

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
(Akademischer Vertreter: Prof. Dr. med. Norbert Weiler)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

**UNTERSUCHUNGEN NEUROPROTEKTIVER EFFEKTE VON  
2-IMINOBIOTIN KOMBINIERT MIT HYPOTHERMIE:  
ERGEBNISSE AUS EINEM ENZYM-BASIERTEM  
IN-VITRO-HYPOXIEMODELL**

Eine experimentelle Studie

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Lena Sommer**

aus Bremerhaven

Kiel, 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Albrecht, Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thorsten Bartsch, Klinik für Neurologie  
Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2019  
Zum Druck genehmigt; Kiel, den 14.11.2018  
gez.: Prof. Dr. Wolfram Klapper

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Perinatale Asphyxie .....	1
1.1.1 Pathophysiologie.....	1
1.1.2 Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie.....	1
1.2 Zelluläre Mechanismen bei neuronaler Hypoxie.....	2
1.2.1 HIF-1 $\alpha$ und PARP-1 .....	3
1.3 Zelluläre Überlebenskaskaden.....	4
1.3.1 Der PI3-Kinase/Akt- und Erk-Signalweg.....	4
1.4 Therapie der Hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie .....	6
1.4.1 Hypothermie.....	6
1.4.2 2-Iminobiotin.....	6
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	8
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1 Material.....	9
2.1.1 Pufferlösungen und Zellkulturmedien .....	9
2.1.2 Zellkulturmaterialien .....	11
2.1.3 Materialien für Proteinbiochemie .....	12
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Zellkultur .....	14
2.2.1.1 Versuchsprotokoll.....	14
2.2.1.2 Kultivierung von IMR-32 Zellen .....	15
2.2.1.3 Hypoxieinduktion in-vitro und Applikation von 2-IB .....	16
2.2.1.4 Proteinisolierung .....	17
2.2.2 Proteinbiochemie .....	18
2.2.2.1 LDH-Assay.....	18
2.2.2.2 MTS-Assay .....	18
2.2.2.3 ROS-Assay .....	19
2.2.2.4 Apoptose-Assay .....	20
2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Western Blot.....	20
2.2.3 Statistische Methoden .....	22

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1	Zeitliche Manifestierung eines Zellschadens nach Hypoxie.....	23
3.2	Wirkung von 2-Iminobiotin auf den hypoxieinduzierten Zellschaden.....	25
3.3	Wirkung von 2-Iminobiotin auf die metabolische Zellaktivität.....	27
3.4	Wirkung von 2-Iminobiotin auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.....	29
3.5	Regulation von Caspase 3/7 durch 2-Iminobiotin .....	30
3.6	Regulation von HIF-1 $\alpha$ durch 2-Iminobiotin .....	31
3.7	Spaltung von PARP-1 durch 2-Iminobiotin .....	32
3.8	Phosphorylierung von Akt durch 2-Iminobiotin .....	33
3.9	Phosphorylierung von Erk durch 2-Iminobiotin .....	34
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>36</b>
4.1	Eigenschaften des verwendeten in-vitro Modells.....	36
4.2	Effekte von 2-IB und Hypothermie auf den hypoxieinduzierten Zellschaden .....	37
4.3	Effekte von 2-IB und Hypothermie auf Zellmetabolismus und Apoptose.....	38
4.4	Effekte von 2-IB und Hypothermie auf oxidativen Stress.....	40
4.5	Effekte von 2-IB und Hypothermie auf Signalmoleküle.....	40
4.6	Effekte von 2-IB und Hypothermie auf Überlebenskaskaden.....	42
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>53</b>
8.1	Übersicht der Herstellungsfirmen .....	53
8.2	Veröffentlichungen .....	54

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der HIE .....	2
Abbildung 2: Zelluläre Vorgänge bei Hypoxie .....	3
Abbildung 3: Zelluläre Wirkungen von HIF-1 $\alpha$ und PARP-1 .....	4
Abbildung 4: Wirkungen des Akt- und Erk-Signalweges .....	5
Abbildung 5: Summen- und Strukturformel von 2-IB .....	7
Abbildung 6: Versuchsprotokoll .....	15
Abbildung 7: Reaktionsgleichungen Glukoseoxidase und Katalase .....	17
Abbildung 8: Zellmorphologie und LDH-Freisetzung .....	24
Abbildung 9: Zellmorphologie und LDH-Freisetzung .....	26
Abbildung 10: Relative LDH-Freisetzung .....	27
Abbildung 11: Metabolische Zellaktivität .....	28
Abbildung 12: Einfluss von 2-IB auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies .....	30
Abbildung 13: Regulation der Aktivität von Caspase 3/7 durch 2-IB .....	31
Abbildung 14: Regulation von HIF-1 $\alpha$ durch 2-IB .....	32
Abbildung 15: Spaltung von PARP-1 durch 2-IB .....	33
Abbildung 16: Phosphorylierung von Akt durch 2-IB .....	34
Abbildung 17: Phosphorylierung von Erk durch 2-IB .....	35

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Produkte und Hersteller aus dem Zellkulturbereich .....	11
Tabelle 2: Produkte und Hersteller aus der Proteinbiochemie .....	12
Tabelle 3: Verwendete Antikörper .....	13
Tabelle 4: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele .....	13

---

**Abkürzungsverzeichnis**

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B
ANOVA	Analysis of variances
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Caspase	Cysteinyl-aspartate specific protease
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d.h.	Das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleid acid
EGF	Epidermal growth factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endothelial nitrit oxide synthase
EPO	Erythropoetin
Erk	Extrazellular Signal-regulierte Kinase
et al.	Et alii (und Andere)
FKS	Fötales Kälberserum
ggf.	Gegebenenfalls
GLUT	Glukose-Transporter
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HeLa	Humane Zervixkarzinomepithelzellen nach Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure

---

HIE	Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor-1 alpha
HIF-1 $\beta$	Hypoxie-induzierter Faktor-1 beta
h	Hour (s)
2-IB	2-Iminobiotin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M	Molar
mg	Milligramm
mio	Millionen
mM	Millimolar
mol	Stoffmenge
MW	Molecular weight
ng	Nanogramm
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	Non essential amino acids
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
P-Akt	Phosphorylierte Proteinkinase B
PARP	Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase
P-Erk	Phosphorylierte Extrazellular Signal-regulierte Kinase
PBS	Phosphat buffered saline
pH	Pondus Hydrogenii
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PVDF	Polyvinylidendifluoridmembran
ROS	Reactive oxygen species
s.	Siehe
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standart error of mean
Tab.	Tabelle
TBST	Tris buffered saline tween 20

---

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	Versus
WHO	World health organisation
z.B.	Zum Beispiel



# 1 Einleitung

## 1.1 Perinatale Asphyxie

### 1.1.1 Pathophysiologie

Das Wort Asphyxie entstammt dem Altgriechischen und bedeutet sinngemäß übersetzt "Pulslosigkeit". Perinatale Asphyxie bezeichnet die Minderversorgung eines Säuglings mit Sauerstoff, die sich vor, während oder unmittelbar nach der Geburt ereignet<sup>1</sup>.

Die Inzidenz der Perinatalen Asphyxie liegt in der westlichen Welt bei 1-1,5 Prozent und stellt damit eine häufige Schwangerschafts- und Geburtskomplikation dar<sup>2</sup>. Ursächlich sind Beeinträchtigungen des placentaren oder pulmonalen Gasaustausches, die unter anderem durch maternale Infektionen, Plazentainsuffizienz, Uterusruptur oder Nabelschnurkompression bedingt sein können<sup>3,4</sup>. Der betroffene Säugling erhält daraufhin ein vermindertes Sauerstoffangebot. Der sinkende Sauerstoffgehalt im arteriellen Blut (Hypoxämie) sowie Kohlenstoffdioxidretention (Hyperkapnie) sind die Folge. Ebenso kommt es zum Abfall des Sauerstoffpartialdrucks im kindlichen Gewebe (Hypoxie)<sup>4</sup>. Zerebrales Gewebe weist die geringste Ischämietoleranz aller Organe auf, daher kann es bereits innerhalb weniger Minuten zu irreversiblen Schäden von Gehirnzellen kommen<sup>5</sup>.

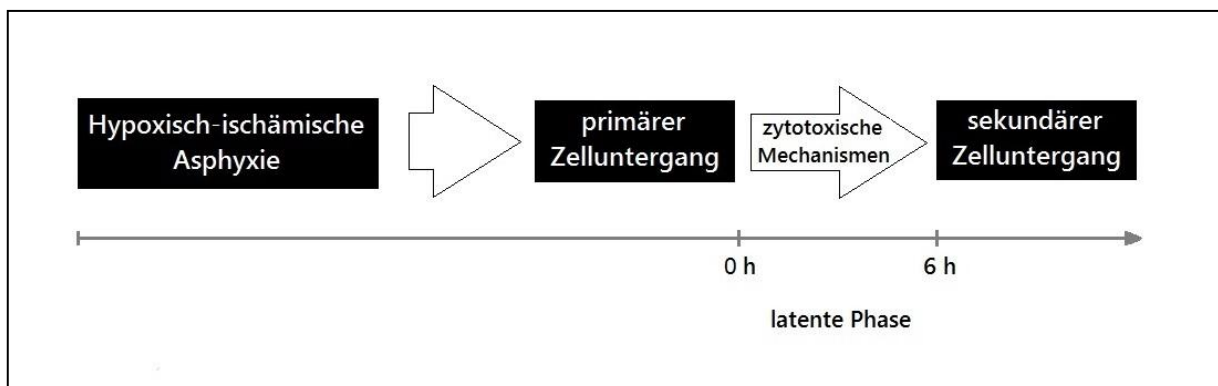
### 1.1.2 Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie

Als Folge der Asphyxie kann sich eine Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE) entwickeln, die mit einer Inzidenz von 2-3 auf 1000 auftritt und klinisch unterschiedliche Manifestationen zeigen kann<sup>6</sup>. In 25-50 Prozent der Fälle wurden Folgeschäden in Form von kognitiven und sozialen Defiziten registriert. Die Schweregrade zeigten unterschiedliche Ausprägungen. Bei Frühgeborenen traten besonders schwerwiegende Folgen auf. Diese manifestierten sich in bis zu 10 Prozent der Fälle in Form von Zerebralparesen, Krampfanfällen und schwersten mentalen Retardierungen<sup>2</sup>.

Eine HIE liegt definitionsgemäß vor, wenn folgende vier Kriterien erfüllt sind: metabolische Azidose (Nabelarterien pH-Wert unter 7,0), klinische Zeichen einer Enzepha-

lopathie, Zerebralparese im Verlauf, zudem muss eine andere Ursache einer lokalen oder globalen Hirnschädigung ausgeschlossen sein<sup>1</sup>.

Der Verlauf der HIE gliedert sich in mehrere Phasen des Zelluntergangs (s. Abb. 1)<sup>7</sup>: Die primäre Phase beschreibt den primären Zelluntergang durch zunächst nekrotische neuronale Schäden aufgrund eines verminderten zerebralen Blutflusses während der akuten Asphyxie. Im Anschluss folgt eine Reoxygenierungsphase mit einem regelrechten zerebralen Sauerstoffmetabolismus, der bis zu sechs Stunden anhalten kann. Dieser Zeitraum ist sehr entscheidend für das Zellüberleben und wird als latente Phase beschrieben<sup>6</sup>. Vermutlich werden in dieser Periode Energiereserven der Zellen metabolisiert. Nach deren vollständigem Verbrauch werden zytotoxische Mechanismen und die Initiation intrazellulärer apoptotischer Vorgänge ausgelöst<sup>2</sup>. Der apoptotische Zelltod (sekundärer Zelluntergang) findet im Zeitraum von 6-15 Stunden nach der Asphyxie statt und ist klinisch von zerebraler Ödembildung und Krämpfen begleitet. Das Zeitfenster zwischen dem primären (nekrotischen) und sekundären (apoptotischen) neuronalen Zelluntergang (0-6 Stunden nach dem Insult), die sogenannte latente Phase, stellt nachweislich den optimalen therapeutischen Zeitraum für Interventionen dar<sup>6,8</sup>.



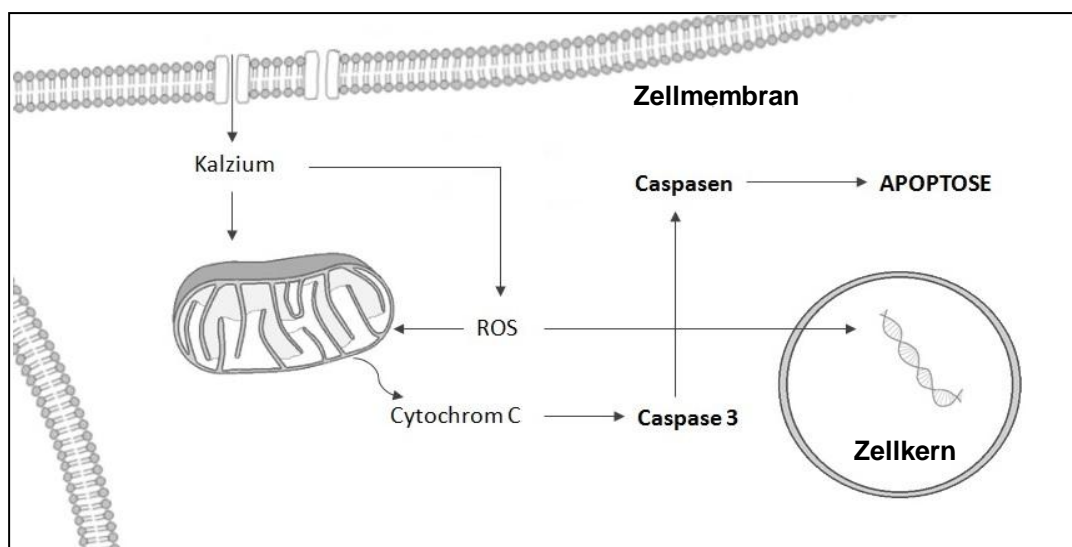
**Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der HIE**

## 1.2 Zelluläre Mechanismen bei neuronaler Hypoxie

Durch Hypoxie entsteht eine Wiederaufnahmestörung des Neurotransmitters Glutamat. Über die vermehrte Aktivierung von Kalziumkanälen durch Glutamat kommt es zum Einstrom von Kalzium in die postsynaptischen Neurone (s. Abb. 2)<sup>9</sup>. Es entstehen hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen, die zur Aktivierung von Proteasen, Endonukleasen und Phospholipasen führen. Zudem wird die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) begünstigt. ROS sind Sauerstoffderivate mit hochreagiblen

Eigenschaften<sup>10</sup>. Sehr hohe Konzentrationen werden als oxidativer Stress bezeichnet und führen zur Destruktion des Zytoskeletts und des Genoms der Zellen. Außerdem bewirken ROS die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Über die Aktivierung von Caspasen wird die intrinsische Apoptosekaskade eingeleitet und führt in den Zelltod<sup>2,11,12</sup>.

Die hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen stimulieren und aktivieren die im Zytoplasma gelegene neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase, was eine erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) zur Folge hat<sup>13</sup>. NO schädigt die Mitochondrien durch Inhibition der Atmungskette<sup>14</sup>.



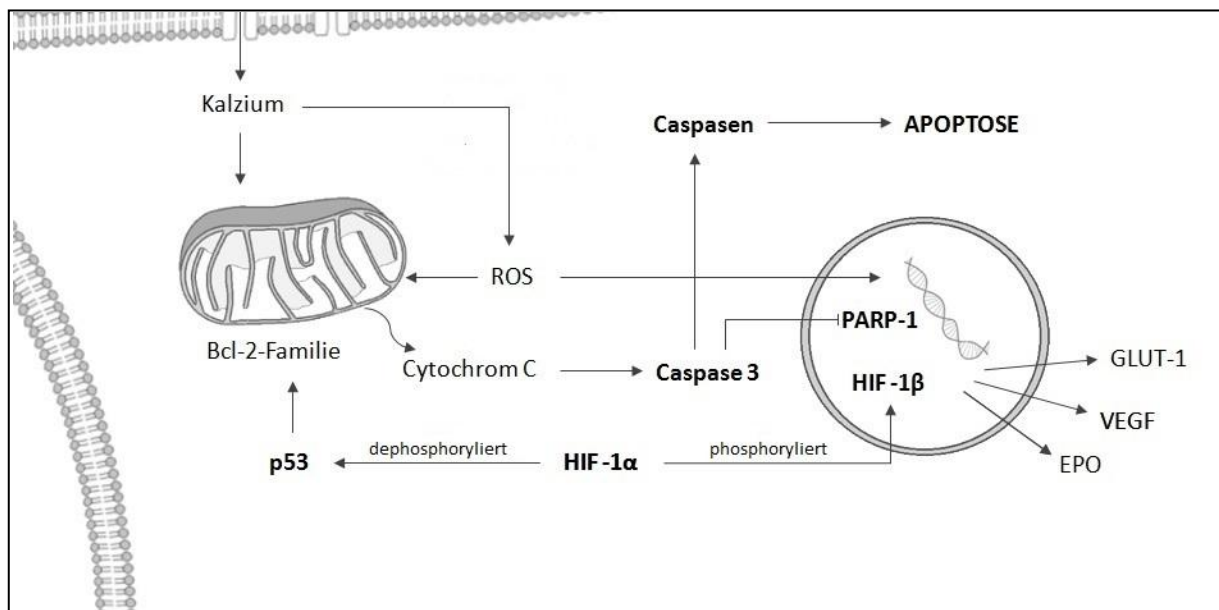
**Abbildung 2: Zelluläre Vorgänge bei Hypoxie**

### 1.2.1 HIF-1 $\alpha$ und PARP-1

Der Hypoxie-induzierte Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ist die Untereinheit eines im Zytoplasma vorliegenden Transkriptionsfaktors, der konstitutiv synthetisiert wird<sup>15</sup>. Unter Normoxie ist HIF-1 $\alpha$  hydroxyliert und liegt in inaktiver Form vor<sup>11,16</sup>. Unter leichter Hypoxie entfällt durch die Abwesenheit von Sauerstoff die Hydroxylierung und es kommt zur Akkumulation der aktiven Form von HIF-1 $\alpha$ . Anschließend wird HIF-1 $\alpha$  phosphoryliert und gelangt in den Zellkern, um dort mit der HIF-1 $\beta$  Untereinheit zu dimerisieren<sup>17</sup>. Der so entstandene aktive Transkriptionsfaktor HIF-1 induziert eine Genexpression, die die Adaptation der Zelle an Hypoxie fördert: Es wird eine gesteigerte Expression von VEGF (Vascular endothelial growth factor), EPO (Erythropoetin), Glukose-Transportern (GLUT-1, GLUT-3) und Enzymen der Glykolyse induziert<sup>18,19</sup>.

Unter starker Hypoxie oder Anoxie interagiert HIF-1 $\alpha$  in dehydroxylierter und dephosphorylierter Form mit p53. Das p53-Protein ist an der Regulierung der Permeabilität der Mitochondrienmembran über die Bcl-2-Familie beteiligt und beeinflusst damit die Cytochrom C-Freisetzung und den intrinsischen Weg der Apoptose (s. Abb. 3)<sup>17,19</sup>.

Die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) ist ein körpereigenes Enzym, das in verschiedenen Isoformen ubiquitär intrazellulär auftritt. Die klassische und am meisten untersuchte PARP-Form ist die im Zellkern lokalisierte PARP-1. Die Hauptfunktion ist die Katalysierung der DNA-Reparatur durch Ribosylierung nach Strangbrüchen<sup>20</sup>. Eine Inaktivierung von PARP-1 erfolgt durch Spaltung, die unter anderem durch Caspase 3 katalysiert wird<sup>21</sup>. Eine Vielzahl gebrochener DNA-Stränge bewirkt eine starke PARP-1 Aktivität. Die Ribosylierung der DNA ist energieintensiv, sodass ab einem bestimmten Ausmaß der Energiedepletion die Apoptose der Zelle eingeleitet werden kann (s. Abb. 3)<sup>22,23</sup>.



**Abbildung 3: Zelluläre Wirkungen von HIF-1 $\alpha$  und PARP-1**

### 1.3 Zelluläre Überlebenskaskaden

#### 1.3.1 Der PI3-Kinase/Akt- und Erk-Signalweg

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg ist beteiligt an der Regulation von Überleben, Zellzyklus, Metabolismus und Wachstum der Zelle<sup>24</sup>. Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt über Liganden, die an membranständige Tyrosinkinase-Rezeptoren wie den

Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) binden<sup>25,26</sup>. Über weitere Zwischenschritte wird die im Zytoplasma gelegene PI3-Kinase aktiviert. Nachfolgend wird eine Kaskade ausgelöst, die zur Aktivierung durch Phosphorylierung der Kinase Akt zu P-Akt führt. P-Akt vermittelt über die Bcl-2 Familie anti-apoptotische Signale, die zu verminderter Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien ins Zytoplasma führen. Die intrinsische Apoptoseeinleitung wird dadurch abgeschwächt (s. Abb. 4)<sup>24,27,28</sup>.

Die Extrazellulär-Signal regulierte Kinase (Erk) ist Bestandteil einer Mitogen-aktivierten-Proteinkinase-Kaskade (MAP-Kinase-Kaskade) zur Regulation von Zellzyklus, Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle<sup>29,30</sup>. Auch die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade erfolgt meist über Tyrosinkinase-Rezeptoren. Neben der Ligandenbindung können auch weniger spezifische, extrazelluläre Einflüsse wie Hyperthermie oder Hypoxie zur Induktion der Kaskade führen<sup>11</sup>. Nach Aktivierung des Rezeptors werden unter anderem über das G-Protein Ras mehrere Schritte eingeleitet, die zu einer Phosphorylierung von Erk zu P-Erk führen<sup>46,31</sup>. P-Erk hat eine anti-apoptotische Wirkung mittels Inhibition pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie (z.B. Bax) und inaktiviert die Caspasen 3 und 9 (s. Abb. 4)<sup>32</sup>. Außerdem kann P-Erk im Zellkern durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren in die Genregulation eingreifen<sup>31,33-35</sup>.

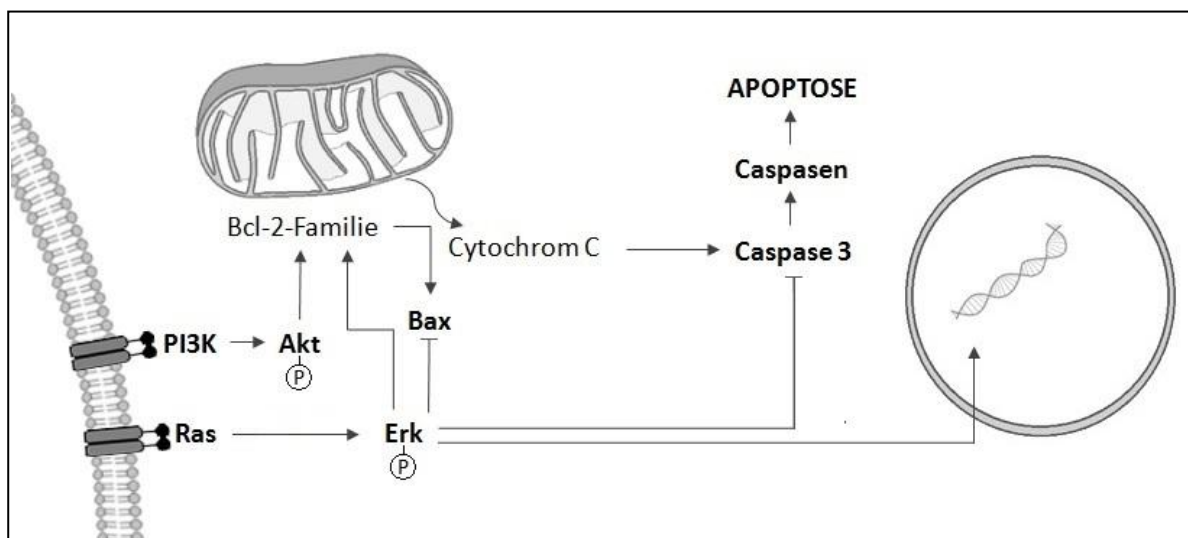


Abbildung 4: Wirkungen des Akt- und Erk-Signalweges

## 1.4 Therapie der Hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie

### 1.4.1 Hypothermie

Die aktuellen Therapieoptionen der HIE beschränken sich neben intensivmedizinischer Überwachung und symptomatischer Behandlung auf den Einsatz milder Hypothermie, bei der die Körpertemperatur um 3-4°C abgesenkt wird. Diese Behandlung hat sowohl experimentell als auch klinisch eine neuroprotektive Wirkung erwiesen<sup>7</sup>. Die Hypothermietherapie sollte innerhalb der latenten Phase 0-6 Stunden nach der Asphyxie (s. Abb. 1) beginnen und 48-72 Stunden andauern. Etwa 15 Prozent der behandelten Patienten mit HIE zeigten ein besseres Outcome unter der Hypothermiebehandlung, Langzeitfolgen sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht<sup>6</sup>.

### 1.4.2 2-Iminobiotin

2-Iminobiotin (2-IB) ist ein bisher nicht zugelassenes Medikament, das von der niederländischen Firma Neurophyxia entwickelt und im Juni 2008 patentiert wurde<sup>36</sup>. Eine mögliche pharmakologische Therapieoption der HIE durch 2-IB ist bereits in verschiedenen Studien evaluiert worden:

In Tierversuchen wurden neonatale Ferkel nach induzierter Hypoxie mit 2-IB behandelt. Es zeigten sich in diesen Versuchen neuroprotektive Effekte anhand eines geringeren zerebralen Zellunterganges<sup>14,37</sup>. Eine Zellkulturstudie, die in unserem Institut durchgeführt wurde, ergab ebenfalls positive Auswirkungen von 2-IB auf den hypoxieinduzierten Zellschaden<sup>38</sup>. Im Juni 2011 konnte zunächst in einer klinischen Phase-I-Studie mit erwachsenen, gesunden Probanden die Verträglichkeit der Substanz gezeigt werden<sup>36</sup>.

Seit Juli 2015 findet im niederländischen Utrecht eine Phase-II-Studie an Neugeborenen mit perinataler Asphyxie statt<sup>39</sup>. Die Probanden müssen ein Mindestalter von 36 Schwangerschaftswochen aufweisen und eine moderate bis schwere Asphyxie erlitten haben. 2-IB wird erstmals additiv zur Hypothermiebehandlung eingesetzt und innerhalb der ersten 12 Stunden postnatal intravenös appliziert. In dieser noch nicht abgeschlossenen Studie wird die Sicherheit von 2-IB sowie dessen Pharmakokinetik evaluiert<sup>39</sup>.

2-IB weist chemische Strukturverwandtschaft zu Vitamin H (Biotin) auf. Als Wirkmechanismus wurde eine selektive Inhibition der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) beschrieben<sup>37</sup>. Es ist anzunehmen, dass es neben der selektiven NOS-Inhibition weitere Effekte gibt, die zur Neuroprotektion führen. In-vivo Experimente wiesen beispielweise nach 2-IB-Gabe eine verringerte zelluläre Aktivität von Caspase 3 auf, die als Effektorcaspase ein Schlüsselenzym der Apoptose darstellt<sup>14,40</sup>.

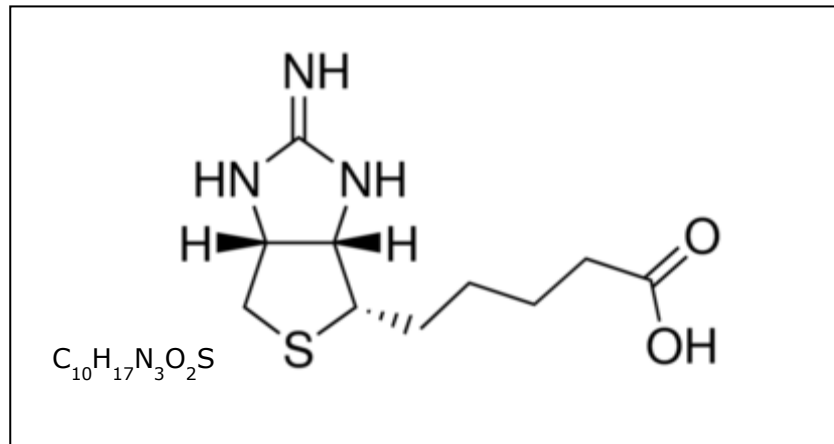


Abbildung 5: Summen- und Strukturformel von 2-IB

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die zellulären Vorgänge der Hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie weisen ein hohes Maß an Komplexität auf und sind in ihrer Gesamtheit nicht vollständig erforscht. Unter Verwendung eines in der Arbeitsgruppe etablierten in-vitro Hypoxiemodells sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

Vorarbeiten zeigten, dass 2-IB dazu in der Lage ist, den hypoxieinduzierten neuronalen Zellschaden zu reduzieren.

1. Sind diese Effekte auch unter hypothermen Bedingungen nachweisbar?
2. Welche ist die optimale 2-IB Konzentration, die in Kombination mit milder Hypothermie neuroprotektive Effekte vermittelt?
3. Welche hypoxieinduzierten Signalwege werden von 2-IB unter hypothermen Bedingungen beeinflusst?

Da bereits klinische Daten zum Einsatz von milder Hypothermie als auch von 2-IB als jeweils isolierte Therapie vorliegen, könnten positive in-vitro Befunde bezüglich der Kombination aus 2-IB und Hypothermie darauf hindeuten, dass die Kombination von 2-IB mit Hypothermie auch eine klinische Therapieoption zur Reduktion der Hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie darstellen könnte.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pufferlösungen und Zellkulturmedien

Alle verwendeten Substanzen waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad. Genauere Informationen zu den Herstellern befinden sich im Anhang.

##### **Citrat Puffer:**

Citronensäure	132 mg
Tri-Natrium-Citrat	231 mg
Natriumchlorid	900 mg

mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen  
pH 4,0 einstellen (mit 0,1 M Citronensäure und 0,1 M Natriumcitrat)

##### **HBS:**

HEPES	119,2 mg
NaCl	423,7 mg
KCl	82 mg
Glukose	45 mg

mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen  
pH 7,3 einstellen (mit HCl und NaOH)

##### **SDS-Laufpuffer:**

Tris	12,4 g
Glycin	57,6 g
SDS	4 g

mit Aqua dest. auf 4 l auffüllen  
pH 8,3 einstellen (mit HCl und NaOH)

##### **Transferpuffer:**

Glycin	28,6 g
Tris	24,2 g

mit Aqua dest. auf 1,6 l auffüllen  
400 ml Methanol hinzufügen

##### **TBST-Puffer:**

Tris	6,1 g
NaCl	2 g
EDTA 0,5 M	5 ml
Tween 20	2,5 ml

mit Aqua dest. auf 2,5 l auffüllen  
pH 7,5 einstellen (mit HCl und NaOH)

**Gelpuffer I**

Tris 45,4 g  
 SDS 1 g  
 mit Aqua dest. auf 4 ml auffüllen  
 pH 8,8 einstellen (mit HCl und NaOH)  
 mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen

**Gelpuffer II**

Tris 15,1 g  
 SDS 1 g  
 mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen  
 pH 6,8 einstellen (mit HCl und NaOH)  
 mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen

**Lämmlli 4X**

SDS	800 mg
β-Mercaptoethanol ≥99 %	2 ml
Glycerin	4 ml
Bromphenolblau 1 %	0,08 ml
Tris 1 M; pH 6,8	2,5 ml

**Harsh-Stripping-Buffer**

SDS 10 %	20 ml
Tris 0,5 M; pH 6,8	12,5 ml
Ultra pure water	67,5 ml
β-Mercaptoethanol ≥99 %	0,8 ml

**HEPES-Puffer**

HEPES 25 mM 1,3 g  
 mit Aqua dest. auf 150 ml auffüllen  
 200 µl Triton x-100 hinzugeben  
 pH 7,5 einstellen (mit NaOH)

**M1 (Medium 10 % FKS):**

DMEM F-12	500 ml
Glutamax 100x	5 ml
MEM NEAA 100x	5 ml
FKS	56,7 ml

**M2 (Medium 1 % FKS)+Gentamicin:**

DMEM F-12	500 ml
Glutamax 100x	5 ml
MEM NEAA 100x	5 ml
FKS	5,16 ml
Gentamicin 50mg/ml	0,5 ml

## 2.1.2 Zellkulturmaterialien

Produkt	Hersteller, ggf. Bestellnummer
Brutschränke	Heraeus Kendro Heracell 51021245
Katalase	Sigma Aldrich C1345
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) F-12 Nutrient Mixture (Ham) + L-Glutamine	Life technologies; Gibco 11320-074
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Life technologies; Gibco
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> (DPBS-A)	Life technologies; Gibco
Ethanol 70 %	Carl-Roth 9065.2
Fötales Kälberserum (FKS)	Life technologies; Gibco 26140-079
Gefrierschrank	Liebherr
Gentamicin	PAA - P 11-005
Glasflaschen f. Medium, Pufferlösungen	Schott Duran
Glukoseoxidase	Sigma Aldrich G6125
Glutamax/ L-Glutamin	Life technologies; Gibco 35050-038
Lichtmikroskop	Leica Type 090-135.002
Mammalian Protein Extraction Reagent (M-Per) Lysis Puffer	Thermo-Scientific
MEM NEAA Non Essential Amino Acids	Life technologies; Gibco 11140-050
Neubauer Zählkammer	Brand
Pasteurpipetten	Assistent
PD Tips	Brand
Penicillin/ Streptomycin	PAA- P11-010
Phosphatase Inhibitor	Thermo-Scientific
Pipetten	Eppendorf
Pipettus	Brand
Protease Inhibitor	Thermo-Scientific
Serologische Pipetten	Greiner bio-one und Sarstedt
Sicherheitswerkbank/ Bench	Heraeus Kendro HERAsafe KS 51021508
Stepper	Brand
Tips	Sarstedt und Biozym
Trypan blue stain 0,4 %	Sigma-Aldrich T8154
Trypsin	PAA L11-003
Vortex Touch Mixer	Scientific Industries SI-0156
Wärmebad 37° C	PD Industriegesellschaft mbH
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Sarstedt und Sigma
Zentrifuge	Heraeus Sepatech 3630

Tabelle 1: Produkte und Hersteller aus dem Zellkulturbereich

## 2.1.3 Materialien für Proteinbiochemie

Produkt	Hersteller, ggf. Bestellnummer
APS/ Rotiphorese Gel	Roth
Apoptose-Assay/ Caspase 3/7-Assay	Promega G7790
Autoradiografie Film Amersham Hyperfilm MP High performance	GE Healthcare
Bromphenolblau 1 %	Roth
BSA/ Bovine Serum Albumin	New England BioLabs
Citronensäure	Merk
DMSO/ Dimethylsulfoxid	Roth
ECL-Plus Western Blotting Detection System	Amersham Pharmacia Biotech
EDTA/ Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
Eismaschine	Scotsman AF80
ELISA Reader Absorption	Tecan Sunrise
ELISA Reader Fluoreszenz	Tecan Genios FL
Filterpapier Mini Trans-Blot	Bio Rad
Glukose	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HEPES	Sigma
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare
KCl	Carl-Roth
LDH Kit	Roche 11644793001
Marker Western Blot	SM 0672
$\beta$ -Mercaptoethanol $\geq 99$ %	Sigma
Methanol	J.T.Baker
Milchpulver	Roth
MTS-Assay	Promega G3580
Natriumchlorid	Roth
Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran	GE Healthcare
ROS-Assay (H <sub>2</sub> DCFDA-Assay)	Sigma D6883
Roti-Quant-Assay	Carl-Roth
SDS	Roth
Tris/ (hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton x-100	Roth
Tween 20	Roth
Western Transblot System	Bio-RAD
Zentrifuge	Heraeus Biofuge fresco

Tabelle 2: Produkte und Hersteller aus der Proteinbiochemie

<u>Primärantikörper</u>				
Zielprotein	MW (kDa)	Spezies	Firma	Verdünnung
HIF-1 $\alpha$	110; 90	Kaninchen	Acris / Novus Biological NBP1 02160SS	1:1000
PARP-1	116; 89	Kaninchen	Cell signaling #9542	1:1000
Akt	60	Kaninchen	Cell signaling #4691	1:2000
P-Akt	60	Kaninchen	Cell signaling #4060	1:1000
Erk	42; 44	Kaninchen	Cell signaling # 9102	1:8000
P-Erk	42; 44	Kaninchen	Cell signaling # 9101S	1:8000
Aktin	42	Ziege	Santa Cruz, sc-1615	1:2000
<u>Sekundärantikörper</u>				
Anti-Kaninchen		Ziege	Cell signaling #7074	1:8000
Anti-Ziege		Kaninchen	Santa Cruz sc-2922	1:10000

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Komponente	Trenngel 7 %	Trenngel 10 %	Sammelgel
Gelpuffer I	2,5 ml	2,6 ml	-----
Gelpuffer II	-----	-----	2,6 ml
Acrylamid	1,75 ml	2,5 ml	1,13 ml
Aqua dest.	5,66 ml	4,81 ml	6,19 ml
APS	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l
TEMED	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

Tabelle 4: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

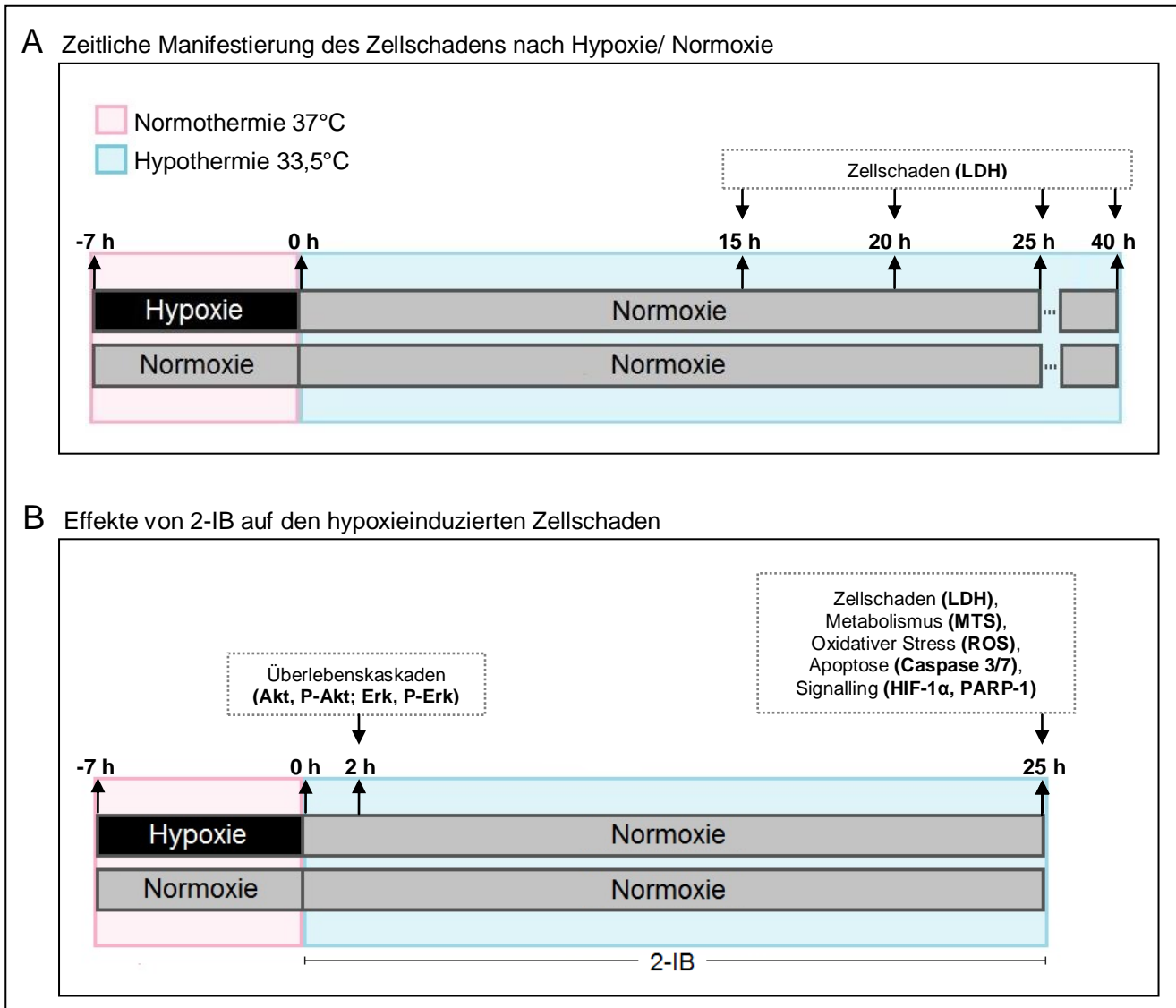
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Versuchsprotokoll

**Versuchsteil A:** Zeitliche Manifestierung des Zellschadens nach Hypoxie/ Normoxie: Zur Induktion der Hypoxie bzw. Normoxie fand zu Beginn des Versuchs zum Zeitpunkt **-7 h** ein Austausch des verwendeten Zellkulturmediums durch hypoxisches bzw. nicht hypoxisches Medium statt (s. 2.2.1.3). Die IMR-32 Zellen (s. 2.2.1.2) inkubierten anschließend für 7 h bei 37°C bis zum Zeitpunkt **0 h**. Zur Beendigung der Hypoxie bzw. Normoxie wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch die gleiche Menge frisches, normoxisches Medium ersetzt. Eine Bestimmung des Anstieges der Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturmedium als Surrogatparameter für den Zellschaden wurde zu den Zeitpunkten **15 h, 20 h, 25 h** und **40 h** durchgeführt (s. Abb. 6 A).

**Versuchsteil B:** Effekte von 2-IB auf den hypoxieinduzierten Zellschaden: Hypoxie- und Normoxieinduktion war identisch zu Versuchsteil A. Zum Zeitpunkt **0 h** fand ein Mediumwechsel statt. Das frische Medium enthielt die verschiedenen Konzentrationen von 2-IB (0-0,5 µg/ml), die Zellen inkubierten ab diesem Zeitpunkt wie auch in Versuchsteil A bei 33,5°C. Nach **2 h** fand eine Proteinisolierung zur Bestimmung der Proteine Akt, P-Akt, Erk und P-Erk statt. Zum Zeitpunkt **25 h** nach Hypoxie bzw. Normoxie wurden Analysen von Zellschaden, Metabolismus, oxidativem Stress, Apoptose und Signalling durchgeführt (s. Abb. 6 B).



**Abbildung 6: Versuchsprotokoll**

(A) Zeitliche Manifestierung eines Zellschadens nach Hypoxie/ Normoxie; (B) Effekte von 2-IB auf den hypoxieinduzierten Zellschaden

### 2.2.1.2 Kultivierung von IMR-32 Zellen

Für die folgenden Versuche wurden IMR-32 Zellen verwendet, die einer abdominalen Metastase eines Neuroblastoms entstammen<sup>41</sup>. Die IMR-32 Zellen wurden zur Kultivierung in T75er Zellkulturflaschen ausgesät und zu Beginn der Aussaat sowie alle 2-3 Tage mit je 10 ml Medium (M1) pro Flasche versorgt. In 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> verweilten sie daraufhin im Brutschrank je nach Wachstumsgeschwindigkeit für 3-11 Tage, bis eine Konfluenz von 70-90 % erreicht war. Zur Entfernung aus den T75er Flaschen wurden die Zellen mit 6-8 ml PBS-A pro Flasche gewaschen. Anschließend

wurden 2 ml Trypsin pro Flasche für 2-3 min auf die Zellen appliziert. Hierbei handelt es sich um eine Protease, die zur Lösung der Kontakte der Zellen mit dem Kulturflaschenboden und Nachbarzellen eingesetzt wird. Nach Waschen mit 7-8 ml Medium (M1) wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 10 min mit 2400 Umdrehungen/min, pelletiert und der Rest verworfen. Mit 8-12 ml Medium (M1) je nach gewonnener Pelletmenge wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1 ml Pipette suspendiert. 10 µl dieser Lösung wurden mit 65 µl Medium und 25 µl Trypan blue Lösung verdünnt und anschließend in der Neubauer Zählkammer unter einem Lichtmikroskop gezählt. Die Gesamtzellzahl wurde anschließend durch Hochrechnung auf die Verdünnung ermittelt. Die IMR-32 Zellen wurden erneut je nach Bedarf im 12- oder 96-Well Platten oder T25er Flaschen und zusätzlich zur weiteren Kultivierung in neuen T75er Zellkulturflaschen ausgesät.

Aussaat:

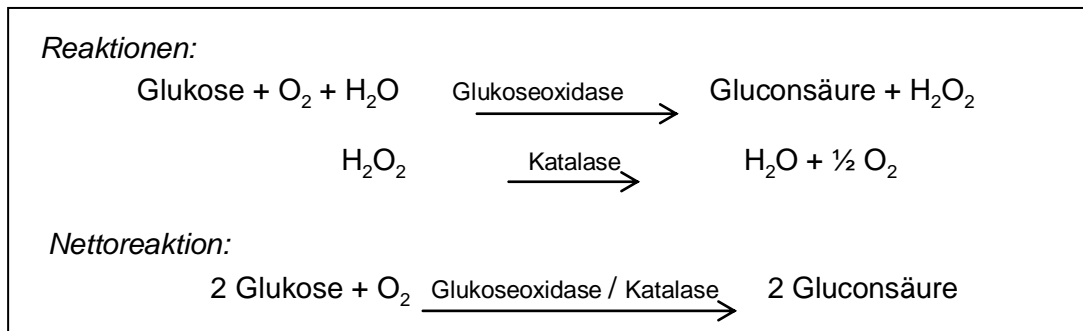
IMR-32 Zellen wurden für die Messungen der LDH in einer 12-Well Platte mit 120.000-200.000/Well in je 2 ml Medium (M1) ausgesät, daraufhin wuchsen sie 2-3 Tage bis zu 40-50 % Konfluenz. Für den MTS und ROS-Assay wurden in 72-80 Wells einer 96-Well Platte 30.000-40.000 IMR-32 Zellen/Well in je 100 µl Medium (M1) ausgesät und ca. 3 Tage bis zu einer 70-75 %igen Konfluenz kultiviert. In T25er Flaschen wurden IMR-32 Zellen mit 1,5 mio/Flasche in 4 ml Medium (M1) für die Proteinisolierung (s. 2.2.1.4) ausgesät und ca. 2 Tage bis zu einer Konfluenz von 60 % kultiviert.

### 2.2.1.3 Hypoxieinduktion in-vitro und Applikation von 2-IB

Hintergrund:

Das in dieser Arbeit verwendete enzymbasierte in-vitro Hypoxiemodell ist im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin etabliert worden<sup>42-44</sup>. Die Hypoxie wird unter Verwendung der Enzyme Glukoseoxidase und Katalase induziert. Glukose reagiert mit molekularem Sauerstoff und Wasser zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid, durch die Katalase wird zeitgleich Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abgebaut (s. Abb. 7).





**Abbildung 7: Reaktionsgleichungen Glukoseoxidase und Katalase**

Durchführung:

Zur Herstellung einer 50-fachen Stock Lösung für das hypoxische Medium wurden 15,8 mg Katalase und 57,75 mg Glukoseoxidase in 10 ml Medium (M2) gelöst. Die Lösung wurde unmittelbar vor Gabe auf die Zellen 1:50 in Medium (M2) verdünnt, sodass eine Enzymaktivität von 2 U/ml Glukoseoxidase und 120 U/ml Katalase vorlag. Das die Zellen bedeckende Medium wurde abgesaugt und in jeweils die Hälfte der Wells schließlich das hergestellte hypoxische Medium gegeben. Die übrigen Wells erhielten die gleiche Menge Medium (M2) ohne Enzyme und dienten damit als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen für 7 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Beendigung der Hypoxie wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erhielten wieder frisches Medium (M1). Zu diesem Zeitpunkt fand die Applikation der verschiedenen 2-IB Konzentrationen (0-0,5 µg/ml) statt.

#### 2.2.1.4 Proteinisolierung

Eine Proteinisolierung wurde für die Western Blots von HIF-1α, PARP-1, Akt und P-Akt, Erk und P-Erk und außerdem zur Bestimmung der Aktivität von Caspase 3/7 durchgeführt. Nach entsprechender Inkubationszeit am Versuchsende (s. Abb. 6) wurden die Zellen mit je 1,5 ml pro Flasche eiskaltem PBS-A gewaschen und mit je 100 µl Lysis Puffer, der aus 98 µl M-Per und je 1 µl Phosphatase und Protease Inhibitor bestand, versetzt. Zur Lyse der Zellmembran fand eine 15-minütige Inkubation auf Eis statt, woraufhin eine visuelle Kontrolle im Lichtmikroskop erfolgte. Zusammen mit dem Puffer wurden die lysierten Zellen in 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgenommen und für 15 min bei 13.000 Umdrehungen/min in 4°C zentrifugiert. Zur Entfernung des Pellets wurde der Überstand in neue Eppendorfgefäße pipettiert und die Protein-

menge wurde mit der Rotiquant-Methode bestimmt. Zur Lagerung wurden die gewonnenen Aliquots bei -20°C eingefroren.

## 2.2.2 Proteinbiochemie

### 2.2.2.1 LDH-Assay

Hintergrund:

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein in Zellen universell vorkommendes, zytosolisches Enzym. Zelluläre Schäden können sich durch erhöhte Membranpermeabilität manifestieren. Daraufhin gelangt die LDH in den Extrazellulärraum bzw. das umliegende Zellkulturmedium und dient als zuverlässiger Surrogatparameter zur Quantifizierung der Zellschäden<sup>45</sup>. Mit dem kolorimetrischen Cytotoxicity Detection Kit wurde die Menge an LDH in den Zellkulturüberständen quantitativ bestimmt. Durch LDH wird die Umwandlung von Tetrazoliumsalzen (Iodtetrazoliumchlorid) zu Formazan katalysiert. Der Assay beruht auf dieser Reaktion und enthält die entsprechenden Substrate. Das rötliche Formazan lässt sich bei einer Absorption von 492 nm photometrisch messen.

Durchführung:

Am Ende des Experiments (s. Abb. 6B) wurden je 125 µl Medium/Well in jeweils ein 1,5 ml Eppendorfgefäß abgenommen. Zur Bestimmung der Gesamt-LDH-Aktivität wurden die Zellen mit 30 %igem Triton für 45 min bei 37°C lysiert. Daraufhin erfolgte eine weitere Entnahme von 125 µl Medium/Well zur Relativierung auf die Gesamt-LDH-Aktivität. Die Messungen erfolgten in einer 96-Well Platte mit jeweils 50 µl Probe, die mit je 50 µl Medium (M2) verdünnt und anschließend mit 100 µl LDH-Kit/Well versetzt wurde. Die Messung wurde photometrisch bei einer Absorption von 492 nm in einem ELISA-Reader durchgeführt.

### 2.2.2.2 MTS-Assay

Hintergrund:

Der MTS-Assay misst die metabolische Aktivität der Zellen. Die Reaktionslösung enthält MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-

phenyl)-2H-tetrazolium] und zur Bindung von Elektronen Phenazin-Ethosulfat. Das MTS kann durch die Zellen NADH-abhängig zu farbigem Formazan reduziert werden. Um das benötigte NADH oder NADPH bereitzustellen, müssen diese jedoch metabolisch aktiv sein. Die Farbintensität des Formazans kann photometrisch bestimmt werden und ist somit direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen.

Durchführung:

Zur Analyse der metabolischen Aktivität der Zellen wurden in jedes zu messende Well 20 µl MTS-Reaktionsgemisch gegeben. Es erfolgte zunächst eine Ausgangsmessung mittels eines ELISA-Readers in dem die Absorption in den Zellkulturmedien bei 492 nm bestimmt wurde. Anschließend inkubierten die Zellen für weitere 2,5 h bei 33,5°C im Brutschrank. Es wurden innerhalb dieses Zeitraumes vier weitere Messungen im Abstand von je 30 min durchgeführt.

### 2.2.2.3 ROS-Assay

Hintergrund:

Mit dem ROS-Assay können die intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies quantitativ bestimmt werden. Der ROS-Assay enthält H<sub>2</sub>DCFDA [2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat], welches per Diffusion intrazellulär aufgenommen wird und durch die ROS zu dem fluoreszenten DCF [2',7'-Dichlorofluorescein] oxidiert wird. Die Menge an DCF ist direkt proportional zur ROS-Menge und dient als Marker für den oxidativen Stress der Zellen<sup>2,11</sup>.

Durchführung:

Die Zellen wurden in 96er black-Wall, clear Bottom Platten ausgesät. Zur Bestimmung der ROS wurde in jedes Well 2 µl der Assay-Lösung pipettiert. Anschließend erfolgten 5 Messungen der Fluoreszenz mittels eines ELISA-Readers bei einer Exzitationswellenlänge von 504 nm und einer Emissionswellenlänge von 529 nm bei 37°C im Abstand von jeweils 15 min.

#### 2.2.2.4 Apoptose-Assay

Hintergrund:

Caspase 3 und 7 spielen als Effektorcaspasen eine zentrale Rolle in der Apoptose der Zelle<sup>11</sup>. Der Apoptose-Assay misst die Aktivität von Caspase 3/7 unter Einsatz von Z-DEVD-R110 (bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide)) als Substrat. Dieses wird durch die aktiven Caspasen 3 und 7 gespalten, wodurch es zur Freisetzung des fluoreszierenden Rhodamins 110 kommt. Dieses dient als Marker für die apoptotische Aktivität in den Zellen, da die Menge an gebildetem fluoreszierendem Rhodamin 110 direkt proportional zu Caspase 3/7 Aktivität ist.

Durchführung:

Die Proteine wurden zunächst wie unter 2.2.1.4 beschrieben isoliert. Für die Bestimmung der Aktivität von Caspase 3/7 wurden je 4 µg Protein mit HEPES-Puffer 1:20 verdünnt und anschließend erneut mit HEPES-Puffer auf ein einheitliches Volumen von 50 µl aufgefüllt und in die Wells einer 96er black-Wall Platte pipettiert. 50 µl des zuvor angesetzten APO-Reagenz wurde in jedes Well pipettiert. Unter Lichtausschluss erfolgten die Messungen der Fluoreszenz mittels eines ELISA-Readers bei 499 nm Exzitationswellenlänge und 521 nm Emissionswellenlänge in einem Abstand von jeweils 30 min für insgesamt 20 h.

#### 2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Western Blot

Hintergrund:

Mit einem Western Blot können bestimmte Zielproteine durch spezifische Antikörperbindungen nachgewiesen werden. Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) trennt zunächst ein Proteingemisch elektrophoretisch nach Molekulargewicht auf. Es erfolgt daraufhin der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran, sodass ein Primärantikörper an ein auf der Membran fixiertes Zielprotein binden kann. Ein Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet und gleichzeitig an ein Enzym gekoppelt ist, wird hinzugegeben. Durch Zugabe des Substrats kann das entsprechende Protein über eine photochemische Reaktion als schwarze Bande dargestellt werden.

---

**Durchführung:**

Es erfolgte zunächst eine Bestimmung der Proteinmenge der jeweiligen Proben mithilfe des Roti-Quant-Assays nach dem Herstellerprotokoll. Jeweils 30 µg Protein/Probe wurde im Verhältnis 3:1 mit Lämmli-Puffer gemischt. Anschließend wurden die Proben für 3 min auf 95°C erhitzt und in die Taschen eines 7 % oder 10 %igen Polyacrylamid-Gels pipettiert. In die letzte Tasche eines jeden Gels kamen 10 µl, die das Gesamtprotein von IMR-32 Zellproben enthielten und als Positivkontrollen dienten. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte im SDS-Laufpuffer für 90 min bei 120 V (40 mA). Anschließend folgte der Transfer bei 4°C und einer angelegten Spannung von 100 V (300 mA) im Western Transblot System auf eine PVDF-Membran, die zuvor durch 100 %iges Methanol aktiviert wurde. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran darauffolgend für 2 h unter Schütteln in 5 % Milch/TBST oder 3 % BSA/TBST gelegt. Daraufhin erfolgte die Auftragung des verdünnten primären Antikörpers (s. Tab. 5), dieser inkubierte über Nacht bei 4°C unter Schütteln auf der Membran. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Antikörperanteil durch dreimaliges Waschen in TBST-Puffer entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde aufgetragen und verweilte für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur auf der Membran. Es folgten drei weitere Waschgänge in TBST und daraufhin die Auftragung von 1,5 ml der ECL-Entwickler-Lösung, die über 5 Minuten unter Bewegung auf der Membran verteilt wurde. Anschließend wurde die Membran aus der Lösung herausgenommen und in Folie eingeschlagen. Die manuelle Filmentwicklung benötigte abhängig von der Signalstärke etwa 10-120 Sekunden Belichtungszeit. Ein High-Performance Chemiluminescence-Film wurde hierfür auf die Membran aufgelegt und diente zur Darstellung der Proteinbanden. Zur Relativierung der Signale von HIF-1α wurde auf den entsprechenden Membranen ein Aktinnachweis durchgeführt, da dieses konstant im Zytoskelett vorhanden ist. Der Aktin-Antikörper inkubierte hierfür 45 min bei Raumtemperatur auf der Membran, der sekundäre Antikörper 1 h. Die Belichtungszeit betrug 1-30 Sekunden. Die entwickelten Bilder wurden eingescannt und die Intensitäten der entsprechenden Proteinbanden mit Hilfe der Software ImageJ analysiert und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Um den Phosphorylierungsstatus des jeweiligen Proteins analysieren zu können, fand eine Relativierung der Intensitäten der phosphorylierten Form auf die Intensitäten der nicht phosphorylierten Form statt (P-Akt/Akt und P-Erk/Erk).

### 2.2.3 Statistische Methoden

Alle Experimente wurden 3-7 mal unabhängig voneinander jeweils als Duplikate durchgeführt. Das Programm GraphPad Prism 5 für Windows diente zur statistischen Auswertung. Zur Prüfung auf eine Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Normality-Test eingesetzt, die Daten wurden ggf. zum Erreichen einer Normalverteilung transformiert. Die Datenanalyse erfolgte unter der Verwendung des Einstichproben-t-Test, des Mehrfachvergleichstests nach Dunnett oder der Ein- bzw. Zweiweg-Varianzanalyse (ANOVA). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$ SEM (Standardfehler) aufgezeigt. Eine Datentransformation fand in folgenden Experimenten statt: 3.1 (X100, logX); 3.2 (X100, logX); 3.3 (X10, logX) und 3.9 ( $\sin^{-1}\sqrt{X}$ ).

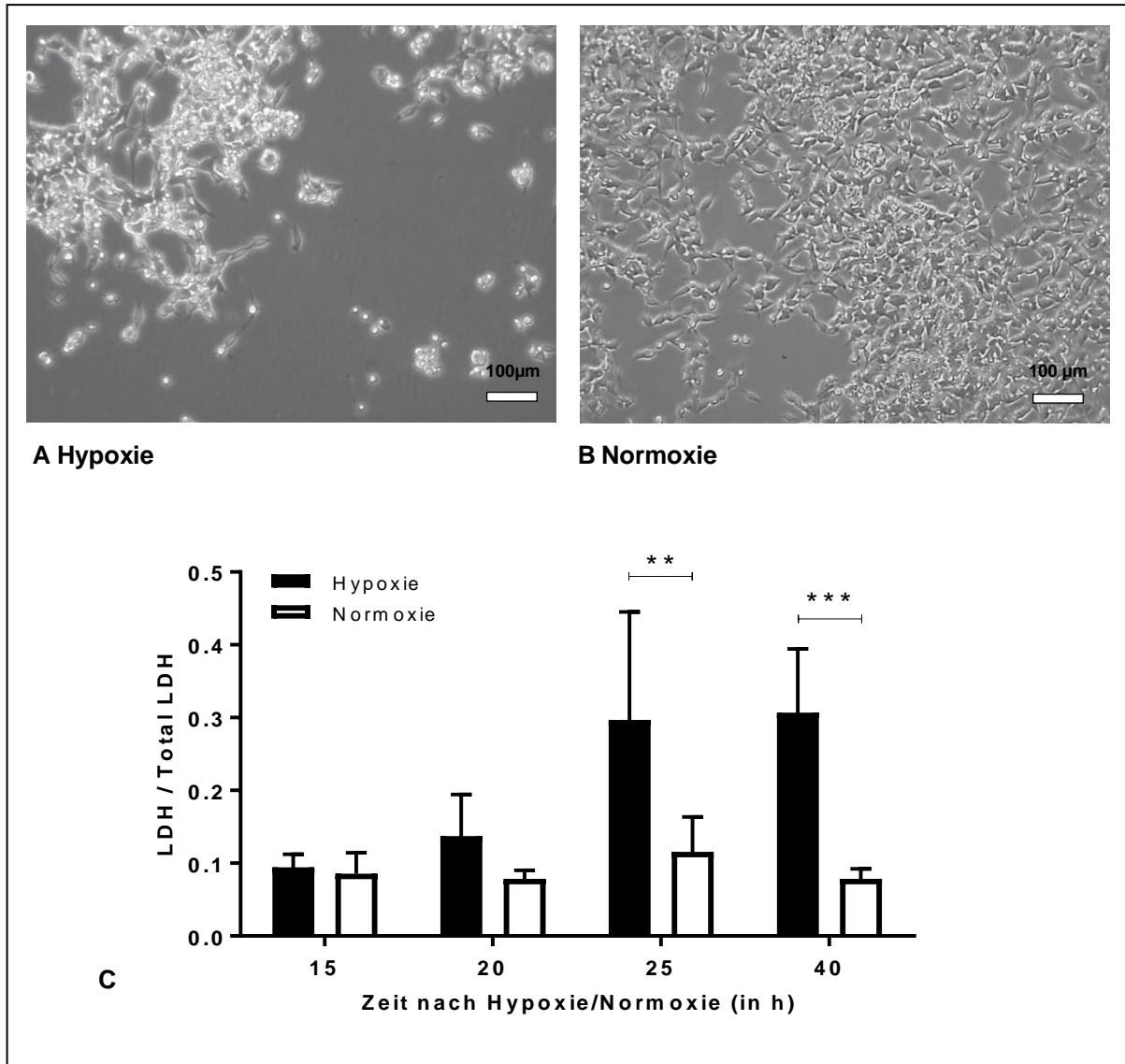
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zeitliche Manifestierung eines Zellschadens nach Hypoxie

In den jeweiligen Experimenten sollte geprüft werden, zu welchem Zeitpunkt nach 7 h Hypoxie unter hypothermen Bedingungen ein detektierbarer Zellschaden in IMR-32 Zellen auftritt, um das zeitliche Setting für die anschließenden Versuche festzulegen. Die IMR-32 Zellen wurden in 12-Well Platten, wie in 2.2.1.2 beschrieben ausgesät und wuchsen 2-3 Tage bis zum Erreichen einer Konfluenz von 40-50 %. Es folgte eine Hypoxie bzw. Normoxie für 7 h und anschließende Beobachtungen durch ein Lichtmikroskop. Bis zu diesem Zeitpunkt ließen sich keine morphologischen Veränderungen der Zellen erkennen (nicht in Abb. gezeigt). Daraufhin inkubierten die Zellen 15, 20, 25 oder 40 h im 33,5°C Brutschrank, woraufhin anschließend eine Mediumabnahme zur Bestimmung der extrazellulären Laktatdehydrogenase erfolgte (s. Abb. 6A). Die LDH diente als Surrogatparameter für die Zellschädigung. Die Zellen nach 15 h und 20 h Hypoxie bzw. Normoxie wiesen kaum morphologische Veränderungen zu den Vorbefunden auf (nicht in Abb. gezeigt). Nach 25 h waren im Lichtmikroskop Veränderungen der Zellen, die einer Hypoxie ausgesetzt waren, sichtbar: Es zeigten sich eine insgesamt geringere Zelldichte, abseits liegende und abgerundete Somata durch partielle oder vollständig abgelöste Zell-Zell-Verbindungen sowie von der Unterlage vollständig gelöste Zellen durch verlorenen Zell-Boden-Kontakt (s. Abb. 8A). In der Kontrollgruppe ohne Hypoxie waren nach 25 h keine derartigen Veränderungen in Anzahl und Morphologie sichtbar. Die Zelldichte war normal und die Zell-Zell-Verbindungen und Zell-Boden-Kontakte wirkten intakt (s. Abb. 8B). Ähnliche Befunde wurden auch nach 40 h detektiert (nicht in Abb. gezeigt). Die LDH Messung ergab einen signifikanten Anstieg der relativen LDH Menge nach 25 h (Hypoxie:  $0,29 \pm 0,15$ ;  $P < 0,01$  vs. Normoxie:  $0,11 \pm 0,06$ ) sowie nach 40 h (Hypoxie:  $0,31 \pm 0,09$ ;  $P < 0,001$  vs. Normoxie:  $0,08 \pm 0,01$ ). Zu früheren Zeitpunkten, nach 15 h (Hypoxie:  $0,09 \pm 0,02$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $0,09 \pm 0,03$ ) und 20 h (Hypoxie:  $0,14 \pm 0,06$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $0,08 \pm 0,02$ ), fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der LDH-Freisetzung zwischen den mit Hypoxie- und Normoxie behandelten IMR-32 Zellen (s. Abb. 8C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in IMR-32 Zellen ein enzymatisch induzierter Hypoxieschaden nach 7 h Hypoxie und 25 h Hypothermie sowohl mor-

phologisch als auch biochemisch detektierbar war. Basierend auf diesen Befunden wurde in allen weiteren Experimenten eine Hypoxiezeit von 7 h mit anschließend 25 h Hypothermie eingesetzt.



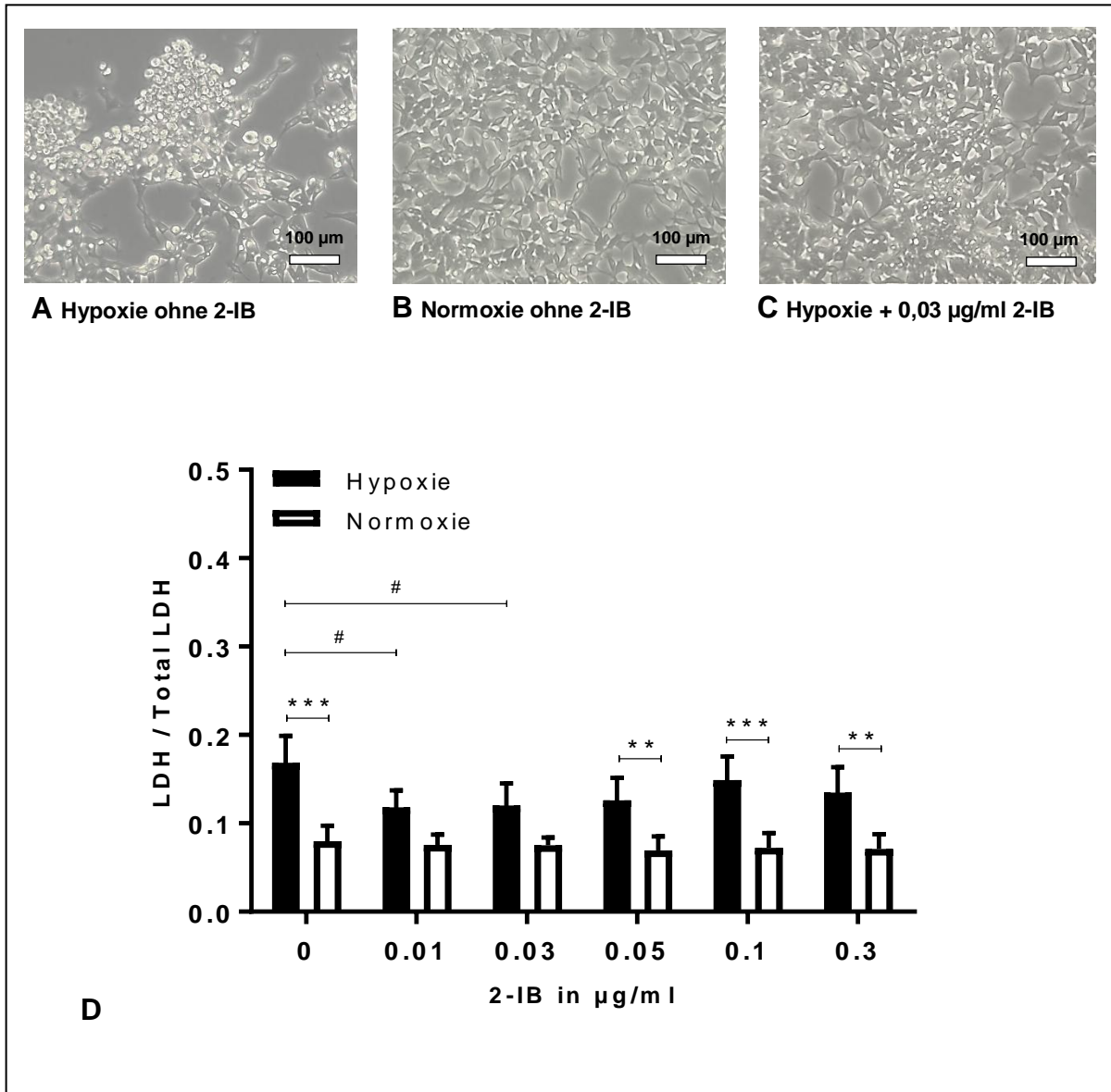
### Abbildung 8: Zellmorphologie und LDH-Freisetzung

Nach 7 h Hypoxie und 25 h Hypothermie zeigen sich morphologische Veränderungen (**A**): geringere Zelldichte, abseits liegende Somata durch abgelöste Zell-Zell-Verbindungen und verlorenen Zell-Boden-Kontakt. Nach 7 h Normoxie (**B**) sind keine sichtbaren morphologische Veränderungen vorhanden. Die LDH-Freisetzung ist nach 25 h und 40 h im Vergleich zur Normoxie nach Hypoxie signifikant erhöht (**C**). Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  vs. Normoxie.



### 3.2 Wirkung von 2-Iminobiotin auf den hypoxieinduzierten Zellschaden

Die IMR-32 Zellen wurden nach 7 h Hypoxie mit verschiedenen 2-IB Konzentrationen versetzt (0-0,3  $\mu\text{g/ml}$ ) und inkubierten 25 h in Hypothermie (s. Abb. 6B). Am Versuchsende erfolgte eine optische Beurteilung mit dem Lichtmikroskop: Die Zellen nach induzierter Hypoxie und ohne Zugabe von 2-IB (s. Abb. 9A) wiesen wie schon in den Vorversuchen erkennbare, morphologische Veränderungen auf (s. Abb. 8A). Die Zellen ohne Hypoxie sowie ohne Zugabe von 2-IB zeigten eine normale Morphologie mit entsprechender Konfluenz (s. Abb. 9B). Ein ähnliches Bild ließen auch die Zellen nach Hypoxie mit 0,01 und 0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB erkennen: Stabile Zell-Zell- und Zell-Boden Kontakte (s. Abb. 9C). Durch Bestimmung der Konzentration der extrazellulären LDH, welche proportional zur Anzahl geschädigter Zellen ist, wurde der Zellschaden laborchemisch quantifiziert. In der Kontrollgruppe ohne 2-IB ergab sich nach Hypoxie ein signifikanter Anstieg der extrazellulären LDH (**0  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,17 \pm 0,03$ ;  $P < 0,001$  vs. Normoxie:  $0,08 \pm 0,02$ ). Ebenfalls signifikant angestiegen war die LDH in den Konzentrationen 0,05; 0,1 und 0,3  $\mu\text{g/ml}$  2-IB nach Hypoxie gegen Normoxie (**0,05  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,13 \pm 0,03$ ;  $P < 0,01$  vs. Normoxie:  $0,07 \pm 0,02$ ; **0,1  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,15 \pm 0,03$ ;  $P < 0,001$  vs. Normoxie:  $0,07 \pm 0,02$ ; **0,3  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,14 \pm 0,03$ ;  $P < 0,01$  vs. Normoxie:  $0,07 \pm 0,02$ ). Die Konzentrationen 0,01 und 0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB zeigten ebenfalls einen Anstieg unter Hypoxie, wiesen jedoch keine Signifikanz gegen Normoxie auf (**0,01  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,12 \pm 0,02$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $0,08 \pm 0,01$ ; **0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,12 \pm 0,03$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $0,08 \pm 0,01$ ). Zudem konnte signifikante LDH-Verringerung der mit Hypoxie behandelten Zellen mit 0,01 und 0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB gegen die Kontrollgruppe ohne 2-IB nach Hypoxie gezeigt werden (**0,01  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,12 \pm 0,02$ ;  $P < 0,05$  vs. 0  $\mu\text{g/ml}$  2-IB: Hypoxie  $0,17 \pm 0,02$ ; **0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,12 \pm 0,03$ ;  $P < 0,05$  vs. 0  $\mu\text{g/ml}$  2-IB: Hypoxie  $0,17 \pm 0,02$ ) (s. Abb. 9D).



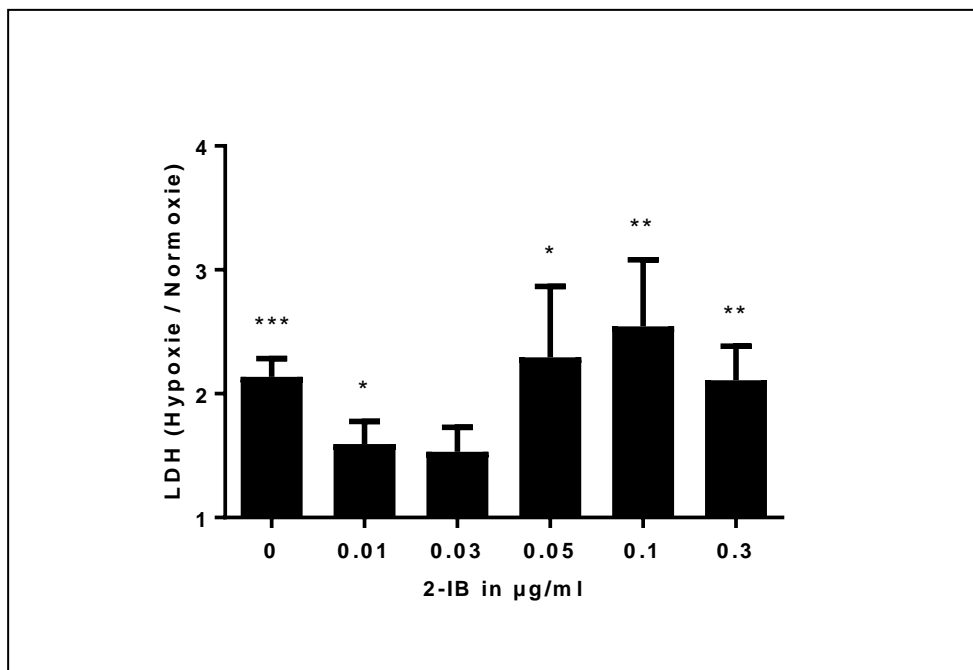
**Abbildung 9: Zellmorphologie und LDH-Freisetzung**

(A) Die Zellen zeigen nach Hypoxie ohne Gabe von 2-IB eine veränderte Morphologie, die charakterisiert ist durch geringere Zelldichte und gelöste Zell-Zell- sowie Zell-Boden Verbindungen. (B) Nach Normoxie ist keine morphologische Veränderung der Zellen, die kein 2-IB erhalten haben, sichtbar. (C) Die Zellen nach Hypoxie und anschließender 2-IB Gabe in einer Konzentration von 0,03 µg/ml sind ebenfalls nicht sichtbar morphologisch verändert. (D) Kein signifikanter LDH-Anstieg nach Hypoxie im Vergleich zur Normoxie liegt bei den 2-IB Konzentrationen von 0,01 und 0,03 µg/ml vor. Im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Hypoxie ohne 2-IB ist die LDH nach Hypoxie mit 0,01 und 0,03 µg/ml 2-IB signifikant verringert. Die Balken zeigen den Mittelwert +/- SEM; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 vs. Normoxie; #P<0,05 vs. 0 µg/ml 2-IB nach Hypoxie.

Abbildung 10 zeigt den Quotienten aus Hypoxie und Normoxie und damit den relativen LDH-Anstieg nach Hypoxie. Die IMR-32 Zellen mit 0; 0,01; 0,05; 0,1 und 0,3

$\mu\text{g/ml}$  2-IB zeigten signifikant gesteigerte relative LDH-Freisetzung (**0  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $2,14 \pm 0,15$ ;  $P < 0,001$  vs. Normoxie=1; **0,01  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $1,59 \pm 0,18$ ;  $P < 0,05$  vs. Normoxie=1; **0,05  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $2,30 \pm 0,57$ ;  $P < 0,05$  vs. Normoxie=1; **0,1  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $2,54 \pm 0,54$ ;  $P < 0,01$  vs. Normoxie=1; **0,3  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $2,11 \pm 0,28$   $P < 0,01$ ; vs. Normoxie=1). Die IMR-32 Zellen mit 0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB-Zugabe wiesen den geringsten und statistisch nicht signifikanten relativen LDH-Anstieg auf (**0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $1,53 \pm 0,20$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie=1)(s. Abb. 10).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass 2-IB in einer Konzentration von 0,03  $\mu\text{g/ml}$  unter hypothermen Bedingungen die nach Hypoxie gesteigerte LDH-Freisetzung in den Extrazellulärraum verringert, welche proportional zum Zellschaden der IMR-32 Zellen ist.



**Abbildung 10: Relative LDH-Freisetzung**

Die Probe mit 0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB zeigt keine signifikante relative LDH-Erhöhung gegen Normoxie.

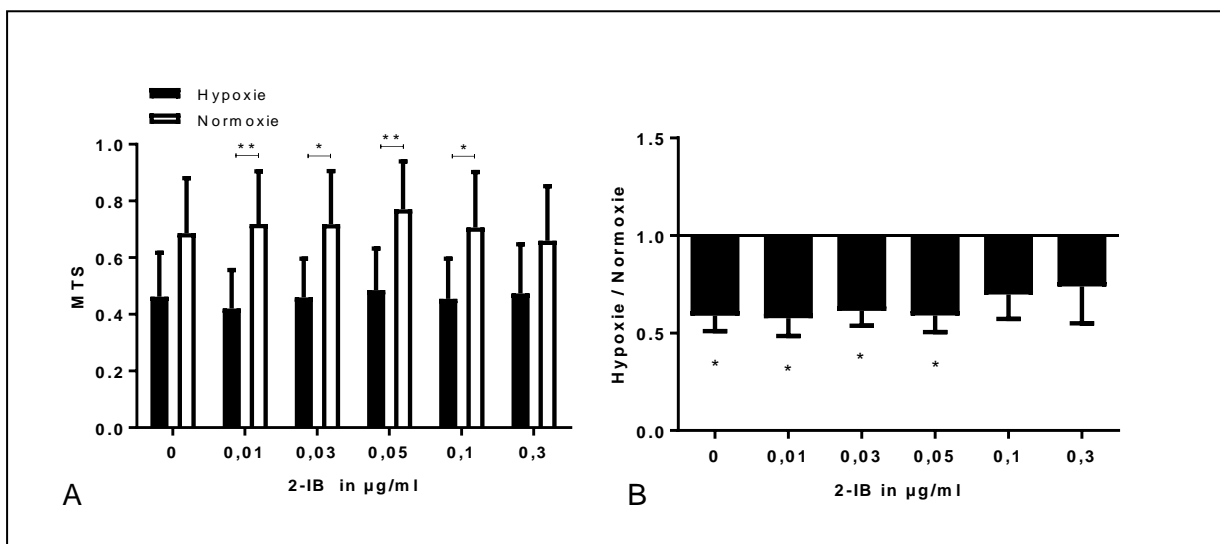
Die Balken entsprechen den Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  vs. Normoxie=1.

### 3.3 Wirkung von 2-Iminobiotin auf die metabolische Zellaktivität

In den nachfolgenden Versuchen wurde die metabolische Zellaktivität unter hypothermen Bedingungen und 2-IB Gabe untersucht. Die IMR-32 Zellen wurden wie in vorherigen Versuchen nach 7 h Hypoxie/Normoxie mit verschiedenen 2-IB Konzentrationen versetzt (0-0,3  $\mu\text{g/ml}$ ) und inkubierten anschließend 25 h unter hypothermen

Bedingungen (s. Abb. 6B). Zur Messung der metabolischen Zellaktivität diente ein MTS-Assay. Die Proben mit 0,01-0,1  $\mu\text{g/ml}$  2-IB zeigten nach Hypoxie eine signifikante Reduktion der metabolischen Zellaktivität (**0  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,46 \pm 0,15$  ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $0,69 \pm 0,19$  ; **0,01  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,42 \pm 0,14$ ;  $P < 0,01$  vs. Normoxie:  $0,72 \pm 0,19$ ; **0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,46 \pm 0,14$ ;  $P < 0,05$  vs. Normoxie:  $0,72 \pm 0,19$ ; **0,05  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,49 \pm 0,15$ ;  $P < 0,01$  vs. Normoxie:  $0,77 \pm 0,17$ ; **0,1  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,45 \pm 0,14$ ;  $P < 0,05$  vs. Normoxie:  $0,71 \pm 0,20$ ; **0,3  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:** Hypoxie:  $0,47 \pm 0,17$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $0,66 \pm 0,19$ ) (s. Abb. 11A). In der Auftragung Hypoxie/Normoxie, die den relativen Abfall der metabolischen Zellaktivität darstellt, konnte auch für die Kontrollgruppe ohne 2-IB eine Signifikanz nach Hypoxie gegen Normoxie als Positivkontrolle erreicht werden (**0  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $0,59 \pm 0,08$ ;  $P < 0,05$  vs. Normoxie=1; **0,01  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $0,58 \pm 0,09$ ;  $P < 0,05$  vs. Normoxie=1; **0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $0,61 \pm 0,08$ ;  $P < 0,05$  vs. Normoxie=1; **0,05  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $0,59 \pm 0,21$ ;  $P < 0,05$  vs. Normoxie=1; **0,1  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $0,70 \pm 0,31$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie=1; **0,3  $\mu\text{g/ml}$  2-IB:**  $0,74 \pm 0,46$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie=1)(s. Abb. 11).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der metabolischen Aktivität der Zellen nach Hypoxie unter hypothermen Bedingungen unabhängig von 2-IB stattfand.



**Abbildung 11: Metabolische Zellaktivität**

Abbildung **A**: Die metabolische Zellaktivität ist in allen Proben nach Hypoxie verringert. Signifikant gegen Normoxie verringert sind die Proben mit 0,01-0,1  $\mu\text{g/ml}$  2-IB. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  vs. Normoxie.

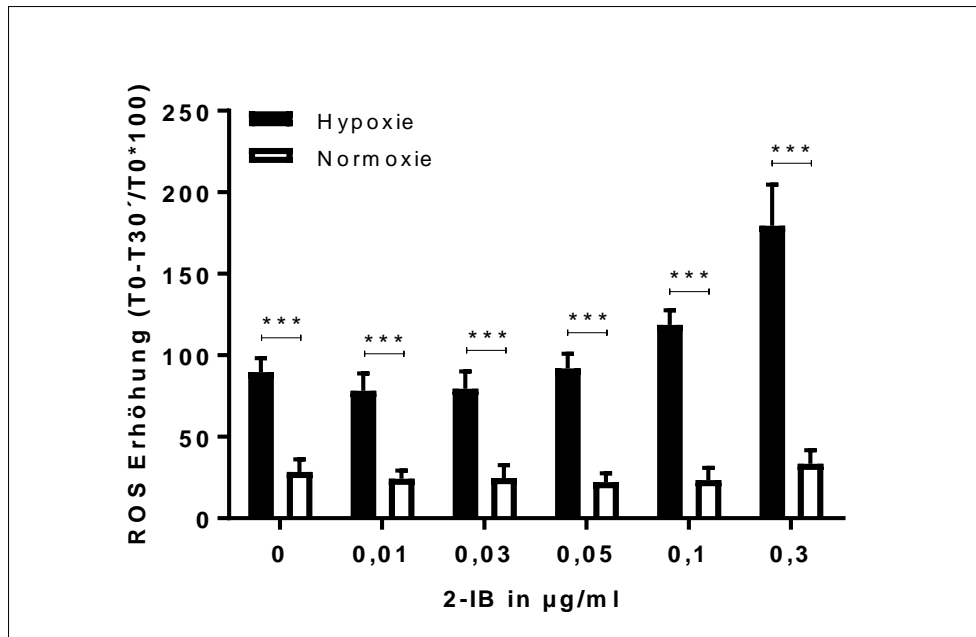
In Abbildung **B** ist die relative Verminderung der metabolischen Zellaktivität nach Hypoxie gezeigt. Signifikant gegen Normoxie sind die Konzentrationen 0,01-0,05  $\mu\text{g/ml}$  2-IB sowie die Probe ohne 2-IB. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $P < 0,05$  vs. 1 (Normoxie=1).

### 3.4 Wirkung von 2-Iminobiotin auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

Zur Untersuchung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nach Hypoxie unter Hypothermie und 2-IB Gabe wurden die IMR-32 Zellen wie in den Vorversuchen mit einer 7-stündigen Hypoxie/Normoxie und anschließender Inkubation behandelt (s. Abb. 6B). Am Ende des Versuchs wurden die freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit dem ROS-Assay quantitativ bestimmt. In allen Proben zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ROS nach Hypoxie im Vergleich zur Normoxie (**0 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $89,72 \pm 8,50$ ;  $P > 0,001$  vs. Normoxie:  $28,40 \pm 7,81$ ; **0,01 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $78,42 \pm 10,56$ ;  $P < 0,001$  vs. Normoxie:  $35 \pm 4,84$ ; **0,03 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $79,56 \pm 10,58$ ;  $P < 0,001$  vs. Normoxie:  $24,73 \pm 7,93$ ; **0,05 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $91,94 \pm 8,91$ ;  $P < 0,001$  vs. Normoxie:  $22,14 \pm 5,37$ ; **0,1 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $118,62 \pm 8,91$ ;  $P < 0,001$  vs. Normoxie:  $23,39 \pm 7,50$ ; **0,3 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $179,38 \pm 25,40$ ;  $P < 0,001$  vs. Normoxie:  $33,53 \pm 8,27$ ). Die Proben mit den Konzentrationen 0,01 und 0,03 µg/ml 2-IB setzten tendenziell unter Hypoxie weniger ROS frei als die Kontrollgruppe ohne 2-IB (s. Abb. 12).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es in allen Proben nach Hypoxie unter hypothermen Bedingungen eine signifikante Erhöhung von ROS unabhängig von der 2-IB Konzentration gab.

Basierend auf den Daten aus Messungen von LDH, MTS und ROS sind in den weiteren Versuchen nur noch drei ausgewählte 2-IB Konzentrationen (0; 0,03 und 0,5 µg/ml) verwendet worden. Die Proben mit 0 µg/ml 2-IB dienen als Kontrollgruppe, die Konzentration 0,03 µg/ml 2-IB war die bisher effektivste Dosis. Die Konzentration 0,5 µg/ml 2-IB wurde als Höchstdosis verwendet.



**Abbildung 12: Einfluss von 2-IB auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies**

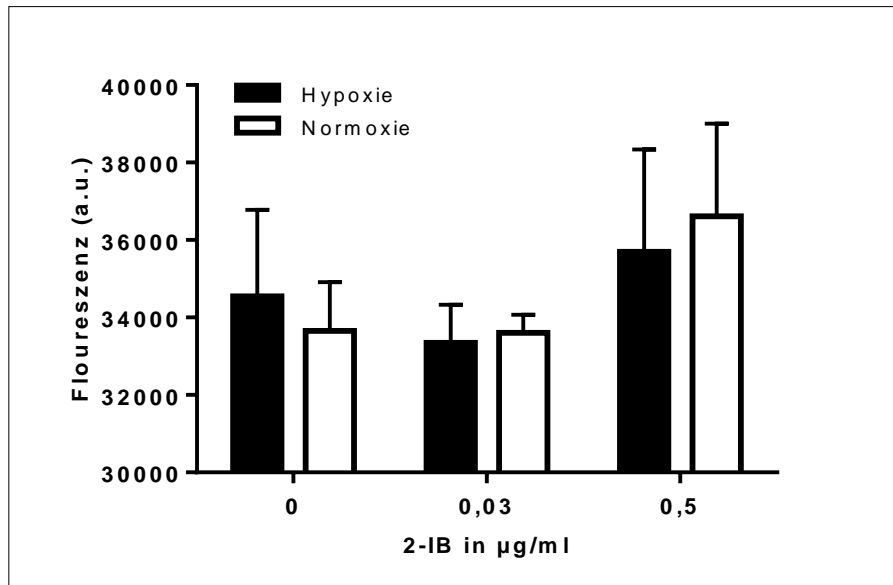
Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ist in allen Proben nach Hypoxie signifikant erhöht. Die Balken zeigen den Mittelwert +/- SEM, \*\*\*P < 0,001 vs. Normoxie.

### 3.5 Regulation von Caspase 3/7 durch 2-Iminobiotin

Die Caspasen 3 und 7 sind Effektorcaspasen, welche durch Induktion weiterer Caspasen zur Apoptose der Zellen führen<sup>32</sup>. Die Aktivität der Caspase 3/7 wurde mit dem APO-Assay (Apoptose-Assay) bestimmt. Vorher wurden die IMR-32 Zellen nach 7 h Hypoxie bzw. Normoxie mit 2-IB versetzt und inkubierten 25 h in Hypothermie woraufhin eine Zelllyse und Proteinisolation stattfand (s. Abb. 6B)

In den Proben ohne 2-IB zeigte sich nach Hypoxie gegen Normoxie ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Caspase Aktivität (**0 µg/ml 2-IB: Hypoxie:** 34546,50 ± 2232,67; P > 0,05 vs. Normoxie: 33657,25 ± 1256,78). Die Proben mit 0,03 µg/ml 2-IB wiesen nach Hypoxie keine signifikant veränderte Caspase Aktivität verglichen gegen Normoxie auf. (**0,03 µg/ml 2-IB:** Hypoxie: 33347,25 ± 978,52; P > 0,05 vs. Normoxie: 33606,50 ± 460,44). Die Zellen, die 0,5 µg/ml 2-IB enthielten, zeigten eine nicht signifikant erhöhte Caspase Aktivität (**0,5 µg/ml 2-IB :** Hypoxie: 35694,50 ± 2641,73; P > 0,05 vs. Normoxie: 36608 ± 2395,72)(s. Abb. 13).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass 2-IB unter hypothermen Bedingungen nach Hypoxie die Aktivität von Caspase 3/7 nicht signifikant beeinflusst.



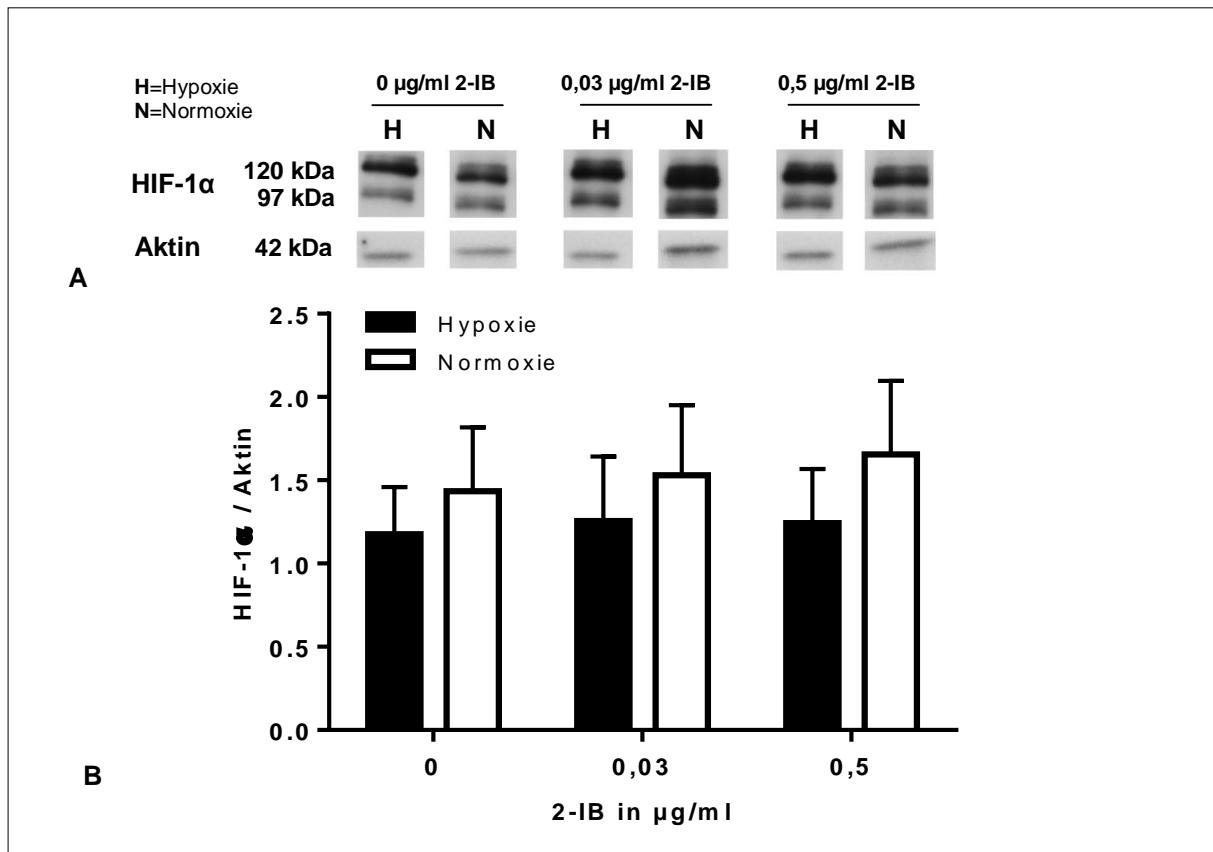
**Abbildung 13: Regulation der Aktivität von Caspase 3/7 durch 2-IB**

Die Aktivität von Caspase 3 und 7 ist nach Hypoxie unter hypothermen Bedingungen nicht signifikant durch 2-IB verändert. Die Balken zeigen den Mittelwert +/- SEM.

### 3.6 Regulation von HIF-1 $\alpha$ durch 2-Iminobiotin

Die Aktivierung und Akkumulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  wird physiologisch durch Hypoxie stimuliert<sup>18,19</sup>. Um die Wirkung von 2-Iminobiotin auf HIF-1 $\alpha$  unter hypothermen Bedingungen zu evaluieren, fand eine Zellyse und Proteinisolation der zuvor behandelten IMR-32 Zellen statt (s. Abb. 6B). Die Detektion von HIF-1 $\alpha$  in den verschiedenen Proben erfolgte mittels Western Blots. HIF-1 $\alpha$  konnte in allen Proben nachgewiesen werden, die Unterschiede der Signalintensitäten zwischen Hypoxie und Normoxie waren nicht signifikant (**0 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $1,18 \pm 0,28$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $1,44 \pm 0,38$ ; **0,03 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $1,26 \pm 0,39$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $1,53 \pm 0,42$ ; **0,5 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $1,24 \pm 0,33$ ;  $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $1,66 \pm 0,44$ )(s. Abb. 14).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass HIF-1 $\alpha$  nach 7 h Hypoxie bzw. Normoxie und 25 h Hypothermie in allen Proben detektiert werden konnte. Ein Effekt durch 2-IB unter hypothermen Bedingungen war nicht nachweisbar.



**Abbildung 14: Regulation von HIF-1α durch 2-IB**

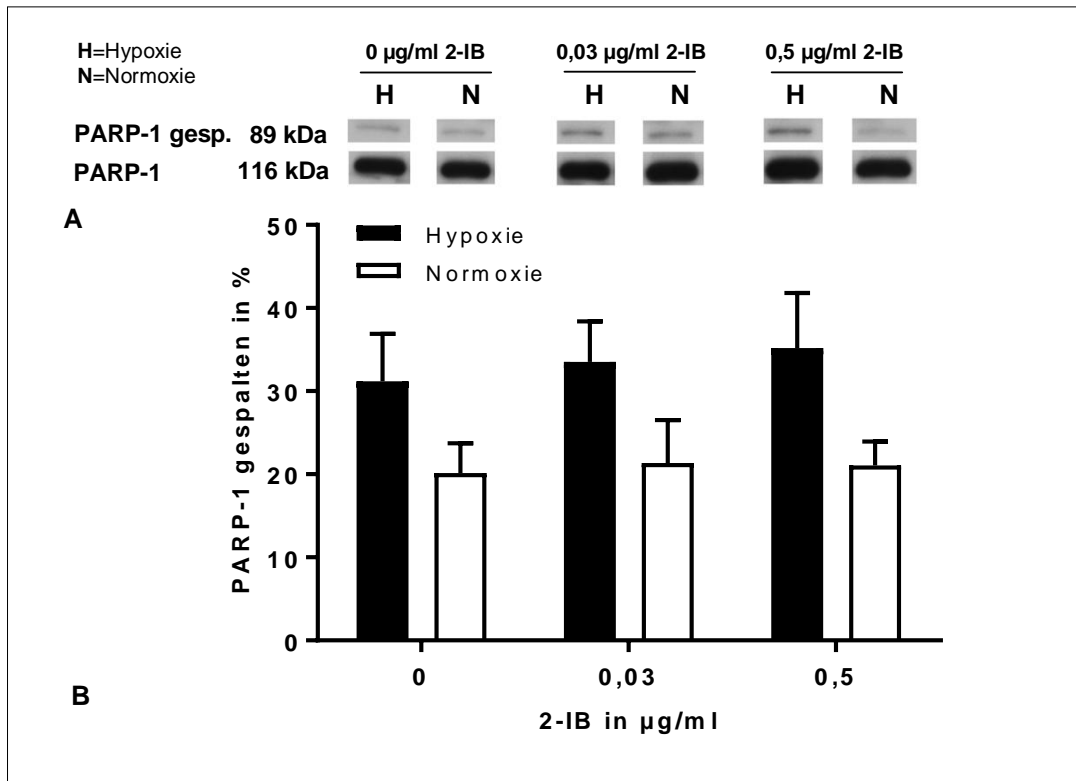
HIF-1α konnte in allen Proben detektiert werden, ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt (A). Zur Relativierung der Signalintensität diente ein Blot für Aktin. HIF-1α weist keine signifikanten Unterschiede in den Signalintensitäten im Vergleich Hypoxie gegen Normoxie auf (B). Die Balken entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 3.7 Spaltung von PARP-1 durch 2-Iminobiotin

PARP-1 ist ein Enzym, das unter anderem die DNA-Reparatur nach Strangbrüchen katalysiert<sup>20</sup>. In gespaltenen Form ist PARP-1 inaktiviert<sup>21</sup>. Um die Wirkung von 2-IB auf PARP-1 unter hypothermen Bedingungen in vitro zu evaluieren, wurde ein Western Blot mit zuvor behandelten IMR-32 Zellen durchgeführt (s. Abb. 6B). PARP-1 konnte gespalten sowie ungespalten in allen Proben nachgewiesen werden. Nach Hypoxie war die Menge an gespaltenem PARP-1 in allen Proben erhöht, wies jedoch keine Signifikanz im Vergleich zu den mit Normoxie behandelten Zellen auf (**0 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $31,17 \pm 5,71$   $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $20,16 \pm 3,59$ ; **0,03 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $33,54 \pm 4,87$   $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $21,36 \pm 5,16$ ; **0,5 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:  $35,18 \pm 6,64$   $P > 0,05$  vs. Normoxie:  $21,08 \pm 2,88$ ) (s. Abb. 15).



Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es keine signifikante Steigerung der gespaltenen PARP-1 Menge nach Hypoxie unter hypothermen Bedingungen unabhängig von der 2-IB-Konzentration gab.



**Abbildung 15: Spaltung von PARP-1 durch 2-IB**

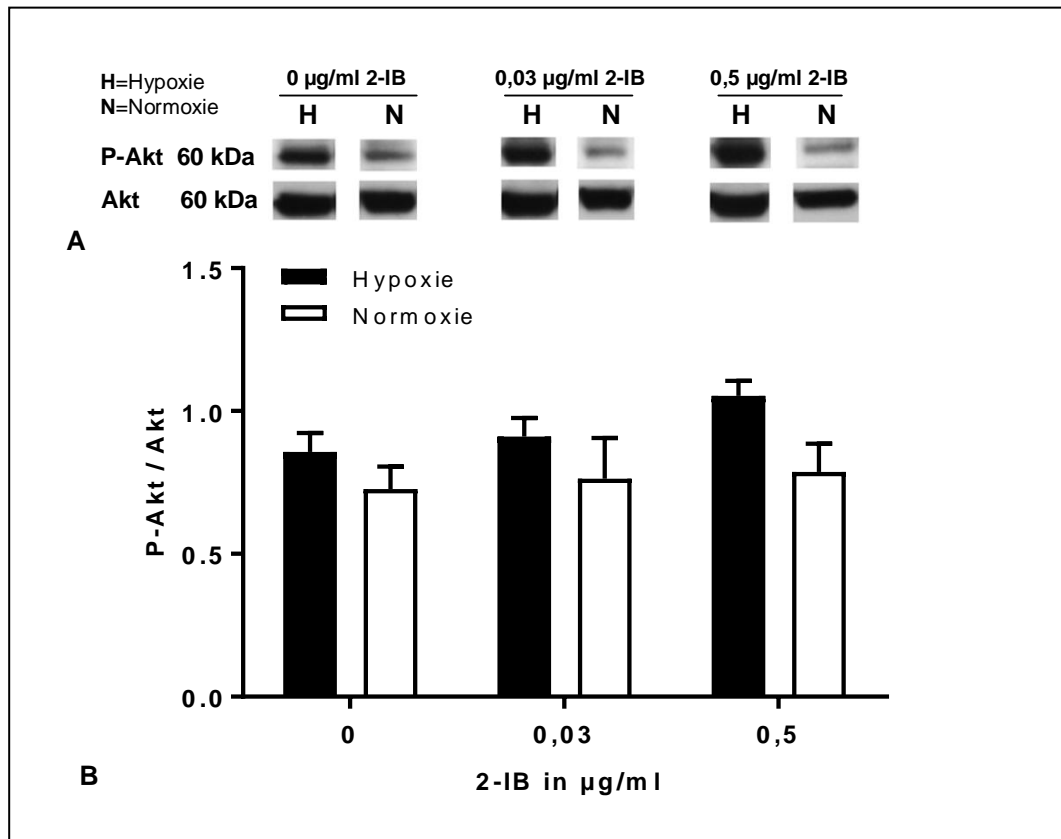
Die PARP-1 konnte in allen Proben detektiert werden, ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt (A). Quantifizierung des Anteils von gespaltenener PARP-1 (B). Nach Hypoxie ist die Menge an gespaltenener PARP-1 in allen Proben leicht gesteigert. Die Balken zeigen den Mittelwert +/- SEM.

### 3.8 Phosphorylierung von Akt durch 2-Iminobiotin

Akt ist eine im Zytoplasma vorkommende Kinase, die durch Phosphorylierung (zu P-Akt) aktiviert wird und unter anderem anti-apoptotische Signale vermittelt<sup>24</sup>. Zur Untersuchung der Regulation von Akt durch 2-Iminobiotin ist dieses nach 7 h Hypoxie für 2 h unter hypothermen Bedingungen in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben worden, woraufhin eine Zellyse und Proteinisolierung stattfand (s. Abb. 6B). Mit einem Western Blot wurde die vorhandene Menge an P-Akt und Akt bestimmt und anschließend relativiert, sodass die phosphorylierte und aktive Form in den verschiedenen Proben quantifiziert werden konnte. P-Akt und Akt konnten in allen Proben nachgewiesen werden. Nach Hypoxie war ein leichter Anstieg von P-Akt erkennbar, der keine Signifikanz gegen Normoxie zeigte (**0 µg/ml 2-IB**: Hypoxie:

0,86 ± 0,07; P>0,05 vs. Normoxie: 0,73 ± 0,08; **0,03 µg/ml 2-IB**: Hypoxie: 0,91 ± 0,07; P>0,05 vs. Normoxie: 0,76 ± 0,14; **0,5 µg/ml 2-IB**: Hypoxie: 1,05 ± 0,05; P>0,05 vs. Normoxie: 0,79 ± 0,10)(s. Abb. 16).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Akt keine signifikant erhöhte Phosphorylierung nach Hypoxie unter hypothermen Bedingungen, unabhängig von der 2-IB-Konzentration, aufwies.



**Abbildung 16: Phosphorylierung von Akt durch 2-IB**

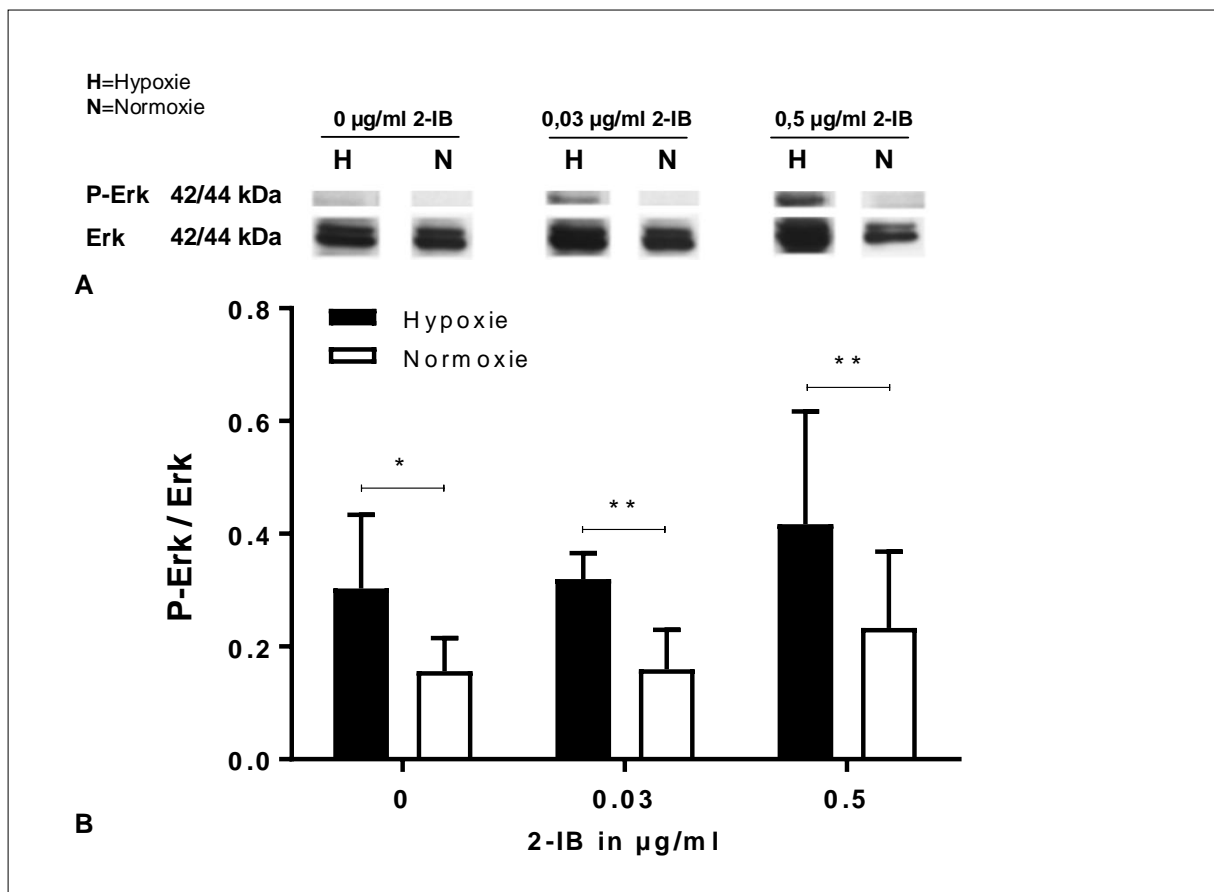
Akt und P-Akt konnten in allen Proben detektiert werden, ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt (A). Nach Hypoxie ist die Menge an P-Akt in allen Proben leicht erhöht. Die Balken zeigen den Mittelwert +/- SEM.

### 3.9 Phosphorylierung von Erk durch 2-Iminobiotin

Erk gehört zur Gruppe der Mitogen-aktivierten-Kinasen (MAP-Kinasen) und wird durch Phosphorylierung (zu P-Erk) aktiviert. Anschließend kann P-Erk unter anderem inhibierend auf pro-apoptotische Faktoren der Zelle einwirken<sup>46,31</sup>. Zur Untersuchung der Regulation von Erk durch 2-IB wurden nach 7 h Hypoxie verschiedene 2-IB Konzentrationen auf die Zellen gegeben. Nach anschließender 2-stündiger Inku-

bation in Hypothermie fand eine Proteinisolierung statt (s. Abb. 6B). Anhand von Western Blots wurde die vorhandene Menge an P-Erk und Erk bestimmt und anschließend relativiert. Es zeigte sich nach Hypoxie in allen Proben ein signifikanter Anstieg an P-Erk gegen Normoxie (**0  $\mu\text{g/ml}$  2-IB**: Hypoxie:  $0,30 \pm 0,08$ ;  $P < 0,05$  vs. Normoxie:  $0,16 \pm 0,03$ ; **0,03  $\mu\text{g/ml}$  2-IB**: Hypoxie:  $0,32 \pm 0,03$ ;  $P < 0,01$  vs. Normoxie:  $0,16 \pm 0,04$ ; **0,5  $\mu\text{g/ml}$  2-IB**: Hypoxie:  $0,42 \pm 0,12$ ;  $P < 0,01$  vs. Normoxie:  $0,23 \pm 0,08$ )(s. Abb. 17).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Menge an P-Erk nach Hypoxie unter hypothermen Bedingungen signifikante Steigerung aufwies, was unabhängig von der 2-IB-Konzentration war.



**Abbildung 17: Phosphorylierung von Erk durch 2-IB**

Darstellung eines repräsentativen Western Blots von P-Erk und Erk (A). Nach Hypoxie ist die Menge an P-Erk in allen Proben signifikant gegen Normoxie erhöht (B). Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  vs. Normoxie.

## 4 Diskussion

### 4.1 Eigenschaften des verwendeten in-vitro Modells

Die Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie sollte bestmöglich und reproduzierbar in ein in-vitro Modell projiziert werden. IMR-32 Zellen sind Vorläuferzellen sympathischer Ganglien, die nach Differenzierung große Projektionen kortikaler Neurone darstellen<sup>46</sup>. Morphologische Veränderungen des zerebralen Kortex nach HIE konnten bereits in Studien nachgewiesen werden: Betroffene Neugeborene zeigten magnetresonanz-tomografische Schädigungen in kortikalen Arealen 72 h postnatal in Form von Hyperintensitäten im diffusions-gewichteten Bild<sup>47,48</sup>. Auch in Tierexperimenten mit neonatalen Ratten waren lichtmikroskopisch 48 h nach Hypoxie zellmorphologische Veränderungen des Kortex in Form von Nekrosen und Apoptose sichtbar<sup>47</sup>. Eine veränderte Morphologie nach Hypoxie zeigten auch die IMR-32 Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, in Form von verminderter Konfluenz, Zell-Zellkontaktlösung und Zell-Bodenkontaktlösung. Die HIE kann somit zumindest teilweise durch das in-vitro Modell repräsentiert werden.

Hierüber ließen sich die Phasen der HIE im in-vitro Modell mit IMR-32 Zellen nachvollziehen: Zu Beginn ereignet sich die primäre Phase, die durch Zellnekrose während der akuten Hypoxie charakterisiert ist<sup>7</sup>. Im in-vitro Modell wurde die akute Hypoxie für 7 h eingesetzt. Dieser Zeitraum wurde basierend auf Erfahrungswerten vorheriger Hypoxiestudien unseres Instituts ausgewählt<sup>38,42,49</sup>. Im direkt auf die Hypoxie folgenden Zeitraum findet die Reoxygenierung statt und ist die latente Phase, die in vivo bis zu 6 h andauert<sup>6,8</sup>. Die latente Phase stellte in dem in-vitro-Modell die 25-stündige hypotherme Postinkubationszeit in Normoxie dar. Anschließend folgt die sekundäre Phase des neuronalen Zelluntergangs, der sich aus den bereits initiierten, in die Apoptose führenden Signalkaskaden ergibt. In dem IMR-32-Zellmodell wurde der sekundäre neuronale Untergang durch die Bestimmung der freigesetzten Laktatdehydrogenase evaluiert. Ein signifikanter Zellschaden war erst nach 25 h Inkubationszeit in Hypothermie messbar. Im terminalen Stadium der Apoptose erfolgt eine Lyse apoptotischer Körperchen und ihrer Membran, wodurch sich ein erst später, jedoch massiver Anstieg der extrazellulär gemessenen LDH erklären lässt<sup>50</sup>. Die Postinkubationszeit bis zum detektierbaren Zellschaden wurde auf 25 h nach 7 h Hypoxie angepasst, was sich durch die hypothermen Bedingungen ergab. Vorherige

Studien unseres Instituts mit IMR-32 Zellen ohne Hypothermie zeigten nach 7 h Hypoxie und anschließender 17 h andauernder Inkubation unter normothermen Bedingungen bereits eine signifikante LDH-Steigerung<sup>38</sup>.

Es konnte nach diesen Versuchen gezeigt werden, dass der Zeitraum zwischen Ende der Hypoxie bis zum messbaren Zellschaden, der mit der latenten Phase vergleichbar ist, durch Hypothermie verlängert wird.

Die Hypothermie hat sich in-vivo als bisherige neuroprotektive Therapie der Wahl für die HIE etabliert<sup>7</sup>. Dies wurde in unserem in-vitro Modell bewusst nicht weiter isoliert untersucht, da die Zielsetzung der Arbeit darin bestand, die Effekte des 2-IB in Kombination mit Hypothermie zu beurteilen und mögliche additive Neuroprotektion durch 2-IB evaluieren zu können.

#### 4.2 Effekte von 2-IB und Hypothermie auf den hypoxieinduzierten Zellschaden

Die IMR-32 Zellen wurden nach Beendigung der Hypoxie mit verschiedenen 2-IB Konzentrationen versetzt. Die ausgewählten Konzentrationen hatten teilweise in vorherigen Studien unseres Instituts, die unter normothermen Bedingungen durchgeführt wurden, Effekte in Form von reduziertem hypoxieinduzierten Zellschaden gezeigt<sup>38</sup>. In dieser Arbeit war in Proben mit den 2-IB Konzentrationen 0,01 und 0,03 µg/ml ebenso ein signifikant reduzierter hypoxieinduzierter Zellschaden durch LDH-Assays messbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass 2-IB auch unter Hypothermie neuroprotektiv wirkt. Die in diesem Zusammenhang beobachtete Morphologie ist hierfür ein weiterer Hinweis. Protektive Effekte nach Hypoxie durch 2-IB konnten bereits in-vivo durch Perrone et al. sowie Peeters-Scholte et al. gezeigt werden, was auf die selektive Inhibition der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) als Wirkmechanismus zurückgeführt wurde<sup>2,14</sup>. Da 2-Iminobiotin durch seine Guanidino- und Carboxylgruppe strukturähnliche Merkmale zu L-Arginin aufweist, wird es in der Nähe des aktiven Zentrums der NOS gebunden, kann jedoch als Substrat nicht umgesetzt werden. Es entsteht eine kompetitive reversible Hemmung, unter der kein Stickstoffmonoxid freigesetzt wird. 2-IB hemmt selektiv die induzierbare und die neuronale NOS<sup>2,51</sup>. Fujisawa et al. zeigten jedoch, dass die IMR-32 Zelllinie, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, keine detektierbare Aktivität an NOS aufweist<sup>52</sup>. Der Effekt der Neuroprotektion durch selektive NOS Inhibition als Wirkmechanismus lässt sich

somit auf die verwendeten IMR-32 Zellen nicht übertragen. Somit besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass 2-IB über weitere Wirkmechanismen verfügt. Eine Studie von Nijboer et al. stellte ebenfalls einen neuroprotektiven Effekt durch 2-Iminobiotin ohne Reduktion der zerebralen Stickstoffmonoxidkonzentration fest<sup>40</sup>.

In dieser Arbeit wurden weitere mögliche Mechanismen zur Erklärung der Verringerung des Zellschadens durch 2-Iminobiotin in Betracht gezogen und untersucht.

#### 4.3 Effekte von 2-IB und Hypothermie auf Zellmetabolismus und Apoptose

In den Versuchen dieser Arbeit zeigten die IMR-32 Zellen unter hypothermen Bedingungen nach Hypoxie unabhängig von der 2-IB Konzentration verringerte metabolische Aktivität. In der Literatur werden sowohl Hypoxie als auch Hypothermie als hemmende Faktoren des Zellmetabolismus aufgeführt: Wheaton et al. zeigten, dass die Reduktion des Stoffwechsels nach Hypoxie zunächst ein Anpassungsmechanismus ist und der Aufrechterhaltung der Homöostase dient. Beispielweise wird der Elektronentransport über die mitochondriale Atmungskette, die als größte Energiegewinnungsquelle der Zelle dient, durch ein niedriges Sauerstofflevel verringert<sup>53</sup>. Sehr niedrige Energiegewinnung kann jedoch eine Energiedepletion zur Folge haben, die zur Freisetzung von Glutamat und massivem Kalziumeinstrom in die Zellen führt, wodurch Apoptosekaskaden initiiert werden können<sup>9</sup>. Doenicke et al. beobachteten, dass die Stoffwechselrate temperaturabhängig ist und pro 1°C um 7-9 % sinkt oder steigt<sup>54</sup>. Es ist daher wahrscheinlich, dass die metabolische Aktivität der IMR-32 Zellen in diesen Versuchen nach Hypoxie durchgehend durch die Hypothermie stark herunter reguliert wurde. Ein möglicher Einfluss auf den Zellmetabolismus durch 2-IB nach Hypoxie lässt sich unter hypothermen Bedingungen entsprechend schwer beurteilen.

Als Surrogatparameter für den Zellschaden nach Hypoxie wurde bereits eine Bestimmung der extrazellulären Laktatdehydrogenase durchgeführt. Zur Quantifizierung aller Zellen, die bereits Caspase-abhängige Apoptosekaskaden initiiert haben, wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Es konnten darüber weitere Zellen erfasst werden, die sich in der Apoptose befanden und noch nicht vollständig in dem letzten Schritt der Zellwandlyse mit LDH-Freisetzung waren. Der Apoptose-Assay quantifiziert die gemeinsame Aktivität von Caspase 3 und 7. Die Apoptose kann zudem auch unabhängig von Caspasen stattfinden, was in diesem Fall nicht mit dem Assay er-

fasst wurde<sup>55</sup>. Die Proteinisolierung für die Messungen fand nach 7 h Hypoxie und folgenden 25 h Hypothermie aus Proben ohne 2-Iminobiotin als Kontrolle, 0,03 µg/ml und 0,5 µg/ml 2-IB statt. Da die hohen Konzentrationen ab 0,1 µg/ml 2-IB in der Messung der reaktiven Sauerstoffspezies interessanterweise bereits eine Tendenz zu gegenteiligen Effekten in Form von gesteigerter ROS-Produktion gegen die Kontrollgruppe zeigten, wurde die Konzentration von 2-IB zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse über die möglichen involvierten Signalwege auf 0,5 µg/ml gesteigert. Diese Änderung der Konzentration ist in den darauffolgenden Experimenten übernommen worden. Caspase 3 und 7 fungieren als Effektorcaspasen zur Einleitung des programmierten Zelltods<sup>11</sup>. Walsh et al. beschrieben eine ähnliche Funktion und enge Verwandtschaft von Caspase 3 und 7, wobei Caspase 3 als das effizientere Enzym zur Aktivierung der Caspase-Kaskade herausgestellt wird<sup>56</sup>. In dem verwendeten Assay sind die Caspasen jedoch ausschließlich zusammen quantifiziert worden. Peeters-Scholte et al. wiesen in Tierexperimenten an Ferkeln eine signifikant reduzierte Caspase 3 Aktivität in parietalem Kortex, Striatum und Hippokampus 24 h nach Hypoxie und 2-IB Gabe nach<sup>14</sup>. In einem weiteren in-vivo Experiment mit Ferkeln von Bjorkman et al. konnte im Thalamus 48 h nach Hypoxie hingegen keine signifikante Veränderung der Aktivität von Caspase 3 nach 2-IB Gabe festgestellt werden<sup>37</sup>. Lajtha et al. beschrieben in verschiedenen Ischämie modellen eine zeit-abhängige Aktivierung der Caspasen 1, 2, 3, 6, 7, 8 und 11. Beispielweise zeigte sich in einem Ischämie modell an Ratten erst 16-24 h nach Okklusion der mittleren Zerebralarterie eine Erhöhung der mRNA von Caspase 3, wohingegen die mRNA von Caspase 7 und 8 bereits nach 6 h erhöht war und nach 12-24 h die höchsten Konzentrationen erreicht wurden<sup>57</sup>. Eine anti-apoptotische Wirkung konnte in dem von uns verwendeten in-vitro Modell mit IMR-32-Zellen mit der Konzentration 0,03 µg/ml 2-IB nach 25 h Hypothermie nur mit einer schwachen Tendenz und nicht signifikant gezeigt werden. Eine erneute Bestimmung von Caspase 3 und 7 zu weiteren Zeitpunkten könnte sinnvoll sein, da sie zeitabhängige Schlüsselenzyme der Apoptosekaskaden darstellen<sup>11,58</sup>.

#### 4.4 Effekte von 2-IB und Hypothermie auf oxidativen Stress

Durch Sauerstoffmangel im Gewebe entsteht zellulär oxidativer Stress, was sich durch eine starke Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auszeichnet<sup>12</sup>. Diese wirken in hohen Konzentrationen schädigend auf die Mitochondrien und das Genom und initiieren Apoptosekaskaden<sup>2</sup>. Für die ROS-Bestimmung inkubierten die IMR-32 Zellen des in-vitro Modells nach Hypoxie 25 h unter Hypothermie mit 2-IB Konzentrationen von 0 bis 0,3 µg/ml. Zitta et al. haben in vorherigen Studien gezeigt, dass die Zugabe von Katalase, eines der Enzyme, die zur Hypoxieinduktion des in-vitro Modells verwendet wurden (s. 2.2.1.3), anteilige ROS-Mengen senkt<sup>42</sup>. Daher schien es zunächst schwierig, die alleinigen Effekte von 2-IB kombiniert mit Hypothermie auf die ROS-Produktion zu beurteilen. In dieser Arbeit zeigte sich dennoch eine signifikant erhöhte Freisetzung der ROS in allen Proben nach Hypoxie im Vergleich zur Normoxie. Dieses Ergebnis spricht für die Funktionalität des Zellmodells mit IMR-32 Zellen, weil eine verstärkte ROS-Produktion nach Hypoxie auch physiologisch stattfindet<sup>59</sup>. Zudem wird die Hypothese untermauert, dass es neben der NOS-Inhibition durch 2-IB weitere Effekte gibt, die zu einem verringerten Zellschaden führen, da sich keine eindeutige Korrelation zwischen ROS-Produktion und Zellschaden ergeben hat.

#### 4.5 Effekte von 2-IB und Hypothermie auf Signalmoleküle

Die aktivierte Form von HIF-1 $\alpha$  kann im Zellkern mit HIF-1 $\beta$  dimerisieren und fördert als Transkriptionsfaktor HIF-1 eine Genexpression zur Adaption der Zelle an Hypoxie<sup>18</sup>. Aufgrund dieser Funktion wurde HIF-1 schon in zahlreichen Studien als sehr bedeutsamer Mediator beschrieben<sup>60</sup>. Auch gegenteilige Effekte sind bekannt: Ausgeprägte Hypoxie oder Anoxie führen über HIF-1 $\alpha$  in den intrinsischen Weg der Apoptose<sup>19</sup>.

In dieser Arbeit wurde HIF-1 $\alpha$  in allen Proben detektiert, erwies jedoch unabhängig von der 2-IB Konzentration keine Steigerung nach Hypoxie. Zitta et al. führten an unserem Institut ebenfalls in-vitro Versuche an IMR-32 Zellen durch und konnten eine signifikante Erhöhung von HIF-1 $\alpha$  nach 2 h Hypoxie und anschließenden 24 h Normothermie zeigen<sup>61</sup>. Stroka et al. hingegen stellten in Hypoxieversuchen an Mäusen andere Zeitpunkte einer HIF-1 $\alpha$  Steigerung fest. Der inspiratorische Sauerstoffanteil



der Tiere wurde für 75 min reduziert. Der Maximalwert von HIF-1 $\alpha$  wurde zum Zeitpunkt 0 nach Hypoxie bestimmt. Die HIF-1 $\alpha$  Menge fiel daraufhin nach 15 min auf etwa die Hälfte ab und nach 1 h war keine Erhöhung mehr gegen die Kontrollgruppe auszumachen<sup>62</sup>. Vermutlich ist die HIF-1 $\alpha$  Freisetzung nach Hypoxie abhängig von Zeit, Zelltyp und weiteren Gegebenheiten. Der IMR-32 Zelltyp ist durchaus dazu in der Lage, HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie freizusetzen, was Zitta et al. bereits gezeigt haben<sup>61</sup>. Eine weitere mögliche Erklärung für die nicht signifikant gesteigerte HIF-1 $\alpha$  Menge nach Hypoxie in dieser Arbeit könnte die Hypothermie als zusätzlicher Faktor sein. Tanaka et al. untersuchten in T98G (einer humanen Glioblastomzelllinie) und in He-La-Zellen eine zeitabhängige Unterdrückung der hypoxieinduzierten Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  nach 24 h unter hypothermen Bedingungen<sup>63</sup>. Die Hypothermie wurde jedoch nicht in Normoxie, sondern zeitgleich mit der Hypoxie eingesetzt. Dennoch ist die Hypothermie als Störfaktor ein möglicher Anhaltspunkt, der genauer evaluiert werden könnte. Es ist schwierig, den Einfluss von 2-IB kombiniert mit Hypothermie auf HIF-1 $\alpha$  zu beurteilen. Nach Hypoxie wäre eine Steigerung von HIF-1 $\alpha$  in der Kontrollgruppe ohne 2-IB zu erwarten gewesen, was sich in unseren Experimenten unter hypothermen Bedingungen nicht gezeigt hat. Bisher gibt es keine Hinweise, dass 2-Iminobiotin in Kombination mit Hypothermie auf HIF-1 $\alpha$  wirkt, ein möglicher Effekt ist jedoch nicht auszuschließen.

Die PARP-1 ist ein weiteres in dieser Arbeit untersuchtes Molekül. Hauptsächlich ist sie an der DNA-Strangbruchreparatur beteiligt, sowie an Transkription, Apoptose und Mitose<sup>20</sup>. Die PARP-1 benötigt für die katalytische Aktivität der Strangbruchreparatur Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>), welches nicht nur PARP-1 sondern auch zahlreichen zellulären Stoffwechselreaktionen der Energiegewinnung als Coenzym dient<sup>64</sup>. Eine übersteigerte PARP-1 Aktivierung führt daher unter anderem über NAD<sup>+</sup>-Verbrauch in eine Energiedepression, die den nekrotischen Zelltod induzieren kann<sup>22</sup>. Das Ausmaß der DNA-Strangbrüche bestimmt die Ausprägung der gegenteiligen Effekte durch PARP-1. Eine Inaktivierung der PARP-1 erfolgt unter anderem durch Spaltung durch Caspasen. Boulares et al. beschreiben Caspase 3 als führendes Enzym der PARP-Spaltung<sup>21</sup>. Germain et al. wiesen hingegen durch in-vitro Experimente mit aufgereinigter PARP-1 aus Rindern eine größere Effizienz der Caspase 7 bei der Spaltung auf<sup>65</sup>. Die genaue Präferenz ist für die Herstellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Aktivität von Caspasen und PARP-1-Spaltung in dieser Arbeit nicht von Relevanz, da Caspase 3 und 7 ausschließlich zusammen

quantifiziert wurden. PARP-1 konnte in dieser Arbeit in allen Proben nach Hypoxie unabhängig von der 2-IB Konzentration nachgewiesen werden und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Hypoxie und Normoxie. Chaitanya et al. beschreiben die Caspase 3-induzierte Spaltung der PARP-1 als bei zerebraler Asphyxie beobachtetes Phänomen und als Marker für apoptotische Zellen<sup>66</sup>. Folglich erscheint eine erhöhte Menge an gespaltenen PARP-1 unter Hypoxie logisch, da die durch Hypoxie induzierten Strangbrüche zur PARP-1 Aktivierung führen. Parallel werden durch Hypoxie jedoch auch Apoptosekaskaden initiiert, in denen Caspasen aktiviert werden und PARP-1 spalten und inaktivieren können<sup>67</sup>. Zeitgleich kann PARP-1 somit durch Hypoxie aktiviert als auch inaktiviert werden. Physiologisch erscheint die PARP-1 Inaktivierung sinnvoll, da eine DNA-Reparatur apoptotischer Zellen keinen Nutzen bringt. Die bisherige Datenlage sowie die Experimente dieser Arbeit liefern keine Indizien, die auf einen Zusammenhang zwischen 2-IB kombiniert mit Hypothermie und der Spaltung von PARP-1 schließen lassen.

#### 4.6 Effekte von 2-IB und Hypothermie auf Überlebenskaskaden

Als Schutzmechanismus gegen Hypoxie können Überlebenskaskaden initiiert werden, um einen kollektiven Untergang eines Zellverbandes zu verhindern<sup>11</sup>. In dieser Arbeit wurden die Enzyme P-Akt und P-Erk untersucht, die sich in der Endstrecke zweier unterschiedlicher Überlebenskaskaden, dem Akt-Signalweg und der MAP-Kinasekaskade, befinden<sup>11,24</sup>. Beide Signalwege führen zur Phosphorylierung von Akt und Erk zu deren aktiven Formen P-Akt und P-Erk<sup>31,68</sup>. Zur Quantifizierung der beiden Enzyme wurde eine Proteinisolierung aus Proben durchgeführt, die 7 h in Hypoxie und anschließender Hypothermie mit den 2-IB Konzentrationen 0; 0,03 und 0,5 µg/ml für 2 h inkubierten. In früheren Studien unseres Institutes hat sich die früh stattfindende Phosphorylierung von Akt und Erk gezeigt<sup>49,69,70</sup>. Daher wurde der Zeitraum von nur 2 statt 25 h Inkubation in Hypothermie ausgewählt.

Tomimatsu et al. führten Experimente an neonatalen Ratten durch. Die linke Karotisarterie wurde für 1 h zur Induktion einer zerebralen Hypoxie ligiert. Dann folgte eine Reperfusionphase für 24 h, die entweder unter 30°C Hypothermie oder 37°C Normothermie stattfand. In der frühen Reperusionsperiode konnte eine erhöhte Menge an P-Akt in der mit 37°C behandelten Gruppe gemessen werden, was auf die mit Hypothermie behandelten Tiere jedoch nicht zutraf<sup>71</sup>. In den vorliegenden IMR-32

Zellkulturen zeigte sich nach Hypoxie in Hypothermie ebenfalls kein signifikanter Anstieg an P-Akt, jedoch war eine vermehrte Phosphorylierung nach Hypoxie erkennbar. Zhao et al. beschäftigten sich genauer mit der Hypothermieeinwirkung auf die Phosphorylierung der Akt. Sie führten ein Experiment zu zerebraler Ischämie mit Ratten unter Okklusion der Karotiden für 1 h durch. Die P-Akt Menge wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Western Blots bestimmt. In der mit Normothermie behandelten Gruppe zeigten sich während der Reperfusionphase starke Schwankungen der P-Akt Menge. Die Tiere der Vergleichsgruppe mit Hypothermiebehandlung, die 10 min vor bis 1 h nach der Ischämie andauerte, wiesen in der P-Akt Menge bis auf eine zwischenzeitliche Absenkung 24 h nach Ischämie keine signifikanten Abweichungen auf. Folglich bewirkte die Hypothermie keine Steigerung an P-Akt, stabilisierte diese jedoch größtenteils gegen Schwankungen<sup>72</sup>. Durch den Einsatz der Hypothermiebehandlung 10 min vor Hypoxie bzw. Ischämie handelt es sich um eine Präkonditionierung. Folglich sind diese in-vivo Experimente nur teilweise mit den von uns durchgeführten in-vitro Versuchen an IMR-32 Zellen vergleichbar. Als möglichen molekularen Mechanismus bestimmten Zhao et al. die Konzentration der Phosphatase PTEN, die in aktiver Form  $PIP_3$  zu  $PIP_2$  dephosphoryliert und damit die Akt-Signalkaskade unterbricht. Die PTEN-Konzentration wurde zu mehreren Zeitpunkten bestimmt. Die inaktive Form von PTEN wurde unter Hypothermie vermehrt nachgewiesen, was eine geringere P-Akt Schwankung als in Normothermie erklären könnte<sup>72</sup>. Da die Proben der verschiedenen Konzentrationen an 2-IB keine signifikanten Unterschiede an P-Akt sowohl in Hypoxie als auch in Normoxie gegen die Kontrollgruppe zeigten, gibt es bisher keine Anhaltspunkte für einen möglichen Effekt durch 2-IB auf Akt in Hypothermie.

P-Erk hingegen war in allen Proben nach Hypoxie und Hypothermie mit verschiedenen 2-IB Konzentrationen signifikant im Vergleich zur Normoxie gesteigert. Zudem konnte auch hier eine Tendenz zu erhöhter Phosphorylierung proportional zur 2-IB Konzentration gezeigt werden, was jedoch ebenfalls nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne 2-IB war. Zum Einfluss von Hypothermie allein auf den Erk-Signalweg existiert eine gegensätzliche Datenlage. Whittington et al. konnten exemplarisch in in-vitro Experimenten ohne Hypoxie an humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) eine signifikante P-Erk Verringerung unter Hypothermie verglichen mit Normothermie feststellen<sup>73</sup>. Dagegen zeigten Atkins et al. eine erhöhte Erk Aktivierung durch Hypothermiebehandlung in einem Versuch mit Ratten<sup>74</sup>. Sawe et al. beschrie-

---

ben unterschiedliche Effekte nach Erk Aktivierung in Form von gesteigerter als auch verminderter Zellprotektion, was abhängig von den auslösenden Faktoren der Signalkaskade sein könnte<sup>75</sup>. Möglicherweise werden durch Hypothermie die protektiven Effekte durch P-Erk gesteigert und dessen schädigende Wirkung gehemmt, was die unterschiedliche Datenlage und auch unser Versuchsergebnis erklären könnte<sup>76</sup>. Die in Hypoxie signifikant erhöhte Konzentration an P-Erk in unserem IMR-32 Modell könnte folglich unter anderem inhibierend auf die pro-apoptotischen Mitglieder Bad, Bim und Bax der Bcl-2 Familie wirken. Dadurch kommt es zu einer verringerten Porenbildung für die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien, was wiederum zu verringerter intrinsischer Apoptoseaktivität führen könnte<sup>46,48</sup>. Allan et al. beschrieben direkte inhibitorische Effekte von P-Erk auf weitere Mediatoren des intrinsischen Apoptoseweges wie auf die Effektorcaspase 3<sup>32</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass 2-Iminobiotin kombiniert mit Hypothermie zytoprotektive Effekte nach Hypoxie zeigt. Die verwendeten IMR-32 Zellen sind Neuroblastomzellen und stellen einen isolierten Zelltyp dar, der dem Kortex ähnelt, jedoch nicht den gesamten Zellverband des zerebralen Gewebes widerspiegelt. Eine weitere interessante Fragestellung wäre daher, wie sich 2-IB unter Hypothermie auf andere neuronale Zelltypen wie primäre zerebrale Zellen auswirkt.

## 5 Zusammenfassung

Perinatale Asphyxie gilt als eine der wichtigsten Ursachen der neonatalen Morbidität und Mortalität. Als Komplikation kann sich eine Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie entwickeln, deren Behandlung mangels Alternativen ausschließlich durch den Einsatz von Hypothermie erfolgt. Es wird an pharmakologischen Therapieoptionen geforscht, die in Kombination mit Hypothermie angewendet werden können. Ziel aller entsprechenden Ansätze ist eine Verminderung des nach perinataler Asphyxie auftretenden Zellschadens. In der vorliegenden Arbeit sollte evaluiert werden, ob die Substanz 2-Iminobiotin (2-IB) den hypoxieinduzierten Zellschaden supplementär zur Hypothermiebehandlung reduziert und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen.

Unter Verwendung eines enzymbasierten in-vitro Hypoxiesystems wurde in Kulturen von neuronalen IMR-32 Zellen eine 7-stündige Hypoxie induziert. Daraufhin inkubierten die Zellen für 25 h unter Hypothermie bei 33,5°C, während sie zeitgleich mit verschiedenen 2-IB Konzentrationen (0-0,5 µg/ml) behandelt wurden. Die Zellmorphologie wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten evaluiert. Der hypoxieinduzierte Zellschaden wurde durch LDH-Assays analysiert. Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen dienten MTS-Assays. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Aktivität von Caspase 3/7 wurden mittels fluorometrischer Assays gemessen. Zudem wurden Western Blots für HIF-1α, PARP-1 und die phosphorylierten Formen von Akt und Erk durchgeführt.

25 h nach Hypoxie konnten sichtbare morphologische Zeichen von Zellschäden und signifikant erhöhte LDH-Freisetzung trotz Hypothermie beobachtet werden. Die Behandlung mit 0,01 und 0,03 µg/ml 2-IB reduzierte den morphologisch sichtbaren Zellschaden sowie die hypoxieinduzierte LDH-Freisetzung auch unter hypothermen Bedingungen. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies war 25 h nach Hypoxie signifikant gesteigert, wohingegen die metabolische Zellaktivität signifikant reduziert wurde. Die Gabe von 2-IB zusätzlich zur Hypothermie hatte keinen Einfluss auf diese hypoxieinduzierten Effekte. Eine 7-stündige Hypoxie führte auch unter hypothermen Bedingungen zu einer erhöhten Phosphorylierung von Erk, welche unabhängig von der Anwesenheit von 2-IB im Kulturmedium war. Unter Hypothermie zeigte sich nur ein geringfügiger Einfluss von Hypoxie auf die Caspase 3/7, HIF-1α Expression,

---

Spaltung von PARP-1 sowie die Phosphorylierung von Akt. Die Zugabe von 2-IB hatte insgesamt keinen signifikanten Effekt auf die untersuchten Proteine.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 2-Iminobiotin in Kombination mit Hypothermie in der Lage ist, den hypoxieinduzierten Zellschaden zu reduzieren. Obwohl die exakten Wirkungsmechanismen in der vorliegenden Arbeit nicht entschlüsselt werden konnten, deuten die Daten darauf hin, dass die kombinierte Therapie bestehend aus Hypothermie und 2-IB eine vielversprechende Behandlungsstrategie zur Verminderung neuronaler Zellschäden nach perinataler Asphyxie darstellen könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Flemmer, A.W., Maier, R.F., Hummler, H. 024/023 S2k-Leitlinie: Behandlung der neonatalen Asphyxie unter besonderer Berücksichtigung der therapeutischen Hypothermie. AWMF online , Das Portal der wissenschaftlichen Medizin, 1-42 (2013).
2. Perrone, S., Santacroce, A., Buonocore, G. 2-Iminobiotin for the treatment of perinatal asphyxia Expert Opinion on Orphan Drugs 1, 935-945 (2013).
3. Golubnitschaja, O., Yeghiazaryan, K., Cebioglu, M., Morelli, M., Herrera-Marschitz, M. Birth asphyxia as the major complication in newborns: moving towards improved individual outcomes by prediction, targeted prevention and tailored medical care. EPMA J 2, 197-210 (2011).
4. Hellstern, G., Bald, M., Blattmann, C., Bosse, H.M. Kurzlehrbuch Pädiatrie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2012).
5. Ullrich L., Stolecki, D., Grünewald, M. Intensivpflege und Anästhesie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2005).
6. Gunn, A.J., Thoresen, M. Hypothermic neuroprotection. NeuroRx 3, 154-169 (2006).
7. Herrera-Marschitz, M., Morales, P., Leyton, L., Bustamante, D., Klawitter, V., Espina-Marchant, P., Allende, C., Lisboa, F., Cunich, G., Jara-Cavieles, A., Neira, T., Gutierrez-Hernandez, M.A., Gonzales-Lira, V., Simola, N., Schmitt, A., Morelli, M., Andrew Tasker, R., Gebicke-Haerter, P.J. Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins. Neurotox Res 19, 603-627 (2011).
8. Ma, H., Sinha, B., Pandya, R.S., Lin, N., Popp, A.J., Li, J., Yao, J., Wang, X. Therapeutic hypothermia as a neuroprotective strategy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury and traumatic brain injury. Curr Mol Med 12, 1282-1296 (2012).
9. Fan, X., van Bel, F. Pharmacological neuroprotection after perinatal asphyxia. J Matern Fetal Neonatal Med 23 Suppl 3, 17-19 (2010).
10. Li, D., Ueta, E., Kimura, T., Yamamoto, T., Osaki, T. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. Cancer Sci 95, 644-650 (2004).
11. Scharl, M., Gessler, M., von Eckardstein, A. Biochemie und Molekularbiologie des Menschen, Elsevier, München (2009).
12. Evans, P., Halliwell, B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. Ann N Y Acad Sci 884, 19-40 (1999).
13. Mbaya, E., Oulès, B., Caspersen, C., Tacine, R., Massinet, H., Pennuto, M., Chrétien, D., Munnich, A., Rötig, A., Rizzuto, R., Rutter, G.A., Paterlini-Bréchet, P., Chami, M. Calcium signalling-dependent mitochondrial dysfunction and bioenergetics regulation in respiratory chain Complex II deficiency. Cell Death Differ 17, 1855-1866 (2010).
14. Peeters-Scholte, C., Koster, J., Veldhuis, W., van den Tweel, E., Zhu, C., Kops, N., Blomgren, K., Bär, D., van Buul-Offers, S., Hagberg, H., Nicolay, K., van Bel, F., Groenendaal, F. Neuroprotection by selective nitric oxide synthase inhibition at 24 hours after perinatal hypoxia-ischemia. Stroke 33, 2304-2310 (2002).
15. Shah, T., Krishnamachary, B., Wildes, F., Mironchik, Y., Kakkad, S.M., Jacob, D., Artemov, D., Bhujwalla, Z.M. HIF isoforms have divergent effects on invasion, metastasis, metabolism and formation of lipid droplets. Oncotarget 6, 28104-28119 (2015).
16. Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. Semin Cancer Biol 13, 83-89 (2003).
17. Piret, J.P., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C. Is HIF-1 $\alpha$  a pro- or an anti-apoptotic protein? Biochem Pharmacol 64, 889-892 (2002).

18. Ziello, J.E., Jovin, I.S., Huang, Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 80, 51-60 (2007).
19. Li, Y., Zhou, C., Calvert, J.W., Colohan, A.R., Zhang, J.H. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp Neurol* 191, 198-210 (2005).
20. Dantzer, F., Amé, J.C., Schreiber, V., Nakamura, J., Ménissier-de Murcia, J., de Murcia, G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol* 409, 493-510 (2006).
21. Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S., Smulson, M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* 274, 22932-22940 (1999).
22. Beneke, S., Bürke, A. Poly-ADP-Ribosylierung. *BIOspektrum*, 476-480 (2007).
23. Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceq, Z., Wang, Z.Q., Schulze-Osthoff, K. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* 13, 978-988 (2002).
24. Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., González-Barón, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30, 193-204 (2004).
25. Kumar, N., Afeyan, R., Sheppard, S., Harms, B., Lauffenburger, D.A. Quantitative analysis of Akt phosphorylation and activity in response to EGF and insulin treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 14-20 (2007).
26. Hemmings, B.A., Restuccia, D.F. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011189 (2012).
27. She, Q.B., Solit, D.B., Ye, Q., O'Reilly, K.E., Lobo, J., Rosen, N. The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell* 8, 287-297 (2005).
28. Tsuruta, F., Masuyama, N., Gotoh, Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem* 277, 14040-14047 (2002).
29. Chang, F., Steelman, L.S., Lee, J.T., Shelton, J.G., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R.A., McCubrey, J.A. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17, 1263-1293 (2003).
30. Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., Lenormand, P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1299-1310 (2007).
31. Friday, B.B., Adjei, A.A. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 14, 342-346 (2008).
32. Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., Clarke, P.R. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol* 5, 647-654 (2003).
33. McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tarufi, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M., Franklin, R.A. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1263-1284 (2007).
34. Tamura, Y., Simizu, S., Osada, H. The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Lett* 569, 249-255 (2004).
35. Morales-Cano, D., Calvino, E., Rubio, V., Herráez, A., Sancho, P., Tejedor, M.C., Díez J.C. Apoptosis induced by paclitaxel via Bcl-2, Bax and caspases 3 and 9 activation in NB4 human leukaemia cells is not modulated by ERK inhibition. *Exp Toxicol Pathol* 65, 1101-1108 (2013).
36. Neurophyxia B.V., News. URL: <http://www.neurophyxia.com/news.html>(Stand: 20.12.2016).



37. Bjorkman, S.T., Ireland, Z., Fan, X., van der Wal, W.M., Roes, K.C.B., Colditz, P.B., Peeters-Scholte, C. Short-term dose-response characteristics of 2-iminobiotin immediately postinsult in the neonatal piglet after hypoxia-ischemia. *Stroke* 44, 809-811 (2013).
38. Zitta, K., Peeters-Scholte, C., Sommer, L., Parczany, K., Steinfath, M., Albrecht, M. Insights into the neuroprotective mechanisms of 2-iminobiotin employing an in-vitro model of hypoxic-ischemic cell injury. *European Journal of Pharmacology* 792, 63-69 (2016).
39. Neonatology, D.o. Phase II study at UMC Utrecht exploring safety and pharmacokinetics of 2-IB given in addition to hypothermia in neonates with perinatal asphyxia (2-STEP study). URL: <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?trialid=EUCTR2014-004265-25-NL>(Stand: 22.12.2016).
40. Nijboer, C.H., Groenendaal, F., Kavelaars, A., Hagberg, H.H., van Bel, F., Heijnen, C. Gender-specific neuroprotection by 2-iminobiotin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat via a nitric oxide independent pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 282-292 (2007).
41. Tumilowicz, J.J., Nichols, W.W., Cholon, J.J., Greene, A.E. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Research* 30, 2110-2118 (1970).
42. Zitta, K., Meybohm, P., Bein, B., Rodde, C., Steinfath, M., Scholz, J., Albrecht, M. Hypoxia-induced cell damage is reduced by mild hypothermia and postconditioning with catalase in-vitro: application of an enzyme based oxygen deficiency system. *Eur J Pharmacol* 628, 11-18 (2010).
43. Baumann, R.P., Penketh, P.G., Seow, H.A., Shyam, K., Sartorelli, A.C. Generation of oxygen deficiency in cell culture using a two-enzyme system to evaluate agents targeting hypoxic tumor cells. *Radiation research* 170, 651-660 (2008).
44. Mueller, S., Millonig, G., Waite, G.N. The GOX/CAT system: a novel enzymatic method to independently control hydrogen peroxide and hypoxia in cell culture. *Advances in medical sciences* 54, 121-135 (2009).
45. C. Korzeniewski, Callewaert, D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of immunological methods* 64, 313-320 (1983).
46. Rao, R.R., Kisaalita, W.S. Biochemical and electrophysiological differentiation profile of a human neuroblastoma (IMR-32) cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38, 450-456 (2002).
47. Martinez-Biarge, M., Bregant, T., Wusthoff, C.J., Chew, A.T., Diez-Sebastian, J., Rutherford, M.A., Cowan, F.M. White matter and cortical injury in hypoxic-ischemic encephalopathy: antecedent factors and 2-year outcome. *J Pediatr* 161, 799-807 (2012).
48. Fatemi, A., Wilson, M.A., Johnston, M.V. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol* 36, 835-858 (2009).
49. Huang, Y., Zitta, K., Bein, B., Steinfath, M., Albrecht, M. An insert-based enzymatic cell culture system to rapidly and reversibly induce hypoxia: investigations of hypoxia-induced cell damage, protein expression and phosphorylation in neuronal IMR-32 cells. *Dis Model Mech* 6, 1507-1514 (2013).
50. Ganten, D., Ruckpaul, K. *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen*, Springer Berlin (2003).
51. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615 (2001).
52. Fujisawa, H., Oqura, T., Kurashima, Y., Yokoyama, T., Yamashita, J., Esumi, H. Expression of two types of nitric oxide synthase mRNA in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem* 63, 140-145 (1994).
53. Wheaton, W.W., Chandel, N.S. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C385-393 (2011).
54. Doenicke, A., Kettler, D., List, W.F., Radke, J., Tarnow, J. *Anästhesiologie*. Springer, Berlin (1995).
55. Cande, C., Cecconi, F., Dessen, P., Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 115, 4727-4734 (2002).

56. Walsh, J.G., Cullen, S.P., Sheridan, C., Lüthi, A.U., Gerner, C., Martin, S.J. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12815-12819 (2008).
57. Lajtha, A., Banik, N. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology Neural Protein Metabolism and Function*, Springer, New York (2007).
58. Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G.A., Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I., Flavell, R.A. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311, 847-851 (2006).
59. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84 (2007).
60. Ke, Q., Costa, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70, 1469-1480 (2006).
61. Zitta, K., Meybohm, P., Bein, B., Ohnesorge, H., Steinfath, M., Scholz, J., Albrecht, M. Cytoprotective effects of the volatile anesthetic sevoflurane are highly dependent on timing and duration of sevoflurane conditioning: findings from a human, in-vitro hypoxia model. *Eur J Pharmacol* 645, 39-46 (2010).
62. Stroka, D.M., Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R.H., Neil, D.A., Bauer, C., Gassmann, M., Candinas, D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 2445-2453 (2001).
63. Tanaka, T., Wakamatsu, T., Daijo, H., Oda, S., Kai, S., Adachi, T., Kizaka-Kondoh, S., Fukuda, K., Hirota, K. Persisting mild hypothermia suppresses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein synthesis and hypoxia-inducible factor-1-mediated gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298, 661-671 (2010).
64. Andrabi, S.A., Umanah, G.K., Chang, C., Stevens, D.A., Karuppagounder, S.S., Gagné, J.P., Poirier, G.G.; Dawson, V.L., Dawson, T.M. Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 10209-10214 (2014).
65. Germain, M., Affar, E.B., D'Amours, D., Dixit, V.M., Salvesen, G.S., Poirier, G.G. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 274, 28379-28384 (1999).
66. Chaitanya, G.V., Steven, A.J., Babu, P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 8, 31 (2010).
67. Gilliams-Francis, K.L., Quayle, A.A., Naegle, J.R. PARP cleavage, DNA fragmentation, and pyknosis during excitotoxin-induced neuronal death. *Exp Neurol* 184, 359-372 (2003).
68. Liao, Y., Hung, M.C. Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res* 2, 19-42 (2010).
69. Weber N.C., Riedemann, I., Smit, K.F., Zitta, K., van de Vondervoort, D., Zuurbier, C.J., Hollmann, M.W., Preckel, B., Albrecht, M. Plasma from human volunteers subjected to remote ischemic preconditioning protects human endothelial cells from hypoxia-induced cell damage. *Basic Res Cardiol* 110, 17 (2015).
70. Zitta, K., Meybohm, P., Bein, B., Heinrich, C., Renner, J., Cremer, J., Steinfath, M., Scholz, J., Albrecht, M. Serum from patients undergoing remote ischemic preconditioning protects cultures human intestinal cells from hypoxia-induced damage: Involvement of matrixmetalloproteinase-2 and -9. *Mol Med* 18, 29-37 (2012).
71. Tomimatsu, T., Fukuda, H., Endo, M., Watanabe, N., Mu, J., Kohzaki, M., Fujii, E., Kanzaki, T., Murata, Y. Effects of hypothermia on neonatal hypoxic-ischemic brain injury in the rat: phosphorylation of Akt, activation of caspase-3-like protease. *Neurosci Lett* 312, 21-24 (2001).
72. Zhao, H., Shimohata, T., Wang, J.Q., Sun, G., Schaal, D.W., Sapolsky, R.M., Steinberg, G.K. Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* 25, 9794-9806 (2005).

- 
73. Whittington, R.A., Bretteville, A., Virág, L., Emala, C.W., Maurin, T.O., Marcouiller, F., Julien, C., Petry, F.R., El-Khoury, N.B., Morin, F., Charron, J., Planel, E. Anesthesia-induced hypothermia mediates decreased ARC gene and protein expression through ERK/MAPK inactivation. *Sci Rep* 3, 1388 (2013).
  74. Atkins, C.M., Oliva, A.A., Alonso, O.F., Chen, S., Bramlett, H.M., Hu, B.R., Dietrich, W.D. Hypothermia treatment potentiates ERK1/2 activation after traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 26, 810-819 (2007).
  75. Sawe, N., Steinberg, G., Zhao, H. Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res* 86, 1659-1669 (2008).
  76. Han, H.S., Park, J., Kim, J.H., Suk, K. Molecular and cellular pathways as a target of therapeutic hypothermia: pharmacological aspect. *Curr Neuropharmacol* 10, 80-87 (2012).

## 7 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei allen bedanken, die mich unterstützt haben und zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke zunächst bei Herrn Prof. Dr. Steinfath für die Möglichkeit im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin als Doktorandin tätig zu sein.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. physiol. Martin Albrecht für die Bereitstellung des spannenden Themas, die Einbindung ins Labor-team und die engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit. Großen Dank auch an Dr. Karina Zitta für ihre herzliche Art, viele gute Erklärungen und wertvolle Anregungen.

Für die Einarbeitung, Unterstützung und viele Tipps danke ich zudem Kerstin Parczany.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir zu jeder Zeit Unterstützung in meinem Studium gaben und mir jederzeit zur Seite standen.

## 8 Anhang

### 8.1 Übersicht Herstellungsfirmen:

Biozym Scientific GmbH; [www.biozym.com/](http://www.biozym.com/)

BRAND GMBH + CO KG; [www.brand.de](http://www.brand.de)

Carl Roth GmbH + Co. KG; [www.carlroth.com](http://www.carlroth.com)

Eppendorf AG; [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

FEATHER® Safety Razor Co; [www.feather.co.jp/](http://www.feather.co.jp/)

GE Healthcare; [www3.gehealthcare.de](http://www3.gehealthcare.de)

Greiner Bio-One GmbH; [www.gbo.com](http://www.gbo.com)

Heraeus Holding GmbH; [www.heraeus.de](http://www.heraeus.de)

Leica Microsystems Inc.; [www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)

Liebherr-International Deutschland GmbH; [www.liebherr.com](http://www.liebherr.com)

Life Technologies GmbH; [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)

New England Biolabs GmbH; <http://www.neb-online.de>

PAA Laboratories GmbH; [www.atmp-ready.com/](http://www.atmp-ready.com/)

Sarstedt AG & Co.; [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)

Scientific industries; [www.scientificindustries.com/](http://www.scientificindustries.com/)

Sigma-Aldrich Biochemie GmbH ; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

(SCHOTT)-DURAN Group GmbH; [www.duran-group.com](http://www.duran-group.com)

Worthington Biochemical Corp.; [www.worthington-biochem.com](http://www.worthington-biochem.com)

---

## 8.2 Veröffentlichungen

### Zeitschriften:

Zitta K., Peeters-Scholte C., Sommer L., Gruenewald M., Hummitzsch L., Parczany K., Steinfath M., Albrecht M.

2-Iminobiotin Superimposed on Hypothermia Protects Human Neuronal Cells from Hypoxia-Induced Cell Damage: An in Vitro Study. *Frontiers in Pharmacology*, Volume 8, January 2018, Article 971

Zitta K., Peeters-Scholte C., Sommer L., Parczany K., Steinfath M., Albrecht M.

Insights into the neuroprotective mechanisms of 2-Iminobiotin employing an in-vitro model of hypoxic-ischemic cell injury. *European Journal of Pharmacology*, Volume 792, December 2016, 63-69

### Posterpräsentation:

Zitta K., Peeters-Scholte C., Sommer L., Parczany K., Steinfath M., Albrecht M.

2-Iminobiotin reduces hypoxia-induced neuronal cell damage in-vitro. *Euroanesthesia, Meeting of the European Society of Anesthesiology*, Berlin, Deutschland, 2015