Aus der Abteilung Molekulare Neurobiologie (Prof. Dr. rer. nat. Nils Brose) des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin

Untersuchung des Zusammenhangs zwischen SUMO2/3-Konjugaten und Zellstress in einem *In-vitro*-Modell

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Julius Marcus Klaus Eh ^{aus}

Hannover

Göttingen 2020

Dekan:

Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in	Prof. Dr. rer. nat. N. Brose
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. med. D. Katschinski

Prüfungskommission

Referent/in	Prof. Dr. rer. nat. N. Brose
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Dörthe Katschinski
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 13.01.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchung des Zusammenhangs zwischen SUMO2/3-Konjugaten und Zellstress in einem *in-vitro-*Modell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

In	naltsve	erzeichnis	I
AŁ	Abbildungsverzeichnis III		
Та	TabellenverzeichnisV		
AŁ	kürzu	ngsverzeichnis	VI
1	Einle	eitung	1
	1.1	Zerebrale Ischämie	1
	1.2	Small ubiquitin-like modifiers	2
	1.3	SUMO2/3 als neuroprotektive Faktoren	3
	1.4	SUMO2/3-KI-Mäuse	4
	1.5	Ischämie-Modelle in vivo bzw. in vitro	5
	1.6	Zellkultur	6
	1.7	Ziel dieser Arbeit	7
2	Mate	erialien und Methoden	8
	2.1	Tiere	8
	2.2	Geräte	8
	2.3	Computerprogramme	8
	2.4	Verbrauchsmaterialien	9
	2.5	Chemikalien	9
	2.6	Chemikalien für die Zellkultur	. 10
	2.7	Kits	. 10
	2.8	Antikörper	. 11
	2.9	Medien und Lösungen	. 11
	2.10	Hippocampus-Neuronen-Kultur	. 12
	2.11	Kortex-Neuronen-Kultur	. 13
	2.12	Нурохіе	. 13
	2.13	Oxygen glucose deprivation (OGD)	. 14
	2.14	Zell-Lyse	. 14
	2.15	Proteinkonzentrationsbestimmung	. 15
	2.16	Western Blot	. 15
	2.17	Statistische Auswertung	. 16
	2.18	Zell-Tod-Nachweis	. 17
3	Erge	ebnisse	. 19
	3.1 SUMC	Hypoxie führt in Hippocampus-Neuronen-Kulturen zu einer Verminderung der 02/3-Konjugate	. 19

1

	3.2	1 h Reoxygenierung führt zu keiner Veränderung der SUMO2/3-Konjugate im Vergleich zur reinen Hypoxie
	3.3	OGD führt zu einem Abfall der SUMO2/3-Konjugat-Level in Hippocampus- Neuronen-Kulturen
	3.4	SUMO2/3-Konjugate verhalten sich in Kortex-Neuronen-Kulturen fast identisch zu den Hippocampus-Neuronen-Kulturen
	3.5	E18-Kortex-Neuronen-Kulturen zeigten eine Abnahme der SUMO2/3-Konjugat- Intensitäten unter OGD-Stimulation
	3.6	Die SUMO3-Konjugate der SUMO3-HA-KI-Mäuse zeigen ein ähnliches Muster wie bei WT-Mäusen
	3.7	Die Zell-Mortalität in den Neuronen-Kulturen kann nicht den gesamten Abfall der SUMO2/3-Konjugate erklären
4	Disł	kussion
	4.1	Einführung
	4.2	Diskussion der in der SUMO2/3-Forschung verwendeten Methoden41
	4.2.	1 Die Heterogenität der verwendeten Zellkultursysteme
	4.2.	2 Die Variabilität der gewählten OGD- und Reoxygenierungszeiten und O ₂ - Konzentrationen42
	4.2.	3 Die unterschiedlichen OGD-Medien
	4.2.	4 Die verwendeten Antikörper variieren in ihrer Qualität und sind nicht universal verfügbar43
	4.2.	5 Überblick über die bisherigen Argumente43
	4.3	Diskussion veröffentlichter Studien zum Thema: SUMO2/3 nach OGD und Reoxygenierung
	4.4	Resümee der Diskussion
	4.5	Ausblick
5	Zus	ammenfassung47
6	Anh	ang48
7	Lite	raturverzeichnis61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Western Blots zu Normoxie, 4 h Hypoxie und 24 h Hypoxie (1% O₂) 20 Abbildung 2: Western Blots zu Normoxie, 1 h Hypoxie und 2 h Hypoxie (1% O₂) 21 Abbildung 3: Quantitative Auswertung der Western Blots von HIF1a und SUMO2/3 für Normoxie, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h Hypoxie 22 Abbildung 4: Western Blot zu Normoxie und 24 h Hypoxie (1% O₂) mit anschließend 1 h Reoxygenierung 23 Abbildung 5: Western Blot zu Normoxie und 4 h Hypoxie (1% O₂) mit anschließend 1 h Reoxygenierung 24 Abbildung 6: Quantitative Auswertung der Western Blots von SUMO2/3 für Normoxie 4 h und 24 h Hypoxie mit anschließend 1 h Reoxygenierung 25 Abbildung 7: Western Blot zu Normoxie und 4 h OGD (1% O₂) mit oder ohne anschließend 1 h Reoxygenierung von Hippocampus-Neuronen-Kulturen 27

Abbildung 8: Quantitative Auswertung der Western Blots von SUMO2/3 für Normoxie und 4 h OGD mit oder ohne anschließend 1 h Reoxygenierung von Hippocampus-Neuronen-Kulturen 28

Abbildung 9: Western Blot zu Normoxie und 4 h OGD (1% O2) mit oder ohne anschließend1 h Reoxygenierung von Kortex-Neuronen-Kulturen30

Abbildung 10: Quantitative Auswertung der Western Blots von SUMO2/3 für Normoxie und 4 h OGD mit oder ohne anschließend 1 h Reoxygenierung von Kortex-Neuronen-Kulturen 31

Abbildung 11: Western Blot zu Normoxie und 45 min OGD $(0,3\% O_2)$ mit anschließend 3 h Reoxygenierung von Hippocampus-Neuronen-Kulturen und Kortex-Neuronen-Kulturen 32

Abbildung 12: Quantitative Auswertung der Western Blots von SUMO2/3 für Normoxie und 45 min OGD mit anschließend 3 h Reoxygenierung von Hippocampus-Neuronen-Kulturen und Kortex-Neuronen-Kulturen 33

Abbildung 13: Western Blot zu Normoxie und 2,5 min OGD (0,3% O₂) mit anschließend 4,5 h Reoxygenierung von E18-Kortex-Neuronen-Kulturen 34

Abbildung 14: Western Blot zu Normoxie und 1 h, 2 h, 4 h Hypoxie (1% O₂) von His6-SUMO3-HA-KI-Hippocampus-Neuronen-Kulturen 35

Abbildung 15: Western Blot zu Normoxie und 24 h Hypoxie (1% O₂) mit und ohne 1 h Reoxygenierung von His6-SUMO3-HA-KI-Hippocampus-Neuronen-Kulturen 36

Abbildung 16: Western Blot zu Normoxie und 4 h OGD (1% O2) mit und ohne 1 hReoxygenierung von His6-SUMO3-HA-KI-Hippocampus-Neuronen-Kulturen37

Abbildung 17: Bilder von Hippocampus-Neuronen-Kulturen, die Normoxie und 4 h OGD mitund ohne 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden38

Abbildung 18: Quantitative Auswertung der Bilder von Hippocampus-Neuronen-Kulturen, die Normoxie und 4 h OGD mit und ohne 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden 39

Abbildung A1: Weitere Western Blots zu Normoxie, 1 h Hypoxie und 2 h Hypoxie (1% O₂) 48

Abbildung A2: Weitere Western Blots zu Normoxie, 4 h Hypoxie und 24 h Hypoxie (1% O₂) Kulturen vom 23.1.18 (oben) und 6.2.18 (unten). 49

Abbildung A4: Weitere Western Blots zu Normoxie und 24 h Hypoxie (1% O₂) mit anschließend 1 h Reoxygenierung Kulturen vom 2.5.18 (oben) und 3.5.18 (unten) 51

Abbildung A5: Weitere Western Blots zu Normoxie und 4 h OGD (1% O₂) mit oder ohne anschließend 1 h Reoxygenierung von Hippocampus-Neuronen-Kulturen Kulturen vom 14.6.18, 21.6.18, 28.6.18, 11.7.18 (von oben nach unten). 52

Abbildung A6: Weitere Western Blots zu Normoxie und 4 h OGD (1% O₂) mit oder ohne anschließend 1 h Reoxygenierung von Kortex-Neuronen-Kulturen Kulturen vom 20.8.18 (oben) und 22.8.18 (unten). 56

Abbildung A7: Weitere Western Blots zu Normoxie und 45 min OGD (0,3% O₂) mit anschließend 3 h Reoxygenierung von Kortex-Neuronen-Kulturen Kortikale-Kulturen vom 14.8.18 (oben) und 16.8.18 (unten). 58

Abbildung A8: Weitere Western Blots zu Normoxie und 45 min OGD (0,3% O₂) mit anschließend 3 h Reoxygenierung von Hippocampus-Neuronen-Kulturen Hippocampus-Kulturen vom 14.8.18 (oben), 15.8.18 (mitte) und 16.8.18 (unten) 58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: DNS-Labeling-Solution Pipettier-Schema	. 17
Tabelle 2: Antikörper-Lösung Pipettier-Schema	. 18

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle's medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DRP1	Dynamin-related protein 1
E16/ E18	Embryonaltag 16/18
ECL	Enhanced chemiluminescence
FBS	Fetal bovine serum
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HBSS	Hank's balanced salt solution
HeLa	Von einem Zervix-Karzinom abstammende Zelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
HIF1α	Hypoxia-inducible factor 1α
His6	Ein aus sechs Histidin-Aminosäuren bestehender Protein-tag
HSF1	Heat shock factor 1
KI	Knock-In
MCAO	Middle cerebral artery occlusion
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NEM	N-Ethylmaleimid
OGD	Oxygen glucose deprivation
P0 (P1/2)	Nullter bzw. erster/ zweiter Tag nach Geburt
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PTM	Posttranslationale Modifikation
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
SAE1/2	SUMO-activating enzyme 1/2
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SENP	SUMO-specific proteases
SH-SY5Y	Von Neuroblastom-Zellen abstammende Zelllinie
SUMO	Small ubiquitin-like modifiers
TdT	Terminale Desoxynukleodityl-Transferase

TIV Tage in vitro

Ubc9 Ubiquitin carrier protein 9

WT Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Zerebrale Ischämie

Schlaganfälle sind die zweithäufigste Todesursache weltweit (Murray und Lopez 1997) und der häufigste Auslöser für Behinderungen bei Erwachsenen. So sind etwa ein Drittel der Betroffenen, die länger als sechs Monate nach dem Schlaganfall noch leben, auf Hilfe Dritter angewiesen (Warlow 1998). Die durch die Erkrankung entstehenden Kosten sind weltweit für die Gesundheitssysteme eine Belastung, da sie 6% des gesamten Gesundheitsbudgets (USA) in Anspruch nehmen. In einer alternden Gesellschaft wie der unseren werden Schlaganfälle in Zukunft eine immer größere gesundheitliche und sozioökonomische Rolle spielen (Durukan und Tatlisumak 2007).

Pathologisch basieren 80% der Schlaganfälle auf einer Minderperfusion des Gehirns, welche zu einer zerebralen Ischämie führt (Durukan und Tatlisumak 2007). Die zerebrale Ischämie ist definiert als Blutfluss zum Gehirn, der nicht ausreicht, um dem metabolischen Bedarf an z. B. Sauerstoff und Nährstoffen des Gehirns gerecht zu werden. Daraus resultieren der Funktionsverlust und das Absterben der Neurone, Glia-Zellen etc. (Schreihofer 2015). Dabei reagiert das Gehirn besonders empfindlich auf eine Sauerstoff-Minderversorgung, weil es keine Speicherkapazität für Sauerstoff und gleichzeitig einen hohen Sauerstoffverbrauch hat. So hat das Gehirn nur einen Anteil von ca. 2% am Gesamtkörpergewicht, erhält aber 12% des Herzminutenvolumens (Zhou et al. 2016).

Ursächlich für den ischämischen Schlaganfall sind zumeist thrombotische oder embolische Verschlüsse einer der großen zerebralen Arterien oder ihrer Äste (Durukan und Tatlisumak 2007).

Auf molekularem Level führt die Ischämie zu einem Energie-Defizit der Zellen. Daraus resultieren eine Dysregulierung des intrazellulären Ionenhaushalts mit einem Einstrom von Calcium-Ionen über glutamatgesteuerte Ionenkanäle. Dies führt zur Bildung reaktiver Sauerstoff- (ROS) und Stickstoff-Spezies, mitochondrialem Versagen und der Aktivierung intrazellulärer Proteasen, Lipasen und Ribonucleasen, die zu einem schnellen Abbau der Zellstruktur-Elemente und einem Verlust der Zell-Integrität führen (Patel 2008; Schreihofer 2015; Anrather und Iadecola 2016).

Die Therapie der zerebralen Ischämie stützt sich auf zwei Hauptpfeiler: der schnellen Rekanalisation und der Neuroprotektion. Das meistverwendete Medikament zur Rekanalisation ist dabei Alteplase oder rt-PA. Dabei handelt es sich um einen gewebespezifischen Plasminogenaktivator, der den verstopfenden Thrombus auflösen soll. Eine weitere Möglichkeit der Rekanalisation stellt die endovaskuläre Revaskularisation dar, wobei der Thrombus mechanisch über einen Katheter entfernt wird (Durukan und Tatlisumak 2007).

Für die medikamentöse Induktion der Neuroprotektion gibt es mittlerweile mehrere gute Ansätze und klinische Studien, aber bislang hat noch kein Medikament den Durchbruch geschafft (Durukan und Tatlisumak 2007; Neuhaus et al. 2017).

Auch der Sumoylierung mit small ubiquitin-like modifiers (SUMO) 2/3 werden neuroprotektive Effekte zugeschrieben (siehe Einleitung 1.3). So ist ein langfristiges Ziel der SUMO2/3-Forschung über eine medikamentöse Manipulation der SUMO2/3-Konjugation eine Neuroprotektion bei Schlaganfall-Patienten zu bewirken und so möglicherweise zu einer Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten beizutragen.

1.2 Small ubiquitin-like modifiers

Die SUMO-Konjugation gehört zu den Posttranslationalen Modifikationen (PTM). Dabei wird ein Protein nach seiner Biosynthese kovalent und normalerweise enzymatisch modifiziert. Zu den PTMs zählen unter anderem Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung und eben Sumoylierung (Kessler und Edelmann 2011). Durch PTMs kann die funktionale Diversität des Proteoms noch weiter erhöht werden. So beeinflussen PTMs unter anderem die zelluläre Differenzierung, Protein-Degradation, Protein-Interaktionen und die Regulation der Gen-Expression (Silva et al. 2013).

Die Ahnlichkeit zwischen Ubiquitin und SUMO wird besonders deutlich im Konjugationsprozess. So werden für die Konjugation von SUMO an das Ziel-Protein genau wie bei Ubiquitin E1-, E2- und E3-Enzyme benötigt. Am Anfang des Zyklus steht eine spezifische proteolytische Spaltung von SUMO, um das Doppel-Glycin-Motif am C-Terminus freizulegen. Danach bindet SUMO Adenosin-Triphosphat(ATP)-abhängig mit dem freien Glycin an ein aktivierendes E1-Enzym. Im Anschluss wird SUMO auf das Konjugations-Enzym E2 transferiert und zusammen mit einer E3-Ligase wird SUMO an ein Lysin auf dem jeweiligen Ziel-Protein gebunden. Wie Ubiquitin können auch SUMO2/3 durch Multimerisierung Ketten formen (Vertegaal 2007). Im Unterschied zu Ubiquitin ist die Anzahl der beteiligten Enzym-Unterformen für SUMO aber sehr begrenzt. So gibt es nur ein E2-Enzym, das Ubiquitin carrier protein 9 (Ubc9) und wenige E3-Ligasen. Die Desumoylierung sowie die spezifische proteolytische Spaltung werden von SUMO-specific Proteases (SENP) übernommen. Das E1-Enzym besteht aus einem Heterodimer mit den Unterformen SAE1 und SAE2 (SUMO-activating enzyme 1/2) (Dohmen 2004; Yang et al. 2008a; Gareau und Lima 2010).

Die SUMO-Familie ist eine im Vergleich zu anderen Proteinen noch relativ unbekannte Gruppe an Proteinen. Es wird zwischen den drei Hauptformen SUMO1 und SUMO2/3 unterschieden, die in allen Geweben vorkommen. Dabei werden SUMO2/3 in der Regel in einer Unterfamilie zusammengefasst, weil sich beide Formen in ihrer Aminosäuresequenz zu 95% gleichen. Die Aminosäureseguenz von SUMO1 zeigt eine Homologie von 50% mit der von SUMO2/3 (Datwyler et al. 2011; Xiao et al. 2015). SUMO2/3 kommen in der Zelle häufiger vor als SUMO1 und werden besonders unter Zellstress, wie erhöhte Temperatur oder Ischämie, vermehrt an Ziel-Proteine gebunden (Dohmen 2004; Hendriks et al. 2015). Zu den bisher bekannten Ziel-Proteinen von SUMO zählen vor allem nukleäre Proteine, Transkriptionsfaktoren und Proteine, die für die Stabilität und Integrität des Genoms verantwortlich sind (Dohmen 2004; Yang et al. 2008a; Wang et al. 2013). Die SUMO-Konjugation ist dabei sehr dynamisch. Es kommt also zu einer sehr hochfrequenten Konjugation und Dekonjugation. Trotzdem scheint SUMO Einfluss auf das Langzeit-"Schicksal" der Ziel-Proteine zu haben (Hay 2005). Dabei kann SUMO sowohl reprimierende (Hay 2005; Yang et al. 2008a) als auch aktivierende Effekte, wie für den hypoxia-inducible factor 1a (HIF1a) und heat shock factor 1 (HSF1), ausüben (Abe et al. 1995; Bae et al. 2004; Carbia-Nagashima et al. 2007). Es zeigt sich also, dass SUMO durch seine Langzeitwirkung auf entscheidende Proteine einen starken Einfluss auf die Bestimmung der jeweiligen Zelle ausüben kann.

1.3 SUMO2/3 als neuroprotektive Faktoren

Diesen entscheidenden Einfluss auf die Bestimmung der Zelle kann man insbesondere auch bei Neuronen beobachten. So kann durch SUMO2/3 ein Absterben der Neurone unter Stress-Konditionen verhindert werden (Datwyler et al. 2011).

Die erste Idee, dass SUMO2/3 neuroprotektive Aktivität haben könnten, wurde von Lee et al. (2007) entwickelt. In ihrem Experiment wollten sie SUMO2/3 unter verschiedenen metabolischen Gesichtspunkten betrachten und nutzten dafür Erdhörnchen. Diesen wurde bei Aktivität und während des Winterschlafs das Gehirn entnommen und auf SUMO2/3 untersucht. Im Western Blot fiel auf, dass die Intensität der SUMO2/3-Konjugat-Banden in der Winterschlafphase im Vergleich zu aktiven Erdhörnchen erhöht waren. Im Winterschlaf werden die Körpertemperatur, der Blutfluss und die Proteinbiosynthese auf normalerweise lethale Level reduziert. Die Wissenschaftler vermuteten, dass die erhöhten SUMO2/3-Konjugate einen protektiven Effekt bewirken, der dazu beiträgt, dass die Tiere den Winterschlaf überhaupt tolerieren. Diese Vermutung wurde zusätzlich dadurch unterstützt, dass bei Überexpression von Ubc9 in Neuroblastom-SH-SY5Y-Zellen deren Toleranz gegenüber oxygen glucose deprivation (OGD) deutlich steigt, wohingegen es bei Expression einer dominant negativen Ubc9-Form zu einem ausgeprägten Zellsterben bei OGD kommt.

Einleitung

Dieser Veröffentlichung folgte eine beträchtliche Anzahl Versuche mit dem Ziel, die Ergebnisse von Lee et al. in anderen Organ- bzw. Kultursystemen zu reproduzieren. So konnte gezeigt werden, dass es auch in Plazentagewebe zu einem SUMO2/3-Konjugat-Anstieg kommen kann, wenn die Zellen Hypoxie ausgesetzt werden (Bhattacharjee et al. 2016; Baczyk et al. 2018). Dadurch konnte bewiesen werden, dass nicht nur in Neuronen bzw. Krebszellen SUMO2/3-Konjugate als Antwort auf Zellstress ansteigen. Außerdem wurde von Datwyler et al. (2011) ein Experiment durchgeführt, bei dem Kortikale-Neuronen-Kulturen am Tag 3 in vitro (TIV 3) mit Kontroll- oder SUMO2/3-micro-Ribonukleinsäure (SUMO2/3-knockdown) transfektiert wurden. Die SUMO2/3-knockdown Zellen hatten unter normalen Bedingungen die gleiche Überlebensrate wie die Kontroll-Zellen. Nach 45 min OGD kam es allerdings zu einem massiven Zellsterben in der knockdown-Kultur. Dagegen lag das Überleben der Zellen in der Kontroll-Kultur noch fast beim Ausgangswert. Dieses Ergebnis zeigt sehr deutlich, dass SUMO2/3 einen neuroprotektiven Effekt bei Zellstress hat, weil der knockdown von SUMO2/3 zu einem vielfach schlechteren Überleben der Neuronen-Kultur führt als in der Vergleichskultur. Es ist bislang noch unbekannt warum und wie SUMO2/3 diesen Effekt ausübt. Allerdings kann eine Korrelation des neuroprotektiven Effekts mit dem Anstieg der SUMO2/3-Konjugate nachgewiesen werden. Ein Ziel der SUMO2/3-Forschung ist es somit, durch ein besseres Verständnis des neuroprotektiven Effektes Medikamente zu entwickeln von dem Patienten mit zerebraler Ischämie eventuell profitieren (Li et al. 2017; Yang et al. 2008a).

1.4 SUMO2/3-KI-Mäuse

Eines der großen Probleme in der SUMO-Forschung ist der Mangel an verlässlichen Antikörpern sowohl bei SUMO1 als auch bei SUMO2/3. Das erschwert insbesondere die Identifikation von SUMO-Ziel-Proteinen (Tirard et al. 2012; Rossner und Tirard 2014). Um dieses Problem zu umgehen, wurden Knock-In-Mauslinien gezüchtet, deren SUMO1,2 oder 3 mit einem HA-tag bzw. V5-tag konjugiert sind (Tirard et al. 2012; Tirard und Brose 2016; Daniel et al. 2017). Durch Verwendung des HA-Tags kann SUMO mit anti-HA-Antikörpern nachgewiesen werden, die deutlich spezifischer sind als die konventionellen SUMO-Antikörper. Außerdem können SUMO2 und SUMO3 durch die einzelnen Tags zum ersten Mal einzeln betrachtet werden, da die konventionellen Antikörper zwischen SUMO2 und 3 nicht differenzieren können. Zusätzlich kann man bei Verwendung der SUMO-KI-Mäuse Wildtyp(WT)-Mäuse als negativ Kontrolle bzw. zur Darstellung des unspezifischen Hintergrunds einsetzen. Für die SUMO1-KI-Mäuse konnte dabei bereits gezeigt werden, dass die Expression von SUMO1 gleich der in WT-Mäusen ist (Tirard et al. 2012; Tirard und Brose 2016). Um diesen Effekt auch bei den SUMO2/3-KI-Mäusen darzustellen, beschäftigt sich ein Teil dieser Arbeit auch damit die SUMO2/3-KI-Mäuse mit den WT-Mäusen anhand des Konjugationsverhaltens von SUMO2/3 zu vergleichen.

1.5 Ischämie-Modelle in vivo bzw. in vitro

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, um die oben beschriebene zerebrale Ischämie zu simulieren. Die führenden Ischämie-Modelle in der SUMO2/3-Forschung sind Hypoxie und vor allem OGD für *in-vitro*-Experimente sowie middle cerebral artery occlusion (MCAO) für *in-vivo*-Versuche. In Hypoxie-Experimenten *in vitro* werden Zellkulturen in ihrem Medium in eine Hypoxiekammer gesetzt werden. In dieser Kammer herrscht eine Atmosphäre mit einem Sauerstoffanteil von 1% und weniger. Bei OGD werden die Kulturen auch für eine gewisse Zeit in der Hypoxiekammer inkubiert. Zusätzlich wird direkt vor der Inkubation in der Hypoxiekammer das normale Medium gegen eine Glukose-freie Lösung ausgetauscht, die Ionen in physiologischer Konzentration enthält (Bruer et al. 1997; Scorziello et al. 2001; Zhao et al. 2014). Durch Transfer der Kulturen aus der Hypoxiekammer in einen normalen Inkubator und zusätzlich bei OGD durch Ersatz des OGD-Mediums mit einem Glukosehaltigen Medium können die Kulturen reoxygeniert werden (Yang et al. 2012; Zhou et al. 2013).

MCAO ist eine *in-vivo*-Technik, bei der die Arteriae Carotis von anästhesierten Tieren freigelegt und okkludiert werden. Nach einer gewissen Zeit werden die Karotiden wieder deokkludiert und der ischämische Bereich des Gehirns wird dadurch reperfundiert. Nach definierter Reperfusions-Zeit werden die Mäuse erneut anästhesiert und durch Dekapitation euthanasiert (Sheng et al. 2000).

Bei Exposition gegen Hypoxie zeigen vor allem Plazenta-Zellen einen Anstieg von SUMO2/3 im Nukleus (Bhattacharjee et al. 2016; Baczyk et al. 2018). In HeLa-Zellkultur wurde im Gegensatz dazu keine Veränderung der SUMO2/3-Konjugate nachgewiesen. Dafür stieg die SUMO1-Expression besonders nach 24h Hypoxie stark an (Kunz et al. 2016).

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den OGD-Ergebnissen bei Kortikalen-Neuronen-Kulturen. Dort wurde nach OGD und Reoxygenierung ein Anstieg der SUMO2/3-Konjugate gefunden, aber keine Veränderung in der SUMO1-Expression (Loftus et al. 2009; Datwyler et al. 2011; Li et al. 2017). Zusätzlich konnte noch bewiesen werden, dass es auch in hippocampalen Neuronen-Kulturen bei OGD zu einem Anstieg der SUMO2/3-Konjugate kommt (Cimarosti et al. 2012). Dadurch ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem SUMO2/3-Konjugat-Anstieg um ein Ereignis handelt, das nicht auf eine bestimmte Gehirn-Region beschränkt ist. Auf der anderen Seite liegen Studien vor, in denen nach OGD und Reoxygenierung kein Anstieg in den SUMO2/3-Konjugaten feststellen werden konnte (Lee et al. 2009). Daraus ergibt sich eine Datenlage für *in-vitro*-Experimente, die abhängig vom gewählten Zellsystem und den benutzten Methoden heterogen ist.

Bei MCAO sind die Ergebnisse homogener. Schon nach 10 min Ischämie mit anschließender Reperfusion kommt es zu signifikanten SUMO2/3-Konjugat-Anstiegen (Yang et al. 2008b; Wang et al. 2013). Bei MCAO ohne Reperfusion findet dagegen keine vermehrte Konjugation von SUMO2/3 statt (Cimarosti et al. 2008).

Der SUMO2/3-Anstieg scheint also in den reactive oxygen species (ROS) begründet zu sein, die vor allem bei Reoxygenierung bzw. Reperfusion durch das plötzliche Sauerstoff-Überangebot entstehen. Niedrige ROS-Konzentrationen induzieren die Bildung von Sulfonsäure-Gruppen Diese können Disulfid-Bindungen mit E1-Enzymen und Ubc9 eingehen und zu einer Inhibition der SUMO-Konjugation und dadurch zu einer schnellen Reduktion der SUMO2/3-Konjugate führen (Bossis und Melchior 2006). Dagegen scheinen hohe ROS-Konzentrationen eher die SENP1 durch Disulfid-Bindungen zu inhibieren. Deshalb kommt es zu einer Hemmung der SUMO-Dekonjugation und einem Anstieg der SUMO2/3-Konjugate (Xu et al. 2007).

1.6 Zellkultur

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, die für diese Untersuchungen nötigen primären Zellkulturen herzustellen. So ist es möglich aus Material verschiedener Hirnregionen z. B. dem Hippocampus oder dem Kortex Neuronen-Kulturen anzuziehen. Für die Nutzung von Hippocampus-Neuronen-Kulturen spricht neben der relativ leichten Präparation auch der Fakt, dass hippocampale Kulturen seit 20 Jahren etabliert sind. Außerdem ist die Neuronen-Population im Hippocampus sehr homogen. So besteht der Hippocampus an Embryonaltag 17 zu 90% aus Pyramidenneuronen. Somit werden Hippocampus-Kulturen im späten Embryonalstadium angefertigt, wenn die Generierung der Pyramidenneurone abgeschlossen ist, aber die Proliferation der Körnerzellen des Gyrus dentatus erst beginnt. Andere Protokolle arbeiten mit neonatalen bzw. adulten Hippocampi, weil man bei der neonatalen Präparation nicht die Mutter euthanasieren muss (Kaech und Banker 2006; Hermey et al. 2010). Da die Zahl der Muttertiere der SUMO2/3-KI-Mäuse begrenzt war, wurden in diesem Projekt auch neonatale Tiere zur Kulturanfertigung verwendet. Aus Gründen der Übertragbarkeit galt dies sowohl für SUMO2/3-KI-Tiere als auch für die WT-Tiere.

Ein Nachteil der Kortex-Neuronen-Kultur ist, dass sie im Vergleich zur Hippocampus-Kultur eindeutig heterogener ist. Neben Pyramidenneuronen besteht der Kortex aus Körnerzellen und mehr Gliazellen als der Hippocampus. Der Vorteil einer kortikalen Kultur liegt darin, dass man bei der Präparation des Kortex pro Gehirn mehr Material bzw. Neurone erhält als bei einer Hippocampus-Präparation. Dadurch ist es möglich, Kulturen mit höherer Zelldichte anzufertigen, was sich langfristig positiv auf das Überleben der Neurone auswirkt.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es die Korrelation zwischen Zellstress und den SUMO2/3-Konjugaten in einem *in-vitro*-Modell genauer zu beleuchten. Das langfristige Ziel ist es, ein Modell zu etablieren, bei dem es zu einem konstanten Anstieg der SUMO2/3-Konjugate in WT-Kulturen kommt. Dieses Modell soll letztendlich auf SUMO2/3-KI-Kulturen übertragen werden. Mithilfe des Modells sollen dann die SUMO-Substrate bei OGD aufgereinigt und identifiziert werden, um mögliche pathogene oder protektive Mechanismen von SUMO aufzudecken.

2 Materialien und Methoden

2.1 Tiere

Die verwendeten Mäuse stammten aus der Zucht am MPI für experimentelle Medizin. Bei den Wildtyp-Mäusen handelt es sich um C57Black6N-Mäuse. Die HA-SUMO2-KI-Mäuse sind eine Kreuzung aus C57Black6N- und FVB/N-Mäusen.

2.2 Geräte

ApoTome	Zeiss GmbH, Jena
Chemostar ECL & Fluorescence Imager	INTAS Science Imaging Instruments
	GmbH, Göttingen
CO₂-Inkubator CB150	Binder GmbH, Tuttlingen
Filmentwickcler Curix 60	Agfa-Gevaert GmbH, Martsel (Belgien)
INVIVO2 400	Biotrace I.B.U., Bridgend (UK)
Mini PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cell	
Reinluftwerkbank Heraguard™ ECO	Thermo Electron LED GmbH,
	Langenselbold
Sicherheitswerkbank Herasafe™ KS 18	Thermo Electron LED GmbH,
	Langenselbold
pH-Meter	Knick, Schütt GmbH, Göttingen
Sonoplus HD 2200 Ultraschall-Homogenisator	BANDELIN electronic GmbH & Co.KG,
	Berlin
Spectrafuge Mini	Labnet International Inc.
Sterilwerkbänke	
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
X-Cell II™ Blot Module	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
X-Cell SureLock™ Mini-Cell	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

2.3 Computerprogramme

AxioVision	Zeiss GmbH, Jena
Excel	Microsoft, Seattle (USA)
ImageJ	National Institute of Health, Bethesda
	(USA)

2.4 Verbrauchsmaterialien

24 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Amersham Hyperfilm [™] ECL	GE Healthcare UK Limited,
	Buckinghamshire (UK)
Amersham Protran [™] 0,2µm NC	GE Healthcare UK Limited,
	Buckinghamshire (UK)
Corning® cell strainer 40µm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Deckgläser Ø 12mm	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG,
	Braunschweig
Greiner Cellstar® dish Ø 60mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Millex®-GP 33mm Filter Unit	Merck Millipore Ltd., Tullagreen (Irland)
NuPAGE [™] 3-8% Tris-Acetate Protein Gels,	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
1.0 mm, 12-well	
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.5 mm,	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
10-well	
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Superfrost® Plus Objektträger	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG,
	Braunschweig
Whatman 3MM Chr	Whatman International Ltd, Maidstone
	(UK)
2.5 Chemikalien	
Amersham ECL [™] Western Blotting Detection	GE Healthcare UK Limited,
Reagents	Buckinghamshire (UK)
Ammonium-Persulfat	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Dimethylsulfoxid Glycine

Leupeptin

N-Ethylmaleimide

Phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF)

Pierce[™] ECL Western Blotting Substrate

GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire (UK) Fisher Scientific GmbH, Schwerte Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München AppliChem GmbH, Darmstadt Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Pierce™ Reversible Protein Stain Kit for	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
ProtoGel	Scientific Laboratory Supplies Ltd,
	Nottingham
Nitrocellulose Membranes	GE Healthcare UK Limited,
	Buckinghamshire (UK)
TEMED	SERVA Electrophoresis GmbH,
	Heidelberg
Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München

2.6 Chemikalien für die Zellkultur

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
B-27 [™] Plus Supplement (50x)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
(D)PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
GlutaMAX (100x)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
-ethansulfonsäure)	
Neurobasal [™] -A Medium	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Papain	Worthington Biochemical Corporation
	Lakewood (USA)
Penicillin-Streptomycin (10.000U/ml)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München

2.7 Kits

In situ BrdU-Red DNAF Fragmentation (TUNEL)	Abcam plc., Cambridge (UK)
Assay Kit	
BCA (Bicinchoninsäure)-kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

2.8 Antikörper

Cell Signaling Technolog Europe B.V,	
Frankfurt am Main	
Bio-Techne Ltd, Abington (UK)	
Abcam plc., Cambridge (UK)	
BioLegend GmbH, Koblenz	
Bio-Rad Laboratories GmbH,	
Düsseldorf	
Bio-Rad Laboratories GmbH,	
Düsseldorf	
Bio-Rad Laboratories GmbH,	
Düsseldorf	

2.9 Medien und Lösungen

(Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben auf wässrige Lösungen, die unter Verwendung von vollentsalztem Wasser hergestellt wurden).

Laemmli-Puffer (3x)	6% SDS (10% w/v), 30% Glycerol,
	180mM Tris-HCI (1M pH 6,8), 0,03%
	w/v Bromphenolblau
Lyse-Puffer	150mM NaCl; 20mM Tris pH 7,6; 1%
	Triton-X-100
Modifiziertes DMEM-Medium	5ml FBS; 0,5ml Penicillin/
	Streptomycin; 50mM GlutaMAX auf
	45ml DMEM
Neurobasal-A-Medium	1x B27; 50mM GlutaMAX; 0,25ml
	Penicillin/ Streptomycin auf 50ml
	Neurobasal-A
NuPAGE® MOPS SDS Lauf Puffer (20x)	50mM MOPS; 50mM Trizma® base;
	0,1% SDS; 1mM EDTA; pH 7,7
NuPAGE® Tris-Acetate SDS Lauf Puffer (20x)	50mM Tricine; 50mM Trizma® base;
	0,1% SDS; pH 8,24
OGD-Medium	(1x)116mM NaCl; 5,4mM KCl; 0,8mM
	MgSO ₄ ; 1mM NaH ₂ PO ₄ ; 26,2mM
	NaHCO ₃ ; 1,8mM CaCl ₂ ; 0,33mM
	Glycine; 10mM HEPES
OGD-Kontroll-Medium (1x)	116mM NaCl; 5,4mM KCl; 0,8mM
	MgSO ₄ ; 1mM NaH ₂ PO ₄ ; 26,2mM

	NaHCO3; 1,8mM CaCl2; 0,33mM
	Glycine; 10mM HEPES; 20mM Glukose
Paraformaldehyd (PFA)	4% PFA in 1x PBS; pH 7,4
PBS (1x)	150mM NaCl; 8mM Na ₂ HPO ₄ ; 3mM
	KCl; 2mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBS-T (1x)	150mM NaCl; 8mM Na₂HPO₄; 3mM
	KCl; 2mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4; 0,05%
	Tween® 20
SDS-PAGE Lauf-Puffer (1x)	384mM Glycin; 50mM Trizma® base;
(für selbst gegossene Gele)	2%SDS
SDS-Probenpuffer (1x)	50mM Tris pH 6,8; 2% SDS; 0,1%
	Bromphenolblau; 10% Glycerol;
	100mM DTT
Transfer-Puffer (1x)	192mM Glycine; 25mM Trizma® base;
	20% Methanol

2.10 Hippocampus-Neuronen-Kultur

Die Hippocampus-Neuronen wurden wie zuvor beschrieben präpariert (Bekkers und Stevens 1991; Rosenmund und Stevens 1996). Die präparierten Mäuse-Hippocampi wurden in 500 µl Papain-Lösung bei 37 °C für 45 min inkubiert. Die Papain-Reaktion wurde durch 15 min Inkubation in STOP-Lösung abgebrochen. Nach Waschen mit 1 ml Medium fand die Vereinzelung der Neurone durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in 100 µl Medium statt. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt und der Überstand in ein Eppendorf-Gefäß mit 500 µl Neurobasal-A Medium gegeben. Eine Behandlung der Petrischalen bzw. 24-Loch-Platten (mit Glas-Coverslip) mit Poly-L-Lysin für 1 h bei 37 °C stellte das optimale Anwachsen der Kulturen sicher. Die Eppendorf-Gefäße mit den vereinzelten Zellen wurden zusammen mit Petri-Schalen/24- Loch-Platten zum Institut für Physiologie und Biochemie gebracht. Für den Transfer wurde eine Plastik-Box benutzt, die vor dem Transport mit 70% Ethanol besprüht und 30 min mit UV-Licht bestrahlt worden war. Nach der UV-Licht-Behandlung erfolgte die Öffnung der Box nur noch unter sterilen Abzügen. Im physiologischen Institut wurden 5 ml Neurobasal-A-Medium in die Petri-Schalen gegeben und die 700 µl Zellsuspension gleichmäßig darauf verteilt.

2.11 Kortex-Neuronen-Kultur

Die Kortizes wurden nach ihrer Entnahme zusammen in eine 10 ml HBSS-Lösung aufgenommen. Nach dreimaligem Waschen mit HBSS wurden 5-10 ml Trypsin-Lösung zur Zellsuspension gegeben und es wurde bei 37 °C für 15 min inkubiert. Darauf folgten erneut vier Waschschritte mit HBSS. Um die Zellen zu vereinzeln, wurde die Suspension mit einer 1 ml Eppendorf-Pipette 20-mal sowie einer Gauge 20 und 24 Kanüle jeweils dreimal bzw. sechsmal auf- und abpipettiert. Nach jeder Vereinzelung der Zellen erfolgte eine Auftragung des Überstands auf ein 40 µm Zellsieb (Corning® cellstrainer). Mit modifiziertem 37 °C warmen DMEM-Medium wurde nach jedem Auftragen sowohl das Sieb gewaschen als auch der Überstand wieder aufgefüllt. Im Anschluss an das Vereinzeln wurde über das Sieb so viel modifiziertes 37 °C warmes DMEM-Medium gegeben, bis die gewünschte Menge erreicht war. Zum Beispiel strebte man bei sechs Kortizes ein Zielvolumen von 30 ml an, da daraus sechs Petri-Schalen mit jeweils 5 ml Medium bescheidet werden können. Die Zellsuspension und die mit Poly-L-Lysin vorbehandelten Petri-Schalen wurden in der sterilen Plastik-Box zum physiologischen Institut gebracht und dort ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde das DMEM-Medium abgesaugt und nach zwei Waschschritten gegen Neurobasal-A-Medium ausgetauscht. Bei gleichzeitiger Kultivierung von Hippocampus- und Kortex-Neuronen-Kulturen erfolgte die Behandlung der hippocampalen Kulturen nach dem Schema der Kortex-Neuronen-Kultur.

2.12 Hypoxie

An TIV 14 fand der Transfer der Kulturen in die Hypoxie-Kammer statt. Dort wurden sie unterschiedlich lange bei 1% O₂ inkubiert. Für einige der Kulturen erfolgte nach der Hypoxie noch eine Reoxygenierung. Dafür wurden die Kulturen für 1 h in einem Inkubator bei 37 °C Normoxie inkubiert. Nach der Inkubation folgte die Lyse der Zellen in der Hypoxie-Kammer bzw. unter dem normoxischen Abzug. Kontroll-Kulturen wurden ebenfalls an TIV 14 lysiert. Um zu überprüfen, ob die Hypoxie erfolgreich war, wurden neben den SUMO2/3-Western Blots auch Western Blots für HIF1α angefertigt. HIF1α ist das kritische Protein für die Zellantwort auf hypoxische Umwelteinflüsse. Unter physiologischen Bedingungen wird HIF1α von Sauerstoff-abhängig hydroxyliert. Diese Markierung führt dazu, dass HIF1α mithilfe des Von-Hippel-Lindau-Proteins ubiquitiniert wird. Die Ubiquitinierung führt dann letztendlich zum Abbau im Proteasom. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es aber durch die Sauerstoff-Abnahme zu einer Aktivitätsreduktion der Sauerstoff-sensitiven Hydroxylasen. Dadurch wird HIF1α weniger hydroxyliert und subsequent auch weniger ubiquitiniert und abgebaut. Die Stabilisierung von HIF1α ermöglicht dessen Translokation in den Nukleus und die Induktion verschiedener Gene, die essentiell für die Adaption an

hypoxische Bedingungen sind (Nguyen et al. 2013). HIF1α ist deshalb unter physiologischen Bedingungen in der Zelle kaum nachweisbar. Bei Hypoxie steigt die Konzentration jedoch messbar an. Das macht HIF1α zu einem optimalen Kontroll-Faktor für Experimente unter hypoxischen Rahmenbedingungen.

2.13 Oxygen glucose deprivation (OGD)

Oxygen glucose deprivation ist die gängigste Methode, um Ischämie *in vitro* zu simulieren. Um die OGD zu induzieren, wurde ein Salzpuffer ohne Glucose auf die Zellen gegeben. Das Medium der Kulturen, die im Anschluss an die OGD noch reoxygeniert werden sollten, wurde im Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Nach zwei Waschschritten mit dem OGD-Medium folgte der Transfer der Kulturen in die Hypoxie-Kammer. Dort wurde der Waschpuffer abgesaugt und durch in der Kammer über Nacht äquilibriertes OGD-Medium ersetzt. Das Gasgemisch in der Hypoxie-Kammer bestand zu 5% aus CO₂, zu 94% aus N₂ und, wenn nicht anders aufgeführt, zu 1% O₂. Die Kontroll-Kulturen wurden zweimal mit Kontroll-OGD-Medium (mit 20 mM Glukose) gewaschen und anschließend in OGD-Kontroll-Medium bei 37 °C bis zur Lyse inkubiert (Bruer et al. 1997).

Um zu überprüfen, ob die OGD erfolgreich abgelaufen ist, wurde Dynamin-related protein 1 (DRP1) als Kontrollprotein eingesetzt. DRP1 eignet sich sehr gut als Kontrollprotein, weil auf dem Western Blot das DRP1-Level im Vergleich zu normoxischen Verhältnissen sowohl bei OGD als auch bei Reoxygenierung abnimmt (Wappler et al. 2013).

DRP1 spielt bei der mitochondrialen Spaltung eine entscheidende Rolle. Es befindet sich zum größten Teil im Zytoplasma, kann aber spezifisch an die äußere Mitochondrienmembran rekrutiert werden. Dort formt es durch Oligomerisierung einen Spaltungs-Komplex, der GTP-abhängig eine Konstriktion der mitochondrialen Membran auslöst. Im Anschluss wird der Spaltungskomplex aufgelöst und DRP1 kehrt ins Zytoplasma zurück (Otera et al. 2013). Mitochondrien sind sehr dynamische Zellorganellen, die ständig einen Zyklus aus Fusion und Spaltung durchlaufen. Für die Zellhomöostase ist es wichtig, dass Fusion und Spaltung im Gleichgewicht liegen (Anderson und Blackstone 2013).

2.14Zell-Lyse

Die Zell-Lyse wurde wie zuvor bereits beschrieben durchgeführt (Daniel et al. 2017). Zu 1 ml Lyse-Puffer wurden jeweils die Protease-Inhibitoren PMSF (0,1 mmol/l), Leupeptin (0,001 mmol/l) und Aprotinin (0,015 mmol/l) zugefügt. Zusätzlich wurden unmittelbar vor der Lyse-Puffer-Applikation auf die Neuronen-Kultur 20 µl einer 1 M N-Ethyl-Maleimid(NEM)-Lösung zum Lyse-Puffer addiert. NEM ist ein Cystein-Proteasen-Hemmer, der zusammen mit den anderen Protease-Hemmern verhindern soll, dass nach der ZellLyse SUMO2/3 dekonjugiert wird. Nach dem Absaugen des Mediums folgte ein Waschschritt mit PBS. Danach wurde die Kultur mit 200 µl Lyse-Puffer + NEM behandelt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben. Am Max-Planck-Institut erfolgte die Behandlung der Zell-Lysate mit Ultraschall, um Desoxyribonukleinsäure(DNS)-Netze aufzulösen. Anschließend wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.15 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Proben erfolgte mithilfe des BCA-Kit der Firma Pierce. Zu 200 µl BCA-Reagenz wurden 4 oder 8 µl Probe in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Für den Proteinstandard wurden 0-12 µl BSA (1g/l) zum BCA-Reagenz pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 60 °C erfolgte die Analyse der Platte im Thermomax microplate reader bei 570 nm. Anhand der Eichgeraden des Proteinstandards konnte die Konzentration der einzelnen Proben ermittelt werden (Pierce[™] BCA Protein Assay Kit).

2.16 Western Blot

Zur Größenauftrennung der Lysat-Proteine erfolgte eine denaturierte, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Towbin et al. 1979). Die Proben wurden so vorbereitet, dass sie mindestens 10 µg Protein und Laemmli-Puffer in einfacher Konzentration enthielten. Zur Auftrennung von HIF1α und DRP1 wurden selbst gegossene Gele verwendet. Dagegen wurden für die Auftrennung von SUMO2/3 bzw. SUMO2/3-tag vorgefertigte NuPAGE[™]-Gele bevorzugt. Die selbstgegossenen Gele liefen bei 25 mA pro Gel und nicht mehr als 200 V für etwa eine Stunde. Die NuPAGE[™]-Gele wurden nach Herstellerangaben behandelt. Im Anschluss folgte der Transfer der Proteine mittels Elektro-Blot in einer Tankblotkammer bei 80 mA und nicht mehr als 200 V für 16 Stunden auf einer Nitrocellulose-Membran.

Für quantitative Analysen wurde die Membran mit Pierce memcode gefärbt. Die gefärbte Membran wurde mit einem EPSON-Scanner eingescannt und das Bild wurde auf dem PC mit ImageJ ausgewertet. Um die gemessenen Banden zu quantifizieren, wurde der Quotient aus der Signalintensität für z. B. SUMO2/3 durch die Intensität aus der memcode-Färbung gebildet. Anschließend wurde der Quotient von einer Kontrolle (z. B. Normoxie 1) gleich eins bzw. gleich 100% gesetzt und die Quotienten der restlichen Proben wurden ins Verhältnis zu diesem Kontrollwert gesetzt. Somit stellten sich die restlichen Werte als prozentuale Darstellung um den Kontrollwert dar. Um die memcode-Färbung zu entfernen, wurde der Pierce stain eraser benutzt. Die Blockierung der Membran erfolgte mit einer 5%-

Instant-Magermilchpulver-Lösung (in PBS-T (PBS + 0,1%Tween)) für 45 min bei Raumtemperatur.

Die Auswahl des Primär-Antikörpers hing von der jeweiligen Fragestellung ab. Der Primär-Antikörper wurde im entsprechenden Verhältnis (z. B. 1:2000) in 5%-Milch gelöst und die Membran wurde in 15 ml über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach mehrmaligem Waschen in 5%-Magermilchpulver-Lösung wurde die Membran eine Stunde mit Sekundär-Antikörper inkubiert. Der Sekundär-Antikörper wurde entsprechend des Primär-Antikörpers ausgewählt. Zum Beispiel war der Sekundär-Antikörper für SUMO2/3-Färbung ein Anti-Maus-Antikörper von der Ziege, während es sich beim Sekundär-Antikörper für HIF1α um einen Anti-Kaninchen-Antikörper von der Ziege handelte. Nach erneutem Waschen in 5%-Milch, PBS-T und PBS wurden die zwei Komponenten des Enhanced Chemiluminesence (ECL) Kits im 1:1 Verhältnis auf die Membran gegeben. Nach einer Minute Inkubation konnten die Membranen zur Detektion der Chemilumineszenz in das INTAS-System oder auf einen Amersham Hyperfilm transferiert werden. Der Sekundär-Antikörper war mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol (einem Bestandteil des ECL-Kits). In der oxidierten Form emittiert Luminol Licht, welches vom INTAS-System bzw. vom Hyperfilm detektiert werden kann.

Die bei den jeweiligen Methoden entstandenen Bilder wurden mit ImageJ ausgewertet.

2.17 Statistische Auswertung

Auf den entstandenen Bildern wurden die Intensitäten der für das jeweilige Protein relevanten Banden mit ImageJ quantifiziert. Ebenfalls erfolgte für die jeweiligen Proben eine Quantifizierung der Farbintensität, bei den mit memcode gefärbten Bildern. Der Wert für die Intensität der Protein-Bande wurde dann durch den Wert der korrespondierenden memcode-Intensität dividiert. Dadurch kann die Intensität der Protein-Bande ins Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe gesetzt werden. Die dabei produzierten Werte wurden gegen einen Normoxie-Wert aus der jeweiligen Testreihe normalisiert. Aus den normalisierten Werten erfolgte die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen. Bei mehreren Experimenten einer Versuchsreihe wurden aus den Mittelwerten der einzelnen Experimente ein Mittelwert der Versuchsreihe, sowie eine Standardabweichung der Versuchsreihe bestimmt. Die Signifikanz konnte dann aus den Mittelwerten und Standardabweichungen der Versuchsreihe ermittelt werden.

2.18 Zell-Tod-Nachweis

Mit der Bestimmung der Mortalität in den Neuronen-Kulturen wurde untersucht, ob Veränderungen im SUMO2/3-Expressionsverhalten auf eine Änderung in der SUMO2/3-Aktivität oder auf eine verminderte Zellzahl zurückzuführen sind. Dafür wurde das "In situ BrdU-Red Fragmentation (TUNEL) Assay Kit" von abcam benutzt. Dieses Kit verwendet die Terminale Desoxynukleodityl-Transferase (TdT). Diese kann freie 3'OH-Enden der DNS ohne Matrize verlängern. Bei absterbenden bzw. apoptotischen Zellen liegen durch die Fragmentierung der DNS mehr freie DNS-Enden vor, so dass die TdT mehr Enden verlängern kann. Neben den normalen Nukleotiden enthält das Kit noch Br-dUTP, welches von der TdT an die freien DNS enden angebaut wird. Dieses Br-dUTP lässt sich von dem ebenfalls enthaltenem BrdU-Red-Antikörper detektieren. Dieser ist mit einem roten Fluorochrom markiert, welches mit Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert werden kann. Je mehr Fluoreszenz detektiert werden kann, desto mehr freie DNS-Enden liegen vor in die Br-dUTP eingebaut werden kann und desto mehr Zellen befinden sich in Apoptose.

Das verwendete Protokoll war angelehnt an das Protokoll von abcam, da das Protokoll von abcam sich auf Gewebe-Schnitte bezieht und nicht auf Coverslips, beschichtet mit dissoziierten Zellen.

Die Neuronen wurden wie oben beschrieben in 24-Loch-Platten auf Coverslips kultiviert. Nach 14 Tagen im Inkubator wurden die Kulturen unterschiedlich lange Hypoxie und OGD ausgesetzt.

Zur Fixierung wurde 4%-Paraformaldehyd verwendet. Danach konnten die Zellen durch 0,25% Triton[®] X-100 permeabilisiert werden. Nach drei Waschschritten erfolgte die Inkubation der Coverslips mit DNS-Labeling-Solution für eine Stunde bei 37 °C.

Komponente	1 Test (µl)
TdT Reaktionspuffer	10
TdT Enzym	0,75
Br-dUTP	8
ddH ₂ O	34,25
Gesamtvolumen	53

Tabelle 1: DNS-Labeling-Solution Pipettier-Schema

Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Coverslips mit 100 µl Antikörper-Lösung für 1 h im Dunkeln inkubiert.

Komponente	1 Test (µl)
Anti-BrdU-Red Antikörper	5
Waschpuffer	95
DAPI	0,5

Tabelle 2: Antikörper-Lösung Pipettier-Schema

Nach erneutem Waschen wurden die Coverslips auf Glas-Objektträgern mit mountingmedium gegeben. Abschließend konnten die mithilfe des ApoTome generierten Bilder in ImageJ ausgezählt werden (TUNEL Assay Kit (ab66110) | Abcam).

3 Ergebnisse

3.1 Hypoxie führt in Hippocampus-Neuronen-Kulturen zu einer Verminderung der SUMO2/3-Konjugate

In der ersten Versuchsreihe erfolgte eine Exposition der Hippocampus-Neuronen-Kulturen gegen 4 h und 24 h Hypoxie (1% O₂). Als Kontrolle dienten Hippocampus-Neuronen-Kulturen, die am selben Tag kultiviert und ohne hypoxische Exposition lysiert wurden. Bei den SUMO2/3-Western Blots wird der hochmolekulare Schmier ab 130 kDa analysiert. Dort laufen die SUMO2/3-Konjugate. Anhand der Intensität dieses Schmiers kann ausgewertet werden, ob die SUMO2/3-Konjugation steigt oder sinkt im Verhältnis zur Kontrolle. Die Auswertung der Western Blots (siehe Abb. 1) zeigte, dass nach 4 h Hypoxie die Intensität der SUMO2/3-Konjugat-Banden fast auf dem gleichen Level wie bei der Kontrolle waren (4 h Hypoxie 1,24±0,43; Kontrolle 1,27±0,51). Im Gegensatz dazu war die Intensität der SUMO2/3-Konjugat-Banden nach 24 h Hypoxie mit 0,33±0,07 signifikant vermindert (siehe Abb. 3).

Um beweisen zu können, dass die Hypoxie funktioniert hat, wurde für jede Kultur ein Western Blot gegen HIF1 α durchgeführt. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, steigt HIF1 α spezifisch an, wenn die Zelle hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wird. Die HIF1 α -Intensität betrug bei Normoxie 1,01±0,29. Wie erwartet, stieg nach 4 h Hypoxie die Intensität der HIF1 α -Bande auf 4,43±2,37 an und nach 24 h Hypoxie betrug sie 3,12±2,38 (siehe Abb. 3). Dieser signifikante Anstieg der HIF1 α -Intensität legt nahe, dass sich die verwendete Methode sehr gut eignet, um Zellen der Hypoxie auszusetzen.



Abbildung 1: Western Blots zu Normoxie, 4 h Hypoxie und 24 h Hypoxie (1% O2)

Kultur vom 31.1.2018. Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. A: SUMO2/3 Western Blot von Kontroll- bzw. Normoxie-, 4 h und 24 h Hypoxie-Kulturen. Der für SUMO2/3 typische hochmolekulare Schmier (über 130 kDa) ist sichtbar. In dieser Fraktion laufen die mit SUMO2/3 konjugierten Proteine. SUMO2/3 selbst läuft bei etwa 16 kDa und ist hier nicht abgebildet. Zwischen 4 h Hypoxie und Normoxie ist optisch kaum ein Unterschied in der Intensität der Banden feststellbar, während nach 24 h Hypoxie fast keine SUMO2/3-konjugierten Proteine im Western Blot zu finden sind. Expositionszeit des ECL-Hyperfilms war 40 min.

B: memcode des in A abgebildeten SUMO2/3-Blots.

C: HIF1α-Blot; Es wird deutlich, dass die Intensität der HIF1α-Bande nach 4 h Hypoxie deutlich ansteigt und nach 24 h Hypoxie immer noch erhöht ist. Expositionszeit des ECL-Hyperfilms betrug 5 min. D: Die zum HIF1α-Blot zugehörige memcode-Färbung.

In der vorhandenen Literatur wird von teilweise massiven SUMO2/3-Konjugat-Anstiegen nach MCAO (middle cerebral artery occlusion) berichtet (Cimarosti et al. 2008; Yang et al. 2008b; Wang et al. 2013). In diesem Experiment war die Intensität der SUMO2/3-Konjugat-Banden nach Hypoxie gleich oder signifikant verringert. Daraus ergab sich die Frage, ob der Anstieg der Konjugate möglicherweise bei einer Hypoxie-Exposition von weniger als 4h zu finden ist, sodass das Maximum der SUMO2/3-Expression nach 4h schon überschritten war.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Testreihe mit kultivierten Hippocampus-Neuronen, die 1 h und 2 h Hypoxie (1% O₂) durchgeführt. Die Kontrollen durch Normoxie und HIF1α-Blots wurden dabei analog zum vorigen Experiment durchgeführt.

Durch die Blots (siehe Abb. 2) zeigt sich deutlich, dass auch nach 1 h oder 2 h Hypoxie keine signifikante Änderung der SUMO2/3-Konjugate auftritt. Auffällig war die stärkere Streuung der Werte nach 1 h Hypoxie mit 0,87±0,58 und 2 h Hypoxie mit 0,95±0,6 im Vergleich zur Normoxie- Kontrolle mit 0,99±0,1 (siehe Abb. 3). Allerdings war die

Standardabweichung in der ersten Versuchsreihe mit 0,43 und 0,51 bei 4 h Hypoxie bzw. Normoxie in einem vergleichbaren Bereich. Die Western Blots (siehe Abb. 2) für HIF1 α zeigten für 1 h Hypoxie wie auch für 2 h Hypoxie einen signifikanten Anstieg der spezifischen Bande (Normoxie 1,26±0,22; 1 h Hypoxie 4,64±1,15; 2 h Hypoxie 12,26±8,95, siehe Abb. 3).



Abbildung 2: Western Blots zu Normoxie, 1 h Hypoxie und 2 h Hypoxie (1% O2)

Kultur vom 27.3.2018. Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. A: SUMO2/3 Western Blot von Kontroll- bzw. Normoxie-, 1 h und 2 h Hypoxie-Kulturen. Zwischen den unterschiedlichen Konditionen lässt sich bei Betrachtung der SUMO2/3-Konjugate mit dem Auge kaum ein Unterschied feststellen. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager war 40 min.

B: memcode des in A abgebildeten SUMO2/3-Blots.

C: HIF1α-Blot; Es wird deutlich, dass die Intensität der HIF1α-Bande nach 1 h und 2 h Hypoxie im Vergleich zu den normoxischen Kulturen erhöht ist. Expositionszeit des ECL-Hyperfilms betrug 10 min.

D: Die zum HIF1a-Blot zugehörige memcode-Färbung.

Ergebnisse



Abbildung 3: Quantitative Auswertung der Western Blots von HIF1α und SUMO2/3 für Normoxie, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h Hypoxie

Quantifizierung der Western-Blot-Banden mit ImageJ. Normalisierung der Banden gegen memcode und gegen eine Kontroll-Probe. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. A: Graphische Darstellung der quantifizierten SUMO2/3-Konjugat-Banden. Es wird deutlich, dass der Unterschied zwischen Normoxie und 1 h, 2 h, 4 h Hypoxie nur minimal ist. Nach 24 h Hypoxie kommt es zu einer signifikanten Reduktion des SUMO2/3-Konjugat-Signals im Vergleich zu Normoxie (p=0,0178). B/C: Graphische Darstellung der quantifizierten HIF1α-Banden. Man sieht deutlich, dass die HIF1α-Expression bis 2 h Hypoxie ansteigt und danach etwas absinkt, aber weiterhin im Vergleich zu Normoxie signifikant erhöht ist (1 h Hypoxie p=0,0001; 2 h Hypoxie p=0,0186; 4 h Hypoxie p=0,0010; 24 h Hypoxie p=0,0335). Die Graphiken für 1 h, 2 h Hypoxie und 4 h, 24 h Hypoxie sind nicht zusammengefasst, weil die jeweiligen Blots unterschiedlich lange auf den ECL-Hyperfilmen exponiert wurden. Normoxie N=6; 1 h Hypoxie N=3; 2 h Hypoxie N=3; 4 h Hypoxie N=2; 24 h Hypoxie N=3

Aus diesen Ergebnissen konnte man schließen, dass nach 1 h, 2 h und 4 h Hypoxie die Intensitäten der SUMO2/3-Konjugat-Banden ungefähr auf demselben Level wie bei Normoxie waren. Außerdem führte eine lange Exposition gegen Hypoxie (24 h) zu einem fast kompletten Verschwinden der SUMO2/3-Konjugate. Daraus ergab sich die Fragestellung, welche weiteren Methoden es gibt, um den Zellstress zu erhöhen und einen Anstieg der SUMO2/3-Konjugate zu produzieren. Als nächster Schritt erfolgte deshalb die Reoxygenierung der Zellen im Anschluss an die Hypoxie.

3.2 1 h Reoxygenierung führt zu keiner Veränderung der SUMO2/3-Konjugate im Vergleich zur reinen Hypoxie

Für das Experiment wurden Hippocampus-Neuronen-Kulturen angefertigt und an TIV 14 4 h oder 24 h lang der Hypoxie ausgesetzt. Im Anschluss daran erfolgte die Reoxygenierung der Kulturen im normoxischen Inkubator für eine Stunde. Die Frage bestand darin, ob 1 h Reoxygenierung nach 24 h Hypoxie die SUMO2/3-Konjugat-Intensität im Vergleich zu 24 h Hypoxie ohne Reoxygenierung verändert und ob 1 h Reoxygenierung nach 4 h Hypoxie zu einem Anstieg der SUMO2/3-Konjugat-Intensität führt im Vergleich zur Kontrolle.

Die Western Blots für 24 h Hypoxie mit 1 h Reoxygenierung (siehe Abb. 4) zeigten, dass sich die Intensität der SUMO2/3-Konjugate im Vergleich zu 24 h Hypoxie ohne Reoxygenierung kaum änderten. Die Intensität der Banden bei 24 h Hypoxie + 1 h Reoxygenierung lag bei 0,26±0,11 und die Intensität der Banden von 24 h Hypoxie ohne Reoxygenierung bei 0,33±0,07 (siehe Abb. 6).



Abbildung 4: Western Blot zu Normoxie und 24 h Hypoxie (1% O₂) mit anschließend 1 h Reoxygenierung

Kultur vom 9.5.18. Die Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. A: SUMO2/3 Western Blot von Normoxie bzw. Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 24 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Die Abnahme in der Intensität der SUMO2/3-Konjugate wird mit dem Auge ersichtlich. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min. B: Zum SUMO2/3-Blot zugehöriger memcode.

Die SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten nach 4 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung unterschieden sich ebenfalls nicht wesentlich von den Intensitäten der Kontroll-Kulturen (siehe Abb. 5). Nach der Quantifizierung ergab sich für die SUMO2/3-Konjugat-Banden nach 4 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung 0,83±0,02. Die Werte bei der Normoxie-Kultur lagen bei 0,98±0,02 (siehe Abb. 6).



Abbildung 5: Western Blot zu Normoxie und 4 h Hypoxie (1% O₂) mit anschließend 1 h Reoxygenierung

Kultur vom 24.5.18. Die Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt.

A: SUMO2/3 Western Blot von Normoxie bzw. Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 4 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es ist keine Änderung der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten zwischen den zwei Konditionen erkennbar. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min. B: Zum SUMO2/3-Blot zugehöriger memcode.





Quantifizierung der Western-Blot-Banden mit ImageJ. Normalisierung der Banden gegen memcode und gegen eine Kontroll-Probe. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. A: Graphische Darstellung der quantifizierten SUMO2/3-Konjugat-Banden für 24 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung. Die Graphik zeigt, dass auch nach 24 h Hypoxie mit 1 h Reoxygenierung eine signifikante Abnahme in der Intensität der SUMO2/3-Konjugate im Vergleich zu Normoxie besteht (p=0,0009). B: Graphische Darstellung der quantifizierten SUMO2/3-Banden für 4 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung. Anhand der Graphik lässt sich feststellen, dass eine Verminderung der SUMO2/3-Konjugat-Intensität nach 4 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung vorliegt. Allerdings handelte es sich bei dem Versuch um ein Pilot-Experiment. Deshalb ist N=1 und es kann kein endgültiges Ergebnis abgeleitet werden. A: Normoxie N=3; 24 h Hypoxie + 1 h Reoxygenierung N=3; B: Normoxie N=1; 4 h Hypoxie + 1 h Reoxygenierung N=1.

Aus den vorliegenden Daten zeigt sich, dass Reoxygenierung nach Hypoxie im Vergleich zu Hypoxie ohne Reoxygenierung zu keiner Veränderung der SUMO2/3-Konjugate führt. Die einmalige Exposition der Kulturen gegen 4 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung war ein Pilot-Versuch, um festzustellen, ob Reoxygenierung nach Hypoxie nicht möglicherweise doch zu einem Anstieg der SUMO2/3-Konjugate führt. Da die Ergebnisse allerdings zeigten, dass sich die SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten zwischen 4 h Hypoxie mit 1 h Reoxygenierung und der Kontrolle nicht wesentlich unterschieden, wurde das Stress-Paradigma für die Neurone erneut geändert.

Für die nachfolgenden Experimente wurde statt Hypoxie die oxygen glucose deprivation (OGD) durchgeführt. OGD ist das beste verfügbare *in-vitro*-Modell zur Simulation von Ischämie.

3.3 OGD führt zu einem Abfall der SUMO2/3-Konjugat-Level in Hippocampus-Neuronen-Kulturen

Bei den ersten Experimenten mit OGD wurden die Kulturen 4 h lang in der Hypoxie-Kammer in Glukose-freiem Medium inkubiert. Ein Teil der Kulturen wurde direkt danach lysiert, während der andere Teil noch eine Stunde reoxygeniert wurde. Somit waren die Zeiten identisch zu den Hypoxie Experimenten mit 4 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung. Diese Zeiteinheiten wurden so gewählt, weil nach 4 h Hypoxie bzw. 4 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung von allen Hypoxie Experimenten die höchsten Intensitäten der SUMO2/3-Konjugat-Banden gemessen werden konnten. Deshalb wurde im Vorfeld erwartet, dass die Intensitäten der SUMO2/3-Konjugat-Banden mindestens auf dem Niveau der Hypoxie-Kulturen wären. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein signifikanter Abfall in den SUMO2/3-Konjugat-Banden (siehe Abb. 7). Die normoxischen Kontroll-Banden besaßen im Durchschnitt eine Intensität von 0,89±0,12, während nach 4 h OGD die Intensität auf 0,27±0,12 fiel und nach einer Stunde Reoxygenierung bei 0,29±0,12 stagnierte (siehe Abb. 8).

Im Vergleich mit den Hypoxie Kulturen (4 h Hypoxie 1,24±0,43; 4 h Hypoxie + 1 h Reoxygenierung 0,83±0,02) wurde deutlich, dass die SUMO2/3-Konjugat-Intensität anscheinend durch OGD verringert wird und durch Hypoxie ungefähr auf Normoxie-Niveau bleibt.

Als Nachweis der OGD wurden Western Blots für DRP1 angefertigt (siehe Abb. 7). DRP1 ist ein Molekül, das im Zusammenhang mit Mitochondrien-Fragmentierung steht und dessen Konzentration in der Zelle bei OGD-Exposition abnimmt. Wie erwartet nahm das DRP1-Level unter 4 h OGD (0,54±0,20) ab. Unter 4 h OGD und 1 h Reoxygenierung war das DRP1-Level noch weiter auf 0,25±0,22 verringert. Das DRP1-Level bei den normoxischen Kontroll-Kulturen lag bei 0,93±0,28 (siehe Abb. 8). Aus diesen Daten ließ sich ableiten, dass die OGD scheinbar funktioniert hat.




Kultur vom 13.6.18. Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. Die DRP1-Proben wurden im SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C erhitzt.

A: SUMO2/3 Western Blot von Normoxie bzw. Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 4 h OGD oder 4 h OGD und 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es ist eine eindeutige Abnahme der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten zwischen der Kontrolle und 4 h OGD bzw. 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung erkennbar.

Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min.

B: Zum SUMO2/3-Blot zugehöriger memcode.

C: Zum oberen Western Blot gehöriger DRP1-Blot. Besonders bei 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung wird die DRP1-Abnahme deutlich.

D: Zum DRP1-Blot zugehöriger memcode





Quantifizierung der Western-Blot-Banden mit ImageJ. Normalisierung der Banden gegen memcode und gegen eine Kontroll-Probe. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

A: Graphische Darstellung der quantifizierten SUMO2/3-Konjugat-Banden für 4 h OGD und 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung. Die Graphik zeigt, dass durch 4 h OGD die Intensität der SUMO2/3-Konjugat-Banden im Vergleich zu Normoxie signifikant abnimmt (p<0,0001). Nach Reoxygenierung kommt es zu einem leichten Anstieg der Konjugate im Vergleich zu 4 h OGD, welcher allerdings keine statistische Signifikanz hat (p=0,784). Im Vergleich zur Normoxie ist die Intensität der SUMO2/3-Konjugat-Banden nach 4 h OGD und 1 h Reoxygenierung ebenfalls signifikant reduziert (p<0,0001).

B: Graphische Darstellung der quantifizierten DRP1-Banden für 4 h OGD und 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung. Es zeigt sich die erwartete signifikante Abnahme der DRP1-Intensitäten nach 4 h OGD (p=0,0255). Nach 4 h OGD und 1 h Reoxygenierung ist die DRP1-Intensität im Vergleich zur Normoxie noch weiter vermindert (p=0,0206).

Kontrolle N=5; 4 h OGD N=5; 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung N=5.

3.4 SUMO2/3-Konjugate verhalten sich in Kortex-Neuronen-Kulturen fast identisch zu den Hippocampus-Neuronen-Kulturen

Bisher wurden alle Experimente mit Hippocampus-Neuronen-Kulturen durchgeführt. Da die meisten anderen Forschungsgruppen den SUMO2/3-Anstieg in Kortex-Kulturen nachweisen konnten, bestand der nächste Schritt darin, ebenfalls Versuche an Kortex-Kulturen durchzuführen. Zum einen wurden Kortex-Neuronen-Kulturen 4 h OGD und 1 h Reoxygenierung ausgesetzt, um diese mit den Hippocampus-Neuronen-Kulturen vergleichen zu können. In einer weiteren Versuchsreihe wurden von Mäusen sowohl Kortex als auch Hippocampus entnommen, in unterschiedlichen Kulturen angezüchtet und am selben Tag OGD mit oder ohne Reoxygenierung ausgesetzt und lysiert. Da Material von den gleichen Mäusen am selben Tag verwendet wurde, besteht bei dieser Versuchsreihe ein optimaler Vergleich zwischen Hippocampus- und Kortex-Neuronen-Kulturen.

Auch bei Kortex-Neuronen-Kulturen führten 4 h OGD mit oder ohne Reoxygenierung zu einer signifikanten Reduktion der SUMO2/3-Konjugat-Level (siehe Abb. 9). Die quantifizierten Werte der entsprechenden Banden waren dabei für die normoxische Kontrolle 0,92±0,01, nach 4 h OGD fiel die Intensität auf 0,65±0,06 und nach Reoxygenierung stagnierte die Intensität auf einem Level von 0,72±0,05 (siehe Abb. 10). Es zeigte sich, dass das Verhalten der SUMO2/3-Konjugate in der Kortex-Neuronen-Kultur ähnlich dem in der Hippocampus-Neuronen-Kultur ist (Kontrolle: 0,89±0,12; 4 h OGD: 0,27±0,12; 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung: 0,29±0,12). Allerdings sanken die SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten der Hippocampus-Neuronen-Kultur deutlich stärker ab als bei der Kortex-Neuronen-Kultur. Das DRP1-Signal der entsprechenden Kulturen war zu schwach, um es sinnvoll quantifizieren zu können.



Abbildung 9: Western Blot zu Normoxie und 4 h OGD (1% O₂) mit oder ohne anschließend 1 h Reoxygenierung von Kortex-Neuronen-Kulturen

Kultur vom 21.8.18. Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt.
A: SUMO2/3 Western Blot von Normoxie bzw. Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 4 h OGD oder 4 h OGD und 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es ist ein eine diskrete Abnahme der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten zwischen der Kontrolle und 4 h OGD bzw. 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung erkennbar.
Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min.
B: Zum SUMO2/3-Blot zugehöriger memcode.



Abbildung 10: Quantitative Auswertung der Western Blots von SUMO2/3 für Normoxie und 4 h OGD mit oder ohne anschließend 1 h Reoxygenierung von Kortex-Neuronen-Kulturen

Quantifizierung der Western-Blot-Banden mit ImageJ. Normalisierung der Banden gegen memcode und gegen eine Kontroll-Probe. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Graphische Darstellung der quantifizierten SUMO2/3-Konjugat-Banden für 4 h OGD und 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung. Die Graphik zeigt, dass durch 4 h OGD die Intensität der SUMO2/3-Konjugat-Banden im Vergleich zu Normoxie signifikant abnimmt (p=0,0033). Nach Reoxygenierung kommt es zu einem leichten Anstieg der Konjugate, welcher allerdings keine statistische Signifikanz hat (p=0,2383). Im Vergleich zur Normoxie ist die Intensität der SUMO2/3-Konjugat-Banden nach 4 h OGD und 1 h Reoxygenierung ebenfalls signifikant reduziert (p=0,0043).

Kontrolle N=3; 4 h OGD N=3; 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung N=3.

In der zweiten Versuchsreihe wurden Kulturen aus Hippocampi und Kortizes derselben Mäuse angefertigt. Die Kulturen wurden am TIV 14 45 min OGD bei 0,3% O2 und 3 h Reoxygenierung ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigten für beide Kulturen einen leichten, nicht signifikanten Anstieg der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten (siehe Abb. 11). So stieg in der Hippocampus-Neuronen-Kultur die quantifizierte Intensität von 1,01±0,12 in der Kontrolle auf 1,10±0,25 bei Exposition gegen 45 min OGD und 3 h Reoxygenierung. In der Kortex-Neuronen-Kultur lagen die Werte für die Kontrolle bei 0,95±0,1 und bei 45 min OGD und 3 h Reoxygenierung befanden sie sich auf einem Level von 1,04±0,36 (siehe Abb. 12). Bei der Evaluation der DRP1-Intensitäten wurde deutlich, dass sowohl für die Hippocampus-, als auch die Kortex-Neuronen-Kultur eine signifikante Abnahme der DRP1-Intensitäten vorliegt. Bei der hippocampalen Kultur sank die DRP1-Intensität von 0,76±0,04 in der Kontrolle auf 0,49±0,01 nach 45 min OGD und 3 h Reoxygenierung. Die Kortex-Neuronen-Kultur zeigte eine Abnahme der DRP1-Intensität von 0,89±0,01 (Kontrolle) auf 0,52±0,01 (45 min OGD und 3 h Reoxygenierung) (siehe Abb. 12). Daraus lässt sich schließen, dass in dieser Versuchsreihe die OGD funktioniert hat bzw. zu einer Veränderung der Genexpression der Zellen geführt hat.

Anhand der SUMO2/3-Ergebnisse ließ sich allerdings kein eindeutiger Unterschied zwischen den kortikalen und hippocampalen Neuronen-Kulturen ablesen. Es konnte beobachtet werden, dass nach 4 h OGD und 1 h Reoxygenierung in kortikalen Kulturen eine geringere SUMO2/3-Konjugat Abnahme stattfindet als in hippocampalen Kulturen. Ebenso führte bei beiden Kulturtypen eine Verkürzung der OGD (auf 45 min) mit geringerer Sauerstoff-konzentration (0,3%) und eine Verlängerung der Reoxygenierung (3 h) zu einem leichten Anstieg der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten.





Kortikale Kultur vom 15.8.18. Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. Die DRP1-Proben wurden im SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C erhitzt.

A: SUMO2/3 Western Blot von Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 45 min OGD und 3 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Konditionen sichtbar. Die geringere SUMO2/3-Konjugat-Intensität in den beiden äußeren Spalten ist durch eine Proteinbeladung erklärbar, welche im memcode rechts sichtbar wird. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min. B: Zum SUMO2/3-Blot zugehöriger memcode.

C: Zum oberen Western Blot gehöriger DRP1 Blot. D: Zum DRP1-Blot zugehöriger memcode.









Quantifizierung der Western-Blot-Banden mit ImageJ. Normalisierung der Banden gegen memcode und gegen eine Kontroll-Probe. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

A: Graphische Darstellung der quantifizierten SUMO2/3-Konjugat-Banden für die Kontrolle und 45 min OGD und 3 h Reoxygenierung. Die Graphik zeigt eine leichte Zunahme der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten nach OGD und Reoxygenierung für sowohl die Hippocampus-, als auch die Kortex-Neuronen-Kultur.

B: Graphische Darstellung der quantifizierten DRP1-Banden für die Kontrolle und 45 min OGD mit 3 h Reoxygenierung. Es zeigt sich in beiden Kulturtypen die erwartete signifikante Abnahme der DRP1-Intensitäten nach OGD und Reoxygenierung im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Hippocampale Kultur

p=0,0201; Kortikale Kultur p=0,0011).

Hippocampale Kultur: Kontrolle N=3; 45 min OGD + 3 h Reoxygenierung N=3 Kortikale Kultur: Kontrolle N=3; 45 min OGD + 3 h Reoxygenierung N=3

3.5 E18-Kortex-Neuronen-Kulturen zeigten eine Abnahme der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten unter OGD-Stimulation

Da die vorherigen Ergebnisse eine leicht erhöhte SUMO2/3-Konjugat-Intensität bei längerer Reoxygenierung zeigten, wurden bei dem folgenden Experiment mit 0,3% Sauerstoff längere OGD-Zeiten (2,5 h) sowie Reoxygenierungs-Zeiten (4,5 h) gewählt, um den Stress auf die Neurone zu maximieren. Des Weiteren wurden in diesem Experiment Kortizes von E18 Maus-Embryos zur Kultivierung verwendet. Der Grund dafür war, dass die Mehrzahl der Arbeitsgruppen, die sich mit SUMO2/3 beschäftigen, embryonale Neurone kultivieren. Dabei nimmt die Intensität der SUMO2/3-Konjugat-Banden nach 2,5 h OGD sowie nach 2,5 h OGD und 4,5 h Reoxygenierung leicht ab im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 13). Bei diesem Experiment handelte es sich um ein Pilot-Experiment, weil nur an einem Tag Kulturen gewonnen und getestet wurden. Deshalb ließ sich aus dem Western Blot kein definitives Ergebnis ableiten. Allerdings waren die Resultate aus diesem Experiment ähnlich zu den bereits durchgeführten Experimenten, da auch hier eine Abnahme bzw. keine Änderung der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten nach OGD und Reoxygenierung festgestellt werden konnte.



Abbildung 13: Western Blot zu Normoxie und 2,5 min OGD (0,3% O₂) mit anschließend 4,5 h Reoxygenierung von E18-Kortex-Neuronen-Kulturen

Kultur vom 9.10.18. Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. A: SUMO2/3 Western Blot von Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 2,5 h OGD und 4,5 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es ist erkennbar, dass die SUMO2/3-Konjugate nach 2,5 h OGD mit oder ohne 4,5 h Reoxygenierung abnehmen. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min. B: Zum SUMO2/3 Western Blot gehöriger memcode. In die 2,5-h-OGD-mit-4,5-h-Reoxygenierungs-Spalten wurde etwas weniger Protein gegeben als in die Restlichen. Ergebnisse

3.6 Die SUMO3-Konjugate der SUMO3-HA-KI-Mäuse zeigen ein ähnliches Muster wie bei WT-Mäusen

Um zu verifizieren, ob die SUMO3-HA-KI-Mäuse unter Zellstress ähnliche Muster in den SUMO2/3-Konjugaten zeigen, wurden Hippocampus-Neuronen-Kulturen von SUMO3-HA-KI-Mäusen angefertigt und unter den gleichen Bedingungen wie die WT-Mäuse getestet. Folgende Bedingungen wurden getestet: 24 h Hypoxie mit und ohne 1 h Reoxygenierung, 1 h, 2 h und 4 h Hypoxie, sowie 4 h OGD mit und ohne 1 h Reoxygenierung.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse aus den SUMO3-HA-KI-Kulturen die gleiche Tendenz wie die der WT-Kulturen. 24 h Hypoxie führten zu einem Abfall der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten und mit anschließend einer Stunde Reoxygenierung kam es zu keiner Zunahme der Intensität (siehe Abb. 15). Bei 1 h, 2 h, 4 h und der Kontrolle wurde jeweils nur eine einzige Kultur getestet. Die Ergebnisse zeigten für alle Bedingungen eine Abnahme der SUMO2/3-Konjugate im Verhältnis zur Kontrolle (siehe Abb. 14). Wie auch bei den WT-Kulturen konnte in den SUMO3-HA-KI-Kulturen ein massiver Abfall der SUMO3-Konjugate nach 4 h OGD sowie 4 h OGD mit 1 h Reoxygenierung festgestellt werden (siehe Abb. 16).

Anhand dieser Ergebnisse ließ sich im Muster der SUMO2/3-Konjugate kein eindeutiger Unterschied zwischen den WT-Kulturen und den SUMO3-HA-KI-Kulturen feststellen.



Abbildung 14: Western Blot zu Normoxie und 1 h, 2 h, 4 h Hypoxie (1% O₂) von His6-SUMO3-HA-KI-Hippocampus-Neuronen-Kulturen

Kultur vom 18.4.18. Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. Links: SUMO2/3 Western Blot von Normoxie-, 1-h-, 2-h- und 4-h-Hypoxie Kulturen. Es zeigt sich eine leichte Abnahme der SUMO2/3-Konjugate in den Hypoxie-Kulturen im Vergleich zur normoxischen Kultur. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min.

Rechts: Zum SUMO2/3 Western Blot gehöriger memcode.



Abbildung 15: Western Blot zu Normoxie und 24 h Hypoxie (1% O₂) mit und ohne 1 h Reoxygenierung von His6-SUMO3-HA-KI-Hippocampus-Neuronen-Kulturen

Kultur vom 24.4.18. Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. A: SUMO2/3 Western Blot von Kulturen, die Normoxie, 24 h Hypoxie mit und ohne 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es zeigt sich eine starke Abnahme der SUMO2/3-Konjugate in den Hypoxie-Kulturen im Vergleich zur normoxischen Kultur. Weiterhin führt die Reoxygenierung zu keiner Veränderung der SUMO2/3-Konjugate. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min. B: Zum SUMO2/3 Western Blot gehöriger memcode.



Abbildung 16: Western Blot zu Normoxie und 4 h OGD (1% O₂) mit und ohne 1 h Reoxygenierung von His6-SUMO3-HA-KI-Hippocampus-Neuronen-Kulturen

Kultur vom 20.7.18. Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. A: SUMO2/3 Western Blot von Kulturen, die Normoxie, 4 h OGD mit und ohne 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es zeigt sich eine starke Abnahme der SUMO2/3-Konjugate in den Hypoxie-Kulturen im Vergleich zur normoxischen Kultur. Weiterhin führt die Reoxygenierung zu keiner Veränderung der SUMO2/3-Konjugate. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min. B: Zum SUMO2/3 Western Blot gehöriger memcode.

3.7 Die Zell-Mortalität in den Neuronen-Kulturen kann nicht den gesamten Abfall der SUMO2/3-Konjugate erklären

Der Abfall der SUMO2/3-Konjugate könnte begründet sein in einer starken Dekonjugierung der Ziel-Proteine oder einem Abbau von SUMO2/3 in der Zelle oder durch ein vermehrtes Zellsterben bei OGD/Hypoxie, wodurch die Anzahl der SUMO2/3-Konjugat-produzierenden Zellen abnimmt. Um auszuschließen, dass das Zellsterben für den beobachteten Effekt alleine verantwortlich ist, wurden Hippocampus-Neuronen-Kulturen Normoxie, 4 h OGD, 4 h OGD mit 1 h Reoxygenierung und 24 h Hypoxie ausgesetzt. Im Anschluss an die Exposition wurden die Zellen fixiert und mittels des TUNEL-Assay-Kit analysiert (siehe Abb. 17).

In der normoxischen Kontroll-Kultur für das OGD-Experiment lag eine Zellmortalität von 20±12% vor. Nach 4 h OGD betrug die Mortalität 50±4% und nach 4 h OGD mit 1 h Reoxygenierung 45±12% (siehe Abb. 18). Daraus ergab sich, dass die Mortalität in den OGD Kulturen mit oder ohne Reoxygenierung ungefähr 2-2,5x so hoch war wie in der Kontrolle. Allerdings lag in der Hippocampus-Neuronen-Kultur eine Reduktion der SUMO2/3-Konjugate um den Faktor 3-3,5 vor. Dieser Vergleich dokumentiert, dass der Abfall der SUMO2/3-Konjugate unter OGD nicht allein durch die Zellmortalität erklärt

werden kann. Noch deutlicher war die Differenz bei der 24 h Hypoxie Kultur. In der normoxischen Kontroll-Kultur starben 8±7% der Zellen und nach 24h Hypoxie betrug die Mortalität 17±3%. Die Mortalitäts-Differenz zwischen beiden Kulturen ist dabei nicht signifikant. Dagegen waren die SUMO2/3-Konjugat-Banden nach 24 h Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle ungefähr um den Faktor vier vermindert. Somit spielt die Zellmortalität für die Reduktion der SUMO2/3-Konjugate eine Rolle, aber daneben müssen noch weitere Mechanismen vorliegen, die zur Reduktion der SUMO2/3-Konjugate beitragen.



Abbildung 17: Bilder von Hippocampus-Neuronen-Kulturen, die Normoxie und 4 h OGD mit und ohne 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden

Das linke Bild in jeder Reihe zeigt die emittierte Fluoreszenz des BrdU-Red-Antikörpers. Das mittlere Bild zeigt die emittierte Fluoreszenz des DAPI und die rechten Bilder entstehen, wenn man das linke und mittlere Bild fusioniert. Dabei ist in Blau DAPI und in Rot der BrdU-Red-Antikörper dargestellt. In diesen Bildern ist sichtbar, dass die Anzahl der von BrdU-Red angefärbten Zellen bei OGD mit (C) oder ohne (B) 1 h Reoxygenierung im Vergleich zur Kontrolle (A) ansteigt.

Belichtungszeit: DAPI 25 ms, BrdU-Red Antikörper 80 ms



Abbildung 18: Quantitative Auswertung der Bilder von Hippocampus-Neuronen-Kulturen, die Normoxie und 4 h OGD mit und ohne 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden

Es wurden für Normoxie vier Kulturen und für 4 h OGD und 4 h OGD mit 1 h Reoxygenierung jeweils fünf Kulturen analysiert. Die Ausplattierung der Kulturen erfolgte auf 60 mm Kulturschalen, in die immer drei Coverslips eingelegt wurden. Von jedem Coverslip wurden vier Bilder an unterschiedlichen Stellen aufgenommen. Quantifiziert wurden die Bilder mit ImageJ (Einstellungen: Threshold=15 (DAPI), 30 (BrdU-Red-Antikörper; size=140-inf (DAPI), 70-inf (BrdU-Red Antikörper); circularity=0,25-1). Bei einigen Bildern erfolgte die Auszählung der Zellen auch manuell.

Im Vergleich zur Kontrolle steigt die Zellmortalität nach 4 h OGD mit oder ohne Reoxygenierung um den Faktor 2-2,5 signifikant an (4 h OGD p=0,0023; 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung p=0,0265).

4 Diskussion

4.1 Einführung

Im Ergebnis-Teil wird nachgewiesen, dass OGD und Hypoxie mit oder ohne Reoxygenierung zu einem Abfall oder einer Stagnation der SUMO2/3-Konjugate führen, ohne dass diese Reduktion ausschließlich auf ein vermehrtes Zellsterben zurückgeführt werden kann. Ebenfalls wird Evidenz dafür gefunden, dass kürzere Hypoxie/ OGD-Zeiten bei niedrigerer O₂-Konzentration und längere Reoxygenierungs-Zeiten zu einer höheren SUMO2/3-Konjugat-Konzentration führen. So treten die niedrigsten SUMO2/3-Konjugat-Level nach 24 h Hypoxie bei 1% O₂ auf. Nach 4 h OGD bei 1% O₂ mit einer Stunde Reoxygenierung liegen die Werte etwas höher. Deutlich höhere Werte finden sich nach 45 Minuten OGD mit 0,3% O₂ und 3 h Reoxygenierung. Dies kann sowohl für Kortex-, als auch Hippocampus-Neuronen-Kulturen gezeigt werden. Ein weiter wichtiger Punkt dieser Arbeit besteht darin, dass die Kulturen aus den SUMO3-HA-KI-Mäusen sehr ähnliche SUMO3-Level zeigen, wie unter Verwendung von WT-Mäusen. Das deutet darauf hin, dass sich die KI-Kulturen in ihrer SUMO3-Expression ähnlich wie die WT-Kulturen verhalten. Dies ist ein vielversprechender Hinweis im Hinblick auf die zukünftige Verwendung der KI-Tiere.

Damit widersprechen die Ergebnisse zum Teil den vorherigen Publikationen anderer Labore. Die Gründe dafür liegen wahrscheinlich im Transfer eines Hirn-Ischämie-Modells bzw. eines Schlaganfall-Modells auf Zellkultur-Ebene. Das kann man aus der Heterogenität der Daten zwischen den einzelnen Laboren schließen. Mehrere Arbeitsgruppen berichten von einem SUMO2/3-Anstieg in Zellkultur durch OGD (Lee et al. 2007; Cimarosti et al. 2012; Li et al. 2017). In anderen Laboren wird dagegen ein Absinken der SUMO2/3-Konjugate nach OGD festgestellt (Lee et al. 2009). Im Unterschied dazu sind die Ergebnisse bei MCAO deutlich homogener. So wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen massive SUMO2/3-Anstiege nach MCAO nachgewiesen (Cimarosti et al. 2008; Wang et al. 2013; Li et al. 2017). Die Gründe für die Heterogenität der Ergebnisse bei Verwendung von Zellkulturen scheinen also in der Übertragung des Schlaganfall-Modells auf Zellkultur-Ebene zu liegen.

Die zwei Hauptursachen dafür sind die von Labor zu Labor unterschiedlichen Methoden für Zellkultur und OGD-Modelle, sowie eine unzureichende Publizierung der Methoden und Ergebnisse.

4.2 Diskussion der in der SUMO2/3-Forschung verwendeten Methoden

4.2.1 Die Heterogenität der verwendeten Zellkultursysteme

Dabei beginnen die Unterschiede in den Zellkulturen bereits mit dem Kulturmaterial. So benutzen die meisten Labore Mäuse Kortexe für ihre Kulturen (Lee et al. 2009; Datwyler et al. 2011; Li et al. 2017). In anderen Studien werden die Kulturen dagegen aus Hippocampus-Neuronen (Cimarosti et al. 2012) oder Tumor-Zellen (Lee et al. 2007; Yang et al. 2012) gefertigt. Dabei ist nicht sicher, inwieweit Ergebnisse, die zum Beispiel mit Tumor-Zellen gewonnen wurden, auf Kortex-Neuronen-Kulturen übertragbar sind. In dieser Arbeit kann für Hippocampus- und Kortex-Neuronen-Kulturen ein Absinken bzw. kein Anstieg der SUMO2/3-Konjugate gezeigt werden. Insbesondere in der Versuchsreihe, bei der Hippocampi und Kortizes von denselben Mäusen gewonnen und kultiviert wurden und auf 45 min OGD und 3 h Reoxygenierung getestet wurden, kann kein Unterschied zwischen den Hippocampus- und Kortex-Neuronen-Kulturen festgestellt werden. Anhand dieser Ergebnisse scheint es, als würde SUMO2/3 in Hippocampus- und Kortex-Neurone nach OGD und Reoxygenierung ein ähnliches Konjugationsverhalten präsentieren.

Ein weiterer technischer Unterschied zwischen einzelnen Laboren in Bezug auf die Zellkultur besteht bei der Art und dem Alter der verwendeten Tiere. Einige Labore benutzen E16 (Datwyler et al. 2011) oder E18-Mäuse (Lee et al. 2009), andere dagegen E18 Ratten (Cimarosti et al. 2012; Li et al. 2017). Wieder andere Labore verwenden P1/2 Ratten (Loftus et al. 2009). Durch die Verwendung unterschiedlicher Arten wird die Allgemeingültigkeit der SUMO-Ergebnisse verstärkt, wenn alle Tiermodelle zum selben Ergebnis führen würden. Allerdings sind die Ergebnisse nicht homogen. Dadurch führt die Verwendung unterschiedlicher Zu mehr Verwirrung, da man nicht einordnen kann, ob die Unterschiede in den Ergebnissen möglicherweise durch die verschiedenen Tiere bzw. das Alter der Tiere verursacht werden.

Im Idealfall sollten sich mehrere Arbeitsgruppen auf ein standardisiertes Zellkultursystem einigen. So würden die Unterschiede in den Zellkulturen als möglicher Grund für die verschiedenen Ergebnisse ausscheiden. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich P0-Mäuse getestet. Der Grund dafür ist, dass die SUMO2- und SUMO3-tag-KI-Mäuse in ihrer Anzahl limitiert sind, so dass kein Muttertier geopfert werden muss. Für die WT-Kulturen wurden ebenfalls P0-Mäuse verwendet, um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die KI-Mäuse zu gewährleisten. Im Verlauf der Arbeit wurden auch einmal E18-Mäuse verwendet und die Kulturen mit 2,5 h OGD und 4,5 h Reoxygenierung behandelt. Es zeigte sich ebenso wie bei den P0-Kulturen ein leichter Abfall der SUMO2/3-Konjugate. Hierbei handelte es sich um ein Pilot-Experiment, um festzustellen, ob direkt ein Unterschied zwischen E18 und P0

Kulturen feststellbar ist. Da sich die SUMO2/3-Konjugation zwischen E18- und P0-Kulturen nicht wesentlich änderte, wurde diese Idee nicht weiterverfolgt.

4.2.2 Die Variabilität der gewählten OGD- und Reoxygenierungszeiten und O₂-Konzentrationen

Die Konzentration der SUMO2/3-Konjugate ist abhängig von den unterschiedlich gewählten OGD und Reoxygenierungs-Zeitpunkten, sowie der O₂-Konzentration. In diesem Punkt unterscheiden sich die Studien sehr drastisch voneinander. Einige Forschungsgruppen variieren die OGD-Zeit bei feststehender Reoxygenierungs-Zeit (Datwyler et al. 2011; Li et al. 2017), während es in anderen Laboren genau andersherum gehandhabt wird (Cimarosti et al. 2012). Dabei gibt es eine enorme Diskrepanz zwischen den OGD-Zeiten. Bei einigen werden OGD-Zeiten von bis zu 75 Minuten untersucht (Datwyler et al. 2011; Cimarosti et al. 2012). In anderen Arbeiten handelt es sich dagegen um OGD-Zeiten von 4 h (Lee et al. 2009) oder 12 h (Lee et al. 2007). Das gleiche gilt für Reoxygenierungs-Zeiten, die zwischen 0 h (Lee et al. 2007) und 24 h (Li et al. 2017) variieren. Ebenso zeigt sich bei den O₂-Konzentrationen eine gewisse Variation zwischen angeblich 0% (Lee et al. 2009; Cimarosti et al. 2012; Li et al. 2017) und 3% (Lee et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit finden sich Hinweise darauf, dass kürzere OGD- bei geringerer O₂-Konzentration und längere Reoxygenierungs-Zeiten zu höheren SUMO2/3-Konjugat-Leveln führen. Dadurch ist es fraglich, inwieweit Studien, die in ihren OGD- und Reoxygenierungs-Zeiten, sowie der O₂-Konzentration so stark variieren, noch vergleichbar sind.

4.2.3 Die unterschiedlichen OGD-Medien

Ein weiterer experimenteller Aspekt ist das OGD-Medium selbst. Die Herausforderung dabei besteht darin, dass man für die Zeit der OGD die Zellen in einem Medium halten muss, dass komplett frei von Glukose und anderen Sacchariden ist. Da die Rezeptur, der von den bekannten Firmen geführten Medien nicht veröffentlicht wird, ist deren Einsatz diskutabel. Es existieren zwar Glukose-freie Formen zum Beispiel des Neurobasal-A-Mediums. Allerdings ist nicht gesichert, dass diese auch frei von anderen Sacchariden sind. Trotzdem verwenden einige Labore diese vorgefertigten Medien als OGD-Medium (Lee et al. 2007; Lee et al. 2009; Datwyler et al. 2011; Li et al. 2017). Der geringere Teil der Arbeitsgruppen verwendet ein selbst hergestellte definierte OGD-Medien, in denen sich sicher keine Saccharide befinden (Loftus et al. 2009; Cimarosti et al. 2012). Dadurch, dass die Medien selbst hergestellt sind, unterscheiden auch diese sich in ihrer

Zusammensetzung voneinander. In dieser Arbeit wurde das OGD-Medium von Bruer et al. 1997 verwendet.

4.2.4 Die verwendeten Antikörper variieren in ihrer Qualität und sind nicht universal verfügbar

Die Reproduktion der Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen wird weiterhin dadurch erschwert, dass die verwendeten SUMO2/3-Antikörper entweder nicht mehr auf dem Markt sind (Cimarosti et al. 2012; Li et al. 2017) oder nicht frei verkäuflich sind (Lee et al. 2007; Lee et al. 2009; Loftus et al. 2009). Für seine Studie an Erdhörnchen, die den ersten neuroprotektiven Effekt von SUMO2/3 nachweisen konnte (Lee et al. 2007), bekam John Hallenbeck SUMO2/3-Antikörper von Hisato Saitoh (Saitoh und Hinchey 2000). Diese Antikörper gab er dann an einige andere Arbeitsgruppen weiter. Deshalb werden diese Antikörper von einigen Laboren genutzt, obwohl sie nicht frei verkäuflich sind. Es ist bekannt, dass die verkäuflichen Antikörper für SUMO2/3 teilweise viele unspezifische Signale zeigen. Infolgedessen können SUMO2/3-Western Blots, bei denen verschiedene Antikörpern benutzt wurden, unterschiedliche Ergebnisse liefern. Durch die Variation der Antikörperqualität zwischen den einzelnen Firmen können Studien, die unterschiedliche Antikörper verwenden, nur schwer miteinander verglichen werden. Aus diesem Grund ist es sehr bedauerlich, dass in anderen Projekten Antikörper genutzt werden, die entweder nicht mehr auf dem Markt oder gar nicht verkäuflich sind. Somit ist es nicht möglich zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der eigenen Arbeit und den anderen Arbeitsgruppen möglicherweise von den verwendeten Antikörpern herrühren. Eine sehr gute Option, um dieses Problem zu lösen sind die vorhandenen SUMO-KI Tiere, bei denen SUMO2 oder SUMO3 mit einem Tag versehen ist. Die Antikörper für die entsprechenden Tags sind deutlich verlässlicher und vergleichbarer als für SUMO2/3. Dementsprechend gibt es bei Verwendung der KI-Tiere kaum Variation aufgrund der unterschiedlichen Antiklörper-Qualität.

4.2.5 Überblick über die bisherigen Argumente

Zusammenfassend zeigen die einzelnen Arbeitsgruppen Unterschiede, in der Herstellung der Zell-Kultur, der OGD- und Reoxygenierungs-Zeit, dem OGD-Medium und den SUMO2/3-Antikörpern. Es wird deutlich, dass sich die Labore untereinander in ihrer technischen Herangehensweise an die Problematik des SUMO2/3-Konjugat-Nachweises in Zell-Kultur nach OGD sehr stark unterscheiden. Dadurch fällt es zum einen schwer die einzelnen Studien untereinander zu vergleichen und die Ergebnisse der einzelnen Studien sinnvoll zu reproduzieren.

4.3 Diskussion veröffentlichter Studien zum Thema: SUMO2/3 nach OGD und Reoxygenierung

Erschwerend kommt hinzu, dass die Qualität der Publikationen zum Thema SUMO2/3 unter OGD teilweise zu wünschen übrig lässt.

In einer Publikation (Li et al. 2017) werden beispielsweise keine Proteinstandards bzw. keine Proteingrößen zu den Western Blots angegeben. Dadurch ist nicht sicher zu erkennen, ob es sich bei den dargestellten Proteinbanden tatsächlich um SUMO2/3-Konjugate handelt oder ob etwas anderes abgebildet wurde.

In zwei weiteren Veröffentlichungen ist nicht ausreichend dargelegt, wie sich die O₂-Konzentration während der OGD verhielt und es wird nicht erwähnt unter welcher Hypoxie-Apparatur gearbeitet wurde. Cimarosti et al. (2012) erwähnen nichts zu der Hypoxie-Apparatur und der Bestimmung der O₂-Konzentration während der OGD. Dagegen wird bei Loftus et al. (2009) beschrieben, dass die Anaerobie mittels Indikator-Streifen nachgewiesen wurde. Allerdings ist durch Indikator-Streifen die Messung der O₂-Konzentration weder genau noch kontinuierlich möglich. Da die O₂-Konzentration einen Einfluss auf das Level der SUMO2/3-Konjugate besitzt, ist es nicht ausreichend, diese nur mit Indikator-Streifen zu bestimmen.

Noch erstaunlicher ist, dass es in einigen Veröffentlichungen versäumt wurde, die Größe der Stichprobe zu nennen (Cimarosti et al. 2012; Guo et al. 2013; Li et al. 2017). Dadurch ist nicht ersichtlich, wie sicher die beschriebenen Effekte überhaupt sind. Auch in den Veröffentlichungen, in denen das N genannt wird, ist die Zahl der untersuchten Kulturen eher gering mit einem N von 3 (Lee et al. 2009) oder 4 bis 5 (Loftus et al. 2009).

Am Gravierendsten ist allerdings die Tatsache, dass beim überwiegenden Teil der Veröffentlichungen die Kontrolle der Ergebnisse nicht nachvollziehbar ist. Zum einen wird mehrfach überhaupt nicht erwähnt, wie die Kontrolle behandelt wurde (Lee et al. 2009; Cimarosti et al. 2012; Li et al. 2017), bzw. einmal ist die Bezugsquelle nicht korrekt angegeben (Datwyler et al. 2011). Zum anderen ist die Durchführung der Kontrolle nicht nachvollziehbar. So wurde bei Loftus et al. (2009) das Neurobasal-A-Medium mit B27 gegen Neurobasal-A-Medium ohne B27 getauscht, als die OGD-Behandlung der Test-Zellen beendet wurde. Die Test-Zellen wurden nach dieser Veröffentlichung in einer definierten Salzlösung ohne Glukose in die Hypoxie-Kammer gegeben und bei Beenden der OGD wieder in Neurobasal-A Medium ohne B27 reoxygeniert. Das bedeutet, in der Behandlung der Zellen wurde nur der Reoxygenierungs-Schritt kontrolliert, weil sowohl für die Test- als auch die Kontroll-Zellen am Ende der OGD das Medium zu Neurobasal-A ohne B27 getauscht wurde. Dagegen wurde die OGD nicht adäquat kontrolliert, weil das Medium der Kontroll-Zellen nicht gegen eine definierte Salzlösung mit Glukose gewechselt wurde. Aus diesem Grund ist es nicht möglich zu differenzieren, ob sich die in der Veröffentlichung

beschriebenen Effekte aus der OGD oder aus den Unterschieden zwischen der definierten Salzlösung und dem Neurobasal-A-Medium mit B27 ergeben. In einem anderen Artikel (Lee et al. 2007) wurden die Kontroll-Kulturen mit DMEM ohne Glukose gewaschen und dann in DMEM mit Glukose inkubiert. Die Test-Kulturen wurden ebenfalls in DMEM ohne Glukose gewaschen und anschließend in DMEM ohne Glukose in der Hypoxie-Kammer inkubiert. Der Sinn dahinter, die Kontroll-Kulturen mit dem glukosefreien Medium zu waschen und sie anschließend in glukosehaltigem Medium aufzubewahren, ist nicht ersichtlich, da nur den Test-Kulturen Glukose entzogen werden soll. Die Kontroll-Kulturen sollen sich genau darin von den Test-Kulturen unterscheiden, indem sie die ganze Zeit Glukose und Sauerstoff zur Verfügung haben.

4.4 Resümee der Diskussion

Die starke Diversität der Methoden und die teilweise ungenügende Qualität der Publikationen erschweren den Vergleich der Publikationen untereinander sowie die Einordnung der eigenen Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext. Besonders aus den vielen verschiedenen, verwandten Methoden begründet sich die Heterogenität der Ergebnisse. Für die Zukunft wäre es wünschenswert, wenn in Publikationen als OGD-Medien vergleichbare definierte Salzlösungen verwendet werden und die OGD-Zeiten ebenso in einem vergleichbaren Rahmen gehalten werden. Außerdem sollten bereits publizierte Ergebnisse, die mit vom Markt genommenen Antikörpern gewonnen wurden, mit frei verkäuflichen Antikörpern wiederholt werden, um anderen Laboren die Chance zu geben Variationen aufgrund der Antikörper auszuschließen. Noch besser wäre es, wenn alle beteiligten Arbeitsgruppen Zugriff auf die Antikörper von John Hallenbeck hätten, weil diese ursprünglich SUMO mit einem neuroprotektiven Effekt in Verbindung brachten. Dadurch könnte man Unterschiede zwischen den Laboren in Bezug auf OGD-Medium und -Zeit sowie die Antikörper minimieren und die restliche Variation wäre auf unterschiedliche Zellkultursysteme zurückzuführen.

4.5 Ausblick

Bei diesem Projekt wäre es jetzt wahrscheinlich am sinnvollsten einen Methodenwechsel von *in-vitro-* zu *in-vivo*-Experimenten bzw. von OGD zu MCAO durchzuführen. Im Verlauf dieses Projekts hat es sich als sehr schwierig erwiesen die *in-vitro*-Ergebnisse so zu verändern und zu optimieren, dass möglicherweise ein Anstieg der SUMO2/3-Konjugate zu sehen ist. Bei MCAO dagegen sind die Ergebnisse wie oben beschrieben homogener (Yang et al. 2008b; Wang et al. 2013) als bei OGD. Deshalb wird die MCAO voraussichtlich auch bei den SUMO2/3-KI-Mäusen zu einem Anstieg der SUMO2/3-Konjugate führen, die dann weiter analysiert werden können.

Des Weiteren sollte auch mit den Daten aus diesem Projekt eine Diskussion über die unterschiedlichen Kultur- und OGD-Methoden in der SUMO2/3-Forschung angestoßen werden mit dem Ziel die Methoden, soweit es sinnvoll ist, zu vereinheitlichen. Dadurch wären die Publikationen für SUMO2/3 bei OGD vergleichbarer und ein konstruktives Vorantreiben der Forschung in diesem Bereich würde möglich.

5 Zusammenfassung

Small ubiquitin-like modifiers (SUMO) sind kleine Proteine, die über einen ähnlichen Mechanismus wie Ubiquitin mit anderen Proteinen verknüpft werden. Somit zählt die SUMO-Konjugation zu den posttranslationalen Modifikationen. Die drei Hauptformen umfassen SUMO1 und SUMO2/3. SUMO2/3 werden oft als eine SUMO-Unterart zusammengefasst, da ihre Aminosäuresequenz zu 95% identisch ist und sie durch die momentan verkäuflichen SUMO2/3-Antikörper nicht differenziert werden können. SUMO1 gleicht SUMO2/3 dagegen nur in 50% seiner Aminosäuren.

In den letzten 10 Jahren fanden immer mehr Studien Evidenz dafür, dass SUMO2/3 einen neuroprotektiven Effekt besitzt. Der erste Beweis dafür wurde in Winterschlaf-haltenden Erdhörnchen gefunden. Im Anschluss konnten mehrere Studien einen Überlebensvorteil von Neuronen mit höherem SUMO2/3 im Vergleich zu Neuronen mit niedrigerem SUMO2/3 unter Zellstress nachweisen. Dieser Überlebensvorteil scheint mit einem Anstieg der hochmolekularen SUMO2/3-Konjugate verknüpft zu sein.

Allerdings stellt die Übertragung auf ein *in-vitro*-System die Wissenschaftsgemeinde vor einige Herausforderungen. So können nicht alle Studien den postulierten SUMO2/3-Konjugats Anstieg reproduzieren und die Ergebnisse sind dementsprechend heterogen. Außerdem fällt der Vergleich der einzelnen Studien schwer, weil die Methoden der einzelnen Arbeitsgruppen stark variieren und aus den Publikationen teilweise nicht alle Details entnehmbar sind.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich genau mit diesem Zusammenhang zwischen Zellstress und den SUMO2/3-Konjugaten in einem *in-vitro*-Modell. Zu diesem Zweck wurden Kortex- und Hippocampus-Neuronen-Kulturen von P0- und E18-Mäusen angefertigt. Die Kulturen wurden dann unterschiedlichen Zeiten von Hypoxie und oxygen glucose deprivation (OGD) mit und ohne Reoxygenierung ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine längere Exposition (bei Hypoxie 24 h bei OGD 4 h) zu einem fast vollständigen Verlust der SUMO2/3-Konjugate führt. Bei kürzeren OGD Zeiten und längeren Reoxygenierungs-Zeiten befinden sich die SUMO2/3-Konjugate etwa auf einem Level mit der Kontrolle.

Die gewählten Methoden führen also in diesem Projekt eher zu einem Absinken der SUMO2/3-Konjugate als zum postulierten Anstieg. Aus den Ergebnissen resultiert die Frage, ob sich ein verlässliches *in-vitro*-Modell, in welchem man konstante Anstiege der SUMO2/3-Konjugate sieht, etablieren lässt oder ob man besser auf *in-vivo*-Modelle zurückgreifen sollte. Außerdem muss die aktuelle Datenlage kritisch bewertet werden, da jede Arbeitsgruppe unterschiedliche Methoden benutzt und die Ergebnisse teilweise qualitativ ungenügend publiziert werden.

6 Anhang





A: SUMO2/3 und HIF1α Western Blot von Kontroll- bzw. Normoxie-, 1 h und 2 h Hypoxie-Kulturen. Bei den SUMO2/3-Blots lässt sich zwischen den unterschiedlichen Konditionen mit dem Auge kaum ein Unterschied feststellen. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager war 40 min.

C: Die HIF1α-Blots zeigen, dass die Intensität der HIF1α-Bande nach 1 h und 2 h Hypoxie im Vergleich zu den normoxischen Kulturen erhöht ist. Expositionszeit des ECL-Hyperfilm betrug 10 min. B/D: Zu den Blots gehörige memcodes.



Abbildung A2: Weitere Western Blots zu Normoxie, 4 h Hypoxie und 24 h Hypoxie (1% O2)

Kulturen vom 23.1.18 (oben) und 6.2.18 (unten). Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt.

A: SUMO2/3 und HIF1α Western Blot von Kontroll- bzw. Normoxie-, 4 h und 24 h Hypoxie-Kulturen. Bei den SUMO2/3-Blots ist eine Abnahme der Intensität in den SUMO2/3-Konjugaten erkennbar insbesondere nach 24 h Hypoxie. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager war 40 min.

C: Die HIF1α-Blots zeigen, dass die Intensität der HIF1α-Bande nach 4 h Hypoxie im Vergleich zu den normoxischen Kulturen erhöht ist. Außerdem sinkt die Intensität der HIF1α-Bande nach 24 h Hypoxie im Vergleich zu 4 h Hypoxie etwas ab. Expositionszeit des ECL-Hyperfilm betrug 10 min. B/D: Zu den Blots gehörige memcodes.





Kultur vom 23.1.18. Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. A: SUMO2/3 Western Blot für Normoxie und 24 h Hypoxie. Der drastische Abfall der SUMO2/3-Konjugate nach 24 h Hypoxie im Vergleich zu Normoxie ist gut sichtbar. B: Zum Western Blot gehöriger memcode.



Abbildung A4: Weitere Western Blots zu Normoxie und 24 h Hypoxie (1% O₂) mit anschließend 1 h Reoxygenierung

Kulturen vom 2.5.18 (oben) und 3.5.18 (unten). Die Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt.

A: SUMO2/3 Western Blot von Normoxie bzw. Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 24 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Die Abnahme in der Intensität der SUMO2/3-Konjugate wird mit dem Auge ersichtlich. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min. B: Zum SUMO2/3-Blot zugehöriger memcode.





Kulturen vom 14.6.18, 21.6.18, 28.6.18, 11.7.18 (von oben nach unten). Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. Die DRP1-Proben wurden für im SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C erhitzt.

A: SUMO2/3 Western Blot von Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 4 h OGD mit und ohne 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es ist eine Abnahme der SUMO2/3-Konjugate erkennbar mit teilweisem Wiederanstieg nach einer Stunde Reoxygenierung. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min. C: Der DRP1-Blot zeigt eine Abnahme der DRP1-Intensität bei 4 h OGD. Nach einer Stunde Reoxygenierung nimmt die Intensität noch weiter ab.

B/D: Zu den Blots gehöriger memcode.



Abbildung A5 (fortgesetzt)



54







Kulturen vom 20.8.18 (oben) und 22.8.18 (unten). Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt.

A: SUMO2/3 Western Blot von Normoxie bzw. Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 4 h OGD oder 4 h OGD und 1 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es ist ein eine leichte Abnahme der SUMO2/3-Konjugat-Intensitäten zwischen der Kontrolle und 4 h OGD bzw. 4 h OGD + 1 h Reoxygenierung erkennbar. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min.

B: Zum SUMO2/3-Blot zugehöriger memcode.









Anhang

Abbildung A7: Weitere Western Blots zu Normoxie und 45 min OGD (0,3% O₂) mit anschließend 3 h Reoxygenierung von Kortex-Neuronen-Kulturen

Kortikale-Kulturen vom 14.8.18 (oben) und 16.8.18 (unten). Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. Die DRP1-Proben wurden für im SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C erhitzt.

A: SUMO2/3 Western Blot von Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 45 min OGD mit 3 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es ist keine Veränderung der SUMO2/3-Konjugate erkennbar. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min.

C: Der DRP1-Blot zeigt eine leichte Abnahme der DRP1-Intensität bei 45 min OGD mit 3 h Reoxygenierung im Vergleich zur Kontrolle.

B/D: Zu den Blots gehöriger memcode.



Abbildung A8: Weitere Western Blots zu Normoxie und 45 min OGD (0,3% O₂) mit anschließend 3 h Reoxygenierung von Hippocampus-Neuronen-Kulturen

Hippocampus-Kulturen vom 14.8.18 (oben), 15.8.18 (mitte) und 16.8.18 (unten). Die SUMO2/3-Proben wurden im SDS-Probenpuffer bei 65 °C für 20 min erhitzt. Die DRP1-Proben wurden für im SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C erhitzt.

A: SUMO2/3 Western Blot von Kontroll-Kulturen und von Kulturen, die 45 min OGD mit 3 h Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Es ist keine Veränderung der SUMO2/3-Konjugate erkennbar. Expositionszeit im Chemostar ECL Imager betrug 40 min.

C: Der DRP1-Blot zeigt eine leichte Abnahme der DRP1-Intensität bei 45 min OGD mit 3 h Reoxygenierung im Vergleich zur Kontrolle.

B/D: Zu den Blots gehöriger memcode.



<u>59</u>



Abbildung A8 (fortgesetzt)

7 Literaturverzeichnis

Abe K, Aoki M, Kawagoe J, Yoshida T, Hattori A, Kogure K, Itoyama Y (1995): Ischemic delayed neuronal death. A mitochondrial hypothesis. Stroke <u>26</u>, 1478–1489

Anderson CA, Blackstone C (2013): SUMO wrestling with Drp1 at mitochondria. EMBO J <u>32</u>, 1496–1498

Anrather J, Iadecola C (2016): Inflammation and Stroke: An Overview. Neurotherapeutics 13, 661–670

Baczyk D, Audette MC, Coyaud E, Raught B, Kingdom JC (2018): Spatiotemporal distribution of small ubiquitin-like modifiers during human placental development and in response to oxidative and inflammatory stress. J Physiol <u>596</u>, 1587–1600

Bae S-H, Jeong J-W, Park JA, Kim S-H, Bae M-K, Choi S-J, Kim K-W (2004): Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. Biochem Biophys Res Commun <u>324</u>, 394–400

Bekkers JM, Stevens CF (1991): Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. Proc Natl Acad Sci USA <u>88</u>, 7834–7838

Bhattacharjee J, Alahari S, Sallais J, Tagliaferro A, Post M, Caniggia I (2016): Dynamic regulation of HIF1A stability by SUMO2/3 and SENP3 in the human placenta. Placenta <u>40</u>, 8–17

Bossis G, Melchior F (2006): Regulation of SUMOylation by Reversible Oxidation of SUMO Conjugating Enzymes. Mol Cell <u>21</u>, 349–357

Bruer U, Weih MK, Isaev NK, Meisel A, Ruscher K, Bergk A, Trendelenburg G, Wiegand F, Victorov IV, Dirnagl U (1997): Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. FEBS Lett <u>414</u>, 117–121

Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E (2007): RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. Cell <u>131</u>, 309–323

Cimarosti H, Lindberg C, Bomholt SF, Rønn LCB, Henley JM (2008): Increased protein SUMOylation following focal cerebral ischemia. Neuropharmacology <u>54</u>, 280–289

Cimarosti H, Ashikaga E, Jaafari N, Dearden L, Rubin P, Wilkinson KA, Henley JM (2012): Enhanced SUMOylation and SENP-1 Protein Levels following Oxygen and Glucose Deprivation in Neurones. J Cereb Blood Flow Metab <u>32</u>, 17–22

Daniel JA, Cooper BH, Palvimo JJ, Zhang F-P, Brose N, Tirard M (2017): Analysis of SUMO1-conjugation at synapses. eLife <u>6</u>, e26338

Datwyler AL, Lättig-Tünnemann G, Yang W, Paschen W, Lee SLL, Dirnagl U, Endres M, Harms C (2011): SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. J Cereb Blood Flow Metab <u>31</u>, 2152–2159

Dohmen JR (2004): SUMO protein modification. Biochim Biophys Acta 1695, 113–131

Durukan A, Tatlisumak T (2007): Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. Pharmacol Biochem Behav <u>87</u>, 179–197

Gareau JR, Lima CD (2010): The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. Nat Rev Mol Cell Biol <u>11</u>, 861–871

Guo C, Hildick KL, Luo J, Dearden L, Wilkinson KA, Henley JM (2013): SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. EMBO J <u>32</u>, 1514–1528

Hay RT (2005): SUMO: A History of Modification. Mol Cell <u>18</u>, 1–12

Hendriks IA, D'Souza RC, Chang J-G, Mann M, Vertegaal ACO (2015): System-wide identification of wild-type SUMO-2 conjugation sites. Nat Commun <u>6</u>, 7289

Hermey G, Mahlke C, Schwake M, Sommer T: Der Experimentator: Neurowissenschaften. Springer-Verlag Heidelberg 2010, 76-80

Kaech S, Banker G (2006): Culturing hippocampal neurons. Nat Protoc 1, 2406–2415

Kessler BM, Edelmann MJ (2011): PTMs in Conversation: Activity and Function of Deubiquitinating Enzymes Regulated via Post-Translational Modifications. Cell Biochem Biophys <u>60–60</u>, 21–38

Kunz K, Wagner K, Mendler L, Hölper S, Dehne N, Müller S (2016): SUMO Signaling by Hypoxic Inactivation of SUMO-Specific Isopeptidases. Cell Rep <u>16</u>, 3075–3086

Lee Y, Miyake S, Wakita H, McMullen DC, Azuma Y, Auh S, Hallenbeck JM (2007): Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. J Cereb Blood Flow Metab <u>27</u>, 950–962

Lee Y, Castri P, Bembry J, Maric D, Auh S, Hallenbeck JM (2009): SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance. J Neurochem <u>109</u>, 257–267

Li G, Liu X, Su Z, Zhang D (2017): Hypothermia exerts early neuroprotective effects involving protein conjugation of SUMO-2/3 in a rat model of middle cerebral artery occlusion. Mol Med Rep <u>16</u>, 3217–3223

Loftus LT, Gala R, Yang T, Jessick VJ, Ashley MD, Ordonez A, Thompson SJ, Simon RP, Meller R (2009): Sumo-2/3-ylation following in vitro modeled ischemia is reduced in delayed ischemic tolerance. Brain Res <u>1272</u>, 71–80

Murray CJ, Lopez AD (1997): Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet <u>349</u>, 1269–1276

Neuhaus AA, Couch Y, Hadley G, Buchan AM (2017): Neuroprotection in stroke: the importance of collaboration and reproducibility. Brain <u>140</u>, 2079–2092

Nguyen LK, Cavadas MAS, Scholz CC, Fitzpatrick SF, Bruning U, Cummins EP, Tambuwala MM, Manresa MC, Kholodenko BN, Taylor CT et al. (2013): A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1α) network. J Cell Sci 119974

Otera H, Ishihara N, Mihara K (2013): New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res <u>1833</u>, 1256–1268

Patel PM: Cerebral Ischemia. In: Gupta AK, Gelb AW (Hrsg.): Essentials of Neuroanesthesia and Neurointensive Care. W.B. Saunders, Philadelphia 2008, 36–42

Rosenmund C, Stevens CF (1996): Definition of the Readily Releasable Pool of Vesicles at Hippocampal Synapses. Neuron <u>16</u>, 1197–1207
Rossner MJ, Tirard M (2014): Thy 1.2 driven expression of transgenic His₆-SUMO2 in the brain of mice alters a restricted set of genes. Brain Res <u>1575</u>, 1–11

Saitoh H, Hinchey J (2000): Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. J Biol Chem <u>275</u>, 6252–6258

Schreihofer DA: Neuroprotection by Dietary Isoflavones and Their Role in Cerebral Ischemia. In: Watson RR, Preedy VR (Hrsg.): Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease. Academic Press, San Diego 2015, 385–394

Scorziello A, Pellegrini C, Forte L, Tortiglione A, Gioielli A, Iossa S, Amoroso S, Tufano R, Renzo GD, Annunziato L (2001): Differential vulnerability of cortical and cerebellar neurons in primary culture to oxygen glucose deprivation followed by reoxygenation. J Neurosci Res <u>63</u>, 20–26

Sheng H, Kudo M, Mackensen GB, Pearlstein RD, Crapo JD, Warner DS (2000): Mice Overexpressing Extracellular Superoxide Dismutase Have Increased Resistance to Global Cerebral Ischemia. Exp Neurol <u>163</u>, 392–398

Silva AMN, Vitorino R, Domingues MRM, Spickett CM, Domingues P (2013): Posttranslational Modifications and Mass Spectrometry Detection. Free Radic Biol Med <u>65</u>, 925–941

Tirard M, Brose N (2016): Systematic Localization and Identification of SUMOylation Substrates in Knock-In Mice Expressing Affinity-Tagged SUMO1. Methods Mol Biol <u>1475</u>, 291–301

Tirard M, Hsiao H-H, Nikolov M, Urlaub H, Melchior F, Brose N (2012): In vivo localization and identification of SUMOylated proteins in the brain of His6-HA-SUMO1 knock-in mice. Proc Natl Acad Sci U S A <u>109</u>, 21122–21127

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A <u>76</u>, 4350–4354

Vertegaal ACO (2007): Small ubiquitin-related modifiers in chains. Biochem Soc Trans <u>35</u>, 1422–1423

Wang Z, Wang R, Sheng H, Sheng SP, Paschen W, Yang W (2013): Transient ischemia induces massive nuclear accumulation of SUMO2/3-conjugated proteins in spinal cord neurons. Spinal Cord <u>51</u>, 139–143

Wappler EA, Institoris A, Dutta S, Katakam PVG, Busija DW (2013): Mitochondrial Dynamics Associated with Oxygen-Glucose Deprivation in Rat Primary Neuronal Cultures. PLOS ONE <u>8</u>, e63206

Warlow CP (1998): Epidemiology of stroke. Lancet 352, S1-S4

Xiao Y, Pollack D, Nieves E, Winchell A, Callaway M, Vigodner M (2015): Can your protein be sumoylated? A quick summary and important tips to study SUMO-modified proteins. Anal Biochem <u>477</u>, 95–97

Xu Z, Lam LSM, Lam LH, Chau SF, Ng TB, Au SWN (2007): Molecular basis of the redox regulation of SUMO proteases: a protective mechanism of intermolecular disulfide linkage against irreversible sulfhydryl oxidation. FASEB J <u>22</u>, 127–137

Yang W, Sheng H, Homi HM, Warner DS, Paschen W (2008a): Cerebral ischemia/stroke and small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation – a new target for therapeutic intervention? J Neurochem <u>106</u>, 989–999

Yang W, Sheng H, Warner DS, Paschen W (2008b): Transient Global Cerebral Ischemia Induces a Massive Increase in Protein Sumoylation. J Cereb Blood Flow Metab <u>28</u>, 269– 279

Yang W, Thompson JW, Wang Z, Wang L, Sheng H, Foster MW, Moseley MA, Paschen W (2012): Analysis of oxygen/glucose-deprivation-induced changes in SUMO3 conjugation using SILAC-based quantitative proteomics. J Proteome Res <u>11</u>, 1108–1117

Zhao J, Meng X, Zhang J, Li Yong-li, Li Yue-juan, Fan Z (2014): Oxygen glucose deprivation post-conditioning protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation injury: Role of HSP70 and inhibition of apoptosis. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci <u>34</u>, 18–22

Zhou T, Jiang J, Zhang M, Fu Y, Yang Z, Jiang L (2013): Protective effect of mild hypothermia on oxygen-glucose deprivation injury in rat hippocampal neurons after hypoxia. Mol Med Rep <u>7</u>, 1859–1864

Zhou Z-B, Meng L, Gelb AW, Lee R, Huang W-Q (2016): Cerebral ischemia during surgery: an overview. J Biomed Res <u>30</u>, 83–87

Pierce[™] BCA Protein Assay Kit.

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227?gclid=EAIaIQobChMIqpaVwP TL5AIVAuJ3Ch3RmA3QEAAYASAAEgIv9vD_BwE&ef_id=EAIaIQobChMIqpaVwPTL5AIV AuJ3Ch3RmA3QEAAYASAAEgIv9vD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!305473767015!b!!g! !&s_kwcid=AL!3652!3!305473767015!b!!g!!; Zugriff am 12.09.2019

TUNEL Assay Kit (ab66110) | Abcam. https://www.abcam.com/tunel-assay-kit-brdu-red-ab66110.html; Zugriff am 06.06.2019

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Nils Brose, Prof. Dörthe Katschinski und Dr. Marilyn Tirard dafür bedanken, dieses Projekt möglich gemacht zu haben und für ihre wunderbare Betreuung und die vielen Diskussionen und Ratschläge, die sie mir mit auf den Weg gegeben haben. Dabei geht ein besonderer Dank an Dr. Marilyn Tirard, die bei allen Problemen oder Fragen immer zur Stelle war und mir zudem den Großteil der verwendeten Methoden beigebracht hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Anke Zieseniß, die meine Ansprechpartnerin im physiologischen Institut war und mir die Verwendung der Hypoxie-Kammer beigebracht hat. Bei Carolina Thomas und Dr. Ali Shaib möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Zellmortalitäts-Evaluation bedanken.

Außerdem bedanke ich mich noch bei Klaus Hellmann, der mir bei allen Fragen und Problemen rund um das Western-Blotting geholfen hat.

Zuletzt geht ein Dank an die Arbeitsgruppe von Prof. Ulrich Dirnagl für die Bereitstellung ihres OGD-Protokolls.