erster Metabolit des Citratzyklus Citrat. Dieses kann weiter den Citratzyklus durchlaufen. Alternativ ist an dieser Stelle bei einem großen Angebot an Citrat über aktiven Transport ein Verlassen der Mitochondrien möglich. Über die Citratlyase wird Citrat zu Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten, wodurch das Acetyl-CoA der Fettsäuresynthese zur Verfügung

gestellt werden kann.

An der Fettsäuresynthese sind zwei Enzyme beteiligt. Zum einen spielt die Acetyl-CoA-Carboxylase, die das Schrittmacherezym der Fettsäuresynthese darstellt, eine zentrale Rolle. Da es sich bei der Bildung einer Bindung zwischen zwei C-Atomen um einen endergonen Prozess handelt, bedarf es zur Verwirklichung einer aktivierten Substanz. Dazu wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase biotin- und ATP-abhängig unter Hinzuziehen von  $\text{CO}_2$  durch Carboxylierung der Methylgruppe des Acetyl-CoA das Malonyl-CoA gebildet.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Fettsäuresynthese nach Graeve et al. 2014.** Durch die Glykolyse entsteht Pyruvat, aus dem Acetyl-CoA generiert und in den Mitochondrien in den Citratzyklus eingeschleust wird. Dabei entstehendes, überschüssiges Citrat wird wieder ausgeschleust und der Fettsäuresynthese zur Verfügung gestellt. Die zwei Enzyme der Fettsäuresynthese, die Acetyl-CoA-Carboxylase und die Fettsäuresynthase, bilden aus Acetyl-CoA Palmitat.

Bei dem zweiten Enzym handelt es sich um die Fettsäuresynthase, einem dimeren Multienzymkomplex, welcher alle sieben, für die Fettsäuresynthese relevanten, Reaktionsdomänen enthält. Da die beiden Dimere identisch aufgebaut sind, entstehen zwei katalytische Zentren, die sich bis zu einem gewissen Grad, bis zur Stufe der Kondensation, gegenseitig bedienen können. Die Bindung der Substrate erfolgt während der Reaktionsschritte kovalent an zwei Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen). Eine wird als zentrale SH-Gruppe bezeichnet, sie liegt carboxyterminal am Phosphopanthetein-Arm der Acyl-Carrier-Domäne und trägt die Acylgruppe zu den einzelnen Domänen. Die zweite, sogenannte periphere SH-Gruppe befindet sich als Teil eines Cysteins am aminoterminalen Ende des Enzyms und übernimmt die entstehende Fettsäure während der Beladung der zentralen SH-Gruppe mit einem neuen Malonyl-CoA-Molekül.

Die Fettsäuresynthese beginnt mit einem Acetyl-CoA als Startermolekül, das an

die zentrale SH-Gruppe in der Malonyl/Acetyltransferase-Domäne gebunden und direkt auf die periphere SH-Gruppe übertragen wird. Die weitere Elongation erfolgt mit C<sub>2</sub>-Einheiten aus dem Malonyl-CoA immer am COOH-Ende der entstehenden Kette.

Die frei gewordene zentrale Stelle wird mit einem Malonyl-CoA beladen. Durch Decarboxylierung entsteht eine COO<sup>-</sup>-Gruppe mit einem freien Elektronenpaar. Hier kann nun mit Hilfe der Ketoacyl-Synthase-Domäne die zuvor peripher abgelegte Acetylgruppe gebunden werden und damit die Kondensation zu einem Acetacetylrest erfolgen.

Im Weiteren kommt es NADPH/H<sup>+</sup>-abhängig zu einer ersten Reduktion zu einem D-β-Hydroxybutyrylrest über die β-Ketoacylzym-Reduktase-Domäne. In der Dehydratase-Domäne entsteht daraus ein Δ<sup>2</sup>-Enoylrest, der erneut NADPH/H<sup>+</sup>-abhängig ein zweites Mal reduziert wird und damit den letzten Schritt zum gesättigten Acylrest nimmt.

Es erfolgt durch die nahe des Phosphopanthetin-Arms gelegene Thioesterase-Domäne die hydrolytische Abspaltung der entstandenen Acylgruppe und damit die Freisetzung aus der Fettsäuresynthese. Bald darauf wird sie mit Coenzym A ATP-abhängig durch die Acyl-CoA-Synthetase verbunden und dadurch aktiviert. Im Weiteren werden die vorhandenen aktivierten Fettsäuren schnell in Triacylglyceriden gebunden und vor allem in Leber und Fettgewebe gespeichert.

Während der Fettsäuresynthese entstehen Acylgruppen mit einer geraden Anzahl an C-Atomen, vornehmlich das Palmitat. Hierzu bedarf es 16 C-Atome, so dass in der Summe aus 1 Acetyl-CoA + 7 Malonyl-CoA + 14 NADPH → 1 Palmitat + 14 NADP<sup>+</sup> entstehen.

Sieben CO<sub>2</sub>-Moleküle werden zunächst unter Hydrolyse von sieben ATP zur Carboxylierung herangezogen und im Verlauf bei der Decarboxylierung des Malonyl-CoA wieder freigesetzt.

Die Lipogenese wird auf der Ebene der involvierten Enzyme streng reguliert, dies bezieht vor allem die Pyruvatdehydrogenase, Acetyl-CoA-Decarboxylase und Fettsäuresynthase ein. Bei ausreichend hohem Anteil an Fettsäuren in der Nahrung kommt es zu einer nahezu vollständigen Hemmung der körpereigenen Fettsäuresynthese.

Die Pyruvatdehydrogenase wird durch Phosphorylierung inaktiviert und durch Dephosphorylierung aktiviert. Insulin stimuliert die Glukoseaufnahme in die Zelle und die Glykolyse durch Überführung der Pyruvatdehydrogenase in ihre aktive Form.

Die Acetyl-CoA-Carboxylase als Schrittmacherenzym unterliegt einer allosterischen Stimulation durch Citrat. Bei einer hohen Konzentration von ATP in den Mitochondrien kommt es zu einer Hemmung der Enzyme des Citratzyklus und in-

folgedessen zu einer Akkumulation und einem Export von Citrat. Die allosterische Hemmung erfolgt durch Acyl-CoA im Sinne einer Endprodukthemmung.

Darüber hinaus existiert eine hormonelle Regulation. Während durch Adrenalin und Glukagon die Expression der Acetyl-CoA-Carboxylase reprimiert wird, wird sie durch Insulin induziert (Rassow 2006; Graeve et al. 2014).

## 1.5 Inhibition der Fettsäuresynthese

In den vergangenen Dekaden rückte die Inhibition der Fettsäuresynthese stärker in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. Insbesondere mit der Beschreibung, dass es in diversen neoplastischen Zellen zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung des Fettsäuremetabolismus und Überexpression der an der Fettsäuresynthese beteiligten Enzyme kommt, könnte ihre Inhibition als Induktor der Apoptose ein wertvolles Target für die Therapie darstellen (Zhao et al. 2006). Durch das Adressieren verschiedener Zielstrukturen stehen mit Cerulenin und *5-(Tetradecyloxy)-2-furoic acid* (TOFA) zwei Inhibitoren mit unterschiedlichem Wirkprinzip zur Verfügung.

Das erstmalig von Matsumae et al. (1963) beschriebene *Cephalosporium caeruleus* synthetisiert das Antibiotikum Cerulenin, welches mittels kovalenter Bindung an das Cystein der  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase-Domäne irreversibel die Fettsäuresynthese inhibiert, während die übrigen Domänen intakt bleiben. In diesem Schritt kommt es, wie bereits erläutert, durch die Verbindung zweier Acetylgruppen zur Kondensation zu einem Acetacetylrest. Die Folge ist eine gut 50%-ige Reduktion der endogenen Fettsäuresynthese, an deren Ende der Zelltod auf Grund von Apoptose steht (Omura 1976; Zhao et al. 2006). Parallel dazu wurde eine inhibitorische Wirkung auf die HMG-CoA-Reduktase und damit auf die Cholesterinsynthese beobachtet (Omura 1976).

TOFA zeigt strukturelle Ähnlichkeit zu einer langkettigen Fettsäure (Panek et al. 1977). Nach Konversion zu TOFyl-CoA durch die mikrosomale Fettsäure-CoA-Ligase inhibiert es allosterisch die Acetyl-CoA-Carboxylase und damit die Bildung von Malonyl-CoA, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fettsäuresynthese (McCune und Harris 1979). Durch das reduzierte Angebot an Malonyl-CoA entfällt die Inhibition der  $\beta$ -Oxidation. Zusätzlich wurde eine Reduktion des Effluxes von Citrat aus den Mitochondrien beobachtet, wodurch im Zuge der Akkumulation von Citrat in den Mitochondrien die Glykolyse gehemmt wird (Kariya und Wille 1978; McCune und Harris 1979).

Brose et al. haben in ihrer 2014 publizierte Arbeit die Adaptation von neuronalen Zellen an Hypoxie untersucht und konnten infolgedessen erstmalig beschreiben, dass unter Hypoxie die Lipidsynthese signifikant ansteigt und dies besonders intensiv unter der Inkorporation von Glutamin und Glutamat stattfindet. Dazu wurden



Zellen der SH-SY5Y-Zelllinie, die aus einem Neuroblastom extrahiert wurden, unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 24 bzw. 42 h mit anschließender Analyse der Lipide inkubiert. Um identifizieren zu können, welche Substrate in diese Lipide inkorporiert werden, wurden die radioaktiv markierten Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Aspartat und Glycin hinzugefügt. Neben der Beobachtung, dass zu beiden Untersuchungszeitpunkten die Konzentration an Lipiden unter hypoxischen Bedingungen signifikant und im Zeitverlauf zunehmend anstieg, wurde außerdem ein Novum beschrieben: es sind vor allem das Glutamin und Glutamat, welche für die Lipidsynthese bereitgestellt werden. Um der Hypothese nachzugehen, dass dies speziell und ausschließlich in neuronalen Zellen stattfindet, wurden mit demselben experimentellen Setup andere Zellen neuronalen und nichtneuronalen Ursprungs untersucht. Dies führte zur zweiten, neuen Erkenntnis, dass dieser Weg der Adaptation an hypoxische Konditionen den neuronalen Zellen vorenthalten ist.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dies stattfindet, um das Reduktionspotenzial in Gestalt des Nikotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) zu erhalten, welches essenziell für oxidative Reaktionen ist, wie sie während der anaeroben Glykolyse und des Citratzyklus stattfinden (Brose et al. 2014).

Darauf fußend wurde im Weiteren 2016 eine Arbeit veröffentlicht, die diese Hypothese unterstreicht. Grundlage dessen war der oben beschriebene Versuchsaufbau unter Hinzunahme der vorgestellten Inhibitoren der Fettsäuresynthese, Cerulenin und TOFA. Unter Inhibition der Fettsäuresynthese kam es nach 42 h Hypoxie zu einem ausgeprägten Anstieg des Quotienten von  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ . Diese Beobachtung lieferte einen Hinweis darauf, dass Fettsäuren unter Hypoxie als Protonenakzeptoren fungieren und dadurch das Reduktionspotenzial ausrechterhalten und zusätzlich die Laktatazidose in neuronalen Zellen unter Hypoxie reduzieren (Brose et al. 2016).

## 1.6 Hypothese und experimentelle Strategie

Aus den Erkenntnissen, die Brose et al. gewonnen haben, ergeben sich nun folgende Fragestellungen:

- Ist die Stimulation der Fettsäuresynthese unter Hypoxie auch in primären Cortexzellen ein relevanter Pfad?
- Hat die Inhibition der Fettsäuresynthese nach zerebraler Ischämie einen Einfluss auf die neurologische Erholung?
- Welche anderen Mechanismen sind involviert in der postischämischen Inhibition der Fettsäuresynthese beziehungsweise werden durch diese tangiert?

Um einer Beantwortung dieser Fragen nachzukommen, lohnt es sich, zunächst die In-vitro-Situation genauer zu beleuchten. Brose et al. haben dabei auf ein Modell mit 42 h Hypoxie in glukosereichem Medium ohne anschließende Reoxygenierung zurückgegriffen. Im Gegensatz dazu dominiert in der klinischen Situation der zerebralen Ischämie die Okklusion eines Gefäßes mit daraus resultierender Hypoxie und Hypoglykämie des distal der Okklusion liegenden Stromgebietes und (bei rechtzeitiger Intervention) einer Rekanalisierung desselbigen, die mit einer Reoxygenierung einhergeht.

Um sich diesem Umstand anzunähern, besteht der erste Schritt in dem Wechsel auf ein Protokoll, das eine simultane Sauerstoff- und Glukosedepriavation für eine definierte Zeit vorsieht, an die sich eine Reoxygenierung unter Standardzellkulturbedingungen anschließt. Anschließende Analysen beziehen sich vor allem auf die Quantifizierung des Zellschadens und entstehende Stoffwechselprodukte.

In einem konsekutiven Schritt soll untersucht werden, ob sich die in vitro gewonnen Erkenntnisse in vivo am Mausmodell wiederfinden lassen. Dazu bietet sich das gut bekannte und etablierte Fadenokklusionsmodell an, um eine zerebrale Ischämie zu induzieren.

Die Kurzzeitexperimente dienen dabei der genaueren Aufschlüsselung der akuten Veränderungen in vivo. Immunhistochemische Untersuchungen sollen beleuchten, inwieweit sich unter Inhibition der Fettsäuresynthese zerebral die Situation ortsständiger Zellen verändert. Western Blot-Analysen sollen den Einfluss auf jene Proteine aufzeigen, die in Signaltransduktionswege der Apoptose involviert sind.

In einem Langzeitexperiment liegt der Fokus vor allem auf der Regeneration und klinischen Entwicklung, hierzu werden Verhaltenstests herangezogen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Instrumente

**Tab. 1:** Geräte und Instrumente

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Cryostat CM3050S	Leica
Elektrophorese Blottingsystem Mini Protean II	BIO RAD
Elektrophorese Power Supply Power Pac basic	BIO RAD
Elektrophoresesystem Mini-Protean Tetra Cell	BIO RAD
Fluoreszenzplattenreader Fluostar Optima	BMG Labtech
Hirn-Handschnittmatrize RBM-2000C	ASI Instruments
Homogenisator Tissue Lyser LT	Qiagen
Fluoreszenzmikroskop Axiophot 2	Zeiss
Kaltlichtquelle KL 2500 LCD	Schott
Inkubator Hera cell	Heraeus
Laser-Doppler PF 5010 LDPM Unita	Perimed
Mikroskop Axioplan 2 imaging	Zeiss
Narkosegerät Vapor 19.3	Dräger
Mikroskop Stem 2000	Zeiss
Photometer Sunrise	Tecan
Reinstwassersystem Arium pro	Sartorius
Schlauchpumpe ZISM 596 D	Ismatec
Überwachungssystem Homeothermic Blanket Control Unit	Harvard
Vakuumkonzentrator Speedvac SVC 100	Savant
Waage BL 3100	Sartorius
Wipptisch WT 17	Biometra

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2:** Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Elektrophorese-Membranen Immobilon PVDF	Merck
Injektionskanülen Sterican 30 G x 1/2“	Braun
MCAO Fäden 702145PK5Re	Doccol
Nahtmaterial Mersilene 5-0 EH6731H	Ethicon
Seide schwarz geflochten metric 0,7 USP 6/0	Vömel
Xylocain Gel 2% 30g	AstraZeneca

## 2.1.3 Chemikalien

**Tab. 3:** Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton 1000 ml 1.00014.1000	Merck
Carprofen Carprieve 50 mg/ml	Bayer
Cerulein	abcam
DAPI A1001	AppliChem
Dimethylsulfoxid 100 ml D2650	Sigma
Dimethylsulfoxid 500 ml 7029.1	Roth
Eindeckmedium Shandon Immu-Mount	Thermo Scientific
Glucose 5% B. Braun 500 ml	Braun
Isofluran	Abbvie
Laemmli-Puffer Roti-Load 1	Roth
TOFA	abcam
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid 50 g KK13.2	Roth
Primäre Antikörper	
GFAP anti chicken	Millipore
Iba-1 x rabbit	WAKO
Sekundäre Antikörper	
Alexa Fluor goat anti chicken	Immuno Jackson
Cy 3 donkey anti rabbit	Immuno Jackson

## 2.1.4 Lösungen

Tab. 4: Lösungen

### Medium SH-SY5Y-Zellen

MEM	225,5 ml
DMEM F 12	225,5 ml
FCS	50 ml
Natriumbicarbonat	10 ml
nicht essentielle Aminosäuren	5 ml
Natriumpyruvat	5 ml
PenStrep	5 ml

### Medium Cortezellen

Neurobasal	100 ml
Transferrin	0,5 ml
PenStrep	1 ml
L-Glutamin	0,25 ml
B-27	2 ml

### Puffer zur OGD

Aqua a. d.	86 ml
10x BSS0	10 ml
Natriumbicarbonat	2,62 ml
HEPES	1 ml
Glycin	16,6 µl
CaCl <sub>2</sub>	180 µl

### Western Blot Puffer

10 x Elektrophorese Puffer (E-Puffer)	
250 mM Tris (Base)	15,12 g
1,9 M Glycine	71,25 g
1% SDS	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

### 10 x Transfer Puffer (Stocklösung) pH 8,3

25 mM Tris (Base)	30,25 g
192 mM Glycine	144 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

### 1 x Transfer Puffer (Arbeitslösung)

10 x Stocklösung	100 ml
------------------	--------

dH <sub>2</sub> O	700 ml
Methanol (100%)	200 ml
<b>10 x TBS-T pH 7,6</b>	
200 mM Tris (Base)	24,2 g
NaCl	80 g
1% Tween 20	10 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml
<b>1 x Tris-HCl/SDS pH 6,8</b>	
100 mM Tris (Base)	12,1 g
SDS	0,4 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
<b>1,5 x Tris-HCl/SDS pH 8,8</b>	
800 mM Tris (Base)	91 g
SDS	2 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml
<b>Sammelgel</b>	
30% Polyacrylamide	5 ml
1 M Tris/SDS (pH 6.8)	1,7 ml
10% Ammonium persulfate	1,25 µl
TEMED	10 µl
H <sub>2</sub> O	6,8 ml
<b>Trenngel</b>	
30% Polyacrylamide	8 ml
1.5 M Tris/SDS (pH 8.8)	5 ml
10% Ammonium persulfate	200 µl
TEMED	8 µl
H <sub>2</sub> O	6,6 ml

## 2.2 Methoden in vitro

### 2.2.1 Gewinnung von primären Cortezellen

Eine tragende Maus wurde nach 16,5 d (E16,5) mittels CO<sub>2</sub> in tiefe Narkose versetzt, anschließend das Abdomen eröffnet und die Embryonen aus dem Uterus entnommen. Nach Dekapitation der Embryonen wurden die Köpfe in *phosphate buffered saline* (PBS) auf Eis gelegt. Zur Präparation des Cortex wurde zunächst die

Kopfhaut entfernt, der Schädel sagittal eröffnet und das gesamte Gehirn ab- und herausgehoben. Die beiden Hemisphären wurden voneinander entlang des *Corpus callosum* getrennt, der *Bulbus olfactorius* sowie das *Cerebellum* entfernt. Nach Abziehen der Meningen ließ sich der Cortex vom übrigen Gehirn abtrennen und wurde in eiskaltes PBS gegeben.

Zur Gewinnung der Cortexzellen wurde das PBS abgesaugt und die Cortices für 15 min in 1 ml Trypsin bei 37°C inkubiert, nach abgelaufenen 14 min wurden 50 µl DNase hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Gemisch 1 min bei 800 *revolutions per minute* (rpm) zentrifugiert, so dass am Boden des Gefäßes ein Zellpallet entsteht und unter dessen Schonung der Überstand, soweit möglich, entfernt, 1 ml *fetal calf serum* (FCS) hinzugefügt und mit einer Pipette gemischt. Sollte es nicht zu einer vollständigen Suspension des Cortextgewebes gekommen sein, wurden die Schritte wiederholt. Daran schloss sich eine erneute Zentrifugation an. Im letzten Schritt wurde das Zellpallet mit Medium resuspendiert, die Zellen ausgezählt und ausgesät. Drei Tage nach der Aussaat wurden die Zellen den Versuchsbedingungen ausgesetzt.

### 2.2.2 Kultur der SH-SY5Y-Zelllinie

Die Passage der SH-SY5Y-Zelllinie war vorgesehen, wenn die Zellen 60-80% konfluent waren. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 1 min bei 37°C unter Zugabe von Trypsin inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde FCS hinzugegeben, die nun abgelösten Zellen in ein Röhrchen überführt und 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Nach einmaligem weiterem Waschen mit PBS und einer weiteren Zentrifugation konnte das Zellpallet in Medium resuspendiert und eine neue Zellkulturflasche beimpft oder die Zellen ausgezählt und ausgesät werden. Nach einer Ruhephase von 24 h wurde mit dem Experiment begonnen.

### 2.2.3 Versuchsaufbau der Zelleexperimente

Alle in das Experiment involvierten Medien und Pufferlösungen wurden 24 h vor Versuchsbeginn zum Äquilibrieren in die Hypoxiekammer eingeschleust.

Bei der Arbeit mit 24-Well-Platten wurden von jedem Well 250 µl Medium genommen und gesammelt. Dieses wird im Weiteren als konditioniertes Medium bezeichnet und am Ende des Arbeitsschrittes einmal zentrifugiert, um Suspensionszellen zu entfernen. Das verbliebene Medium eines jeden Wells wurde entfernt, es folgten ein einmaliges Waschen mit *buffered salt solution* (BSS0) und das Einschleusen in die Hypoxiekammer. Dort wurden in jedes Well 400 µl BSS0 inklusive der in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelösten Fettsäuresyntheseinhibitoren gegeben. In diesem Fall wurden für Cerulenin Konzentrationen von 2,5 und 5 µg/ml gewählt, für TOFA 5 µg/ml. Als Kontrollen wirkten Zellen, die in der Hypoxiekammer ohne Inhibitor in

BSS0, BSS0 mit DMSO versetzt und Medium inkubiert wurden. Die Hypoxiedauer betrug 10 h bei 0,1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C und 70% Luftfeuchtigkeit.

Nach dem Ausschleusen wurde das Medium gewechselt. Hierzu wurden 250 µl konditioniertes Medium mit 200 µl frischem Medium gemischt und davon nach Entfernen des für die Hypoxie genutzten Puffers je 400 µl inklusive des respektiven Inhibitors in jedes Well gegeben. Nach weiteren 24 h Reoxygenierung unter Standardzellkulturbedingungen wurden die weiterführenden Analysen durchgeführt.

Wurden 6-Well-Platten verwendet, gestaltete sich der Ablauf analog mit einer Aussaat von 1 Mio Zellen/Well in 3 ml Medium. Der Versuch wurde mit 2 ml Puffer/Medium je Well durchgeführt. Das für die Reoxygenierung verwendete Medium wurde in einem Verhältnis von 1,5 ml konditioniertem Medium zu 1 ml frischem Medium hergestellt.

### 2.2.4 Zellvitalität

Zur Ermittlung der Zellvitalität wurde mit dem *3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*-Assay (MTT) ein bereits etablierter Test herangezogen.

Nach der Aufbereitung wurden die Zellen auf 24-Well-Platten mit einer Dichte von 200.000 Zellen/Well in 1 ml Medium ausgesät und oben beschriebenen Konditionen ausgesetzt. Am Ende der Inkubationszeit wurden zum Medium pro Well 10% an MTT-Lösung hinzugegeben (5 mg/ml in PBS gelöst), die Platten wurden bei 37°C für 3,5 h inkubiert. Die gesamte Flüssigkeit wurde aus jedem Well abpipettiert und 500 µl DMSO hinzugegeben, die Platten wurden für 5 min geschüttelt und aus jedem Well 100 µl auf die Analyseplatte gegeben. Die weitere Analyse erfolgte mittels Mikrotiterplattenphotometer (TECAN Sunrise) bei 565 nm Absorption über die Software Magellan (TECAN).

### 2.2.5 Fettsäureanalyse

Vor Durchlaufen des Versuchsaufbaus wurden 1 Mio Zellen je Well auf 6-Well-Platten ausgesät. Im Weiteren kam das Free Fatty Acid Quantification Kit, von Abcam bezogen, zum Einsatz.

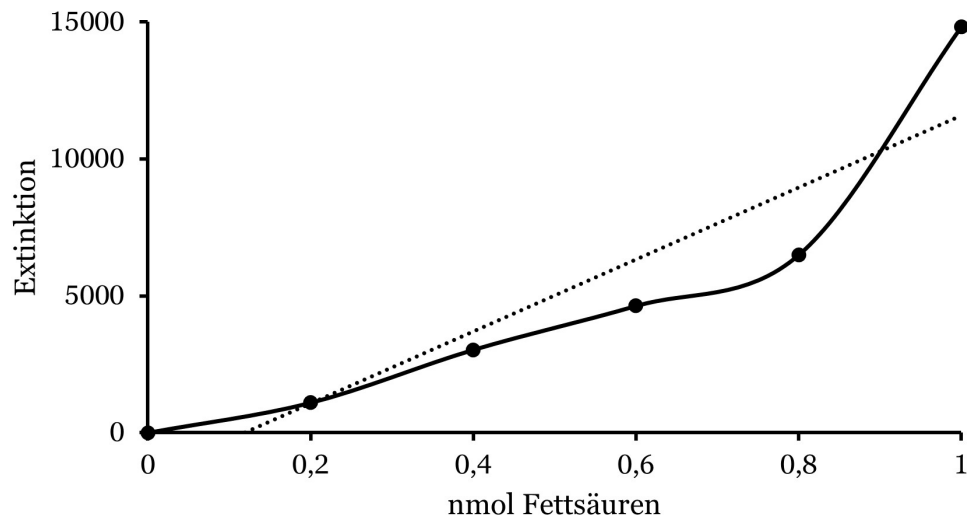
Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und abgekratzt. Die nun in PBS gelösten Zellen wurden in ein Tube überführt und zentrifugiert. Das Homogenisieren gelang durch Auf- und Abpipettieren nach Zugabe von 200 µl Chloroform/Triton X-100 (1% Triton X-100 in purem Chloroform). Anschließend wurde das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert, dann für 5-10 min in einer Mikrozentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Von den so entstandenen zwei Phase wurde die untere, organische Phase in einem neuen Tube gesammelt und bei 50°C



getrocknet, um das Chloroform zu entfernen. Letzte Spuren des Chloroforms wurden durch Gabe der Proben in eine Vakuumzentrifuge für 30 min eliminiert. Durch Zugabe des Fatty Acid Assay Puffer, leichte Erwärmung und intensives Vortexen wurde das entstandene Pallet resuspendiert.

Es wurde durch Mischen des Standards mit 180  $\mu\text{l}$  Assay Puffer ein Palmatic Acid Standard hergestellt und eine Verdünnungsreihe erstellt.

Für die Durchführung der Analyse wurden von jeder Probe 20  $\mu\text{l}$  auf die 96-Well-



**Abb. 3: Standardkurve zur Bestimmung der Fettsäuremenge**

Testplatte gegeben und mit Assay Puffer auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Standardreihe wurde mit je 50  $\mu\text{l}$  angefertigt. Zu allen Wells wurden je 2  $\mu\text{l}$  ACS Reagent hinzugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden in jedes Well 50  $\mu\text{l}$  Reaction Mix gegeben und die Mischung vor Licht geschützt bei 37°C 30 min inkubiert. Die Messung fand im Fluoreszenzmikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 544 nm für die Extinktion und 590 nm in der Emission statt. Anhand der Standardkurve konnte nun die Fettsäuremenge berechnet werden.

### 2.2.6 NAD/NADH-Analyse

Um den NADH/NAD-Quotienten zu bestimmen, wurden in 6-Well-Platten 1 Mio Zellen pro Well ausgesät und den Versuchsbedingungen zugeführt. Zur Vorbereitung und Durchführung der Analyse wurde das NAD/NADH Assay Kit (Fluorometric), vertrieben von Abcam, genutzt. Im Anschluss an die Reoxygenierung folgte ein Waschgang mit kaltem PBS, so dass die Zellen sich abgelöst haben und abgekratzt werden konnten. Das PBS-Zell-Gemisch wurde in ein Tube überführt und 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetragen und das Zellpallet in 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer resuspendiert, dieses wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugieren für 5 min bei 1.500 rpm wurde der Überstand

für die Messung genutzt. Aus 30  $\mu\text{l}$  1mM NADH Stock solution, die in 970  $\mu\text{l}$  PBS verdünnt wurden, wurde eine Standardreihe erstellt. Die Messplatte wurde mit Standardreihe und Proben bestückt und gemäß der Arbeitsanleitung wechselnd mit NADH- oder NAD-Extraction solution bzw. NAD/NADH control solution inkubiert. Zu jedem Well 75  $\mu\text{l}$  Reaction Mixture hinzugeben und dies 1,5 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte bei  $\text{Ex/Em} = 544/590 \text{ nm}$  im Fluoreszenzmikroplattenreader, je Probe wurde der Quotient aus NADH/NAD ermittelt.

## 2.3 Methoden in vivo

### 2.3.1 Versuchstierhaltung

Alle Tiere wurden in den Zentralen tierexperimentellen Einrichtungen der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Die männlichen C57BL6/JRj Mäuse waren 8-10 Wochen alt und wurden von Janvier Labs bezogen. Es wurden je fünf Tiere in einem Käfig mit Wasser und Nahrung *ad libitum* bei 23°C untergebracht. Der Halteraum verfügte über Lichtverhältnisse, die einem Tag-Nacht-Rhythmus angenähert waren.

### 2.3.2 Middle cerebral artery occlusion (MCAO)

Zur Induktion einer zerebralen Ischämie wurde das gut etablierte Fadenokklusionsmodell mit transienter Okklusion der *A. cerebri media* (middle cerebral artery occlusion/MCAO) gewählt (Doeppner et al. 2017).

Zur Vorbereitung wurden etwa 30 min vor Narkosebeginn jedem Tier 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin subkutan injiziert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einem 3-3,5% Isofluran/Sauerstoff-Gemisch. Nach Überprüfung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde eine Inzision der Haut über der Schädelkalotte vorgenommen. Unter Orientierung an den *Suturæ* konnte die *A. cerebri media* aufgefunden werden und über ihr eine Sonde fixiert werden, die eine Dopplermessung ermöglichte.

Nach einem Schnitt am Hals knapp oberhalb des Sternums stellte sich nach Beiseitelegen des Thymus die *A. carotis communis dextra* dar. Wurde diese verfolgt, gelang die Präparation der Bifurkation zu *A. carotis interna* und *externa*. Um den proximalen Anteil der *A. carotis communis* wurde eine feste Ligatur gelegt, um den distalen Bereich eine lose Ligatur. Direkt nach der Bifurkation wurde die *A. carotis externa* mit einer weiteren Ligatur abgebunden. Auf die *A. carotis interna* wurde ein Clip gesetzt, bevor zwischen den beiden Ligaturen an der *A. carotis communis* eine Inzision vorgenommen wurde. Über diese wurde unter parallelem Lösen des Clips, ein beschichtetes Filament in die *A. carotis interna* und weiter in Richtung der *A. cerebri media* vorgeschoben. Nach Überprüfung der sicheren Lage in der *A. cerebri*

*media*, verblieb das Filament dort für 60 min. Nach dessen Entfernung erfolgten eine Wundanästhesie mit Lidocain und das Verschließen mittels Wundnaht durch einen Faden (Ethicon Prolene 5-0).

### 2.3.2.1 Postoperative Versorgung

Im Anschluss an die MCAO wurde jedes Tier gewogen und ihm 1 ml NaCl subcutan injiziert. Für die weitere Analgesie wurde 4 h nach der OP die Injektion mit Buprenorphin wiederholt. Während der ersten drei postoperativen Tage wurde den Tieren alle 24 h subcutan Carprofen appliziert. Die Tiere wurden zudem täglich gewogen und mit Blick auf die Abbruchkriterien klinisch beurteilt. Um starken Gewichtsverlusten vorzubeugen, erhielten die Tiere an Tag 1 und 2 je drei Glukoseinjektionen (1 ml G2%), am dritten Tag wurde dieses einmal am Tag wiederholt.

Ab Tag 1 begannen tägliche Injektionen mit 0,75 mg Cerulenin (50 mg/kg KG bei einem mittleren Gewicht von 25 g) gelöst in DMSO.

Um die Infarkt volumetrie zu analysieren wurde als Tötungszeitpunkt Tag 4 festgelegt, für alle übrigen Untersuchungen, i. e. Immunhistochemie, Western Blot, Fettsäureanalyse, NADH/NAD-Analyse, Tag 7.

### 2.3.3 Infarkt volumetrie

Am vierten Tag nach Induktion des Schlaganfalls wurde das Tier durch eine tiefe Narkose und einen Genickbruch getötet. Mittels Dekapitation und Eröffnung des Schädels wurde das Gehirn zugänglich und entnommen. Unter Zuhilfenahme einer Hirn-Handschnittmatrize wurden Hirnschnitte von 2 mm Dicke angefertigt. Zum Anfärben wurde eine 2%-ige Lösung von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in PBS hergestellt. Vitales Gewebe fungiert dabei als Elektronen- und Protonendonator, unter anderem bereitgestellt durch Dehydrogenasen, die an den inneren Mitochondrienmembranen angesiedelt sind, wodurch TTC zu 1,3,5-Triphenylformazan reduziert und durch einen roten Farbumschlag sichtbar wird, während ischämisches Gewebe ungefärbt bleibt (Bederson et al. 1986).

Die Schnitte wurden für 10 min in dieser Lösung eingelegt. Das Ausmessen des Infarkt volumens erfolgte nach Einscannen der Schnitte mit der Software ImageJ (National Institutes of Health). Dabei wurde aus den Infarktflächen und der Schnittdicke das Infarkt volumen im Verhältnis zum Gesamtvolumen der Hemisphäre berechnet (Doepfner et al. 2014b).

### 2.3.4 Fettsäureanalyse

Nach Entnahme der Gehirne an Tag sieben wurde der Hirnstamm entfernt und die beiden Hemisphären voneinander getrennt. Sie wurden in kaltem PBS gewaschen

und nach Zugabe von 200 µl Chloroform/Triton X-100 (1% Triton X-100 in purem Chloroform) mit einer Kugelmühle (TissueLyser LT, Qiagen) homogenisiert. Weiteres Prozedere siehe 2.2.5

### 2.3.5 NAD/NADH-Analyse

Die Gehirne wurden am siebten Tag entnommen und nach Entfernen des Hirnstamms die Hemisphären getrennt. Im Anschluss an das Waschen mit kaltem PBS wurden die Hemisphären mit 400 µl Lysis Buffer homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10 min bei 2.500 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Tube überführt.

Weiteres Prozedere siehe 2.2.6

### 2.3.6 Immunhistochemie

Die Gehirne wurden sieben Tage nach Induktion der MCAO kryokonserviert und 12 µm dicke Schnitte angefertigt. Bis zur weiteren Verwendung verblieben sie bei -20°C.

Zu Beginn wurden die Schnitte 5 min bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend 5 min in eiskaltes Aceton getaucht und dreimal für 5 min mit *Tris buffered saline* (TBS) gewaschen. Im Weiteren wurden die Objektträger in Citratpuffer dreimal bei 560 Watt für je 5 min in der Mikrowelle erhitzt und erneut dreifach 5 min lang mit TBS gewaschen. Zum Blocken der unspezifischen Bindungsstellen wurde ein Blockerpuffer aus 10% Serum, 2% bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,25% 100x Triton in TBS verdünnt hergestellt und je 250 µl auf jeden Objektträger gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde der primäre Antikörper auf die Proben gegeben. Für Iba-1 wurde eine 1:500-Verdünnung genutzt und GFAP im Verhältnis 1:1.000, jeweils mit dem Blockerpuffer gemischt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C gehalten und am Folgetag dreimal 5 min mit TBS gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper in einer 1:250-Konzentration mit 250 µl auf die Objektträger gegeben und für eine Stunde dort abgedunkelt bei Raumtemperatur belassen wurde. Zum Anfärben der Zellkerne wurde 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in einer Konzentration von 1:10.000 in TBS mit 250 µl auf die Schnitte pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger nochmals 5 min mit TBS gewaschen und nach Beträufeln mit Eindeckmedium eingedeckt.

### 2.3.7 In-situ-Detektion von Apoptose

Der Mechanismus des programmierten Zelltodes, die Apoptose, spielt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des Schlaganfalls. Zur Detektion apoptotischer Zellen

bietet sich das *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL) an. Diese Methode ist besonders attraktiv, da im Gegensatz zur Elektrophorese die Gewebe- und Zellarchitektur dabei erhalten bleibt und damit eine In-situ-Detektion der Apoptose ermöglicht wird (Gavrieli et al. 1992).

Die Aufbereitung geschah unter Zuhilfenahme des In situ cell death detection Kit, TMR red (Sigma Aldrich). Zunächst wurden die Proben 20 min lang in 4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4, bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 30 min in PBS gewaschen. Für eine bessere Permeabilität der Zellen wurden die Schnitte in Citratpuffer für 10 min bei 500 W in der Mikrowelle inkubiert und zum Abkühlen 30 min stehen gelassen. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und gut abgetrocknet. Auf jeden Objektträger wurden 50  $\mu$ l TUNEL Reaction mixture gegeben, dies 60 min bei 37°C abgedunkelt in der Feuchtkammer inkubiert. Abschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und dabei im letzten Waschschrift DAPI (1:10.000) hinzugefügt.

### 2.3.8 Western Blot

Zur Herstellung der Proben wurden die Hemisphären zunächst separat lysiert. Dazu wurde nach der Trennung der Hemisphären voneinander Radio Immuno Precipitation Assay Puffer 1:10 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Von dieser Verdünnung war 1 ml mit 5  $\mu$ l 200x Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zu vermischen. Davon wurden zu jeder Probe 800  $\mu$ l gegeben und im Homogenisator lysiert. Anschließend wurde das Lysat 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube gegeben.

Die Proteinkonzentration wurde mittels BSA-Kit (Pierce BCA Assay Kit, Thermo Scientific, 23225) bestimmt. Hier wurden von jeder Probe und dem Standard 25  $\mu$ l in das jeweilige Well einer Mikroplatte gegeben und 200  $\mu$ l des zuvor hergestellten Working Reagents hinzugefügt. Zum Vermischen wurde die Mikroplatte für 30 sec auf eine Rüttelplatte gestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation lichtgeschützt bei 37°C für 30 min. Nach Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur konnte die Messung bei einer Wellenlänge von 562 nm Absorption in einem Mikrotiterplattenphotometer durchgeführt werden und die Auswertung mit der Software Magellan erfolgen. Bis zur weiteren Bearbeitung blieben die Proben bei -80°C konserviert.

In Vorbereitung auf die Elektrophorese wurden zuerst Gele hergestellt.

Zunächst wurde das Trenngel zwischen die beiden Glasdämme des Elektrophoresesystems gegeben und bis zur Polymerisierung mit 70% Isopropanol bedeckt. Anschließend wurden die Reste des Isopropanols entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Nach der Ermittlung der Proteinkonzentration wurden von jeder Probe 10  $\mu$ l mit entsprechend 20  $\mu$ g Proteinmenge mit 4x Laemmli-Puffer vermischt. Um die Dena-

turierung der Proteine zu erreichen, wurden sie 7 min lang bei 95°C gehalten und anschließend kurz zentrifugiert. Jede Geltasche wurde mit 10 µl Gemisch beladen und die Elektrophorese bei 95 V für eine Stunde durchgeführt. Für das Blotting wurden die Membranen erst eine Minute in 100% Methanol inkubiert, dann für 15 min in Transferpuffer geschwenkt. Im Weiteren wurden die Materialien in der Reihenfolge Schwamm-Filterpapier-Gel-Membran-Filterpapier-Schwamm in der Halterung des Blottingsystems geschichtet und in Transferpuffer bei 4°C 100 V ausgesetzt.

Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurden die Membranen in 5%-iger Milchlösung 1 h lang geschwenkt. Anschließend wurden sie mit dem ersten Antikörper in 5%-iger Milchlösung über Nacht bei 4°C auf einem Wipptisch inkubiert. Folgende Antikörper sind zum Einsatz gekommen: Akt (1:1.000, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts), Phospho-Akt (1:1.000, Cell Signaling), Bcl xl (1:1.000, Cell Signaling), Bcl 2 (1:1.000, Santa Cruz, Dallas, Texas).

Am Folgetag wurden die Membranen dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper auf dem Wipptisch inkubiert. Abschließend wurde unter Zugabe einer ECL-Lösung eine *Horseradish peroxidase reaction* ausgelöst, die durch Belichtung in der Dunkelkammer auf Fotopapier entwickelt und damit sichtbar gemacht werden konnte.

### 2.3.9 Verhaltenstests

Die ausgewählten Verhaltenstests sollten das Ausmaß der motorischen und sensorischen Einschränkung sowie die neurologische Erholung der Tiere näher beleuchten. Für die Präkonditionierung auf die Verhaltenstests erfolgte das Training an zwei konsekutiven Tagen vor Initiierung der MCAO. Die eigentlichen Tests wurden an den Tagen 7, 14, 21 und 28 nach MCAO durchgeführt.

Um einen Eindruck von motorischer Koordination und Kondition der Mäuse zu erhalten, eignete sich der von Dunham und Miya (1957) vorgestellte Rotarod-Test. Dazu wurde jede Maus auf eine sich drehende Trommel gesetzt, die sukzessive ihre Geschwindigkeit von 4 auf 40 rpm erhöht. Gemessen wurde dabei die Zeit bis die Maus von der Trommel fiel bei einer maximalen Testzeit von 5 min.

Mit Blick auf Kraft und Koordination wurden im Tight-rope-Test die Tiere mit den Vorderpfoten an eine 60 cm gespannte Leine herangeführt und die Zeit genommen bis sie die Plattform erreicht hatten. Während gesunde Tiere die Hinterpfoten hochziehen, um Kontakt zur Leine herzustellen, sowie den Schwanz gebrauchen, ist dies neurologisch beeinträchtigten Tieren nur eingeschränkt möglich. Unter Anwendung eines Scores wurden je nach Leistung Punkte vergeben (Tabelle 1).

Der Corner-turn-Test besteht daraus, dass die Maus zehnmal in einen Aufbau von zwei im 30°-Winkel zulaufenden Seitenwänden gesetzt wird. Ziel dabei ist, dass die Maus zum Ende der Gasse läuft, mit den Tasthaaren die Seitenwände berührt, sich

in eine Richtung umdreht und zurückläuft. Es wird jeweils dokumentiert, in welche Richtung sich die Maus dreht und dies ausgewertet nach der Formel: (Anzahl Linksdrehungen – Anzahl Rechtsdrehungen)/10. Der Test gibt insofern Aufschluss über die Sensomotorik und die Neigung zur Lateralisierung, als dass Tiere mit neurologischem Defizit vermehrt die unbeeinträchtigte Seite wählen, während gesunde Tiere keine der beiden Seiten präferieren.

Im Balance-beam-Test können die Feinmotorik und das Gleichgewicht beobachtet werden. Dazu wird jedes Tier zweimal auf eine sich verjüngende Stange gesetzt, die Zeit gemessen bis es die Plattform am Ende der Stange erreicht und daraus der Mittelwert gebildet. Sofern das Tier von der Stange fällt, wird hierfür die maximale Zeit von 60 sec genommen (Doepfner et al. 2014a).

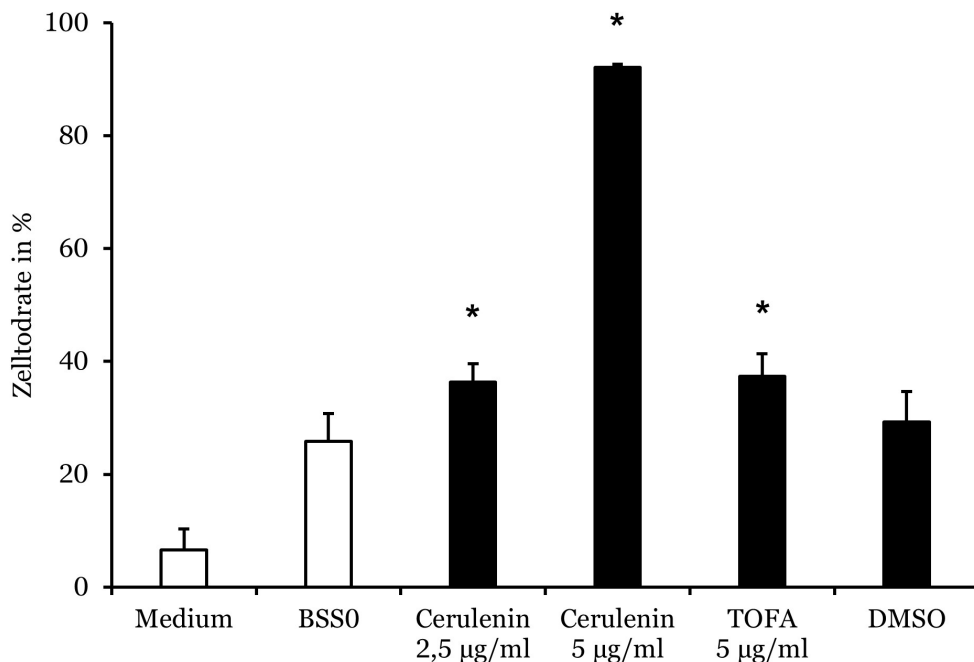
**Tab. 5:** Score zur Auswertung des Tight-rope-Tests

Score	Zeit in sek	Plattform erreicht
20	1-6	+
19	7-12	+
18	13-18	+
17	19-24	+
16	25-30	+
15	31-36	+
14	37-42	+
13	43-48	+
12	49-54	+
11	55-60	+
10	55-60	-
9	49-54	-
8	43-48	-
7	37-42	-
6	31-36	-
5	25-30	-
4	19-24	-
3	13-18	-
2	7-12	-
1	1-6	-
0	0	-

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aggravation des Zelltods durch Inhibition der Fettsäuresynthese

In einem ersten Schritt erfolgte zunächst der Transfer von dem Versuchsaufbau nach Brose et al., der eine 42-stündige Inkubation unter Hypoxie in einem glukose-reichen Medium vorsah, hin zu einer stärkeren Annäherung an die Pathophysiologie während des Schlaganfalls. Wie bereits beschrieben wurden dazu Zellen der SH-SY5Y-Linie einer Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung von 24 h ausgesetzt (siehe 2.2.3). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Zellschädigung von



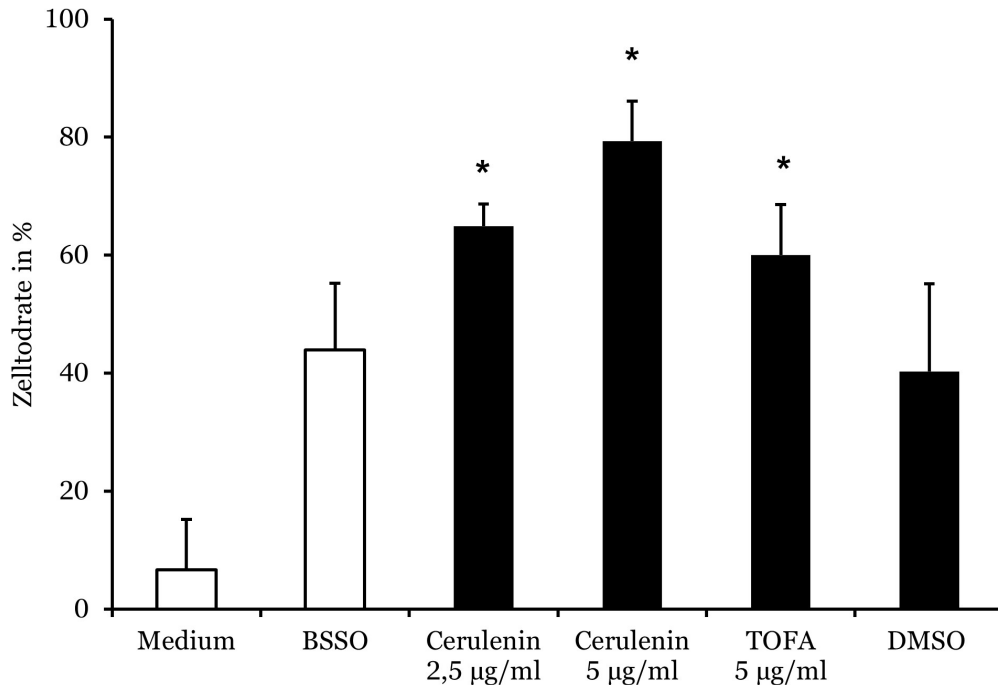
**Abb. 4: Aggravation des Zelltods bei SH-SY5Y-Zellen durch Inhibition der Fettsäuresynthese.** Kultivierte SH-SY5Y-Zellen wurden, mit Cerulenin bzw. TOFA versetzt, 10 h einer Hypoxie bei 0,1% O<sub>2</sub> ausgesetzt mit anschließender Reoxygenierung für 24 h unter Standardzellkulturbedingungen. Zur Kontrolle wurden einige Zellen in dem Puffer BSS0 und Medium gehalten, BSS0 mit DMSO stellt die Lösungsmittelkontrolle dar. Anschließend wurde mittels MTT-Assay die Zellviabilität bestimmt. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für n = 3 von 2 verschiedenen Zellpassagen, \*signifikant im Vergleich zu DMSO (BSS0+DMSO), p < 0,5.

der Dauer der Hypoxie abhängig ist (8 vs. 10 h). Aus diesem Grund wurden die folgenden Experimente mit einer Hypoxiedauer von 10 h durchgeführt. Zusätzlich fiel eine Erhöhung der Konzentration des Cerulenins (1,25 vs. 2,5 µg/ml) mit Blick auf das Zellüberleben negativ ins Gewicht (Abb. 4).

Wurden nun, um der Frage nachgehen zu können, inwieweit die Stimulation der



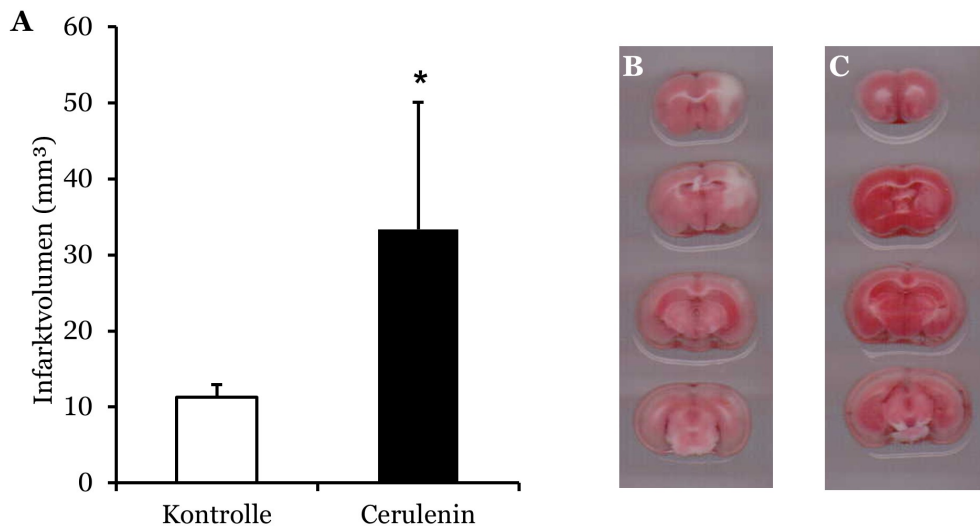
Fettsäuresynthese unter Hypoxie auch in primären Cortezellen relevant ist, diese nach demselben Modell wie die SH-SY5Y-Zellen behandelt, zeigte sich eine ähnliche Abhängigkeit der Zellschädigung von Inkubationsdauer und Stoffkonzentration (Abb. 5).



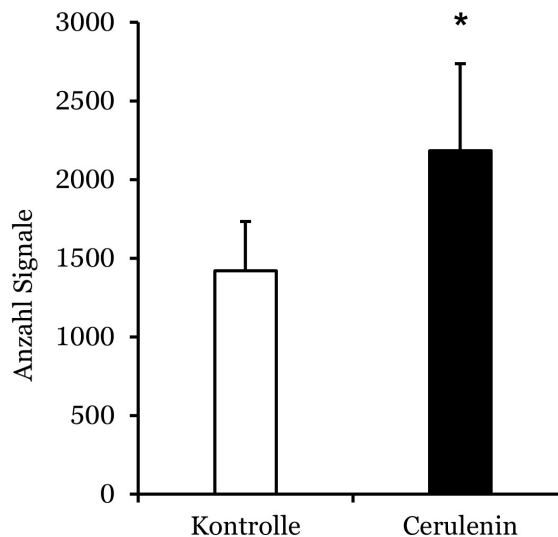
**Abb. 5: Aggravation des Zelltods bei primären Cortezellen durch Inhibition der Fettsäuresynthese.** Primäre Cortezellen wurden, mit Cerulenin bzw. TOFA versetzt, 10 h einer Hypoxie bei 0,1% O<sub>2</sub> ausgesetzt mit anschließender Reoxygenierung für 24 h unter Standardzellkulturbedingungen. Zur Kontrolle wurden einige Zellen in dem Puffer BSS0 und Medium gehalten, BSS0 mit DMSO stellt die Lösungsmittelkontrolle dar. Anschließend wurde mittels MTT-Assay die Zellviabilität bestimmt. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für n = 3 von 2 verschiedenen Zellpräparationen, \*signifikant im Vergleich zu DMSO (BSS0+DMSO), p < 0,5.

### 3.2 Neuronale Schädigung durch Inhibition der Fettsäuresynthese in vivo

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, inwieweit die in vitro beobachtete Zellschädigung auch in vivo stattfindet, wurde Mäusen nach einstündiger Okklusion der *A. cerebri media* ab Tag 1 postoperativ täglich Cerulenin mit einer Konzentration von 50 µg/kg KG intraperitoneal injiziert. Zwar konnten keine Anzeichen einer Intoxikation beobachtet werden, jedoch kam es in der mit Cerulenin behandelten Gruppe postoperativ zu einem deutlicheren Gewichtsabfall. Um dem zu begegnen, erhielten alle Tiere in den ersten drei postoperativen Tagen Glukoseinjektionen. Unter diesen Bedingungen stellte sich an Tag 4 eine signifikante Zunahme des Infarkt volumens dar (Abb. 6) und unterstützt damit die Hypothese, dass die Fettsäuresynthese und



**Abb. 6: Neuronale Schädigung durch Inhibition der Fettsäuresynthese in vivo.** Inhibition der Fettsäuresynthese durch Cerulenin vergrößert das Infarktvolumen nach MCAO. (A) Messung des Infarktvolumens mittels TTC-Färbung an Tag 4 nach 1 h MCAO und täglicher Gabe von Cerulenin (50 µg/kg). Die Kontrolle erfolgte unter Injektion von DMSO. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für n = 5/6, \* signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, p < 0,5. (B, C) Darstellung der des Infarktvolumens mittels TTC-Färbung nach Ceruleningabe (B) und Injektion von DMSO (C).

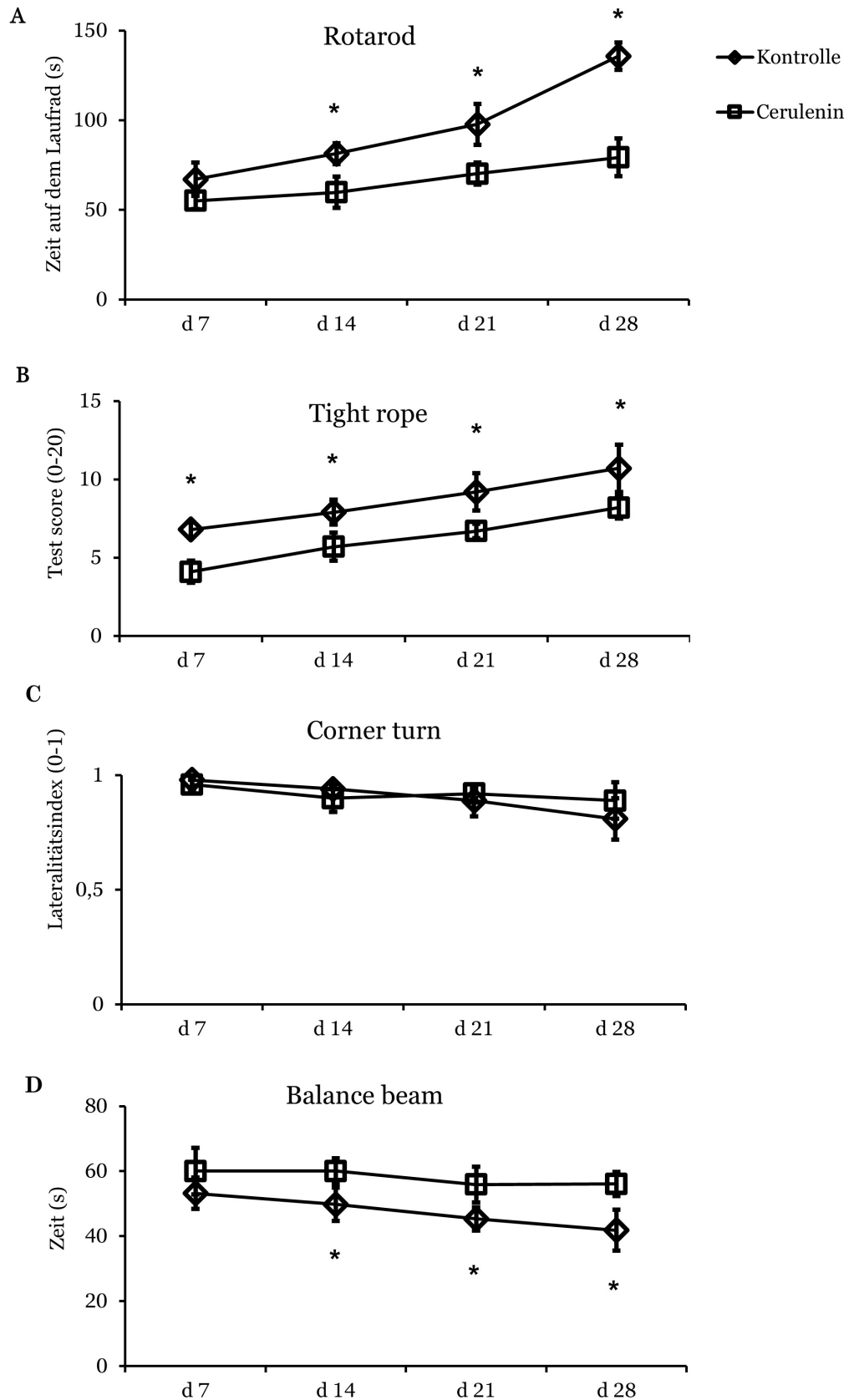


**Abb. 7: Akuter Zellschaden nach MCAO und Inhibition der Fettsäuresynthese.** Quantifizierung von TUNEL<sup>+</sup>-Zellen an Tag 7 nach 1 h MCAO und täglicher Gabe von Cerulenin (50 µg/kg). Die Kontrolle erfolgte unter Injektion von DMSO. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für n = 5.

deren Inhibition auch eine Rolle in der zerebralen Ischämie spielt. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Quantifikation der TUNEL<sup>+</sup>-Zellen. Sie diente der immunhistochemischen Analyse des akuten Zellschadens und damit als Marker der Apoptose. Unter der Behandlung mit Cerulenin war diese signifikant erhöht (Abb. 7).

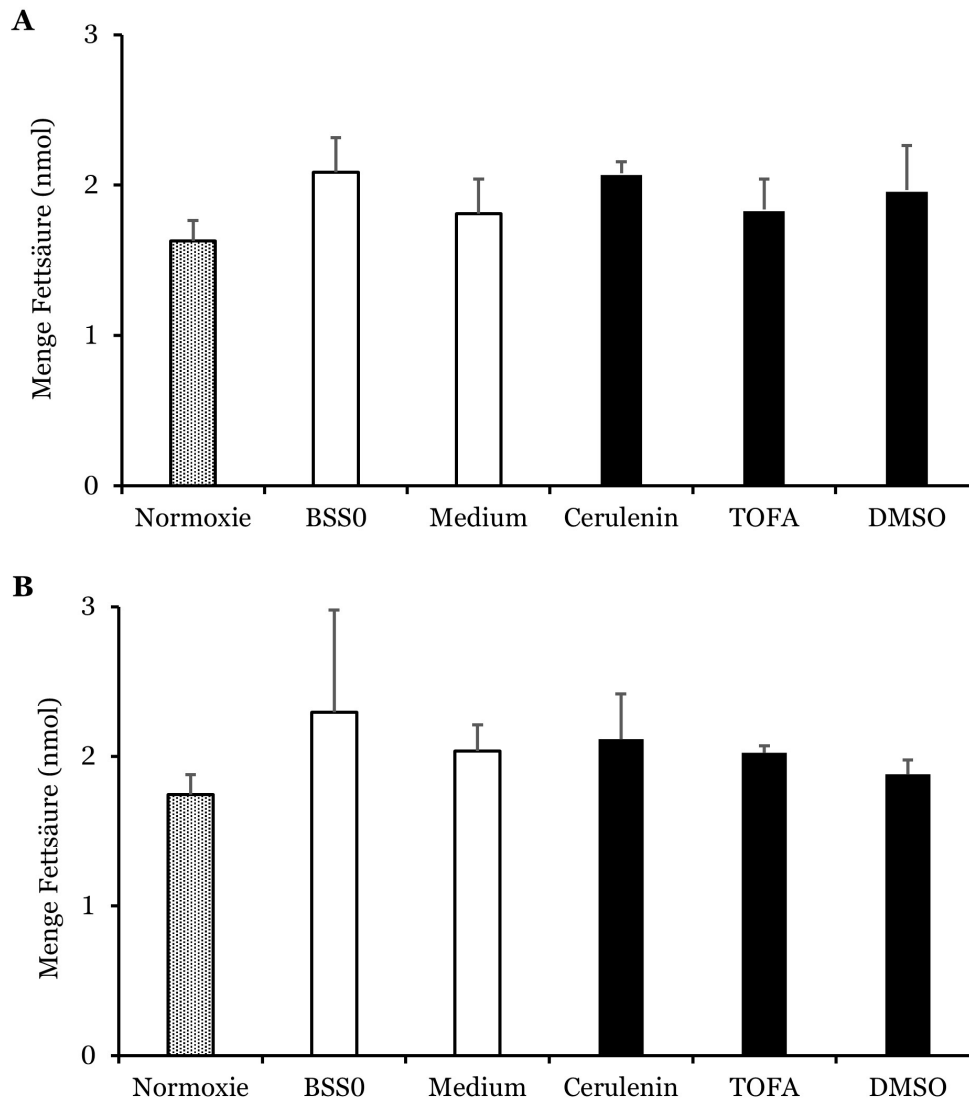
### 3.3 Analyse des postischämischen neurologischen Defizits

In der Langzeituntersuchung wurden mit den Tieren zu vier Zeitpunkten nach Induktion der MCAO Verhaltenstests durchgeführt (Tag 7, 14, 21, 28). Auf dem Rotarod wurde für jedes Tier die Verweildauer gemessen. Ab Tag 14 zeigte sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Cerulenin behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Dieser nahm im Verlauf bis Tag 28 weiter zu (Abb. 8 A). Für das Klettern am Tight-rope zeigten sich zu allen Untersuchungszeitpunkten ähnlich signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Tieren und den Kontrolltieren (Abb. 8 B). Im Corner-turn-Test konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 8 C). Während des Balance-beam-Tests wurden ab Tag 7 signifikante Unterschiede zwischen Cerulenin- und Kontrollgruppe verzeichnet (Abb. 8 D). Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz der Fettsäuresynthese bei der postischämischen neurologischen Erholung.



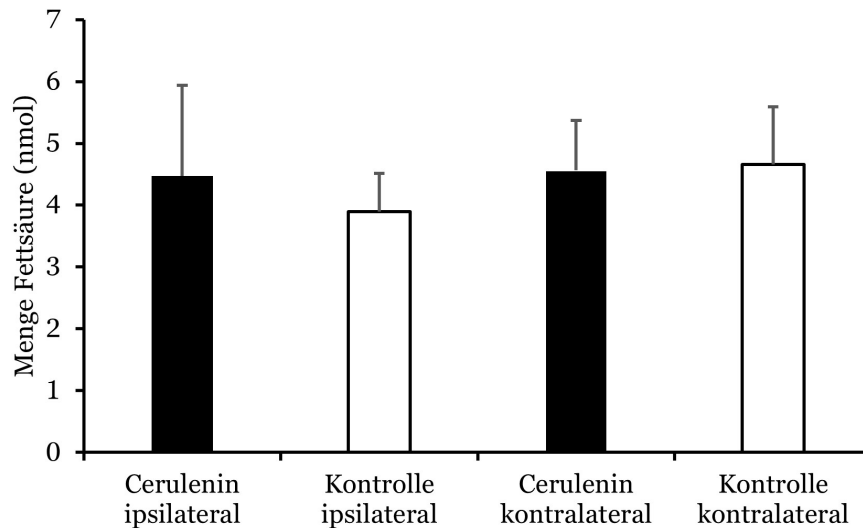
**Abb. 8: Analyse des postischämischen neurologischen Defizits.** Inhibition der Fettsäureynthese wirkt sich negative auf die postischämische neurologische Erholung aus. Herangezogen wurden Untersuchungen auf dem Rotarod (A), dem Tight rope (B), im Corner-turn-Test (C) sowie der Balance-beam-Test (D). Dargestellt sind die jeweiligen Ergebnisse an Tagen 7, 14, 21, 28 nach 1 h MCAO und täglicher Gabe von Cerulenin (50 µg/kg. Die Kontrolle erfolgte unter Injektion von DMSO.

### 3.4 Untersuchung der Fettsäuresynthese



**Abb. 9: Untersuchung der Fettsäuresynthese in vitro.** Auswirkungen von Cerulenin und TOFA auf die Fettsäuresynthese nach Hypoxie. Kultivierte SH-SY5Y-Zellen (A) und primäre Cortezellen (B) wurden, mit Cerulenin bzw. TOFA versetzt, 10 h einer Hypoxie bei 0,1% O<sub>2</sub> ausgesetzt mit anschließender Reoxygenierung für 24 h unter Standardzellkulturbedingungen. Zur Kontrolle wurden einige Zellen in dem Puffer BSS0 und Medium gehalten, BSS0 mit DMSO stellt die Lösungsmittelkontrolle dar. Anschließend wurde die Menge an freien Fettsäuren quantifiziert. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für n = 4.

Im Weiteren sollte der Fokus auf die Bestimmung der Stoffwechselprodukte gelegt werden. Dazu wurden sowohl Zellen der SH-SY5Y-Linie wie auch primäre Cortezellen erneut den Versuchsbedingungen mit 10 h Hypoxie und 24 h Reoxygenierung ausgesetzt, um im Anschluss die Menge an freien Fettsäuren zu quantifizieren. Dabei konnte für beide Zelltypen kein signifikanter Anstieg der freien Fettsäuren beobachtet werden (Abb. 9 A+B). Weiterführende Analysen nach MCAO beinhalteten ebenfalls die Quantifizierung der freien Fettsäuren an Tag 7. Dies ergab simultan zu

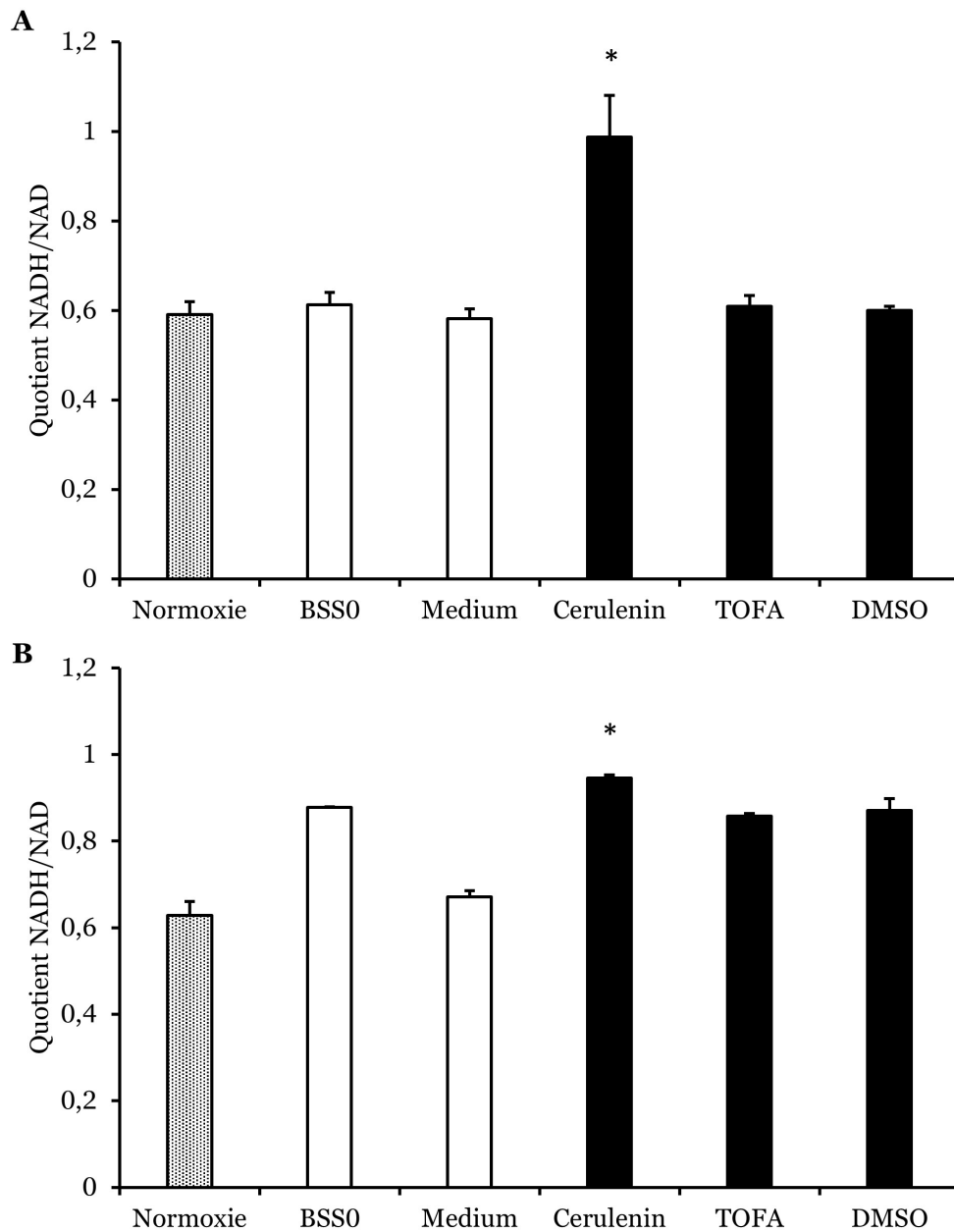


**Abb. 10: Untersuchung der Fettsäuresynthese in vivo.** Auswirkungen des Cerulenin auf die Fettsäuresynthese nach MCAO. Quantifizierung der Fettsäuren an Tag 7 nach 1 h MCAO und täglicher Gabe von Cerulenin (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Die Kontrolle erfolgte unter Injektion von DMSO. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für  $n = 4$ .

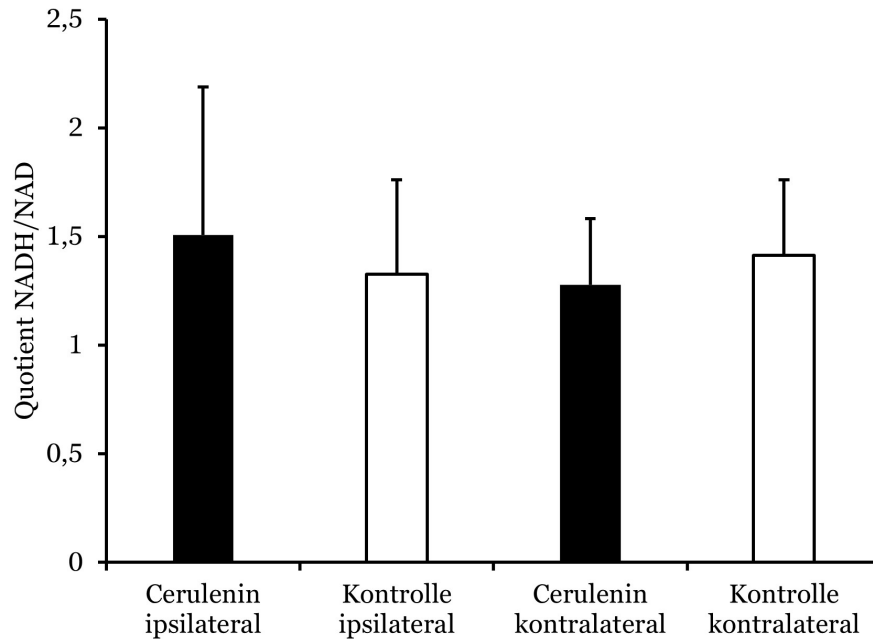
den Experimenten in vitro keinen signifikanten Anstieg im Vergleich von behandelter zur Kontrollgruppe. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Hemisphären (Abb. 10).

### 3.5 Einfluss der Fettsäuresynthese auf das Redoxpotenzial

Um der Frage nachzugehen, inwieweit die Inhibition Einfluss auf das Redox-Potenzial hat, wurde in der Analyse in vitro nach dem beschriebenen Versuchsaufbau das Augenmerk auf den Quotienten aus NADH und NAD gelegt. Sowohl für die Zellen der SH-SY5Y-Reihe (Abb. 11 A) als auch für die primären Cortexzellen (Abb. 11 B) ergab sich ein signifikanter Anstieg des NADH/NAD-Quotienten unter Behandlung mit Cerulenin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Dies konnte nicht für TOFA (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) verzeichnet werden. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass es unter der Inhibition der Fettsäuresynthese zu signifikanten Veränderungen des Redox-Potenzials kommt. Für die Betrachtung des Redox-Potenzials in vivo wurde analog zur Situation in vitro NADH und NAD an Tag 7 nach MCAO gemessen und daraus der Quotient gebildet. Hier konnte weder zwischen Cerulenin- und Kontrollgruppe noch den Hemisphären ein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abb. 12).



**Abb. 11: Einfluss der Fettsäuresynthese auf das Redoxpotenzial in vitro.** Inhibition der Fettsäuresynthese durch Cerulenin nach Hypoxie wirkt sich negativ auf das Redoxpotenzial aus. Kultivierte SH-SY5Y-Zellen (A) und primäre Cortezellen (B) wurden, mit Cerulenin bzw. TOFA versetzt, 10 h einer Hypoxie bei 0,1% O<sub>2</sub> ausgesetzt mit anschließender Reoxygenierung für 24 h unter Standardzellkulturbedingungen. Zur Kontrolle wurden einige Zellen in dem Puffer BSS0 und Medium gehalten, BSS0 mit DMSO stellt die Lösungsmittelkontrolle dar. Anschließend wurden die Mengen an NADH und NAD gemessen und der Quotient aus beiden gebildet. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für n = 4, \* signifikant im Vergleich zu DMSO (BSS0+DMSO), p < 0,5.

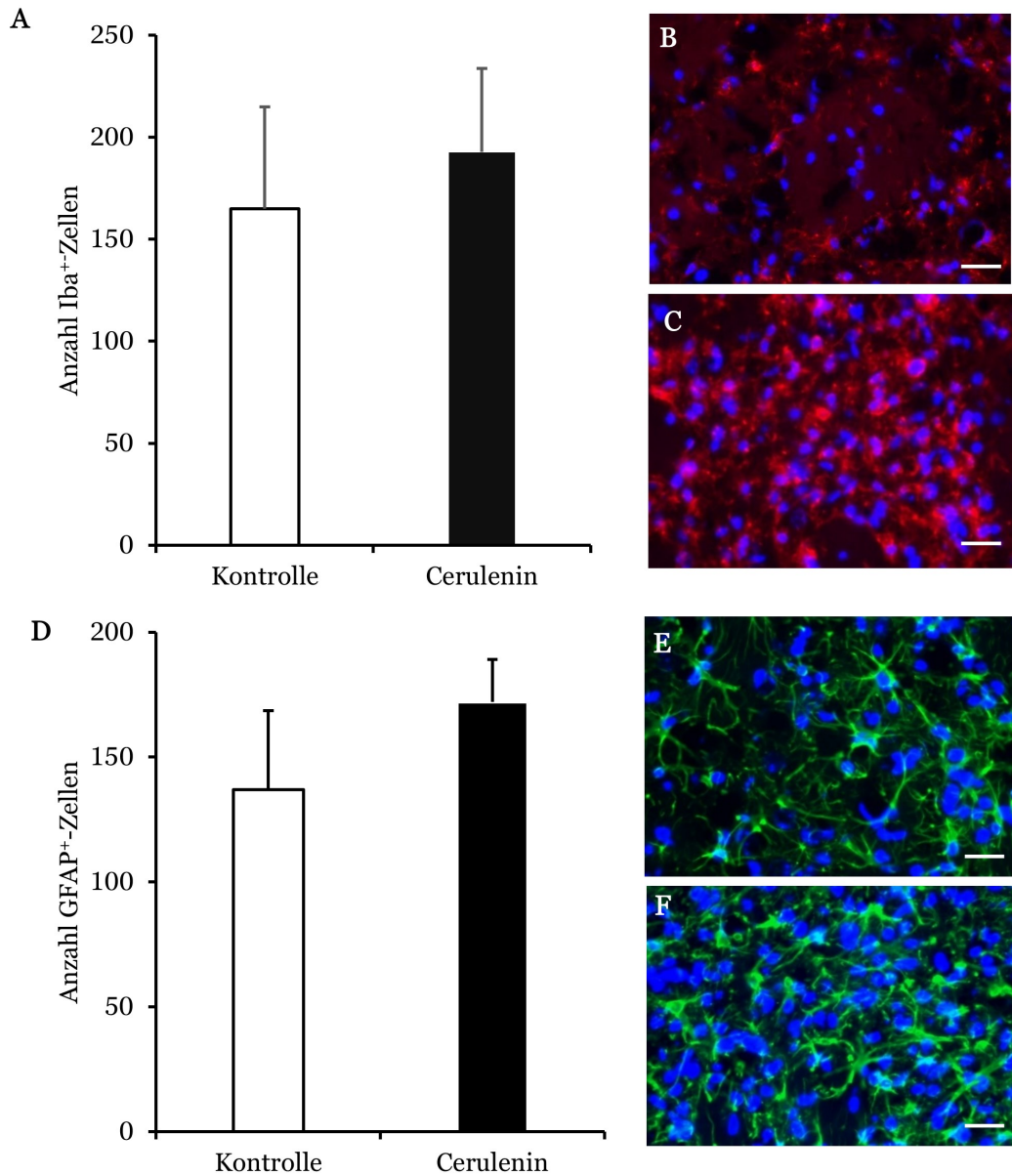


**Abb. 12: Auswirkungen des Cerulenin auf das Redoxpotenzial nach MCAO.** Quantifizierung von NADH und NAD und Bildung des NADH/NAD-Quotienten an Tag 7 nach 1 h MCAO und täglicher Gabe von Cerulenin (50 µg/kg). Die Kontrolle erfolgte unter Injektion von DMSO. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für  $n = 4$ .

### 3.6 Mikrogliale und gliale Antwort auf die Inhibition der Fettsäuresynthese

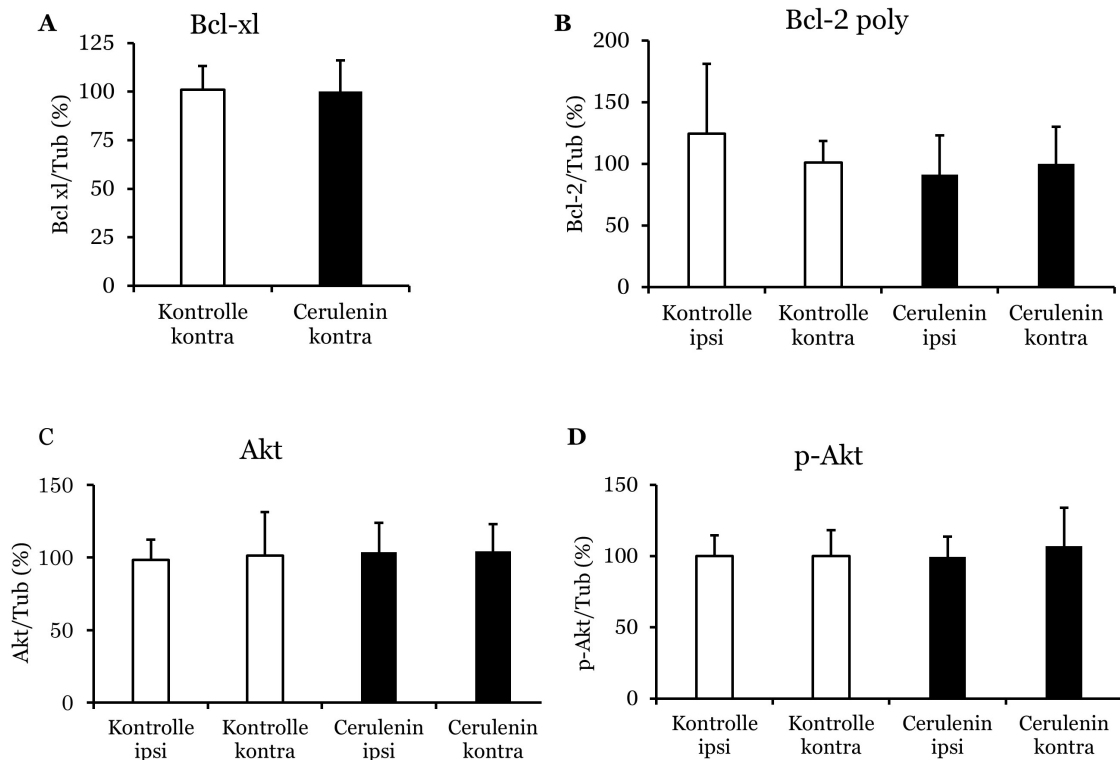
Zur Detektion einer mikroglialen und/oder glialen Antwort auf die Inhibition der Fettsäuresynthese wurden an Tag 7 nach MCAO die kryokonservierten Hirnschnitte immunhistochemisch gefärbt. Bezüglich der Anfärbung mit dem Iba-1-Antikörper ließ sich in der Ceruleningruppe ein höheres Aufkommen von Iba-1<sup>+</sup>-Zellen beobachten, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied auszumachen. In der GFAP-Färbung zeigte sich ebenfalls ein, wenn auch nicht signifikanter, Anstieg der GFAP<sup>+</sup>-Zellen bei den mit der Cerulenin behandelten Tieren. Dies legt nahe, dass es unter der Inhibition der Fettsäuresynthese zu einer relevanten Aktivierung der Mikroglia und Glia im Sinne einer zentralnervösen inflammatorischen Antwort kommt.





**Abb. 13: Mikrogliale und gliale Antwort auf die Inhibition der Fettsäuresynthese.** Quantifizierung von Iba-1<sup>+</sup>-Zellen (A) und GFAP<sup>+</sup>-Zellen (B) an Tag 7 nach 1 h MCAO und täglicher Gabe von Cerulenin (50 µg/kg). Die Kontrolle erfolgte unter Injektion von DMSO. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für n = 5/6. Beispiele für eine immunhistochemische Färbung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen (rot) bzw. der GFAP<sup>+</sup>-Zellen (grün) und der Zellkerne (blau) aus der Kontrollgruppe (B, E) und der mit Cerulenin behandelten (C, F). Maßstabsleiste entspricht 10 µm.

### 3.7 Pro- und antiapoptotische Signalkaskaden



**Abb. 14: Detektion pro-/antiapoptotischer Proteine.** Quantifizierung der Proteine Bcl-xl (A), Bcl-2 poly (B), Akt (C) und p-Akt (D) an Tag 7 nach 1 h MCAO und täglicher Gabe von Ceruleinin (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Die Kontrolle erfolgte unter Injektion von DMSO. Abgebildet finden sich die Mittelwerte mit Standardabweichung für  $n = 5/6$ .

Die Western Blot-Analysen widmeten sich der Detektion und Quantifizierung von Proteinen, die über ihre nachgeschalteten Signalkaskaden relevanten Anteil an pro- und antiapoptotischen Signalwegen in der Zelle haben. Für keines der untersuchten Proteine konnte jedoch nach MCAO und Behandlung mit Ceruleinin ein signifikanter Anstieg oder Abfall beobachtet werden (Abb 14 A-D).

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, inwieweit die Inhibition der Fettsäuresynthese einen biologisch relevanten Pfad in hypoxischen bzw. ischämischen Neuronen darstellt. Die Dissertation fußt auf den Vorarbeiten von Brose et al. (2016). Diese konnten zeigen, dass eine Inhibition der Fettsäuresynthese mit einer höheren neuronalen Zelltodrate und einer Verschiebung des Redox-Potenzial zu Gunsten von NADH vergesellschaftet ist (Brose et al. 2016). Diese Untersuchungen wurden an der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y in einem klinisch wenig relevanten Modell mit einer sehr langen Hypoxie von 42 Stunden und gleichzeitig vorhandener Glukose durchgeführt, also Bedingungen, wie sie in einer fokalen zerebralen Ischämie nicht anzutreffen sind.

Folgerichtig sollte unter Verwendung der hier vorliegenden Modelle zum einen ein kombinierter Sauerstoff-Glukose-Entzug sowohl an SH-SY5Y-Zellen wie auch an primären Neuronen durchgeführt werden. Zum anderen sollten die Erkenntnisse dieses In-vitro-Modells auf das Fadenokklusionsmodell der Maus übertragen werden. Es zeigte sich in vitro, dass die Inhibition der Fettsäuresynthese sowohl mit Cerulenin als auch mit TOFA in kultivierten SH-SY5Y-Zellen und in primären Cortezellen mit einer signifikant erhöhten zellulären Schädigung unter hypoxischen Bedingungen vergesellschaftet ist. Diese erhöhte Zelltodrate geht einher mit einer Verschiebung des Redox-Potenzials mit Erhöhung des NADH/NAD-Quotienten. Eine Übertragung der Erkenntnisse auf das Schlaganfallmodell der Maus ist insofern gelungen, als dass es zu einem signifikanten Anstieg des Infarktolumens unter Therapie mit Cerulenin nach Schlaganfallinduktion kam. Dies spiegelte sich in einer signifikant erhöhten Anzahl an apoptotischen Zellen wider. Darüber hinaus konnte dargestellt werden, dass die Inhibition der Fettsäuresynthese die postischämische neurologische Erholung signifikant beeinträchtigt. Immunhistochemisch ließ sich ein Anstieg der mikroglialen und astroglialen Reaktion im Infarktgewebe nach Inhibition der Fettsäuresynthese nachweisen.

Durch diverse Arbeiten unter nicht-ischämisch/-hypoxischen Bedingungen konnte bereits beleuchtet werden, dass die Inhibition der Fettsäuresynthese einen proapoptotischen Effekt erzielt. Diese Daten fußen auf der Beobachtung, dass Tumorzellen, anders als physiologische Zellen, über eine verstärkte Expression der Fettsäuresynthase verfügen. Cerulenin inhibiert irreversibel die Fettsäuresynthase durch kovalente Bindung an Cystein in der  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase-Domäne und steht somit als potenzieller therapeutischer Ansatz im Fokus der Forschung verschiedener Tumorerkrankungen (Zhao et al. 2006; Furuta et al. 2008; Murata et al. 2010). In der hier vorliegenden Arbeit wurde nun der Nachweis erbracht, dass die Inhibition der

Fettsäuresynthese nicht nur zu einer signifikant erhöhten Zelltodrate in einem pathophysiologisch sinnvollen Hypoxiemodell führt, sondern auch in einem signifikanten Anstieg des Infarkt volumens resultiert. Insgesamt wird das initiale neurologische Defizit vor allem der Größe des von der Ischämie betroffenen Areals zugeschrieben. Neben dem eigentlichen Infarktkern ist die Penumbra als „*tissue at risk*“ von besonderem Interesse. Ihre Regeneration unter gleichzeitiger Vergrößerung des Infarktkerns zu Lasten der Penumbra determiniert das neurologische Outcome und ist von diversen Prozessen abhängig (siehe 1.2). In der Analyse des postischämischen neurologischen Defizits manifestierte sich dieses nicht nur zu Beginn, sondern über die gesamte Beobachtungsdauer von 28 Tagen. Dies verleiht der Fettsäuresynthese eine herausragende Rolle in der Adaptation von Neuronen an hypoxisch-ischämische Bedingungen mit dem Ziel, die metabolische Homöostase aufrechtzuerhalten und die neurologische Erholung sicherzustellen.

Ausgangsprodukt für die Fettsäuresynthese ist Malonyl-CoA (siehe 1.4), welches einen Inhibitor der Carnitin-Palmityl-Transferase 1 darstellt, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der  $\beta$ -Oxidation. Die Carnitin-Palmityl-Transferase 1 ist an der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert. Ebenjene Lokalisation wird dem Protein *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), einem Inhibitor der Apoptose, zugeschrieben, weswegen eine Interaktion im Sinne einer gegenseitigen Aktivierung vermutet wird (Paumen et al. 1997). Gerade im Rahmen der zerebralen Ischämie bei Mäusen wird Bcl-2 sowohl durch ektopische Applikation (Kilic et al. 2002; Doepfner et al. 2010), aber auch durch Überexpression, eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen (Zhao et al. 2003; Zhang et al. 2015). Ebenso kann die Überexpression von Bcl-2 in Glioblastomzellen den proapoptotischen Effekt der Applikation von Cerulenin teilweise kompensieren (Zhao et al. 2006). Gleichzeitig gibt es Erkenntnisse darüber, dass Hypoxie mit einer vermehrten Expression von Bcl-2 einhergeht. Umgekehrt zeigen Bcl-2-defiziente Mäuse größere Infarkt volumina und deutlichere neurologische Defizite im Vergleich zu Wildtyptieren (Akhtar et al. 2004). Andererseits führt die Inhibition der Fettsäuresynthese durch Cerulenin zu einer Reduktion endogener Bcl-2 Level, wie es in Blasenkarzinomzellen gezeigt werden konnte (Jiang et al. 2012).

Wie in dieser Arbeit dargelegt, konnte nach Applikation von Cerulenin in vivo keine vermehrte Expression von Bcl-2 dokumentiert werden. Infolgedessen findet sich in den so behandelten Schlaganfallmäusen keine Neuroprotektion. Unter anderem hierdurch ließe sich der beobachtete proapoptotische Effekt erklären, den eine ausschließliche Inhibition der Fettsäuresynthese mit resultierender Akkumulation von Malonyl-CoA zu haben scheint. Interessanterweise konnte umgekehrt in einer Untersuchung an humanen Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden, dass die simultane Inhibition von Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäuresynthese durch TOFA bzw. C75 mit einem besseren Zellüberleben verbunden ist (Zhou et al. 2003).

Trotz signifikanter Zunahme der Infarkt volumina nach Gabe von Cerulenin konn-

te in vivo kein signifikanter Abfall der freien Fettsäuren detektiert werden. In vitro zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz zu einer reduzierten Fettsäuresynthese. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Energiemetabolismus und die Regulation des Lipidhaushalts zentrale Aufgabe der Astrozyten ist (Panov et al. 2014; Falkowska et al. 2015). Insgesamt verfügt das zentrale Nervensystem über eine geringe endogene De-novo-Fettsäuresynthese und bedient sich zur Deckung des Bedarfs der Resorption freier Fettsäuren aus dem Serum (Dhopeshwarkar und Mead 1969; Schönfeld und Reiser 2017). Entsprechend würde sich unter Inhibition der Fettsäuresynthese ein Blick auf die Gewebe mit der höchsten Fettsäuresyntheseleistung, Leber und Fettgewebe, empfehlen. Außerdem erfolgt im Anschluss an die Synthese eine schnelle Konversion von Fettsäuren zu Lipiden wie z. B. Phospholipiden, so dass die freien Fettsäuren nicht mehr detektiert werden können (Graeve et al. 2014). Dies könnte, wie in vorherigen Arbeiten dargestellt, durch den Nutzen radioaktiv markierter Fettsäuren kompensiert werden oder durch eine Aufschlüsselung der Lipide per Chromatographie (Marcheselli et al. 1989; Bays et al. 2009; Cunnane et al. 2012). Diese Untersuchungen waren jedoch nicht mehr Teil der vorliegenden Dissertation.

Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) fungiert als Cofaktor für über 250 Redoxreaktionen. Seine Relevanz in den Reaktionswegen der Glykolyse und des Citratzyklus zeigen beispielhaft, dass  $\text{NAD}^+$  vor allem am katabolen Metabolismus beteiligt ist (Graeve et al. 2014). Unter physiologischen Bedingungen wird  $\text{NAD}^+$  im Zuge der Glykolyse und des Citratzyklus zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$  reduziert und über die Atmungskette reoxidiert, um die Protonen zum Aufbau des Gradienten zu nutzen, der schließlich zur Generierung von ATP benötigt wird. Im Rahmen dieser oxidativen Phosphorylierung wird außerdem Sauerstoff auf zwei Protonen übertragen und somit ein Wassermolekül als Nebenprodukt hervorgebracht. Folglich kommen dieser Mechanismus und gleichermaßen die ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung unter Hypoxie zum Erliegen. Als Konsequenz daraus kann  $\text{NADH}+\text{H}^+$  zumindest über diesen Weg nicht mehr reoxidiert werden, weshalb dies in Abwesenheit von Sauerstoff unter Bildung von Laktat aus Pyruvat geschieht. Mit zunehmender Akkumulation von Laktat als Konsequenz anhaltender Hypoxie hat auch diese Option ihre Limitierung (Back und Schüler 2004; Levine 2004; Brose et al. 2016).

Dieser Zustand findet sich in dieser Arbeit in dem Anstieg des Quotienten von  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  unter Hypoxie wieder und verdeutlicht, dass sich die Hypoxie mit simultaner Inhibition der Fettsäuresynthese negativ auf das zelluläre Redoxpotenzial auswirkt. Zwar konnte durch die vorliegende Arbeit ein ähnlicher Effekt in vivo nicht nachgewiesen werden, die Applikation von  $\text{NAD}^+$  nach transienter fokaler Ischämie konnte jedoch einer Untersuchung zu Folge zu einem besseren neurologischen Outcome führen (Ying et al. 2007), so dass sich vermuten lässt, dass der Erhalt

des Redoxpotenzials auch in vivo ein relevantes Ziel darstellt. Dies verläuft kongruent mit den Beobachtungen von Brose et al. (2016) und unterstreicht damit, dass das Potenzial zur Reoxidation von  $\text{NADH}+\text{H}^+$  unter Inhibition der Fettsäuresynthese zusätzlich eingeschränkt ist und somit die Fettsäuresynthese dazu beitragen kann, das zelluläre Redoxpotenzial unter Hypoxie zu erhalten.

Relevant wird dies z. B. für die sogenannten Sirtuine, einer Familie  $\text{NAD}^+$ -abhängiger Histondeacetylasen. Aus den sieben Unterformen ist vor allem das Sir1 im zentralen Nervensystem exprimiert (Perez-Pinzon und Koronowski 2015). Sirtuine beeinflussen Enzymstabilität, -lokalisierung und -aktivität, wodurch sie an Prozessen beteiligt sind, die sowohl zur Neuroprotektion als auch zum Zelltod beitragen (Khoury et al. 2018). Es wurde bereits untersucht, dass in Sir1-Knockout-Mäusen größere Infarktareale nach permanenter MCAO zu verzeichnen sind, während der Gewebeschaden durch eine Überexpression reduziert wird. Insgesamt kam es zu einer ausgeprägten Sir1-Expression im Perinfarktareal (Perez-Pinzon und Koronowski 2015). Eine weitere Untersuchung dieses Proteins könnte daher aufschlüsseln, ob und inwieweit dessen Expression nach MCAO durch eine Inhibition der Fettsäuresynthese tangiert wird.

Die phosphorylierte Form Nikotinamidadenindinukleotidphosphat ( $\text{NADP}$ ) stellt den zentralen Cofaktor in der Fettsäuresynthese dar und übernimmt dadurch eine relevante Rolle in einem anabolen Stoffwechselweg. Trotz der unterschiedlichen Funktionen von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  sind sie eng miteinander verknüpft, zumal  $\text{NAD}^+$  durch Phosphorylierung direkt zu  $\text{NADP}^+$  konvertiert werden kann (Xia et al. 2009). Ferner können extramitochondrial durch die zytosolische Malatdehydrogenase und das Malatenzym Protonen von  $\text{NADH}+\text{H}^+$  auf  $\text{NADP}^+$  übertragen werden. Wenn Citrat aus den Mitochondrien exportiert wird, kann ein Acetyl-Rest abgespalten werden, aus dem Acetyl-CoA gebildet wird, und es bleibt Oxalacetat. Dieses wird zu Malat reduziert, wozu es  $\text{NADH}+\text{H}^+$  bedarf. Malat kann nun zu Pyruvat oxidiert werden, wodurch  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  entsteht. In der Summe bedarf es  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , um  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  zu generieren, welches z. B. der Fettsäuresynthese zur Verfügung gestellt werden kann (Rassow 2006; Graeve et al. 2014).

Die Synthese von Phospholipiden, den Grundelementen der Zellmembran, zu denen z. B. Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) und Phosphatidylinositol-3,4,5- Trisphosphat ( $\text{PIP}_3$ ) zählen, spielen eine zentrale Rolle in inflammatorischen und pro-/antiapoptotischen Signalkaskaden. Der PI3K/Akt-Signalweg reguliert diverse zelluläre Prozesse, die unter anderem zelluläres Überleben, Proliferation, Metabolismus und Angiogenese betreffen (Ersahin et al. 2015; Zhang et al. 2018). Ausgangspunkt ist dabei die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), die  $\text{PIP}_2$  zu  $\text{PIP}_3$  konvertiert. Die im Zytosol lokalisierte Serin-/Threonin-Kinase Akt verfügt über eine n-terminale *Pleckstrin-homology*-Domäne, einer Bindungsstelle für

PIP3, dessen Bindung nicht nur zur Aktivierung von Akt führt sondern auch zur Translokation an die Zellmembran (Mullonkal und Toledo-Pereyra 2007; Lai et al. 2014; Ersahin et al. 2015; Zhang et al. 2018). Von dort reguliert Akt diverse nachgeschaltete Signalwege, unter anderem für die Proteine *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) und Bcl-2 zur Unterstützung des Zellüberlebens (Ersahin et al. 2015; He et al. 2018) und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) mit proapoptotischer Wirkung auf zellulären Stress (Lai et al. 2014).

Von einer Inhibition der Fettsäuresynthese ist konsekutiv die Generierung von Phospholipiden betroffen. Auf die ausbleibende Aktivierung von Akt durch fehlende Phospholipide folgte in Kolonkarzinomzellen die Aktivierung der Apoptose (Murata et al. 2010). Für Cerulenin konnte nachgewiesen werden, dass es die Phosphorylierung von Akt inhibiert (Jiang et al. 2012). Zusätzlich wurde dargestellt, dass Akt die Expression von Bcl-2 stimuliert (Unoki et al. 2016). Demnach dürfte diese Kaskade bei einer Inhibition der Fettsäuresynthase reduziert verlaufen respektive zum Erliegen kommen. Dies entspricht den Resultaten im Rahmen der Western Blots in der vorliegenden Arbeit, nach denen weder für Bcl-2 noch für Akt oder seine phosphorylierte Form Veränderungen oder gar Anstiege verzeichnet werden konnten.

Entgegen der antiapoptotischen Reaktion, die mit der Aktivierung von Bcl-2 einhergeht, beansprucht der Akt/JNK-Signalweg die Rolle der zellulären Stressreaktion mit einer proapoptotischen Wirkung für sich und führt zu einer Zellantwort auf Transkriptionsebene (Lai et al. 2014). Entsprechend wurde der Nachweis generiert, dass eine Inhibition dieses Signalwegs neuroprotektive Wirkung hat und zusätzlich vor den Folgen der Exzitotoxizität schützt (Dar et al. 2018). Wie Zhang et al. (2018) in ihren Untersuchungen dokumentiert haben, führt die Inkubation von humanen Leukämiezellen mit Cerulenin neben einer Inaktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs zu einer Aktivierung des ROCK1/Akt/JNK-Signalwegs und war folglich mit einer signifikant erhöhten Zelltodrate verbunden. Darauf basierend wäre eine Untersuchung dieses Signalwegs für die weitere Aufschlüsselung der Zellantwort von Neuronen auf Hypoxie von großem Interesse.

Der Beginn der Ischämie ist von einer ausgesprochenen Glutamatfreisetzung mit daraus resultierender Exzitotoxizität geprägt (siehe 1.2). Bereits in dieser Phase kommt es von Seiten postsynaptischer N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren über eine calciumabhängige Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrat 1 zur Bindung und Aktivierung von PI3K und in der Konsequenz zur Aktivierung von Akt (Lai et al. 2014). Dieses Ereignis markiert die hohe Relevanz des PI3K/Akt-Signalwegs für das Zellüberleben nach zerebraler Ischämie/Hypoxie. Entsprechend konnte bereits untersucht und dargestellt werden, dass die postischämische Inhibition dieses Signalwegs mit einem ausgeprägteren Zellschaden verbunden ist (Dar et al. 2018). Angesichts des dargestellten Kontexts zwischen Inhibition der Fettsäuresynthese und daraus folgender Inhibition des PI3K-Akt-Signalwegs ergibt sich daraus eine weitere

Interpretation für die Genese des sowohl in vitro als auch in vivo manifestierten Zellschadens.

Die Acetyl-CoA-Carboxylase liegt in zwei Isoformen im Cytosol vor, als Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$  und Acetyl-CoA-Carboxylase  $\beta$ . Während der Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$  die Schlüsselrolle in der Fettsäuresynthese zukommt, reguliert die  $\beta$ -Isoform die  $\beta$ -Oxidation. Durch seine Ähnlichkeit zu einer Fettsäure initiiert TOFA nach Konversion zu TOFyl-CoA eine endogene allosterische Inhibition der Acetyl-CoA-Carboxylase  $\alpha$  (Halvorson und McCune 1984; Wang et al. 2009; He et al. 2018). Wie hier dokumentiert werden konnte, kommt es in vitro, einhergehend mit vorherigen Arbeiten, bei kombinierter Inhibition der Fettsäuresynthese durch TOFA und Hypoxie zu einer signifikanten Steigerung der Zelltodrate (Brose et al. 2016). Wenn auch in dieser Studie nicht bestätigt, konnten andere Autoren bereits darlegen, dass durch die Applikation von TOFA der Quotient von NADH und NAD<sup>+</sup> ebenfalls in den Mitochondrien steigt (Panek et al. 1977). Darüber hinaus gibt es eine deutliche Inzidenz, dass auch die Apoptose über den PI3K/Akt-Signalweg induziert wird (Wang et al. 2009; He et al. 2018). Da beide Fettsäureinhibitoren TOFA und Cerulenin diesen Weg inhibieren, liegt nahe, dass zumindest die proapoptotische Wirkung auf die Fettsäureinhibition per se, denn auf Nebeneffekte der Inhibitoren zurückzuführen ist. Dies stellt ein weiteres Indiz für die Relevanz von Fettsäuren bei der Induktion der Apoptose bzw. für das Zellüberleben dar. Da für TOFA bislang weniger Interaktionen mit anderen Signalwegen als für Cerulenin bekannt sind, empfiehlt sich, auch diesen Inhibitor in weitere Untersuchungen in vivo zu inkludieren.

Eine der frühen inflammatorischen Reaktionen nach zerebraler Ischämie erfolgt durch die Aktivierung von Mikroglia, den Immunzellen des zentralen Nervensystems. Nach einer Transformation von ihrer ortsständigen, verzweigten Form in eine amöboide Form produzieren sie mit Einwanderung in das Infarktareal ihrerseits pro- und antiinflammatorische Mediatoren (Kawabori und Yenari 2015). Das Protein *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba-1) wird von aktivierter Mikroglia ausgeprägt exprimiert und stellt damit einen Marker für den Grad an zentralnervöser Inflammation dar. Entsprechend lassen sich im Schlaganfallmodell nach Reperfusion mehr Iba-1<sup>+</sup>-Zellen detektieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Surinkaew et al. 2018). Es wurde bereits untersucht, dass die Inhibition der Mikroglia zu einer Zunahme des Infarktolumens führt (Kawabori und Yenari 2015). Unter der Behandlung mit Cerulenin nach MCAO zeichnete sich immunhistochemisch eine Tendenz zu einem vermehrten Aufkommen von Iba-1<sup>+</sup>-Zellen ab. Der Aktivierung von Mikroglia und damit der inflammatorischen Antwort werden sowohl positive als auch negative Effekte zugeschrieben (Wang und Feuerstein 2004; Anttila et al. 2017). Diese lässt sich in eine akute, subakute und langfristige Phase unterteilen. Die akute Phase ist von der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine geprägt. Subakut



folgen Mikrogliazellen chemotaktisch sogenannten *danger-associated molecule patterns*, die von apoptotischen Zellen im Periinfarktareal sezerniert werden (Anttila et al. 2017). Langfristig trägt die Mikroglia nach neuronaler Schädigung zur Regeneration durch Unterstützung der neuronalen Plastizität bei, indem sie durch pro- und antiinflammatorische Aktivität die Neurogenese und Synaptogenese modifiziert. Dazu beleuchteten Untersuchungen einen supportiven Effekt der Proliferation und Integration von neuronalen Progenitorzellen durch Microglia (Sandvig et al. 2018).

Ergänzend zur Mikroglia fällt den Astrozyten eine zentrale Rolle in der inflammatorischen Antwort und ihrer Modulation zu. Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der Neuronen hinsichtlich ihrer nutritiven Versorgung bereits erläutert (siehe 1.3). Konsekutiv zu einer neuronalen Schädigung, wie z. B. im Rahmen von Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen oder dem Schlaganfall, exprimieren Astrozyten vermehrt das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), wobei der Grad der Expression den Grad der Schädigung widerspiegeln kann (Dong und Benveniste 2001). Wo aktivierte Astrozyten einwandern, synthetisieren sie neurotrophe Substanzen und bilden so die Grundlage für die spätere Glianarbe (Dong und Benveniste 2001; Kawabori und Yenari 2015). Das Ausmaß dieser reaktiven Gliose ist multifaktoriell und u. a. von der Größe der initialen Läsion, der inflammatorischen Antwort und der metabolischen Situation abhängig (Pekny und Nilsson 2005). In GFAP-Knockout-Mäusen konnte ein vergrößertes Infarktvolume mit reduziertem zerebralem Blutfluss und erhöhtem intrakraniellm Druck beschrieben werden (Panickar und Norenberg 2005). Analog zur Mikroglia zeichnete sich bei der Quantifizierung an GFAP<sup>+</sup>-Zellen eine Tendenz zu deren vermehrtem Vorkommen ab. Dies unterstützt die Beobachtung, dass Mikroglia und Astrozyten miteinander im Sinne einer gegenseitigen Aktivierung interagieren (Panickar und Norenberg 2005). Insgesamt lässt sich ableiten, dass die Inhibition der Fettsäuresynthese nach transienter Ischämie nicht mit einer Inhibition der Mikro- und Makroglia vergesellschaftet ist. Angesichts des beschriebenen sowohl positiven als auch negativen Effekts der Inflammation auf die neurologische Erholung bleibt zu diesem Zeitpunkt offen, ob diese tendenzielle Aktivierung der Mikro- und Makroglia zum Vorteil oder Nachteil des ischämischen Gehirnareals ist.

In der Zusammenschau lässt sich schlussfolgern, dass die Fettsäuresynthese einen relevanten Mechanismus zur Adaptation an hypoxische und ischämische Zustände in Neuronen darstellt. Ihre Inhibition führt nicht nur zu einem ausgeprägten Zellschaden bzw. Infarktvolume, sondern schränkt zudem die neurologische Erholung ein. Dabei beeinflusst sie neben dem Metabolismus der Neurone auch die Signalwege der Apoptose und Inflammation. Insbesondere bzgl. dieser nachgeschalteten Signalwege ergeben sich Themenfelder, die in weiteren Arbeiten noch zu beleuchten wären.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen des Schlaganfalls kommt es auf Zellebene zu einer Kaskade von Reaktionen, die in Inflammation und Apoptose mündet. Fettsäuren spielen eine Schlüsselrolle im Zellmetabolismus - sie können de novo aus Kohlenstoff generiert werden oder aus dem Blut dem Gehirn zur Verfügung gestellt werden. Nutritiv spielen Fettsäuren im zentralen Nervensystem nur eine untergeordnete Rolle, sie sind allerdings an der Regulierung von Inflammation und Apoptose beteiligt. Dadurch lässt sich mit der Regulierung der Fettsäuren eine mögliche Adaptationsreaktion von Neuronen an hypoxische Zustände vermuten. Diese Arbeit soll eben jenen Aspekt genauer beleuchten.

Methodisch stand dabei in vitro als Schlaganfallmodell die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen und primären Cortezellen mit kombiniertem Sauerstoff- und Glukoseentzug im Vordergrund, in vivo wurde per Fadenokklusionsmodell der Maus eine zerebrale Ischämie induziert. Zur Modulation der Fettsäuresynthese kamen die beiden Inhibitoren Cerulenin und *5-(Tetradecyloxy)-2-furoic acid* (TOFA) zum Einsatz.

Im Zuge dessen konnte zum ersten Mal dargestellt werden, dass die Inhibition der Fettsäuresynthese sowohl in vitro als auch in vivo mit einer Aggravation des akuten Zellschadens und einer Vergrößerung des Infarktolumens nach zerebraler Ischämie verbunden ist. Gleichzeitig wirkt sich die Inhibition der Fettsäuresynthese negativ auf die neurologische Erholung nach zerebraler Ischämie aus. Neben dem akuten Zellschaden wurden Stoffwechselmetabolite genauer untersucht. Zwar wurde keine Veränderung bei der Quantifizierung der freien Fettsäuren detektiert, jedoch schränkt die Inhibition der Fettsäuresynthese das Reduktionspotenzial ein, das seinerseits modulierend auf diverse metabolische Pfade einwirkt. Bei Betrachtung der postischämischen glialen und mikroglialen Reaktion im Sinne einer zentralen Entzündungsreaktion konnte eine Tendenz zu einer verstärkten Aktivierung dieser Zellen verzeichnet werden.

Insgesamt konnte damit aufgezeigt werden, dass die Fettsäuresynthese und deren Modulation eine wichtige Rolle bei der Adaptation an hypoxische/ischämische Zustände in Neuronen spielt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akhtar RS, Ness JM, Roth KA (2004): Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1644, 189–203
- Anttila JE, Whitaker KW, Wires ES, Harvey BK, Airavaara M (2017): Role of microglia in ischemic focal stroke and recovery: focus on Toll-like receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 79, 3–14
- Back T, Schüler OG: The natural course of lesion development in brain ischemia. In: Baethmann A, Eriskat J, Lehmborg J, Plesnila N (Hrsg.): Mechanisms of secondary brain damage from trauma and ischemia. Springer, Wien 2004, 55–61
- Bays NW, Hill AD, Kariv I (2009): A simplified scintillation proximity assay for fatty acid synthase activity: development and comparison with other FAS activity assays. *J Biomol Screen* 14, 636–642
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM (1986): Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17, 1304–1308
- Brose SA, Marquardt AL, Golovko MY (2014): Fatty acid biosynthesis from glutamate and glutamine is specifically induced in neuronal cells under hypoxia. *J Neurochem* 129, 400–412
- Brose SA, Golovko SA, Golovko MY (2016): Fatty acid biosynthesis inhibition increases reduction potential in neuronal cells under hypoxia. *Front Neurosci* 10, 546
- Cunnane SC, Schneider JA, Tangney C, Tremblay-Mercier J, Fortier M, Bennett DA, Morris MC (2012): Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 29 691–697
- Dar NJ, Satti NK, Dutt P, Hamid A, Ahmad M (2018): Attenuation of glutamate-induced excitotoxicity by withanolide-A in neuron-like cells: Role for PI3K/Akt/MAPK Signaling Pathway. *Mol Neurobiol* 55, 2725–2739
- Dhopeshwarkar GA, Mead JF (1969): Fatty acid uptake by the brain. *Biochim Biophys Acta, Lipids Lipid Metab* 187, 461–467

- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397
- Doepfner TR, El Aanbouri M, Dietz GPH, Weise J, Schwarting S, Bähr M (2010): Transplantation of TAT-Bcl-xL-transduced neural precursor cells: Long-term neuroprotection after stroke. *Neurobiol Dis* 40, 265–276
- Doepfner TR, Kaltwasser B, Bähr M, Hermann DM (2014a): Effects of neural progenitor cells on post-stroke neurological impairment - a detailed and comprehensive analysis of behavioral tests. *Front Cell Neurosci* 8, 338
- Doepfner TR, Kaltwasser B, Teli MK, Bretschneider E, Bähr M, Hermann DM (2014b): Effects of acute versus post-acute systemic delivery of neural progenitor cells on neurological recovery and brain remodeling after focal cerebral ischemia in mice. *Cell Death Dis* 5, e1386–e1386
- Doepfner TR, Doehring M, Kaltwasser B, Majid A, Lin F, Bähr M, Kilic E, Hermann DM (2017): Ischemic post-conditioning induces post-stroke neuroprotection via Hsp70-mediated proteasome inhibition and facilitates neural progenitor cell transplantation. *Mol Neurobiol* 54, 6061–6073
- Dong Y, Benveniste EN (2001): Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180–190
- Dunham NW, Miya TS (1957): A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 46, 208–209
- Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R (2015): The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst* 11, 1946–1954
- Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I (2015): Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism. *Int J Mol Sci* 16, 25959–25981
- Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K et al. (2008): Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res* 68, 1003–1011
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493–501
- Graeve L, Heinrich PC, Müller M (Hrsg.): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2014

- Halvorson DL, McCune SA (1984): Inhibition of fatty acid synthesis in isolated adipocytes by 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid. *Lipids* 19, 851–856
- He D, Sun X, Yang H, Li X, Yang D (2018): TOFA induces cell cycle arrest and apoptosis in ACHN and 786-O cells through inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. *J Cancer* 9, 2734–2742
- Jiang B, Li EH, Lu YY, Jiang Q, Cui D, Jing YF, Xia SJ (2012): Inhibition of fatty-acid synthase suppresses p-Akt and induces apoptosis in bladder cancer. *Urology* 80, 484.e9-484.e15
- Kariya T, Wille LJ (1978): Inhibition of fatty acid synthesis by RMI 14,514 (5-tetradecyloxy-2-furoic acid). *Biochem Biophys Res Commun* 80, 1022–1024
- Kawabori M, Yenari M (2015): Inflammatory responses in brain ischemia. *Curr Med Chem* 22, 1258–1277
- Khoury N, Koronowski KB, Young JI, Perez-Pinzon MA (2018): The NAD<sup>+</sup>-dependent family of sirtuins in cerebral ischemia and preconditioning. *Antioxid Redox Signal* 28, 691–710
- Kilic E, Dietz GPH, Hermann DM, Bähr M (2002): Intravenous TAT-Bcl-Xl is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. *Ann Neurol* 52, 617–622
- Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014): Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 115, 157–188
- Levine SR (2004): Pathophysiology and therapeutic targets for ischemic stroke. *Clin Cardiol* 27, 12–24
- Marcheselli VL, Scott BL, Reddy TS, Bazan NG: Quantitative analysis of acyl group composition of brain phospholipids, neutral lipids, and free fatty acids. In: Boulton AA, Baker GB, Horrocks LA (Hrsg.): *Lipids and Related Compounds*. Band 7; Humana Press, New Jersey 1989, 83–110
- Matsumae A, Kamio Y, Hata T (1963): Studies on cerulenin. I. Studies on cerulenin producing strain. *J Antibiot* 16, 236–238
- McCune SA, Harris RA (1979): Mechanism responsible for 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid inhibition of hepatic lipogenesis. *J Biol Chem* 254, 10095–10101
- Molavian HR, Kohandel M, Sivaloganathan S (2016): High concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> make aerobic glycolysis energetically more favorable for cellular respiration. *Front Physiol* 7, 362

- Muir KW, Tyrrell P, Sattar N, Warburton E (2007): Inflammation and ischaemic stroke. *Curr Opin Neurol* 20, 334–342
- Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH (2007): Akt in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 20, 195–203
- Murata S, Yanagisawa K, Fukunaga K, Oda T, Kobayashi A, Sasaki R, Ohkohchi N (2010): Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci* 101, 1861–1865
- Omura S (1976): The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol Rev* 40, 681–697
- Panek E, Cook GA, Cornell NW (1977): Inhibition by 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid of fatty acid and cholesterol synthesis in isolated rat hepatocytes. *Lipids* 12, 814–818
- Panickar KS, Norenberg MD (2005): Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. *Glia* 50, 287–298
- Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, Lyakhovich V (2014): Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *BioMed Res Int* 2014, 1–22
- Paumen MB, Ishida Y, Han H, Muramatsu M, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Honjo T (1997): Direct interaction of the mitochondrial membrane protein carnitine palmitoyltransferase I with Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 523–525
- Pekny M, Nilsson M (2005): Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427–434
- Perez-Pinzon M, Koronowski K (2015): Sirt1 in cerebral ischemia. *Brain Circ* 1, 69
- Rassow J (Hrsg.): *Biochemie: 50 Tabellen (Duale Reihe)*. Thieme, Stuttgart 2006
- Robert Koch-Institut (Hrsg.): *Gesundheit in Deutschland, Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis*. H. Heene-mann GmbH & Co.KG, Berlin 2015
- Sandvig I, Augestad IL, Håberg AK, Sandvig A (2018): Neuroplasticity in stroke recovery. The role of microglia in engaging and modifying synapses and networks. *Eur J Neurosci* 47, 1414–1428
- Schönfeld P, Reiser G (2013): Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? - reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1493–1499

- Schönfeld P, Reiser G (2017): Brain energy metabolism spurns fatty acids as fuel due to their inherent mitotoxicity and potential capacity to unleash neurodegeneration. *Neurochem Int* 109, 68–77
- Statistisches Bundesamt (Hrsg.): Statistisches Jahrbuch Deutschland 2018. Statistisches Bundesamt (Destatis), 2018
- Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH (2004): Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRX* 1, 17–25
- Surinkaew P, Sawaddiruk P, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2018): Role of microglia under cardiac and cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. *Metab Brain Dis* 33, 1019–1030
- Unoki T, Abiko Y, Toyama T, Uehara T, Tsuboi K, Nishida M, Kaji T, Kumagai Y (2016): Methylmercury, an environmental electrophile capable of activation and disruption of the Akt/CREB/Bcl-2 signal transduction pathway in SH-SY5Y cells. *Sci Rep* 6, 28944
- Wang C, Xu C, Sun M, Luo D, Liao D, Cao D (2009): Acetyl-CoA carboxylase-inhibitor TOFA induces human cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 385, 302–306
- Wang X, Feuerstein GZ: The Janus face of inflammation in ischemic brain injury. In: Baethmann A, Eriskat J, Lehmberg J, Plesnila N (Hrsg.): *Mechanisms of Secondary Brain Damage from Trauma and Ischemia*. Springer, Wien 2004, 49–54
- Xia W, Wang Z, Wang Q, Han J, Zhao C, Hong Y, Zeng L, Tang L, Ying W (2009): Roles of NAD / NADH and NADP<sup>+</sup> / NADPH in cell death. *Curr Pharm Des* 15, 12–19
- Ying W, Wei G, Wang D, Wang Q, Tang X, Shi J, Zhang P, Lu H (2007): Intranasal administration with NAD<sup>+</sup> profoundly decreases brain injury in a rat model of transient focal ischemia. *Front Biosci J Libr* 12, 2728–2734
- Zhang HR, Peng JH, Zhu GY, Xu RX (2015): Neuroprotective effects of Bcl-2 overexpression on nerve cells of rats with acute cerebral infarction. *Genet Mol Res* 14, 7696–7703
- Zhang Z, Yao L, Yang J, Wang Z, Du G (2018): PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). *Mol Med Rep* 18, 3547–3554

- 
- Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK (2003): Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity: Bcl-2 protects neurons in the infarct margin. *J Neurochem* 85, 1026–1036
- Zhao W, Kridel S, Thorburn A, Kooshki M, Little J, Hebbar S, Robbins M (2006): Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy. *Br J Cancer* 95, 869–878
- Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, Pinn ML, Ronnett GV, Kuhajda FP (2003): Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res* 63, 7330–7337



# Danksagung

Zuerst geht mein Dank an Univ.-Prof. Dr. med. Thorsten R. Döppner für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Seiner Offenheit, Neugierde und Begeisterungsfähigkeit verdanke ich die Möglichkeit, dass ich dieses Thema vorschlagen und verwirklichen konnte. Dabei hat er mir stetig mit neuen Impulsen, Ideen und Vorschlägen zur Seite gestanden. Danke für die Einladung in die Welt der experimentellen Forschung und den wissenschaftlichen Diskurs.

Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. Bozena Zechmeister, Irina Graf und Regine Kruse für die methodische Einarbeitung, Unterstützung bei fachlichen Fragen und Hilfsbereitschaft bedanken.

Nicht zuletzt danke ich den anderen Studenten/Doktoranden der Arbeitsgruppe Nivethini Sangarapillai, Xuan Zheng und Simone Lieschke für die anhaltende, gegenseitige Ermutigung, die persönlichen Gespräche und den wunderbaren Zusammenhalt.