

Untersuchungen zu regenerativen und protektiven Mechanismen beim
neuronalen Zelltod nach zerebraler Ischämie



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Georgios Kiourkenidis
aus Stuttgart
Juli 2002

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig
und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Georgios Kiourkenidis

Promotionsgesuch eingereicht am: 17. Juli 2002

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Armin Kurtz und Prof. Dr. Ulrich Bogdahn in der Arbeitsgruppe um
Hr. Dr. Markus Horn und Hr. Dr. Rainer Apfel

Prüfungsausschuss: Vorsitzender

1. Prüfer (Erstgutachten)
2. Prüfer (Zweitgutachten)
3. Prüfer

*In Wahrheit heisst etwas wollen,
ein Experiment machen,
um zu erfahren, was wir können*
(Friedrich Wilhelm Nietzsche)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN **1**

A ZUSAMMENFASSUNG **4**

B EINLEITUNG **7**

B 1	EPIDEMIOLOGIE, RISIKOFAKTOREN UND FRÜHSYMPTOME DES SCHLAGANFALLS	7
B 2	PATHOPHYSIOLOGIE DER ZEREBRALEN ISCHÄMIE	8
B 2.1.	ENERGIEGEWINNUNG DER NERVENZELLE	8
B 2.2.	ZEREBRALER METABOLISMUS UND ZEREBRALE PERFUSION	9
B 2.3.	NEURONALER ZELLTOD NACH ZEREBRALER ISCHÄMIE	12
B 2.3.1.	EXZITOTOXIZITÄT	12
B 2.3.2.	PERI-INFARKT DEPOLARISATION	14
B 2.3.3.	INFLAMMATORISCHE PROZESSE	14
B 2.3.3.1.	AKTIVIERUNG VON MATRIX-METALLO-PROTEINASEN	15
B 2.3.3.2.	BEDEUTUNG DES TRANSFORMIERENDEN WACHSTUMSFAKTORS BETA (TGF- β)	16
B 2.3.4.	ROLLE DES PROGRAMMIERTEN NEURONALENZELLTODS	17
B 3	NEUROPROTEKTION	21
B 3.1.	GLUTAMAT-REZEPTOR-AGONISTEN (NMDA, AMPA), KALZIUM-, NATRIUM- UND CHLORIDKANALBLOCKER	21
B 3.2.	WACHSTUMSFAKTOREN	23
B 3.3.	ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE ALS THERAPEUTIKA	24
B 4	NEUROREGENERATION	25
B 4.1.	NEUROGENESE NACH ZEREBRALER ISCHÄMIE	26

B 5	ZEREBRALE ISCHÄMIEMODELLE	27
B 5.1.	Globale zerebrale Ischämie	27
B 5.2.	Fokale zerebrale Ischämie	27
B 6	Ziele der Arbeit	28

C MATERIAL **31**

C 1.1.	Enzyme	31
C 1.2.	Antikörper	31
C 1.3.	Phosphorthioat oligonukleotide	33
C 1.4.	Inhibitoren	33
C 1.5.	Tiere	33
C 1.6.	Verwendete Lösungen	34
C 1.6.1.	Puffer	34
C 1.6.2.	Färbelösungen	35
C 1.6.3.	Sonstige Lösungen	36
C 1.7.	Computerprogramme und Datenbanken	37

D METHODEN **38**

D 1	Zellkultur	38
D 1.1.	Proliferation der Zellen	38
D 1.2.	Bestimmung der Zellzahl	38
D 2	In-vitro-Untersuchungen zur Apoptose	38
D 2.1.	Kinetik der Camptothecin vermittelten Apoptose in PC 12-Zellen	39
D 2.2.	Proliferation von PC 12-Zellen unter TGF- β	39
D 2.3.	Die Rolle von TGF- β auf die Apoptose in vitro	39
D 3	Durchflusszytometrie	40
D 3.1.	Sub-G ₁ -Peak Methode	40
D 3.2.	Detektion apoptotischer Zellen durch Annexin V im	

	DURCHFLUSSZYTOMETER	41
D 4	TIEREXPERIMENTELLER TEIL	42
D 4.1.	NARKOSEEINLEITUNG UND NARKOSEFÜHRUNG	42
D 4.2.	INTUBATION	42
D 4.3.	KONNEKTION	43
D 4.4.	BEATMUNG	43
D 4.5.	AUSLEITUNG	44
D 4.6.	INJEKTIONSNAKROSE	44
D 4.6.1.	EINLEITUNG	44
D 4.6.2.	INJEKTION	44
D 4.6.3.	ERHALTUNGSMEDIKATION	44
D 4.7.	KATHETERISIERUNG DER SCHWANZARTERIE BEI DER RATTE	44
D 4.7.1.	HERSTELLUNG DER KATHETER	45
D 4.7.2.	KANÜLIERUNG DER SCHWANZARTERIE	45
D 4.7.3.	KATHETER ENTFERNEN	46
D 4.8.	HERSTELLUNG SILIKONÜBERZOGENER FÄDEN FÜR DEN VERSCHLUSS DER MITTLEREN ZEREBRALEN ARTERIE	46
D 4.9	MONITORING	47
D 4.9.1.	REKTALE TEMPERATURMESSUNG	47
D 4.9.2.	ELEKTROKARDIOGRAMM	47
D 4.9.3.	MESSUNG DER HERZFREQUENZ	48
D 4.9.4.	BLUTFLUSSMESSUNG AM KORTEKX	48
D 4.9.5.	BLUTGASANALYSE	49
D 4.10.	OPERATIVES VORGEHEN	49
D 4.10.1.	HALSPRÄPARATION	50
D 4.10.2.	MCA-OKKLUSION	50
D 4.10.3.	REPERFUSION, MEDIKAMENTENAPPLIKATION UND NAHT	51
D 4.11.	NEUROLOGISCHE UNTERSUCHUNG	51
D 4.12.	EXPERIMENTELLE THERAPIEANSÄTZE NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE IN DER RATTE	52
D 4.12.1.	APPLIKATION FITC-KONJUGierter ANTISENSE- OLIGONUKLEOTIDE	52
D 4.12.2.	APPLIKATION DES MMP-2/MMP-9-INHIBITORS	52
D 4.12.2.1.	BLUTENTNAHME ZUR PHARMAKOKINETISCHEN UNTERSUCHUNG (HPLC) DES MMP-2/-9 INHIBITORS	53
D 4.12.3.	APPLIKATION DES CASPASE-3 INHIBITORS (z-DEVD.FMK)	53
D 4.12.4.	APPLIKATION VON SMAD4 UND SMAD7 ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDEN ZUR MODULATION DES TGF- β SIGNALWEGES	54

D 5	POSTOPERATIVE AUFARBEITUNG DES RATTEN- UND GERBILHIRNS FÜR IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	54
D 5.1.	PERFUSIONSFIXIERUNG	54
D 5.2.	GEHIRNENTNAHME UND WEITERE PROZESSIERUNG	55
D 5.3	AUFARBEITUNG DER GEHIRNE VON GERBILS NACH GLOBALER ISCHÄMIE	55
D 6	MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE (MRT)	55
D 7	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) UND WESTERN BLOT ANALYSEN ZUR AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON CASPASE-3 AUS GEHIRNHOMOGENATEN AUS RATTEN NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE	56
D 7.1.	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	56
D 7.2.	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	57
D 7.2.1.	HERSTELLUNG DER GELE	57
D 7.2.2.	PROBENVORBEREITUNG	58
D 7.2.3.	ELEKTROPHORESEBEDINGUNGEN	58
D 7.3.	WESTERN BLOTTING (SEMI-DRY-TECHNIK)	59
D 7.3.1.	ELEKTROPHORETISCHER PROTEINTRANSFER	59
D 7.3.2.	PROTEINNACHWEIS IM GEL MIT ANTIKÖRPER	60
D 8	HISTOLOGIE	60
D 8.1.	HERSTELLUNG VON GEWEBESCHNITTEN	60
D 8.1.1.	GELATINE-BESCHICHTUNG VON OBJEKTTRÄGERN	61
D 8.1.2.	SCHNEIDEN AM SCHLITTENMIKROTOM	61
D 8.1.3.	SCHNEIDEN AM KRYOSTAT	61
D 8.2.	HISTOCHEMIE	61
D 8.2.1.	NISSL-FÄRBUNG	62
D 8.2.2.	TRI-PHENYL-TETRAZOLIUM-CHLORID (TTC)-FÄRBUNG	62
D 8.3.	IMMUNOHISTOCHEMIE	62
D 8.3.1.	ANTI-BrdU FREE FLOATING FÄRBUNG	62
D 8.3.2.	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT FLUORESZENZMARKIERTEN SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER	63
D 8.3.3.	TUNEL-FÄRBUNG	64
D 8.3.4.	EVANS BLAU-FÄRBUNG	64

E ERGEBNISSE 65

E 1	INTRAARTERIELLE APPLIKATION FITC-KONJUGierter OLIGONUKLEOTIDE NACH FOKALER ZEREBRALER ISCHÄMIE	65
E 1.1.	OPERATIONSVERLAUF	65
E 1.2.	NACHWEIS DER ISCHÄMISCHEN BLUTHIRNSCHRANKENSTÖRUNG	65
E 1.3.	VERTEILUNG FITC-KONJUGierter OLIGONUKLEOTIDE	66
E 1.4.	VERTEILUNG FITC-KONJUGierter OLIGONUKLEOTIDE 48 STUNDEN NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE	67
E 1.5.	UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN AUFNAHME FITC-KONJUGierter OLIGONUKLEOTIDE NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE	68
E 1.6.	ZELLULÄRE AUFNAHME FITC-KONJUGierter OLIGONUKLEOTIDE IM HIPPOKAMPUS NACH TRANSIENTER GLOBALER ISCHÄMIE IM GERBIL	69
E 2	INTRAARTERIELLE APPLIKATION EINES SPEZIFISCHEN MMP-2/-9 INHIBITORS NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE IN DER RATTE	71
E 3	INHIBIERUNG DER APOPTOSE NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE IN DER RATTE MITTELS DES SPEZIFISCHEN CASPASE-3 INHIBITORS z-DEVD.FMK	76
E 3.1.	VERTEILUNG VON FITC-MARKIERTEM CASPASE-3 INHIBITOR NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE IN DER RATTE	76
E 3.2.	MRT-AUFNAHMEN UND -VOLUMETRIE ZUR QUANTIFIZIERUNG DER INFARKTGRÖSSE NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE IN DER RATTE	77
E 3.3.	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ZELLULÄREN AUFNAHME DES CASPASE-3 INHIBITORS UND DIE EXPRESSION VON CASPASE-3 NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE	78
E 4	MODULATION DES TGF-β SIGNALWEGES UND SEINE WIRKUNG AUF DEN NEURONALEN ZELLTOD NACH EINER ISCHÄMIE	81
E 4.1.	IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN	81
E 4.1.1.	KINETIK DER APOPTOSEINDUKTION IN PC 12-ZELLEN MIT CAMPTOTHECIN	81
E 4.1.2.	EINFLUSS VON TGF- β AUF DAS PROLIFERATIONSVERHALTEN VON PC 12-ZELLEN	83
E 4.1.3.	INHIBIERUNG DER APOPTOSE IN PC 12-ZELLEN	85

E 4.2.	IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN	86
E 4.2.1.	INTRAARTERIELLE APPLIKATION VON SMAD7- UND SMAD4 ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDEN NACH TRANSIENTER FOKALER ISCHÄMIE REDUZIEREN DIE INFARKTGRÖSSE	86
E 5	NEUROGENESE IM ADULTEN SÄUGERGEHIRN NACH ISCHÄMIE	92
E 5.1.	NEUBILDUNG VON NERVENZELLEN IM GYRUS DENTATUS NACH FOKALER ISCHÄMIE	93
E 5.2.	NEUROGENESE IN DER INFARKTZONE NACH FOKALER ISCHÄMIE	96

F DISKUSSION **101**

F 1	NEURONALER ZELLTOD NACH ZEREBRALER ISCHÄMIE	101
F 1.1.	SCHLÜSSELMOLEKÜLE DER NEURONALEN APOPTOSE	103
F 2	INFLAMMATION IM ISCHÄMISCHEN GEHIRN	106
F 2.1.	DIE ROLLE DES TRANSFORMIERENDEN WACHSTUMSFAKTOR-BETA (TGF β) FÜR DIE INFLAMMATION NACH ISCHÄMIE	108
F 2.2.	EXPRESSION VON MATRIX-METALLOPROTEINASEN WÄHREND DER INFLAMMATION NACH ISCHÄMIE	111
F 3	NEUROGENESE IM GEHIRN ADULTER SÄUGER	112
F 3.1.	NEUROGENESE UNTER MODIFIZIERTEN ÄUSSEREN BEDINGUNGEN	113
F 3.2.	NEUROGENESE IN VERSCHIEDENEN ZEREBRALEN LÄSIONSMODELLEN	114
F 4	TRANSPLANTATION EMBRYONALER-, ADULTER- ODER HÄMATOPOETISCHER STAMMZELLEN ALS THERAPIEANSATZ NACH NEURODEGENERATIVEN ERKRANKUNGEN	116

G LITERATURVERZEICHNIS **120**

VERÖFFENTLICHUNGEN

DANKSAGUNG

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	<i>Anterior carotis externa</i>
ACI	<i>Anterior carotis interna</i>
AMPA	<i>alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Antisense
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat, 4-Toluidin-Salz
BGA	Blutgasanalyse
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BrdU	Bromdeoxyuridin
BSA	Rinderserum
BT	Biotin
ca.	zirka
CBF	zerebrale Blutfluss
cm	Zentimeter; ccm^3 : Kubikzentimeter
CPP	Zerebraler Perfusionsdruck
CPS	<i>Cryo protection solution</i> (Kryo Protektions Lösung)
d	Tag(e)
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DEPC	Pyrokohlensäurediethylester (Diethylpyrocarbonat)
d.h.	das heisst
DIG	Digoxigenin
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Threo-1,4-Dimercapto-2,3-Butandiol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor

FITC	Fluoro-Iso-Thio-Zyanat
g	Gramm
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>
ggf.	Gegebenfalls
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsaeure Natriumsalz
HS	Pferdeserum
hum	Human
ICE	<i>Interleukin-converting-enzyme</i>
ICP	intrakranieller Druck
I. E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
i. v.	intravenös
ICB	Intrazerebrale Blutung
l	Liter
mA	Milliamper
MAP	arterieller Mitteldruck
MCA	Mittlere zerebrale Arterie
MCAO	Mittlere zerebrale Arterien Okklusion
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter; mm ³ : Kubikmillimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NeuN	<i>neuron-specific nuclear protein</i>
ng	Nanogramm
NGF	Nerven Wachstumsfaktor
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NSC	neuronale Stammzellen

OP	Operation
PET	Positronen Emissions Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PIZ	Peri-Infarkt-Zone (Penumbra)
PMNs	polymorphonukleäre Leukozyten
PS	Phosphatidylserin
PVA	Polyvinylalkohol
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAB	Subarachnoidalblutung
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
sog.	Sogenannt
SVZ	Subventrikuläre Zone
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
u.a.	und andere
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
V	Volt
xg	Vielfache der Erdbeschleunigungskraft
z.B.	zum Beispiel
z-DEVD-FMK	N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Fluoro-Methyl-Ketone, Caspase-3-Inhibitor
ZNS	Zentrales Nerven System

A Zusammenfassung

Der Schlaganfall ist nach Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen die dritthäufigste Todesursache weltweit und stellt die häufigste Ursache für Frühinvalidität dar. Auch wirtschaftlich betrachtet stellen Schlaganfallerkrankungen in den westlichen Industrieländern die teuerste Krankheitsgruppe überhaupt dar.

In der Schlaganfallforschung gibt es mehrere Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie. Die transiente Okklusion der *A. cerebri media* in der Ratte simuliert die fokale Durchblutungsstörung im Menschen bei arterieller Thrombembolie und führt zur vorübergehenden Ischämie im Versorgungsterritorium des Gefässes. Der ischämische neuronale Zelltod in diesem Modell ist durch Nekrose im Infarktkern und den apoptotischen Zelltod in der ischämischen Randzone (Penumbra) charakterisiert.

Die erste pathophysiologische Konsequenz wenige Minuten nach einer Durchblutungsstörung im Gehirn ist eine Permeabilitätsstörung der Blut-Hirn-Schranke. Um klinischen Ansprüchen zu genügen ist eine unmittelbare Erreichbarkeit des ischämischen Zielgewebes (Penumbra) für therapeutische Substanzen unbedingt anzustreben. Über einen lokalen intraarteriellen Zugangsweg wurde zunächst die Aufnahme FITC-konjugierter Oligonukleotide, unmittelbar nach transientser fokaler Ischämie in der Ratte, in das Hirngewebe untersucht. Dabei wurde eine überwiegende, zelluläre Aufnahme der markierten Oligonukleotide in Nervenzellen, in der ischämischen Hemisphäre beobachtet.

Ein zweiter therapeutischer Ansatzpunkt nach transientser fokaler Ischämie bestand in der Inhibierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), einer Gruppe strukturell verwandter zinkhaltiger Endoproteinasen. Nach Ischämie wird eine Hochregulierung vor allem von MMP-2 und MMP-9 in den ersten 48 Stunden beobachtet, die an der ischämischen Schädigung der Blut-Hirn-Schranke massgeblich beteiligt sind. Jedoch zeigte die intraarterielle Applikation eines neuen synthetischen und spezifischen MMP-2/-9 Inhibitors in unseren Experimenten zwar im Trend eine Reduktion der Mortalität, nicht aber der Infarktgrösse.

Wie bereits erwähnt hat bei fokaler zerebraler Ischämie die Apoptose einen entscheidenden Anteil am ischämischen Zelluntergang. Quantitativ spielt sie vor allem in der ischämischen Randzone, der sog. Penumbra, die sich um das nekrotische Kerngebiet bildet, eine massgebliche Rolle. Da die Apoptosekaskade,

die nach zerebraler Ischämie initiiert wird und mit der Aktivierung der mediatorischen Caspase-3 einhergeht, mit spezifischen Inhibitoren hemmbar ist, liegt hier ein therapeutischer Ansatz nahe.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Ansatz mittels eines intraarteriell applizierten spezifischen Caspase-3 Inhibitors als neuroprotektiv wirksam bestätigt werden, wobei sich die Infarktgrösse allein im Kortex um 75 % reduzieren liess.

Die Invasion von hämatogenen Makrophagen und auch aus aktivierten Mikroglia generierten Makrophagen in den ersten Tagen nach einer transienten fokalen zerebralen Ischämie stellte einen weiteren Ansatzpunkt für die Neuroprotektion dar. Eine grosse Bedeutung in der Inflammation nach Ischämie und der anschliessenden Angiogenese wird dem transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TGF- β) nachgesagt. In-vitro-Untersuchungen in PC 12-Zellen zeigten die für TGF- β typische Proliferationshemmung. Ausserdem konnte die Apoptoserate in PC 12-Zellen durch Antisense-Oligonukleotide gegen das mediatorische Smad4 Protein und durch einen spezifischen TGF- β Antikörper reduziert werden.

Ein hohes Mass an Neuroprotektion wurde in der Modulation des TGF- β Signalweges durch die Smad7 Antisensebehandlung *in vivo* erreicht. Durch die Inhibierung des inhibierenden Smad7 wurde der Signalweg von TGF- β verstärkt, wodurch ebenfalls eine erhebliche Neuroprotektion (60 %) resultierte, und sich hauptsächlich auf den Kortex nach einer fokalen Ischämie niederschlug. Eine Behandlung gegen das mediatorische Smad4 und die dadurch resultierende Inhibierung des TGF- β Signalweges erbrachte keine protektive Wirkung.

Für die Neurogenese im Gehirn adulter Säuger sind in der letzten Dekade zwei Regionen als proliferative Ressourcen identifiziert worden: Die subventrikuläre Zone der Seitenventrikel und der Gyrus dentatus im Hippokampus. Eine bis ins hohe Alter anhaltende Proliferation neuronaler Stammzellen in diesen Regionen sind in zahlreichen Nagerspezies, aber auch im Menschen beschrieben. Daneben findet eine Verstärkung der Neurogenese nach unterschiedlichen Läsionen (Trauma, Ischämie, epileptische Anfälle) statt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Proliferation neuronaler Stammzellen nach transientser fokaler Ischämie auch im Infarktkerngebiet, im Kortex und im Striatum gezeigt werden, und stützt damit die Hypothese, dass Neurogenese im Gehirn adulter Säuger unter pathophysiologischen Bedingungen auch ausserhalb des Gyrus dentatus und der subventrikulären Matrix möglich ist. So darf das bis heute

aufrechterhaltene Dogma, es gäbe keine kortikale Neurogenese im Gehirn adulter Säuger nach Ischämie, in Frage gestellt werden.

Die Stimulierung des endogenen regenerativen Potentials des adulten Säugergehirns stellt einen wichtigen neuen therapeutischen Ansatz nicht nur bei zerebraler Ischämie, sondern auch bei der Behandlung anderer neurodegenerativer Erkrankungen dar.

B Einleitung

B 1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Frühsymptome des Schlaganfalls

Schlaganfälle sind nach Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen die dritthäufigste Todesursache weltweit und die führende Ursache vorzeitiger Invalidität. Medizinisch-ökonomisch betrachtet stellen Schlaganfallerkrankungen in den westlichen Industrieländern die teuerste Krankheitsgruppe überhaupt dar. In Deutschland erkranken zur Zeit ungefähr 200.000 Personen pro Jahr neu an einem Schlaganfall, wobei 15-20 % der Patienten innerhalb der ersten 4 Wochen sterben. Bei etwa einem Drittel der Schlaganfallpatienten ist eine Wiederaufnahme des gewohnten Lebensablaufs möglich. Ein weiteres Drittel wird zwar wieder soweit selbstständig, dass sie einfache tägliche Dinge verrichten können, die Patienten sind aber durch Lähmungen oder andere Symptome behindert, nicht mehr berufsfähig, und müssen im täglichen Leben viele Einschränkungen akzeptieren. Das letzte Drittel der Patienten bleibt dauerhaft pflegebedürftig. Man nimmt heute an, dass rund 1.000 000 Menschen in Deutschland unter den Folgen eines Schlaganfalls leiden.

Die häufigsten Schlaganfälle sind ischämische Infarkte, d.h. Durchblutungsstörungen, die zur Ischämie in umschriebenen Gefässterritorien des Gehirns führen. Sie liegen bei 80-90 % der Patienten dem Schlaganfall zugrunde. Etwa 10-20 % aller Schlaganfälle entstehen durch spontane intrazerebrale Blutungen (ICB). Die sichere Differenzierung zwischen ischämischem Infarkt und Hirnblutung ist nur mit bildgebenden Verfahren möglich. Die häufigsten Ursachen für Hirnblutungen sind hoher Blutdruck (etwa 70 % der Patienten) und übermässiger Alkoholkonsum, der das Risiko, eine intrazerebrale Blutung zu erleiden, um das 5-6fache erhöht. Weitere wesentliche Risikofaktoren sind Gefässmissbildungen und die Amyloidangiopathie. Seltener Risikofaktoren für das Auftreten intrazerebraler Blutungen sind die Behandlung mit Antikoagulanzen (z.B. Marcumar) und die thrombolytische Therapie bei Herzinfarkten, peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten, Lungenembolien und ischämischen Infarkten. Blutkrankheiten (Leukämien), Thrombozytopenien und andere krankhafte Störungen der Blutgerinnung sind weitere Risikofaktoren für das Auftreten von ICBs. Dabei

entwickelt sich rasch ein perifokales Hirnödem um die Blutung, die im späteren Verlauf resorbiert wird. Seltener können Blutungen auch in Metastasen und primären Hirntumoren entstehen. Wie bereits erwähnt sind zur Aufklärung atypisch gelegener Blutungen oder bei fehlenden Risikofaktoren bildgebende Verfahren wie die Angiographie und die Magnetische Resonanz Tomographie (MRT) unabdingbar. Diabetes, Hypercholesterinämie, Zigarettenrauchen und kardiale Krankheiten (ausser solche mit Antikoagulation) sind keine wesentlichen Risikofaktoren für ICBs. Zu den meist plötzlich einsetzenden Symptomen des Schlaganfalls gehören Schwäche oder Gefühlsstörungen einer Körperseite, Störungen der Sprache, Sehstörungen, auch doppelt Sehen, Schwindel mit Gangunsicherheit und unvermittelt auftretende, sehr heftige Kopfschmerzen. Die Krankheitserscheinungen können flüchtig (nur wenige Minuten) oder auch von längerer Dauer sein.

B 2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

B 2.1. Energiegewinnung der Nervenzelle

Obwohl das Gehirn nur 2 % des Körpergewichts ausmacht, erhält es bei körperlicher Ruhe ca. 15 % (etwa 1,2 l) des Herzminutenvolumens und verbraucht etwa 20 % des gesamten Sauerstoffbedarfs des Körpers. In Ruhe benötigt das menschliche Gehirn pro 100 g Hirngewebe ca. 3,35 ml O₂/min. Der Energiebedarf ist im Schlaf und bei geistiger Aktivität gleich. Hauptenergielieferant für das Gehirn ist Glukose, die unter physiologischen Bedingungen zu über 95 % oxidativ zu CO₂ und H₂O metabolisiert und zu 5 % anaerob zu Pyruvat abgebaut wird. Die Energie wird über die Glykolyse und den Zitronensäurezyklus gewonnen, die aerob pro Mol Glukose 38 Mol ATP als energiereiche Phosphate bilanzieren. Unter normal physiologischen Bedingungen werden nur etwa 10 % der Glukose bis zu Pyruvat und Laktat abgebaut und nehmen somit nicht an der weiteren Umsetzung im Zitronensäurezyklus teil. Bei Sauerstoffmangel hingegen fällt die Atmungskette aus, mit der Folge, dass über anaerobe Glykolyse vornehmlich der Strukturstoffwechsel der Zelle erhalten werden kann. Es besteht ein empfindliches Gleichgewicht zwischen der O₂-Versorgung und der Nährstoffzufuhr (Glukose), da das Gehirn nur für kurze Zeit auf den anaeroben Stoffwechselweg ausweichen kann, der zu deutlich geringerer Energieausbeute und zur Anhäufung von Laktat als Endprodukt führt.

B 2.2. Zerebraler Metabolismus und zerebrale Perfusion

Wie alle anderen lebenden Zellen haben auch Nervenzellen einen Stoffwechsel, der für die Aufrechterhaltung der Zellstrukturen essentiell ist (*Strukturstoffwechsel*). Wird dieser Stoffwechselumsatz nicht erreicht, treten irreversible Schäden auf, und die Zelle stirbt. Für die neuronale Funktion muss die Zelle darüberhinaus die Energie bereitstellen, die für die aktiven Tätigkeiten benötigt wird (*Funktionsstoffwechsel*). Die Funktion wird -zunächst reversibel- eingestellt. Bei weiterem Energieverlust wird auch die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts, der Gradienten für Kalium, Natrium und Kalzium gefährdet und es kommt zur Schädigung der Integrität. Dieses Ionengleichgewicht wird durch eine Pumpe (*Natrium-Kalium-Ionenpumpe*) im Fließgleichgewicht gehalten, die zwei Prozesse koppelt. Sie pumpt Natriumionen aus der Zelle und Kaliumionen in die Zelle. Dabei benötigt sie eine beträchtliche Menge an biologischer Energie in Form von ATP (das durch ein ATPase genanntes Enzym gespalten wird), da sie beide Ionen gegen ihre jeweiligen Konzentrationsgradienten pumpen muss. Die Aktivität dieser Ionenpumpe wird durch die Konzentration ihrer "Substrate" bestimmt - also der intrazellulären Kaliumionen und der extrazellulären Natriumionen. Je mehr Natrium sich im Zellinneren befindet, desto aktiver wird die Pumpe - ein perfektes Beispiel eines selbstregulierenden Systems.

Die Unterbrechung der Substratzufuhr hat demzufolge ein rasches Erlöschen der Gehirnfunktionen zur Folge, da das Gehirnparenchym nahezu keine Sauerstoff- oder Glukosevorräte besitzt. Bereits nach 6-8 Sekunden findet man in der grauen Substanz des Gehirns keinen molekularen Sauerstoff mehr; nach 3-4 min ist die vorhandene, freie Glukose verbraucht. Schon wenige Sekunden nach der Unterbrechung der Durchblutung treten im Elektroenzephalogramm (EEG) Veränderungen auf. Nach 10-12 Sekunden tritt bereits Bewusstlosigkeit ein, und nach 4-5 min kommt es zu ersten irreversiblen Schädigungen der Nervenzellen. Einen Herzstillstand von 8-10 min Dauer kann das Gehirn nicht überstehen. Auch bei Hypoglykämie unter 2,3 mmol/l im arteriellen Blut treten Bewusstseinsstörungen auf. Die extreme Abhängigkeit von ununterbrochener Substratzufuhr und gleichzeitigem Abtransport von Metaboliten erfordert, dass die Hirndurchblutung in sehr engen Grenzen konstant gehalten wird.

Der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) hängt von der Herzleistung, dem arteriellen Mitteldruck (MAP) und dem intrakraniellen Druck (ICP) ab ($CPP = MAP - ICP$). Wenn der intrakranielle Druck ansteigt, sinkt der zerebrale Perfusionsdruck bei gleichbleibendem Blutdruck ab.

Der Schwellenwert der lokalen Hirndurchblutung, bei dessen Unterschreiten neurologische Funktionsstörungen auftreten, wird Ischämieschwelle genannt. Bei einem gesunden Erwachsenen beträgt der zerebrale Blutfluss (CBF) ca. 60-80 ml/min/100 g Hirngewebe. Der CBF ist sehr auf Sicherheit ausgelegt, denn erst bei einem Absinken auf ca. 1/3 bis 1/4 des Ausgangswerts (etwa 20 ml/min/100 g Hirngewebe) kommt es zu neuronalen Funktionsstörungen. Ist wie bei einem Herz-Kreislauf-Stillstand die Durchblutung des gesamten Gehirns betroffen, spricht man von **globaler** zerebraler Ischämie, bei Verschluss einer Hirnarterie (Schlaganfall) hingegen von **fokaler** zerebraler Ischämie. Die Funktionsstörung ist grundsätzlich reversibel, rasche Wiederherstellung einer normalen Durchblutung vorausgesetzt. Die Reduktion der Durchblutung in einem Gehirnabschnitt unter die Ischämieschwelle führt zu einem Versagen des Funktionsstoffwechsels. Auch die Ionenpumpen, die die intrazelluläre Kaliumkonzentration 20-100mal höher und gleichzeitig die Natriumkonzentration 5-15mal niedriger als die extrazelluläre Konzentration halten, funktionieren dann nicht mehr ausreichend. Das Membranpotential bricht zusammen, Kaliumionen strömen in den Extrazellulärraum, während Natrium- und Kalziumionen intrazellulär angereichert werden. Gleichzeitig findet jedoch durch die erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration eine Aktivierung des zellulären Stoffwechsels statt, die sich in einem erhöhten Sauerstoff- und Glukoseverbrauch niederschlägt. In der Reduktion des Substratangebotes auf der einen Seite und in der begleitenden Erhöhung des zellulären Energiebedarfs auf der anderen Seite besteht in zweifacher Hinsicht eine deletäre Auswirkung des ischämiebedingten, zellauswärts gerichteten Kalium-Ionenstroms (Raichle, 1983). Einhergehend mit den Störungen im Kaliumhaushalt kommt es während der Ischämie zur Abnahme der extrazellulären Kalzium- und Natriumkonzentrationen. Dabei ist vor allem dem massiven Einstrom von Kalzium-Ionen – zunächst über spannungsgesteuerte Kalzium-Kanäle – in der Zelle besondere Aufmerksamkeit zu widmen, da diesem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des irreversiblen ischämischen Nervenzellschadens zugerechnet wird (Siesjö, 1988; Siesjö and Bengtsson, 1989). Die Zunahme des freien intrazellulären Kalziums resultiert aus

mitochondrialer Freisetzung, die von freien Fettsäuren vermittelt wird, und aus der Freisetzung des Kations aus dem endoplasmatischen Retikulum (Siesjö and Bengtsson, 1989). Hierdurch wird die Zelloberfläche negativiert, und die elektrische Erregbarkeit der Membranen erlischt. Mit der Äquilibration der transmembralen Ionengradienten erfolgt die elektrische Depolarisation der Zelle, die in Abhängigkeit von der intrazellulären Entstehung osmotisch wirksamer Metaboliten der anaeroben Glykolyse eine Flüssigkeitsbewegung von extra- nach intrazellulär nach sich zieht (zytotoxisches Ödem), morphologisch zuerst erkennbar an einer Schwellung von endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien. Diese Depolarisierung der Zellmembran ist zunächst reversibel, dauert sie länger an, treten auch irreversible, strukturelle Schäden auf. Durch den Sauerstoffmangel fällt zudem die Energiegewinnung durch den Zitronensäurezyklus aus, die anaerobe Glykolyse tritt ein und führt zur Azidose. Wenn die CBF-Schwelle von 10 ml/min/100 g Hirngewebe unterschritten wird (Untergrenze des Strukturerhaltungsstoffwechsel = Infarktschwelle), kann die zelluläre Integrität der Hirnzelle nicht aufrechterhalten werden, und es resultieren Nekrose bzw. Infarkt.

Der CBF-Bereich zwischen Infarkt- und Ischämieschwelle nach einer fokalen Ischämie wird auch als ischämischer Halbschatten (**Penumbra**) bezeichnet. Dies bezieht sich auf ein Hirngewebeareal, das gefährdet und funktionsgestört ist, aber bei zeitiger Therapie gerettet werden könnte. Wie ausgedehnt die Penumbra im Einzelfall ist, kann nur über (zeitaufwendige und komplizierte) Untersuchungen wie die Positronen Emissions Tomographie (PET) und Diffusions-MRT abgeschätzt werden. Bestimmt wird die Ausdehnung der Penumbra vom Ausmass der regionalen CBF-Minderung, dem Ort des Gefässverschlusses, dem Status der Kollateralen und der Dauer des Perfusionsdefizits. Die Entstehung der Penumbra ist ein dynamisches Konzept. Eine Durchblutungs-minderung auf 15 ml/min/100 g Hirngewebe ist nach den obigen Regeln eine reversible Funktionsstörung. Wenn diese Störung jedoch über längere Zeit anhält, kann es auch bei ausreichend erscheinenden Durchblutungswerten zur Infarzierung kommen.

Diese ist auch für die Entstehung des ischämischen Hirnödems, das durch Zellschwellung entsteht, mitverantwortlich. Das Hirnödem führt zur Druckerhöhung und damit zur Minderung des lokalen zerebralen Perfusionsdrucks. Es folgt eine Kaskade von metabolischen Schritten, die schliesslich zur strukturellen Schädigung der Zelle führen.

B 2.3. Neuronaler Zelltod nach zerebraler Ischämie

Der neuronale Zelltod nach einer zerebralen Ischämie ist durch vier aufeinanderfolgende, zeitabhängige Prozesse, der Exzitotoxizität, der Peri-infarkt Depolarisation, der Inflammation und der Apoptose beschreibbar und im folgenden Schaubild dargestellt (Abb. 1).

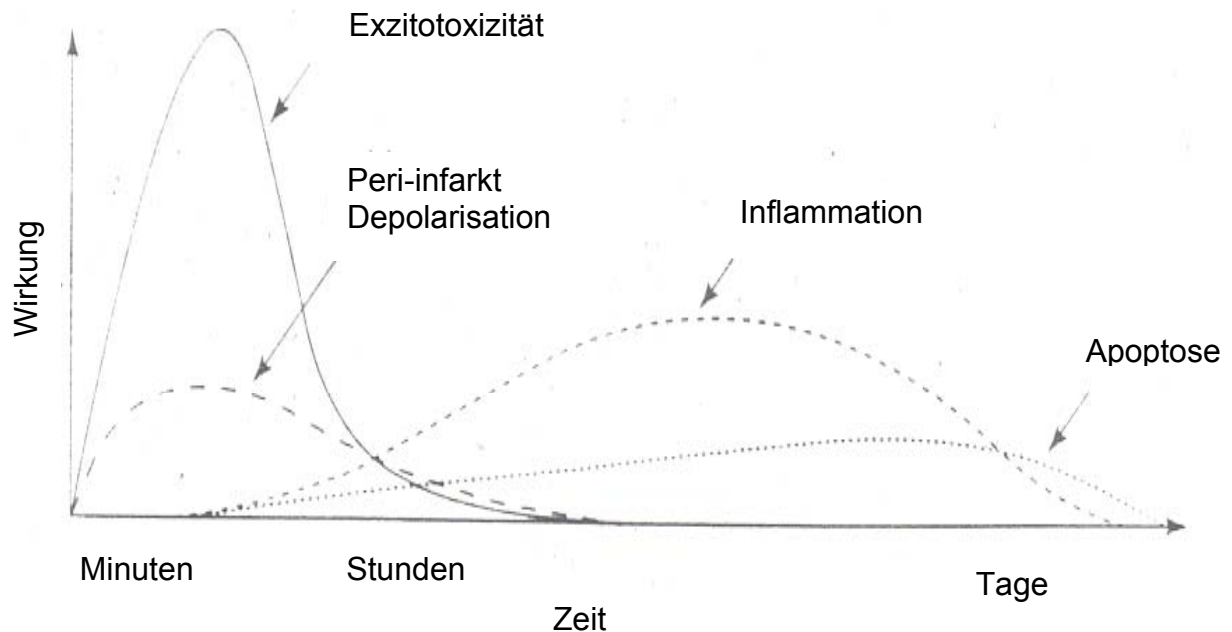


Abb.1 Postulierte Kaskaden zerstörerischer Ereignisse nach einer fokalen zerebralen Ischämie

Sehr früh nach einem fokalen Perfusionsdefizit induzieren exzitatorische Mechanismen den Untergang von Nervenzellen und Glia. Zusätzlich werden verschiedene Kaskaden aktiviert, die das Gewebe ebenfalls schädigen. Dazu gehören die Peri-infarkt Depolarisation, die wenige Stunden später auftretende Inflammation und der nach einigen Tagen einsetzende programmierte Zelltod (Apoptose). Die x-Achse reflektiert die Entwicklung der Kaskaden über die Zeit, während die y-Achse die Wirkung jeden Prozesses der Kaskaden und die daraus resultierende Wirkung illustriert (aus Dirnagl *et al*, 1999, modifiziert).

B 2.3.1. Exzitotoxizität

Die kritische Abnahme der zerebralen Durchblutung nach arteriellem Gefäßverschluss (Schlaganfall) führt dazu, dass nicht genug Energie in Form von Sauerstoff und Glukose vorhanden ist, die für die Aufrechterhaltung der Ionengradienten notwendig ist. Der daraus resultierende Verlust des Membranpotentials führt zur Depolarisation von Nerven- und Gliazellen.

Somatodendritische wie auch präsynaptische spannungsabhängige Kalziumkanäle werden aktiviert und exzitatorische Aminosäuren (z.B. Glutamat) in den extrazellulären Raum sezerniert. Gleichzeitig ist der energieabhängige Prozess der präsynaptischen Wiederaufnahme von exzitatorischen Aminosäuren behindert, was zu einer zusätzlichen Akkumulierung von Glutamat im synaptischen Spalt führt. In letzter Zeit ist die zentrale Bedeutung der terminalen Freisetzung von exzitatorischen Transmittern wie Glutamat (Nicotera *et al.*, 1996) in der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie erkannt worden. Diese werden in unphysiologisch hoher Konzentration freigesetzt und öffnen Kalziumkanäle, mit der Folge intrazellulärer Anreicherung von Kalzium. Kalzium ist ein zentrales Steuerelement in der Funktion der Nervenzelle und fungiert als Koenzym für verschiedene Stoffwechselwege. Ebenfalls als Konsequenz der erhöhten intrazellulären Kalzium-Konzentration wird die Aktivierung von Phospholipasen, vor allem Phospholipase A₂, beobachtet, die Membranphospholipide zu freien Fettsäuren, insbesondere zu Arachidonsäure, abbauen, die im Zytosol akkumulieren (Horn *et al.*, 1991). Die Lipidperoxidation von Zellmembranbestandteilen leitet den strukturellen und damit irreversiblen Zerfall (Zytolyse) ein. Arachidonsäure kann als Vorläufer der Eicosanoide (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene) kaskadenartige Synthesewege von deletärer Bedeutung für den Nervenzellstoffwechsel initiieren. Wichtig ist hier vor allem Prostaglandin (PGI₂), ein Vasodilatator und Inhibitor der Plättchenaggregation, dessen Synthese mit dem Auftreten freier Sauerstoffradikale einhergeht (Schmidley, 1990). Diese können bei ischämiebedingter Stoffwechselsuppression in ihrer gewebstoxischen Wirkung nicht ausreichend durch physiologische antioxidative Systeme der Zelle (Zytochrom-Oxidase, Glutathion-Reduktase, Superoxid-Dismutase) neutralisiert werden. Auch die Produktion von NO-Synthetase und NO führt zu einer frühen zusätzlichen neuronalen Schädigung der ohnehin gefährdeten Zellen (Iadecola, 1997). Der intrazelluläre und intranukleäre Einstrom von Kalzium stellt also ein pathophysiologisches Schlüsselereignis bei zerebraler Ischämie dar (Mattson *et al.*, 2000). Zusätzlich induziert eine pathologische Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration Apoptose (Dirnagl *et al.*, 1999).

B 2.3.2. Peri-infarkt Depolarisation

In ischämischen Neuronen und Gliazellen kommt es aufgrund des Energieverlustes zur Depolarisation und der Ausschüttung von Kalium und Glutamat. Im Infarktkern gehen die Zellen anoxisch zu Grunde, sie depolarisieren und können nicht repolarisiert werden. In der Penumbra hingegen, in der eine Restperfusion noch vorhanden ist, kommt es unter zusätzlichem Energieaufwand zu einer Repolarisation der Zellen. Aufgrund weiter zunehmender Kalium- und Glutamatlevel, die im Extrazellularraum akkumulieren, können dieselben Zellen erneut depolarisiert werden. Dieser Prozess, der als Peri-infarkt Depolarisation bezeichnet wird, wiederholt sich mehrmals in einer Stunde und wird bis zu 8 Stunden nach Ischämie beobachtet. Dabei korreliert die Infarktgrösse mit der Frequenz der Depolarisation (Mies *et al.*, 1993).

B 2.3.3. Inflammatorische Prozesse

Die Kalzium-abhängige Aktivierung intrazellulärer sog. *second messenger* Systeme, die Zunahme freier Sauerstoff-Radikale und auch die Hypoxie selber, fördern die Expression einer Vielzahl von proinflammatorischen Genen.

Inflammatorische und/oder immunologische Prozesse werden als Mediatoren der sekundären Gehirnschädigung nach zerebraler Ischämie angenommen (Kochanek and Hallenbeck, 1992). Danach infiltrieren frühzeitig inflammatorische Zellen das ischämische Gewebe. Bereits 4 Stunden nach der Okklusion der mittleren zerebralen Arterie (MCAO) in der Ratte können polymorphonukleäre Leukozyten (PMNs) in der ischämischen Hemisphäre detektiert werden, deren Aufkommen nach 48-72 Stunden maximal ist, um danach zahlenmässig wieder abzunehmen (Dereski *et al.*, 1992). Hämatogene und ortsständige Makrophagen, die eine wesentliche immunologische Bedeutung einnehmen (Thomas, 1992), treten später auf und verbleiben länger im ischämischen Gewebe (Morioka *et al.*, 1991; Petroff *et al.*, 1992; Ramsay *et al.*, 1992). Die Herkunft dieser Makrophagen im Gehirn wurde kontrovers diskutiert, jedoch gilt es mittlerweile als anerkannt, dass sie überwiegend aus dem zirkulierenden Blut stammen (Casanova *et al.*, 1986; Jordan and Thomas, 1988). Einen zweiten Subtyp von Makrophagen stellen gewebsständige Hirnmakrophagen dar, die wie auch dendritische Zellen aus Mikroglia generiert werden können.

Dendritische Zellen, die aus aktivierter, proliferierender Mikroglia im ischämischen Hirngewebe stammen (Kostulas *et al.*, 2002), zeigen bereits wenige Stunden nach Ischämie eine verstärkte Expression verschiedener Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ), die bis zu 6 Tage nach Ischämie erhöht ist.

β -Chemokine wie *macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α) und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) werden ebenfalls als potentielle Mediatoren der akuten inflammatorischen Antwort im Gehirn diskutiert (Kim *et al.*, 1995).

Ischämische Neurone selbst produzieren Cyclooxygenase 2 (COX2), ein Enzym, das Superoxid produziert, dessen Anion (O₂⁻) mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit (ONOO⁻) reagiert und somit die oxidative Schädigung vorantreibt (Iadecola, 1997). Das Stickstoffmonoxid (NO) wird dafür von den endothelialen Stickstoffsynthetasen (eNOS) und von den neuronalen Stickstoffsynthetasen (nNOS) bereitgestellt, die nach einer Ischämie und dadurch ständig erhöhten Kalziumkonzentrationen, verstärkt NO produzieren (Iadecola, 1997).

B 2.3.3.1. Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen

Die Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) umfasst eine Gruppe strukturell verwandter zinkhaltiger Endoproteinasen. Dazu gehören die Kollagenasen (MMP 1, 2 und 3), und die Gelatinasen (MMP 2 und 9), die in der Ischämie von Bedeutung sind, sowie Stromelysine (MMP 3, 10 und 11), Matrilysin (MMP 7). Derzeit sind 23 verschiedene MMPs bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass ihre Zahl in Zukunft durch Identifizierung weiterer MMPs noch steigen wird.

Die Regulation der MMP-Aktivität wird unterschiedlich, jedoch streng kontrolliert (Ries and Petrides, 1995). Zytokine, wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Transformierender Wachstumsfaktor (TGF- β) sowie Eicosanoide, insbesondere Prostaglandin E₂ sind wichtige Mediatoren, die die intrazelluläre Synthese von MMPs direkt fördern oder auch hemmen können.

MMPs zeichnen sich durch eine breite, aber nicht zwingend überlappende Substratspezifität aus. Sie sind für den Abbau von nahezu allen Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen, Elastin, Fibronectin oder Laminin verantwortlich (Chandler *et al.*, 1995). Dieser Verdau extrazellulärer Matrixproteine spielt eine wesentliche Rolle bei zahlreichen physiologischen Prozessen (z.B. Angiogenese), aber auch pathologischen Vorgängen, wie bei Ischämie (Planas *et al.*,

2001). MMP 2 und in geringerem Masse MMP 9 werden konstitutiv im Gehirn produziert (Zhang *et al.*, 1998). Nach Schädigung des Gehirns, z.B. durch Trauma (Shibayama *et al.*, 1997), permanente Ischämie (Gasche *et al.*, 1999), oder transiente Ischämie (Rosenberg *et al.*, 1998; Planas *et al.*, 2000), findet man eine Aktivierung von MMP 2 und 9 bereits wenige Stunden später, bis am vierten Tag ein Konzentrationsmaximum erreicht ist. Dieses korreliert zeitlich mit der inflammatorischen Inervierung von Makrophagen und Mikroglia des Infarktgebietes. Tatsächlich wurde gezeigt, dass diese Überexpression von MMP 2 und 9 diesen Zellen zuzuordnen ist (Planas *et al.*, 1998) und bis zu 4 Wochen nach Ischämie anhält.

MMPs nehmen daher bei zerebralen Läsionen im Rahmen von Entzündungsreaktionen, wie nach Schlaganfall, eine wichtige pathogenetische Rolle ein. Die gezielte Hemmung dieser Proteasen stellt daher einen aussichtsreichen therapeutischen Ansatz dar, und wurde in unserem Tiermodell der transienten, fokalen Ischämie untersucht.

B 2.3.3.2. Bedeutung des transformierenden Wachstumsfaktors beta (TGF- β)

TGF- β ist ein ubiquitär vorkommendes und multifunktionelles Zytokin, das beim Wachstum, der Proliferation, der Differenzierung, der Inflammation, der Migration, der Regulation von unterschiedlichen Zelltypen (Nervenzellen, Astrozyten und Mikroglia) und in verschiedensten Gewebearten von den frühen Entwicklungsstadien bis hin zur Wundheilung, eine entscheidende Rolle einnimmt. Auch in der Entwicklung des ZNS nimmt TGF- β eine besondere Rolle ein. Sogar eine Hauptrolle in der Regulation beim Überleben von Nervenzellen wird ihm zugesagt (Krieglstein *et al.*, 1998b; Schober *et al.*, 1999). Neben dem von Levi-Montalcini und Hamburger (1953) erstmals beschriebenen Nerven Wachstumsfaktor (NGF), der ebenso wie der Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) viele protektive Eigenschaften zeigt (Yamamoto *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1989), und weit verbreitet im Gehirn vorkommt und FGF seinerseits die Biosynthese von NGF anregt (Ono *et al.*, 1991), hat sich in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit auf TGF- β als protektiver (Henrich-Noack *et al.*, 1994; McNeill *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 2001) und regulierender Wachstumsfaktor im ZNS konzentriert (Flanders *et al.*, 1998).

Der pleiotrope Wachstumsfaktor TGF- β wird in geringen Mengen konstitutiv im Gehirn adulter Ratten exprimiert (Wang *et al.*, 1995). Darüber hinaus wird die Expression von TGF- β und seiner beiden Rezeptoren nach einem ischämischen Insult hochreguliert (Ata *et al.*, 1999). Interessanterweise korreliert dabei das Expressionsprofil von TGF- β 1 m-RNA mit der Monozyten/Makrophagen Akkumulation im ischämischen Kortex und der zunehmenden Formierung (Deformierung) der extrazellulären Matrix nach einer fokalen zerebralen Ischämie (Wang *et al.*, 1995). Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass TGF- β eine Hauptrolle im anti-inflammatorischen Prozess und in der Gewebeneubildung nach einer ischämischen Gehirnverletzung spielt. Auch eine erhöhte Expression von Serin-Protease-Inhibitoren (sog. *serpins*) bedingt durch TGF- β , die die Expression von Plasminogen Aktivator als einen wesentlichen Mediator für die Expression der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) nach Ischämie unterbinden, und damit einen protektiven Effekt bei Schlaganfall aufweisen (Docagne *et al.*, 1999) wurde beschrieben.

B 2.3.4. Rolle des programmierten neuronalen Zelltods

Der programmierte neuronale Zelltod tritt nicht nur während der Entwicklung des ZNS auf, sondern auch im adulten Gehirn von Säugern (Oppenheim, 1991). Die Degeneration und das Absterben von Nervenzellen ist ein fundamentaler biologischer Prozess, der für die klinische Manifestation vieler unterschiedlicher neurologischer Erkrankungen und des Alterns verantwortlich ist. Aufgrund der Tatsache, dass durch die bessere, weiter entwickelte medizinische Versorgung das Durchschnittsalter vor allem in den westlichen Industrieländern steigt, ist eine Zunahme der altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimerischen Erkrankung, Parkinson und vor allem des Schlaganfalls festzustellen.

Die Caspase-abhängige Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelltods im ZNS dar und kann als aktive Form des Zelltodes von der Nekrose anhand morphologischer, biochemischer, molekularer und pharmakologischer Parameter unterschieden werden und dient prinzipiell der physiologischen Zellmauserung. Mittlerweile sind auch grosse Teile der molekularen Kaskade, die zur Apoptose führen, bekannt (Schulz *et al.*, 1999). Jedoch spielt die Apoptose nicht nur beim

physiologischen Zelluntergang, sondern auch bei pathologischen Prozessen eine Rolle (Schulz *et al.*, 1999; Dirnagl *et al.*, 1999). Hierbei können durchaus Nekrose und Apoptose nebeneinander ablaufen, wobei sie sich nicht immer voneinander unterscheiden lassen. Mehrere Arbeitsgruppen haben mittlerweile auch eine Evidenz für eine Beteiligung der Apoptose bei zerebraler Ischämie erbracht (Namura *et al.*, 1998; Fink *et al.*, 1998; Velier *et al.*, 1999; Mattson *et al.*, 2000). Hierbei wurden verschiedene Tiermodelle der globalen (Liu *et al.*, 1998) und fokalen Ischämie (Velier *et al.*, 1999) verwendet. Nach fokaler Ischämie kommt es innerhalb des Infarktareals relativ rasch zum Zelluntergang. Hiervon unterscheiden sich Modelle mit milder fokaler Ischämie. Nach nur 30 min fokaler Ischämiezeit beispielweise demarkiert sich ein Infarkt erst nach Tagen. Bei diesem verzögerten neuronalen Tod handelt es sich offensichtlich vornehmlich um Apoptose (Fink *et al.*, 1998). Ebenso ist seit langem bekannt, dass es auch nach globaler Ischämie zu einem verzögerten Zelltod ("*delayed neuronal death*") in ganz bestimmten, besonders vulnerablen Arealen (vor allem CA1-Neurone im Hippokampus sowie Striatum) kommt (Liu *et al.*, 1998). Auch an diesem Zelltod, der selektiv Neurone betrifft, hat die Apoptose entscheidenden Anteil. Quantitativ spielt die Apoptose vor allem in der Penumbra, die sich um das nekrotische Kerngebiet eines Infarktes bildet, eine massgebliche Rolle. In dieser Zone findet noch eine Restperfusion statt, und die Zellen weisen einen Restmetabolismus auf, können jedoch ihre normale Funktion nicht mehr aufrecht erhalten. Offensichtlich ermöglicht jedoch gerade der verbleibende Metabolismus diesen Zellen die Induktion von Apoptose. Da die Apoptosekaskade prinzipiell hemmbar ist, liegen therapeutische Ansätze nahe. Erfolgsversprechend ist die pharmakologische Inhibition der sog. Caspasen (Schulz *et al.*, 1999). Hierbei steht „C“ für die Cysteinproteinaseaktivität, „aspase“ reflektiert die gemeinsame Fähigkeit dieser Enzyme, Polypeptide jeweils nach Asparaginsäure zu schneiden (Alnemri *et al.*, 1996). Die grundlegenden molekularen und biochemischen Arbeiten über die Gene, die den programmierten Zelltod regulieren, wurden von Horvitz und Mitarbeitern im Nematoden *Caenorhabditis elegans* durchgeführt (Ellis *et al.*, 1991). Hierbei können mehrere Klassen von Genen (ced-Gene für „cell death abnormal“) unterschieden werden. Zum einen gibt es negative Regulatoren, sog. „death inhibiting genes“, wie das ced-9 Gen, zum anderen „death effector genes“, wie ced-3 und ced-4, ohne die der programmierte Zelltod nicht stattfinden kann (Rubin *et al.*, 1994). Ein entscheidender Durchbruch gelang nach der Entdeckung, dass das

menschliche Interleukin-1 β -converting-Enzym (ICE) homolog zum ced-3-Gen ist (Yuan and Horwitz, 1990). ICE generiert aus pro-Interleukin 1- β das fertige IL-1- β , das als Mediator von zahlreichen Entzündungsreaktionen, Hypoxie-vermittelter Apoptose *in vitro* (Friedlander *et al.*, 1996) und von globaler und fokaler zerebraler Ischämie in verschiedenen Tiermodellen (Liu *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1996) angesehen wird. Caspase-3 scheint hauptsächlich in der Apoptose aktiviert zu werden. Neuropathologisch wurde inzwischen der Caspase-3-abhängige Nervenzelltod auch beim humanen Hirninfarkt nachgewiesen (Love *et al.*, 2000).

In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten eine Reihe experimenteller Untersuchungen den neuroprotektiven Effekt von pharmakologischen Inhibitoren der Caspasen nach zerebraler Ischämie an Maus und Ratte belegen (Endres *et al.*, 1998; Fink *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000; Wiessner *et al.*, 2000). Da diese synthetischen Caspase-Inhibitoren die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können, erfolgte die Anwendung der Substanzen bisher direkt intrathekal (intracerebroventrikulär) oder intraparenchymatös.

Mit dem Ziel, einen auch auf die klinische Situation der akuten Schlaganfallversorgung übertragbaren Applikationsweg zu erschliessen, wurde die Wirksamkeit einer lokalen intraarteriellen Gabe des vorwiegend Caspase-3-hemmenden Tetrapeptids z-DEVD.FMK nach experimenteller fokaler zerebraler Ischämie in der Ratte untersucht.

Unterschiedliche Hirnregionen und unterschiedliche neuronale Subpopulationen weisen unterschiedliche Ischämieschwellenwerte auf (=selektive Vulnerabilität). So sind Nervenzellen des Hirnstamms resistenter als kortikale Neurone und die Hirnrinde etwas empfindlicher als das Marklager. Topographisch handelt es sich hierbei insbesondere um das Ammonshorn, wobei sich die Empfindlichkeit der hippokampalen neuronalen Subpopulationen folgendermassen verhält: CA1>CA4>CA2>CA3>Gyrus dentatus>Subiculum. Weitere selektive vulnerable Nervenzellen finden sich in der Grosshirnrinde (3., 5., 6. Schicht>2., 4. Schicht; parietal, occipital>temporal, frontal; Sulci>Gyri), im Striatum (kleine, mittelgrosse Neurone>grosse Neurone), im Thalamus (insbesondere bei Säuglingen) und im Kleinhirn (Purkinjezellen>Körnerzellen) (Auer and Benveniste, 1997). Bei der Ratte werden nach globaler Ischämie zunächst die Zellen in der CA1-Schicht des Hippokampus geschädigt, gefolgt von den CA3-Pyramidenzellen, den granulären

Zellen des Gyrus dentatus (GD), den Gliazellen und zuletzt den Endothelzellen, die am resistantesten gegenüber Ischämie sind.

Das folgende Schaubild (Abb. 2) gibt einen prägnanten Überblick über die einzelnen Prozesse, die in der Pathophysiologie der Ischämie eine wesentliche Rolle spielen (B 2.3.1 bis B 2.3.4).

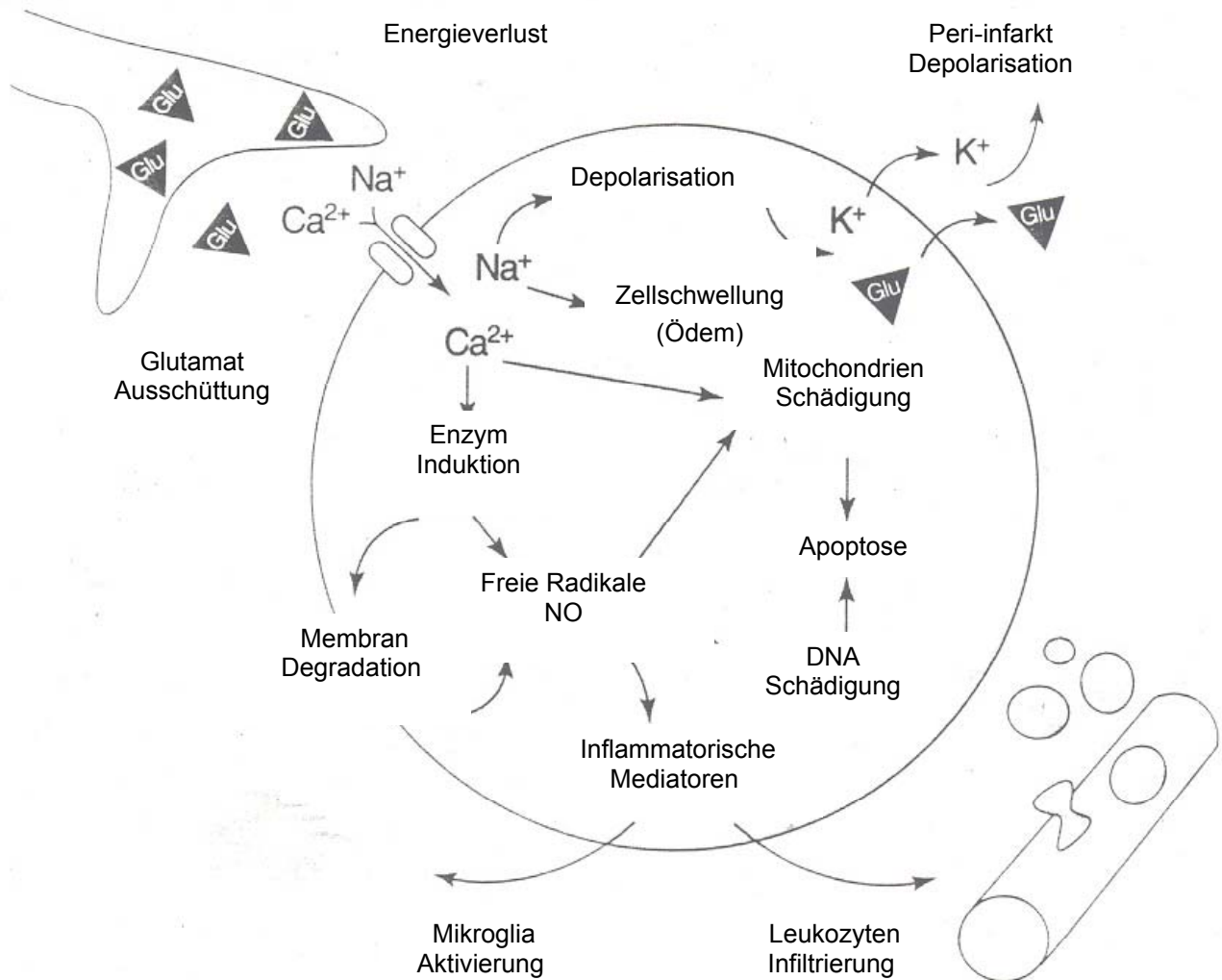


Abb. 2 Überblick pathophysiologischer Mechanismen im fokalen ischämischen Gehirn

Mangelnde Energie bedingt die Depolarisation einer Nervenzelle. Die Aktivierung spezifischer Glutamat-Rezeptoren führt zu einer dramatischen intrazellulären Anreicherung von Kalzium-, Natrium- und Chloridionen während Kaliumionen in den extrazellulären Raum ausgeschüttet werden. Durch die Diffusion von Glutamat (Glu) und Kaliumionen in den extrazellulären Raum kommt es zu einer Serie von aufeinanderfolgenden Depolarisationen (Peri-infarkt Depolarisation). Die Ionenwanderungen bauen einen osmotischen Gradient auf, Wasser gelangt in den intrazellulären Raum und es kommt zur Zellschwellung (Ödem). Der universelle intrazelluläre *messenger* Kalzium überaktiviert zahlreiche Enzymsysteme (Proteasen, Lipasen, Endonukleasen u. a.). Freie Radikale werden generiert, die die Membran zerstören (Lipolysis), ausserdem kommt es durch mitochondriale und DNA-abhängige Caspase-Induktion zum Zelltod (Apoptose). Zusätzlich kommt es durch freie Radikale zur Formierung inflammatorischer Mediatoren, die Mikroglia aktivieren und durch Hochregulierung endothelialer Adhesionsmoleküle, zur Invasion hämatogener inflammatorischer Zellen (Leukozyten-Infiltrierung). (aus Dirnagl *et al*, 1999, modifiziert).

B 3 Neuroprotektion

Der zur Zeit einzige neuroprotektive Ansatz, der bei einem Patienten mit akutem Schlaganfall zum Einsatz kommt, ist der *tissue plasminogen activator* (tPA). Es handelt sich dabei um ein thrombolytisches Agenz, das die Ischämie selbst limitiert, indem es arterielle Thromben lysiert und dadurch die Durchblutung wiederherstellt. Ausserdem kommen Kalzium-Antagonisten zum Einsatz, die den Kalziumeinstrom in die Zelle verhindern und die zerebrale Durchblutung erhöhen sollen.

Eine zweite sehr wichtige Strategie stellen, die als selektiv vulnerable bezeichnete, therapierbare und protegierbare zerebrale Strukturen bestimmter Neuronenpopulationen nach einer ischämischen Verletzung dar. Dabei spielt die Verminderung der Exzitotoxizität eine übergeordnete Rolle, da dieses Ereignis unmittelbar nach einer Ischämie auftritt (siehe Abb. 1 in B 2.3. und B 2.3.1.).

Die Reduzierung der Glutamatausschüttung, die verminderte Stimulierung der Glutamatrezeptoren und der daran beteiligte Kalziumeinstrom sind Hauptangriffspunkte für die Reduzierung der Exzitotoxizität.

B 3.1. Glutamat-Rezeptor-Agonisten (NMDA, AMPA), Kalzium-, Natrium- und Chloridkanalblocker

Glutamat und sein Rezeptor nehmen eine überragende Rolle in der Pathogenese der Ischämie (wie unter B 2.3.1. näher beschrieben) ein. Dabei spielt die Hypothese der

Glutamat-Kalzium Überladung eine entscheidende Rolle, die darauf beruht, dass während einer Ischämie eine exzessive Akkumulierung des Glutamats im extrazellulären Raum, in der postsynaptischen Zelle zur Aktivierung der Glutamatrezeptoren führt (Kristian and Siesjö, 1996). Diese Hypothese bestätigt also den direkten toxischen Effekt von Glutamat auf eine Nervenzelle durch die kritische Beeinflussung der Wanderung von Ionen durch die Zellmembran und intrazellulären Organellen, vor allem der von Kalzium und Natrium. Jedoch gibt es auch Untersuchungen, die eine rasche Abnahme des Glutamats im extrazellulären Raum auf normales Niveau beschreiben, sobald sich der Blutfluss nach Reperfusion normalisiert (Globus *et al.*, 1991). Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Funktionalität der Nervenzellen auch auf ein Grundniveau sinkt (Chang *et al.*, 1989). Mitani und Kataoka (1992) widersprechen ebenfalls diesem direkten Zusammenhang von der Anreicherung von exzitatorischen Glutamat und dem damit verbundenen neuronalen Zellverlust. In Untersuchungen nach einer globalen Ischämie an der mongolischen Wüstenspringmaus, ergaben Microdialysen einen gleichen Gehalt an extrazellulärem Glutamat in den beiden hippocampalen Regionen CA1 und CA3, von denen jedoch bekannt ist, dass die Neurone der CA3 Region resistent gegenüber einer Ischämie sind, und nicht wie die Nervenzellen der CA1 Region untergehen. Zusätzlich haben *in vitro* Analysen Glutamat als Mediator für die akute Depolarisation von Nervenzellen, die anoxisch inkubiert wurden, widerlegt (Calabresi *et al.*, 1999). Diese Erkenntnisse legen den Verdacht nahe, dass die Zunahme von Glutamat im extrazellulären Raum nach Ischämie und die damit verbundene Aktivierung von postsynaptischen Glutamatrezeptoren nicht die alleinigen Mediatoren der Nervenzellschädigung sind, sondern vielmehr einen Prozess initiieren, der zum neuronalen Zellverlust führt.

Die Mechanismen dieser extrazellulären Anreicherung von Glutamat beruhen auf einem Ungleichgewicht der Ionengradienten von Natrium, Kalium, Kalzium und Chlorid während einer Ischämie, das auf die reduzierte Energieproduktion zurückzuführen ist (Jiang *et al.*, 1992). Durch diese Inbalance der Ionengradienten kommt es zur Depolarisation der Zellmembran und zur Aktivierung von spannungsabhängigen und rezeptorregulierten Ionenkanälen (Silver and Erecinska, 1990) und dadurch bedingt zur exzitatorischen Ausschüttung von Neurotransmittern während der normalen Neurotransmission. Hinzu kommt eine verstärkte Glutamatausschüttung unter ischämischen Bedingungen. Auch die Aktivierung von

Natriumkanälen induziert die Glutamatausschüttung via reversiblen Transport von Glutamat durch Glutamattransporter. Taylor *et al.*, (1995) haben gezeigt, dass durch Natriumkanal-Antagonisten oder –Blocker, die Zellschädigung im Hippokampus durch einen Überfluss an Glutamat während der Ischämie reduziert ist. Extrazelluläres Glutamat und Natriumionen werden unter normalen physiologischen Bedingungen durch Glutamattransporter in die Zelle importiert. Gleichzeitig werden intrazelluläre Kaliumionen exportiert (Barbour *et al.*, 1988). Pharmakologische Manipulationen *in vivo* und *in vitro* haben die Beteiligung von spannungsabhängigen/sensitiven Ionenkanälen bei der verstärkten Freisetzung von Glutamat bestätigt. Neuere Untersuchungen belegen, dass auch Chloridkanäle für die zunehmende Ausschüttung von Glutamat verantwortlich gemacht werden können, wenn sie während hypertoner Bedingungen in Ischämien und der damit verbundenen Zellschwellung aktiviert werden (Phillis *et al.*, 1997).

Therapeutisch einwirken kann man erst, nachdem ein Schlaganfall eingetreten ist, so dass die Therapeutika vor allem nach einer Ischämie ihre Wirksamkeit erbringen müssen. Es gibt Untersuchungen, die die protektive Wirkung von NMDA-Rezeptor Antagonisten und nicht NMDA-Rezeptor Antagonisten (AMPA) belegen, auch wenn sie nach einer transienten Ischämie, global oder fokal, im Tiermodell verabreicht werden (Park *et al.*, 1988; Nelligard and Wieloch, 1992).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Untersuchungen zur Neuroprotektion in den verschiedenen Tiermodellen der Ischämie, sich auf die drei Prozesse beschränken, die Exzitotoxizität, die Peri-Infarkt Depolarisation und den neuronalen Zelltod. Dabei werden Glutamatantagonisten (NMDA, AMPA) und Natrium- bzw. Kalziumkanalblocker verwendet. Der später folgende, programmierte neuronale Zelltod wird mit Caspase-Inhibitoren reduziert.

B 3.2. Wachstumsfaktoren

Mehere Untersuchungen haben in den letzten Jahren die protektive Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren im neuronalen Zelltod gezeigt (Thoenen, 1995). Darüber hinaus hat sich diese protektive Eigenschaft der Wachstumsfaktoren auch im adulten Gehirn nicht nur unter pathophysiologischen Bedingungen bestätigt, sondern auch während der Neurogenese (Goldman *et al.*, 1997; Lindsay *et al.*, 1994). Auffallend dabei war eine Anreicherung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren

in der subependymalen Schicht der Seitenventrikel und in der granulären Schicht des Gyrus dentatus im Hippokampus. Vor allem der *Nerve Growth Factor* (NGF), der von Levi-Montalcini und Hamburger bereits 1953 als neuroprotektiv beschrieben wurde, und der *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), beide Mitglieder der Familie der Neurotrophine, wurden als neuroprotektive Wachstumsfaktoren beschrieben. Aber auch Neurotrophin 3 (NT-3), nicht aber NT-4/-5 gelten als neuroprotektiv. Eine endogene, autoprotektive neuronale Expression von NGF und BDNF wird nach zerebraler Ischämie beobachtet (Lindvall *et al.*, 1992). Endogenes BDNF und sein Rezeptor trkB spielen in der akuten neuronalen Schädigung eine wichtige Rolle. Sowohl nach globaler, als auch nach fokaler Ischämie zeigte sich eine Reduzierung des Infarktvolumens in Ratten durch die Behandlung mit rekombinantem BDNF (Beck *et al.*, 1994; Tsukahara *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu zeigten Versuche mit transgenen Mäusen, denen ein Allel von BDNF deletiert wurde oder die eine reduzierte Funktion von BDNF aufwiesen und somit eine Überexpression einer modifizierten Form des trkB-Rezeptors induzierten, ein grösseres Infarktvolumen als die Kontrolltiere (Endres *et al.*, 2000). Auffällig ist zudem, dass bei einem bestimmten Rattenstamm mit spontanem Bluthochdruck, die Neigung oder Anfälligkeit einen Schlaganfall zu erleiden, mit einer Mutation im trkB-Gen korreliert (Kageyama *et al.*, 1996).

B 3.3. Antisense-Oligonukleotide als Therapeutika

Die Antisense-Technologie hat sich in den letzten Jahren als eine erfolgversprechende Methode zur selektiven Suppression von Genen im ZNS etabliert. Ihre zelluläre Aufnahme und die Anreicherung im betroffenen Gewebe konnte ebenfalls gezeigt werden (Ogawa *et al.*, 1995). Die Inhibierung der Proteinsynthese mit dieser Technologie ermöglicht es, die Funktion einzelner Gene in komplexen Zusammenhängen, darunter auch die Gewebeerstörung nach einer Ischämie, zu untersuchen. In diesem Zusammenhang konnte auch die Verhinderung pathologischer Prozesse durch die selektive Suppression von Genen während der Ischämie gezeigt werden (Zhou *et al.*, 1994). Der grosse Vorteil dieser Technologie besteht darin, dass bei der richtigen Wahl der Zielsequenz, der Grösse (Anzahl der Nukleotide im Oligomer) und der Basenkomposition (um eine unspezifische Hybridisierung mit einer Nichtzielsequenz zu verhindern), eine unbegrenzte Anzahl

an Molekülen synthetisiert werden kann, die eine hohe Spezifität und Effektivität gewährleisten. Durch gezielte Expressionshemmung können Funktionen einzelner Proteine untersucht werden.

B 4 Neuroregeneration

Das Dogma, dass das Wachstum von Nervenzellen nach der abgeschlossenen Embryogenese und die Erneuerung oder Regeneration derselben nach einer Hirnverletzung nicht möglich sei, wurde bereits vor nunmehr siebenunddreissig Jahren (1965) zum ersten Mal widerlegt. Altman und Das beschrieben die postnatale, neuronale Regeneration im Hippokampus bei Ratten. Erst dreissig Jahre später wurde dieses Phänomen der endogenen Regeneration von Nervenzellen im Gehirn adulter Säuger, nicht zuletzt bedingt durch die zunehmende Bedeutung der neurodegenerativen Erkrankungen, Ziel neuer Untersuchungen (Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993; Menezes *et al.*, 1995). Diese zeigten, dass die in der subependymalen Zone der adulten Lateralventrikel generierten, neuronalen Vorläuferzellen in den rostralen migratorischen Strom wandern, ihre letzten Zellteilungen vollenden und in den Bulbus olfactorius migrieren, um letztendlich zu neuen Neuronen zu differenzieren. Die zweite regenerative Zone befindet sich im Hippokampus, der stark in die Prozessierung und Speicherung von neuen Informationen involviert ist. Während der Entwicklung des Hippokampus bildet sich eine sekundäre Keimzone zwischen dem Hilus und der granulären Zellschicht, der sog. subgranulären Zone (Altman und Bayer, 1990). Von hier aus migrieren die Vorläuferzellen oder neuronalen Stammzellen lokal in den Gyrus dentatus um dort zu Nervenzellen auszudifferenzieren (Cameron *et al.*, 1993).

Diese unter physiologischen Bedingungen zu beobachtende Neurogenese im erwachsenen Säugergehirn, von der inzwischen bekannt ist, dass sie unter anderem Alters- (Kuhn *et al.*, 1996), Östrogen- (Tanapat *et al.*, 1999) und kortikoidabhängig (Cameron and Gould, 1994) ist, lässt sich durch bestimmte Versuchsanordnungen modifizieren. Auch konnte gezeigt werden, dass Stress diesen physiologischen Prozess der Zellerneuerung hemmen kann (Gould *et al.*, 1997) und stimulierende Umweltreize sowie freiwilliges oder forciertes Laufen (*voluntary or forced running*) ihn fördern können (Gould *et al.*, 1998; Kempermann *et al.*, 1997; Kempermann *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1999; van Praag *et al.*, 1999).

Neben umweltkorrelierten äusseren Reizen führen auch zerebrale Schädigungen zu einer Modifizierung der Neurogenese. In einem Tiermodell der Epilepsie zeigten Parent *et al.*, (1997), dass prolongierte epileptische Anfälle mit einer Stimulation der Neurogenese einhergehen. Ebenso kann nach exzitotoxisch oder traumatisch hervorgerufenen Läsionen eine Zunahme neuronaler Proliferation im erwachsenen Säugergehirn beobachtet werden (Gould and Tanapat, 1997).

Die zunehmende Diskussion um die Transplantation embryonaler aber auch adulter Stammzellen ist ebenfalls in den letzten Jahren in das Zentrum wissenschaftlichen Interesses gerückt. Mehrere Gruppen haben die Anwendung von Stammzellen zur Förderung der Regeneration nach unterschiedlichen Gehirnverletzungen dokumentiert.

B 4.1. Neurogenese nach zerebraler Ischämie

Die Neubildung von Nervenzellen nach zerebraler Ischämie wurde an verschiedenen Nagern, z.B. im Gerbil (Liu *et al.*, 1998), in der Maus (Takagi *et al.*, 1999) oder in der Ratte (Jin *et al.*, 2001; Kee *et al.*, 2001) gezeigt. Diese Neurogenese findet überwiegend im Gyrus dentatus und in der subventrikulären Zone statt, nicht aber in den ischämisch empfindlichen Regionen des Hippokampus CA1-CA4 oder dem zerebralen Kortex. Die Untersuchung kortikaler Neurogenese, aber auch die Regeneration im Striatum nach einer fokalen zerebralen Ischämie, wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Einzelne, neuere Untersuchungen bestätigen frühere Annahmen, dass das Phänomen der Neurogenese sich nicht nur auf den Gyrus dentatus des Hippokampus und die subventrikuläre Zone der Seitenventrikel beschränkt, sondern auch im Kortex erwachsener Mäuse (Magavi *et al.*, 2000), erwachsener Ratten (Jiang *et al.*, 2001) und auch im Kortex von Primaten (Gould *et al.*, 1999c), nachweisbar ist. In Magavis Untersuchungen konnte nicht nur die Neubildung von Nervenzellen gezeigt werden, sondern darüber hinaus die funktionelle Integration dieser neuen Nervenzellen durch die Ausbildung axonaler Fortsätze zu ihrem Zielgebiet im Thalamus. Für die Regeneration, oder besser gesagt, die Neubildung von Nervenzellen aus proliferierenden Stammzellen in der Peri-Infarkt-Zone (PIZ) nach zerebraler Ischämie gibt es bisher nur einige Hinweise. Dazu kommt noch die Tatsache, dass unterschiedliche Modelle benutzt werden und damit eine eindeutige

Aussage über die Fähigkeit des adulten Gehirns, sein endogenes Potential nach einer Verletzung zu nutzen um speziell im Infarktgebiet das abgestorbene Gewebe zu regenerieren, noch intensiven Untersuchungen unterliegen wird.

B 5 Zerebrale Ischämiemodelle

Es gibt unterschiedliche Modelle, die für die Untersuchung des ischämisch bedingten Untergangs von Nervenzellen Verwendung finden. Man unterscheidet drei Hauptklassen von In-vivo-Modellen bei Nagern. Globale Ischämie, fokale Ischämie und eine Kombination aus Hypoxie und Ischämie, bei der eine Gefässokklusion zeitgleich mit hypoxischer Beatmung oder arterieller Hypofusion durchgeführt wird. Desweiteren bestehen In-vitro-Modelle, die dazu benutzt werden, das Verhalten neuronaler Zellen nach Anoxie oder einer sog. In-vitro-Ischämie (Anoxie mit gleichzeitiger Abwesenheit von Glukose), zu untersuchen.

B 5.1. Globale zerebrale Ischämie

Die drei am häufigsten benutzten Modelle sind die *four-vessel-occlusion* (4-VO) in der Ratte, bei der eine permanente Koagulation der Vertebralarterien mit der temporären Ligation beider Karotiden kombiniert wird, die *two-vessel-occlusion* (2-VO) kombiniert mit einer Hypotension in der Ratte, bei der beide Karotiden temporär verschlossen werden und die 2-VO im Gerbil (mongolische Wüstenspringmaus).

B 5.2. Fokale zerebrale Ischämie

Unabhängig von der Wahl des fokalen Versuchstiersmodells (grössere Säuger, Katze, Primaten oder Nager) sind alle Modelle durch die Okklusion einer Hirnarterie charakterisiert. Es gibt zwei wesentliche Unterschiede zur globalen Ischämie. Erstens ist auch im Kerngebiet des Infarktes der Blutfluss grösser, was die wesentlich längere Okklusionsdauer bis zum Zelluntergang erklärt, und zweitens entwickelt sich nach einer fokalen zerebralen Ischämie ein ischämischer Kern, in dem die Nervenzellen nekrotisch in wenigen Stunden zu Grunde gehen. Dieses Kerngebiet des Infarktes ist wiederum von der Penumbra umgeben, in der ein apoptotischer

Zelluntergang verzögert auftritt. Somit ist die MCAO sehr viel komplexer als die globale Ischämie und spiegelt die Gegebenheiten eines Schlaganfalls besser wider.

B 6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Ansätze für protektive Mechanismen zur Reduzierung des neuronalen Zelltods nach einer Ischämie zu überprüfen. Zusätzlich sollte das endogen vorhandene Potential des adulten Säugergehirns zur Neurogenese nach Schlaganfall untersucht werden.

Unterschiedliche Ansatzpunkte wurden für die Reduzierung des neuronalen Zelltods (Neuroprotektion) gewählt:

1. Etablierung einer geeigneten Applikationsform für niedermolekulare therapeutische Substanzen (Kapitel E 1)
2. Die gezielte Inhibierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die nach Ischämie stark hochreguliert werden und zum Hirnödem führen und damit der Hemmung der Degradation der extrazellulären Matrix (Kapitel E 2)
3. Die Reduzierung des programmierten neuronalen Zelltods durch den Einsatz eines spezifischen Caspase-3 Inhibitors (Kapitel E 3)
4. Die Modulation (Verstärkung) des TGF- β Signalweges durch Antisense-Oligonukleotide gegen an der Signalkette von TGF- β beteiligte Moleküle (Kapitel E 4).

Im Gegensatz zu der bisherigen experimentellen Applikationsform (intraparenchymatös, intrazerebroventrikulär), könnte die intraarterielle Applikation einen unmittelbaren Weg darstellen, das ischämische Hirngewebe zu erreichen.

In diesem Zusammenhang wurden folgende Fragen untersucht:

- a) Können Antisense-Oligonukleotide und Caspaseinhibitoren nach intraarterieller Applikation die ischämisch geschädigte Blut-Hirn-Schranke passieren und erreichen sie das Zielgewebe (Penumbra)?
- b) Wie schnell erreichen sie diese und wie lange verbleiben sie dort?
- c) Wird die Substanz von den Zielzellen (Neurone) aufgenommen?

Die zweite Variante bestand darin, die durch Endopeptidasen bedingte Degradation der extrazellulären Matrix nach Ischämie zu verhindern. Auch dieser MMP-2/-9 spezifische Inhibitor wurde wie die FITC-konjugierten Antisense-Oligonukleotide zur

Untersuchung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Kapitel E 1) intraarteriell unmittelbar mit Reperfusion appliziert (Kapitel E 2).

Auch durch die Verwendung eines spezifischen Caspase-3 Inhibitors wurde versucht den programmierten neuronalen Zelltod nach Ischämie mit der neuen Applikationsform (intraratriell) zu reduzieren (Kapitel E 3).

Ein sehr auffälliges Phänomen nach einer Ischämie ist die inflammatorische Aktivierung von Makrophagen/Monozyten in der Infarktzone, die mit der Expression von Zytokinen korreliert, vor allem der von TGF- β , dem eine neuroprotektive Wirkung *in vivo* zugesprochen wird und dessen Expression nach einer Ischämie für bis zu zwei Wochen hochreguliert ist. Ausserdem nimmt TGF- β eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese ein, die nach einer Ischämie verstärkt auftritt.

Aufgrund dieser vorliegenden Erkenntnisse sollte durch die Verstärkung der Signalkaskade von TGF- β dieser protektive Effekt im Tiermodell genutzt werden, um die in den letzten Jahren viel diskutierte Substanzklasse der Antisense-Oligonukleotide *in vivo* zu testen (Kapitel E 4). Vorangehende In-vitro-Untersuchungen bestätigten eine Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide zur Reduzierung der Apoptoserate in PC 12-Zellen nach Apoptoseinduktion.

Während der Signaltransduktion von TGF- β spielen Smads (Sma 2,3 und 4 aus *C. elegans*; MAD: *mothers against decapentaplegic* aus *Drosophila*) eine wichtige Rolle. Diese werden in drei Klassen eingeteilt, je nachdem ob sie rezeptorregulierend (Smad 2,3), inhibierend (Smad 7) oder als Mediator (Smad4) in die Signalkaskade von TGF- β eingreifen.

Durch In-vivo-Aufnahme von Antisense-Oligonukleotiden gegen Smad7, das den TGF- β -Signalweg normalerweise hemmt, aber durch die Antisense-Behandlung TGF- β nicht mehr abfängt und so die Signalkaskade verstärkt, sollte einerseits eine protektive Wirkung erreicht werden, während andererseits durch die Smad4 Antisense-Behandlung und der daraus resultierenden Hemmung des TGF- β Signalweges, keine Protektion des Gewebes und somit keine Verminderung der Infarktgrösse zu erwarten war.

5. Aufgrund der in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnis, dass im Gehirn adulter Säuger Neurogenese stattfindet und diese auch induzierbar ist, wurde in dem selben Tiermodell untersucht, inwiefern Neurogenese neben den bisher bekannten Orten der Neurogenese (Hippokampus und subventrikuläre Zone) auch in der

Randzone des Infarktgebietes und dem umliegenden Gewebe nachzuweisen ist (Kapitel E 5).

C Material

C 1.1. Enzyme

Alkalische Phosphatase	(Merck, Mannheim)
DNase	(Merck, Mannheim)
RNase A	(Merck, Mannheim)
Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT), <i>ApopTag[®] Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit</i>	(Intergen, Purchase, USA)

C 1.2. Antikörper

Primäre Antikörper

rat anti BrdU	1:400	Chemicon, Hofheim
mouse anti NeuN	1:20	Salk Institute, San Diego, USA
rabbit anti GFAP	1:500	Dianova, Hamburg
rat anti BrdU	1:500	Harlan SERA-LAB, Loughborough, England
sheep anti DIG AP	1:500	Boehringer, Mannheim
sheep anti DIG FITC	1:100	Boehringer, Mannheim
mouse <i>myeloma</i> Prot. (MOPC21)	1: 200	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
rabbit anti TGF- β 1/2	1:50	R & D Systems, Wiesbaden
rabbit anti <i>cleaved</i>	1:100	Cell Signaling Technology, Boston, USA

Caspase-3-FITC		
mouse anti active Caspase 3 (Klon 5F6.H7)		Oncogene Research, Boston

Sekundäre Antikörper

donkey anti sheep IgG-FITC	1:500	Dianova, Hamburg
donkey anti mouse IgG-RHOX	1:500	Dianova, Hamburg
donkey anti rabbit IgG-CY5	1:1000	Dianova, Hamburg
donkey anti rat IgG-CY5	1:1000	Dianova, Hamburg
donkey anti rat IgG-FITC	1:1000	Dianova, Hamburg
donkey anti rat IgG-BT	1:1000	Dianova, Hamburg
donkey anti rabbit IgG- BT	1:1000	Dianova, Hamburg
goat anti mouse APkonjugiert	1:5000	Boehringer, Mannheim

C 1.3. Phosphorthioat Oligonukleotide

	Region in cDNA Sequenz	Sequenz	GeneBank Acc.-No.
SMAD 7	245-264	5'-CTGCGGGGAGAAGGGGCGAC-3'	AF042499
antisense		5'-GTCGCCCCTTCTCCCCGCAG-3'	
SMAD 4	129-144	5'-ATGGACAATATGTCTA-3'	AF056000
antisense		5'-TAGACATATTGTCCAT-3'	

Die Infusion der Antisense-Oligonukleotide (100 pmol/0,5 ml in 0,9 %iges NaCl) erfolgte nach 90 min Ischämie mit Reperfusion über 1 h intraarteriell (lokal) über einen in der *A. carotis interna* (ACI) der ischämischen Seite platzierten Katheter. Die Smad4 sense Sequenz (AF 056000) wurde als Kontrolle für die *in vivo* Experimente eingesetzt.

C 1.4. Inhibitoren

Caspase-3 Inhibitor: zDEVD-FMK; *N*-benzyloxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethylketone
(Enzyme Systems, Livermore, CA, USA)

MMP-2/MMP-9 Inhibitor: 2R)-2-[(4-Biphenylsulfonyl)amino]-3-phenylpropionic Acid (Calbiochem, Cat. Number 444241)

C 1.5. Tiere

Im tierexperimentellen Teil dieser Arbeit wurden für die Untersuchungen zur transienten fokalen Ischämie junge adulte Wistar-Ratten der Gewichtsklasse 230-270 g aus der Zucht Charles River (Sulzfeld) verwendet. Für die Versuche mit globaler Ischämie wurden junge Gerbils (mongolische Wüstenspringmaus, ca. 20 g) ebenfalls aus der Zucht Charles River benutzt.

C 1.6. Verwendete Lösungen

C 1.6.1. Puffer

0,1 M Boratpuffer:	Borsäure pH 8,5 mit 5 N NaOH einstellen	5 mM
0,2 M PO_4^{3-} Puffer:	NaH_2PO_4 bzw. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ Na_2HPO_4 bzw. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	45 mM 155 mM
PBS:	0,2 M PO_4^{3-} -Puffer NaCl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	500 ml 154 mM ad 1000 ml
10 x TBS:	Trizma HCl Trizma Base NaCl	840 mM 160 mM 1,54 M
20 x SSC:	NaCl NaCitrat x 2 H_2O pH 7,0 mit 10 N HCl einstellen	3 M 355 mM
Substrat Puffer:	Tris-HCl pH 9,5 NaCl MgCl_2	0,1 M 0,1 M 50 mM
5 x TE:	Tris-HCl pH 8,0 EDTA	50 mM 5 mM
10 x TBE:	Tris Borsäure EDTA	500 mM 500 mM 10 mM

5 x Auftragspuffer.	Saccharose	50% (w/v)	
	Harnstoff	4 M	
	EDTA	50 mM	
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)	

Acrylamidlösung bei 4°C lagern	(29:1): Acrylamid	29 g	
	Bisacrylamid	1 g	add 100 ml H ₂ O _{dest}

Alkalische (AP)-Puffer:	Phosphatase Tris pH 9,5	38 mM	
	MgCl ₂	5,4 mM	
	NaCl	50 mM	

Anodenpuffer A: bei 4°C lagern	MeOH	100 ml	
	1M Tris pH 10,4	12,5 ml	ad 500 ml H ₂ O _{dest}

Anodenpuffer B: bei 4°C lagern	MeOH	100 ml	
	1M Tris pH 10,4	150 ml	ad 500 ml H ₂ O _{dest}

10% APS: bei -20°C lagern	NH ₄ -Persulfat	10 g	ad 100 ml H ₂ O _{dest}
------------------------------	----------------------------	------	--

Blocklösung: bei -20°C lagern	BSA (<i>blot qualified</i>)	10 g	
	TBST		ad 500 ml H ₂ O _{dest}

Kathodenpuffer: bei 4°C lagern	1M Tris pH 9,4	12,5 ml	
	DL-Norleucin	2 mM	ad 500 ml H ₂ O _{dest}

C 1.6.2. Färbelösungen

DAB-Färbelösung:	TBS	40 ml	
	H ₂ O ₂ (30 %)	12 µl	
	NiCl ₂ -Lösung (8 %)	200 µl	
	DAB tetrahydrochlorid	500 µl (20mg/ml)	

(0,7 mM)

BCIP/NBT-Färbelösung:	NBT-Stammlösung	450 µl
	BCIP-Stammlösung	350 µl

NBT-Stammlösung:
 75 mg/ml Nitro Blue Tetrazolium
 in 70 % Dimethylformamid/30 %
 H_2O_2
 bei -20°C lagern

BCIP-Stammlösung:
 50 mg/ml Bromo-chloro-indolyl-
phosphat toluidinsalz in
 Dimethylformamid
 bei -20°C lagern

Vectastain	ABC-Kit	Vector Laboratories, USA
------------	---------	--------------------------

C 1.6.3. Sonstige Lösungen (Aufbereitung und Lagerung)

CPS:	Glycerin	250 ml
	Ethylenglycol	250 ml
	0,1 M PO_4^{3-} -Puffer	500 ml

30 % Sucrose:	Sucrose	150 g
	0,1 M PO_4^{3-} -Puffer	ad 500 ml

Gelantine-Lösung:	Gelantine (300 Bloom)	3,5 g
	Chromkaliumsulfat	0,35 g
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	700 ml

PVA-DABCO:

12 g Glycerin und 4,8 g PVA (Polyvinylalkohol) wurden gut vermischt mit 12 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ versetzt und ÜN gemischt. Nach Zugabe von 24 ml 0,2 M Tris pH 8-8,5 wurde unter gelegentlichem Schütteln für 30 min auf 50°C erhitzt. Danach erfolgte eine Zugabe von 2,5 % (w/v) DABCO (Triethylendiamin). Nach Durchmischung wurde zwei mal 15 min mit 3000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Paraformaldehyd (4%ig):

4 g Paraformaldehyd wurden in 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ nach Zugabe von 100 μl 10 N NaOH unter ständigem Rühren und Erwärmung auf 70°C gelöst. Anschliessend wurden 50 ml 0,2 M PO_4^{3-} -Puffer zugegeben und durch einen Faltenfilter (24 Ø, Macherey-Nagel, Düren) filtriert.

C 1.7. Computerprogramme und Datenbanken

Texte und Tabellen dieser Arbeit wurden mit Microsoft Office 98 Professional (Macintosh Edition) auf einem Macintosh iMAC erstellt. Zeichnungen, Diagramme und Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop 6.0 (Adobe), Corel Draw 8.0 (Corel Systems), Canvas 5.0.3. (Deneba Systems) und Cricket Graph 1.3. (Cricket Software) angefertigt. Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe der TCS-NT Software 1.6.569 (Leica) erstellt. Für die Literatursuche wurde die MEDLINE-Datenbank (*National Library of Medicine*) unter folgender Adresse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) herangezogen. Die quantitative Auswertung der Histogramm- (D 3.1.) und Dotblot-Untersuchungen (D 3.2.) am Durchflusszytometer wurden mit WinMDI 2.8 (SoftWindows 95) durchgeführt (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

D Methoden

D 1 Zellkultur

Für die *in-vitro*-Untersuchungen wurde ausschliesslich die Zelllinie PC 12 (*rat pheochromocytoma*) benutzt. Diese stammen aus einem Nebennierentumor der Ratte und finden sehr breite Verwendung in der Erforschung von neuronalen Zellen *in vitro*, da sie mit entsprechenden Wachstumsfaktoren (z.B. NGF) inkubiert, zu Nervenzellen differenzieren können.

Die verwendete Zelllinie wurde in einem Brutschrank inkubiert, dessen Einstellung eine Atmosphäre von 37°C, 5% CO₂-Gehalt und eine 95%ige Luftfeuchtigkeit gewährleistete. Die Zelllinie wurde in RPMI 1640-Medium (Biochrom, Berlin) mit 8% FCS und 8% Pferdeserum und 5 % Glutamat im Brutschrank (Heraeus, Nürnberg) kultiviert.

D 1.1. Proliferation der Zellen

Die in Suspension gehaltenen PC 12-Zellen wurden 2-3 mal wöchentlich im Verhältnis 1:5 geteilt und dabei in frisches Medium überführt.

D 1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Zellkultur wurde mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Lebende Zellen erscheinen farblos während tote sich blau anfärben. Aus einer gut suspendierten Zellkultur wurde ein Aliquot entnommen, mit Trypanblau verdünnt, in die Zählkammer überführt und unter dem Mikroskop mit dem 10er Objektiv ausgewertet. Dazu wurden die vier diagonal gegenüberliegenden und 16-fach unterteilten Quadrate ausgezählt. Die Gesamtzahl pro ml Suspension ergab sich nach der Formel:

Mittelwert Zellzahl x Verdünnungsfaktor x 10000

D 2 In-vitro-Untersuchungen zur Apoptose

D 2.1. Kinetik der Camptothecin-vermittelten Apoptose in PC 12-Zellen

Für die Induktion der Apoptose durch Camptothecin (0,5 µg/ml) wurden 200.000 Zellen pro well einer 6-well-Platte ausgesät und mit 2 ml Medium inkubiert. Unterschiedliche Inkubationszeiten wurden untersucht um die maximale Apoptoserate zu erhalten. Die Auswertung erfolgte wie unter D 3.1. beschrieben ist.

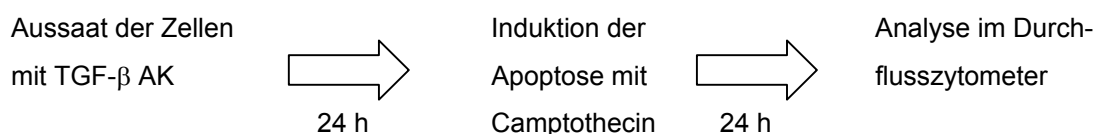
D 2.2. Proliferation von PC 12-Zellen unter TGF-β

Um die Proliferation der PC 12-Zellen unter Einwirkung von TGF-β zu untersuchen, wurden 200.000 Zellen pro well einer 6-well-Platte ausgesät und mit 10 ng/ml TGF β1, TGF-β2 oder einer Kombination aus beiden inkubiert. Nach 24, 48 und 72 h wurde die Proliferation dieser Zellen mit einer Kontrollsuspension ohne TGF-β verglichen und wie unter D 1.2. beschrieben ausgewertet.

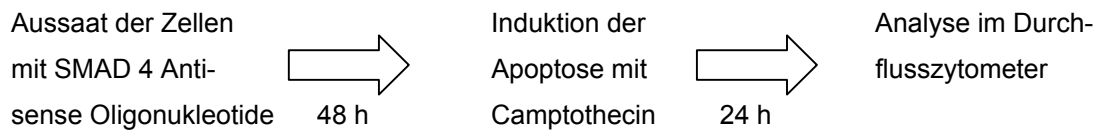
D 2.3. Die Rolle von TGF-β auf die Apoptose in vitro

Um den Signalweg von TGF-β zu schwächen wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Entweder durch die Blockierung der Rezeptoren für TGF-β mit einem *pan-specific TGF-β Antibody* (5 µg/ml; R und D Systems, Boston) oder durch Verwendung der gegen SMAD 4 gerichteten Antisense-Oligonukleotiden (5 µM) sollte die Apoptoserate mittels Inhibierung des TGF-β Signalweges reduziert werden. Eine Isotypkontrolle (mouse IgG, 5 µg/ml, Dianova, Hamburg) für den TGF-β Antikörper (AK) und eine MOCK-Kontrolle (Sense-Oligonukleotid, 5 µM) für die SMAD 4 Antisense-Oligonukleotide lief mit.

Schema zur TGF-β Antikörperbehandlung und Induktion der Apoptose in PC 12-Zellen durch Camptothecin:



Schema zur SMAD 4 Antisense-Oligonukleotid Behandlung und Induktion der Apoptose in PC 12-Zellen durch Camptothecin:



Nach dem Ende der Apoptoseinduktion wurden die Zellsuspensionen für die Analyse im Durchflusszytometer wie unter D 3.2. beschrieben weiter prozessiert.

D 3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine multiparametrische Zellanalyse. Bedingt durch die Fluoreszenz und das Streulichtverhalten von Einzelzellen, die über spezifische Rezeptoren, Proteine oder andere Marker (membranständig oder intrazellulär) fluoreszenzmarkiert werden, können diese Zellen aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften durch eine kombinierte Interpretation im Durchflusszytometer detektiert werden (Knüchel, 1994). Dabei ist es möglich sehr grosse Zellzahlen innerhalb kürzester Zeit (bis zu 1000 Zellen/sec) zu analysieren.

D 3.1. Sub-G₁-Peak Methode

In apoptotischen Zellen wird eine Endonuklease aktiviert, die DNA im Bereich zwischen den Nukleosomen schneidet. Die freien einzelnen Nukleosomen oder auch Oligonukleosomen können dann aus dem Kern heraus diffundieren, nicht jedoch aus der Zelle, da die Zellmembran apoptotischer Zellen intakt bleibt. Wenn man solche Zellen zunächst zweimal mit PBS (1g/l Glukose) wäscht und mit kaltem 70 %-gem Ethanol fixiert und somit permeabilisiert (ÜN bei 4°C), und anschliessend mit RNaseA (RNaseA-Stammlösung: 1 mg/ml RNase A bei 95°C in H₂O_{dest} 15 min kochen) bei 37 °C 20 Minuten inkubiert, können die DNA-Fragmente die Zellen verlassen. Färbt man die Zellen danach mit einem DNA-spezifischen Farbstoff wie z.B. das polare Fluorochrom Propidiumjodid (PI, 50 µg/ml/1x10⁶ Zellen), so kann man im Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) den DNA-Gehalt der einzelnen Zellen bestimmen. Die ursprünglich vitalen Zellen befinden sich dann in der G₁-, S- oder G₂/M-Phase des Zellzyklus, während die apoptotischen Zellen mit

reduziertem DNA-Gehalt weniger Farbstoff binden und im sog. Sub- G_1 -Peak zu finden sind.

D 3.2. Detektion apoptotischer Zellen durch Annexin V im Durchflusszytometer

Annexin ist ein phospholipidbindendes Protein, mit einer grossen Affinität für Phosphatidylserin (PS). Ein sehr frühes Ereignis in apoptotischen Zellen ist die Translokation von PS von der inneren auf die äussere Seite der Zellmembran. Die Bindung von Annexin an PS gilt daher als Marker für die Apoptose. Intakte Zellen werden von Annexin nicht gebunden. Jedoch werden auch nekrotische Zellen von Annexin markiert, so dass eine zusätzliche Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen notwendig ist. Diese wird durch die gleichzeitige Inkubation von Annexin V mit Propidiumjodid (PI) erreicht, das nur nekrotische, nicht aber apoptotische Zellen durchdringt.

Durch die Konjugation von Annexin V mit FITC ist es anschliessend möglich, im Durchflusszytometer diese unterschiedlich markierten Zellpopulationen (apoptotische Zellen sind ausschliesslich FITC positiv, während nekrotische entweder rot fluoreszieren (PI-positiv) oder doppelt positiv vorliegen) voneinander zu unterscheiden. Eine einmalige FACS (*fluorescence associated cell sorting*)-Analyse (Becton Dickinson, Heidelberg) mit darauffolgender mikroskopischer Untersuchung gewährleistete, dass die Verteilung der Zellen im *dot blot* auch tatsächlich den Gegebenheiten der Zellsuspension wiedergab (siehe Abb. D 3.2.1. und D 3.2.2.)

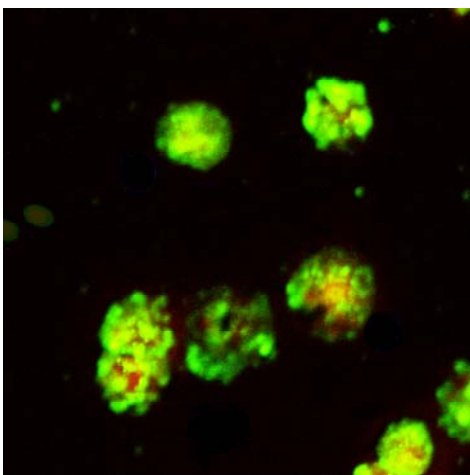


Abb. D 3.2.1.: Doppelpositive PC 12-Zellen mit Annexin und PI nach Induktion der Apoptose und FACS-Analyse

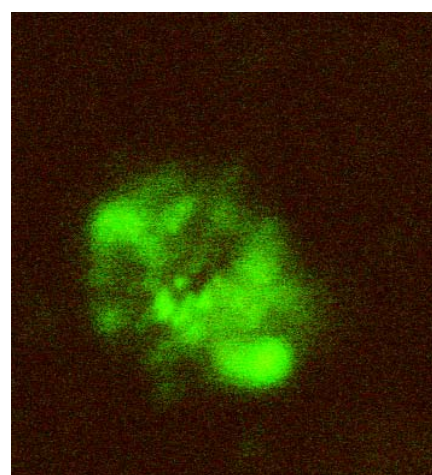


Abb. D 3.2.2.: Vergrösserte Darstellung einer apoptotischen Zelle (Annexin positiv) nach Apoptose und FACS-Analyse

Für die Prozessierung der Zellsuspension nach der Apoptoseinduktion wurde folgendermassen verfahren.

Am Ende der Apoptoseinduktion wurde die Suspension mit einer Pipette in ein Mikrotube transferiert und für 2 min mit 2000 U/min in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml PBS inkl. Glukose (1g/l) zweimal gewaschen. Danach wurde das Pellet in 100 µl Annexin V-Fluos (Boehringer, Mannheim) resuspendiert und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschliessend wurde die Probe auf 1 ml mit Annexin V-Fluos-Puffer aufgefüllt, um sofort im Durchflusszytometer analysiert zu werden, oder alternativ bis zu 4 h auf Eis gehalten, bevor es analysiert wurde.

D 4 Tierexperimenteller Teil

Das zu operierende Tier wurde immer die Nacht vor der Operation ausgenüchtert. Die notwendigen Gasflaschen wurden aufgedreht und ihr Druck überprüft. Auch der Vorrat des Narkosegases wurde geprüft und falls erforderlich aufgefüllt. Das Vakuum wurde angelegt (ganz sachter Sog). Der Respirator wurde eingeschaltet und die Druckanzeige auf null abgeglichen.

D 4.1. Narkoseeinleitung und Narkoseführung

Hierbei handelte es sich um eine Inhalationsnarkose mit endotrachealer Intubation.

Zunächst wurde der Gasfluss zum Exsikkator umgelegt. Das einströmende Gas wurde mittels eines Narkosegasmischers (Frischgasmischer Trajan 808, Verdampfer Vapor 19.3 für Isofluran, Drägerwerk, Ludwigshafen) erzeugt und hatte folgende Zusammensetzung: 25 % medizinischer Sauerstoff (O₂); 70 % Lachgas (N₂O); 5 % Isofluran. Anschliessend wurde das Tier in den Exsikkator gesetzt und nach erfolgter Narkose (Atmung wurde langsamer) herausgenommen, am Kopf und am Hals rasiert und in den Exsikkator zurückgelegt.

D 4.2. Intubation

Die Liegefläche des Operationstisch wurde aufgestellt um das Mikroskop einzustellen. Dazu wurde die Sichtachse des Mikroskops parallel zur Liegefläche

ausgerichtet. Der Fokus wurde so eingestellt, dass man ca. 3 cm unter dem Aufhängebügel scharf sehen konnte um hier später die Trachea scharf darstellen zu können. Erst wenn man sich absolut sicher war, dass das Tier tief narkotisiert ist, was sich durch eine deutliche verlangsamte Atmung zeigte, wurde das Tier an den Vorderzähnen am Bügel aufgehängt. Dabei hing das Tier mit dem Rücken zur Liegefläche und zum Intubateur. Die Zunge wurde weit auf die rechte Seite herausgezogen und der Spatel bis zum Zungengrund eingeführt um diesen nach ventral zu drücken. Durch das Mikroskop sollte sich nun die Epiglottis und die Glottis darstellen. Sofort wurde der Tubus mit dem Führungsstab durch die Glottis eingeführt, der Führungsstab zurückgezogen und der Tubus soweit vorgeschoben, bis die Flügel am Tubus auf das Maul des Tieres trafen. Eine anschließende Lagekontrolle gewährleistete, dass das Tier über den Tubus atmen konnte (normale Atemexkursion), wenn der Tubus korrekt lag. War der Atemweg blockiert, lag der Tubus falsch (inverse Atmung). Bei richtiger Lage des Tubus, nahm man das Tier ab und legte es auf die umgeklappte Liegefläche. Das Tier wurde an den Respirator angeschlossen (siehe D 4.3.). Bei zweifelhafter Tubuslage wurde der Tubus entfernt und das Tier zur Narkoseauffrischung wieder in den Exsikkator gelegt. Bei einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgte erneut ein Intubationsversuch.

D 4.3. Konnektion

Der Gasfluss wurde zum Respirator umgeschaltet und dieser eingeschaltet. Der Tubus wurde unter Beobachtung des Beatmungsdruckes ($< 25 \text{ cm H}_2\text{O}$) an die Schläuche angeschlossen und fixiert. Die Isofuran Konzentration wurde dann von anfangs 5 % auf 2 % reduziert. Die korrekte Lage des Tubus wurde erneut kontrolliert. Dazu mussten seitengleiche respiratorsynchrone Thoraxexkursionen tastbar sein. Die Augen des Tieres wurden mit einer geeigneten Creme (z.B. Bepanthen®, Vidisic®) gegen Austrocknung geschützt.

D 4.4. Beatmung

Intraoperativ wurde die Beatmung anhand der arteriellen Blutgasanalysen nach Druck (Ventilation) und Gaszusammensetzung (Oxygenierung) angepasst.

D 4.5. Ausleitung

Zunächst wurde sichergestellt, dass der Druckluftregler vollständig zuge dreht und die Druckluftflasche offen waren. Die Isofuran- und Lachgaszufuhr wurde abgeschaltet, der Gasmischer auf „Air“ umgestellt und der Druckluftregler vorsichtig aufgedreht, bis ein Gasfluss (zusammen mit Sauerstoff) von etwa 1 l/min erreicht war. Die Tubusfixierung wurde gelöst und bei ausreichender Spontanatmung des Tieres (Tubus wurde probeweise diskonnektiert) konnte man den Tubus vorsichtig herausziehen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Tier nicht zu wach wurde. Spätestens bei der ersten Spontanbewegung sollte die Extubation stattfinden. Das Tier wurde zurück in den Käfig gelegt.

D 4.6. Injektionsnarkose

D 4.6.1. Einleitung

Die Einleitung erfolgte inhalativ mit 2 % Isofuran in Sauerstoff im Exsikkator. Dabei wurde kein Lachgas zugemischt.

D 4.6.2. Injektion

Vorab wurde eine Injektionslösung präpariert die sich wie folgt zusammensetzte: 550 µl einer 10 %igen Ketamin Injektionslösung wurden mit 250 µl einer 2%igen Xylazin (z.B. Rompun ®) Injektionslösung versetzt und in einer Insulinspritze (1 ml) aufgezogen. Hiervon wurden 200 µl/100g Körpergewicht subcutan appliziert. Diese Dosis genügte für eine etwa 3-stündige Narkose, bei Verwendung von gesunden, nicht operierten Tieren. Postoperativ oder bei schlechtem Allgemeinzustand musste die Dosis entsprechend reduziert werden (unter Umständen bis auf die Hälfte).

D 4.6.3. Erhaltungsmedikation

Falls die verabreichte Dosis nicht ausreichend war, wurde nur Ketamin (0,1 ml der 10 %igen Lösung subkutan) nachinjiziert.

D 4.7. Katheterisierung der Schwanzarterie bei der Ratte

Zur invasiven Blutdruckmessung und zur Gewinnung arterieller Blutproben für die Blutgasanalyse während den Operationen ist ein arterieller Gefässzugang notwendig. Durch Einlage eines Kunststoffkatheters mittels einer Arteriae sectio wird ein solcher Zugang erreicht.

D 4.7.1. Herstellung der Katheter

Das Ende eines dünnen Schlauches (Schlauch Portex Polythene Tubing Ref. 800/110/100, ID 0,28 mm, OD 0,61 mm) wurde etwa 5-6 mm weit in einen dickeren Schlauch (Schlauch Portex Polythene Tubing Ref. 800/110/200, ID 0,58 mm, OD 0,96 mm) eingeführt. Etwa 5 cm von der Nahtstelle entfernt wurde dann der dünnere Schlauch mit einem Skalpell so von der Rolle abgeschnitten, dass sein Ende um ca. 20-30 % abgeschrägt war. Der dickere Schlauch wurde ca. 30-40 cm von der Verbindungsstelle gerade abgetrennt. Anschliessend wurde das freie Ende des dickeren Schlauchs über eine Injektionskanüle (20G) gestülpt. Von der Spitze beginnend wurde der dünne (intravasale) Teil des Katheters in 5 mm Schritten, mit einer Längenmarkierung versehen. Anschliessend wurde das Fassungsvermögen des Katheters bestimmt, um ihn *in situ* mit Heparin spülen zu können, ohne dabei dem Tier unnötige Mengen davon zu verabreichen. Hierzu wurde der Katheter aus einer 1 ml-Spritze (Einwegspritze 1 ml) heraus mit Flüssigkeit gefüllt und das benötigte Volumen vermerkt.

D 4.7.2. Kanülierung der Schwanzarterie (Blutdruck, BGA)

Der Druckabnehmer musste vollständig und blasenfrei mit Flüssigkeit gefüllt sein. Danach wurde der Messapparat eingeschaltet und der Druckmesser gegen null abgeglichen. Um den Katheter einzulegen, wurde das narkotisierte Tier auf dem Rücken gelagert, ein 2 cm langer medianer Hautschnitt an der ventralen Seite der Schwanzwurzel gesetzt und dieser mit einer Klemme stumpf aufgeweitet. Mit einer kleinen Schere oder mit einem Skalpell konnte nun vorsichtig bis zur Arterie vorpräpariert werden um diese darzustellen. Die Arterie wurde distal mit einem 6/0-Faden ligiert. Proximal wurde eine lockere Ligatur angelegt ohne diese zuzuziehen. Das Gefäss konnte nun mit einer kleinen Pinzette unterfahren und durch leichtes Hochziehen proximal abgedrückt werden. Anschliessend konnte man die Arterie

zwischen den Pinzettenarmen an der Oberseite zu 1/3 einschneiden. Dazu wurden kleine Gefäßsscheren benutzt. Der Katheter konnte jetzt 2-3 cm vorgeschoben werden. Die proximale Ligatur konnte jetzt gezogen werden und der Katheter gut am Schwanz fixiert werden. Das Blut konnte nun für Blutgasuntersuchungen, etc. abgenommen werden. Um ein Verstopfen zu vermeiden, musste der Katheter nach jeder Entnahme mit Heparin-Lösung sanft durchgespült werden. Dazu wurde der Katheter an den Druckabnehmer angeschlossen.

D 4.7.3. Katheter entfernen

Eine lockere Ligatur um die Arterie wurde proximal der Öffnung angelegt, der Katheter zurückgezogen und die Ligatur gezogen. Das Zunähen der Hautnaht wurde mit einem der 4/0-Fäden mit einer dünnen Nadel (RB-1) durchgeführt.

D 4.8. Herstellung silikonüberzogener Fäden für den Verschluss der Mittleren Zerebralen Arterie (MCA)

Für den temporären Verschluss der MCA im Rattenmodell erwiesen sich chirurgische Fäden mit silikon-ummantelter Spitze als geeignet. Mit dem Skalpell wurden hierfür aus den geraden Bereichen des chirurgischen Fadens (Ethicon Prolene 4/0, Nadel SH-1, Ref EH7581 oder Ethicon Prolene 4/0, Nadel RB-1) 3 cm lange Stücke geschnitten. Ein Ende dieser Stücke wurde jeweils etwa 4 mm weit durch Schaben mit dem Skalpell aufgeraut (alternativ konnte Schleifpapier verwendet werden), und diese mit wenig 70 %igem Isopropanol entfettet. Für jeden Faden wurde ein 2-3 cm langes Stück eines Polythene-Schlauches (Portex Polythene Tubing Ref. 800/110/100, ID 0,28 mm, OD 0,61 mm) mit dem Skalpell gerade abgeschnitten. Danach wurde dieses Schlauchstück bis zum Anschlag auf eine Injektionskanüle (30G) geschoben. Die Perforationsgefahr war dabei geringer, wenn der Schliff der Kanüle beim Einführen nach unten zeigte. Aus einer 5 ml-Spritze entfernte man den Stempel und die Silikonmasse (transparentes Sanitär-Silikon) wurde von hinten eingepresst. Das Silikon wurde nicht eingesaugt, da sich sonst Blasen bildeten. Auf die gleiche Weise wurde nun eine 1 ml-Spritze aus der 5 ml-Spritze zur Hälfte mit Silikon gefüllt. Die mit dem Schlauch präparierten Kanülen wurden auf die kleine Spritze aufgesteckt und mit Silikon gefüllt, bis der Spiegel 1 mm vor dem freien Schlauchende lag. Dabei war darauf zu achten, dass durch den hohen Druck, der

zum Füllen notwendig war, die Gefahr bestand, dass sich die Kanüle von der Spritze löste. Gegendruck war oft erforderlich. Jetzt konnten die aufgerauten Enden der Fäden in die freie Öffnung der Schläuche eingeführt werden, bis sie 4 mm weit von Silikon umschlossen waren. Um ein Abreissen der Schläuche zu vermeiden, durften die Fäden keinesfalls rückwärts bewegt werden. Alternativ konnten die Fäden schon vor dem Füllen mit Silikon in die Schläuche eingebracht werden und wurden beim späteren Befüllen vom Silikon umflossen. Hierbei war es jedoch notwendig, die Fäden zu fixieren, was die Prozedur umständlicher und fehleranfälliger machte. Nach 24 Stunden war das Silikon ausgehärtet und die ummantelten Fäden wurden aus den Schläuchen entfernt. Zunächst wurde der Schlauch 1-2 mm vom Fadenende entfernt und mit dem Skalpell durchtrennt. Durch Rollen des gefüllten Schlauches mit dem Skalpellrücken unter leichtem Druck konnte der Silikonzylinder von der Wand des Schlauches abgelöst werden. Der Schlauch wurde mit der Pinzette gefasst und der Faden vorsichtig herausgezogen. Um die Spitze des inneren Fadens abzurunden und etwas zu verdicken, wurde das silikonummantelte Ende für einige Sekunden in die Nähe eines heissen Lötkolbens gehalten, wodurch der innere Faden schmolz.

D 4.9. Monitoring

D 4.9.1. Rektale Temperaturmessung

Diese Art der Temperaturmessung und des –monitorings eignete sich sehr gut für narkotisierte Ratten. Die Wärmeplatte, die auf der Liegefläche des Operationstisch angebracht war, wurde erst aktiviert, nachdem die Ratte darauf lag und die Temperatursonde (für die Temperaturmessung) platziert war. Diese Sonde wurde zuvor in Vaseline eingetaucht. Das Skrotum wurde angehoben und die Sonde sanft und mit grosser Vorsicht vollständig in den After eingeführt. Wenn erforderlich, wurde die Sonde mit einem Klebestreifen um die Schwanzwurzel befestigt. Jetzt erst schaltete man die Wärmeregulation ein.

D 4.9.2. Elektrokardiogramm (EKG)

Jeweils eine Einstechelektrode wurde aussen an den oberen Extremitäten und am linken Bein angebracht und über entsprechende Kabel mit dem Monitor verbunden. Nachdem man die Ableitung mit der deutlichsten Darstellung des QRS-Komplexes

ausgewählt hatte, wurde die Amplitude so eingestellt, dass der Ausschlag ausreichend hoch war.

D 4.9.3. Messung der Herzfrequenz

Die automatische Auswertung des EKG zeigte die aktuell vorhandene Herzfrequenz an. Falls atypisch konfigurierte Ausschläge auftraten, wurde eine Herzaktion möglicherweise doppelt gezählt und die Frequenz wurde dementsprechend falsch angezeigt. In diesem Fall musste das EKG ausgedruckt und die Frequenz manuell mit einem EKG-Lineal bestimmt werden.

D 4.9.4. Blutflussmessung am Kortex

Für die Schädelpräparation wurde die Ratte auf den Bauch gelegt und der Kopf fixiert. Der Augenschutz wurde kontrolliert und gegebenenfalls erneuert. Ein tiefer medianer Schnitt von der Ohrhöhe bis zur Augenhöhe wurde angesetzt. Mit einem Watteträger konnten die Bindegewebsschichten abgerubbelt werden, um das Pregma zu lokalisieren. In Pregmahöhe auf beiden Seiten legte man je einen Haltefaden (4/0, Luftknoten) an, der an den Enden mit Klemmen versehen war um die Wunde aufzuspreizen. Bindegewebshäute wurden restlos entfernt und Blutungsstellen sehr sorgfältig mit einem Koagulator (Erbotom ICC 50, REF 10122-033, Erbe Elektromedizin GmbH) koaguliert. Links und rechts der *Sutura sagittalis* und dorsal der *Sutura coronalis* (s. Schemazeichnung) wurde mit einer handelsüblichen Multifunktionsmaschine (Dremel Multi, Modell 395, Typteil F0130395DK) jeweils der Knochen bis auf eine hauchdünne Schicht abgefräst. Die Schichtdicke im Knochenfenster war richtig, wenn sich die restliche Knochenschicht mit einer kleinen Pinzette leicht (elastisch) eindrücken liess. Abschliessend wurde das Operationsfeld erneut auf Blutungen kontrolliert und diese gegebenenfalls koaguliert. Der nächste Arbeitsschritt, das Platzieren der Sonden, wurde erst nach der Präparation des Halses ausgeführt. Das Tier befand sich in Rückenlage, der Kopf war fixiert, so dass vor der Fadeneinlage keine groben Manipulationen mehr notwendig waren. Die Sonden für die Laser-Doppler-Flussmessung wurden eingeschwenkt und unter Sicht (Spiegel) mit den Mikromanipulatoren an die Knochenfelder herangebracht. Die Sonden sollten sich relativ weit lateral befinden

und den Knochen gerade nicht berühren. Am PC wurde die Messapparatur und der Laser eingeschaltet. Als nächstes mussten die Sonden feinjustiert werden. Optimale Einstellungen ergaben ein grosses Messsignal und eine Stabilität über die Zeit. Dabei wurde die Sonde so eingestellt, dass sie nicht über einem oberflächlichen Gefäss lag. Wenn die gleichseitige A. carotis komprimiert wurde fiel das Signal stark ab. Nachdem die Feinjustierung abgeschlossen war, konnten die Sonden auf den Knochen abgesenkt werden. Über diese Lasersonden konnte ein einfaches biparietales EEG abgeleitet werden. Die Lasersonden mussten dafür gegen ihre Halterung elektrisch isoliert werden (isolierendes Material dazwischen klemmen). Nach Präparation der Knochenfenster bedeckte man diese mit Ultraschallgel. Die Gele beider Seiten durften sich jedoch nicht berühren. In diese Geltropfen tauchten die Sonden zur Flussmessung und EEG-Ableitung ein. Über zwei Krokodilklemmen wurden die Sonden mit dem Monitorkabel verbunden. Die Neutralelektrode wurde in die Haut des Unterkiefers eingestochen und dort fixiert.

D 4.9.5. Blutgasanalyse (BGA)

Nach der Diskonnektion des Schwanzarterienkatheters vom Druckabnehmer sollte spontan Blut im Katheter zurücklaufen. Die zurücklaufende Flüssigkeit wurde so lange mit einem Tupfer aufgenommen, bis unverdünntes Blut kam, welches mit Kapillarröhrchen aufgenommen wurde. Es durften sich keine Luftbläschen im Röhrchen befinden. Dabei musste darauf geachtet werden, die Kapillare nicht komplett zu füllen (ca. 0,5-1 cm freilassen). Der Katheter wurde sofort mit Heparinlösung gespült und wieder am Druckabnehmer angeschlossen. Die Blutgasanalyse der Probe erfolgte automatisiert (Chiron Diagnostics 248, Chiron Diagnostics GmbH). Die Probe für die Blutzuckermessung wurde gemeinsam mit dem BGA-Blut entnommen. Die Bestimmung des Blutzuckers erfolgte mit dem *Bedside*-Messgerät (Glucometer Elite 2000, REF 39351, Sensoren REF 3943, Bayer Diagnostics GmbH, Leverkusen) entsprechend den Angaben des Herstellers.

D 4.10. Operatives Vorgehen

Zunächst wurde der Koagulator eingeschaltet, die Option Bipolar ausgewählt und der Level auf 17-18 eingestellt (um umliegendes Gewebe beim Koagulieren der Gefässe nicht zu sehr in Mitleidenschaft zu ziehen).

D 4.10.1. Halspräparation

Für die Halspräparation wurde erst der Situs dargestellt. Dafür wurde das Tier auf dem Rücken gelagert und der Kopf eingespannt. Rechts paratracheal wurde am Halsansatz mit einer kleinen Schere eine Inzision gesetzt. Mit einer grossen Schere wurde der Schnitt nach kranial auf ca. 4 cm erweitert. Mit einer Klemme wurde nun durch die Faszienlogen tiefer präpariert, bis die Gefässnervenscheide erreicht war. Das Pulsieren der *A. carotis* wies dabei den Weg. Nach dem Einsetzen eines Wundhakens wurden die *A. carotis communis*, die Bifurkation und die *A. carotis externa* (ACE) mindestens bis nach dem 2. Abgang und die *A. carotis interna* (ACI) bis zur ersten Aufzweigung dargestellt. Um den Externastumpf zu präparieren wurde in der Bifurkation und der Abgang der ACE langstreckig koaguliert und durchgetrennt. Die ACE wurde möglichst weit distal ligiert. Etwas proximal davon wurde eine zweite Ligatur gesetzt, an der ein Haltefaden zurück blieb. Zwischen den Ligaturen musste genug Platz sein, damit die Fäden nicht abrutschten. Jetzt konnte die ACE zwischen den Ligaturen durchtrennt werden um den proximalen Stumpf zu mobilisieren. Eine grosse Gefässklemme wurde möglichst weit distal auf die *A. communis* gesetzt, eine kleinere Klemme auf die *A. Interna*.

D 4.10.2. MCA-Okklusion

Als erstes begann man mit dem Blutflussmonitoring und der Blutstromaufzeichnung. Der Faden wurde vorbereitet. Der Stumpf wurde mit der Gefässschere möglichst nah am Faden bis zur Hälfte, mit einem 45° zur Bifurkation geneigten Winkel, eingeschnitten. Der Faden wurde eingeführt und in Richtung *A. interna* vorgeschoben. Die Klemme wurde etwas geöffnet und der Faden darüber geschoben. Nun konnte der Faden unter Sicht vorgeschoben werden, wobei sicher zustellen war, dass er in den richtigen Schenkel glitt. Jetzt konnte der Faden vorsichtig weiter durch die Schädelbasis vorgeschoben werden, bis der Blutfluss deutlich abfiel. Zur Kontrolle konnte der Faden etwas zurückgezogen werden, worauf der Blutfluss wieder sprunghaft ansteigen musste. An dieser Stelle konnte eine

Subarachnoidalblutung (SAB) angenommen werden, wenn der Blutfluss nicht erneut anstieg (die Gefahr das Gefäss beim Verschieben des Fadens zu perforieren war sehr gross). Für die endgültige Okklusion wurde der Faden ein letztes mal vorgeschoben bis das Signal erneut fiel. Mit einer Klemme auf dem Externastumpf wurde der Faden fixiert und für 90 min so belassen. Während der gesamten Okklusion wurde die Kurve der Blutflussmessung (siehe Abb. 3 in E1) beobachtet und bei einem deutlichen Signalanstieg die Fadenlage korrigiert. Wenn es zu häufigeren Anstiegen kam und vermehrt korrigiert werden musste, wurde das Tier aus der Versuchsreihe genommen.

D 4.10.3. Reperfusion, Medikamentenapplikation und Naht

Nach Ablauf der Ischämiezeit wurde die Klemme gelockert, der Faden zurückgezogen und die *A. interna* wurde abgeklemmt. Der Infusionskatheter wurde in den Stumpf eingebracht (analog Fadeneinlage) und mit der Klemme fixiert. Nun konnte die zu untersuchende Lösung infundiert werden. Anschliessend wurde noch eine lockere Ligatur um den Externastumpf gelegt, der Katheter zurückgezogen und die *A. interna* abgeklemmt. Jetzt konnte man die Ligatur zuziehen. Eine Hautnaht mit 4/0-Faden beendete die Operation.

D 4.11. Neurologische Untersuchung

Mittels einer einfachen Untersuchung liess sich bei den Ratten ein neurologischer Score erheben, der gut mit dem Ausmass der zerebralen Läsion korrelierte (Menzies *et al.*, 1992). Hierfür waren drei Untersuchungsschritte nötig:

Erster Schritt

Die Ratte wurde am Schwanz aus dem Käfig gehoben. Gesunde Ratten strecken ihre Vorderläufe Richtung Boden.

Zweiter Schritt

Man setzte das Tier auf eine rutschfeste, griffige Unterlage (z.B. ein textiles Mousepad) und zog es am Schwanz. Normale Ratten krallen sich mit den Vorderpfoten seitengleich kräftig fest.

Dritter Schritt

Man hielt das Tier am Schwanz und lies es auf einer ebenen Fläche laufen. Neurologisch unauffällige Tiere bewegten sich nach allen Richtungen, auch wenn man sie sacht am Schwanz zog.

Aus den Beobachtungen bei der Untersuchung lies sich nach folgender Tabelle der neurologische Score bestimmen:

Kriterien	Score
Keine Defizite ersichtlich (Vorderpfoten weisen seitengleich zum Boden, Vorderläufe krallen sich gleich kräftig fest, läuft unter Zug am Schwanz in alle Richtungen)	0
Der paretische Vorderlauf wird beim Hochheben nicht nach unten gestreckt, sonst keine Auffälligkeiten	1
Ein Vorderfuss rutscht ab, wenn das Tier nach hinten gezogen wird	2
Zusätzlich läuft das Tier unter leichtem Zug am Schwanz im Kreis (zur paretischen Seite)	3
Die Ratte läuft spontan im Kreis, auch ohne Zug am Schwanz	4

D 4.12. Experimentelle Therapieansätze nach transienter fokaler Ischämie in der Ratte

D 4.12.1. Applikation FITC-konjugierter Antisense-Oligonukleotide

Im Hauptversuch erhielten Tiere während der ersten 60 min Reperfusion intraarteriell FITC-konjugierte Antisense-Oligonukleotide verabreicht (50 nmol/0,5 ml 0,9%iges NaCl, pH 7,4). Die Tiere wurden danach wie in D 5 beschrieben weiter untersucht.

D 4.12.2. Applikation des MMP-2/MMP-9-Inhibitors

Die Applikation des MMP-2/MMP-9-Inhibitors (Calbiochem, Bad Soden; 50 pmol/0,5 ml in 0,9%iges NaCl, pH 7,4) erfolgte ebenfalls mit Reperfusion über 1 h intraarteriell, über einen in der ACI der ischämischen Seite platzierten Katheter.

D 4.12.2.1. Blutentnahme zur pharmakokinetischen Untersuchung (HPLC) des MMP-2/-9 Inhibitors

Unterschiedliche Zeitpunkte für die Blutentnahmen wurden ausgewählt und in einer HPLC-Anlage (Thermo Separation Products, Thermo Quest, Egelsbach) analysiert. Unmittelbar nach Wiedereröffnung ($t=0$) der verschlossenen *A. cerebri media*, vor Infusion des MMP-2/-9 Inhibitors, nach 30 min ($t=0,5$ h), nach 1,5 h, 12 h und 24 h.

Folgende Trennbedingungen wurden eingestellt:

Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) (4x4) mm, LiChrospher 100 RP-18 5 (μ m) (250x4) mm; (Merck, Darmstadt)

Säulentemperatur: RT

Mobile Phase: 54 % Acetonitril / 46 % Trifluoressigsäure 0,1 %

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 10 μ l

UV-Detektion: 264 nm

Die Proben wurden dabei wie folgt aufbereitet:

180 μ l Blut-Rattenproben + 20 μ l interner Standard (1:10 Verdünnung) wurden mit 400 μ l eiskaltem Acetonitril gemischt und 10 sec gevortext. Nach 1 h im Kühlschrank wurden die Proben 10 min bei 4000 U/min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entnommen. Nach Trocknung in der *speedvac* wurde die Probe in 60 μ l Methanol/DMSO (339:1) gelöst und 20 min geschüttelt bevor die Probe für 5 min in das Ultraschallbad kam. Sollte sich das Pellet nicht vollständig gelöst haben, wurde erneut 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Jetzt konnten 10 μ l des Überstands injiziert werden.

D 4.12.3. Applikation des Caspase-3-Inhibitor (z-DEVD.FMK)

In Vorversuchen erhielten zwei Tiere unmittelbar mit Reperfusion FITC-markiertes z-DEVD.FMK (60 ng/100 g Körpergewicht; MWG Biotech, Ebersberg) über 1 h intraarteriell (lokal) über einen in der ACI der ischämischen Seite platzierten Katheter. Nach Perfusionsfixierung und Kryoprotektion wurden die Gehirne dieser Ratten gefriereschnitten, immunhistochemisch aufbereitet und unter dem konfokalen Mikroskop untersucht. Zwei weitere Ratten wurden postischämisch über

einen ACI-Katheter mit Evans Blue (3%ige Lösung, 200 µl/100 g Körpergewicht über 1 h) infundiert und unmittelbar danach getötet.

Im Hauptversuch erhielten Tiere während der ersten 60 min Reperfusion intraarteriell entweder N-benzyloxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethylketone (z-DEVD.fmk 60 ng/100 g Körpergewicht; Enzyme Systems, Livermore, USA) in 0.1 M Phosphatpuffer mit 0,005% DMSO bei pH 7.4 (50 nmol/0.5 ml; n=10) oder die gleiche Menge an Lösungsmittel (0,5 ml DMSO; n=10).

D 4.12.4. Applikation von SMAD 4 und SMAD 7 Antisense-Oligonukleotiden zur Modulation des TGF- β Signalweges

Die Infusion der Phosphorthioat Einzelstrang Antisense-Oligonukleotide (Sequenz siehe C 1.3., 100 pmol/0,5 ml in 0,9%iges NaCl, pH 7,4) erfolgte nach 90 min Ischämie mit Reperfusion über 1 h intraarteriell (lokal) über einen in der ACI der ischämischen Seite platzierten Katheter.

D 5 Postoperative Aufarbeitung des Ratten- und Gerbilhirns für immunhistochemische Untersuchungen

Nachdem die Tiere durch eine Okklusion der mittleren zerebralen Arterie einen Schlaganfall erlitten, und unterschiedlich lange überlebten wurden sie durch die Verabreichung einer Überdosis Pentobarbital, das intraperitoneal injiziert wurde, getötet.

D 5.1. Perfusionsfixierung

Den kurz vor dem Exitus stehenden Tieren wurde der Brustraum geöffnet, eine Perfusionsnadel in die rechte Herzkammer eingeführt und bis zur Aorta vorgeschoben. Anschliessend wurde durch einen gezielten Schnitt die linke Vorkammer des Herzens geöffnet um ein Abfließen des Blutes zu ermöglichen. Gleichzeitig wurde begonnen mittels einer Peristaltikpumpe (Midi-Vario MS/CA 4-6, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) eisgekühlte 0,9 %ige NaCl-Lösung über die Perfusionsnadel in das Tier zu pumpen. Danach wurde auf eisgekühltes 4 %iges

Paraformaldehyd (PFA) umgeschaltet. Nach einigen Minuten wurden die Tiere dekapitiert und die Gehirne asserviert.

D 5.2. Gehirnentnahme und weitere Prozessierung

Perfusionsfixierte Gehirne wurden sofort nach der Entnahme nachfixiert. Hierzu wurden sie in 4 %igem PFA eingelegt und bei 4°C ÜN leicht geschüttelt. Die Nachfixierung war mit dem Absinken des Gehirns auf den Gefässboden beendet (ca. 24-30 h). Anschliessend wurden die Gehirne in 30 %iger Sucrose bei 4°C bis zu 3 Tage gelagert, bevor das Gehirn erneut in 4%igem PFA, für die langfristige Aufbewahrung bei 4°C, aufgenommen wurde.

Koronale, 40 µm dicke Schnitte wurden nun auf einem modifizierten Schlittenmikrotom (SM 2000 R, Leica, Bensheim) generiert. Diese wurden in einer 96-well-Plate in einer Kryoprotektionslösung (CPS) gesammelt und bei –20°C bis zur immunhistochemischen Untersuchung aufbewahrt.

Gehirne, die vor der Entnahme nicht perfusionsfixiert wurden, mussten sehr schnell eingefroren werden, um die Struktur möglichst zu erhalten. Hierbei kam pulverisiertes Trockeneis zur Anwendung, das mit Methylbutan versetzt wurde. Das asservierte Gehirn wurde in ein Gefäss (50 ml Falcon) aufgenommen und bei –80°C in das mit Methylbutan versetzte Trockeneis gelegt. Dadurch wird die Struktur des Gewebes sehr gut erhalten. Eine weitere Methode stellt das Schockgefrieren (Kryofixierung) dar. Dabei wird das asservierte Gehirn in einem speziellen Gefäss in flüssigen Stickstoff kurz eingetaucht. Anschliessend werden die Gehirne bei –80°C gelagert.

D 5.3. Aufbereitung der Gehirne von Gerbils nach globaler Ischämie

Die mongolischen Wüstenspringmäuse (Gerbils) unterlagen einer 15-minütigen globalen Ischämie und wurden 24 h und 48 h danach mit einer Überdosis Pentobarbital getötet. Das Gehirn wurde asserviert und mit Trockeneis und Methylbutan bei –80°C (siehe D 5.2.) fixiert und 14 µm dicke Schnitte hergestellt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Lokalisation der FITC-konjugierten Antisense-Oligonukleotiden untersucht.

D 6 Magnetresonanztomographie (MRT)

In-vivo-MRT wurde 7 Tage nach Ischämie für die mit Caspase-3 Inhibitor behandelten Tiere und 1,2 und 8 Tage nach Ischämie für die mit dem MMP-2/-9 Inhibitor behandelten Tiere an einem 1,5xT Routine-Scanner (Siemens Magnetom Vision, Erlangen) in koronarer und axialer Orientierung durchgeführt (T2- und Inversion Recovery-Sequenzen). Quantitative Morphometrie erfolgte mittels einer semi-automatischen Bildanalyse-Software (Image Analysis, NIH, Bethesda, USA). Die Tiere wurden dafür unmittelbar vor der Magnetresonanztomographie mit einer Mischung aus Rompun (2 %ig) und Ketamin (0,25 ml : 0,55 ml) narkotisiert. 0,2 ml dieser Lösung pro 100 g Körpergewicht wurden subkutan verabreicht. Diese Konzentration war ausreichend um die Ratten mindestens 90 min tief zu narkotisieren.

D 7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot Analysen zur Aktivitätsbestimmung von Caspase-3 aus Gehirnhomogenaten aus Ratten nach transienter fokaler Ischämie

In Hirnhomogenaten von drei weiteren Tieren jeder Behandlungsgruppe wurde nach 24 h Reperfusion die Aktivität von Caspase-3 mittels SDS-PAGE und Western Blot bestimmt (Antikörper-Klon: 5F6.H7, Oncogene Research, Boston).

24 h nach einer fokalen Ischämie wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital getötet und kryofixiert (siehe D 1.2.). Sham operierte Tiere dienten zur Kontrolle und auch von dem, mit z-DEVD.FMK (Caspase-3-Inhibitor) behandelten Ratten, wurde die Aktivität der Caspase-3 im Western Blot untersucht. Das Gehirn wurde zunächst asserviert und in 1 ml Lyse Puffer (320 mM Sucrose, 4 mM Hepes, 0,1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,1% chaps) inkl. *Complete*[™] Proteasen Inhibitoren Cocktail (Boehringer, Mannheim) mit einem Homogenator (Ultratorax T25, IKA Werke GmbH und Co. KG, Staufen) homogenisiert und 30 min bei 4°C mit 14.000 U/min in einer Tischzentrifuge (Biofuge, pico, Heraeus, Osterode) zentrifugiert. Die Konzentration der im Überstand befindlichen Proteine wurde im Anschluss bestimmt.

D 7.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt.

D 7.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Benötigte Lösungen:

Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)-Lösung (Biozym, Hessisch Oldendorf)

Trenngelpuffer: 113,5 g (1,875 M) Tris/Base
ad 500 ml H₂O_{dest}, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 98,47 g (1,25 M) Tris/HCl
ad 500 ml H₂O_{dest}, pH 6,8

SDS-Stammlösung 10 g (10%) SDS (Fluka, Buchs)
ad 100 ml H₂O_{dest}

Trispuffer: 13 g (1,25 M) Tris/HCl
ad 100 ml H₂O_{dest}, pH 6,8

SDS-Probenpuffer PP (2x): 10 ml Glycerin (20%)
5 ml (125 mM) Trispuffer
2 g (4%) SDS
10 mg (0,02%) Bromphenolblau
ad 50 ml H₂O_{dest}

Laemmli-Puffer (5x): 10 g (40 mM) Tris
144 g (0,95 M) Glycin
10 g (0,5%) SDS
ad 2000 ml H₂O_{dest}

Ammoniumpersulfat (APS) siehe C 1.6.1.

D 7.2.1. Herstellung der Gele

Trenngelzusammensetzung: (12%) 6,2 ml Acrylamid-Bisacrylamid
Lösung (30%ig; 29:1)
5,6 ml H₂O
3 ml Trenngelpuffer

	150 µl (10%ig) SDS
	75 ml TEMED
	50 µl (10%ig) APS
Sammelgelzusammensetzung:	800 µl Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (30%ig; 29:1)
	3,6 ml H ₂ O
	500 µl Sammelgelpuffer
	50 µl (10%ig) SDS
	5 µl TEMED
	20 µl (10%ig) APS

Die Glasplatten wurden mit H₂O_{dest} gewaschen, mit Methanol abgespült und getrocknet. Anschliessend wurden die getrockneten Glasplatten zusammen mit der dazwischen liegenden Silikondichtung (1 mm) in den Glasplattenhalter (Biorad, München) eingespannt. Unmittelbar nach der Zugabe der Polymerisationsstarter APS und TEMED wurde die Trenngellösung blasenfrei zwischen die Glasplatten pipettiert und sofort mit 200-300 µl wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach ca. 30 min wurde das aufliegende Isobutanol abgegossen, der Spalt kurz mit H₂O_{dest} ausgespült und mit Whatman-Papier (Biometra, Göttingen) getrocknet. Die vorbereitete Sammelgellösung wurde luftblasenfrei über das Trenngel pipettiert, und der Probenkamm zwischen den Glasplatten in das Sammelgel gedrückt. Nach weiteren 30 min war die Polymerisation des Sammelgels abgeschlossen. Der Kamm und die Silikondichtung wurden entfernt und die restliche Sammelgellösung mit H₂O_{dest} abgespült. Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoresekammer (MINI PROTEAN II TM, BIO-RAD, München) eingesetzt und Laemmli-Puffer (1x) zugegeben.

D 7.2.2. Probenvorbereitung

20 µg Protein wurden mit Lysepuffer auf ein Volumen von 15 µl eingestellt und mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt.

D 7.2.3. Elektrophoresebedingungen

Die aufgetragenen Proben (30 µl) wurden bei konstanter Stromstärke von 30 mA (Elektrophoresis Power Supply EPS 500/400, Pharmacia, Frankfurt a.M.) für 3-4. Stunden aufgetrennt.

D 7.3. Western-Blotting (Semi-dry-Technik)

D 7.3.1. Elektrophoretischer Proteintransfer (nach Khyse-Andersen)

Proteine können durch elektrophoretischen Transfer aus SDS-Polyacryamidgelen auf geeignete Membranen überführt werden. Bei der *Semi-dry*-Technik dienen in Puffer getauchte Whatman-Papiere (3mm dick) dabei als einziges Pufferreservoir. Die Transferart von Khyse-Andersen weist ein diskontinuierliches Puffersystem auf (2 Anodenpuffer, 1 Kathodenpuffer) und ermöglicht einen maximalen Übertrag der Proteine, der zudem als Folge eines sehr homogenen elektrischen Feldes zwischen den beiden Graphitelektroden, sehr gleichmässig ist. Die Puffer besitzen eine relativ geringe Leitfähigkeit und erlauben daher nur eine niedrige Stromdichte bei trotzdem hoher Feldstärke, die wegen des kurzen Abstandes der Elektroden zustande kommt. Das wirkt begrenzend auf Wärme- und Sauerstoffentwicklung. Da der Sauerstoff nur schlecht entweichen kann, würden bei zu hohen Stromstärken Gasblasen entstehen, die Transferbarrieren darstellen. Die Stromdichte sollte darum $0,8 \text{ mA/cm}^2$ nicht überschreiten. Die Wanderung der Proteine ist wegen der allgemein negativen Ladung (da SDS im Gel) von der Kathode zur Anode gerichtet.

Die drei, für den Proteintransfer verwendeten Puffer (Anodenpuffer A, Anodenpuffer B und Kathodenpuffer) sind in C 1.6.1. aufgeführt.

Für das *Blotting* des Polyacryamidgels auf eine Nitrozellulosemembran (NC) wurde eine spezielle *Blotting*-Kammer von Renner GmbH (Darmstadt) verwendet. Der Aufbau sah folgendermassen aus:

+	Graphitanode	+
6x3 mm Whatman-Papier in Anodenpuffer B		
3x3 mm Whatman-Papier in Anodenpuffer A		
NC-Folie in Anodenpuffer A		
SDS-Gel		
6x3 mm Whatman-Papier in Kathodenpuffer		
—	Graphitkathode	—

Der Proteintransfer auf die NC-Membran erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche und dauerte ca. 45 min.

D 7.3.2. Proteinnachweis im Gel mit Antikörper

Nach dem Transfer der Proteine auf die NC-Membran wurde ÜN bei 4°C dieselbe in 5%igem BSA (siehe C 1.6.1.) gelagert um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren und eine evtl. dadurch bedingte unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. Der Primäre Antikörper gegen aktive Caspase-3 (Klon 5F6.H7, Oncogene, siehe C 1.2.) wurde 1:100 in TBST gelöst und die NC-Membran 90 min auf einem Schüttler (TITRAMAX 1000, Heidolph, Schwabach) bei RT mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem waschen in TBST (je 10 min) wurde die NC-Membran mit dem Sekundärantikörper (1:5000; AP-konjugiert, siehe C 1.2.) 1 h bei RT geschüttelt und abschliessend einmal mit alkalische Phosphatase Puffer (siehe AP-Puffer in C 1.6.1.) gewaschen.

Der Blot wurde nun in der Detektionslösung unter stetiger Bewegung (auf und ab) inkubiert bis die Banden erschienen und durch Zugabe einer Stopplösung (20 mM EDTA/TBS-Lösung) beendet. Der gebundene Antikörper wurde über die Farbreaktion mit NBT/BCIP (siehe C 1.6.2.) als Substrat für die alkalische Phosphatase nachgewiesen. Nach Trocknung an der Luft konnte der Blot anschliessend längere Zeit gelagert werden.

D 8 Histologie

D 8.1. Herstellung von Gewebeschnitten

D 8.1.1. Gelatine-Beschichtung von Objektträgern

Die Objektträger wurden vor dem Beschichten 10 min in Chromschwefelsäure gereinigt. Anschliessend wurden sie in Leitungswasser 30-60 min vorgespült und 10 min in deionisiertem Wasser nachgespült. Die gereinigten Objektträger wurden 1 min in frisch filtrierte Gelatinelösung gestellt und ÜN bei 37°C getrocknet. Der Beschichtungsvorgang wurde am nächsten Tag nochmals wiederholt.

D 8.1.2. Schneiden am Schlittenmikrotom

Das Schneiden der perfusionsfixierten Gehirne (Ratten) erfolgte mittels eines modifizierten Schlittenmikrotoms (SM 2000 R, Leica, Bensheim). Der ursprüngliche, für Paraffinschnitte vorgesehene Kopf des Mikrotoms wurde durch einen Kupferkopf ersetzt, der das Auffrieren der zu schneidenden Gehirne ermöglichte. Dieser wurde mit Trockeneis und Ethanol vorgekühlt. Anschliessend wurde ein Einbettmedium (Tissue Tek, Sakura, Torrance, USA) aufgebracht. Hierauf wurde das Gehirn mit einem Tropfen PO_4^{3-} -Puffer aufgefroren und mit pulverisiertem Trockeneis überhäuft. Nach kompletter Durchfrierung des Gehirns wurden Schnitte mit einer Stärke von 25 μm (Mäuse) und 40 μm (Ratten) hergestellt und in mit Kryo Protektions Lösung (CPS) befüllten 96-well-Platten (Costar, Corning, USA) bei -20°C gelagert.

D 8.1.3. Schneiden am Kryostat

Unfixierte Gehirne wurden mit einem Kryostat (CM 3000, Leica, Bensheim) geschnitten. Die Gehirne wurden dazu mit Einbettmedium (Tissue Tek, Sakura, Torrance, USA) auf dem Objekthalter aufgefroren und in einer Dicke von 14 μm geschnitten (Objekttemperatur: -17°C ; Kammertemperatur: -18°C) und direkt mit einem Adhäsionsobjektträger (SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgenommen. Nach dem Antrocknen der Schnitte auf dem Objektträger bei RT wurden diese bei -80°C gelagert.

D 8.2. Histochemie

D 8.2.1. Nissl-Färbung

Die fixierten Gehirnschnitte wurden auf gelantinebeschichtete Objektträger aufgezogen. Nach dem Antrocknen wurden die Objektträger in einer absteigenden Isopropanol-Reihe inkubiert. Ausgehend von einer 1:1 Isopropanol/Chlorophorm-Mischung, wurden die Objektträger bei RT jeweils 2-3 min in 100 % (2 mal), 96 % (2 mal), 70 % und 50 % Isopropanol belassen. Vor dem nun folgenden Färbeschritt wurden die Objektträger noch zweimal 3 min in H₂O_{dest} gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mittels einer 1,5 %igen Kresylviolett-Lösung. Die Eintauchdauer war abhängig von der Schnittdicke und der Vorbehandlung des Gewebes. Eine Überfärbung wurde durch eine 70 % Isopropanol/0,5 % Acetat-Lösung korrigiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen in H₂O_{dest} erfolgte eine zehn-minütige Nachdifferenzierung unter fließendem Leitungswasser. Abschliessend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe (30 %, 50 %, 70 %, zweimal 96 %, zweimal 100 %) wieder entwässert, dreimal 3 min in *NeoClear* (Merck, Darmstadt) geklärt und mit dem zugehörigen Eindeckmittel *NeoMount* (Merck, Darmstadt) überschichtet und eingedeckelt.

D 8.2.2. Tri-phenyl-tetrazolium-chlorid (TTC)-Färbung

Ein weit verbreitete Methode die Infarktgrösse eines Rattenhirns nach transienter fokaler Ischämie zu bestimmen, ist die TTC-Färbung (*Goldlust et al.*, 1996). TTC färbt normales, gesundes Gehirngewebe rot, ischämisches Gewebe hingegen rosa. Nekrotisches Gewebe ist durch Grau charakterisiert. Nach einer MCAO wurde das Gehirn nach 30 min Reperfusion asserviert, in 2 mm dicke, koronale Schnitte geschnitten und für 30 min in einer 4 %igen TTC-Lösung bei 37°C inkubiert, wonach sich die charakteristische Farbe der entsprechenden Gehirnbereiche einstellte.

D 8.3. Immunohistochemie

D 8.3.1. anti-BrdU free floating Färbung

Für die anti-BrdU-Färbung wurden perfusionsfixierte, auf dem Schlittenmikrotom geschnittene Gewebeschnitte benutzt. Die Färbung erfolgte unter ständigem

Schütteln in Zellkulturschalen (*free floating*) in Verbindung mit Netzeinsätzen (Costar, Corning, USA) Die Schnitte wurden dreimal 10 min in TBS gewaschen. Anschliessend wurde sie 30 min in einer 0,6 %igen H_2O_2 /TBS-Lösung inkubiert (um die endogene Peroxidase abzubauen, nur bei DAB Entwicklung notwendig). Nach einem weiteren Waschschrift (zweimal 10 min in TBS) wurde die für die anti-BrdU-Färbung notwendige Vorbehandlung durchgeführt. Diese Vorbehandlung dient dazu, die DNA zu denaturieren und so die Präsentation des darin eingebauten Antigens (BrdU) zu ermöglichen. Hierzu wurden die Schnitte 90 min in 50 % Formamid/2 x SSC auf 65°C erhitzt, dann 5 min bei RT in 2 x SSC gewaschen, 30 min in 2 N HCl bei 37°C inkubiert und nochmals 10 min in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) gespült. Dieser wird durch mehrmaliges Waschen mit TBS (viermal 5 min) wieder entfernt. Zur Blockierung wurden die Schnitte 30 min in 3 %igen Eselserum/0,1 % Triton X-100/TBS inkubiert. Der BrdU-Antikörper (mouse anti BrdU) wurde in der Blockierungslösung aufgenommen, auf die Schnitte aufgetragen und ÜN bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschriften (je 10 min, RT) erfolgte am nächsten Morgen eine erneute Inkubation der Schnitte in Blockierungslösung für 10 min bei RT. Anschliessend wurde der in Blockierungslösung verdünnte Sekundärantikörper (donkey anti-mouse IgG-BT) aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurden die Schnitte 60 min mit *Vectastain* (Vector, Burlingame, USA) inkubiert. Hierbei kam es zu einer Konjugation der Sekundärantikörper mit Peroxidase. Diese Peroxidase katalysierte nach nochmaligen Waschen (zweimal 10 min in TBS) die eigentliche Färbereaktion. Hierzu wurde 5-10 min in einer DAB-Färbelösung inkubiert. Abschliessend wurden die Schnitte viermal 5 min in Leitungswasser inkubiert um die Reaktion zu stoppen. Die Schnitte wurden in PO_4^{3-} -Puffer bei 4°C gelagert, bis sie auf gelantinebeschichtete Objektträger aufgezogen werden konnten. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Isopropanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, zweimal 96 %, zweimal 100 %) entwässert, dreimal 3 min in *NeoClear* geklärt und mit *NeoMount* eingedeckelt.

D 8.3.2. Immunhistochemische Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern

Auch die auf dem Nachweis von fluoreszenzmarkierten Farbstoffen basierende immunhistochemischen Untersuchungen wurden nach dem obigen Protokoll der anti

BrdU-Färbung (siehe D 8.3.1.) durchgeführt. Jedoch war die Vorbehandlung (Denaturierung der DNA) nicht notwendig wenn andere als BrdU zu untersuchende Epitope detektiert werden sollten. Die hierfür verwendeten Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen sind unter C 1.2. aufgelistet. Dabei entfiel der oben erwähnte Färbeschritt mit DAB, da der Nachweis der fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörperbindung am konfokalen Mikroskop erfolgte.

D 8.3.3. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick endlabeling)-Färbung

Die hier durchgeführte TUNEL-Färbung ist eine Modifikation des *ApopTag*[®] *Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit* (Intergen, Purchase, USA). Für die Färbung wurden 14 µm dicke Kryostatschnitte verwendet. Zur Detektion der DIG-markierten apoptotischen Zellen wurde ein sheep anti-DIG-AP Antikörper (Boehringer, Mannheim) benutzt. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger 5 min in Propidiumjodid (Stammlösung 1mg/ml, 1:2500 in PBS verdünnt) in Hellendahl-Gefäßen inkubiert. Abschliessend wurden die Objektträger 4 mal 5 min in PBS gewaschen und mit PVA-DABCO eingedeckelt.

D 8.3.4. Evans Blau

Das von Evans entwickelte, chirale Hilfsreagenz S-(-)-4-Isopropyl-2-oxazolidinon, das für die enantioselektive Synthese von α -substituierten Carbonsäurederivaten verwendet wird, hat in den letzten Jahren immer wieder auch Verwendung bei Untersuchungen der Funktion der Blut-Hirn-Schranke gefunden. Eine 5 %ige Lösung dieses Reagenz wurde nach der Operation und der Verabreichung der FITC-konjugierten Antisense-Oligonukleotide intraarteriell gegeben um, die Hypothese der partiell geöffneten Blut-Hirn-Schranke nach Ischämie zu untersuchen. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist dieser Farbstoff im ZNS nicht detektierbar.

E Ergebnisse

E 1 Intraarterielle Applikation FITC-konjugierter Oligonukleotide nach fokaler zerebraler Ischämie

Unter Berücksichtigung klinischer Erfordernisse bei akuten Schlaganfallpatienten wäre die intraarterielle oder intravenöse Applikation eines potentiellen Therapeutikums wünschenswert. Aufgrund der Tatsache, dass eine frühe pathophysiologische Konsequenz fokaler Ischämie die Störung der Blut-Hirn-Schranke ist, wurde die Hypothese untersucht, ob intraarteriell verabreichte FITC-konjugierte Oligonukleotide (siehe D 4.12.1.) das ischämische Zielgewebe erreichen.

E 1.1. Operationsverlauf

Der gesamte Operationsverlauf (Operation unter D 4.10.2. beschrieben) einer typisch verlaufenden Okklusion der mittleren zerebralen Arterie (*middle cerebral artery occlusion*; MCAO) ist in der Abbildung 3 wiedergegeben.

E 1.2. Nachweis der ischämischen Blut-Hirn-Schrankenstörung

Eine etablierte Untersuchung der Blut-Hirn-Schranken-Funktion ist die Methode der Evans-Blau Färbung (siehe D 8.3.4.) Dieser Farbstoff penetriert die intakte Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht. Nach MCA-Verschluss tritt er im Infarktkern ins Parenchym über (Abb. 4 A). Zusätzliche histologische Untersuchungen mittels TTC-Färbung (2,3,5 tri-phenyl-tetrazolium-chlorid, siehe D 8.2.2.) zur Unterscheidung von normalem (gesundem), ischämischem und nekrotischem Gewebe (Abb. 4 B) zeigten, dass auch hier der Farbstoff im Bereich der ischämischen Hemisphäre akkumuliert.

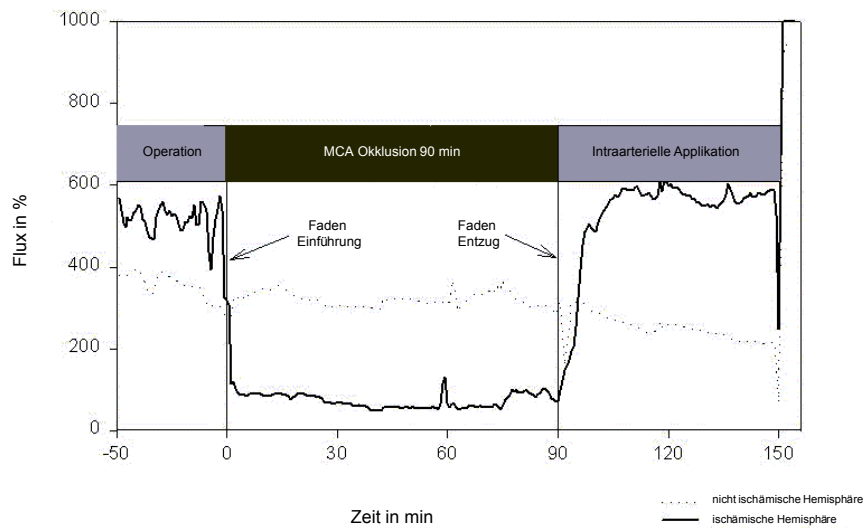


Abb. 3 Zerebraler Blutfluss beider Hemisphären während der Okklusion

Die durchgezogene Linie gibt den reduzierten Blutfluss (ca. 20% des normalen Blutflusses) während der Okklusion der ACI wieder. Die kontralaterale Seite (nicht ischämische Hemisphäre, unterbrochene Linie) ist davon nicht betroffen.

E 1.3. Verteilung FITC-konjugierter Oligonukleotide

Die Aufnahme von Oligonukleotiden im ZNS konnte bereits zwei Stunden nach MCAO im Infarktkern der ischämischen Hemisphäre nachgewiesen werden (Abb. 4 C). Anatomisch korrelierte diese mit der schweren Schrankenstörung der Blut-Hirn-Schranke (Abb. 4 A). Unmittelbar nach MCAO, wurden FITC-konjugierte Oligonukleotide intraarteriell verabreicht. Schon zwei Stunden nach Reperfusion wurde das Tier mit einer Überdosis Pentobarbital getötet und wie in D 5 beschrieben weiter prozessiert.

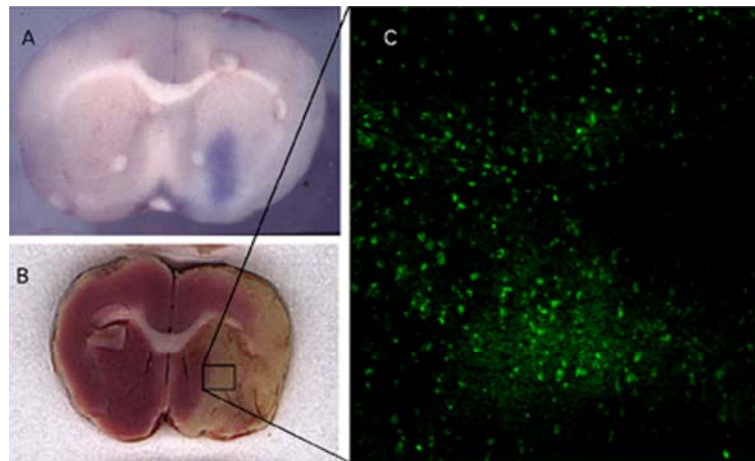


Abb.4 Anreicherung der Oligonukleotide im Infarkttraum nach Ischämie

(A) Intraarterielle Applikation von Evans Blau (5 %ig) unmittelbar nach MCAO. **(B)** TTC-Färbung eines 2 mm dicken Schnittes unmittelbar nach MCAO. **(C)** Detektion der FITC-konjugierten Oligonukleotide im Fluoreszenzmikroskop zwei Stunden nach Reperfusion im Infarktkern der ischämischen Hemisphäre.

E 1.4. Verteilung FITC-konjugierter Oligonukleotide 48 h nach transienter fokaler Ischämie

Nachdem FITC-konjugierte Oligonukleotide bereits wenige Stunden nach Ischämie im betroffenen Gewebe detektierbar waren, wurde die mittelfristige Gewebeverteilung der Substanz untersucht. Auch 48 Stunden nach Ischämie waren FITC-markierte Oligonukleotide im ischämischen MCA-Territorium in der Penumbra und im Infarktkern nachweisbar, während die kontralaterale (nicht ischämische) Hemisphäre FITC-negativ blieb (Abb. 5).

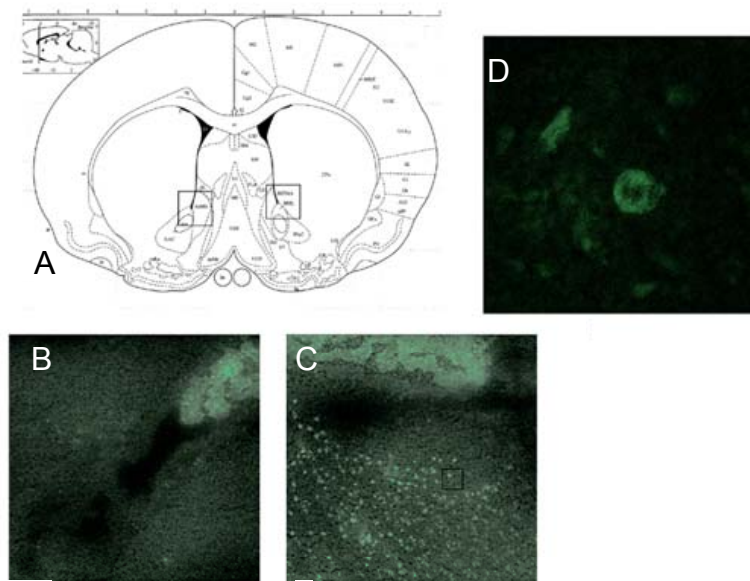


Abb.5 Fluoreszenzmikroskopie 48 Stunden nach Ischämie

(A) Übersicht aus Paxinos (Atlas der Ratte). **(B)** Linker Ausschnitt: Keine unspezifische Aufnahme der FITC-konjugierten Oligonukleotide in der nichtischämischen Hemisphäre. **(C)** Rechter Ausschnitt: Auch 48 Stunden nach MCAO bleibt die Verteilung der Oligonukleotide auf der Infarktseite beschränkt. **(D)** Grössere Auflösung einer FITC-positiven Zelle aus C.

E 1.5. Untersuchung der zellulären Aufnahme FITC-konjugierter Oligonukleotide nach transienter fokaler Ischämie

Immunohistochemische Doppelmarkierung beider Hemisphären mit einem neuronalen (mouse anti NeuN) und astrozytären (rabbit anti GFAP) Marker wurden an aufeinanderfolgenden Schnitten wie in *D 8.3.2.* beschrieben durchgeführt und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht (Abb. 6 A und B). Die gelbe Fluoreszenz resultiert aus der Überlagerung von roter (NeuN-positive Nervenzelle) und grüner (FITC) Fluoreszenz (primäre und sekundäre Antikörper entnehme man aus *C 1.2.*). Die zelluläre Aufnahme von FITC ist nur im Ischämiegebiet (Abb. 6 A), aber nicht in der kontralateralen Hemisphäre zu erkennen (Abb. 6 B). Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Substanz bevorzugt von Nervenzellen aufgenommen wird.

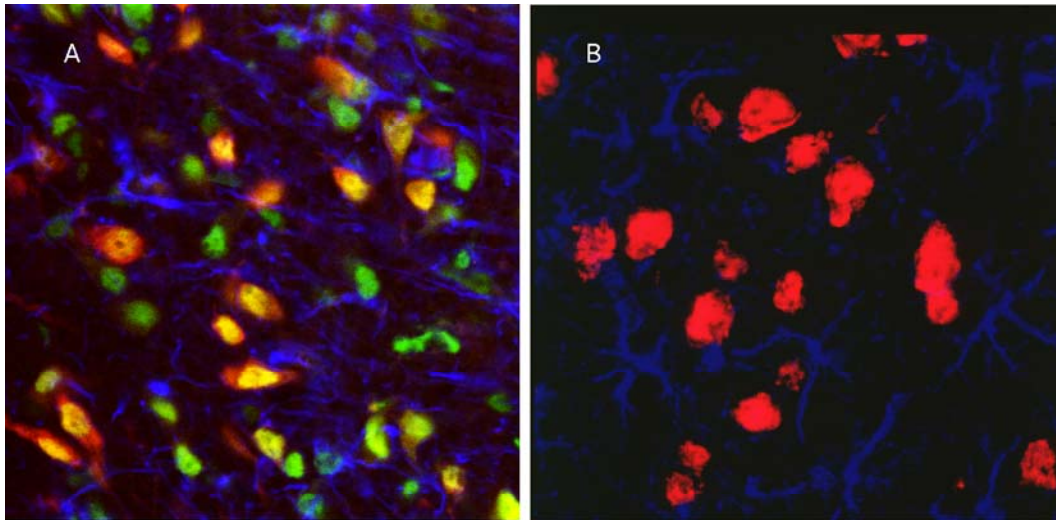


Abb. 6 Immunhistochemie zur Aufnahme der FITC-konjugierten Oligonukleotide

(A) Die Aufnahme der FITC-konjugierten Oligonukleotide ist auf das Infarktgebiet (ischämische Hemisphäre) beschränkt. **(B)** Auf der kontralateralen, nicht läsierten Hemisphäre waren keine Oligonukleotide detektierbar.

E 1.6. Zelluläre Aufnahme FITC-konjugierter Oligonukleotide im Hippokampus nach transients globaler Ischämie im Gerbil

Dieses Modell der globalen Ischämie am Gerbil ist sehr gut geeignet, um den selektiven Nervenzelluntergang im Hippokampus nach globaler zerebraler Ischämie zu beobachten (Kirino, 1982; Schreiber and Baudry, 1995). Nervenzellen der Region CA3 sind normalerweise resistenter als die der Region CA1. 24 Stunden nach einer 15 minütigen beidseitigen Okklusion der Karotiden und der sofort mit der Reperfusion beginnenden intraarteriellen Applikation der FITC-konjugierten Oligonukleotiden wurde das Gehirn asserviert (siehe D 5.3.) und mikroskopisch untersucht. Die Aufnahme FITC-konjugierter Oligonukleotide war nicht nur auf die CA1 Region des Hippokampus beschränkt, sondern war auch in Nervenzellen der resistenteren CA3 Region deutlich detektierbar (Abb. 7 A und B).

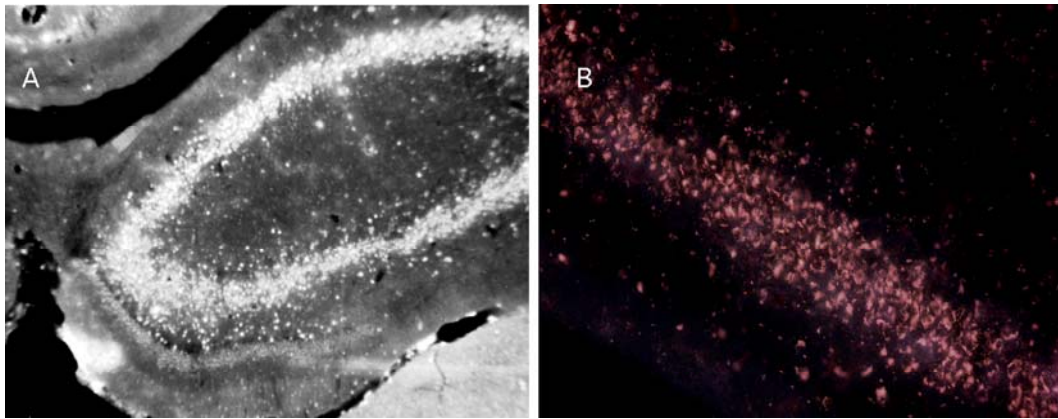


Abb. 7 Mikroskopie zur Aufnahme der Oligonukleotide im Gerbil nach globaler Ischämie

(A) Übersicht des ipsilateralen Hippokampus (CA1, CA2, CA3) im Gerbil 24 Stunden nach 15 minütiger globaler Ischämie und der intraarteriellen Applikation der FITC-konjugierten Oligonukleotide. (B) Detail aus der CA3 Region des Hippokampus in A.

Da neuronaler Zelluntergang nach einer globalen Ischämie vor allem in der CA1 Region des Hippokampus apoptotischer Natur ist, wurde neben der mikroskopischen Auswertung auch eine TUNEL-Färbung (siehe D 8.3.3.) an diesen Schnitten vorgenommen (Abb. 8 B). Dabei war zu beobachten, dass im Gegensatz zu den vulnerablen Nervenzellen der CA1 Region des Hippokampus, Apoptose der relativ resistenten Nervenzellen der CA3 Region selten ist.

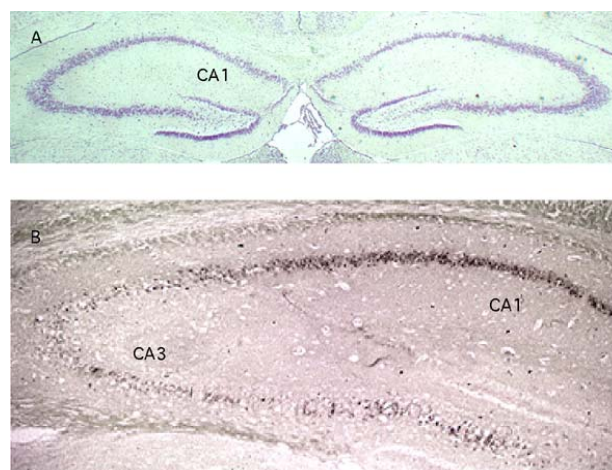


Abb. 8 Histologische Analysen zum selektiven Zelluntergang nach globaler Ischämie im Gerbil

(A) Kresylviolett-färbung des Hippokampus eines nicht ischämischen Gerbilgehirns. (B) Apoptotische Zellen (TUNEL) 72 Stunden nach 15 minütiger globalen Ischämie im Gerbil. Die selektive Vulnerabilität der CA 1 Neurone ist zu erkennen, während die Nervenzellen der CA 3 Region resistenter sind.

E 2 Intraarterielle Applikation eines spezifischen MMP-2 und MMP-9 Inhibitors nach transienter fokaler Ischämie in der Ratte

Ein experimenteller Ansatz zur Reduktion der Infarktgrösse war die Verwendung eines spezifischen Inhibitors der Matrix Metalloproteinasen (MMP) 2 und 9. Diese werden in den ersten 48 Stunden nach fokaler Ischämie im Infarktgebiet hochreguliert (Heo *et al.*, 1999) und wirken, durch ihre proteolytische Aktivität, als Mediatoren der ischämischen Blut-Hirn-Schranken-Schädigung und des dadurch bedingten ischämischen Hirnödems (Rosenberg *et al.*, 1998). Durch Inhibierung der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) wurde in experimentellen Untersuchungen gezeigt, dass eine effektive Reduzierung von Infarktgrösse und Hirnödems nach Ischämie möglich ist (Rosenberg *et al.*, 1998; Rosenberg *et al.*, 1992).

Ein neuer synthetischer Inhibitor (C 1.4.) wurde auf seine Wirkung auf Infarktgrösse und Hirnödem hin untersucht.

Pharmakokinetische Analysen (HPLC, siehe D 4.12.2.1.) ergaben, dass die Applikation des MMP-2/-9 spezifischen Inhibitors in der Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht zu einem 100-fachen Blutplasmaspiegel des sog. IC₅₀ Wertes (gibt die Konzentration des Inhibitors an, die notwendig ist, die Aktivität der MMPs zu halbieren) für MMP-9 (240 nM) führt. Nach 12 Stunden war der Inhibitor nicht mehr detektierbar. Eine 5-fache Erhöhung des Inhibitors auf 5 mg/kg ergab eine 1000-fache Erhöhung von IC₅₀ im Blutplasma. Auch war der IC₅₀ in der höheren Konzentration noch nach 24 Stunden um den Faktor 20 erhöht (Abb. 9).

Wie in den beiden Abbildungen 10 (Inhibitorkonzentration: 1 mg/kg) und 11 (Inhibitorkonzentration: 10 mg/kg) zu erkennen ist, ergab sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (1, 2 und 8 Tage post-ischämisch) ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Inhibitor behandelten Tiere und der Kontrollgruppe, die lediglich NaCl als Vehikel intraarteriell erhielten (siehe D 4.12.2.).

	MMP-2/-9 Inhibitor [1 mg/kg]	MMP-2/-9 Inhibitor [5 mg/kg]
30 Min nach Applikation	26,9 μ M	229,9 μ M
90 Min nach Applikation	23,1 μ M	134,4 μ M
12 h nach Applikation	< 1 μ M	11,2 μ M
24 h nach Applikation	< 1 μ M	5,1 μ M

Abb. 9 Pharmakokinetische Untersuchungen

Blutplasmaspiegel des MMP-2/-9 Inhibitors in den ersten 24 Stunden nach Applikation. Man erkennt, dass der Inhibitor in der geringeren Konzentration (1 mg/kg Körpergewicht) nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar ist. Hingegen ist die Aktivität desselben in 5-facher Konzentration nach 24 Stunden noch um den Faktor 20 von MMP 9 (240 nM) erhöht.

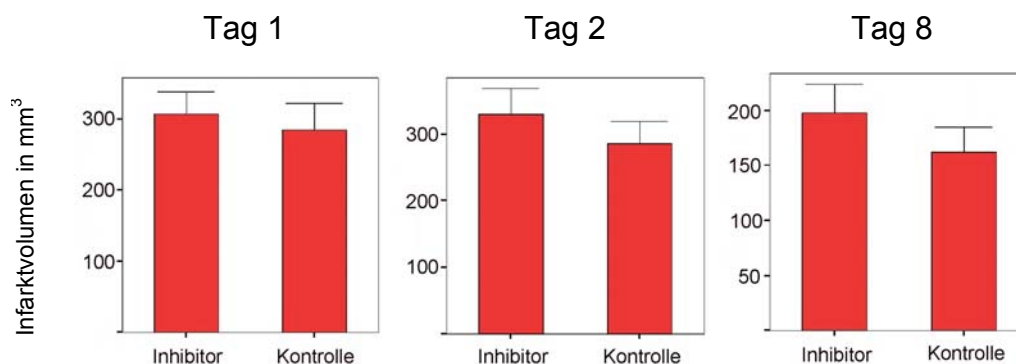


Abb. 10 MRT-Volumetrie zur Bestimmung der Infarktgrösse nach transienter fokaler Ischämie

Die post-ischämische intraarterielle Applikation des synthetischen MMP-2/-9 Inhibitors (1 mg/kg) zeigte zu keinem der drei Zeitpunkte (1, 2 und 8 Tage nach Ischämie) eine protektive Wirkung gegenüber der Kontrollgruppe.

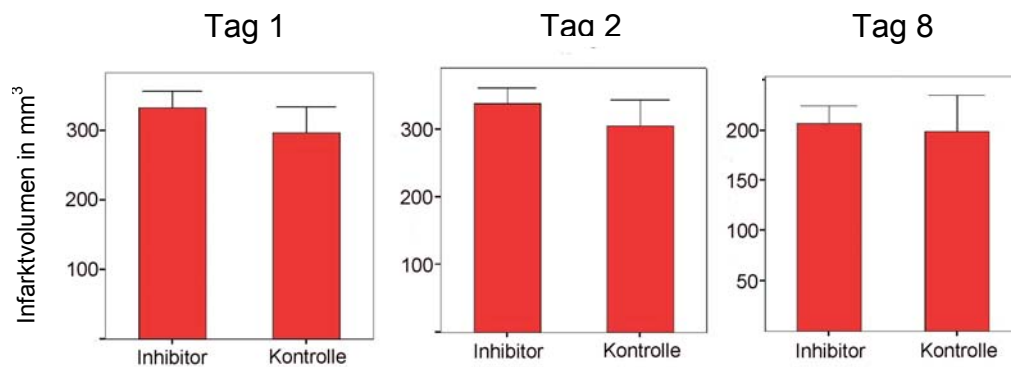


Abb. 11 MRT-Volumetrie zur Bestimmung der Infarktgrösse nach transienter fokaler Ischämie

Die post-ischämische intraarterielle Applikation des synthetischen MMP-2/-9 Inhibitors auch in der 10-fachen Konzentration (10 mg/kg) zeigte zu keinem der drei Zeitpunkte (1, 2 und 8 Tage nach Ischämie) eine protektive Wirkung gegenüber den Kontrolltieren.

Um die Grösse des resultierende Hirnödems nach der transienten fokalen Ischämie quantitativ zu ermitteln, wurde das Verhältnis des Durchmessers der ischämischen zur nicht ischämischen Hemisphäre (Mittellinierverschiebung), berechnet. Sowohl für die niedrigere (Abb. 12 A) wie auch für die erhöhte Konzentration des Inhibitors (Abb. 12 B) ergab sich erneut kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten Tieren und der Kontrollgruppe.

Auch die Entwicklung des Körpergewichts nach transienter fokaler Ischämie war nicht unterschiedlich (Abb. 13 A und B). Die Tabelle in Abb. 14 gibt die Ergebnisse der neurologischen Untersuchungen nach Ischämie wieder. Die Tiere, die mit der geringeren Dosis des Inhibitors behandelt wurden, zeigen am Tag 1 und 2 nach Ischämie zunächst einen besseren neurologischen Score (2 gegenüber 3 der Kontrolltiere), der sich jedoch am Tag 8 verschlechterte (2 gegenüber 1). Hingegen ist der Unterschied zwischen den mit der höheren Dosierung des Inhibitors behandelten Tieren und der Kontrollgruppe minimal. Lediglich am Tag 1 ist der neurologische Score um 0,5 Punkte schlechter in den mit Inhibitor behandelten Tiere verglichen mit der Kontrollgruppe (3 gegenüber 2,5).

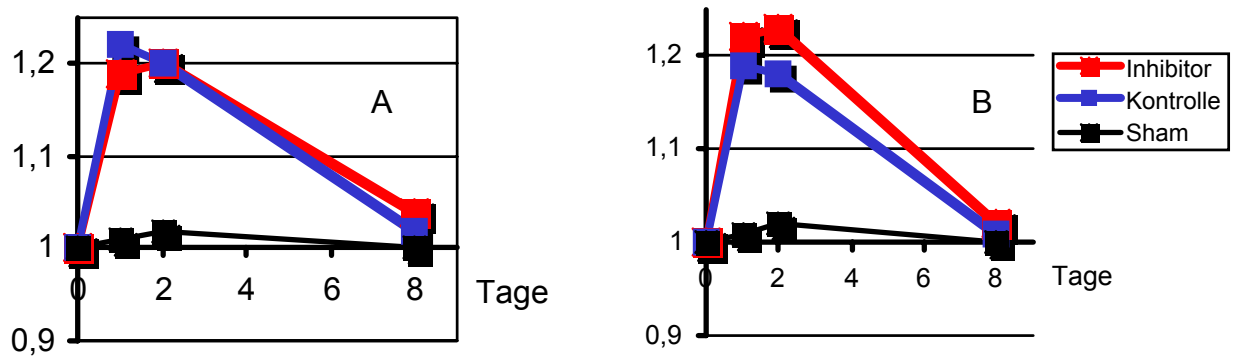


Abb. 12 Mittellinienverschiebung nach zerebraler Ischämie

Sowohl in der Gruppe von Tieren denen 1 mg/kg Körpergewicht **(A)** MMP-2/-9 Inhibitor nach zerebraler Ischämie intraarteriell appliziert wurde als auch die Tiere, die eine 10-fache Dosis (10 mg/kg Körpergewicht) **(B)** mit Reperfusion nach einer MCAO appliziert bekamen, ist keine signifikante Reduzierung des Hirnödems in den mit dem Inhibitor behandelten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen. Sham-operierte Tiere wiesen keine Ödembildung auf.

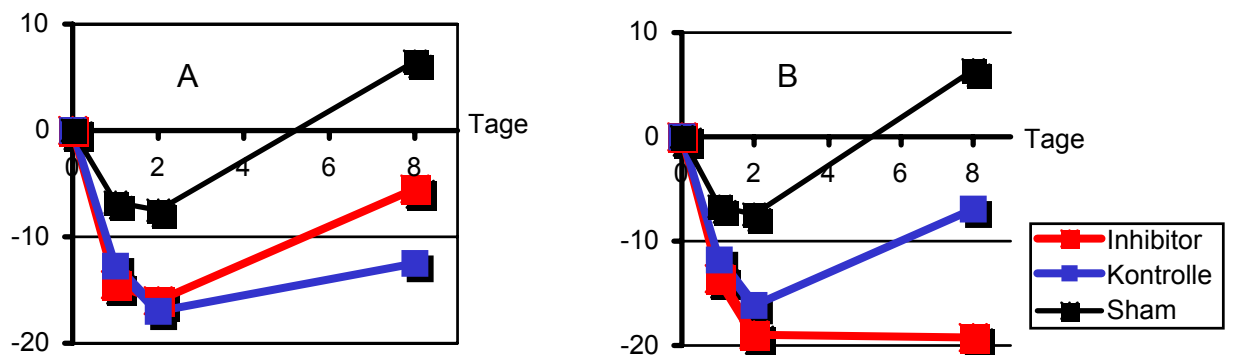


Abb. 13 Kurzfristige Entwicklung des Körpergewichts nach zerebraler Ischämie

(A) Wurde der Inhibitor mit 1 mg/kg Körpergewicht appliziert erholten sich die Tiere etwas besser als die Kontrollgruppe. **(B)** Hingegen ist bei Applikation des Inhibitors mit 10 mg/kg Körpergewicht der Gewichtsverlust konstant.

	Tag 1	Tag 2	Tag 8
MMP-2/-9 Inhibitor [1 mg/kg]	2,0	2,0	2,0
Kontrolle	3,0	3,0	1,0
MMP-2/-9 Inhibitor [10 mg/kg]	3,0	2,5	1,0
Kontrolle	2,5	2,5	1,0
Sham	0	0	0

Abb. 14 Bestimmung des neurologischen Score

Die Tiere wurden 1, 2 und 8 Tage nach zerebraler Ischämie neurologisch untersucht (siehe D 4.11.) und mit scheinoperierten Tiere (Sham) verglichen. Die Werte sind Durchschnittswerte von jeweils 2 Tieren. Dabei steht die 0 für ein unauffälliges Tier, während 4 eine ausgeprägte neurologische Einschränkung bedeutet.

E 3 Inhibierung der Apoptose nach transienter fokaler Ischämie in der Ratte mittels des spezifischen Caspase-3 Inhibitors z-DEVD.FMK

Quantitativ macht der verzögerte programmierte neuronale Zelltod (Apoptose) in der ischämischen Randzone (Penumbra) etwa die Hälfte der untergehenden Zellpopulationen nach einer zerebralen Ischämie aus. Dafür verantwortlich ist vor allem die Effektorcaspase-3, die sowohl durch die extrinsische Initiatorcaspase-8 als auch durch die intrinsische Initiatorcaspase-9 aktiviert wird (Reed, 2000). Hingegen gehen die Zellen im Infarktkern nekrotisch zugrunde. Die Verwendung eines spezifischen Caspase-3 Inhibitors zur Reduzierung der Infarktgrösse konnte in der Vergangenheit zwar schon gezeigt werden, jedoch erfolgte die Applikation bisher intrathekal. Ziel dieser Untersuchungen war zu ermitteln ob eine einseitige lokale intraarterielle Anwendung des Caspase-Inhibitors ebenso effektiv ist.

E 3.1. Verteilung von FITC-markiertem Caspase-3 Inhibitor nach transienter fokaler Ischämie in der Ratte

Vorangehende Versuche mit FITC-markiertem z-DEVD.FMK zeigten 1 Stunde nach intraarterieller Infusion in die *A. carotis interna* (ACI) ipsilateral zum MCA-Verschluss eine Verteilung der Substanz im Infarktkern und der Penumbra der ischämischen Hemisphäre (Abb. 15).

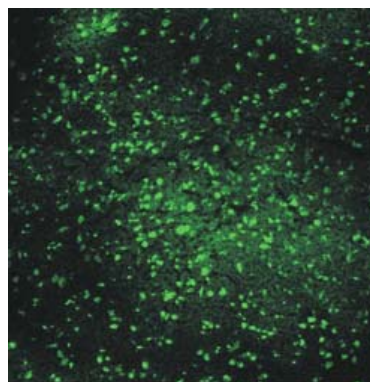


Abb. 15 Verteilung von FITC-markiertem z-DEVD.FMK

Mikroskopisch zeigt sich die Aufnahme von FITC-markiertem Peptid (z-DEVD.FMK) in neuronalen und glialen Zellen der Penumbra.

E 3.2. MRT-Aufnahmen und –Volumetrie zur Quantifizierung der Infarktgrösse nach transienter fokaler Ischämie in der Ratte

MRT-volumetrisch errechnete sich 7 Tage nach MCA-Okklusion ein signifikant geringeres Infarktvolumen in der z-DEVD.FMK-Gruppe gegenüber Kontrolltieren ($65,1 \pm 16,5 \text{ mm}^3$ vs. $118,2 \pm 25,8 \text{ mm}^3$, siehe Abb. 16). Die Erhaltung von Kortex und subkortikalem Marklager in der Penumbra des MCA-Territoriums trug wesentlich zur Reduktion des Infarktvolumens bei ($10,2 \pm 3,9 \text{ mm}^3$ vs. $43,3 \pm 17,1 \text{ mm}^3$, siehe Abb. 16), während die Stammganglien (Infarktkern) in beiden Gruppen vergleichbar geschädigt waren (Abb. 17 A-D)

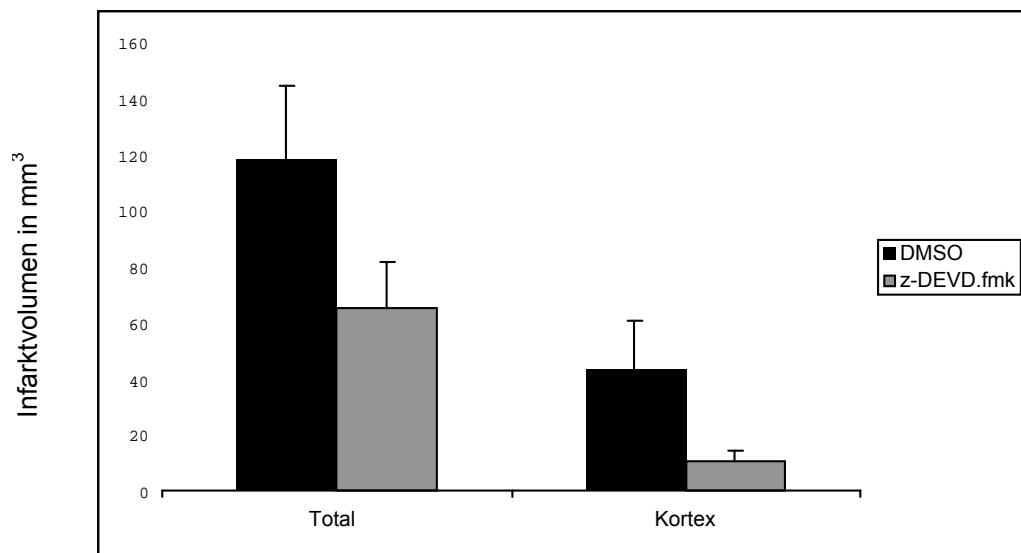


Abb. 16 Quantitative MRT-Volumetrie 7 Tage nach MCAO zur Bestimmung der Infarktgrösse

Die intraarterielle Applikation des spezifischen Caspase-3 Inhibitors z-DEVD.FMK (D 4.12.3.) mit Reperfusion führte zu einer Reduzierung der Infarktgrösse um ca 75 %, vor allem durch die Erhaltung von Kortex und subkortikalem Marklager in der Penumbra des MCA-Territoriums.

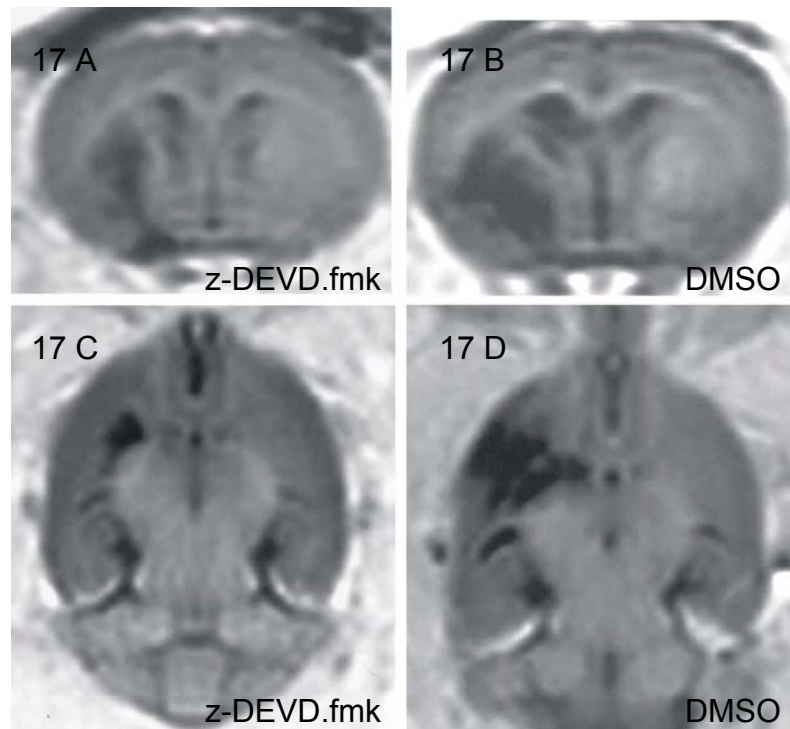


Abb. 17 In-vivo-MRT 7 Tage nach Ischämie

Koronare (A) bzw. axiale (C) Schichten einer mit z-DEVD.FMK behandelten Ratte. Koronare (B) bzw. axiale (D) Schichten eines Tieres, dem nur DMSO (Lösungsmittel) appliziert wurde.

E 3.3. Immunhistochemische Untersuchungen zur zellulären Aufnahme des Caspase-3 Inhibitors und die Expression von Caspase-3 nach transienter fokaler Ischämie

Immunhistochemische Untersuchungen bestätigten die Aufnahme des spezifischen Caspase-3 Inhibitors in der ischämischen Hemisphäre und die geringere Expression von Caspase-3 in den mit dem Inhibitor behandelten Tieren (Abb. 18 A-F). Für die Untersuchungen zur zellulären Aufnahme des Caspase-3 Inhibitors wurde derselbe neuronale- und astrozytäre Marker (mouse anti NeuN und rabbit anti GFAP) wie in Kapitel E 1.5. in Abb. 6 verwendet (Abb. 18 B). Die unterschiedliche Expression von aktiver Caspase-3 in den beiden Hemisphären der unterschiedlich behandelten Tieren wurde immunhistochemisch durch Doppelmarkierung aktiver Caspase-3 (rabbit anti *cleaved* Caspase-3-FITC-konjugiert, siehe C 1.2.) mit demselben neuronalen Marker (mouse anti NeuN) untersucht und ist in den Abb. 18 C-F dargestellt.

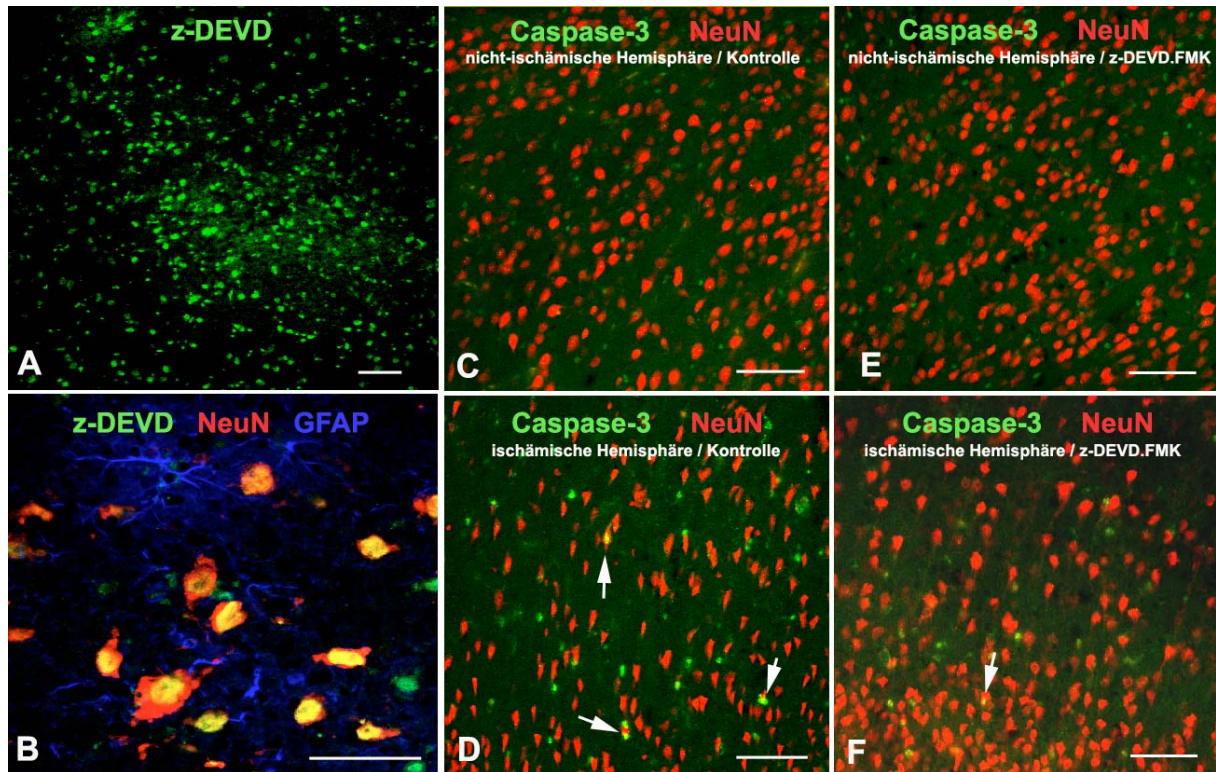


Abb. 18 Immunhistochemische Untersuchungen zur Aufnahme FITC-konjugierter z-DEVD.FMK
(A) Die Verteilung des Caspase-3 Inhibitors in der Penumbra nach MCAO. **(B)** Die gezielte Aufnahme des Inhibitors (grün) von Nervenzellen (rot) ist dargestellt, es resultiert gelb. **(C, E)** Keine Expression von Caspase-3 in der nicht ischämischen Hemisphäre unbehandelter (C) und mit dem Inhibitor behandelten Tiere (E) detektierbar. **(D, F)** In mit Inhibitor behandelten Tieren (F) ist die Expression von Caspase-3 in der ischämischen Hemisphäre, verglichen mit unbehandelten Tieren (D), reduziert.

Nachdem die Aufnahme des Caspase-3 Inhibitors schon 1 Stunde nach intraarterieller Applikation in der Penumbra gezeigt wurde (Abb. 15) konnte darüber hinaus die gezielte Aufnahme des Inhibitors von Nervenzellen ausschliesslich in der ischämischen Hemisphäre durch immunhistochemische Doppelmarkierungen bestätigt werden (Abb. 18 B). Auch nach 7 Tagen wurde eine deutliche Reduzierung des Infarkt Volumens (75 %, Abb. 16), vor allem durch die Erhaltung von Kortex und subkortikalem Marklager in mit Inhibitor behandelten Tieren MRT-volumetrisch festgestellt (17 A-D). Zusätzlich wurde der Einfluss des spezifischen Caspase-3 Inhibitors auf Proteinebene untersucht (Abb. 19). Dafür wurde ein anderer Primärantikörper (mouse anti *active* Caspase-3, siehe C 1.2.) als in der Immunhistochemie eingesetzt und durch einen AP-konjugierten Sekundärantikörper (goat anti mouse, siehe C 1.2.) wie in D 7.3.2. beschrieben detektiert.

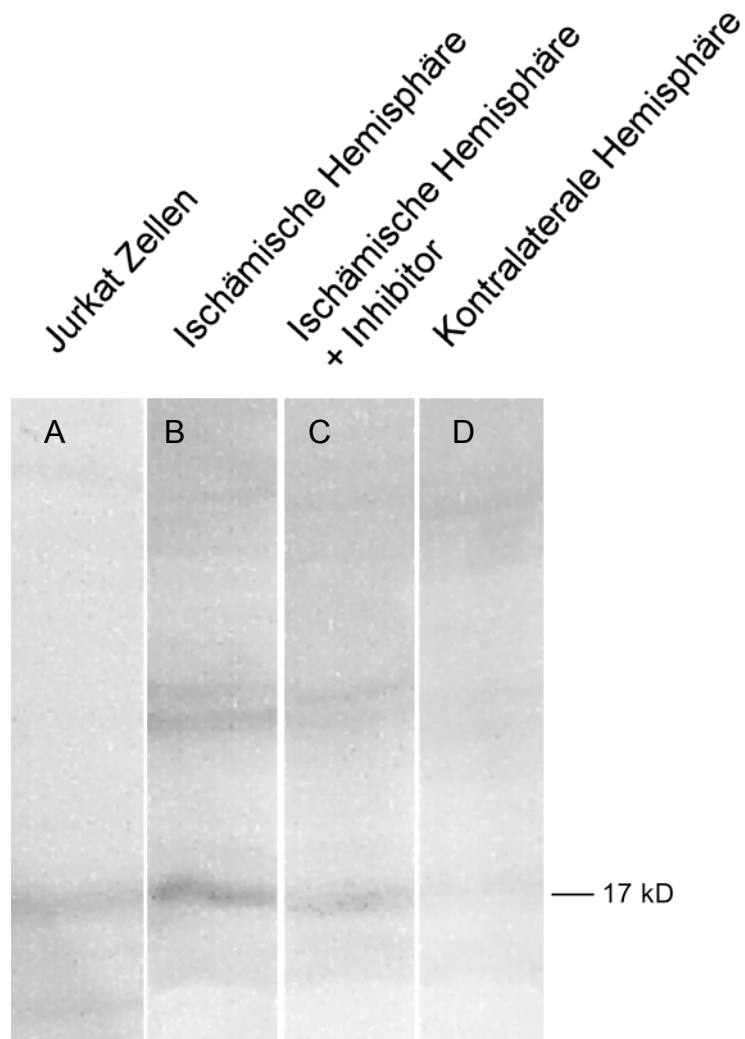


Abb. 19 Western Blot Untersuchungen aktiver Caspase-3 in Gehirnhomogenaten aus der Ratte 24 Stunden nach Ischämie

(A) Positivkontrolle für die Expression aktiver Caspase-3. (B, C) Geringere Expression aktiver Caspase-3 in der ischämischen Hemisphäre, nach Inhibitorbehandlung (C) verglichen mit dem Hemisphären-Homogenat einer unbehandelten Ratte (B). (D) Homogenat der nicht-ischämischen Hemisphäre eines Kontrolltieres.

Die Aktivität von Caspase-3 in Homogenaten der ischämischen Hemisphären 24 Stunden nach der MCA-Okklusion bei z-DEVD.FMK-behandelten Tieren war deutlich niedriger als im DMSO-behandelten Kontrollkollektiv (Abb. 19).

E 4 Modulation des TGF- β Signalweges und seine Wirkung auf den neuronalen Zelltod nach einer Ischämie

Der transformierende Wachstumsfaktor-beta (TGF- β) ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das wenige Stunden nach einer zerebralen Ischämie sehr stark hochreguliert wird und dem eine neuroprotektive Wirkung *in vivo* zugesprochen wird (Henrich-Noack *et al.*, 1994, 1996). Die Verstärkung des TGF- β Signalweges durch die intraarterielle Applikation von Antisense-Oligonukleotide gegen Smad7, das in der Signalkaskade inhibierend wirkt, sollte daher das Infarktvolumen nach einer zerebralen Ischämie reduzieren können. Um dies zu untersuchen wurde zunächst versucht, die Wirkung der Antisense-Oligonukleotide im TGF- β Signalweg *in vitro* nachzuweisen.

E 4.1. In-vitro-Untersuchungen

E 4.1.1. Kinetik der Apoptoseinduktion in PC 12-Zellen mit Camptothecin

Für die Etablierung eines Apoptose Modells *in vitro* wurden PC 12-Zellen (rat phaeochromocytoma) verwendet, die breite Verwendung in unterschiedlichen In-vitro-Systemen für die Apoptoseforschung finden (Batistatou *et al.*, 1993). Zudem ist bekannt, dass TGF- β 1 nach neuronaler Differenzierung von PC 12-Zellen durch NGF-Behandlung hochreguliert wird (Cosgaya and Aranda, 1995; Kim *et al.*, 1994). Als Apoptoseinduktor wurde der Transkriptionshemmer Camptothecin (campt) verwendet, das in den verwendeten Kulturen zu maximaler Apoptoserate führte. Auch durch einen einfachen Entzug des Serums aus dem Medium konnte Apoptose ausgelöst werden, was jedoch in einer gerigeren Apoptoserate resultierte.

Um die Kinetik des Apoptoseverlaufs zu untersuchen, wurden PC 12-Zellen unterschiedlich lange (2 bis 24 h) mit 0,5 μ g/ml Camptothecin inkubiert, und die Apoptoserate wurde im Durchflusszytometer mit Propidiumjodid (PI) analysiert (siehe D 3.1.). Dieser Farbstoff fluoresziert rot nach Bindung genomischer DNA und man erhält ein charakteristisches Histogramm, das die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus widerspiegelt (M3=G₁-Phase, M4=G₂-Phase; dazwischen Synthese-Phase). Durch die progressive Zunahme der Apoptose nimmt der sog. sub.G₁ peak in M2 mit zunehmender Dauer der Apoptoseinduktion zu (Abb. 20 A-I).

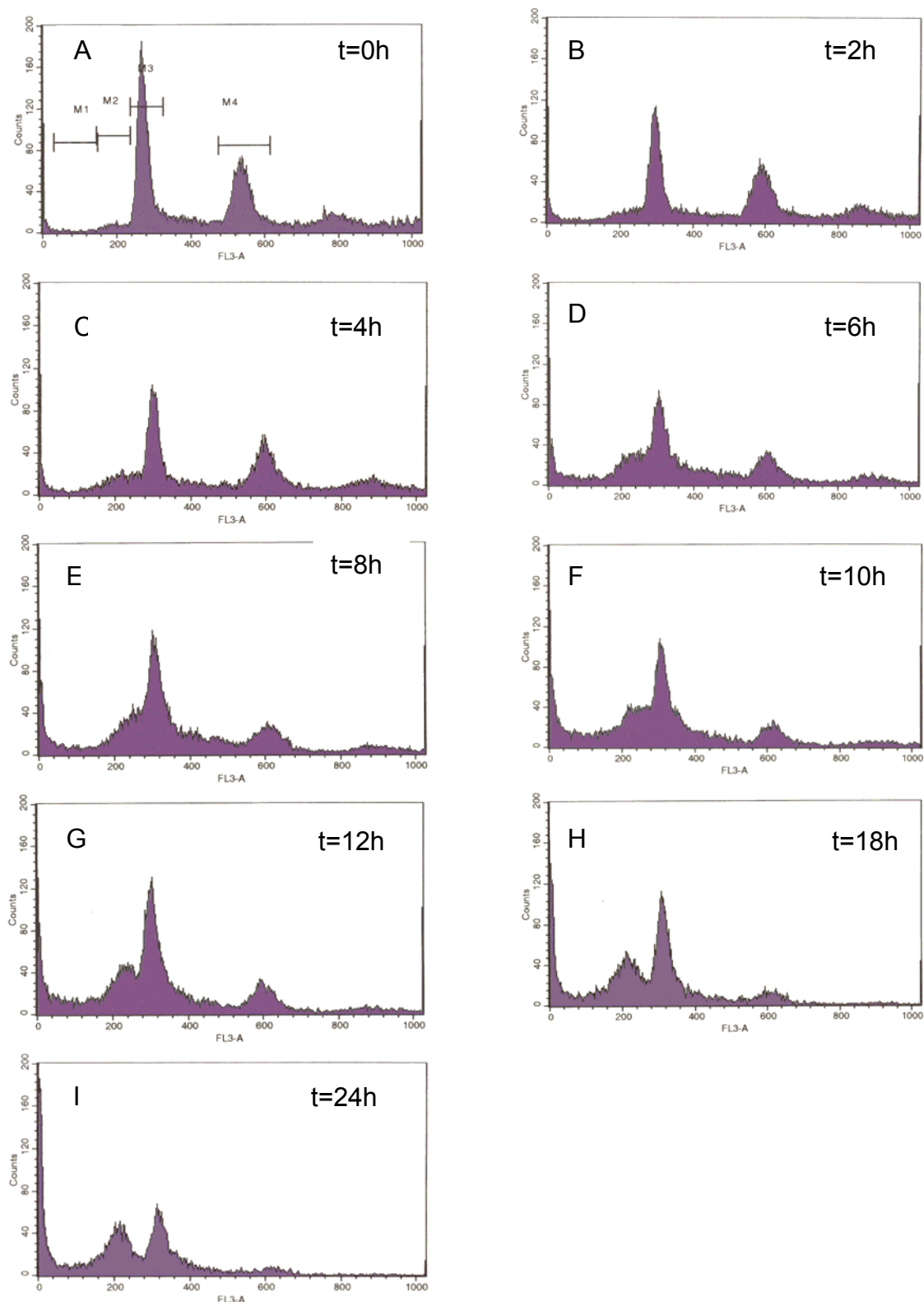


Abb. 20 Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Apoptoseinduktion in PC 12-Zellen

Eine kontinuierliche Zunahme des sub-G₁ peak (in M2) nach 2 (B), 4 (C), 6 (D), 8 (E), 10 (F), 12 (G), 18 (H) und 24 Stunden (I) wurde durch Induktion der Apoptose mit 0,5 µg/ml Camptothecin in PC 12-Zellen beobachtet. (A) Charakteristisches Histogramm von PC 12-Zellen ohne Apoptoseinduktion.

In Abb. 21 sind die verschiedenen Zeitpunkte noch einmal als Balkendiagramm aufgeführt.

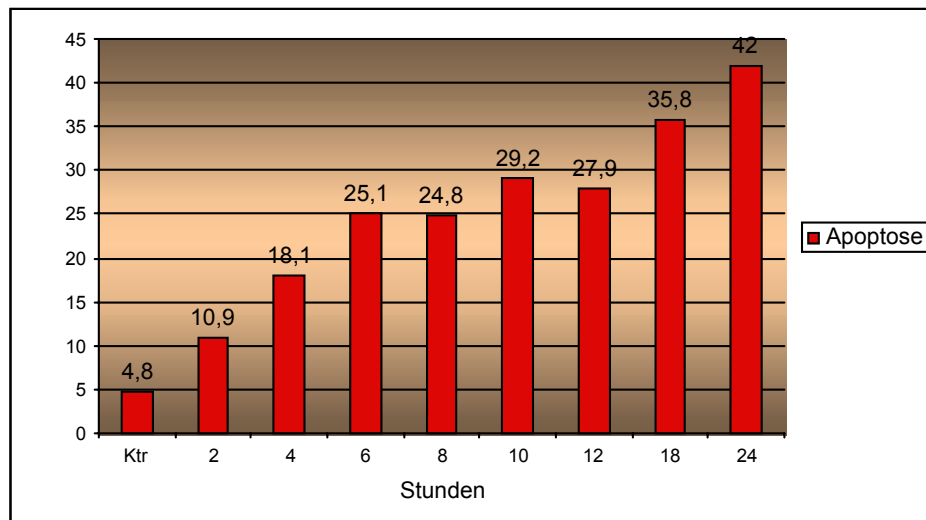


Abb. 21 Quantifizierung der Apoptoseinduktion

PC 12-Zellen wurden für 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 und 24 h mit 0,5 µg/ml Camptothecin inkubiert und die Induktion der Apoptose durch Propidiumjodidfärbung (PI) der DNA im Durchflusszytometer durch Histogramm-Analysen bestimmt. Die Apoptose wurde durch Messung der in der sub G_1 -Region detektierbaren Ereignisse quantifiziert (siehe D 3.1.).

E 4.1.2. Einfluss von TGF- β auf das Proliferationsverhalten von PC 12-Zellen

Die Inhibierung der Proliferation von Endothel- und Epithelzellen, hämatopoetischen, neuronalen und einigen mesenchymalen Zellen ist überwiegend der Wirkung von TGF- β zuzuordnen. Die typische Wirkung des vielseitigen und in Abhängigkeit von seiner Umgebung sehr unterschiedlich agierenden Zytokins wird jedoch in vielen Krebszellen aufgehoben. Vielmehr nimmt die Proliferationsrate ab einem gewissen Malignitätsgrad in Gliomen sogar zu. Um den Einfluss von TGF- β auf die hier ausgewählte Zelllinie zu untersuchen, wurde die Proliferation der PC 12-Zellen nach Inkubation mit TGF- β untersucht (siehe D 2.2.).

Nach unterschiedlich lang anhaltenden Inkubationen der PC 12-Zellen mit TGF- β 1 (10 ng/ml) und TGF- β 2 (10 ng/ml) wurde mittels Trypanblau die Zellzahl in der Suspension bestimmt (siehe D 1.2.) und mit der Kontrollsuspension (PC 12 ohne TGF- β = 100%) verglichen. Die beiden folgenden Abbildungen (Abb. 22, 23) zeigen die reduzierte Proliferation bei TGF- β 1 Inkubation der PC 12-Zellen nach 24 bzw. 72 h deutlich. Wurden die Zellen 48 h mit TGF- β 1 oder TGF- β 2 inkubiert, war die

Proliferationsrate ähnlich reduziert, wie in Abb. 22 für den 24 Stunden-Zeitpunkt dargestellt.

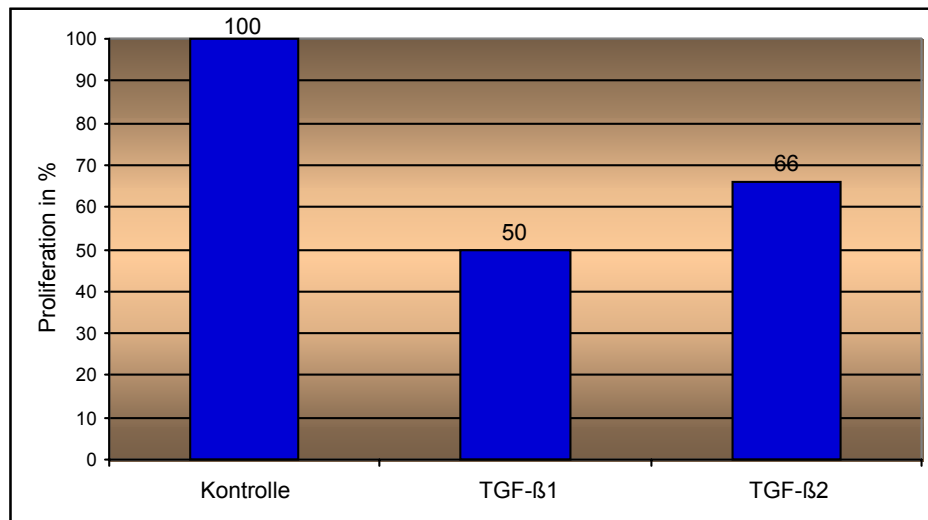


Abb. 22 Untersuchung der Proliferationsrate von PC-12 Zellen unter Einfluss von TGF-β

Eine 24 Stunden anhaltende Inkubation von PC 12-Zellen mit TGF-β1 (10 ng/ml) oder TGF-β2 (10 ng/ml) zeigt eine Reduzierung der Proliferation um 50 % für TGF-β1 und 34 % für TGF-β2. (Beschreibung unter D 2.2.)

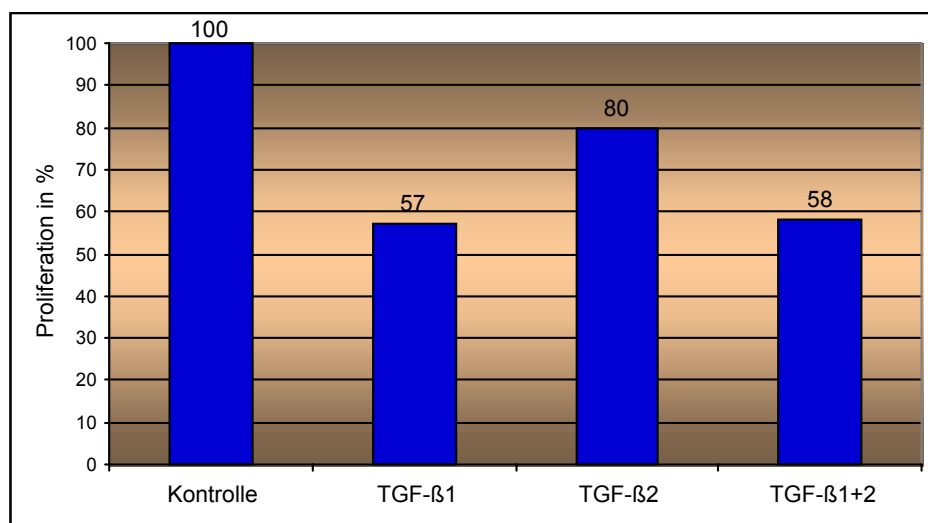


Abb. 23 Untersuchung der Proliferation von PC-12 Zellen unter Einfluss von TGF-β nach 72 h

Gezeigt ist die reduzierte Proliferation von PC 12-Zellen nach Inkubation mit TGF-β1 (10 ng/ml) oder TGF-β2 (10 ng/ml) oder mit TGF-β1 und TGF-β2 (je 10 ng/ml) für 72 Stunden. Die Inkubation der PC 12-Zellen mit TGF-β1 und TGF-β2 hemmt die Proliferation ähnlich stark wie die Inkubation nur mit TGF-β1 alleine. Andererseits führt die alleinige Inkubation mit TGF-β2 zu einer geringeren Reduktion der Proliferationsrate.

E 4.1.3. Inhibierung der Apoptoserate in PC 12-Zellen

Durch die proliferationshemmende Wirkung von TGF- β 1 in den Proliferationsuntersuchungen konnte der funktionelle Signalweg von Tgf- β im PC 12 System gezeigt werden. Zusätzlich wurde durch einen TGF- β -spezifischen Antikörper (siehe Abb. 24) oder Antisense-Oligonukleotide gegen das mediatorische Smad4 (siehe Abb. 25) die Apoptoserate reduziert und gleichzeitig die Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide untersucht.

Sowohl die Antikörperbehandlung der Zellkulturen als auch Smad4 Antisense-Oligonukleotide (AS) reduzierten die Apoptoserate erheblich. Die unterschiedlichen Ansätze sind in D 2.3. näher beschrieben. In Abb. 24 ist eine rund 42 %ige Reduzierung der Apoptose durch den *pan-specific TGF- β Antibody* zu beobachten, die durch Zugabe von TGF- β Protein wieder aufgehoben werden kann.

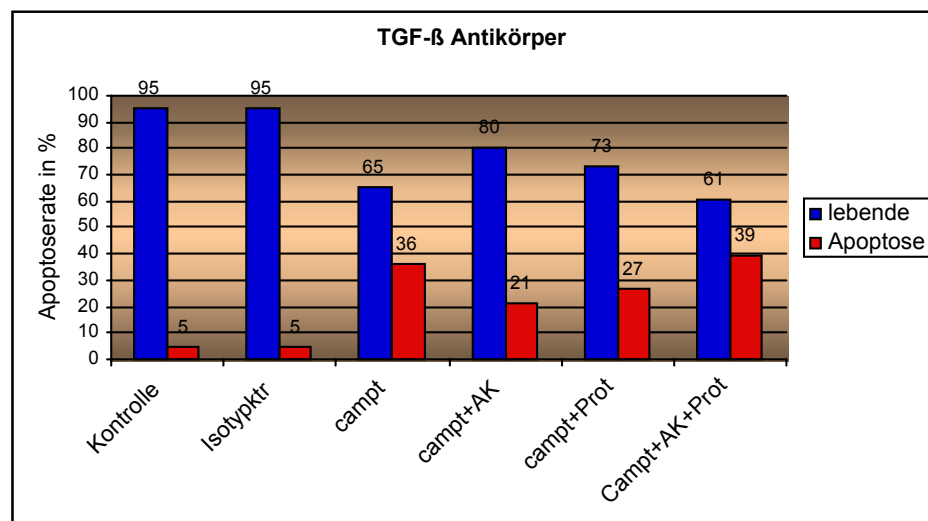


Abb. 24 Inhibierung der Apoptoserate durch neutralisierenden TGF- β Antikörper (AK)

PC 12-Zellen wurden 24 h vor der Apoptoseinduktion mit TGF- β -AK (5 μ g/ml) oder TGF- β Protein (Prot) (10 ng/ml) oder mit AK und Protein inkubiert, um am nächsten Tag mit 0,5 μ g/ml Camptothecin (campt) für weitere 24 h inkubiert zu werden. Die Quantifizierung der Apoptoserate erfolgte gegen eine nicht durch campt-induzierte Kontrolle durch Annexin V und PI im Durchflusszytometer, und durch Dotblot-Analysen quantifiziert (siehe D 3.2.). Eine Isotypkontrolle (Isotypktr) zeigte, dass es sich nicht um einen unspezifischen Effekt des TGF- β Antikörpers handelte.

Aus Abb. 25 ist ersichtlich, dass die 48 h anhaltende Präinkubation der Zellkultur mit Smad4 Antisense-Oligonukleotiden in einer Apoptosereduktion um 41,9 % resultierte (genaue Versuchsbeschreibung unter D 2.3.).

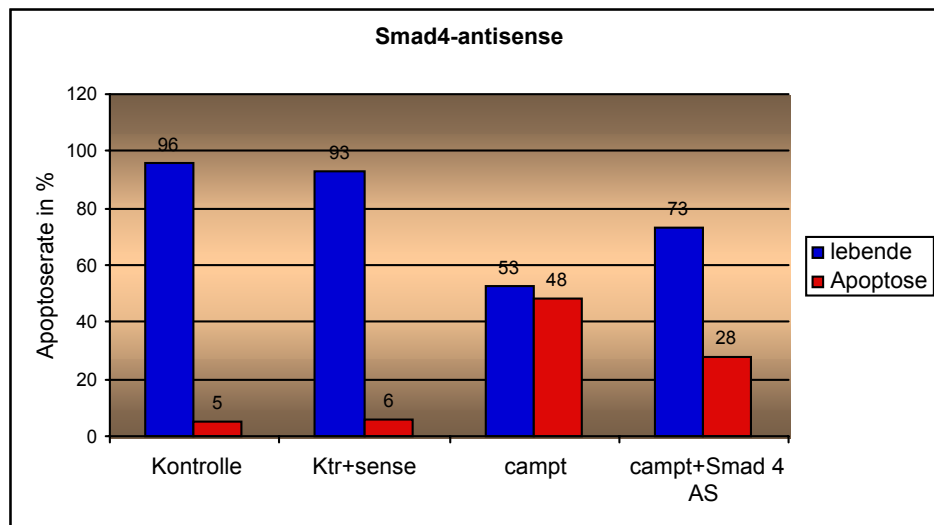


Abb. 25 Inhibierung der Apoptoserate durch Smad4-antisense (AS) Behandlung

PC 12-Zellen wurden 48 h vor der Apoptoseinduktion mit Antisense-Oligonukleotiden (5 μ M) inkubiert und dann mit 0,5 μ g/ml Camptothecin für weitere 24 h inkubiert. Die Induktion der Apoptose wurde durch Annexin V und PI im Durchflusszytometer durch Dotplot-Analysen quantifiziert. Auch hier gewährleistete eine sog. Mock-Kontrolle (Ktr + sense) die Spezifität der Smad 4 Antisense-Oligonukleotide.

E 4.2. In-vivo-Untersuchungen

E 4.2.1. Intraarterielle Applikation von Smad7- und Smad4 Antisense-Oligonukleotiden nach transientser fokaler Ischämie reduzieren die Infarktgrösse

Nachdem die für TGF- β bekannte, typische proliferationshemmende Wirkung auch in PC 12-Zellen gezeigt und die Apoptoserate *in vitro* durch die Antisensebehandlung gegen Smad4 vermindert werden konnte, wurde in weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe der Ansatz einer TGF- β Signalmodulation mittels Antisense-Oligonukleotiden auf das In-vivo-Modell übertragen (Horn *et al.*, 2002). Hierbei erhielten Ratten nach 90-minütiger MCA-Okklusion entweder Antisense-Oligonukleotide gegen das inhibierende Smad7-Protein oder gegen das aktivierende Smad4-Protein. Bei der rezeptorvermittelten Induktion von TGF- β spielen Smads eine übergeordnete Rolle, die in Abb. 26 beschrieben ist. Durch die Verwendung von spezifischen Antisense-Oligonukleotiden gegen Smad4 und Smad7 sollte die TGF- β Expression beeinflusst werden. Während wir uns von der Behandlung mit Smad7

Antisense-Oligonukleotiden, das normalerweise inhibierend auf TGF- β wirkt und jetzt durch die Antisensebehandlung aufgehoben wird, eine Verstärkung des Signalweges und dadurch einen protektiven Effekt erwarteten, sollte die Behandlung mit Smad4 Antisense-Oligonukleotiden (AS) den Signalweg von TGF- β inhibieren und kein protektiver Effekt detektierbar sein. Nach einer 90-minütigen Okklusion der mittleren zerebralen Arterie (MCAO) wurden die Smad7- und Smad4 Antisense-Oligonukleotide intraarteriell, wie auch der Caspase-3 Inhibitor appliziert (siehe D 4.12.4.).

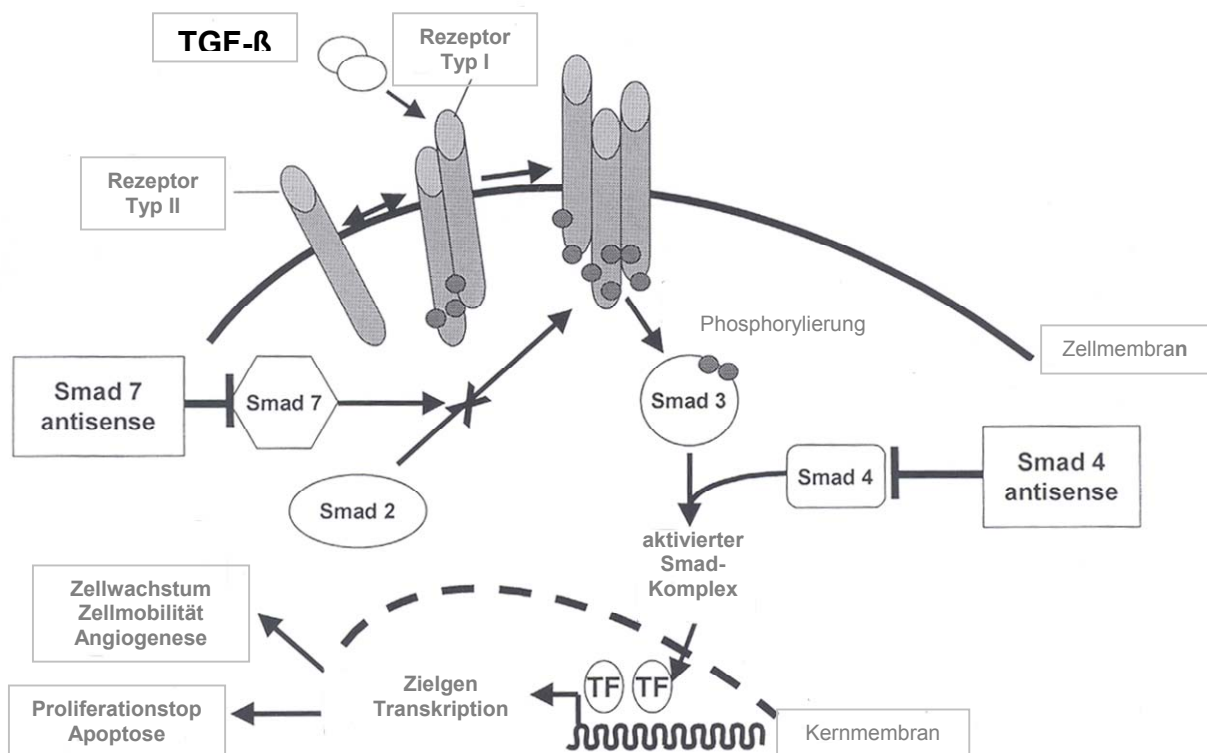
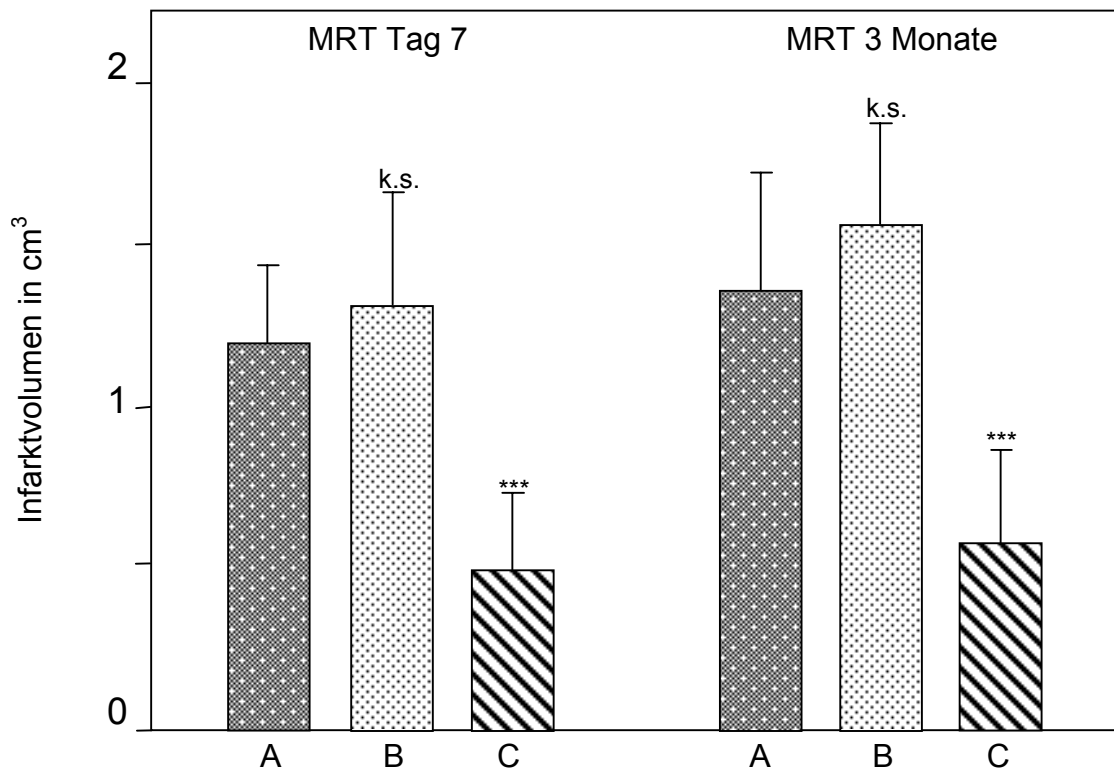


Abb. 26 Dargestellt ist die rezeptorvermittelte Induktion von TGF- β

Die intrazelluläre Signaltransduktion wird durch den aktivierten TGF- β Typ I Rezeptor initialisiert, der spezifische Smads phosphoryliert, nachdem er selber vom Typ II Rezeptor phosphoryliert wird. Dabei phosphoryliert der aktivierte Typ I Rezeptor entweder Smad2 oder Smad 3. Dieser Smad2/Typ I Rezeptor-Komplex oder Smad3/Typ I Rezeptor-Komplex bildet mit dem mediatorischen Smad4 einen aktivierten Smad-Komplex (Smad2/4 oder Smad3/4), der für die Translokation in den Kern verantwortlich ist. Die beiden inhibitorischen Smads 6/7 blockieren diesen aktivierten Smad-Komplex, bestehend aus Smad2/3 und Smad4, sodass die Signaltransduktion unterbrochen wird (Horn *et. al.*, 2002).

Ratten (n=8 pro Gruppe) erhielten unmittelbar mit Reperfusion, intraarteriell entweder Smad4-AS, Smad7-AS oder Smad4 Sense (Kontrolle). Nach sieben Tagen und nach drei Monaten wurde das Infarktvolumen MRT-volumetrisch bestimmt (siehe Abb. 27).



k.s. : kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle

*** : $P < 0.001$, verglichen zur Kontrolle

Abb. 27 MRT-Volumetrie zur Bestimmung des Infarktvolumens 7 Tage und 3 Monate nach Ischämie

Zu beiden Zeitpunkten weisen die mit Smad7 Antisense-Oligonukleotiden behandelten Tiere (C) ein wesentlich geringeres Infarktvolumen gegenüber der Kontrollgruppe (A) und der mit Smad4 Antisense-Oligonukleotiden behandelten Tiere (B) auf. Die durchschnittliche Zunahme des Infarktvolumens von Tag 7 zu 3 Monate betrug jedoch 15,3% in der Kontrollgruppe, 16,6 % in den mit Smad4-antisense behandelten Gruppe und 22,4% für die mit Smad7-antisense behandelten Tieren (Horn *et al.*, 2002)

Wie man der Abb. 27 entnehmen kann, ist der protektive Effekt durch die Behandlung mit Smad7-AS sehr stark ausgeprägt. Das gemessene Infarktvolumen beträgt 7 Tage (3 Monate) nach der Ischämie $1,18 \pm 0,26 \text{ cm}^3$ ($1,36 \pm 0,42 \text{ cm}^3$) für die Kontrollgruppe, $0,49 \pm 0,25 \text{ cm}^3$ ($0,60 \pm 0,28 \text{ cm}^3$) für die mit Smad7-AS behandelten Tieren und $1,32 \pm 0,33 \text{ cm}^3$ ($1,55 \pm 0,35 \text{ cm}^3$) in der Gruppe der mit

Smad4-AS behandelten Tiere. Das Infarktvolumen in der mit Smad7-AS behandelten Tieren ist damit zu beiden Zeitpunkten statistisch signifikant kleiner ($p < 0,001$). Die durchschnittliche Zunahme des Infarktvolumens von Tag 7 zu 3 Monate betrug jedoch 15,3% (Kontrolle), 16,6 % (Smad4-antisense) und 22,4% (Smad7-antisense). Im Gegensatz dazu war kein signifikanter Effekt durch die Smad4-AS Behandlung zu beobachten.

Eine Gegenüberstellung von MRT-Aufnahmen der mit Smad7-AS behandelten Tiere und der mit Smad4 Sense als Kontrollgruppe ist in Abbildung 28 A-H dargestellt. Zusätzliche histologische Untersuchungen zeigten eine einsetzende Gliose (Abb. 28 J und L) und eine allgemein bessere Erhaltung des Gewebes vor allem im Kortex, der subkortikalen weissen Substanz und der Stammganglien 3 Monate nach Ischämie in der mit Smad7-AS behandelten Tiere (Abb. 28 K) verglichen zu Tieren, die mit Smad4 Sense als Kontrollgruppe behandelt wurden (Abb. 28 I).

Smad7-Antisense Oligonukleotide

Smad4-Sense Oligonukleotide

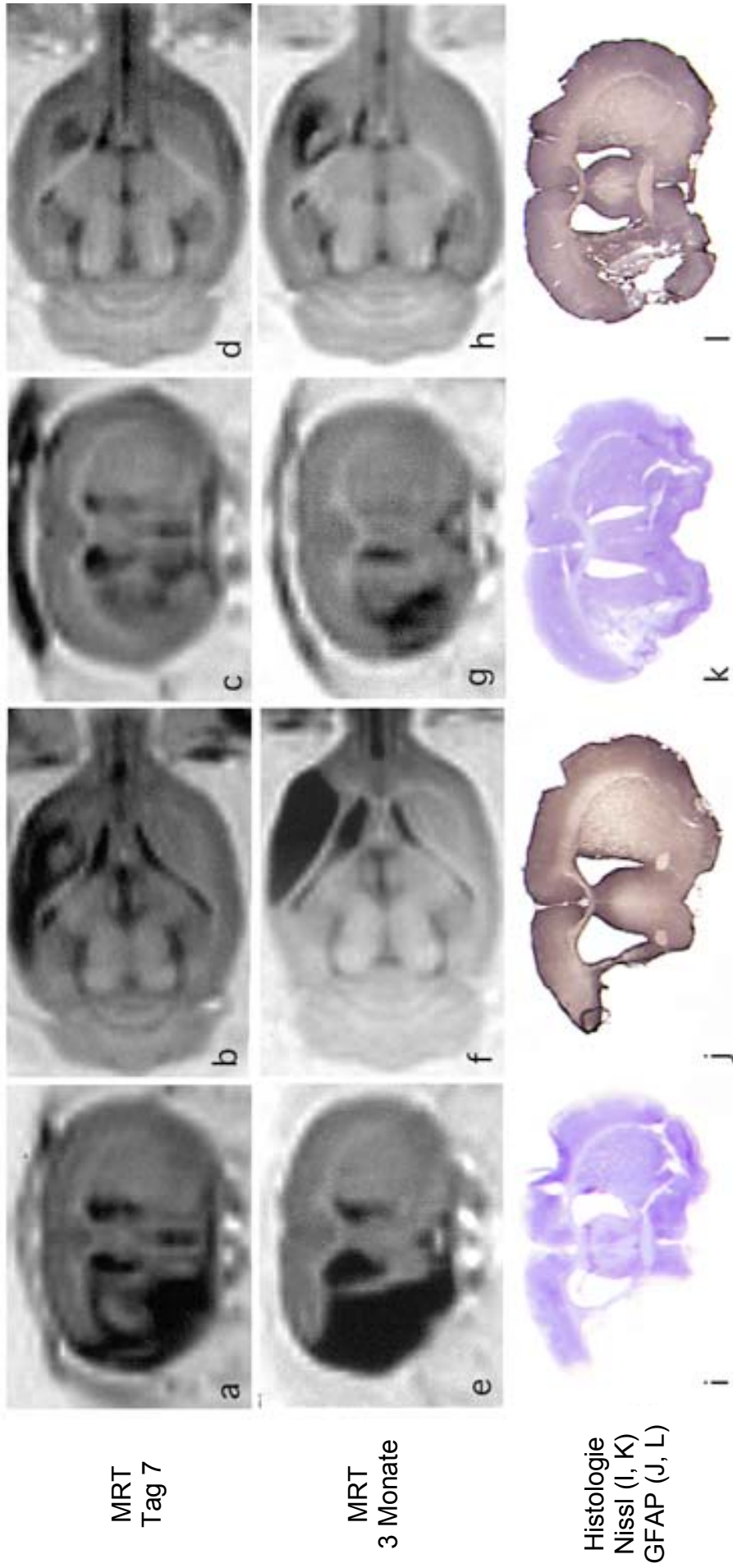


Abb. 28 MRT-Aufnahmen am Tag 7 (A-D) und 3 Monate (E-H) nach Ischämie.

Zu beiden Zeitpunkten fällt bereits makroskopisch auf, dass die mit Smad-7 Antisense Oligonukleotiden behandelten Tiere (C, D, G, H) einen kleineren Infarkt, hauptsächlich im Kortex, aufweisen, als die Kontrolltiere (A, B, E, F). Die histologischen Untersuchungen mit Kresylviolett (I, K) und GFAP (J, L) zeigen ein der MRT-Volumetrie entsprechendes Bild. Man erkennt eine weitaus bessere Erhaltung des Gewebes in (K, L) im Gegensatz zu (I, J) (Horn *et al.*, 2002).

Während den Operationen zu allen Untersuchungsgruppen (Sham, Smad4 Sense, Smad4-AS und Smad7-AS) wurden verschiedene physiologische Parameter kontrolliert, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Physiologische Variablen

Parameter		Sham n = 2	Smad4 sense (Behandlungs kontrolle) n = 8	Smad4- antisense n = 8	Smad7- antisense n = 8
P_{O2} [mm Hg]	pre-ischemia	121 ± 6 ¹	120 ± 9	127 ± 8	125 ± 8
	intra-ischemia		133 ± 8	133 ± 7	130 ± 9
	reperfusion	127 ± 8 ²	128 ± 9	131 ± 8	132 ± 7
P_{CO2} [mm Hg]	pre-ischemia	42.7 ± 4.0 ¹	44.3 ± 3.8	45.1 ± 4.0	46.0 ± 3.5
	intra-ischemia		37.5 ± 2.6	38.2 ± 3.7	37.9 ± 3.3
	reperfusion	40.3 ± 3.3 ²	40.1 ± 4.0	39.7 ± 3.9	40.1 ± 4.2
pH	pre-ischemia	7.40 ± 0.03 ¹	7.41 ± 0.02	7.40 ± 0.03	7.41 ± 0.02
	intra-ischemia		7.41 ± 0.07	7.42 ± 0.05	7.41 ± 0.06
	reperfusion	7.41 ± 0.04 ²	7.41 ± 0.03	7.41 ± 0.04	7.41 ± 0.04
BD [mm Hg]	pre-ischemia	135 ± 11 ¹	134 ± 13	131 ± 11	135 ± 10
	intra-ischemia		125 ± 10	127 ± 11	123 ± 13
	reperfusion	127 ± 9 ²	117 ± 9	113 ± 8	114 ± 12
Glukose [mmol/l]	pre-ischemia	6.4 ± 0.3 ¹	6.4 ± 0.4	6.5 ± 0.3	6.4 ± 0.2
	intra-ischemia		6.7 ± 0.3	6.6 ± 0.5	6.7 ± 0.3
	reperfusion	6.7 ± 0.5 ²	6.9 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.4
Hematokrit	pre-ischemia	49 ± 2 ¹	50 ± 2	49 ± 3	50 ± 3
	intra-ischemia		47 ± 3	46 ± 4	47 ± 4
	reperfusion	45 ± 4 ²	46 ± 4	45 ± 3	46 ± 3
Kern Temperatur [°C]	pre-ischemia	36.9 ± 0.2 ¹	36.9 ± 0.2	37.0 ± 0.1	36.9 ± 0.1
	intra-ischemia		36.9 ± 0.2	36.9 ± 0.2	36.9 ± 0.2
	reperfusion	37.0 ± 0.3 ²	37.0 ± 0.3	37.0 ± 0.2	36.9 ± 0.2

1 vor der OP, 2 nach der OP

Tab. 1 Überblick über verschiedene Parameter, die während einer Operation ermittelt wurden

Die ständige Kontrolle verschiedener physiologischer Parameter vor, während und nach der Ischämie gewährten einen Überblick über den gesundheitlichen Zustand der Tiere über die gesamte Dauer der Operation. Diese dauerte, ab der Einleitung der Tiere bis zur Extubation nach der intraarteriellen Applikation, bis zu 6 Stunden.

E 5 Neurogenese im adulten Säugergehirn nach Ischämie

Neben den bisher beschriebenen protektiven Mechanismen, der Inhibierung von MMP 2 und –9, der Hemmung der Aktivität von Caspase-3 und der Modulation (Verstärkung) des TGF- β Signalweges, die nach fokaler zerebraler Ischämie zur Reduzierung des neuronalen Zelltods herangezogen wurden (Kapitel E 2, 3 und 4), wurde auch die endogene Reaktion des adulten Säugergehirns auf eine Degeneration infolge einer Ischämie untersucht. Während umfangreiche Belege für die natürlich vorkommende Neubildung von Nervenzellen im Gyrus dentatus des Hippokampus und der Ventrikelwand (subventrikuläre Zone) vorliegen (Alvarez-Buylla and Nottebohm, 1988; Liu *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 1999; Biebl *et al.*, 2000), sind nur vereinzelt Beobachtungen dieses Phänomens in der Randzone von Läsionen (Ischämie, Trauma) beschrieben (Gu *et al.*, 2000; Magavi *et al.*, 2000).

Darüber hinaus haben Palmer und Mitarbeiter (1999) gezeigt, dass aus Hirnregionen ausserhalb der “klassischen“ neurogenen Zonen isolierte Nervenzellen *in vitro* teilungsfähig sind. Neurogenese in der Infarkttrandzone betreffend liegen derzeit in ihrer Aussagefähigkeit noch sehr begrenzte In-vivo-Daten vor, die in unterschiedlichen Modellen gewonnen werden (Magavi *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2000). Ebenso sind die Zeitpunkte von Proliferation und neuronaler Differenzierung z. B. im Kortex nach Ischämie nicht hinreichend untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher fünf Versuchstiergruppen gebildet, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im postischämischen Verlauf zunächst einen Proliferationsmarker appliziert bekamen und nach einem wiederum variablen Intervall (Differenzierung) histologisch untersucht wurden (Abb. 29).

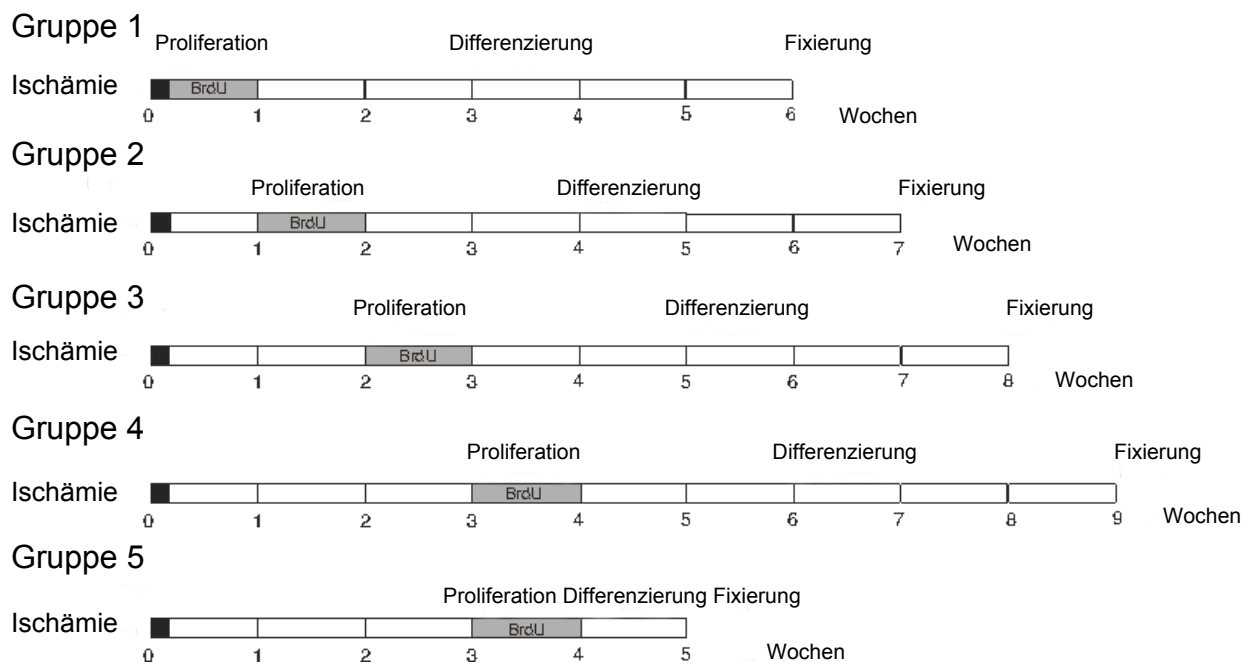


Abb. 29 Gruppenbildung zur Untersuchung neuronaler Proliferation nach fokaler Ischämie

Ratten (n=3) erhielten im Anschluss an 90 Minuten MCAO den Proliferationsmarker BrdU im Trinkwasser zu unterschiedlichen Zeitpunkten: Gruppe 1 in der ersten Woche nach Ischämie, Gruppe 2 in der zweiten, Gruppe 3 in der dritten, Gruppe 4 und 5 in der vierten Woche nach Ischämie. Tiere der Gruppe 1-4 überlebten weitere 5 Wochen, die Überlebenszeit der Tiere aus Gruppe 5 betrug nur 1 Woche.

E 5.1. Neubildung von Nervenzellen im Gyrus dentatus nach fokaler Ischämie

Nach 90-minütiger MCAO wurden die Tiere entsprechend dem Schema (Abb. 29) behandelt und nach einer fünfwöchigen Überlebenszeit für die immunhistochemischen Untersuchung perfusionsfixiert (siehe D 5.1.) Tiere der Gruppe 1 mussten von der Untersuchung ausgeschlossen werden, da die Trinkwassermenge in der ersten Woche nach Ischämie sehr variabel war und eine Vergleichbarkeit mit Tieren aus anderen Gruppen nicht gegeben war. Zur Detektion des Proliferationsmarkers BrdU wurde ein primärer Antikörper (rat anti BrdU, siehe C 1.2.) verwendet und zur Markierung von Nervenzellen wurde ein primärer Antikörper (mouse anti NeuN, siehe C 1.2.) eingesetzt. Am konfokalen Lasermikroskop konnte die Kolokalisation von BrdU und NeuN in vereinzelt Zellen, d.h. proliferierende Nervenzellen im Gyrus dentatus nachgewiesen werden. Dabei wurden zwei

sekundäre Antikörper, ein CY5-konjugierter donkey anti rat-IgG und ein RHOX-konjugierter donkey anti mouse IgG benutzt (siehe C 1.2.), so dass die Nervenzellen rot (RHOX) fluoreszierten und durch die blaue Fluoreszenz von BrdU (CY5) diese proliferierenden Nervenzellen in den Abb. 30 A-G rosa erschienen. Zu keinem der Untersuchungszeitpunkte bestanden Unterschiede zwischen der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphäre. In sämtlichen ischämischen Tieren war der Anteil proliferierender Zellen im Gyrus dentatus etwa um das Doppelte erhöht, verglichen mit nicht-ischämischen Kontrollen.

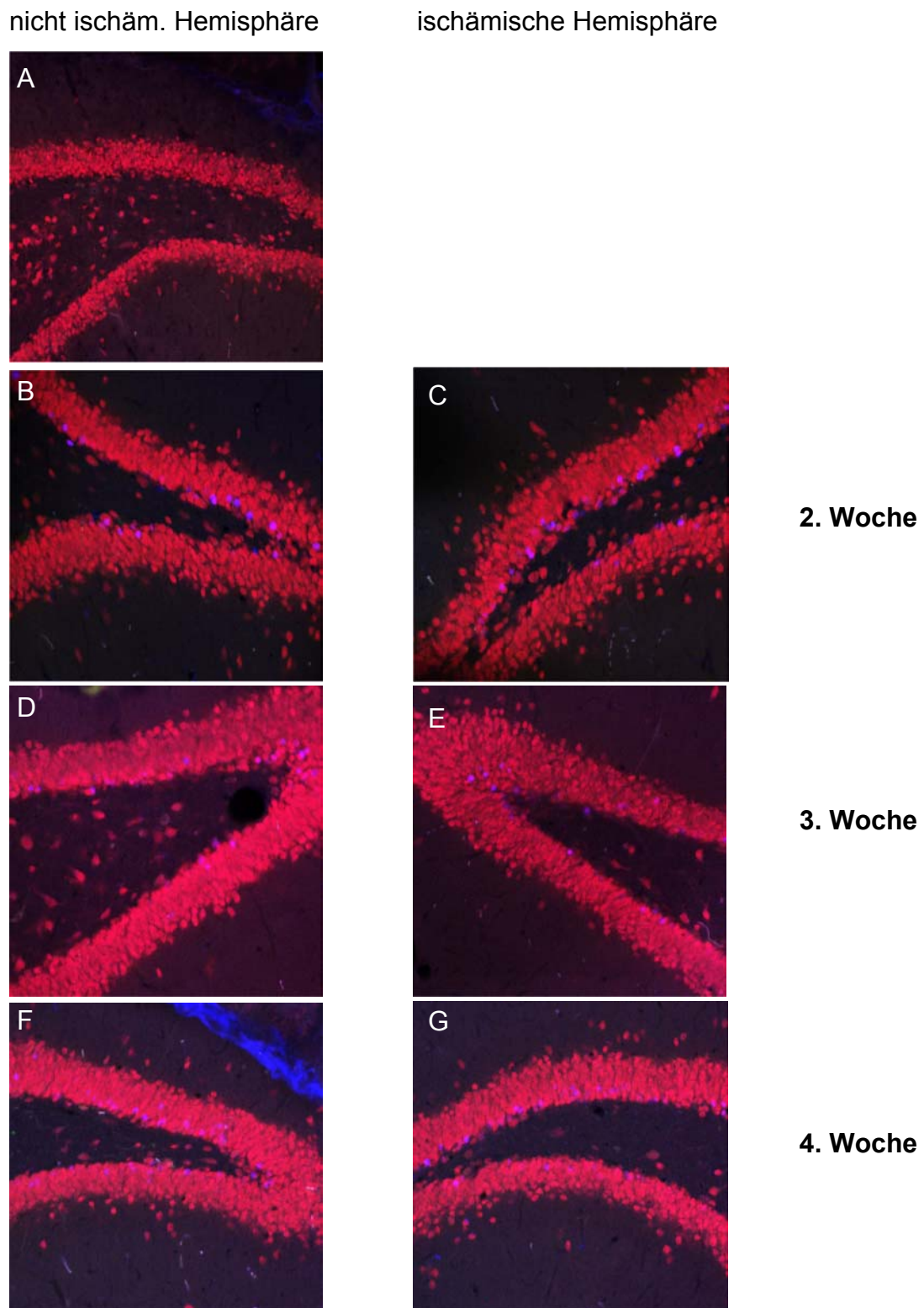


Abb. 30 Proliferation im Gyrus dentatus des Hippokampus nach zerebraler Ischämie

Die Proliferation in der zweiten (**B, C**), dritten (**D, E**) und vierten (**F, G**) Woche nach Ischämie sowohl ipsilateral (ischämische Hemisphäre) **C, E** und **G** als auch kontralateral (nicht ischämische Hemisphäre) **B, D**, und **F** ist zu erkennen. (**A**) In Sham-operierten Ratten ist Proliferation nur selten nachweisbar.

E 5.2. Neurogenese in der Infarktzone nach fokaler Ischämie

Forschungsergebnisse, dass Stammzellen auch aus anderen Bereichen (z. B. Kortex) als dem Hippokampus oder der subventrikulären Zone nach Isolation *in vitro* in verschiedene Zelltypen des Zentralen Nervensystems ausdifferenzieren können (Palmer *et al.*, 1999), hat die Aufmerksamkeit auf die Umgebung der Läsion z.B. nach Trauma oder Ischämie gelenkt. In dem von uns gewählten Tiermodell sind vor allem Zellen im Kortex und im Striatum von Ischämie betroffen. Proliferation konnte bisher nur in Einzelfällen im Kortex gezeigt werden (Magavi *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2000).

In Tieren der Gruppen 2-5 (siehe Schema Abb. 29) wurde auch der Kortex und das Striatum im konfokalen Mikroskop untersucht. Zusätzlich wurde ein primärer Antikörper gegen GFAP eingesetzt (siehe C 1.2.). Die sekundären Antikörper waren mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert (BrdU: FITC, NeuN: RHOX). Astrozyten wurden mit einem CY5 konjugierten sekundären Antikörper markiert und erscheinen damit in den folgenden Abbildungen 31 A-F blau. Der Nachweis proliferierender Nervenzellen blieb im Gegensatz zum Hippokampus auf die ischämische Hemisphäre beschränkt. In Abb. 31 B ist beispielhaft die nicht ischämische Hemisphäre in der zweiten Woche nach Ischämie dargestellt, in der man keine Proliferation (gelb) erkennen kann, im Gegensatz zur ischämischen Hemisphäre zum selben Zeitpunkt (31 A). Für die weiteren Zeitpunkte, in der dritten (Abb. 31 C, D) und vierten (Abb. 31 E, F) Woche nach Ischämie sind ausschliesslich Lokalisationen aus der ischämischen Hemisphäre gezeigt.

Somit ist die Proliferation neuronaler Stammzellen auch im ischämischen Territorium, dem Kortex (Abb. 31, 33 A, B und C) und dem Striatum (Abb 33 D), nach fokaler zerebraler Ischämie eindeutig gezeigt und unterstützt erste Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen.

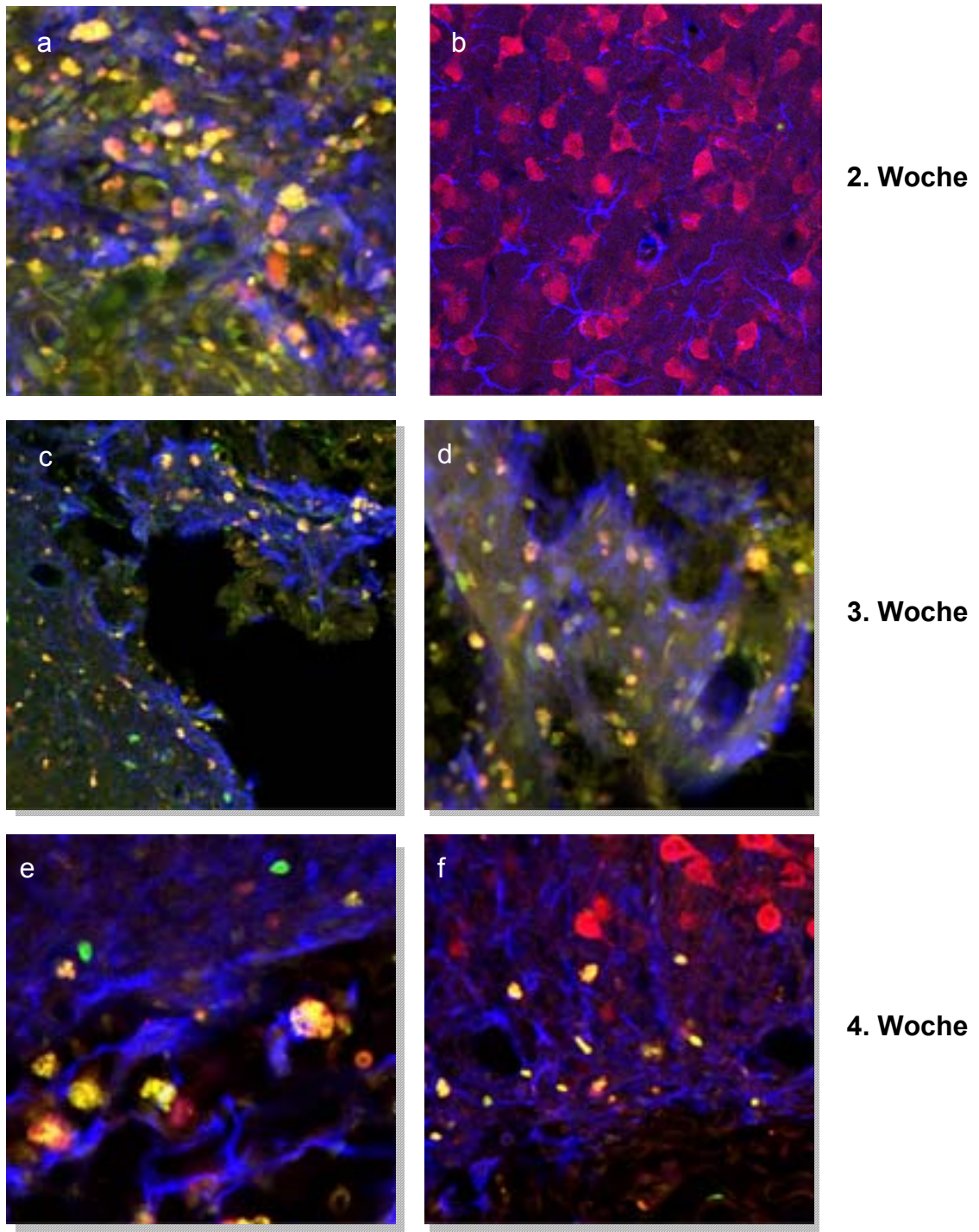


Abb. 31 Proliferation in der Peri-Infarkt Zone nach fokaler zerebraler Ischämie

Die Proliferation in der Penumbra in der zweiten (A), dritten (C, D) und vierten (E, F) Woche nach zerebraler fokaler Ischämie ist gezeigt. (B) Die kontralaterale, nicht ischämische Hemisphäre bleibt negativ für BrdU. Die Tiere überlebten 5 Wochen nach BrdU-Markierung und wurden immunhistochemisch wie unter D 8.3. beschrieben untersucht. Proliferierende BrdU-positive Zellen, die sich innerhalb dieser Zeit zu Nervenzellen (NeuN) ausdifferenziert haben, erscheinen gelb. Der reife gliale Astrozytenmarker GFAP zeigt keine Kolo-kalisation mit BrdU.

Es ist gut untersucht, dass die Proliferation nach einer globalen Ischämie in der zweiten Woche (9.-11. Tag) im Gyrus dentatus maximal ist (Sharp *et al.*, 2002). Die Zeit, die für die neu gebildeten Zellen notwendig ist, um in ein funktionierendes Neuron auszudifferenzieren, wird in der Literatur mit 3 bis 5 Wochen angegeben (Kee *et al.*, 2001). Wie im Schema der Abb. 29 zu erkennen ist, wurden die Tiere der Gruppe 5 bereits eine Woche nach der Gabe des Proliferationsmarker (BrdU) perfusionsfixiert und für die immunhistochemische Untersuchung prozessiert, um eine eventuelle, frühzeitige Differenzierung der neu gebildeten Zellen zu Nervenzellen zu erfassen. Die beiden Abbildungen 32 A (Striatum) und 32 B (Kortex) zeigen Ausschnitte aus einem Schein operierten Tier (Operation ohne MCA-Okklusion) nach der immunhistochemischen Doppelmarkierung mit dem Proliferationsmarker BrdU, der nicht nachweisbar ist, und dem neuronalen Marker NeuN.

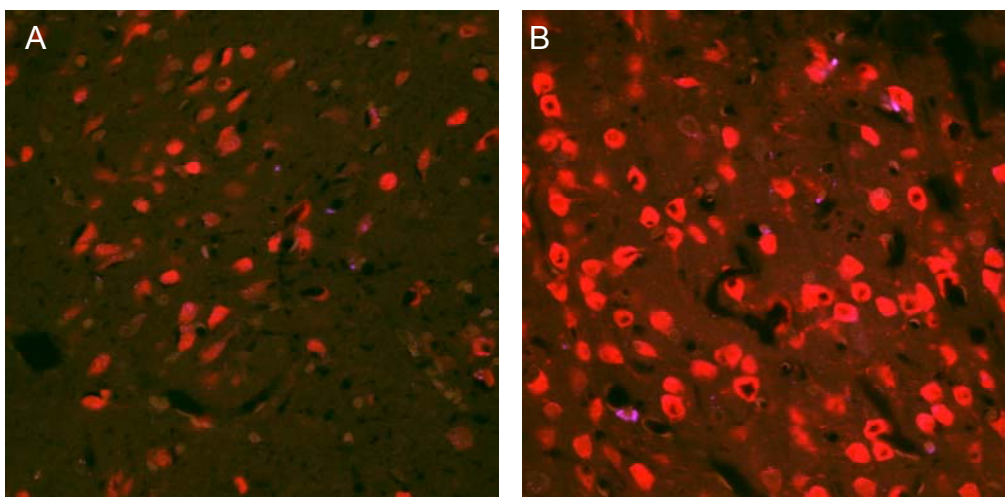


Abb. 32 Immunhistochemische Doppelmarkierung in einer Schein-operierten Ratte aus Gruppe 5

Die Überlebenszeit nach Schein-OP betrug nur 1 Woche, für die immunhistochemischen Untersuchung wurden die beiden primären Antikörpern, rat anti **BrdU** und mouse anti **NeuN** und die beiden sekundären Antikörpern donkey anti rat IgG-**CY5** und donkey anti mouse IgG-**RHOX** verwendet. Weder im Striatum (**A**) noch im Kortex (**B**) ist Proliferation erkennbar. Die immunhistochemische Färbung erfolgte wie in D 8.3. beschrieben.

Im Gegensatz dazu war BrdU in Gehirnen von Tieren nach fokaler Ischämie immunhistochemisch detektierbar. Die in den Abbildungen 33 A-D zur Darstellung kommende violette Färbung resultiert aus der Überlappung des rot-fluoreszierenden (RHOX) Chromophors (Nervenzellen) und des blauen (CY5) der BrdU-positiven

Zellen. Diese Kolokalisation beschränkte sich ausschliesslich auf das ischämische Territorium nach einer MCAO. Die Abbildungen 33 A-D zeigen sowohl im Kortex (A, B und C) als auch im Striatum (D) doppelt positive Zellen.

Wie aus dem Schema in der Abbildung 29 in der Gruppe 5 zu erkennen ist, bekamen die Tiere am 22. Tag (in der vierten Woche nach Ischämie) den Proliferationsmarker mit dem Trinkwasser für eine Woche bis zum 28. Tag. Nach einer weiteren Woche wurden die Tiere am 35. Tag für die Immunhistochemie weiter prozessiert. Das heisst, dass neu gebildete Zellen, die vom 22. bis 28. Tag mit dem Proliferationsmarker markiert wurden, am 35. Tag positiv für den neuronalen Marker NeuN waren. Zu diesem Zeitpunkt, am Tag 35 nach der Ischämie, waren diese neugenerierten Zellen zwischen 9 und 14 Tage alt, je nachdem ob sie am Tag 22 (14 Tage alt) oder am Tag 27 (9 Tage alt) nach der Ischämie neu entstanden.

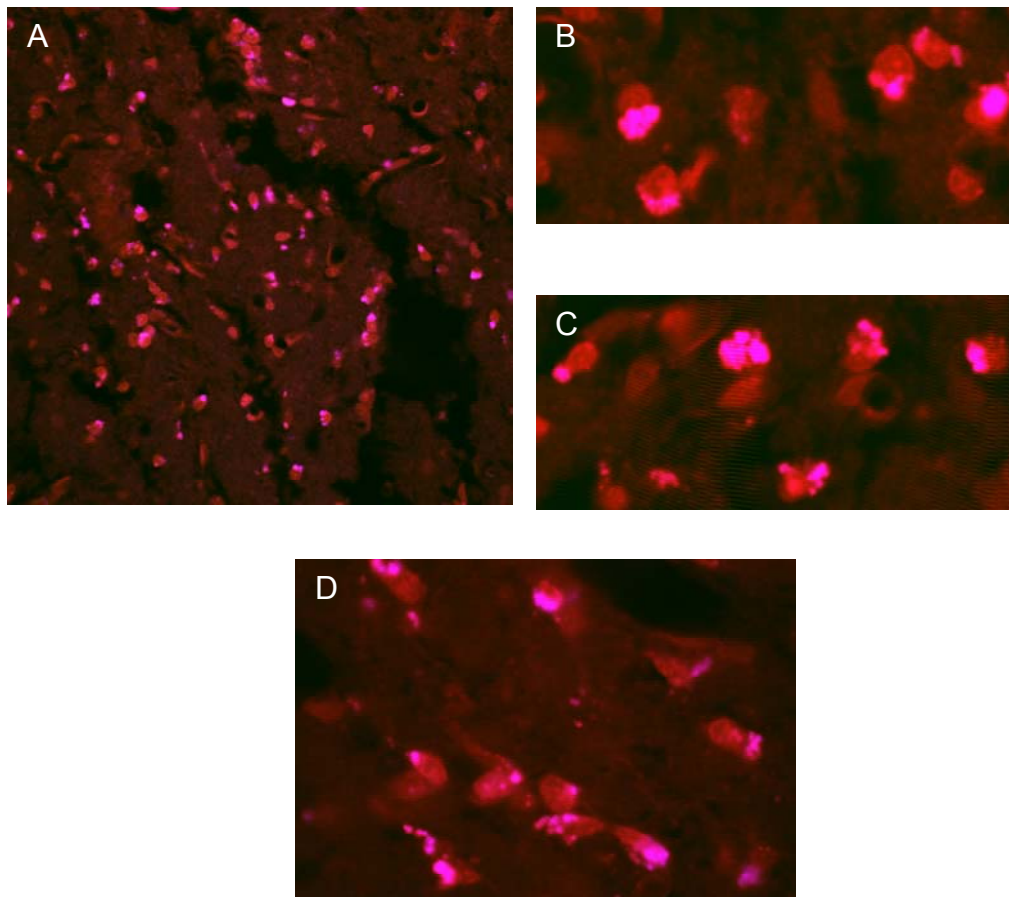


Abb. 33 Proliferation in der Peri-infarkt Zone mit rascher Differenzierung

Proliferierende BrdU-positive Zellen im Kortex (A, B und C) und im Striatum (D), die innerhalb von 9 bis 14 Tagen zu NeuN positiven Nervenzellen ausdifferenzieren.

F Diskussion

F 1 Neuronaler Zelltod nach zerebraler Ischämie

Nach einem Schlaganfall gehen Zellen im Infarktkern nekrotisch zugrunde, während im umliegenden Gewebe (Penumbra), in dem vorübergehend ein Restmetabolismus aufrechterhalten werden kann, der Zelltod apoptotischer Natur ist.

Dieser auch physiologisch auftretende apoptotische oder programmierte Zelltod ist nicht nur für die Aufrechterhaltung einer konstanten Zellzahl in proliferativen Geweben wie der Haut, den Darmepithelien und dem Immunsystem von fundamentaler Bedeutung, sondern spielt auch während der Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems eine entscheidende Rolle. Neuronale Apoptose findet beispielsweise vermehrt zum Zeitpunkt der Synaptogenese statt (Mattson, 2000).

Proteine der Bcl-2 Familie sind sehr wichtige Mediatoren der intrazellulären apoptotischen Signaltransduktion. Sowohl pro- (Bax, Bad und Bid), als auch anti-apoptotische (Bcl-2 und Bcl-X_L) Proteine werden von dieser Genfamilie kodiert. In Bcl-2 überexprimierenden transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass der, unter physiologischen Bedingungen vorkommende, neuronale Zelltod in der Embryonalentwicklung aufgehoben wird und auch nach zerebraler Ischämie eine Überexpression von Bcl-2 protektiv in Erscheinung tritt (Martinou *et al.*, 1994).

Eine vielfache Erhöhung der Apoptoserate in den natürlichen Neurogeneseorten (SVZ, Hippokampus) wurde ebenfalls beschrieben (Biebl *et al.*, 2000). Wenn man sich überlegt, dass täglich zehntausende von Zellen im adulten Säugergehirn neu gebildet werden, verwundert es nicht sehr, dass gleichzeitig auch die Apoptoserate aufgrund der limitierenden und begrenzenden Gegebenheiten im Schädel zunehmen muss. Dieses Zusammenspiel zwischen Neurogenese und Apoptose stellt ebenfalls einen möglichen Ansatzpunkt zur Erhöhung der Neurogeneserate nach zerebraler Ischämie dar. Ganz einfach dadurch, dass man nicht nur versucht die Neurogenese zu verstärken, sondern die Apoptoserate zu vermindern. Genau das wurde in der vorliegenden Arbeit durch die intraarterielle Applikation des Caspase-3 spezifischen Proteininhibitors (z-DEVD.FMK) unternommen. Dabei bewiesen die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse erstmals einen potentiellen therapeutischen Effekt bei Anwendung dieses synthetischen und gegen Caspase-3 gerichteten spezifischen

Inhibitors (z-DEVD.FMK), der über einen lokalen intraarteriellen Zugangsweg appliziert wurde. Der durch z-DEVD.FMK erreichte Grad an Neuroprotektion entsprach der Erfolgsrate anderer Studien, in denen der Caspase-Hemmstoff jedoch intrathekal verabreicht wurde. Das hier vorgestellte Modell erschliesst einen therapeutisch relevanten Applikationsweg für neuroprotektive Substanzen entsprechend der klinischen Situation einer lokalen Applikation im Rahmen einer zerebralen Angiographie.

Unter physiologischen Bedingungen penetrieren synthetische Caspase-Inhibitoren die Blut-Hirn-Schranke (BHS) aufgrund ihrer polaren und hydrophoben Eigenschaften nicht. Die Befunde mit FITC-konjugierten z-DEVD.FMK jedoch belegen, dass das 668D-Peptid bei gestörter BHS-Funktion im ischämischen MCA-Territorium rasch ins Parenchym übertritt und bereits wenige Stunden nach Ischämie in neuronalen und glialen Zellen im Infarktkern und der Penumbra nachweisbar ist (Kapitel E 3).

Daten aus verschiedenen Ischämiemodellen legen nahe, dass Caspase-3-abhängiger (apoptotischer) Zelltod vorwiegend in der ischämischen Penumbra anzutreffen ist, während der Infarktkern unmittelbar nekrotisch zugrunde geht (Fink *et al.*, 1998). In Übereinstimmung damit finden wir unter z-DEVD.FMK-Behandlung - bei bereits signifikant geringeren Gesamt-Infarkt volumina - eine besonders ausgeprägte Reduktion der ischämischen Läsion in Kortex und subkortikalem Marklager. Genau die Bereiche, in denen eine verstärkte Neurogenese detektiert werden konnte (Abb. 31, Kapitel E 5.2.).

Zusammenfassend bestätigen die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse die Befunde früherer Studien zu den Effekten von z-DEVD.FMK in der ischämischen Penumbra und zeigen, dass die einseitige lokale intraarterielle Anwendung des Caspase-Inhibitors ebenso effektiv ist wie dessen intrathekale Verabreichung. Möglicherweise stellt die intraarterielle Applikation auch für andere niedermolekulare neuroprotektive Substanzen einen therapeutisch relevanten Zugangsweg dar.

Für das Schicksal der einzelnen Neurone scheint auch die limitierte Versorgung mit sogenannten neurotrophen Faktoren, die das Überleben und Wachstum von Nervenzellen fördern, sowie die Aktivierung von Rezeptoren des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat bedeutsam zu sein, weil dadurch in der Zelle anti-apoptotische Signalwege aktiviert werden können (Barde, 1994).

Obwohl es wahrscheinlich verschiedene Signalwege gibt, die Apoptose auslösen können, sind bislang nur zwei im Detail untersucht worden. Vereinfacht werden der extrinsische und intrinsische Apoptosesignalweg, zwischen denen es mehrere Querverbindungen gibt, unterschieden (siehe Abb. 34). Während der extrinsische Weg durch die Aktivierung von Zytokinrezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF) – Familie an der Zelloberfläche initiiert wird, hängt der intrinsische Weg von der Integrität und Funktion der Mitochondrien innerhalb der Zelle ab (Reed, 2000).

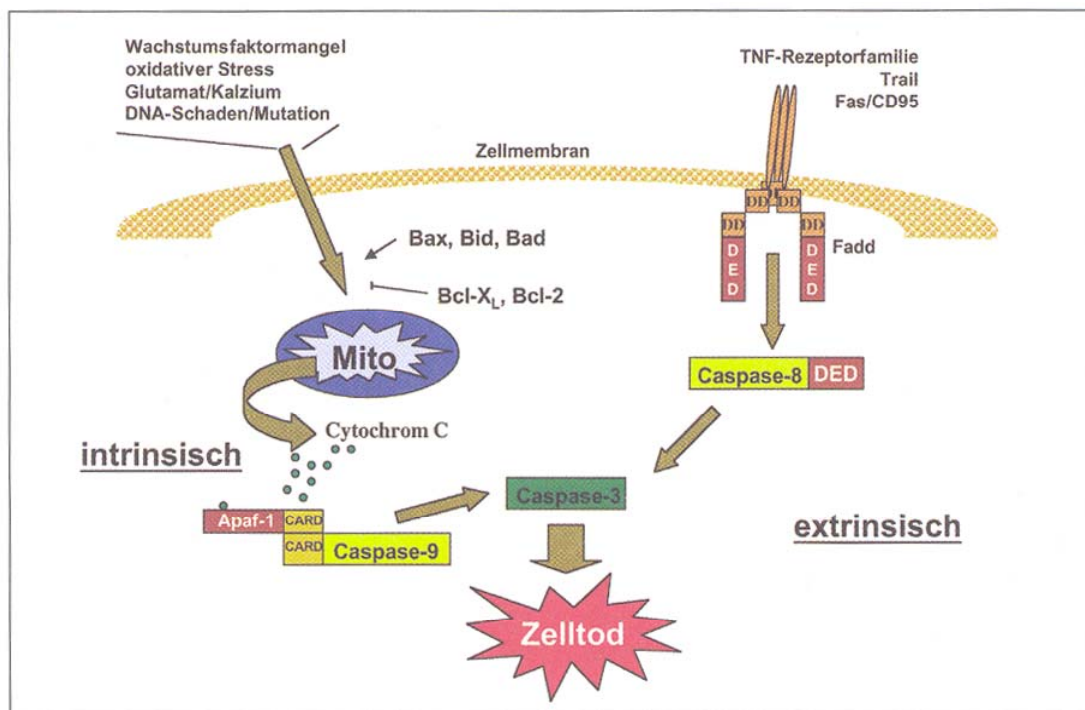


Abb. 34 Signaltransduktion der Apoptose im neuronalen Zelltod

Dargestellt ist die vereinfachte Unterscheidung des intrinsischen und extrinsischen Apoptosewegs. Beide Fälle resultieren in der Aktivierung der Effektorcaspase-3. Während beim intrinsischen Weg die Aktivierung von Caspase-3 mit nachfolgendem Zelltod auf der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und der Aktivierung von der Initiatorcaspase-9 beruht, erfolgt die Aktivierung von Caspase-3 im extrinsischen Apoptoseweg durch die Bindung von Liganden an die Rezeptoren der TNF-Familie und Aktivierung der Initiatorcaspase-8. (aus *Neuroforum* 2/02)

F 1.1. Schlüsselmoleküle der neuronalen Apoptose

Die morphologischen und biochemischen Veränderungen, die man als Apoptose bezeichnet, werden hauptsächlich durch Caspasen (*Cysteine Aspartyl-specific*

proteases), einer Familie von intrazellulären Cysteinproteasen, vermittelt, die ihre Substrate an Aspartat-Resten spalten (Alnemri *et al.*, 1996). Da auch die Aktivierung von Caspasen selbst durch Spaltung an solchen Aspartat-Resten in eine grosse und kleine Untereinheit stattfindet, können sie in proteolytischen Kaskaden neben ihren Substraten, wie zum Beispiel Proteinkinasen, Zytoskelett-, nukleäre Matrix- und DNA-Reparaturproteine, sowohl sich selbst als auch andere Caspasen aktivieren. Heute sind 14 verschiedene Caspasen bekannt, von denen 11 im menschlichen Genom zu finden sind (Reed, 2002). Anhand ihrer unterschiedlich grossen Prodomäne am N-terminalen Ende werden sie in der Regel in vorgeschaltene Initiatorcaspasen und nachgeschaltene Effektorcaspasen unterteilt (Reed, 2000). Während Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-1, -8 und -9) durch ihre langen Prodomänen mit anderen aktivierenden Proteinen interagieren können, haben die kurzen Prodomänen von Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3) bislang keine nachgewiesene Funktion.

Sowohl die extrinsische Initiatorcaspase-8 als auch die intrinsische Initiatorcaspase-9 sind als Initiatorcaspasen des neuronalen Zelltods nach zerebraler Ischämie beschrieben (Velier *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999). Die Initiatorcaspase-8 des extrinsischen Signalweges verfügt am N-Terminus über eine sogenannte *Death-Effektor-Domäne* (DED) durch die sie mit DEDs von anderen DED-Proteinen (bislang 12 bekannt) interagiert und aktiviert werden kann, um selbst wiederum die Effektorcaspase-3 zu spalten und damit zu aktivieren (siehe Abb. 34). Eines dieser DED-Proteine (Fadd) enthält neben der DED eine sogenannte *Death-Domäne* (DD), über die die Interaktion mit den Todesrezeptoren der TNF-Familie vermittelt wird. Die Aktivierung von Caspase-8 in Neuronen nach verschiedenen Todesstimuli, speziell nach fokaler zerebraler Ischämie, ist zwar beschrieben worden (Velier *et al.*, 1999), jedoch wird die Induktion neuronaler Apoptose über Todesliganden und -rezeptoren noch kontrovers diskutiert. Interessanterweise enthält aber der p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor (p75NGFR) eine modifizierte DD (Liepinsh *et al.*, 1997) und seine Aktivierung kann auch Apoptose in Neuronen auslösen (Bredesen *et al.*, 1998). Zusätzlich ist auch eine fehlende Expression des p75NGFR in adulten Neuronen beobachtet worden (Hirsch *et al.*, 2000), so dass berücksichtigt werden muss, dass sich entwicklungsabhängige und krankheitsrelevante Induktionswege voneinander unterscheiden können. Heute kennt man zwei verschiedene extrinsische apoptotische Signalwege, die nach Bindung des Liganden NGF, an

seinen Rezeptor TrkA ablaufen. Dabei kommt es zur Autophosphorylierung eigener Tyrosin-Reste im zytoplasmatischen Teil des Oberflächenrezeptors TrkA. Diese Phosphotyrosine ihrerseits wirken als Docking-Station für andere Moleküle wie z.B. Phospholipase C, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und anderen Adaptorproteinen wie Shc, die eine anschließende Signaltransduktion zum Überleben von Nervenzellen koordinieren. Ganz gleich, ob die ausreichend im Zytosol vorkommende PI3K an die phosphorylierten Tyrosin-Reste bindet und die Aktivierung der Serin/Threonin Kinase AKT induziert, oder Shc an den phosphorylierten Tyrosin-Resten andockt und durch die Bindung kleiner GTP-bindender Proteine (Ras), die nachfolgende sogenannte MAP-Kinase-Kaskade (Ras-Raf-MEK-MAPK-Rsk) aktiviert, kommt es letztendlich zur Phosphorylierung von Bad und damit zur Inaktivierung der Apoptose und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP-response-element-binding protein*), der die Transkription überlebensrelevanter Gene induziert (z.B. Bcl-2). Dabei unterstützen sich die beiden Signalwege gegenseitig, um den protektiven Effekt zu verstärken.

Wissenschaftlich etabliert hingegen ist die Relevanz des intrinsischen Signaltransduktionsweges für die neuronale Apoptose durch zahlreiche Knock-out Studien (Yuan and Yankner, 2000). Das wohl wichtigste Schlüsselmolekül des intrinsischen Apoptosewegs im Säuger, ist das zum Zelltodgen (CED 4) im Nematoden *C. elegans* homologe *apoptotic protease-activating factor-1* (Apaf-1), das nach mitochondrialen Schäden, apoptotische Signale zur Aktivierung von Caspasen transmittiert. Dazu bildet dieses Adapterprotein Apaf-1 mit dem aus den geschädigten Mitochondrien freigesetztem Cytochrom C und Caspase-9 einen Komplex (Apoptosom), der zur Aktivierung der pro-Caspase-9 führt. Zur Komplexbildung kommt es durch die sogenannte *caspase associated recruitment domain* (CARD-Domäne), die sowohl in Apaf-1 als auch in Caspase-9 vorhanden ist (Qin *et al.*, 1999). Diese aktivierte Caspase-9 wiederum aktiviert Caspase-3. Die Unverzichtbarkeit von Apaf-1 für die Apoptose neuronaler Stammzellen ist in Apaf-1-defizienten Mäusen gezeigt worden (Cecconi *et al.*, 1998). Das Fehlen von Apaf-1 führte durch ausbleibende Apoptose zu einer markanten Vergrößerung der proliferativen subventrikulären Zone und zum Tod dieser Mäuse in der späten embryonalen Entwicklung.

Die Aktivierung der Effektorcaspase-3 beim neuronalen Zelltod nach zerebraler Ischämie wird als entscheidender Punkt in der Signalkaskade des programmierten Zelltods diskutiert (Velier *et al.*, 1999; Fink *et al.*, 1998; Dirnagl *et al.*, 1999).

Mit dem Ziel, einen auch auf die klinische Situation der akuten Schlaganfallversorgung übertragbaren Applikationsweg zu erschliessen, konnte in dieser Arbeit die Wirksamkeit einer lokalen intraarteriellen Gabe des spezifischen Caspase-3-hemmenden Tetrapeptids z-DEVD.FMK nach experimenteller fokaler zerebraler Ischämie in der Ratte gezeigt werden, wobei sich die Infarktgrösse vor allem durch die Erhaltung von Kortex und subkortikalem Marklager in der Penumbra des MCA-Territoriums um ca. 75 % reduzierte.

F 2 Inflammation im ischämischen Gehirn

Die Inflammation spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der zerebralen Ischämie und des damit einhergehenden sekundären Zelltods (Barone and Feuerstein, 1999). Wenige Stunden nach einer zerebralen Ischämie ist eine Aktivierung glialer und peripherer inflammatorischer Zellen zu beobachten, vor allem Mikroglia sind bereits nach wenigen Minuten detektierbar (Morioka *et al.*, 1991). Diese können in wenigen Tagen zu Makrophagen transformieren um pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , INF γ , IL-1) auszuschcheiden, die wiederum benachbarte Nervenzellen gefährden können (Giulian *et al.*, 1994). Die Aktivierung dieser Mikroglia ist jedoch streng kontrolliert und soll vor der Transformation zu Makrophagen neuroprotektiver Natur sein (Banati and Graeber, 1994). Zusätzlich ist eine Infiltrierung des Infarktgebietes nach einer zerebralen Ischämie aufgrund der vorübergehend permeablen Blut-Hirn-Schranke mit Neutrophilen und Monozyten aus dem Blut zu beobachten (Kochanek and Hallenbeck, 1992). Den auch als Gehirnmakrophagen bezeichneten Mikroglia wird eine entscheidende Rolle in der Verteidigung des zentralen Nervensystems auch gegen Mikroorganismen nachgesagt und in der Beseitigung zellulärer Abfälle (z.B. *apoptotic bodies*) während der physiologischen Entwicklung oder auch in neurodegenerativen Erkrankungen (Zielasek and Hartung, 1996). Kultivierte Mikroglia zeigten nach Zugabe verschiedener inflammatorischer Mediatoren, wie zum Beispiel löslicher Zytokine, aber auch bakterieller Produkte wie Lipopolysaccharide (LPS), die Induktion mehrerer mikroglialer Aktivitäten, wie zum Beispiel eine zunehmende Phagozytose,

Chemotaxis, Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL) und die Induktion von Stickstoffmonoxid-Synthetasen (NOS). Eine Inhibierung des ischämischen Zelltods durch Administration eines IL-1 Rezeptorantagonisten, der einen natürlich vorkommenden Inhibitor im Gehirn darstellt, ist ebenfalls beschrieben (Del Zoppo *et al.*, 2000). Iadecola und Kollegen konnten sogar eine Reduzierung des Infarktvolumens nach einer fokalen zerebralen Ischämie zeigen, wenn sie 24 Stunden nach der Ischämie Aminoguanidin verabreichten, und somit die induzierbaren NOs (iNOS) verminderten (Nagayama *et al.*, 1998). Aktivierte Astrozyten exprimieren intermediale Filamente, synthetisieren Neurotrophine, die das Wachstum axonaler Fortsätze von Nervenzellen fördern, und bilden gliale Narben (Stoll *et al.*, 1998). Es kommt zur Hochregulation von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interleukin 1-beta (IL-1 β) im Infarktkern, die ihrerseits die Aktivierung von Mikroglia unterstützen. Diese verstärkte IL-1-Expression aktivierter Mikroglia steht auch im Verdacht, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der erblich bedingten Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) zu spielen. Diese Erkrankung ist durch eine progressive Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark und im Gehirn charakterisiert und führt zur Paralyse. Die Lokalisation einer Mutation im Superoxid-Dismutase-1 Gen (SOD-1) ist dabei von grosser Bedeutung (Rosen *et al.*, 1993). Transgene Mäuse, die mutierte Formen von SOD-1 exprimieren, zeigten einerseits einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie im Menschen, der durch eine progressive Degeneration von Motoneuronen charakterisiert ist. Andererseits entwickelten Mäuse, die defizient für oder durch eine Überexpression von Wildtyp-SOD-1 charakterisiert waren, keine Krankheit (Cleveland, 1999). Diese Ergebnisse unterstellen den mutierten Formen von SOD-1 einen neurotoxischen Charakter. Der Mechanismus dieser Toxizität ist bis heute nicht bekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass diese mutierten Formen von SOD-1 neuronale Aggregate ausbilden, die oxidativen Stress induzieren können (Cleveland, 1999). Die Rolle der Apoptose in erblich bedingter ALS konnte durch eine pro-apoptotische Aktivität dieser mutierten Formen von SOD 1 in kultivierten neuronalen Zelllinien gezeigt werden (Pasinelli *et al.*, 1998). Der neuroprotektive Effekt durch Überexpression von anti-apoptotischem Protein Bcl-2 wurde in transgenen Mäusen, die eine mutierte Form von SOD-1 exprimieren, bestätigt (Kostic *et al.*, 1997). Darüber hinaus können aktivierte Caspase-1 und -3 im Rückenmark von ALS-Patienten detektiert werden (Pasinelli *et al.*, 1998). Auffällig ist,

dass durch Inhibierung der Caspase-1 Aktivität in diesen transgenen Mäusen die Progression der Krankheit verlangsamt werden kann (Friedlander *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000). Zwei Möglichkeiten, wie Caspase-1 den neuronalen Zelltod dieser Motoneurone in der ALS induziert, sind denkbar: Entweder durch eine zunehmende Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1, das wiederum Mikroglia aktiviert, die ihrerseits toxische Faktoren ausscheiden um Caspase-3 zu aktivieren oder eine direkte Induktion von Caspase-3 durch Caspase-1.

Einen weiteren zytoprotektiven Ansatz stellt die Inhibierung der Adhäsion von Leukozyten an die Blutgefäße im ischämischen Gewebe dar. Nicht nur nimmt dadurch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine ab, sondern auch eine zusätzliche mikrovaskuläre Okklusion anderer Blutgefäße wird verhindert bzw. verringert (Lee *et al.*, 2000).

Einerseits sorgen inflammatorische Prozesse durch die Aktivierung der sogenannten Mikroglia/Makrophagen für eine Verbesserung der Situation im Infarktkern durch die Beseitigung von Zellresten, die durch den apoptotischen Untergang der Zellen entstehen, oder für die nachfolgende Angiogenese notwendige Wachstumsfaktoren ausscheiden, andererseits ist jedoch bis heute nicht geklärt, ob die negativen Einflüsse der Inflammation diese protektiven Eigenschaften überwiegen oder umgekehrt.

Aufgrund der Tatsache, dass TGF- β ein stark immunsuppressives Zytokin ist, das auch einen entscheidenden Anteil an der Wundheilung hat und seine Expression nach Ischämie hochreguliert wird, wurde die Rolle des transformierenden Wachstumsfaktor-beta in dieser Arbeit genauer untersucht.

F 2.1. Die Rolle des transformierenden Wachstumsfaktor-beta (Tgf- β) für die Inflammation nach Ischämie.

Für das pleiotrophe und anti-inflammatorische Zytokin TGF- β sind einige widersprüchliche Eigenschaften nach Ischämie beschrieben. So ist es sowohl für eine zunehmende, aber auch eine abnehmende neuronale Verletzbarkeit nach Glutamat-induzierter Exzitotoxizität verantwortlich (Prenn and Kriegelstein, 1994). Eine Aktivierung und Inaktivierung von Makrophagen durch TGF- β ist beschrieben (Hurwitz *et al.*, 1995), und die Expression von neurotrophen Faktoren, wie zum Beispiel des Nervenwachstumsfaktors (NGF) oder des basischen

Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF) in Astrozyten wird durch TGF- β induziert (Mattson and Cheng, 1993), während die astrozytäre Proliferation und die Formation von glialem Narbengewebe vermindert wird (Lindholm *et al.*, 1992; Logan *et al.*, 1994).

Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die eine protektive Wirkung von TGF- β *in vivo* bestätigen. Die Infarktgrösse nach einer zerebralen Ischämie konnte im Tierexperiment durch Administration von TGF- β reduziert werden (Henrich-Noack *et al.*, 1994). Eine aktuelle Studie von Krieglstein und Kollegen belegt, dass die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Bad-Proteins der Bcl-2 Familie und die dadurch reduzierte Bad-Expression nach fokaler zerebraler Ischämie, in der Maus neuroprotektiv wirkt (Zhu *et al.*, 2002). Ausserdem konnte dieselbe Arbeitsgruppe eine Assoziation der Bad-Phosphorylierung (intrinsischer Apoptoseweg) und der in F 1.1. erwähnten MAP-Kinase-Kaskade (extrinsischer Apoptoseweg) in hippokampalen Primärkulturen nach Apoptoseinduktion zeigen. Die Protektion der besonders vulnerablen Nervenzellen der CA-1 Region im Hippokampus nach einer globalen Ischämie ist ebenfalls durch TGF- β möglich (Henrich-Noack *et al.*, 1996). Und auch eine reduzierte Adhäsion von Neutrophilen und Lymphozyten an Endothelzellen durch TGF- β ist beschrieben (Gamble *et al.*, 1993). TGF- β 1 mRNA und -Protein werden im zentralen Nervensystem adulter Ratten konstitutiv exprimiert und translatiert (Unsicker *et al.*, 1991; Lehrmann *et al.*, 1995), und bereits wenige Stunden nach transienten Episoden einer globalen zerebralen Ischämie kommt es zur Induktion von TGF- β 1 mRNA in Mikroglia und Gehirnmakrophagen (Lehrmann *et al.*, 1995; Wiessner *et al.*, 1993). Auch eine direkte Inhibierung der Caspase-3 Aktivierung durch TGF- β 1 und der damit einhergehenden neuronalen Apoptose in primären hippokampalen Kulturen ist beschrieben (Zhu *et al.*, 2001). Krupinski und Kollegen (1996) konnten eine zunehmende Expression von TGF- β 1 nach einer Ischämie auch im Gehirngewebe beim Menschen nachweisen.

Aufgrund der Datenlage in der Literatur und den vorangegangenen Untersuchungen zur vorübergehenden Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke im Kapitel E 1, in dem die Nutzbarkeit der reversiblen Störung dergleichen für die intraarterielle Applikation kleiner Antisense-Oligonukleotid-Moleküle sofort mit Reperfusion nach einer transienten zerebralen Ischämie gezeigt werden konnte, und mit der gewonnenen Erkenntnis der gezielten Aufnahme der FITC-markierten Antisense-Oligonukleotide von Nervenzellen in der Penumbra, wurde versucht, durch die Modulation des TGF- β

Signalweges mittels Smad7-Antisense-Oligonukleotiden, die resultierende Infarktgrösse nach einer fokalen Ischämie durch die Verstärkung des Signalweges von TGF- β zu reduzieren. Eine Abnahme des Infarktvolumens zu beiden Zeitpunkten (Tag 7 und 3 Monate nach Ischämie) wurde MRT-volumetrisch bestimmt. Dabei bestätigte sich diese Annahme. Eine deutliche Reduktion der Infarktgrösse von 1,18 cm³ (1,36 cm³) für die unbehandelten Tiere auf 0,49 cm³ (0,6 cm³) in der Gruppe der mit Smad7-Antisense behandelten Tiere war am Tag 7 (3 Monate) nach Ischämie zu beobachten. Dies entspricht einer 59%igen (56%igen) Reduzierung der Infarktgrösse am Tag 7 (3 Monate) nach Ischämie (Abb. 27 in Kapitel E 4.2.1.). Durch die intraarterielle Applikation von Antisense-Oligonukleotiden gegen das mediatorische Smad4 wurde kein protektiver Effekt erzielt, was darauf zurückzuführen ist, dass dadurch die Signalkaskade von TGF- β inhibiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte durch die Inhibierung des inhibitorischen Smad7 durch die Antisensebehandlung eine Verstärkung des Signalweges induziert werden. Damit ist die neuroprotektive Wirkung von TGF- β *in vivo* eindeutig. Der von Zhu und Kollegen (2002) beschriebene unmittelbare Zusammenhang zwischen TGF- β 1 und phosphoryliertem Bad-Protein (apoptosehemmend) für die Neuroprotektion nach fokaler Ischämie in der Maus wird zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe in der Ratte untersucht. Auch In-vitro-Untersuchungen konnten die Nutzbarkeit dieser neuen Substanzklasse der Antisense-Oligonukleotide belegen. Greenberg und Kollegen konnten einen direkten Zusammenhang der Expression von Caspase-3 in kultivierten kortikalen Nervenzellen aus der Maus nach Hypoxie und dem unter physiologischen Bedingungen protektiven Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) zeigen (Jin *et al.*, 2001). Die Expression von Caspase-3 in diesen Kulturen nahm nach Antisense-Behandlung gegen VEGF um 38 % zu. Schaut man sich die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse aus den In-vitro-Untersuchungen zur Apoptose an, ist zu erkennen, dass TGF- β proliferationshemmend wirkt und die Apoptoserate durch die Modulation des Signalweges von TGF- β reduziert werden kann. Dies konnte durch die reduzierte Apoptoserate in PC 12-Zellen durch Antikörperbehandlung (Abb. 24) und mit Smad4-Antisense (Abb. 25) in Kultur gezeigt werden (siehe Kapitel E 4.1.3.). In beiden Fällen wird die Inhibition der Expression von TGF- β induziert und die Apoptoserate deutlich reduziert.

Erste klinische Prüfungen hier in Regensburg, es existieren bereits klinische Phase-I-Studien zur Therapie maligner Gliome mit TGF- β Antisense-Oligonukleotiden,

verdeutlichen die Relevanz und Akzeptanz dieser neuen Substanzklasse. Auch werden Antisense-Oligonukleotide gegen Proteine der anti-apoptotischen Bcl-2 Familie in der Bekämpfung von Melanomen eingesetzt (Heere-Ress *et al.*, 2002). Die Reduzierung dieser anti-apoptotischen Proteine (Abbau der Apoptoseresistenz) durch die Antisensebehandlung machen die Melanome wieder empfänglicher für Zytostatika und heben die Chemoresistenz maligner Melanome auf.

F 2.2. Expression von Matrix-Metalloproteinasen während der Inflammation nach Ischämie.

Nicht nur nach Durchblutungsstörungen, sondern auch unter andersartig induzierten inflammatorischen Bedingungen, degradieren Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) die extrazelluläre Matrix des zentralen Nervensystems (ZNS) (Lukes *et al.*, 1999). Die Störung der Blut-Hirn-Schranke nach zerebraler Ischämie weist zwei Phasen auf (Belayev *et al.*, 1996). Die frühe Phase der vorübergehend permeablen Blut-Hirn-Schranke ist mit MMP 2, auch als Gelatinase A bekannt, assoziiert, während MMP 9, auch Gelatinase B genannt, erst nach einer sekundären Schädigung der Blut-Hirn-Schranke hochreguliert wird (Rosenberg *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 1999). Studien zur Lokalisation von MMPs zeigten, dass MMP 2 und 9, die bei der Inflammation nach zerebraler Ischämie von grosser Bedeutung sind, von Astrozyten, Nervenzellen und Mikroglia/Makrophagen exprimiert werden (Planas *et al.*, 1998). Zeitlich korreliert diese Expression der beiden MMPs, 2 und 9, mit der Inervierung von Mikroglia und Makrophagen im Infarktgebiet. Die Expression ist nach 4 Tagen maximal und die Inervierung hält bis zu 4 Wochen an (Planas *et al.*, 1998).

Auch für die Invasion von Tumorzellen durch die Zerstörung der Basalmembran werden MMPs verantwortlich gemacht. Zusätzlich wird ihnen eine sehr wichtige Rolle für das Überleben der Tumorzellen durch die Schaffung und Erhaltung vorteilhafter Bedingungen im umliegenden Gewebe nachgesagt (Wick *et al.*, 2001). Die Invasion von malignen Gliomen (Gehirntumore) erfordert eine Infiltrierung des Gewebes, eine Angiogenese und die Suppression des Immunsystems. Alle diese Prozesse werden sehr stark von TGF- β mitreguliert (Platten *et al.*, 2001). Dabei reguliert TGF- β die Migration von Gliomzellen durch einen Prozess, der wahrscheinlich die Hochregulierung der $\alpha_v\beta_3$ Einheit von Integrin bedingt (Platten *et al.*, 2000). Von TGF- β ist auch bekannt, dass es die Expression von *tissue inhibitor of*

metalloproteinases (TIMP) induziert und somit den deletären Effekt der MMPs unterbinden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, durch einen neuen, synthetischen und spezifischen MMP-2/-9 Inhibitor (siehe C 1.4.), die Infarktgrösse nach transienter zerebraler Ischämie zu reduzieren. Anders als im Ansatz mit dem spezifischen Caspase-3 Inhibitor (75 %ige Reduktion im Kortex) konnte keine Reduzierung der Infarktgrösse nach der intraarteriellen Applikation des MMP-2/-9 Inhibitors erzielt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine weniger gute Penetration des Inhibitors durch die Blut-Hirn-Schranke sein. Denkbar wäre auch, dass die Konzentration nicht hoch genug gewählt wurde, obgleich sie verdoppelt wurde. Die pharmakokinetische Untersuchung des Inhibitors, in der Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht, ergab einen um den Faktor 20 erhöhten Blutplasmaspiegel von MMP-9 (Abb. 9 in Kapitel E 2) nach 24 Stunden. Der Inhibitor wurde daraufhin mit 10 mg/kg Körpergewicht *in vivo* eingesetzt, dennoch konnte keine Protektion erzielt werden. Eine andere denkbare Erklärung für die ausbleibende Protektion mag die Überkompensation negativer Einflüsse über die protektiven Einflüsse darstellen. In den ersten 30 Minuten nach Reperfusion könnte die intraarterielle Applikation sehr hohe Konzentrationen des Inhibitors in der Penumbra zur Folge haben, die evtl. toxisch wirken. Eine letzte mögliche Erklärung für das Ausbleiben der protektiven Wirkung durch den MMP-2/-9 Inhibitor mag durch veränderte pathophysiologische Bedingungen nach intraarterieller Applikation gegeben sein.

Zu den Ergebnissen der neurologischen Untersuchungen muss gesagt werden, dass die unterschiedlichen Gruppen mit nur 2 Tieren pro Gruppe vielleicht etwas zu klein gewählt wurden, was die Interpretation erschwert. Ausserdem liegen die Werte der neurologischen Untersuchungen (Abb. 14 in Kapitel E 2) so dicht beieinander, dass keine Verbesserung der motorischen Fähigkeit in mit Inhibitor behandelten Tieren erkennbar war. Lediglich ein Trend zur abnehmenden Mortalität in den beiden Gruppen der mit Inhibitor behandelten Tiere (niedere und höhere Konzentration) wurde beobachtet.

F 3 Neurogenese im Gehirn adulter Säuger

Das Dogma, dass Neurogenese ein Prozess sei, der sich auf die Embryonalentwicklung konzentrierte, bis zum zweiten oder dritten Monat nach der

Geburt abgeschlossen sei und im Erwachsenenalter nicht mehr stattfindet, ist heute eindeutig widerlegt, und dadurch bedingt ist die Neurogenese in den letzten Jahren in das Zentrum grossen wissenschaftlichen Interesses gerückt. Während der Entwicklung des ZNS differenzieren proliferative, sich selbst reproduzierende Zellen (Stammzellen), zu einer Vielzahl von Nervenzellen und Gliazellen. Man nimmt an, dass das endgültig ausgebildete Gehirn eines Menschen aus 10^{11} (Hundert Milliarden) Zellen besteht.

Nachdem ursprünglich Altman und Das bereits 1965 das Phänomen postnataler Neurogenese in neugeborenen und Kaplan und Hinds 1977 in jungen Ratten beschrieben haben, konnten Nottebohm und Mitarbeiter Mitte der achtziger Jahre erstmals die Neubildung von Nervenzellen im erwachsenen Gehirn an Kanarienvögeln nachweisen (Goldman und Nottebohm, 1983; Alvarez-Buylla und Nottebohm, 1988). In den letzten zehn Jahren gelang es insbesondere den Arbeitsgruppen um Gage und Gould, Neurogenese im adulten Säugergehirn näher zu charakterisieren (Suhonen *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1996; Gould *et al.*, 1999). Im Jahr 1998 gelang es Eriksson und Mitarbeitern nachzuweisen, dass auch im humanen Hippokampus noch im höheren Erwachsenenalter Neurogenese stattfindet. Im Gehirn adulter Säuger ist diese Neubildung von Nervenzellen unter physiologischen Bedingungen in zwei ganz bestimmten Regionen lokalisiert. Zum einen handelt es sich um die subgranuläre Zellschicht des Gyrus dentatus im Hippokampus und zum anderen ist die subependymale Schicht der Seitenventrikel daran beteiligt (Luskin, 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1993, 1994; Zhang *et al.*, 2001).

F 3.1. Neurogenese unter modifizierten äusseren Bedingungen

Diese unter physiologischen Bedingungen zu beobachtende Neurogenese im erwachsenen Säugergehirn, von der inzwischen bekannt ist, dass sie unter anderem Alters- (Kuhn *et al.*, 1996), Östrogen- (Tanapat *et al.*, 1999) und Kortikoid-abhängig (Cameron *et al.*, 1994) ist, lässt sich durch bestimmte Versuchsanordnungen modifizieren. Unter anderem haben Gould *et al.*, sowie Kempermann *et al.*, zeigen können, dass Stress den physiologischen Prozess der Zellerneuerung hemmen kann und stimulierende Umweltreize sowie freiwilliges oder forciertes Laufen („*voluntary or*

forced running“) ihn fördern können (Gould *et al.*, 1998; Kempermann *et al.*, 1997; Kempermann *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1999; van Praag *et al.*, 1999).

F 3.2. Neurogenese in verschiedenen zerebralen Läsionsmodellen

Neben umweltkorrelierten äusseren Reizen ist es mittlerweile wissenschaftlich etabliert, dass auch zerebrale Schädigungen zu einer Modifizierung der Neurogenese führen. In einem Tiermodell der Epilepsie zeigten Parent *et al.*, (1997), dass prolongierte epileptische Anfälle mit einer Stimulation der Neurogenese einhergehen. Ebenso kann, nach exzitotoxisch oder traumatisch hervorgerufenen Läsionen, eine Zunahme neuronaler Proliferation im erwachsenen Säugerhirn beobachtet werden (Gould und Tanapat, 1997). Eine erhöhte Neurogeneserate konnte auch durch globale zerebrale Ischämie im Hippokampus des Gerbil (mongolische Wüstenspringmaus) nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 1998). Diese verstärkte Proliferation neuronaler Stammzellen unter pathophysiologischen Bedingungen (Ischämie) ist zusätzlich in der Maus beschrieben (Takagi *et al.*, 1999). Sämtliche Studien beschreiben jedoch lediglich die Proliferation von Stammzellen oder eine verstärkte Neurogeneserate granulärer Zellen im Gyrus dentatus. Hingegen findet man keine Produktion von Nervenzellen in den vulnerablen Regionen des Hippokampus (CA1-CA4) oder im Kortex. Das von Liu *et al.*, (1998) und Kollegen gewählte Modell der globalen Ischämie bedingt den Zelltod pyramidaler Nervenzellen beider Hemisphären. Es verwundert daher nicht, dass es dadurch zur Proliferation in beiden bekannten Orten der Neurogenese, im Gyrus dentatus des Hippokampus und der subventrikulären Zone beider Hemisphären kommt.

In dem von uns gewählten Modell der fokalen Ischämie ist zwar nur eine Hemisphäre betroffen, trotzdem beobachteten wir nicht nur in der läsionierten, ischämischen Hemisphäre Proliferation neuronaler Stammzellen, sondern auch in der kontralateralen, nicht ischämischen Hemisphäre (siehe Abb. 30 in E 5.1.). Es ist bekannt, dass die Proliferationsrate nach globaler Ischämie im Gerbil in der zweiten Woche, genauer zwischen dem 9. und 11. Tag, maximal ist (Sharp *et al.*, 2002).

Nur sehr wenige Berichte in den letzten Jahren konnten das Phänomen der kortikalen Neurogenese beschreiben (Gu *et al.*, 2000). Wester und Kollegen zeigten, dass ein photothrombotischer Gefässverschluss in der somatosensorischen Region des Kortex in adulten Ratten zu einer Proliferation von neuronalen Stammzellen in

dieser Region führt. Ebenso konnte neuronale Proliferation durch eine induzierte photolytische Läsion in der Grosshirnrindenschicht adulter Mäuse beobachtet werden (Magavi *et al.*, 2000). Hier konnte nicht nur die Genese neuer Nervenzellen nachgewiesen werden, sondern auch, dass neu generierte Nervenzellen axonale Fortsätze in ihr Zielgebiet, den Thalamus, ausbildeten. Diese Tatsache ist von grosser Bedeutung, wird doch die Fähigkeit neugebildeter Nervenzellen, sich in ein intaktes Netzwerk einzugliedern und funktionelle Verbindungen zu bilden, in der Fachwelt noch bezweifelt.

Eine immer stärker aufkommende Diskussion in der Literatur versucht die Herkunft dieser Stammzellen nach Ischämie zu ermitteln. Bis vor kurzem ging man davon aus, dass diese proliferierenden Zellen aus den bisher bekannten Orten der unter physiologischen Bedingungen vorkommenden Neurogenese, dem Gyrus dentatus im Hippokampus und der subventrikulären Zone, bei zerebraler Ischämie in die Penumbra migrieren.

Der physiologische Vorgang der Neurogenese ist für die subependymalen Stammzellen, die die Seitenventrikel umgeben, so beschrieben, dass sie über den rostralen migratorischen Strom (RMS) in den Bulbus olfactorius migrieren, wo sie zu reifen Nervenzellen ausdifferenzieren (Lois and Alvarez-Buylla, 1993, 1994; Luskin, 1993). Die Migration und die anschliessende Differenzierung im Riechkolben dauert mindestens 12-14 Tage. In den Abb. 33 A-D (E 5.2.) sind neu gebildete Nervenzellen dargestellt, die zwischen 9 und 14 Tage alt sind. Theoretisch könnten sie auch aus der subventrikulären Zone stammen. Wenn dem so wäre, dann müssten jedoch bei der konfokalen Mikroskopie BrdU-positive Zellen zwischen der subventrikulären Zone (SVZ) und der Penumbra detektierbar sein, die eine Migration dieser neu gebildeten Zellen von ihrem Entstehungsort, der SVZ, hin zu ihrem Bestimmungsort, der Penumbra, erkennen lassen. Das ist jedoch nicht der Fall. Auch ist dieses Phänomen in der Literatur noch nicht beschrieben.

Die zweite denkbare Herkunft der proliferierenden Zellen in der Penumbra könnten zirkulierende hämatogene Stammzellen sein. Der bedeutsamste Befund in diesem Zusammenhang ist - wie von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt - dass auch aus anderen Bereichen des Gehirns (z.B. Kortex), neben der subventrikulären Zone und dem Gyrus dentatus, isolierte Stammzellen sich *in vitro* zu den drei überwiegend im Gehirn vorkommenden Zelltypen, Nervenzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten, ausdifferenzieren lassen (Palmer *et al.*, 1999). Die Möglichkeit, dass auch im Kortex

ortsständige Stammzellen vorhanden sind, die bei Bedarf proliferieren, aber auch die generelle Lokalisation von vermeintlichen Stammzellen im gesamten Gehirn wird zur Zeit sehr stark in der Literatur diskutiert. Die in dieser Arbeit gezeigte Differenzierung neugebildeter Zellen bereits 9-14 Tagen nach einer Ischämie, unterstützt diese These.

Zusätzlich bestätigen Ergebnisse aus immunhistochemischen Untersuchungen, die im Einklang mit aktuellen Ergebnissen der Arbeitsgruppen Wester (persönliches Gespräch) (Gu *et al.*, 2000) und Chopp (Lu *et al.*, 2001) stehen, eine deutliche Stimulierung der Neurogenese im Schlaganfallmodell der Ratte nicht nur in Hippokampus (siehe Abb. 30 in E 5.1.) und subventrikulärer Matrix (Jin *et al.*, 2001), sondern auch in der Peri-Infarkt Zone (siehe Abb. 31 und 33 in E 5.2.).

Zusammengefasst legen diese Ergebnisse ein endogenes Regenerationspotential des adulten Säugergehirns nach unterschiedlichen Schädigungen nahe. Unbeantwortet sind bislang Fragen zur klinischen Relevanz dieser Phänomene und nach Möglichkeiten, dieses regenerative Potential zu fördern.

F 4 Transplantation embryonaler, adulter neuronaler oder hämatopoetischer Stammzellen als Therapieansatz nach neurodegenerativen Erkrankungen

Aufgrund der immer schneller ansteigenden Anzahl von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen ist eine dringliche Notwendigkeit für die Entwicklung geeigneter Therapiekonzepte unabdingbar. Begründete Hoffnungen liegen im Ausblick auf die Entwicklung neuronaler Stammzelltherapien. Jedoch ist trotz intensiver Forschung die Stammzelltherapie für Erkrankungen des ZNS noch in weiter Ferne. Effektive Strategien müssen entwickelt werden, die eine Isolierung, Anreicherung und Propagierung homogener Populationen neuronaler Stammzellen (NSC) ermöglichen. Die Identifizierung relevanter Moleküle und Mechanismen für die funktionelle Integration von NSC in läsioniertes Gewebe sind noch weit gehend unerforscht.

Das Problem der Regeneration zerstörten Gewebes in verschiedenen Organen und unterschiedlichen Individuen ist mehrschichtig: Zum einem müssen absterbende Zellen erneuert werden, neu entstandene Zellen müssen zunächst zu dem jeweilig erforderlichen Zelltyp ausdifferenzieren und schliesslich in ein Netzwerk eingebunden

werden, um die Originalstruktur des verletzten Gewebes wiederherzustellen (Rossi and Cattaneo, 2002). Primär hängt die Regenerationsfähigkeit eines Gewebes oder Organs von seinem intrinsischen Potential ab, Zellen zu ersetzen. Das bedeutet, dass in Geweben, die einen grossen Zellumsatz aufweisen, die Reparationsfähigkeit oder Erneuerungsrate effizienter ist als in Geweben, die für die Rekonstruktion eines bestimmten Musters verantwortlich sind. Zum Beispiel können Hautwunden länger anhaltende Narben nach sich ziehen, ihre funktionelle Wiedergewinnung jedoch ist in wenigen Wochen wiederhergestellt (Rossi and Cattaneo, 2002).

Das ZNS im adulten Säuger hingegen hat nur eine begrenzte Fähigkeit zur endogenen Zellerneuerung und Wiederherstellung der Struktur durch die Ausbildung neuer axonaler Fortsätze über grössere Entfernungen, die beide zusammen essentielle Prämissen für die Wiedergewinnung der Funktionalität darstellen. Die Zelltransplantation ist ein vielversprechender Ansatz, diese nur sehr begrenzt vorhandene endogene Fähigkeit des ZNS zu umgehen, um zerstörte oder untergegangene Strukturen nach unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen zu ersetzen. Was muss also eine erfolgsversprechende neuronale Stammzelle für besondere Fähigkeiten besitzen um dieses hochgesteckte Ziel zu realisieren?

Allein die Fähigkeit sich zu teilen und sich an spezifische phänotypische Merkmale zu adaptieren garantiert nicht, dass nach einer Transplantation diese Zellen sich in dem empfangenden Gewebe miteinbeziehen lassen. Komplexe Entwicklungsprozesse, wie die Migration und Ausbildung axonaler Fortsätze über grössere Entfernungen stellen eine grössere Herausforderung an diese NSC. Zusätzlich müssen diese Donorzellen die vorhandenen unterschiedlichen pathologischen Bedingungen in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen verkraften und bewältigen. Der vielleicht grösste Nachteil in diesem Zusammenhang stellt die Isolierung adulter neuronalen Stammzellen aus dem Säugergehirn dar. Man stelle sich vor, einem Patienten werden die Stammzellen aus den bekannten Regionen der natürlich vorkommenden Neurogenese, z.B. der subventrikulären Zone, oder auch aus anderen Regionen wie z.B. dem Kortex, entfernt um sie in Zellkulturen anzureichern und in die gewünschten Zelltypen auszudifferenzieren! Niemand kann heute die Folgen für den Patienten ernsthaft voraussagen. Hauptsächlich ethische Gründe werden diesen Therapieansatz der autologen Transplantation neuronaler Stammzellen für die unterschiedlichsten Erkrankungen

des ZNS wohl noch längere Zeit verhindern. Auch die Propagierung embryonaler Stammzellen für neurodegenerative Erkrankungen, die generell möglich wäre, wird in naher Zukunft sicher noch intensive Diskussionsdebatten auslösen. Eine Verstärkung des endogen vorhandenen Potentials im Gehirn adulter Säuger ist daher der Transplantation vorzuziehen.

Mittlerweile existieren bereits experimentelle Ansätze, mit der lokalen Implantation oder systemischen Infusion von homologen hämatogenen Stammzellen, die in neuronale Zellen differenzieren können, Zellersatzstrategien nach Ischämie oder Trauma zu realisieren (Li *et al.*, 2001). Aber auch humane mesenchymale Stammzellen haben sich als geeignet herausgestellt, da sie zu verschiedenen, nicht hämatopoetischen Zellen ausdifferenzieren können (Chen *et al.*, 2001). Ungeklärt ist gegenwärtig noch für beide Strategien, inwieweit eine funktionsrelevante Integration proliferierender Zellen im Läsionsgebiet erfolgt (Björklund und Lindvall 2000). Es gibt jedoch erste Studien, die eine Verbesserung der räumlichen Orientierung von Ratten beschreiben, wenn ihnen nach einer transienten globalen Ischämie, die zum Untergang der Nervenzellen vor allem in der CA-1 Region des Hippokampus führt, aus dem Hippokampus isolierte neuronale Stammzellen transplantiert werden (Toda *et al.*, 2001). Auch spezies-übergreifende Transplantationen zeigen erste vielversprechende Ergebnisse. So konnte die Arbeitsgruppe um Low dieses Jahr eine Verbesserung neurologischer Defizite in Ratten beobachten, wenn ihnen eine Woche nach einer fokalen zerebralen Ischämie, humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark in den Kortex transplantiert wurden (Zhao *et al.*, 2002). Ihre immunhistochemischen Untersuchungen 6 Wochen nach der Transplantation ergaben, dass die transplantierten humanen mesenchymalen Stammzellen sowohl astrozytäre, neuronale als auch oligodendrogliale Marker exprimieren. Aufgrund ihrer Morphologie, die transplantierten Stammzellen wiesen eine kugelige Form mit wenigen Fortsätzen auf, gehen Zhao und seine Kollegen jedoch davon aus, dass die Wiedergewinnung der Funktionalität in den transplantierten Tieren nicht auf die vermeintlich neu gebildeten Nervenzellen zurückzuführen ist. Vielmehr vermuten sie, dass die Freisetzung von Proteinen aus diesen Zellen zu einer Plastizität als Reaktion auf die Ischämie führt.

Neben der Regeneration von Nerven- und Gliazellen aus hämatogenen oder adulten neuronalen Stammzellen, ist in Umkehr auch die Neubildung von Blutzellen aus neuronalen Stammzellen im Tierexperiment gezeigt (Bjornson *et al.*, 1999). Vescovi

und Kollegen konnten genetisch markierte neuronale Stammzellen nach Transplantation in bestrahlte Mäuse identifizieren, die unterschiedliche Blutzellen (Lymphozyten, Knochenmarkszellen und hämatopoetische Vorläuferzellen) zu produzieren in der Lage waren.

Das bedeutet, dass adulte neuronale Stammzellen ein weitaus grösseres Potential besitzen als bisher angenommen. Sie können nicht nur Zellen des ZNS ersetzen, sondern unter dem Einfluss von Signalen aus dem Knochenmark zu Blutzellen differenzieren. Alternativ könnten sie auch zu Blutstammzellen transformieren und sogar in primitive neuronale oder hämatogene Stammzellen dedifferenzieren.

Mit der heutigen Erkenntnis, dass neuronale Stammzellen auch im Erwachsenenalter zur Neubildung von Nerven- und Gliazellen in der Lage sind und, wie erste vielversprechende Experimente, auch in dieser Arbeit zeigen, die Anwesenheit neuronaler Stammzellen nicht nur in den heute eindeutig identifizierten neurogenen Regionen zu finden ist, sondern sie vielleicht sogar im gesamten ZNS ruhend vorhanden sind, um nach einer neurodegenerativen Erkrankung, welcher Art auch immer, ihre Zellteilung wieder aufzunehmen um zerstörtes Gewebe zu ersetzen, besteht eine begründete Hoffnung, in naher Zukunft Erkrankungen des ZNS besser zu behandeln.

G Literaturverzeichnis

Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W. and Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* (87), 171

Altman J. and Das G.D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* (124), 319-335

Altman J. and Bayer S.A. (1990) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.* (301), 325-342

Alvarez-Buylla A. and Nottebohm F. (1988) Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* (335), 353-354

Ata K.A., Lennmyr F., Funa K., Olsson Y. and Terent A. (1999) Expression of transforming growth factor-beta 1, 2, 3 isoforms and type I and II receptors in acute focal cerebral ischemia: an immunohistochemical study in rat after transient and permanent occlusion of middle cerebral artery. *Acta Neuropathol.* 97(5), 447-55

Auer R.N. and Benveniste H. (1997) Hypoxia and related conditions. In: Graham DI and Lantos PL (eds) *Greenfield's Neuropathology*, 6th edition, pp 263-314

Banati R.B. and Graeber M.B. (1994) Surveillance, intervention and cytotoxicity: Is there a protective role of microglia? *Dev. Neurosci.* (16), 114-127

Barbour B., Brew H. and Attwell D. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335(6189), 433-435

Barde Y.A. (1994) Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog. Clin. Biol. Res.* (390), 45-56

Barone F.C. and Feuerstein G.Z. (1999) Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel threapeutics. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (19), 819-834

Batistatou A., Merry D.E., Korsmeyer S.J. and Greene L.A. (1993) Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Neurosci.* (10), 4422-4428

Beck T., Lindholm D., Castren E. and Wree A. (1994) Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (14), 689-692

Belayev L., Busto R., Zhao W. and Ginsberg M.D. (1996) Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* (739), 88-96

Biebl M., Cooper C.M., Winkler J. and Kuhn H.G. (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.* (291), 17-20

Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C. and Vescovi A.L. (1999) Turning Brain into Blood: A Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells in Vivo. *Science* (283), 534-537

Björklund A. and Lindvall O. (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature Neuroscience* (3), 537-544

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitiv method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (72), 248-254

Bredesen D.E., Ye X., Tasinato A., Sperandio S., Wang J.J., Assa-Munt N. and Rabizadeh S. (1998) p75NTR and the concept of cellular dependence: seeing how the other half die. *Cell Death Differ.* 5(5), 365-371

Calabresi P., Marfia G.A., Amoroso S., Pisami A. and Bernardi G. Pharmacological inhibition of the $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchanger enhances depolarization induced by oxygen/glucose deprivation but not responses to excitatory amino acids in rat striatal neurons. *Stroke* 30(8), 1687-93

Cameron H.A., Woolley C.S., McEwen B.S. and Gould E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* (56), 337-344

Cameron H.A. and Gould E. (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* (61), 203-209

Casanova M.F., Troncoso J.C. and Price D.L. (1986) Hematogenous origin of brain macrophages: A case report. *Neurology* (36), 844-847

Cecconi E., Alvarez-Bolado G., Meyer B.L., Roth K.A. and Gruss P. (1998) Apaf-1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* (94), 727-737

Chandler S., Coates R., Gearing A., Lury J., Wells G. and Bone E. (1995) Matrix Metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci. Lett.* (201), 223-226

Chang H.S., Sasaki T. and Kassel N.F. (1989) Hippocampal unit activity after transient cerebral ischemia in rats. *Stroke* 20(8), 1051-8

Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M. and Chopp M. (2001) Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke* (32), 1005-1011

Cleveland D.W. (1999) From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron* (24), 515-520

Cosgaya J.M. and Aranda A. (1995) Nerve growth factor regulates transforming growth factor-beta 1 gene expression by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms in PC12 cells. *J. Neurochem.* 65(6), 2484-2490

Dahl N.A. and Balfour W.M. (1964) Prolonged anoxic survival due to anoxia pre-exposure: brain ATP, lactate and pyruvate. *Am. J. Physiol.* (207), 452-456

Del Zoppo G., Ginis I., Hallenbeck J.M., Iadecola C., Wang X. and Feuerstein G.Z. (2000) Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* (10), 95-112

Dereski M.O., Chopp M., Knight R.A., Chen A. and Garcia J.H. (1992) Focal cerebral ischemia in the rat: Temporal profile of neutrophil responses. *Neurosci. Res. Commun.* (11), 179-185

Dirnagl U., Iadecola C. and Moskowitz M.A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* (22), 391-397

Docagne F., Nicole O., Marti H.H., MacKenzie E.T., Buisson A. and Vivien D. (1999) Transforming growth factor-beta 1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J.* 13(11), 1315-24

Ellis H.M., Yuan J. and Horvitz H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* (7), 663-698

Endres M., Fan G., Hirt L., Fulli M., Matsushita K., Liu X., Jaenisch R. and Moskowitz M.A. (2000) Ischemic brain damage in mice after selectively modifying BDNF or NT 4 gene expression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (20), 139-144

Endres M., Namura S., Shimizu-Sasamata M., Waeber C., Zhang L., Gómez-Isla T., Hyman B.T. and Moskowitz M.A. (1998) Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* (18), 238-247

Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A. and Gage F.H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* (4), 1313-1317

Fink K., Shu J., Namura S., Shimizu-Sasamata M., Endres M., Ma J., Dalkara T., Yuan J. and Moskowitz M.A. (1998) Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* (18), 1071-1076

Flanders K.C., Ren R.F. and Lippa C.F. (1998) Transforming growth factor-betas in neurodegenerative diseases. *Prog. Neurobiol.* 54(1),71-85

Friedlander R.M., Brown R.H., Gagliardini V., Wang J. and Juan J. (1997) Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature* (388), 31

Friedlander R.M., Gagliardini V., Rotello R.J. and Yuan J. (1996) Functional role of interleukin-1 β (IL-1 β) in IL-converting enzyme-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* (184), 717-724

Gamble J.R., Khew-Goodall Y. and Vadas M.A. (1993) Transforming growth factor β 1 inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J. Immunol.* (150), 4494-4503

Gasche Y., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Copin J.C., Kawase M., Massengale J. and Chan P.H. (1999) Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: A possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (19), 1020-1028

Giulian D., Li J., Leara B. and Keenen C. (1994) Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. *Neurochem. Int.* (25), 227-233

Globus M.Y., Busto R., Martinez E., Valdez I., Dietrich W.D. and Ginsberg M.D. (1991) Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of

glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat. *J. Neurochem.* 57(2), 470-8

Goldlust E.J., Paczynski R.P., He Y.Y., Hsu C.Y. and Golgberg M.P. (1996) Automated Measurement of Infarct Size With Scanned Images of Triphenyltetrazolium Chloride-Stained Rat Brains. *Stroke* (27), 1657 – 1662

Goldman S.A. and Nottebohm F. (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (80), 2390-2394

Goldman S.A., Kirschenbaum B., Harrison-Restelli C. and Thaler H. (1997) Neuronal precursor cells of the adult rat ventricular zone persist into senescence, with no change in spatial extent or BDNF response. *J. Neurobiol.* (32), 554-566

Gould E., MacEwen B.S., Tanapat P., Galea L.A. and Fuchs E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* (17), 2492-2498

Gould E., Reeves A.J., Fallah M., Tanapat P., Gross C.G. and Fuchs E. (1999) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (96), 5263-5267

Gould E., Reeves A.J., Graziano M.S. and Gross C.G. (1999c) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* (286), 548-552

Gould E. and Tanapat P. (1997) Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci.* (80), 427-436

Gould E., Tanapat P., MacEwen B.S. and Flugge C. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95), 3168-3171

Gu W.G., Brännström T. and Wester P. (2000) Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke, *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* (20), 1166-1173

Heer-Ress E., Thallinger C., Lucas T., Schlagbauer-Wadl H., Wacheck V., Monia B.P., Wolff K., Pehamberger H. and Jansen B. (2002) Bcl-X (L) is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy. *Int. J. Cancer* 99(1), 29-34

Henrich-Noack P., Prehn J.M.H. and Krieglstein J. (1994) Neuroprotective effects of TGF- β 1. *J. Neural Transm.* (43), 33-45

Henrich-Noack P., Prehn J.M.H. and Krieglstein J. (1996) TGF- β 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke* (27), 1609-1615

Heo J.H., Lucero J., Abumiya T., Koziol J.A., Copeland B.R. and delZoppo G.J. (1999) Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19(6), 624-633

Horn M., Kiourkenidis G., Dittmar M., Giegerich G., Apfel R. (2002) Amplification of TGF- β signaling mediates neuroprotection in experimental stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 13 (suppl 3):1-100

Horn M., Lang C. and Schlote W. (1991) Delayed neuronal death after cardiac arrest in man. *Clin. Neuropathol.* (10), 270.

Hurwitz A.A., Lyman W.D. and Berman J.W. (1995) Tumor necrosis factor α and transforming growth factor β upregulate astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J. Neuroimmunol.* (57), 193-198

Iadecola C. (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* (20), 132-139

Jiang C., Agulian S. and Haddad G.G. (1992) Cl^- and Na^+ homeostasis during anoxia in rat hypoglossal neurons: intracellular and extracellular in vitro studies. *J. Physiol. (Lond)* (448), 697-708

Jiang W., Gu W.G., Brännström T., Rosqvist R. and Wester P. (2001) Cortical Neurogenesis in Adult Rats After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *Stroke* (32), 1201-1207

Jin K., Mao X.O., Batteur S.P., McEachron E., Leahy A. and Greenberg D.A. (2001) Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor. *Neuroscience* 108(2), 351-358

Jin K., Minami M., Lan J.Q., Ou Mao X., Batteur S., Simon R.P. and Greenberg D.A. (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (98), 4710-4715

Jordan F.L. and Thomas W.E. (1988) Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.* (13), 165-178

Kaplan M.S. and Hinds J.W. (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light autoradiographs. *Science* (197), 1092-1094

Kageyama H., Nemoto K., Nemoto F., Sekimoto M., Nara Y., Nabika T., Iwayama Y., Fukamachi K., Tomita I., Senba E., Forehand E.D., Hendley T. and Ueyama T. (1996) Mutation of the *trkB* gene encoding the high-affinity receptor for brain-derived neurotrophic factor in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (229), 713-718

Kee N.J., Preston E. and Wojtowicz J.M. (2001) Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp. Brain Res.* 136(3), 313-20

Kempermann G., Kuhn H.G. and Gage F.H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* (386), 493-495

Kempermann G., Brandon E.P. and Gage F.H. (1998) Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr. Biol.* (8), 939-942

Kim J.S., Gautam S.C., Chopp M., Zaloga C., Jones M.L., Ward P.A. and Welch K.M.A. (1995) Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neuroimmunol.* (56), 127-134

Kim S.J., Park K., Rudkin B.B., Dey B.R., Sporn M.B. and Roberts A.B. (1994) Nerve growth factor induces transcription of transforming growth factor-beta 1 through a specific promoter element in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 269(5), 3739-3744

Kirino T. (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239(1), 57-69

Knüchel R. (1994) Durchflusszytometrische Analytik und Zellsortierung. Standortbericht und Perspektiven für die Pathologie. *Pathologie* (15), 1

Kochanek P.M. and Hallenbeck J.M. (1992) Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* (23), 1367-1379

Kostic V., Jackson-Lewis V., de Bilbao F., Dubois-Dauphin M. and Przedborski S. (1997) Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* (277), 559-562

Kostulas N., Li H.L., Xiao B.G., Huang Y.M., Kostulas V. and Link H. (2002) Dendritic Cells Are Present in Ischemic Brain After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *Stroke* (33), 1129-1134

Kriegelstein K., Henheik P., Farkas L., Jaszai J., Galter D., Krohn K. and Unsicker K. (1998b) GDNF requires TGF- β for establishing its neurotrophic activity. *J. Neurosci.* (18), 9822-9834

Kristian T. and Siesjo B.K. (1996) Calcium-related damage in ischemia. *Life Sci.* 59(5-6), 357-67

Krupinski J., Kumar P., Kumar S., Path R.F.C. and Kaluza J. (1996) Increased expression of TGF- β 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke* (27), 852-857

Krupinski J., Lopez E., Marti E. and Ferrer I. (2000) Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* (7), 332-342

Kuhn H.G., Dickinson-Anson H. and Gage F.H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* (16), 2027-2033

Lee J.M., Grabb M.C., Zipfel G.J. and Choi D.W. (2000) Brain tissue responses to ischemia. *J. Clin. Invest.* (106), 723-731

Lehrmann E., Kiefer R., Finsen B., Diemer N.H., Zimmer J. and Hartung H.P. (1995) Cytokines in cerebral ischemia: Expression of transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) mRNA in the postischemic adult rat hippocampus. *Exp. Neurol.* (131), 114-123

Levi-Montalcini R. and Hamburger V. (1953) A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* (123), 233-288

Li H., Colbourne F., Sun P., Zhao Z. and Buchan A.M. (2000) Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. *Stroke* (31), 176-182

Li M., Ona V.O., Guegan C. and Chen M. (2000) Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* (288), 335-339

Li Y., Chen J. and Chopp M. (2001) Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* (10), 31-40

Li Y., Chen J., Wang L., Lu M. and Chopp M. (2001) Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* (56), 1666-1672

Liepinsh E., Ilag L.L., Otting G. and Ibanez C.F. (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 16(16), 4999-5005

Lindholm D., Castren E., Kiefer R., Zafra F. and Thoenen H. (1992) Transforming growth factor- β 1 in the rat brain: Increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J. Cell Biol.* (117), 395-400

Lindsay R.M., Wiegand S.J., Altar C.A. and Distefano P.S. (1994) Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci.* (17), 182-190

Lindvall O., Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Smith M.L., Siesjö B.K. and Persson H. (1992) Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (89), 648-652

Liu J., Solway K., Messing R.O. and Sharp F.R. (1998) Increased Neurogenesis in the Dentate Gyrus After Transient Global Ischemia in Gerbils. *J. Neurosci.* (18), 7768-7778

Liu T., McDonnell P.C., Young P.R., White R.F., Siren A.L., Hallenbeck J.M., Barone F.C. and Feuerstein G.Z. (1993) Interleukin-1 β mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke* (24), 1746-1751

Logan A., Berry M., Gonzales A.M., Frautschy S.A., Sporn M.B. and Baird A. (1994) Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur. J. Neurosci.* (6), 355-363

Lois C. and Alvarez-Buylla A. (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (90), 2074-2077

Lois C. and Alvarez-Buylla A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* (264), 1145 – 1148

Love S., Barber R., Srinivasan A. and Wilcock G.K. (2000) Activation of caspase-3 in permanent and transient brain ischemia in man. *Neuroreport* 11(11), 2495-2499

Lu D., Mahmood A., Wang L., Li Y., Lu M. and Chopp M. (2001) Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into the brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* (12), 559-563

Lukes A., Mun-Bryce S., Lukes M. and Rosenberg G.A. (1999) Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol. Neurobiol.* (19), 267-284

Luskin M.B. (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* (11), 173-189

Magavi S.S., Leavitt B.R. and Macklis J.D. (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* (405), 951-955

Martinou J.C., Dubois-Dauphin M., Staple J.K., Rodriguez I., Frankowski H., Missotten M., Albertini P., Talabot D., Catsicas S. and Pietra C. *et. al.* (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13(4), 1017-1030

Martinez G., Di Giacomo C., Sorrenti V., Carnazza M.L., Ragusa N., Barcellona M.L. and Vanella A. (2001) Fibroblast Growth Factor-2 and Transforming Growth Factor- β 1 Immunostaining in Rat Brain after Cerebral Postischemic Reperfusion. *J. Neurosci. Res.* (63), 136-142

Mattson M.P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1(2), 120-129

Mattson M.P. and Cheng B. (1993) Growth factors protect against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Stroke* (24), 1136-1140

Mattson M.P., Culmsee C. and Yu Z.F. (2000) Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.* (301), 173-187

Mattson M.P., Murrain M., Guthrie P.B. and Kater S.B. (1989) Fibroblast growth factor and glutamate: opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J. Neurosci.* (9), 3728-3740

McNeill H., Williams C., Guan J., Dragunow M., Lawlor P., Sirimanne E., Nikolics K. and Gluckmann P. (1994) Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischemic brain injury. *Neuroreport* 14;5(8), 901-4

Menezes J.R., Smith C.M., Nelson K.C. and Luskin M.B. (1995) The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol. Cell. Neurosci.* (6), 496-508

Menzies S.A., Hoff J.T. and Betz A.L. (1992) Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* (31), 100-7

Mies G., Iijima T. and Hossmann K.A. (1993) Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4(6), 709-711

Mitani A. and Kataoka K. (1992) Selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons cannot be explained in terms of an increase in glutamate concentration during ischemia in the gerbil: brain microdialysis study. *Neuroscience* 48(2), 307-313

Morioka T., Kalehua A.N. and Streit W.J. (1991) The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (11), 966-973

Nagayama M., Zhang F. and Iadecola C. (1998) Delayed treatment with aminoguanidine decreases focal cerebral ischemic damage and enhances neurologic recovery in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (18), 1107-1113

Namura S., Zhu J., Fink K., Endres M., Srinivasan A., Tomaselli K.J., Yuan J. and Moskowitz M.A. (1998) Activation and Cleavage of Caspase-3 in Apoptosis Induced by Experimental Cerebral Ischemia. *J. Neurosci.* (18), 3659-3668

Nellgard B. and Wieloch T. (1992) Postischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in the rat brain following transient severe cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12(1), 2-11

Nicotera P., Ankarcrona M., Benfoco E., Orrenius S. and Lipton S.A. (1996) Neuronal apoptosis *versus* necrosis induced by glutamate or free radicals. *Apoptosis* (1), 5-10

Nilsson M., Perfilieva E., Johansson U., Orwar O. and Eriksson P.S. (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J. Neurobiol.* (39), 569-578

Ogawa S., Brown H.E., Okano H.J. and Pfaff D.W. (1995) Cellular uptake of intracerebrally administered oligodeoxynucleotides in mouse brain. *Regulat. Pept.* (59), 143-149

Ono T., Saito H., Kishimoto T., Okumoto T. and Miyamoto K. (1991) Stimulation of biosynthesis of nerve growth factor by acidic fibroblast growth factor in cultured mouse astrocytes. *Neurosci. Lett.* (126), 18-20

Oppenheim R. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* (14), 453-501

Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoite A.R., Safar F. and Gage F.H. (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* (19), 8487-8497

Parent J.M., Yu T.W., Leibowitz R.T., Geschwind D.H., Sloviter R.S. and Lownestein D.H. (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* (17), 3727-3738

Park C.K., Nehls D.G., Graham D.I., Teasdale G.M. and McCulloch J. (1988) The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 24(4), 543-551

Pasinelli P., Borchelt D.R., Houseweart M.K., Cleveland D.W. and Brown R.H.Jr. (1998) Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(26), 15763-15768

Petroff O.A.C., Graham G.D., Blamire A.M., Al-Rayess M., Rothman D.L., Fayad P.B., Brass L.M., Shulman R.G. and Prichard J.W. (1992) Spectroscopic imaging of stroke in humans: Histopathology correlates of spectral changes. *Neurology* (42), 1349-1354

Phillis J.W., Song D. and O'Regan M.H. (1997) Inhibition by anion channel blockers of ischemia-evoked release of excitotoxic and other amino acids from rat cerebral cortex. *Brain Res.* 758(1-2), 9-16

Pittenger M.F., MacKay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S. and Marshak D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (284), 143-147

Planas A.M., Justicia C., Soriano M.A. and Ferrer I. (1998) Epidermal growth factor receptor in proliferating reactive glia following transient focal ischemia in the rat brain. *Glia* (23), 120-129

Planas A.M., Solé S. and Justicia C. (2001) Expression and Activation of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Rat Brain after Transient Focal Cerebral Ischemia. *Neurobiol. Dis.* (8), 834-846

Planas A.M., Solé S., Justicia C. and Rodriguez Farre E. (2000) Estimation of gelatinase content in rat brain: Effect of focal ischemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (278), 803-807

Platten M., Wick W. and Weller M. (2001) Malignant glioma biology: Role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc. Res. Tech.* (52), 401

Platten M., Wick W., Wild-Bode C., Aulwurm S., Dichgans J. and Weller M. (2000) Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 promote glioma cell migration via up-regulation of alpha V-beta 3 integrin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (268), 607

Prehn J.H.M. and Kriegstein J. (1994) Opposing effects of transforming growth factor- β 1 on glutamate neurotoxicity. *Neuroscience* (60), 7-10

Qin H., Srinivasula S.M., Wu G., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. and Shi Y. (1999) Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399(6736), 549-557

Raichle M.E. (1983) The pathophysiology of brain ischemia. *Ann. Neuro.* (13), 2-10

Ramsay S.C., Weiller C.M., Myers R., Cremer J.E., Luthra S.K., Lammertsma A.A. and Frackowiack R.S.J. (1992) Monitoring by PET of macrophage accumulation in brain after ischaemic stroke. *Lancet* (339), 1054-1055

Reed J.C. (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157(5), 1415-1430

Reed J.C. (2002) Apoptosis-based therapies. *Nat. Rev. Drug Disc.* (11), 11-21

Ries C. and Petrides P.E. (1995) Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol. Chem.* (376), 345-355

Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X., et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362(6415), 59-62

Rosenberg G.A., Estrada E.Y. and Dencoff J.E. (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain-barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* (29), 2189-2195

Rosenberg G.A., Kornfeld M., Estrada E., Kellev R.O., Liotta L.A. and Stetler-Stevenson W.G. (1992) TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res.* (576), 203-207

Rossi F. and Cattaneo E. (2002) Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nature Neurosci.* (3), 401-409

Rubin L.L., Gatchalian C.L., Rimon G. and Brokks S.F. (1994) The molecular mechanisms of neural apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* (4), 696-702

Saito K., Suyama K., Nishida K., Sei Y. and Basile A.S. (1996) Early increases in TNF- α , IL-6, and IL-1 β levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neurosci. Lett.* (206), 149-152

Schmidley J.W. (1990) Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* (21), 1086-1090

Schober A., Hertel R., Arumae U., Farkas L., Jaszai J., Krieglstein K., Saarma M. and Unsicker K. (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factors rescues target-deprived sympathetic spinal cord neurons but requires TGF- β as cofactor in vivo. *J. Neurosci.* (19), 2008-2015

Schreiber S.S. and Baudry M. (1995) Selective neuronal vulnerability in the hippocampus – a role for gene expression. *Trends Neurosci.* (18), 446-451

Schulz J.B., Weller M. and Moskowitz M.A. (1999) Caspases as Treatment Targets in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Ann. Neurol.* (45), 421-429

Sharp F.R., Liu J. and Bernabeu R. (2002) Neurogenesis following brain ischemia. *Develop. Brain. Res.* (134), 23-30

Shibayama M., Kuchiwaki H., Inao S., Ichimi K., Yoshida J. and Hamaguchi M. (1997) Induction of matrix metalloproteinases following brain injury in rats. *Acta Neurochi. Suppl.* (70), 220-221

Siesjö B.K. (1988) Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit. Care Med.* (16), 954-963

Siesjö B.K. and Bengtsson F. (1989) Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading suppression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* (9), 127-140

Silver I.A. and Erecinska M. (1990) Intracellular and extracellular changes of $[Ca^{2+}]$ in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J. Gen. Physiol.* 95(5), 837-66

Suhonen J.O., Peterson D.A., Ray J. and Gage F.H. (1996) Differentiation of adult hippocampal-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* (383), 624-627

Takagi Y., Nozaki K., Takahashi J., Yodoi J., Ishikawa M. and Hashimoto M. (1999) Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res.* (831), 283-287

Tanapat P., Hastings N.B., Reeves A.J. and Gould E. (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J. Neurosci.* (19), 5792-5801

Taylor C.P., Burke S.P. and Weber M.L. (1995) Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. *J. Neurosci. Meth.* 59(1), 121-8

Thoenen H. (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* (270), 593-598

Thomas W.E. (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain. Res. Rev.* (17), 61-74

Toda H., Takahashi J., Iwakami N., Kimura T., Hoki S., Mozumi-Kitamura K., Ono S. and Hashimoto N. (2001) Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neurosci. Lett.* (316), 9-12

Tsukahara T., Yonekawa Y., Tanaka K., Ohara O., Wantanabe S., Kimura T., Nishijima T. and Taniguchi T. (1994) The role of brain-derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurosurgery* (34), 232-331

Unsicker K., Flanders K.C., Cissel D.S., Lafyatis R. and Sporn M.B. (1991) Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* (44), 613-625

van Praag H., Kempermann G. and Gage F.H. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience* (2), 266-270

Velier J.V., Ellison J.A., Kikly K.K., Spera P.A., Barone F.C. and Feuerstein G.Z. (1999) Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in rats. *J. Neurosci.* (19), 5932-5941

Wang X., Yue T.L., White R.F., Barone F.C. and Feuerstein G.Z. (1995) Transforming growth factor-beta 1 exhibits delayed gene expression following focal cerebral ischemia. *Brain. Res. Bull.* 36 (6), 607-609

Wick W., Platten M. and Weller M. (2001) Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinases by TGF- β . *J. Neuro-Oncol.* (53), 177-185

Wiessner C., Gehrmann J., Lindholm D., Topper R., Kreutzberg G.W. and Hossmann K.A. (1993) Expression of transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* (186), 439-446

Wiessner C., Sauer D., Alaimo D. and Allegrini P.R. (2000) Protective effect of a caspase inhibitor in models for cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Cell. Mol. Biol.* (46), 53-62

Yamamoto S., Yoshimine T., Fujita T., Kuroda R., Irie T., Fujioka K. and Hayakawa T. (1992) Protective effects of NGF atelocollagen mini-pellet on the hippocampal delayed neuronal death in gerbils. *Neurosci. Lett.* (141), 161-165

Yuan J. and Horwitz H.R. (1990) The caenorhabditis elegans genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev. Biol.* (138), 33-41

Yuan J. and Yankner B.A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407(6805), 802-809

Zhang J.W., Deb S. and Gottschall P.E. (1998) Regional and differential expression of gelatinases in rat brain after systemic kainic acid or bicuculline administration. *Eur. J. Neurosci.* (10), 3358-3368

Zhao L.R., Duan W.M., Reyes M., Keene D., Verfaillie C.M. and Low W.C. (2002) Human Bone Marrow Stem Cells Exhibit Neural Phenotypes and Ameliorate Deficits after Grafting into the Ischemic Brain of Rats. *Exp. Neurol.* (174), 11-20

Zhou L.W., Zhang S.P., Qin Z.H. and Weiss B. (1994) In vivo administration of an oligodeoxynucleotide antisense to the D2 dopamine receptor messenger RNA inhibits D2 dopamine receptor-mediated behavior and the expression of D2 dopamine receptors in mouse striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (268), 1015

Zhu Y., Ahlemeyer B., Bauerbach E. and Krieglstein J. (2001) TGF-beta1 inhibits caspase-3 activation and neuronal apoptosis in rat hippocampal cultures. *Neurochem. Int.* 38(3), 227-235

Zhu Y., Yang G.Y., Ahlemeyer B., Pang L., Che X.M., Culmsee C., Klumpp S. and Krieglstein J. (2002) Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J. Neurosci.* 22(10), 3898-3909

Zielasek J. and Hartung H.P. (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv. Neuroimmunol.* 6(2), 191-220

Zou H., Li Y., Liu X. and Wang X. (1999) An APAF-1 cytochrom c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274(20), 11549-11556

Veröffentlichungen

Artikel in Fachzeitschriften

Kiourkenidis G., Dittmar M., Apfel R. and Horn M. (2002) Increased cortical neurogenesis after focal stroke is a prolonged process with rapid phenotypic differentiation. *submitted*

Kiourkenidis G., Apfel R., Steigerwald R. and Horn M. (2002) Transvascular delivery of oligonucleotides to potentially treatable neurons after transient brain ischemia in the rodent. *submitted*

Horn M., **Kiourkenidis G.**, Muggenthaler M., Steigerwald R, Dittmar M., Schuierer G. and Apfel R. (2002) Local intra-arterial administration of the caspase inhibitor z-DEVD.FMK attenuates neuronal injury after transient MCA occlusion in rat. *submitted*

Horn M., **Kiourkenidis G.**, Dittmar M., Giegerich G., Steinbrecher A., Schuierer G., Bogdahn U. and Apfel R. (2002) Modulation of TGF-beta 1/Smad signaling by specific antisense oligonucleotides in ischemic stroke. *submitted*

Posterpräsentationen bei Fachtagungen

Kiourkenidis G., Apfel R., Steigerwald R. and Horn M. Transvascular delivery of oligonucleotides to potentially treatable neurons after transient brain ischemia in the rodent. *27th International Stroke Conference, San Antonio, Texas/USA, 07.-09. Feb. 2002*

Horn M., **Kiourkenidis G.**, Muggenthaler M., Steigerwald R, Dittmar M., Schuierer G. and Apfel R. (2002) Local intra-arterial administration of the caspase inhibitor z-DEVD.FMK attenuates neuronal injury after transient MCA occlusion in rat. *27th International Stroke Conference, San Antonio, Texas/USA, 07.-09. Feb. 2002*

Kiourkenidis G., Dittmar M., Apfel R. and Horn M. Increased neurogenesis after stroke in rat cortex is enduring and shows rapid phenotypic differentiation. *11th. European Stroke Conference, Geneve/Switzerland, 29.Mai-01.Juni 2002*

Horn M., **Kiourkenidis G.**, Dittmar M., Giegerich G., Steinbrecher A., Schuierer G., Bogdahn U. and Apfel R. Modulation of TGF-beta 1/Smad signaling by specific antisense oligonucleotides in ischemic stroke *11th. European Stroke Conference, Geneve/Switzerland, 29.Mai-01.Juni 2002*

Dittmar M., **Kiourkenidis G.**, Apfel R. and Horn M. Local intra-arterial MMP-2/-9 Inhibitor has no Beneficial Effects after Transient MCAO in Rats. *11th. European Stroke Conference, Geneve/Switzerland, 29.Mai-01.Juni 2002*

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Oktober 1998 und Juli 2002 an der neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Regensburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Bogdahn danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz danke ich vielmals für die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Markus Horn und Herrn Dr. Rainer Apfel für ihre Motivation und tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit. Ihr unermüdliches Engagement hat sehr zum Gelingen dieses Projektes beigetragen.

Bei Chara möchte ich mich für seine ausserordentliche Unterstützung und ständige Bereitschaft mir zu helfen bedanken.

Auch Herrn Dipl. Ing. Rolf Steigerwald sei an dieser Stelle recht herzlich gedankt. Ohne seine RS-Instrumente wäre die Tierexperimentelle Arbeit in dieser professionellen Art und Weise nicht möglich gewesen.

Herrn PD Dr. Schuierer aus der Neuro-Radiologie danke ich für die Unterstützung für die MRT-Aufnahmen der zahlreichen Tiere.

Herrn PD Dr. Bernhardt aus dem Institut für Pharmazie danke ich für die pharmakokinetischen Untersuchungen des MMP-Inhibitors.

Den Laborkollegen der neurologischen, chirurgischen und psychiatrischen Forschung danke ich für das durchaus nette und lustige Arbeitsklima. Vor allem meinen "Mitstreitern" Manfred Biebl, Arabel Vollmann und Petra Wise (ehem. Kempt), Michael Dittmar und Martina Muggenthaler möchte ich an dieser Stelle für die zahlreichen Gespräche und Anregungen danken. Dies gilt insbesondere auch für Herrn Dr. Gerhard Giegerich und Herrn Dr. Thilo Spruss. Auch bei Ines Tschertner

möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Tanja danke ich für die allerersten Korrekturlesungen.

Meinen ehemaligen Kommilitonen, Dunja, Chris, Detlev, Bernd, Tarig, Mio und Manuel in Würzburg möchte ich an dieser Stelle auch danken. Ohne Sie wäre diese Arbeit - von mir - wohl niemals entstanden, DANKE!!!

*Ein ganz besonderer Dank richtet sich an meine **Mutter** und **Zeily**.*