

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

Beurteilung des therapeutischen Potenzials
von intraperitoneal injiziertem Metallothionein-II
im ischämischen Schlaganfallmodell
an der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Abass Eidizadeh

aus

Göttingen

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. med. G. Trendelenburg

Ko-Referent: Prof. Dr. rer. nat. T. A. Bayer

Drittreferent: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 07.03.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Beurteilung des therapeutischen Potenzials von intraperitoneal injiziertem Metallothionein-II im ischämischen Schlaganfallmodell an der Maus" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Eidizadeh A, Khajehalichalehshtari M, Freyer D, Trendelenburg G (2015): Assessment of the Therapeutic Potential of Metallothionein-II Application in Focal Cerebral Ischemia In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 10, e0144035

Eidizadeh A, Trendelenburg G (2016): Focusing on the protective effects of metallothionein-I/II in cerebral ischemia. *Neural Regen Res* 11, 721–722

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
<hr/>	
1.1 Der ischämische Schlaganfall	1
1.1.1 Epidemiologie und Therapie	1
1.1.2 Pathophysiologie und Inflammation im ischämischen Schlaganfall	3
1.2 Metallothionein im ischämischen Schlaganfall	7
1.2.1 Struktur und Funktionen von Metallothioneinen	7
1.2.2 Neuroprotektive Effekte von MT-I/II	11
1.2.3 Extrazelluläre MT-I/II im ZNS	12
1.3 Ziele der Arbeit	15
2 Materialien und Methoden	16
<hr/>	
2.1 Materialien	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Antikörper und Proteine	17
2.1.3 PCR-Reagenzien	18
2.1.4 Puffer und Lösungen	18
2.1.5 Oligonukleotide	18
2.1.6 Laborgeräte, Reaktionsgefäße und Zubehör	19
2.1.7 Operationszubehör	20
2.1.8 Software	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 <i>In-vivo</i> -Experimente	22
2.2.1.1 Tierhaltung und Abbruchkriterien der Versuche	22
2.2.1.2 Artgerechte Tötung der Versuchstiere und transkardiale Perfusion mit Paraformaldehyd	23
2.2.1.3 Intraperitoneale Injektion von Zn ₇ -Metallothionein-II	23
2.2.1.4 Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)-Modell	23
2.2.1.5 Erhebung des neurologischen Defizits (<i>Neuroscoring</i>)	26
2.2.2 Histologische Methoden	27
2.2.2.1 Herstellung von Gefrierschnittpräparaten mittels Kryotom	27
2.2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	27
2.2.2.3 Infarktmetrie	27
2.2.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen	28

2.2.2.5 Auszählung der Neuronen und inflammatorischen Zellen	29
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.3.1 Oligonukleotid-Synthese und Design	30
2.2.3.2 RNA-Isolation aus Gehirngewebe und DNase-Verdau	30
2.2.3.3 RNA-Photometrie und Konzentrationsbestimmung	31
2.2.3.4 cDNA-Synthese mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion	31
2.2.3.5 Konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.3.7 Quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR)	33
2.2.4 Statistische Auswertungen	36
3 Ergebnisse	38

3.1 Versuchsaufbau zum therapeutischen Potenzial von Metallothionein-II im MCAO-Schlaganfallmodell	38
3.2 Metallothioneinbehandlung reduziert das Infarktvolumen im milden Schlaganfallmodell	39
3.3 MT-II Behandlung verbessert neurologische Defizite im milden Schlaganfallmodell	42
3.4 Neuronenüberleben und die Aktivierung von inflammatorischen Zellen wurden von Metallothionein-II nicht beeinflusst	43
3.5 Behandlung mit Metallothionein führt zur einer Repression des TNF- α -Gens	45
4 Diskussion	47

4.1 Therapeutisches Potenzial von Metallothionein im ischämischen Schlaganfall	47
4.2 Eine MT-II Applikation kann das Infarktvolumen und das neurologische Defizit im Schlaganfall verringern	49
4.3 Das neuronale Überleben und die Aktivierung von inflammatorischen Zellen wird von MT-II nicht beeinflusst	52
4.4 Extrazelluläres MT-II führt zu einer Supprimierung von TNF- α	54
4.5 Eine klinische Anwendung von Metallothionein im ischämischen Schlaganfall? Ein Ausblick	57
5 Zusammenfassung	59
6 Literaturverzeichnis	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathophysiologie nach ischämischem Schlaganfall.	4
Abbildung 2: 3D-Proteinstruktur von Metallothionein-II und Vergleich der Primärstrukturen von humanen und murinen MT.	8
Abbildung 3: Neuroprotektive Effekte von extrazellulärem MT-I/II bei Inflammation und ZNS-Schaden.	13
Abbildung 4: Schema und Operationssitus des MCAO-Modells	24
Abbildung 5: Gefrierschnittpräparate zur Infarktmetrie.	28
Abbildung 6: Amplifikationskurve einer SYBR-Green-qRT-PCR.	34
Abbildung 7: Schmelzkurvenanalyse einer SYBR-Green-qRT-PCR.	36
Abbildung 8: Gewichts- und Temperaturkontrollen der behandelten Mäuse.	39
Abbildung 9: Infarktmetrie nach 48 h Reperfusion mit 60 min MCAO im Vergleich.	40
Abbildung 10: Infarktmetrie nach 72 h Reperfusion mit 30 min MCAO im Vergleich.	41
Abbildung 11: Vergleich des neurologischen Defizits (<i>Neuroscore</i>) der MCAO-behandelten Tiere am Ende der Reperusionszeit.	42
Abbildung 12: Vergleich des neuronalen Überlebens und Aktivierung monozytärer Zellen an Immunfluoreszenzfärbungen zwischen zwei MCAO-Modellen.	43
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbungen von Neuronen und monozytären Zellen im Vergleich zwischen MT-II-behandelten und unbehandelten Mäusen im MCAO-Modell.	44
Abbildung 14: Relative Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR bei 30 min Okklusion und 72 h Reperusions-MCAO-Modell und Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Reaktionsansätze.	46

Alle nicht näher gekennzeichneten Abbildungen stammen vom Autor.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Neuroscore</i> zur Ermittlung des neurologischen Defizits.	26
---	----

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
ASC	<i>Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domains</i>
Caspase	<i>Cysteiny-Aspartate Specific Protease</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i>
Da	Dalton
DAMP	<i>Danger Associated Molecular Patterns</i>
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt-deionisiertes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fw	<i>forward</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LRP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein</i>

MCAO	<i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic acid</i>
MT	Metallothionein
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time-PCR</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rtPA	rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
rv	<i>reverse</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TAE	<i>TRIS-Acetat-EDTA</i>
TBS	<i>TRIS-Buffered Saline</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

1.1.1 Epidemiologie und Therapie

Der Schlaganfall stellt ein tiefgreifendes Ereignis im Leben eines betroffenen Menschen dar. Die Konsequenzen für den Patienten und sein soziales und familiäres Umfeld sind zumeist gravierend. Ebenfalls ist der ischämische Schlaganfall weltweit eine relevante Erkrankung, sie wurde 2015 von der WHO als zweithäufigste Todesursache in den Industrieländern angegeben (Feigin et al. 2017). In Deutschland erleiden pro Jahr ca. 250.000 Menschen einen ischämischen zerebralen Insult (Heuschmann et al. 2010) mit einer Lebenszeitprävalenz in der Altersgruppe von 40 bis 79 Jahren von 2.9% (Frauen 2.5%; Männer 3.3%). Im Alter von 70 bis 79 Jahren steigt sie auf 6.3% bei Frauen und 8.1% bei Männern (Busch et al. 2013) an. Der Schlaganfall ist eine zunehmende Herausforderung für die weltweite Gesundheitsversorgung mit weitreichenden sozioökonomischen Folgen.

Der ischämische Schlaganfall ist die häufigste Form, gegenüber dem Hämorrhagischen, mit einem Anteil von 80% (Benjamin et al. 2017), und er ist zumeist thromboembolischer Genese (Grau et al. 2001).

Die Versorgung des Schlaganfalls hat sich kontinuierlich verbessert. Er wird als ein medizinischer Notfall, bei dem akuter Handlungsbedarf besteht, direkt in spezialisierten Abteilungen, den sog. *Stroke Units* behandelt, analog zu den *Chest-Pain-Units* beim akuten Myokardinfarkt. Ein schnelles Erkennen der Symptome und eine anschließende Diagnostik, in erster Linie die kraniale Computertomographie und ggf. eine zeitnahe Therapieeinleitung sind entscheidend.

In den letzten Jahren haben sich die therapeutischen Möglichkeiten des Schlaganfalls erweitert. Im Rahmen eines Zeitraumes bis 4.5 Stunden nach Eintreten der ersten Symptome, besteht die Möglichkeit, eine systemische Thrombolysetherapie mit rekombinantem gewebe-spezifischem Plasminogenaktivator (rtPA) vorzunehmen (Hacke et al. 2008). Seit 2015 wird von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie in ihren Behandlungsleitlinien auch die interventionelle Therapie mittels Katheter-gestützter mechanischer Thrombektomie zur Rekanalisation empfohlen (Leitlinie Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls 2012 und Er-

gänzung von 2015). Mehrere publizierte Studien zeigten 2015 ein deutlich verbessertes Endergebnis des Patienten nach mechanischer Rekanalisation (Berkhemer et al. 2015; Campbell et al. 2015; Goyal et al. 2015; Jovin et al. 2015). Dies gilt bei einem klinisch relevanten Defizit und einem großen arteriellen Gefäßverschluss innerhalb von 6 bis 8 Stunden nach Symptombeginn und sollte möglichst mit einer systemischen Thrombolysetherapie im 4.5-Stunden-Zeitfenster erfolgen (Leitlinie Ergänzung zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls 2015). Sogar spätere Zeitfenster für die Intervention von bis zu 24 h konnten mit positivem Ergebnis demonstriert werden (Jovin et al. 2017).

Beide Therapieoptionen sind allerdings nur für ein enges Zeitintervall, unter dem Vorbehalt einer schnellen Patienteneinweisung, möglich, beinhalten je eine Reihe von Kontraindikationen und sind daher nur in einem begrenzten Patientenkollektiv einsetzbar. Das mittlerweile immer höhere Alter der Bevölkerung und daher bestehenden Komorbiditäten und Medikationen limitieren die Indikationsstellung zusätzlich.

So bleiben letztendlich Maßnahmen der Sekundärprävention, wie die Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren, Thrombozytenaggregationshemmer und die Behandlung einer Dyslipidämie mittels Statinen (Leitlinie Sekundärprophylaxe ischämischer Schlaganfall und TIA 2015). Für die Zeit nach dem Hirninsult ist der Beginn einer frühen Neurorehabilitation, bestehend aus Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie und Schulungen, vorrangig.

Ziel der akuten Therapie des ischämischen Schlaganfalls ist, die Dauer der Ischämie zu reduzieren und möglichst rasch wieder eine Perfusion herzustellen und dadurch die Ausbreitung des ischämischen Areals zu minimieren.

Das Konzept der Neuroprotektion dagegen zielt darauf ab, das Sterben des Gewebes zur verringern, die Resistenz gegenüber der Ischämie und der folgenden Inflammationsreaktion zu erhöhen und dadurch funktionelle Defizite im Verlauf zu senken. Für die Entwicklung neuroprotektiver Konzepte sind Kenntnisse der pathophysiologischen Vorgänge nach Ischämie wichtig, insbesondere um gezielte pharmakologische Ziele zur Intervention zu finden.

Für das Ausmaß der neurologischen Folgen eines Schlaganfalls sind pathophysiologische, inflammatorische und immunologische Reaktionen auf Grund der Ischämie im Gehirngewebe entscheidend (Iadecola und Anrather 2011).

Zwar wurden schon einige potenziell neuroprotektive Substanzen auf Basis der pathologischen Vorgänge im ischämischen Schlaganfall entwickelt und erfolgreich experimentell an Tiermodellen getestet, aber translationale Studienergebnisse an Patienten blieben bisher erfolglos (O'Collins et al. 2006).

Demzufolge könnten die therapeutischen Möglichkeiten des ischämischen Schlaganfalls durch weitere Forschung zur Pathophysiologie und Immunologie erweitert werden, um dadurch neue Optionen für eine langfristige neuroprotektive Therapie und Verbesserung des neurologischen Defizits nach Schlaganfall zu finden. Die Zukunft der Therapiemöglichkeiten könnte somit eine Kombination aus Akuttherapie, Neuroprotektion und Neurorehabilitation sein.

1.1.2 Pathophysiologie und Inflammation im ischämischen Schlaganfall

Die pathophysiologischen und biochemischen Folgen des ischämischen Insults sind weiterhin nicht in allen Punkten vollständig geklärt (Anrather und Iadecola 2016).

Durch die Minderperfusion im ischämischen Hirnareal entsteht ein zentrales nekrotisches Gebiet, welches von einer sich in Gefahr befindenden Zone umgeben ist, die Penumbra. Die Penumbra ist noch unvollständig infarziert, hat eine teilweise erhaltene Perfusion und ist das primäre Ziel der Reperfusionstherapie. In diesem Areal wird durch die Ischämie eine Fülle an pathophysiologischen Reaktionen als Kaskade ausgelöst (Dirnagl et al. 1999).

Die Hauptbestandteile der Reaktions-Kaskade (Abbildung 1) sind, neben nekrotischen Vorgängen, die in der Frühphase wichtige Exzitotoxizität, die Peri-Infarkt-Depolarisation und die für die Spätphase entscheidende Inflammation und Apoptose im Bereich der Penumbra (Dirnagl 2012).

Durch die Ischämie kommt es auf zellulärer Ebene zu einem massiven Energieverbrauch mit gleichzeitig durch den Mangel an Sauerstoff und Glukose nicht stattfindender oxidativer Phosphorylierung, was einen Mangel an Adenosintriphosphat (ATP) zur Folge hat. Das Membranpotenzial der Neuronen und Gliazellen wird unter normalen Bedingungen vorrangig durch sekundär-aktiven Ionen-transport aufrechterhalten, was jedoch durch den verringerten ATP-Vorrat gestört ist. Der Verlust des Ionengradienten führt zu einer Depolarisation der Zellmembran und über spannungsgesteuerte Ionenkanäle zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration. Die Calciumionen dienen als Stimulus zur Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern an den Synapsen, vor allem zu einer Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt. Es kommt zu einer Überaktivierung von *N*-Methyl-*D*-Aspartat (NMDA)- und α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptoren, welche zu einer Erhöhung der intrazellulären Natrium- und Chlorid-, wie auch Calciumionenkonzentrationen an der Postsynapse führen. Diese Osmolaritätsverschiebung bewirkt einen passiven Wassereinstrom, was die Ausbildung einer gefürchteten

Komplikation des Schlaganfalls, des Hirnödems fördert. Die Gefahren darin liegen vor allem in der Erhöhung des intrakraniellen Drucks, einer Mittellinienverlagerung und Herniationen vom Hirngewebe. Diese spielen eine entscheidende Rolle bezüglich der Überlebenschancen sowie der Eintrittswahrscheinlichkeit von möglichen bleibenden neurologischen Defiziten.

Die oben beschriebene synaptische Überstimulation wird als Exzitotoxizität bezeichnet (Moskowitz et al. 2010). Die Exzitotoxizität ist häufig als ein Förderer des Gewebeschadens, Initiator von Nekrose und Apoptose wie auch dadurch von post-ischämischer Inflammation beschrieben worden (Dirnagl et al. 1999).

Ischämische Neurone und Gliazellen depolarisieren durch die vom Verlust an ATP ausgelösten Elektrolytverschiebungen und führen zu einem Anstieg exzitatorischer Neurotransmitter.

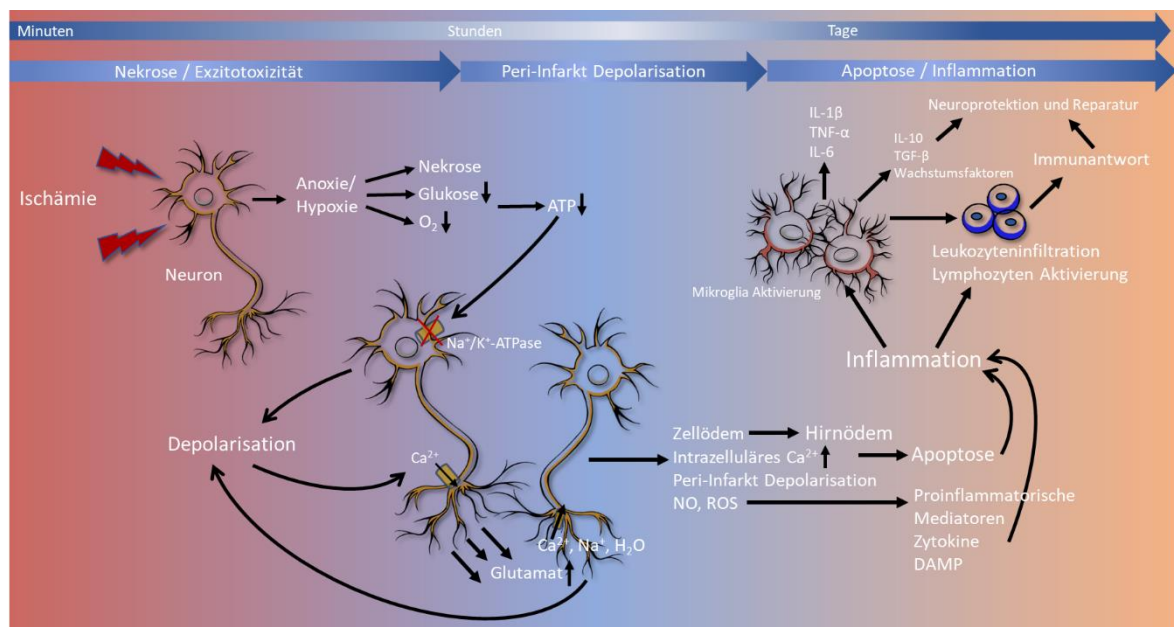


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathophysiologie nach ischämischem Schlaganfall.

Nach fokalem ischämischen Schlaganfall wird eine Kaskade an Gewebsreaktionen ausgelöst (Dirnagl et al. 1999; Iadecola und Anrather 2011). Innerhalb von Minuten führt die Hypoxie zu einer Nekrose der neuronalen Zellen im Infarktkern. In der Penumbra entsteht durch den Mangel an Glukose und Sauerstoff eine Suppression der Glykolyse und dadurch Mangel an ATP. Die Elektrolytverschiebung durch einen Ausfall der Na^+/K^+ -ATPase führt zu einer Depolarisation der Zellmembran, diese zur Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen und das zur exzessiven Sekretion von Glutamat in den synaptischen Spalt. Die Überstimulation mit Glutamat (Exzitotoxizität) führt zur Öffnung von weiteren Calcium- und Natriumionenkanälen, dies wiederum zur erneuten Depolarisation (Peri-Infarkt-Depolarisation) und einer osmotisch bedingten Einschwemmung von Wasser, welches im Hirnödem mündet. Die erhöhte intrazelluläre Calciumionenkonzentration führt zur Apoptose und Entwicklung von NO und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Das führt zur Bildung von proinflammatorischen Mediatoren und *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMP). Diese Faktoren leiten eine Inflammationsreaktion ein, mit Aktivierung von Mikroglia, Leukozyteninfiltration ins Gewebe und einer Immunreaktion. Die Immunzellen produzieren proinflammatorische Interleukine (IL-6, IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Allerdings werden auch neurotrophe, immunsupprimierende und neuroprotektive Faktoren gebildet, wie IL-10, *Transforming Growth Factor*- β (TGF- β) und Wachstumsfaktoren, welche innerhalb von Tagen bis Wochen eine Narbenbildung und die Reparatur des geschädigten Areal fördern.

Im Kerngebiet des Infarkts kommt es nicht mehr zu einer Repolarisation, da hier das Energiedefizit zu groß ist. Im noch perfundierten Bereich der Penumbra können die Zellen unter hoher Energieaufwendung wieder repolarisieren, die weiterhin vorhandene Elektrolytverschiebung führt aber zur erneuten Depolarisation. Diese wiederholten Depolarisationen werden als Peri-Infarkt-Depolarisationen bezeichnet (Dirnagl et al. 1999). Ohne Behandlung und mit der Zeit führen die Exzitotoxizität und die Peri-Infarkt-Depolarisationen zu einer Ausweitung des infarzierten Bereiches, bis auch die gesamte Penumbra betroffen ist.

Die Ischämie fördert einen Anstieg von Calciumionen, welche intrazellulär als *second messenger* auftreten. Das führt zu einer vermehrten Ansammlung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) intrazellulär, u. a. durch die Aktivierung der calciumabhängigen NO-Synthase und einem vermehrten Anfall von NO (Anrather und Iadecola 2016). Darum wird die innere Mitochondrienmembran geschädigt und porös. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom C, welches die intrinsische Apoptosekaskade in Gang setzt. Außerdem führen inflammatorische migrierte Zellen und Zytokine zur Auslösung extrinsischer Apoptosewege im Bereich der Penumbra (Iadecola und Anrather 2011).

Durch die Perfusionsstörung dominiert im Infarktkern ein akutes Energiedefizit, welches zum Verlust des Ionengradienten der Membran beiträgt. Das resultiert in einer mitochondrialen Dysfunktion durch intrazelluläre Proteasen-, Lipasen- und Ribonukleasen-Aktivierung, was die Zellintegrität und ihre Strukturen zerstört und zur Nekrose führt (Moskowitz et al. 2010).

Neben apoptotischen Ereignissen ist die Post-Infarkt-Inflammation entscheidend für die klinische Entwicklung des Schlaganfalls Stunden bis Tage nach der Ischämie. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration, ROS und Hypoxie führen zur Induktion einer Reihe proinflammatorischer Gene. Es kommt zur Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α oder IL-1 β sowie Chemokinen durch intravaskuläre Leukozyten und durch das Hirnparenchym (Iadecola und Anrather 2011). Diese fördern die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten ca. 4-6 Stunden nach Beginn der Ischämie, wie auch die von später einwandernden Lymphozyten (Anrather und Iadecola 2016).

Die Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen und nekrotischem Material durch die gefährdeten Zellen sowie diverse Vorgänge der Nekroptose und Pyroptose triggern sowohl das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem und führen zu einer Inflammationskaskade. Zytokine und von sterbendem neuronalem Gewebe freigesetzte Zellbestandteile (u. a. ATP, *Heat Shock Proteins*, Katabolite), die als *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMP) wirken (Anrather und Iadecola 2016) und weitere proinflammatorische Stoffe (u.a.

Thrombin, Anaphylatoxine) aktivieren das angeborene Immunsystem, beispielsweise durch *Toll-like-Rezeptoren* und das *Inflammasom* (Trendelenburg 2014). Über das angeborene Immunsystem, vor allem das Komplementsystem (Alawieh et al. 2015), wird auch das adaptive Immunsystem angeregt. Durch den regionalen Verlust der Blut-Hirn-Schranke kommt es zu einer Migration immunkompetenter Zellpopulationen ins geschädigte Gewebe.

Trauma, neuronaler Schaden und neurodegenerative Erkrankungen führen zu einer Aktivierung residenter Astrozyten, was als reaktive Astrogliose bezeichnet wird (Sofroniew 2005). Dieses beinhaltet eine zelluläre Hypertrophie, Proliferation und Expression von inflammatorischen Genen. Das scheint zwei Seiten zu haben: Zum einen werden neuronale Regeneration und Proliferation durch inhibitorische Proteine gehemmt, andererseits fördert eine Migration von Astrozyten die Bildung einer astroglialen Narbe, welche die Regeneration fördert (Yiu und He 2006). Außerdem scheint es eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Exzitotoxizität inne zu haben.

Im Laufe von Stunden nach der Ischämie kommt es zu einer Einwanderung von monozytären Zellen in das Infarktareal und zu einer Aktivierung residenter Mikroglia. Neben ihren akuten proinflammatorischen Eigenschaften scheinen sie auch einen längerfristigen neuroprotektiven Effekt im ischämischen Hirnareal zu haben (Anrather und Iadecola 2016).

Relativ früh wandern die neutrophilen Granulozyten ebenfalls ins infarzierte Gewebe. Sie weisen eine proinflammatorische Wirkung auf und verstärken die Neurotoxizität durch Produktion von ROS, Zytokinen und Matrix-Metalloproteinasen (Rosell et al. 2008).

Lymphozyten, wie B- oder T-Zellen, zeigen sowohl neuroprotektive, regeneratorsche Eigenschaften, wie z.B. regulatorische T-Zellen durch IL-10 Sekretion, aber auch schädliche Wirkungen wurden beschrieben, sodass hier die Rolle unklar bleibt (Iadecola und Anrather 2011).

DAMP und Zytokine können sich über die gestörte Blut-Hirn-Schranke im Körper ausbreiten und verursachen Stunden nach dem Schlaganfall letztendlich eine systemische transiente Inflamationsreaktion (Anrather und Iadecola 2016). Die frühe Reaktion des Immunsystems und die systemische Immunantwort auf einen ischämischen Insult wandeln sich Tage nach Infarkt zu einer Immunsuppression um, welche dann die Gefahr von Infektionen vergrößert (Hoffmann et al. 2016a). Bei 20% der Patienten äußert sich das in pulmonalen oder urogenitalen Infekten nach einem Hirninfarkt (Langhorne et al. 2000).

Die Post-Infarkt Inflammation hat einen großen Einfluss auf das weitere Krankheitsgeschehen nach einem Schlaganfall.

Durch die Erforschung der pathophysiologischen Faktoren kann die Entwicklung von pharmakologischen Therapeutika weiter gefördert werden. Ein wichtiges Ziel zukünftiger Interventionen sollte vor allem die Modulation der Inflammation und Neurodegeneration nach ischämischem Schlaganfall sein, um eine effektive Neuroprotektion zu ermöglichen und eine Neurorehabilitation zu fördern. Dies ist momentan ein Fokus experimenteller Schlaganfallforschung.

Ein mögliches Therapeutikum könnte genau in diesem Punkt Metallothionein sein.

1.2 Metallothionein im ischämischen Schlaganfall

1.2.1 Struktur und Funktionen von Metallothioneinen

Erstmals wurden Metallothioneine 1957 in Pferdenieren bei der Erforschung der renalen Ausscheidung von Cadmiumionen als Transportproteinen beschrieben (Margoshes und Vallee 1957). Seitdem sind die genauen Funktionen dieser Proteinklasse trotz intensiver Forschung noch unklar geblieben (Santos et al. 2012).

Metallothioneine (MTs) sind eine 6-7 kDa kleine intrazelluläre Proteinfamilie, werden ubiquitär exprimiert und sind in allen Organismen stark konserviert erhalten (Vallee 1995). Durch ihren hohen Cystein-Gehalt (Abbildung 2b), ca. 10%, sind sie reich an Thiol-Gruppen und können zweiwertige Metallionen komplexieren, was zu ihrer Namensgebung geführt hat. Sie sind für die Detoxifikation von Schwermetallen wichtig, wie Quecksilber-, Cadmium- und Silberionen, aber auch für den physiologischen Haushalt von Kupfer- und Zinkionen (Vašák und Meloni 2011).

Sie haben eine Primärstruktur von 61-68 Aminosäuren Länge, bei Abwesenheit von aromatischen Aminosäuren (Kagi und Vallee 1961). In Säugetieren weisen MTs strukturell eine C-Terminale α - und eine N-Terminale β -Domäne auf, die jeweils drei bzw. vier Metallionen binden können (Vašák und Meloni 2011), sodass ein MT sieben Metallionen chelatieren kann (Abbildung 2a). Die siebenfach zinkgebundene Zn_7 -MT Form dominiert physiologisch in *Mammalia*.

Es sind vier Isotypen des Metallothioneins bekannt (MT-I bis MT-IV). MT-I kommt beim Menschen in sieben Subtypen vor und MT-II besitzt einige Pseudogene (Vašák und Meloni 2011), wobei nur MT-IIa exprimiert wird (Coyle et al. 2002). Bei den *Rodentia* bestehen orthologe Formen, allerdings existieren für die Typen I-IV keine Subtypen (Palmiter et al. 1992).

MT-I und MT-II werden in fast allen Geweben gebildet, weisen hohen Homologien in ihrer Sequenz auf, wie auch ähnliche Expressionsprofile und Funktionen. Daher werden sie oft als eine Isoform MT-I/II bezeichnet (Chung et al. 2008).

MT-III ist vorwiegend im ZNS lokalisiert (Howells et al. 2010), und MT-IV scheint nur in verhorntem und unverhorntem Plattenepithel vorhanden zu sein, kaum exogene Induktoren zu besitzen und ansonsten bei der Gewebeentwicklung eine Funktion zu haben (Schlake und Boehm 2001).

Alle MT-Gene befinden sich beim Menschen auf Chromosom 16, bei Mäusen auf Chromosom 8. Menschen weisen einen hohen Polymorphismus an den Genloci auf, während bei Mäusen nur vier Gene existieren (Coyle et al. 2002). Die Transkription der MT Gene wird

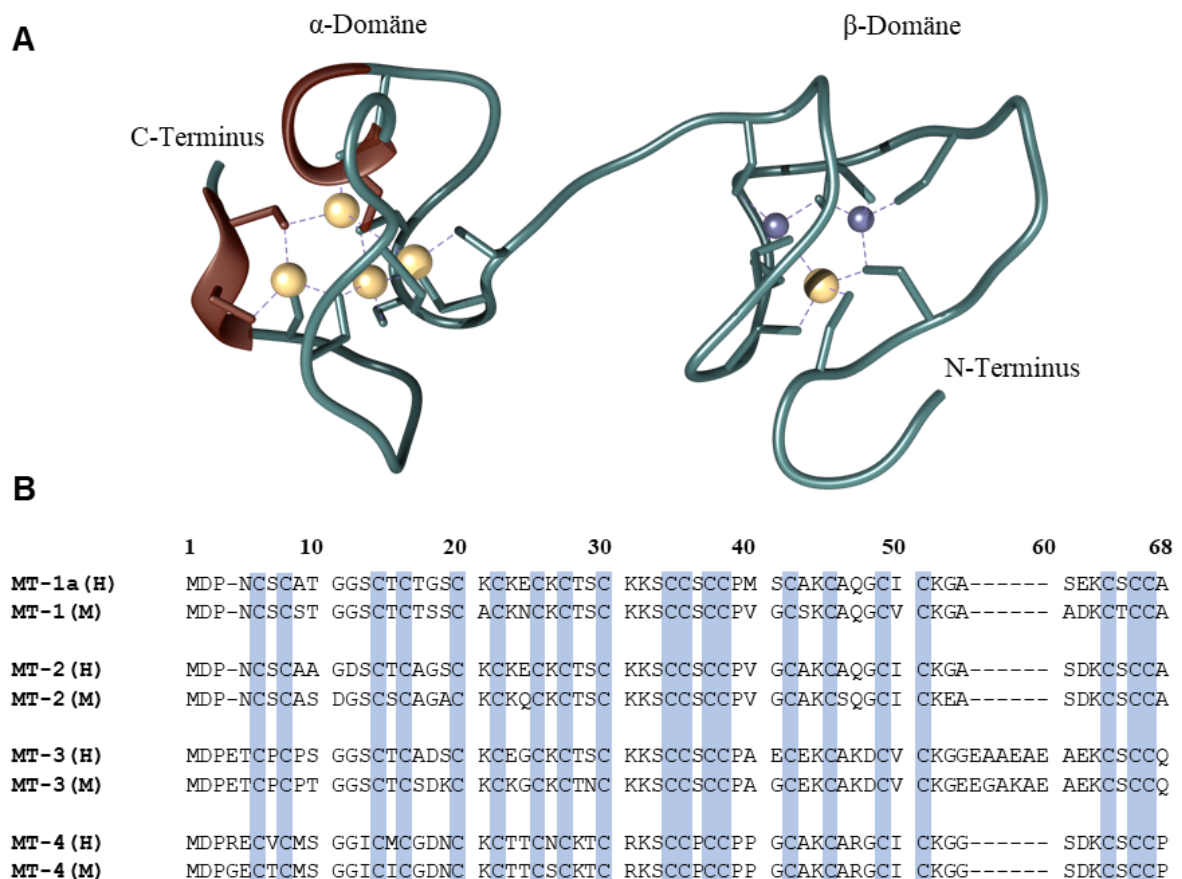


Abbildung 2: 3D-Proteinstruktur von Metallothionein-II und Vergleich der Primärstrukturen von humanen und murinen MT.

(A) 3D-Struktur von Zn_2Cd_5 -MT-II von *Rattus rattus* ermittelt durch Röntgenstrukturanalyse (Braun et al. 1992). Die Cadmiumionen sind als gelbe Kugeln dargestellt, die Zinkionen als blaue Kugeln. β -Faltblatt-Sekundärstrukturen sind dunkelrot markiert. Komplexbindungen durch die Cysteinyliganden sind als blaue gestrichelte Linien zu erkennen. Das Protein besteht aus einer C-Terminalen α -Domäne, welche vier Metallionen binden kann und einer N-Terminalen β -Domäne, die drei Metallionen bindet. Die 3D-Grafik wurde mittels UCSF Chimera Version 1.11.2 erstellt, unter der Verwendung der Koordinaten von 4MT2 aus der Protein Data Bank (Zugriff: 11.05.2017) (B) Alignment der Primärstrukturen der vier MT Isoformen zwischen humanem (H) und murinem (M) MT. Die konservierten Cysteinreste sind blau hervorgehoben. Das Alignment wurde durchgeführt mit Clustal Omega (Zugriff: 11.05.2017).

über einen eigenen Transkriptionsfaktor, den *Metal-responsive Transcription Factor 1* (MTF-1) reguliert (Andrews 2000; Zhang et al. 2001).

MT-I/II kann durch verschiedene Faktoren induziert werden. Die Promoterregionen der MT-I/II-Gene weisen mehrere Bindungsstellen für Rezeptoren auf (*Hormone Responsive Elements*). Es sind Regionen für Metallionen (*Metal Response Elements*), Glukokortikoide (*Glucocorticoid Response Elements*), wie auch für reaktive Sauerstoffspezies in Form von *Antioxidant Responsive Elements* und für STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)-Proteine (Miles et al. 2000; Haq et al. 2003) vorhanden. Mögliche Induktoren sind demnach zellulärer Stress (Saydam et al. 2001), Metallionen und allen voran: Zink, Cadmium und Kupfer, Zytokine, wie IL-6, IL-1 β und TNF- α (Pedersen et al. 2009), Inflammation und ROS (Samson und Gedamu 1998). MT-I/II wird außerdem über Glukokortikoide induziert (Etzel und Cousins 1981). Hauptinduktor bleibt die Erhöhung einer Metallionenkonzentration von Cadmium- oder Zinkionen (Cherian und Nordberg 1983).

Die Proteinlokalisierung ist vorwiegend intrazellulär zytoplasmatisch. MT-I/II kann unter Aktivierung allerdings nukleär transloziert werden (West et al. 2011). Dort weist MT-I/II einen antioxidativen Effekt zum Schutz der DNA auf und ist in der Lage, durch die zinkbindenden Eigenschaften Zink-abhängige Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen (Miles et al. 2000) und so direkte Wirkung auf die Genexpression zu haben (Zeng et al. 1991; Vašák und Meloni 2011).

MT-I/II ist vorrangig zur Entgiftung und Homöostase von Metallionen besonders wichtig. Es hat eine hohe Affinität zu Schwermetallionen, wie Cadmiumionen, kann diese chelatieren und zur Exkretion der Niere zuführen. Dabei wird es in der Niere frei filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert (Nordberg et al. 1971). Der Hauptbildungsort für im Plasma zirkulierendes MT-I/II ist die Leber. Hier werden MTs bei Belastung mit Schwermetallionen, wie Cadmiumionen, vermehrt gebildet (Pankhurst et al. 2012) und dienen im Plasma als Komplexbildner. Die Konzentration von MT-I/II in der Leber steigt mit zunehmender Belastung an Schwermetallionen an und wirkt dagegen protektiv: Maus-Modelle mit einer MT-I Überexpression waren gegenüber Schwermetallintoxikationen geschützt (Coyle et al. 2002).

Im physiologischen Milieu werden Zink- und zu einem Teil auch Kupferionen mit einer hohen Affinität gebunden, sodass MT bei der Homöostase dieser Metallionen eine besondere Rolle spielt. In *Mammalia* sind vor allem die zinkgebundenen MTs (Zn₇-MT) dominierend

(Vašák und Meloni 2011). Zink kommt in allen Geweben des Körpers vor und ist in mehreren Proteinen vorhanden. Insbesondere in Transkriptionsfaktoren als Zink-Finger-Domäne, als Kofaktor für katalytische Prozesse bei einer großen Anzahl von Enzymen, in Zink-Transportproteinen und in makromolekularen Komplexen haben Zinkionen im Organismus eine große Bedeutung (Maret und Li 2009). MTs sind maßgeblich an der Zinkhomöostase im Körper beteiligt (Vašák und Meloni 2011).

Pathophysiologische Bedeutungen von Metallothioneinen liegen in Metallstoffwechselstörungen, wie der Itai-Itai-Krankheit (Baba et al. 2013), Menkes-Krankheit (Kelly und Palmiter 1996) oder Morbus Wilson (Nakazato et al. 2014). In Tumorerkrankungen sind durch klinische Studien schon die Möglichkeiten von Metallothionein als Tumormarker (Krizkova et al. 2011) und als Überwachungsparameter zur Toxizität bei Chemotherapien diskutiert worden (Cherian et al. 1994; Dziegiel et al. 2016; Heger et al. 2016).

Es wurden auch Versuche unternommen, Metallothionein als Biomarker für Cadmium-Intoxikationen (Chen et al. 2006) oder des Zinkhaushaltes zu etablieren.

Durch die vielen Thiol-Gruppen können ROS reduziert werden, daher hat MT-I/II eine antioxidative Wirkung (Sato und Bremner 1993).

Außerdem konnten antiapoptotische Eigenschaften durch Repression von p53 (Ostrakhovitch et al. 2006) und proapoptotischen Caspasen (Reinecke et al. 2006) und durch die Induktion antiapoptotischer Faktoren (Tekur und Ho 2002), welche DNA-protektiv wirken (Cai et al. 1995), gezeigt werden.

MT-I/II zeigt eine stark antiinflammatorische und immunmodulierende Wirkung (Manso et al. 2011). Verschiedene inflammatorische Zytokine können zu einer Expressionssteigerung von MT-I/II führen (Sato et al. 1994).

MT-III dagegen wird kaum durch Metallionen oder andere Faktoren in seiner Expression reguliert und scheint insbesondere in neurodegenerativen Krankheiten wie der Demenz vom Alzheimer Typ protektiv zu wirken (Kobayashi et al. 1993). Es inhibiert neuronales Wachstum und wurde daher als *Neuronal Growth-inhibitory Factor* bei seiner Entdeckung bezeichnet (Uchida et al. 1991). Zwar zeigt MT-III - im Gegensatz zu MT-I/II - eher inhibitorische und wachstumshemmende Eigenschaften, allerdings schützt MT-III über seine Kupferaffinität vor der Alzheimer Krankheit (Meloni et al. 2007). Außerdem scheint die MT-III Konzentration im Liquor als biologischer Marker für die Progredienz der Alzheimererkrankung prognostisch relevant sein (Hölttä et al. 2015).

MT-III wird sowohl in Neuronen, vorwiegend in den zinkreichen Neuronen des Hippocampus, wie auch in Astrozyten gebildet (Howells et al. 2010). Weitere Bildungsorte sind der

Cortex, die Amygdala und das Cerebellum (Masters et al. 1994). Zwar scheint eine neuroprotektive Wirkung in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinsonerkrankung (Meloni und Vašák 2011) sicher, allerdings bleibt seine Funktion in neuroinflammatorischen Krankheiten weiterhin unklar: Im ischämischen Insult zeigten Daten an Mäusen im transienten Ischämie-Modell, dass MT-III inhibierend auf das Zellwachstum wirkt und den Schaden vergrößert (Koumura et al. 2009). Eine Injektion von MT-III bei fokaler ischämischer Hirnschädigung an Mäusen zeigte eine Abnahme neurotropher und neuroprotektiver Faktoren im Sinne einer Verschlimmerung im Gegensatz zu einer MT-I/II-Injektion (Penkowa et al. 2006). MT-III-*Knockout*-Mäuse zeigen dagegen im transienten zerebralen Ischämie-Modell einen größeren neuronalen Schaden, verglichen zu Wildtyp-Mäusen (Koumura et al. 2009). Durch diese widersprüchlichen Daten bleibt die neuroprotektive Rolle von MT-III in der akuten Inflammation weiterhin unklar (Santos et al. 2012).

Ein weiterer klinisch bedeutsamer Bereich ist die neuroprotektive Wirkung von MT-I/II (Ambjørn et al. 2008), da mehrere Hinweise darauf existieren, dass MT-I/II vorwiegend bei akuten neuronalen Schäden wie Ischämien und Inflammationen schützend wirkt (Chung et al. 2008).

1.2.2 Neuroprotektive Effekte von MT-I/II

MT-I und MT-II sind die meist untersuchten Isoformen. Die Studien belegen eine besondere neuroprotektive Wirkung von MT-I/II. Auf Grund ihrer strukturellen Gleichheit sind MT-I und MT-II auch in ihrer Funktion als ähnlich zu betrachten (Chung et al. 2008).

MT-I/II wird im Gehirn vorwiegend von Astrozyten gebildet, zu einem geringen Teil auch durch Neuronen und Ependymzellen (Santos et al. 2012). Die Transkription wird bei Anwesenheit von Cadmium- und Zinkionen, sowie auch unter Vorliegen von neurodegenerativen und akut neuroinflammatorischen Prozessen induziert (Pedersen et al. 2009).

MT-I/II wird in mehreren Erkrankungen stark von den Zellen gebildet, u. a. bei der Amyotrophen Lateralsklerose (Blaauwgeers et al. 1996), Alzheimer-Erkrankung (Carrasco et al. 2006) und im ischämischen Insult (Trendelenburg et al. 2002).

Beim ischämischen Schlaganfall wurde die Bedeutung von MT-I/II in mehreren Versuchen gezeigt. Ein genetisch verändertes Mausmodell mit einer MT-I Überexpression zeigte verringerte neurologische Schäden beim transienten Verschluss der *A. cerebri media* der Maus im *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)-Modell im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

(van Lookeren Campagne et al. 1999). *MT-I/II-Knockout*-Mäuse zeigten vergrößerte Infarktareale gegenüber Wildtyp-Mäusen (Wakida et al. 2007) im MCAO-Modell und *MT-II* stellte sich als das am meisten induzierte Gen während eines ischämischen Hirnschadens dar (Trendelenburg et al. 2002).

MT-I/II-Knockout-Mäuse weisen außerdem eine Aggravation der Inflammation, des oxidativen Stresses, der Apoptoserate und eine schlechtere Bildung einer astroglialen Narbe bei Hirnschädigung auf (Penkowa et al. 1999).

Vielfache experimentelle Daten stützen daher die Annahme einer neuroprotektiven Rolle von *MT-I/II* im ischämischen Schlaganfall.

1.2.3 Extrazelluläre *MT-I/II* im ZNS

Die neuroprotektiven Wirkungen von *MT-I/II* wurden in mehreren Experimenten nicht nur für endogenes intrazelluläres *MT* gezeigt, sondern auch für extrazelluläres, sezerniertes *MT* im ZNS und für Injektionen von xenogenem *MT-I/II* bei Tieren (Santos et al. 2012).

Eine Sekretion von *MT-I/II* in den Extrazellularraum konnte schon in der Leber recht früh nachgewiesen werden (Nordberg und Nordberg 1975) und *MT-I/II* sowohl im Plasma als auch im Urin isoliert werden (Nordberg et al. 1982).

Daher stellte sich die Frage, ob Metallothionein im extrazellulären Raum des ZNS vorkommt und wenn, ob dieses von Zellen des ZNS selbst sezerniert wird.

Es gelang ein Nachweis von *MT-I/II* im Liquor (Gonçalves et al. 2008), und es konnten die Astrozyten als Sekretionsort bei Gewebsschäden identifiziert werden (Ambjørn et al. 2008). Das von den Astrozyten sezernierte *MT-I/II* hat eine wichtige Funktion in der inflammatorischen Regulation von Neuronen und wird von diesen erkannt und aufgenommen (Ambjørn et al. 2008).

Zu *MT-I/II* konnte bisher kein rein *MT-I/II* spezifischer Rezeptor festgestellt werden (Chung et al. 2008). Allerdings wird extrazelluläres *MT-I/II* von Neuronen aufgenommen. *MT-I/II* fungiert dabei als Ligand für die Apolipoprotein E (ApoE)-Rezeptoren *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1* und *2* (LRP1 und LRP2) aus der LDL-Rezeptor Familie (Herz 2009). Als Erstes wurde dies für die Rückresorption des Metallothioneins im proximalen Tubulus der Niere festgestellt (Klassen et al. 2004).

LRP2, auch Megalin genannt, wird vom *Plexus choroideus* (Christensen und Birn 2002) und von Neuronen exprimiert, LRP1 kommt in Astrozyten und Neuronen vor (Moestrup et al. 1992). Sowohl LRP1 wie auch Megalin detektieren in Neuronen *MT-I/II* und transduzieren

über deren Signalwege die neuroregenerativen, neuroprotektiven und wachstumsfördernden Funktionen von Metallothionein (Ambjørn et al. 2008). So wird das von Astrozyten sezernierte MT-I/II von Neuronen über LRP1 und Megalin erkannt und entfaltet hierdurch seine Wirkung (Abbildung 3).

Mögliche intrazelluläre Signalwege, die durch Metallothionein aktiviert werden, sind vorwiegend jene, die auch von Wachstumsfaktoren über membrangebundene Tyrosinkinase- oder Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase-Rezeptoren genutzt werden und welche auch von LRP1 und Megalin aktiviert werden können (Herz 2009). Ein Weg ist der Phosphoinositid-3 (PI3)-Kinase/Proteinkinase B-Weg, der durch die Aktivierung des *cAMP Response Element-binding Protein* (CREB) die dementsprechende Induktion der Transkription fördert (West et al. 2011). Es können weiterhin *Mitogen-activated Protein* (MAP)-Kinasen aktiviert werden, wie die *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK), wobei der ERK-1/2-Weg neurotrophe Faktoren aktiviert (Asmussen et al. 2009). Im Rahmen der von MT-I/II induzierten Astroglieose folgt die Aktivierung über Januskinasen (JAK)/STAT und Rho-Kinasen (Leung et al. 2010).

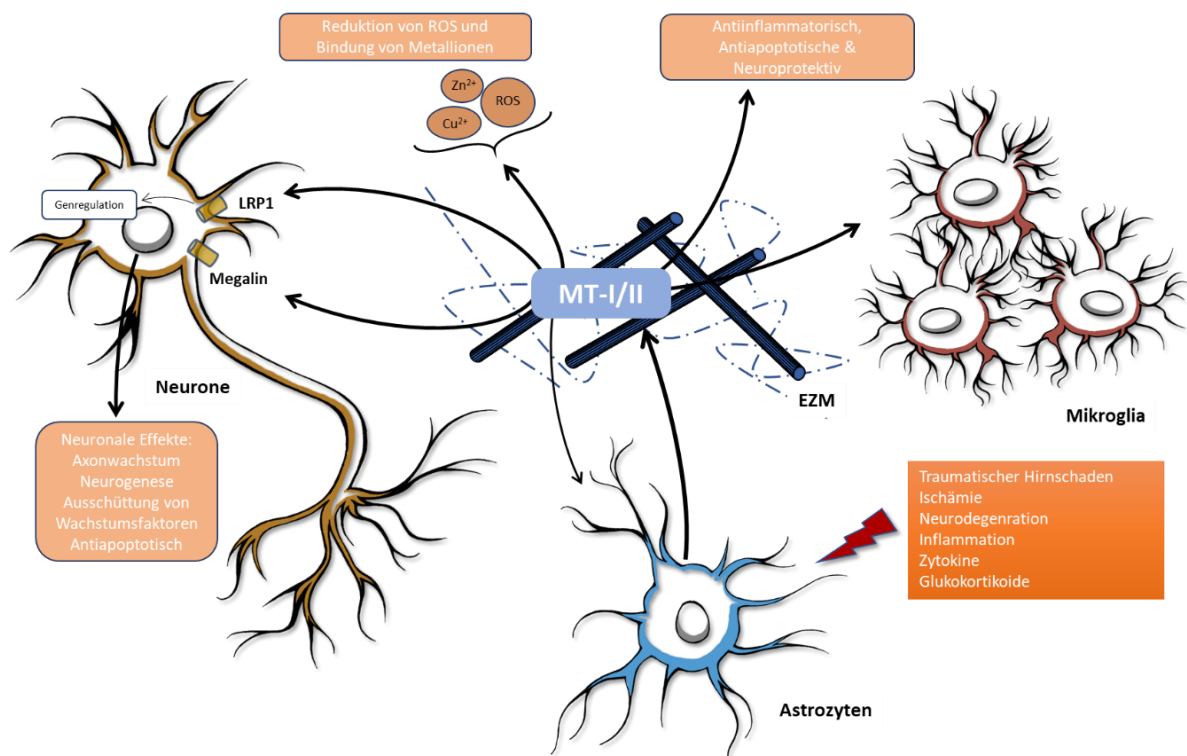


Abbildung 3: Neuroprotektive Effekte von extrazellulärem MT-I/II bei Inflammation und ZNS-Schaden.

Bei Inflammation oder Hirngewebsschäden wird von Astrozyten MT-I/II exprimiert und in die extrazelluläre Matrix (EZM) sezerniert. Das MT-I/II bindet daraufhin zweiwertige Metallionen, vor allem Zn²⁺- und Cd²⁺-Ionen, wirkt antioxidativ gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), hemmt die Aktivität von Mikroglia und beeinflusst direkt die Neuronen als Ligand des *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1* (LRP1) und des LRP2 (auch Megalin genannt). Dies wirkt neurotroph und antiapoptotisch und fördert die Neurogenese. Abbildung modifiziert nach Eidizadeh und Trendelenburg 2016.

Diese Transduktionsketten zeigen sich verantwortlich für die neuroprotektive, wachstumsfördernde und axonregenerierende Wirkung von MT-I/II. Es bleibt unklar, ob MT-I/II über Megalin internalisiert wird oder nicht (Chung et al. 2008).

Extrazelluläres Metallothionein beeinflusst auch weitere Zellen des Immunsystems, z. B. die Migration von Lymphozyten (Yin et al. 2005), Monozyten oder Mikroglia, deren Aktivität durch MT-I/II gehemmt wird (Chung et al. 2009). Über welchen Weg die Mikroglia-Interaktion mit MT-I/II stattfindet, bleibt weiterhin unklar, könnte jedoch über die LDL-Rezeptor-Familie erfolgen (West et al. 2011).

Isoliertes MT-I/II wurde in einigen Tierversuchen in therapeutischer Absicht appliziert und dessen Wirkung getestet. In Erkrankungen des ZNS konnte insbesondere bei neuroinflammatorischen und ischämischen Erkrankungen ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden (Santos et al. 2012).

Die Injektion von MT-IIa fördert die axonale Regeneration nach fokaler kortikaler Läsion bei Ratten (Chung et al. 2003). Die intraperitoneale Injektion von MT-II in Mäusen nach fokaler Kryoläsion des Neocortex förderte auch die Wiederherstellung des neuronalen Gewebes und eine Reduzierung der Apoptoserate von Neuronen und ist vergleichbar mit den Effekten von genetisch veränderten Mäusen mit einer MT-I-Überexpression (Giralt et al. 2002). Extrazelluläres MT-I/II fördert das axonale Wachstum dopaminerger und hippocampaler Neurone (Køhler et al. 2003) sowie kortikaler Neurone (Chung et al. 2003) und retinaler Ganglionzellen (Fitzgerald et al. 2007).

Intraperitoneal injiziertes MT-II gelangt bei Ratten nach 15-45 min in die Extrazellulärmatrix des Hirngewebes und hat dort eine Einwirkzeit von ca. 6-8 Stunden, bevor es nicht mehr nachweisbar ist (Giralt et al. 2002). Dies gilt allerdings nur für eine beschädigte Blut-Hirn-Schranke wie bei fokaler Hirnläsion, da bei intakter Blut-Hirn-Schranke gezeigt werden konnte, dass Metallothionein nicht liquorgängig ist (Lewis et al. 2012).

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass MT-I/II im ischämischen Schlaganfall therapeutisch nutzbar sein könnte.

1.3 Ziele der Arbeit

Obwohl es deutliche Anhaltspunkte für einen neuroprotektiven Effekt von MT-II nach ischämischer fokaler Läsion in mehreren Tiermodellen - auch in applizierter Form - gibt, wurde zu Beginn der Arbeit das therapeutische Potenzial einer MT-II-Injektion im Standardmodell der Schlaganfallforschung, dem transienten *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)-Modell an der Maus noch nicht erforscht.

Ziel dieser Arbeit ist es, dies durchzuführen und die therapeutischen Fähigkeiten von appliziertem MT-II an Mäusen im Faden-MCAO-Modell in drei Schritten zu evaluieren:

1. Mäusen wird MT-II intraperitoneal in zwei verschiedenen MCAO-Modellen mit jeweils unterschiedlicher Okklusions- und Reperusionszeit therapeutisch appliziert und der Effekt mit nicht behandelten Mäusen verglichen. Die möglichen Wirkungen werden sowohl verhaltensbiologisch in Form eines *Neuroscores* als auch in der histologischen Aufbereitung der Gehirne mit anschließender Infarktmetrie gemessen.
 2. Mikroskopische Effekte einer MT-II-Behandlung werden an immunfluoreszenzmarkierten Neuronen und Mikroglia von Hirnschnitten nach MCAO erforscht, indem das Ausmaß des Neuronenuntergangs erfasst wird. Außerdem werden aktivierte und migrierte Mikroglia gezählt als Hinweis auf die Aktivität des inflammatorischen Geschehens.
 3. Für molekularbiologische Aspekte einer MT-II-Behandlung wird die Genexpression ausgewählter proinflammatorischer Zytokine, MT-II und Megalin, mittels quantitativer *Real-Time-PCR* nach MCAO-Induktion gemessen.
-

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

	Hersteller
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth (Karlsruhe ¹)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt)
Distickstoffmonoxid (N ₂ O)	Air Liquide Medical GmbH (Düsseldorf)
Eosin G-Lösung, 1%	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol absolut	Merck (Darmstadt)
Ethanol vergällt	CVH (Hannover)
Ethidiumbromid-Lösung, 1%	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Hämatoxylin (Hämalaun nach Meyer)	Roth (Karlsruhe)
Isofluran	Abbott (Hannover)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Lidocain-Gel, 2%	AstraZeneca (Wedel)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl), 0.9% Injektionslösung	Braun (Melsungen)

¹ Firmensitz

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd (PFA), 4% Lösung	Roth (Karlsruhe)
<i>Roti-Histokitt II</i>	Roth (Karlsruhe)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Sauerstoff (O ₂)	Air Liquide Medical GmbH (Düsseldorf)
<i>Shandon Cryomatrix</i>	Thermo Fischer (Waltham, Massachusetts, USA)
<i>Shandon Immu-Mount Medium</i>	Thermo Fischer (Waltham, Massachusetts, USA)
<i>Triton X-100 (Octoxinol-9)</i>	Merck (Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl) (TRIS)	Merck (Darmstadt)
<i>TRIzol Reagent-Lösung</i>	Thermo Fischer (Waltham, Massachusetts, USA)
Xylol (Isomergemisch)	Merck (Darmstadt)
doppelt-deionisiertes Wasser (ddH ₂ O)	Arium Comfort, Sartorius (Göttingen)
normales Ziegenserum, 3%	Merck (Darmstadt)

2.1.2 Antikörper und Proteine

Primärantikörper

Anti-Iba1 monoklonales IgG aus der Maus	Merck Millipore (Darmstadt)
Anti-NeuN (Klon A60) polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen	Merck Millipore (Darmstadt)

Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege, konjugiert mit AlexaFluor488	Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pennsylvania, USA)
Anti-Maus IgG aus der Ziege, konjugiert mit Cy3	Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pennsylvania, USA)

Proteine

Zn₇-Metallothionein-II Enzo Life Sciences (Lörrach)
aus Kaninchenleber (hochgradige Aufreinigungsstufe)

2.1.3 PCR-Reagenzien

DNase I	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
DNA-Ladepuffer	Peqlab (Erlangen)
100 bp DNA Leiterstandard <i>peqGOLD</i>	Peqlab (Erlangen)
<i>iScript</i> cDNA <i>Synthesis Kit</i>	Bio-Rad (München)
<i>LightCycler</i> 480 SYBR <i>Green I Master-Mix</i> (2x)	Roche (Mannheim)
PCR- <i>Master-Mix</i> Y	Peqlab (Erlangen)

2.1.4 Puffer und Lösungen

In Eigenherstellung.

Phosphate-Buffered Saline (PBS)

140 mM NaCl, 2.7 mM KCl und 12 mM Gesamt-Phosphat (in Form von 10 mM Na₂HPO₄ und 1.8 mM KH₂PO₄); pH 7.6

TRIS-Buffered Saline (TBS)

50 mM TRIS, 150 mM NaCl; pH 7.6

TRIS-Acetat-EDTA-Buffer (TAE-Puffer)

0.4 M TRIS, 0.2 M Essigsäure, 0.01 M EDTA; pH 8.5

2.1.5 Oligonukleotide

Synthetisiert durch Eurofins Scientific (Hamburg).

<i>Primer</i> -Namen	Nukleotidsequenz (5' - 3')
----------------------	----------------------------

fwASC	AACTGCGAGAAGGCTATGGG
rvASC	GTCCACTTCTGTGACCCTGG
fwCaspase-1	CCCAGAAGTTATGGAAAGAAAATCCTTCAG
rvCaspase-1	GGATACCATGAGACATGAATACAAGGAAAG
fwHPRT	GGTTAAGCAGTACAGCCCCA
rvHPRT	TGGCCACAGGACTAGAACAC
fwIL-1 β	GGAAAGAATCTATACCTGTCCTGTGTAATG
rvIL-1 β	CATTAGAAACAGTCCAGCCCATACTTTAG
fwMegalin	CAGATACCATAACCAGTTTCTACTGTTCC
rvMegalin	AGAGAGTATGACGTGCCATCTATAGTTAAG
fwMT-II	CTAGAACTCTTCAAACCGATCTCTCGTC
rvMT-II	AAAGGCTAGGCTTCTACATGGTCTATTTAC
fwTNF- α	CCTCACACTCAGATCATCTTCTCAAATTC
rvTNF- α	CTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAAATCG

2.1.6 Laborgeräte, Reaktionsgefäße und Zubehör

	Hersteller
Axio <i>Examiner.Z1</i> Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
<i>DakoPen</i> , hydrophober Markierungsstift	Dako (Hamburg)
Deckgläschen	Thermo Fischer (Waltham, Massachusetts, USA)
Elektrophorese-Kammer, <i>Rothiphorese</i> -Kammer <i>PROfessional III</i>	Roth (Karlsruhe)
Elektrophorese-Netzgerät <i>Consort</i>	Turnhout (Belgien)
Eppendorf <i>Research plus</i> Pipetten (0.1-2.5 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l)	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf <i>ThermoMixer Comfort</i>	Eppendorf (Hamburg)

Geldokumentationssystem <i>Gel Doc XR+</i>	Bio-Rad (München)
Infrarot-Thermometer <i>Scantemp 385</i>	Roth (Karlsruhe)
Inkubator <i>Function-Line</i>	Heraeus (Hanau)
Kryotom CM3050S	Leica (Wetzlar)
<i>Light Cycler 480 II, Real-Time PCR Cycler</i>	Roche (Mannheim)
<i>NanoDrop 2000</i> Spektralphotometer	Thermo Fischer (Waltham, Massachusetts, USA)
Perfusionspumpe ISM596D	Ismatec (Wertheim)
pH-Meter PB-11	Sartorius (Göttingen)
Reagenzglasschüttler <i>Vortex Genie</i>	Roth (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1 ml, 2 ml) und Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße (50 ml, 100 ml)	BD (Heidelberg)
Reaktionsplatten für den <i>Light Cycler 480 II</i> mit 96 Kavitäten und fluoreszenzdurchgängiger Folie	STARLAB (Hamburg)
<i>Superfrost plus</i> polarisierte Objektträger	Thermo Fischer (Waltham, Massachusetts, USA)
Waage, BL3100	Sartorius (Göttingen)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.7 Operationszubehör

Geflochtener Faden <i>Mersilene</i> , 5-0 USP	Ethicon (Norderstedt)
Geflochtener Faden <i>Perma-Hand</i> Seide, 3-0 USP	Ethicon (Norderstedt)
Induktionskammer	Groppler Medizintechnik (Deggendorf)
Isofluran-Vernebler	Dräger (Lübeck)
Kaltlichtquelle KL 1500 HAL	Schott (Mainz)
Narkosesystem	Dräger (Lübeck)
Okklusionsfaden für das MCAO-Modell	Docol Corp. (Sharon, Massachusetts, USA)

monofilamentöser Faden, 6-0 USP, Länge 11 mm, 9-10 mm Silikonüberzug, Durchmesser 0.21 mm

Operationsbesteck FST (Heidelberg)
(Gefäßklemmen, Pinzetten, Präparier-Scheren, Mikrogefäßklemme, Moskitoklemmen, Nadelhalter, *Vannas*-Stil Federschere)

Operationsmikroskop *Stemi 2000C* Leica Zeiss (Oberkochen)

Temperierte Aufwachkammer V1200 Peco Services (Brough, Cumbria, England)

Temperierte Wärmematte Harvard Apparatus (Holliston, Massachusetts, USA)

2.1.8 Software

ImageJ NIH (Maryland, USA)

UCSF *Chimera*, Version 1.11.2 NIH (Maryland, USA)

GraphPadPrism, Version 5 La Jolla (USA)

LightCycler 480 Software, Version 1.5.0 SP4 *release* Roche (Mannheim)

MS *Office Software 365 Pro-Packet* Microsoft (USA)

ZEN Pro 2013 Software Zeiss (Oberkochen)

2.2 Methoden

2.2.1 *In-vivo*-Experimente

2.2.1.1 Tierhaltung und Abbruchkriterien der Versuche

Als Versuchstiere wurden Mäuse der Art *Mus musculus* des Inzuchtstammes C57Bl6/N verwendet. Die männlichen Mäuse im Alter von 8-10 Wochen wurden von Charles River (Köln) bezogen. Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Göttingen in *Individually Ventilated Cages* (IVC-Systeme) zu Gruppen von fünf Mäusen bei künstlichem Tag- und Nachtrhythmus mit Futter und Wasser *ad libitum*, unter stetiger Pflege und Kontrolle von Tierpflegern und Tierärzten des ZTE, gehalten. Die Tierversuche wurden genehmigt vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LaVeS) unter der Tierversuchsnummer 33.9-42502-04-12/0849. Sie erfolgten unter der Vorgabe der Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen der Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen wie auch nationalen und internationalen Vereinbarungen zum Tierschutz in der biomedizinischen Forschung (Stokes 2002). Die MCAO-Operationen erfolgten nach den Kriterien der *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* (STAIR) Gruppe (Fisher et al. 2009). Vor sämtlichen Eingriffen erfolgte nach Lieferung der Mäuse eine zweiwöchige Akklimatisierung an die gegebenen Käfigverhältnisse. Prä- und postoperativ wurden tägliche Gewichts- und Temperaturkontrollen sowie Verhaltensbeurteilungen (*Neuroscoring*) durchgeführt. Die Körpertemperatur wurde mittels Infrarotthermometer an der Schwanzbasis gemessen.

Die operierten Mäuse wurden eingehend beobachtet, da insbesondere die postoperative Phase der ersten vier Stunden als kritisch angesehen werden kann. Auftreten von Narkosebedingten Komplikationen wie Ateminsuffizienz, Asystolie, Anzeichen von Gefäßdissektionen und -rupturen oder intrazerebrale Blutungen wurden unverzüglich mit einem Abbruch des Experiments und der schmerzfreien Tötung der Mäuse behandelt. Als weitere Abbruchkriterien wurden im Verlaufe der Reperfusionzeit angesehen: ein Verlust des Ausgangsgewichtes von 20% und mehr; Anzeichen für erhebliche Schmerzen beim Tier; Paralysen, die die Gefahr mit sich bringen könnten, dass sich das Tier aus eigener Kraft nicht mehr ernähren kann; dunkle Verfärbung des Unterbauches und des Skrotums als Zeichen einer Blutung; Rektumprolaps; vollständige Hemiplegie und zusätzliche Hemiparese der kontralateralen Gliedmaßen; Tetraplegie und letztendlich ein moribunder Zustand. Diese hatten eine unverzügliche artgerechte schmerzlose Tötung des Tieres zur Folge.

2.2.1.2 Artgerechte Tötung der Versuchstiere und transkardiale Perfusion mit Paraformaldehyd

Die Mäuse wurden in einer Induktionskammer mit 4% Isofluran letal anästhesiert und anschließend thorakotomiert. Das Herz wurde freigelegt und ein Katheter in die Herzspitze eingeführt. Zur Gewährleistung der Zirkulation wurde die Leber mit einer Schere perforiert. Die Perfusion erfolgte mit jeweils 75 ml PBS und 75 ml 4% PFA-Lösung bei einer Laufgeschwindigkeit von 10 ml/min mittels einer Perfusionspumpe. Anschließend wurde das Tier dekapitiert und der Schädel eröffnet. Das Gehirn wurde unter Entfernung der Schädelkalotte freigelegt und präpariert. Dabei wurden die Hirnnerven getrennt und das Gehirn nah am Ende des Cerebrums unter Entfernung des Cerebellums, der *Pons* und der *Medulla oblongata* entnommen und für 24 h in 4% PFA-Lösung konserviert.

2.2.1.3 Intraperitoneale Injektion von Zn₇-Metallothionein-II

Für die folgende Arbeit wurde Zn₇-Metallothionein-II (im Folgenden: MT-II) verwendet. MT-II wird als Isolat aus Kaninchenleber hergestellt und in höchster Aufreinigungsqualität ($\geq 95\%$) bezogen. Die verwendete Lösung beinhaltete verschiedene MT-II Isoformen, hauptsächlich MT-IIa und zu kleineren Teilen MT-IIb und MT-IIc. MT-II ist komplett frei von Cd²⁺- und Cu²⁺-Ionen, welche durch Zn²⁺-Ionen (~ 7 Zn²⁺ pro Molekül) ersetzt wurden. Zur Injektion wurde MT-II in 0.9% steriler NaCl-Lösung rekonstituiert. Es wurden pro Maus 5 $\mu\text{g}/10$ g Körpergewicht, zu einem Volumen von 0.2 ml intraperitoneal (i.p.) injiziert, beginnend unmittelbar vor MCAO-Induktion sowie wiederholend alle 12 h bis zur Tötung (nach Giralt et al. 2002). Als Kontrollgruppe wurde 0.9% sterile NaCl-Lösung zu gleichem Volumen und Zeiten i.p. injiziert.

2.2.1.4 Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)-Modell

Das *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)-Modell ist ein Standardverfahren der tierexperimentellen Schlaganfallforschung und ermöglicht durch einen transienten Verschluss der *Arteria cerebri media* eine fokale zerebrale Ischämie. Bei der MCAO wird mikrochirurgisch über die *A. carotis interna* mittels eines Silikon-überzogenen monofilamentösen Fadens die *A. cerebri media* transient okkludiert (Abbildung 4). Dabei kann das Modell durch die Okklusions- und Reperfusionsdauer modifiziert werden.

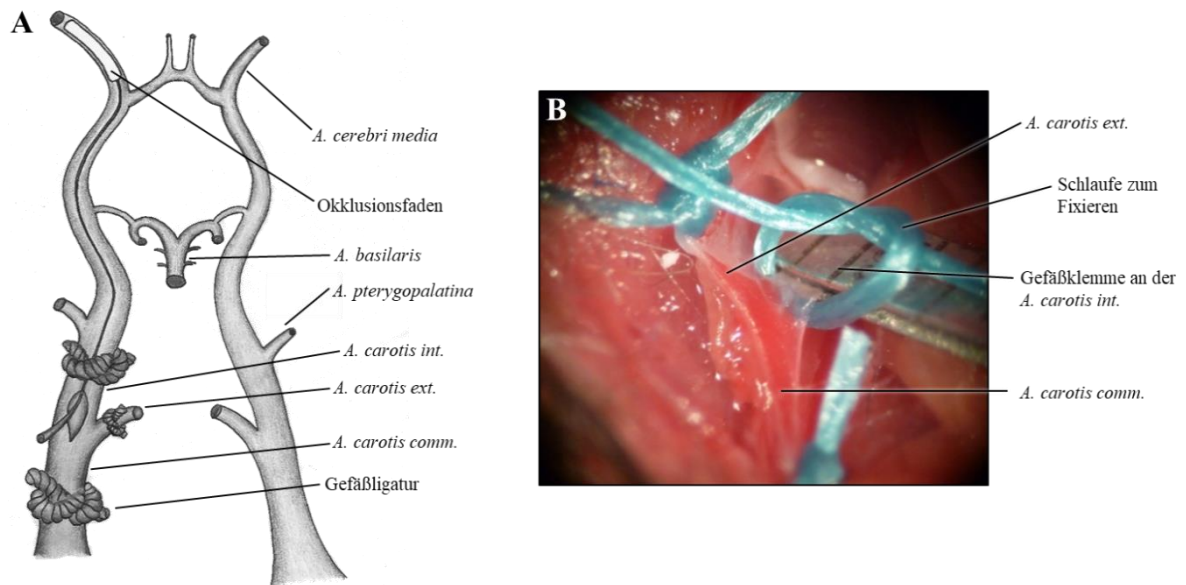


Abbildung 4: Schema und Operationssitus des MCAO-Modells

(A) Schema der zerebralen Gefäßanatomie an der Maus und der Durchführung des MCAO-Modells. Die *A. carotis comm.* wurde ligiert, wie auch die *A. carotis ext.* Der Okklusionsfaden wurde über die perforierte *A. carotis comm.* bis zur *A. cerebri media* vorgeführt. Es ist darauf zu achten den Faden nicht in die *A. pterygopalatina* einzuführen. (B) Operationssitus unter mikroskopischer Sicht (10x Vergrößerung) zum Vergleich. Dargestellt ist die linke Karotisgabelung. Die *A. carotis comm.* wurde ligiert, ebenso die *A. carotis ext.* Die Zirkulation der *A. carotis int.* wurde mit einer Mikrogefäßklemme unterbunden, um im Weiteren die *A. carotis comm.* zu perforieren und den Silikon-überzogenen Faden in die *A. carotis int.* einzuführen. Die Schlaufe dient anschließend der späteren Fixierung des Okklusionsfadens. Die Verwendung von Abbildung A erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Sarah Grünewald.

Diese Form der MCAO-Induktion wurde erstmals 1986 an Ratten durchgeführt (Koizumi et al. 1986). Seither ist das beschriebene experimentelle *in-vivo*-Modell das am weitesten verbreitete in der Schlaganfallforschung und wird vorwiegend an Nagetieren verwendet. Die Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen liegen in der hohen Reproduzierbarkeit, im Verzicht auf eine Kraniotomie, in einer guten Kontrolle über Okklusions- und Reperfusionzeit und in der guten Simulation menschlicher ischämischer Schlaganfälle. Nachteile sind dagegen die Abhängigkeit der Infarktausprägung vom Operateur und der Faden-Beschaffenheit sowie die Schwierigkeit der Operationstechnik, die relativ hohe Rate von Hämorrhagien und die allgemeinen Narkoserisiken (Fluri et al. 2015).

Vor Durchführung der MCAO wurden die Mäuse zur Beurteilung des postoperativen Verlaufs gewogen, die Körpertemperatur gemessen und der *Neuroscore* ermittelt. Für die Induktion des MCAO wurden die Mäuse mit 4% Isofluran und 70% N₂O in einer Induktionskammer tief narkotisiert, analgisiert und anschließend auf dem Operationsplatz in Rückenlage fixiert. Dabei wurde die Körpertemperatur mittels Thermometersonde während der Operation kontinuierlich ermittelt und durch eine Wärmematte beständig bei über 36 ± 0.5 °C gehalten. Die Narkoseerhaltung erfolgte mit 2% Isofluran, 60% N₂O zur Analgesie und 30% O₂ über eine Nasenmaske. Die Operation erfolgte unter mikroskopischer Sicht.

Der Hals wurde freigelegt und die Haare soweit wie nötig vom Operationsfeld entfernt. Die Haut wurde mit 70% Ethanol desinfiziert.

Der Hautschnitt wurde als Längsschnitt links paramedial im Bereich des *Trigonum caroticum* mit einer Hautschere durchgeführt. Das subkutane Gewebe wurde freigelegt und unter Schonung der *Glandula parotis* anschließend bis zur *A. carotis communis* präpariert. Dann wurde das Gefäß unterminiert. Bei den folgenden Schritten wurde insbesondere auf eine geringe Manipulation des an den Halsgefäßen entlangführenden *Nervus vagus* und *N. phrenicus* geachtet. Im Weiteren erfolgte die Ligierung und Fixierung oben genannter Arterie mit einem 5-0 USP (*United States Pharmacopeia*) starken, geflochtenen Faden. Die Karotisgabelung wurde hierauf unterminiert und dargestellt, die *A. carotis externa* ebenfalls ligiert und fixiert und der Blutfluss der *A. carotis interna* mittels einer Mikrogefäßklemme vorübergehend unterbrochen. Der Verlauf der *A. carotis interna* wurde in die Tiefe dargestellt, bis hin zum intrakraniellen Eingang und dem Abgang der *A. pterygopalatina*. Hiernach erfolgte ein kleiner longitudinaler Schnitt mittels *Vannas-Stil-Federschere* in die *A. carotis communis*. Über diesen Zugang wurde der mit Silikon überzogene Faden eingeführt. Es wurden monofilamentöse Fäden der Stärke 6-0 USP der Länge 11 mm mit 9-10 mm Silikonüberzug und einem Durchmesser von 0.21 mm verwendet. Die Gefäßklemme wurde entnommen und unmittelbar der Okklusionsfaden unter Sicht in die *A. carotis interna* eingeführt. Dabei wurde darauf geachtet, nicht in die *A. pterygopalatina* zu gelangen (Abbildung 4). Der Faden wurde bis zur Okklusion der *A. cerebri media* über den *Circulus arteriosus cerebri* (Willisi) vorgeschoben. Hiernach erfolgte eine Fixierung des Okklusionsfadens im Gefäß mittels Schlaufe eines 5-0 USP-Fadens. Die Inhalationsnarkotika wurden ausgeschlichen und die Lunge mit 100% O₂ nachgeflutet. Die Wunde wurde durch eine provisorische Hautnaht mit einem 3-0 USP starken geflochtenen Faden und Einzelknopfnähten verschlossen. Die Haut darüber wurde mit 2% Lidocain-Gel anästhesiert und 0.2 ml 0.9% steriles NaCl als Flüssigkeitssubstitution subkutan (s.c.) injiziert. Die Maus wurde bis zum Erwachen und während der Okklusionszeit bei stetiger Beobachtung in einer temperierten Aufwachkammer bei 37 °C gehalten. Es wurde darauf Wert gelegt, die Operationszeit unter 15 min zu halten.

Nach Beendigung der Okklusionszeit wurde die Maus erneut narkotisiert, die provisorische Hautnaht gelöst und der Okklusionsfaden entfernt. Die *A. carotis interna* wurde daraufhin vollständig ligiert, sodass das Versorgungsgebiet der *A. cerebri media* durch Kollateralkreisläufe aus den Arterien der kontralateralen Hemisphäre versorgt werden konnte. Dann wurde

die endgültige Hautnaht mit 3-0 USP-Fäden als Einzelknopfnähte gelegt und die Haut erneut mit 2% Lidocain-Gel anästhesiert.

Für die Aufwachphase verblieb die Maus zur Beobachtung in der Aufwachkammer für weitere zwei Stunden. Während der Reperfusionzeit wurden die Mäuse höchstens zu zweit in für Mäuse mit motorischen Defiziten vorbereiteten Käfigen gehalten, die einfachen Nahrungszugang ermöglichten. Die Nahrung erfolgte mittels Breikost und Wasser *ad libitum*. Die Mäuse wurden während der Reperfusionzeit regelmäßig alle 12 Stunden beobachtet. Alle 24 Stunden wurden die Temperatur, das Gewicht und der *Neuroscore* ermittelt.

Falls Kriterien für einen Abbruch der Experimente bestanden wurden die Tiere mittels 4% Isofluran letal anästhesiert und dekapitiert. Falls Tiere nach 6 h nach Reperfusion spontan starben, wurden sie mit einem *Neuroscore* von 4 in die Auswertung eingeschlossen, aber von weiteren histologischen Auswertungen ausgeschlossen. Tiere die vorzeitig starben, wurden aus jeglichen Analysen ausgeschlossen.

2.2.1.5 Erhebung des neurologischen Defizits (*Neuroscoring*)

Zur Evaluation des neurologischen Defizits nach MCAO Induktion wurde ein *Neuroscore* erhoben. Das *Neuroscoring* fand direkt vor und alle 24 h nach MCAO-Induktion statt. Als Skala wurde die nach Bederson et al. beschriebene (Bederson et al. 1986) und nach Hara et al. modifizierte (Hara et al. 1996) verwendet (Tabelle 1). Tiere, die einen *Neuroscore* von 4 erhielten, starben entweder spontan innerhalb von 6 h nach Reperfusion, oder mussten auf Grund von ethischen Bedenken und vordefinierten Abbruchkriterien euthanasiert werden.

Tabelle 1: *Neuroscore* zur Ermittlung des neurologischen Defizits.

Das Defizit wurde mit einer Punktzahl zwischen 0 und 4 bewertet. Als Skala wurde die modifizierte Form (Hara et al. 1996) der Bederson et al. (Bederson et al. 1986) Skala verwendet.

Neuroscore	Neurologisches Defizit
0	kein Defizit
1	Streckdefizit der Vorderpfote
2	Zirkulation zur kontralateralen Seite
3	Hemiplegie
4	Tod des Tieres

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Gefrierschnittpräparaten mittels Kryotom

Als Vorbereitung zur Durchführung von Gefrierschnittpräparaten mittels Kryotom wurden die in 4% PFA konservierten Gehirne für mindestens 24 h in 30% Saccharose-Lösung dehydriert. Anschließend erfolgte die Einbettung mit dem Einbettmedium *Shandon Cryomatrix* auf Trockeneis und die Lagerung bei -20 °C. Das eingebettete Gehirn wurde im Kryotom bei -20 °C von rostral an in koronarer Schnittebene in definierten Abständen, welche von der interauralen Position aus definiert wurden, in fünf Ebenen (E) zu einer Dicke von 14 µm geschnitten (Ebenen und interaurale Position in mm: 6.6 (E1), 5.3 (E2), 3.9 (E3), 1.9 (E4) und 0 (E5)) und auf polarisierte Objektträger übertragen, die daraufhin bei 37 °C für 1 h im Inkubator luftgetrocknet wurden (Abbildung 5). Die Objektträger wurden bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Infarkt volumetrie wurden die Gehirne mittels des basischen Farbstoffes Hämatoxylin (Hämalaun nach Meyer) und des sauren Farbstoffes Eosin gefärbt. Hämatoxylin färbt vorwiegend basophile Strukturen wie den Zellkern, die DNA und die Ribosomen. Eosin färbt dagegen basische (eosinophile) Zellkompartimente, wie die Mitochondrien, zytoplasmatische Proteine oder Kollagen, an. Dafür wurden die bei -20 °C gelagerten Präparate erst dreimal für jeweils 5 min in TBS gereinigt und danach für 8 min in Hämalaun-Lösung nach Meyer gefärbt, um dann 10 min mit Leitungswasser gewaschen zu werden. Danach wurden die Schnitte für 2 min in Eosin-Lösung gefärbt und anschließend erfolgte die Entwässerung der Schnitte durch kurzzeitige Inkubation in aufsteigender vergällter Ethanolreihe (50%, 70%, 90%, 96%) sowie für 1 min in 99% vergälltem und 2 min in absolutem Ethanol. Anschließend wurde die Klärung mit Xylol für 3 min und der Einschluss mittels Deckgläschen und *Roti-Histokitt II* durchgeführt.

2.2.2.3 Infarkt volumetrie

Die Infarktflächenbestimmungen wurden an Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Schnittpräparaten in allen fünf definierten Schnittebenen ausgeführt. Dazu wurden die Objektträger digitalisiert und die Areale mittels der *Open-Source-Software ImageJ* gemessen. Normiert

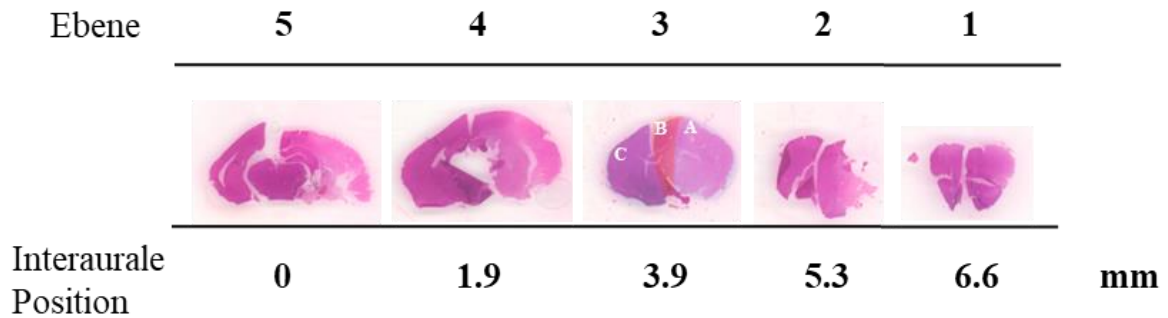


Abbildung 5: Gefrierschnittpräparate zur Infarkt volumetrie.

Die Gehirne wurden mittels Kryotom in fünf definierten Ebenen, ausgehend von ihrer interauralen Position, geschnitten: 0 (E5), 1.9 (E4), 3.9 (E3), 5.3 (E2) und 6.6 (E1) mm interaurale Position. Die Gefrierschnitte wurden anschließend HE-gefärbt. Zur Infarkt volumetrie wurde die infarzierte ipsilaterale Fläche (A), die nicht-infarzierte ipsilaterale Fläche (B), und die kontralaterale Fläche (C) in allen Ebenen ausgemessen. Das Volumen wurde durch Summation der Flächen approximiert (wobei die Flächen von E2 – E4 in doppelter Gewichtung eingingen). Das direkte Infarktvolumen bezeichnet das Volumen der infarzierten Flächen A. Das indirekte Infarktvolumen die Differenz zwischen den Volumen von C und B. Das Hirnödem wird als Differenz zwischen indirektem und direktem Infarktvolumen berechnet.

nach einem Zentimetermaß, erfolgte die Messung folgender Flächen (in mm^2): die infarzierte Fläche der ipsilateralen (ischämischen) Hemisphäre (Fläche A), die nicht-infarzierte Fläche der ipsilateralen Hemisphäre (Fläche B) und die kontralaterale Hemisphäre (Fläche C) in allen fünf Ebenen separat (Abbildung 5). Das Volumen wurde aus den Flächen durch eine Ebenen-gewichtete Summation selbiger (die Flächen E2 bis E4 in doppelter Gewichtung) in folgender Art approximiert (in mm^3):

$$\text{Infarktvolumen} = E1 + 2E2 + 2E3 + 2E4 + E5$$

Als direktes Infarktvolumen wird im Folgenden die Volumetrie der infarzierten Flächen der ipsilateralen Seite bezeichnet. Im Gegensatz dazu stellt das indirekte Infarktvolumen die Differenz der Volumina zwischen kontralateraler Hemisphäre (Kontra) zur ipsilateralen nicht infarzierten Hemisphäre (Ipsi) dar:

$$\text{Indirektes Infarktvolumen} = \text{Volumen Kontra} - \text{Volumen Ipsi}$$

Das Volumen des Hirnödems im ischämischen Areal wurde als die Differenz zwischen indirektem und direktem Infarktvolumen berechnet.

2.2.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten Gefrierschnittpräparate dreimal in TBS für jeweils 5 min gewaschen. Die Objektträger wurden in eine verdunkelte feuchte Kammer gelegt und die Schnitte mittels *DakoPen* umrandet. Hiernach erfolgte

die Inkubation in einer Blocklösung mit TBS++ (3% normales Ziegen Serum, 0.25% *Triton X-100* in TBS) für 60 min. Danach erfolgte die Benetzung der Schnitte mit dem Primärantikörper für 48 h bei 4 °C im Dunkeln. Es wurden zwei verschiedene Primärantikörper gleichzeitig verwendet: der polyklonale Antikörper anti-NeuN aus dem Kaninchen in einem Verhältnis von 1:500 und das monoklonale Immunglobulin (Ig) G anti-Iba1 aus der Maus in einem Verhältnis von 1:500.

Das Antigen NeuN (Neuronale Nuklei) wird in den meisten neuronalen Zellen des ZNS und im peripheren Nervensystem von Vertebraten exprimiert und ist ein DNA-bindendes Protein, welches vor allem im Nukleus und Perikaryon der Neurone lokalisiert ist (Mullen et al. 1992). Iba-1 (ionisiertes Calcium-bindendes Adapterprotein 1) ist vornehmlich im Zytoplasma von Monozyten lokalisiert, wobei bei Aktivierung von monozytären Zellen, wie Mikroglia, die Expression gesteigert wird (Ito et al. 1998).

Hiernach wurden die Objektträger nochmals dreimal für 5 min in TBS gewaschen und es erfolgte ein erneutes Blocken mit TBS++ für 30 min. Diese und die weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur und im Dunkeln durchgeführt. Dann wurden die Objektträger mit den Sekundärantikörpern im Verhältnis von 1:250 für 120 min inkubiert. Als Sekundärantikörper kamen zum Einsatz: ein anti-Kaninchen IgG konjugiert mit AlexaFluor488, aus der Ziege, zur Bindung des anti-NeuN Antikörpers und ein anti-Maus IgG mit Cy3 konjugiert, ebenfalls aus der Ziege, zur Bindung des anti-Iba1 Antikörpers.

Zuletzt erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI (1:10000) für 5 min und anschließend ein Waschvorgang für 5 min in TBS und die Einbettung mittels Deckgläschen und *Shandon Immu-Mount* Medium. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff welcher an die kleine Furche der DNA bindet und zum Anfärben von fast allen Zellkernen angewendet werden kann.

Die Objektträger wurden bei -4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.2.5 Auszählung der Neuronen und inflammatorischen Zellen

Zur Auszählung der NeuN- und Iba1-positiven Zellen wurden die immunfluoreszenzgefärbten Gehirnschnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio *Examiner.Z1* mikroskopiert. Die Präparate wurden in drei Farbkanälen mittels Mehrbildaufnahmen als gesamtes Präparat eingescannt wie auch in der Z-Ebene über die gesamte Dicke des Schnitts aufgenommen und dann mittels *ZEN Pro 2013 Software* auf eine 2D Projektion berechnet und die Aufnahmen digital zusammengefügt (siehe Abbildung 13). NeuN-Antikörper wurden mittels AlexaFluor488-konjugierten Antikörpern markiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde mit 495 nm

Licht angeregt und emittierte Licht bei 519 nm (Zyan-grüner Bereich, in den Abbildungen grün dargestellt). Der Iba-1-Antikörper wurde mittels Cy3 konjugierten Sekundäntikörpern markiert. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte bei 550 nm und die Emission bei 570 nm (Gelber Bereich, in den Abbildungen rot dargestellt). DAPI, zur Anfärbung der DNA in den Zellkernen, wurde mit 358 nm UV-Licht angeregt und emittierte bei 461 nm (in den Abbildungen als blau dargestellt). Es wurde nur die Ebene 3 der Gehirnpräparate aufgenommen. Die Auszählungen erfolgten immer im Vergleich von kontralateraler (nicht-ischämischer) zur ipsilateralen (ischämischer) Hirnhemisphäre.

Die NeuN-positiven Zellen wurden ausgezählt, indem eine Linie 250 μm unter dem *Corpus callosum* horizontal gezogen und alle vitalen Zellen, die diese berührten, mit der *Open-Source-Software ImageJ* gezählt wurden (Abbildung 13). Das neuronale Überleben wurde als Quotient der NeuN-positiven Zellen von ipsilateraler zur kontralateralen Seite berechnet. Die Iba1-positiven Zellen wurden als Ganzes, ipsi- und kontralaterale Seite getrennt, gezählt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Oligonukleotid-Synthese und Design

Die Oligonukleotide wurden mittels des *online* verfügbaren *Alignment*-Programms *Primer-BLAST* (Zugriff: 15.04.2014) unter Beachtung folgender Kriterien erstellt: Länge der Zielsequenz: 250 – 300 bp; *Primer*-Länge: 25 bis 30 bp; Schmelztemperatur: ca. 60 °C, GC-Gehalt: 40 – 60%; mit 1 bp *GC-Clamp*. Die cDNA-Sequenzen wurden von der *Ensembl*-Datenbank (Zugriff: 15.04.2014) verwendet. Die Oligonukleotide wurden von Eurofins Scientific in einer Konzentration von 100 pM bezogen.

2.2.3.2 RNA-Isolation aus Gehirngewebe und DNase-Verdau

Die Tiere wurden letal mittels 4% Isofluran anästhesiert und dekapitiert. Das Gehirn wurde entfernt, und es erfolgte die Separation der Gehirnhemisphären. Die kontra- (nicht-ischämische) und ipsilaterale (ischämische) Hemisphäre wurden getrennt und ca. 100 mg Gewebe in 1 ml *TRIzol Reagent*-Lösung homogenisiert. Hiernach erfolgte die RNA-Isolation nach Herstellerangabe. Die Proben wurden für 5 min inkubiert und eine Phenol-Chloroform-Extraktion mittels Zugabe von Chloroform durchgeführt. Die Proben wurden bei 12000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die entstandene wässrige obere Phase beinhaltet die RNA.

Diese wurde sorgfältig entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Unter Zugabe von 100% Isopropanol wurde die RNA präzipitiert, 10 min inkubiert und bei 12000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das RNA Sediment wurde in 75% Ethanol resuspendiert, wiederum bei 7500 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und dadurch gewaschen. Das Sediment wurde für 10 min luftgetrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Bei allen Schritten wurde auf eine RNase-freie Umgebung und RNase-freie Lösungen geachtet. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur Verwendung bei -80 °C.

Zur Reinigung von kontaminierender DNA und zur Inaktivierung von RNase-Aktivitäten erfolgte ein enzymatischer Verdau mit DNase I. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangabe. Die RNA-Lösung wurde mit dem Reaktionspuffer und der DNase I versetzt und für 15 min inkubiert. Hiernach wurde die Stopp-Lösung hinzugesetzt und es erfolgte die Enzym- und RNA-Denaturierung bei 70 °C für 10 min. Danach wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gekühlt.

2.2.3.3 RNA-Photometrie und Konzentrationsbestimmung

Die RNA Photometrie wurde mit dem *NanoDrop* 2000 Spektralphotometer durchgeführt. Die Eichung des Photometers erfolgte mit einer Leerprobe, einem Eluat der Schritte der RNA-Isolation und des DNase-Verdau ohne Gewebeprobe. Die Spektralkurven wurden durch Messung der Extinktion (Optische Dichte; OD) in einem kontinuierlichen Spektrum von 220 nm bis zu 340 nm pro Probe erstellt. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm und das von Phenol- und Extraktionsresten bei 230 nm. Um die Reinheit der isolierten RNA und mögliche Kontamination durch Proteine, Extraktionsreste oder genomischer DNA darzustellen wird der Quotient aus den optischen Dichten bei 260 nm zu 280 nm und der Quotient der optischen Dichten bei 260 nm zu 230 nm gebildet. Bei einer qualitativ guten RNA-Isolation liegt das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1.8 und 2, sowie das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₃₀ über 2. Aus der Extinktion beim Absorptionsmaximum von 260 nm wurde die RNA-Konzentration der Proben auf ng/ml ermittelt.

2.2.3.4 cDNA-Synthese mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die präparierte RNA wurde in einer Menge von 1 µg für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) mittels *iScript cDNA Synthesis Kit* verwendet. Die RT-

PCR wurde laut Herstellerangabe durchgeführt. Das verwendete System nutzte eine M-MLV (*Moloney Murines Leukämievirus*) ähnliche Reverse-Transkriptase und eine Mischung aus oligo(dT) und zufälligen hexameren *Primern*. Die cDNA wurde im Verhältnis 1:20 in RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5 Konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktionen (*Polymerase-Chain-Reaction*; PCR) wurden mittels einer hitzestabilen *Taq* (*Thermus aquaticus*)-Polymerase mit dem PCR-*Master-Mix* Y in einem 20 µl Ansatz (10 µl 2x PCR-*Master-Mix* Y, 0.2 µl *fw*(forward)*Primer*, 0.2 µl *rv*(reverse)*Primer*, 1 µl cDNA, 8.6 µl ddH₂O) durchgeführt. Die Reaktionszeiten erfolgten nach folgendem Schema im *Light Cycler* 480 II:

	Initiale Denaturierung:	5 min	bei	95 °C
40 x	→ Denaturierung	15 s	bei	95 °C
	<i>Annealing</i>	30 s	bei	57 °C
	Elongation	20 s	bei	72 °C
	End-Elongation	5 min	bei	72 °C
	Abkühlung	1 min	bei	40 °C

2.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden 1% Agarose-Lösungen in TAE-Puffer verwendet und damit Gele für 15 x 15 cm Gelkammern mit 15 µl Probetaschen hergestellt. Vor der Polymerisation wurde die Lösung mit 1% Ethidiumbromid versetzt. Es wurden 15 µl DNA, angereichert mit 4 µl Ladepuffer, in die Taschen gefüllt. Parallel lief ein 100 bp DNA Leiterstandard. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit TAE-Puffer gefüllt und die Elektrophorese erfolgte mit 120 V, 60 mA für 45 min. Die Gele wurden unter UV-Licht (365 nm) fotografiert und mit dem Geldokumentationssystem *Gel Doc XR+* digitalisiert.

2.2.3.7 Quantitative *Real-Time*-Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR)

Reaktionsdurchführung

Die quantitative *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine Erweiterung der konventionellen PCR-Technik, welche durch Fluoreszenzfarbstoffe in Echtzeit die Detektion der Zunahme des Amplifikats ermöglicht. Durch Zunahme des Fluoreszenzsignals kann proportional auf die entstandene DNA-Menge rückgeschlossen und quantifiziert werden. Zur Detektion der DNA können verschiedene Methoden angewendet werden (Holzapfel und Wickert 2007). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion mittels des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR *Green I*, welche zum herkömmlichen PCR-Reaktionsansatz zugegeben wurde. Dieser interkaliert in doppelsträngiger DNA und emittiert Licht bei 521 nm. Die Detektion erfolgt dementsprechend bei jedem PCR-Zyklus am Ende der Elongationsphase. Wird cDNA verwendet, können über die Quantifizierung Rückschlüsse über die exprimierte mRNA-Menge und dadurch über mögliche Induktion oder Repression von Genen geschlossen werden. Es wurde folgendes PCR-Schema für die qRT-PCR verwendet:

	Initiale Denaturierung:	5 min	bei	95 °C
33 x	→ Denaturierung	15 s	bei	95 °C
	<i>Annealing</i>	30 s	bei	57 °C
	Elongation	20 s	bei	72 °C

Schmelzkurvenanalyse:

Denaturierung	15 s	bei	95 °C
Schmelzvorgang	von 60 °C sukzessive auf 95 °C		
Abkühlung	1 min	bei	40 °C

Es wurden 20 µl qRT-PCR-Ansätze mit 10 µl *LightCycler 480 SYBR Green I Master-Mix*, 1 µl cDNA, 0.2 µl jeweils *rv*- und *fw*-Primer und ddH₂O zur Volumenergänzung gebraucht. Die Lösung beinhaltete eine hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase. Für jede Probe wurde ein technisches Replikat erstellt und der Mittelwert der C_t-Werte angewendet. Außerdem wurden bei jedem Versuchsansatz Negativproben zugegeben. Die Reaktionen wurden mit dem

LightCycler 480 II durchgeführt und die Daten mit der *LightCycler 480 Software* analysiert.

DNA Quantifizierung durch qRT-PCR mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Wird die amplifizierende DNA einer PCR detektiert und das Signal gegen die Anzahl an Zyklen aufgetragen, so ergibt sich für die PCR eine Sättigungskurve (Abbildung 6). Nach mehreren Zyklen geht die PCR in eine exponentielle Phase über, in der sich die DNA im Optimalfall bei jedem Zyklus verdoppelt. Allerdings ist die PCR selbstlimitierend.

Dies ist durch Nebenprodukte erklärbar, die zusätzlich entstehen: *Primer*-Dimere und DNA-Fragmente, die miteinander hybridisieren und als kompetitive Inhibitoren der DNA-Polymerase wirken. Die Entwicklung der Zunahme der Fluoreszenzintensität korreliert proportional direkt mit der verwendeten DNA-Menge. Um quantitative Aussagen zu treffen, wird

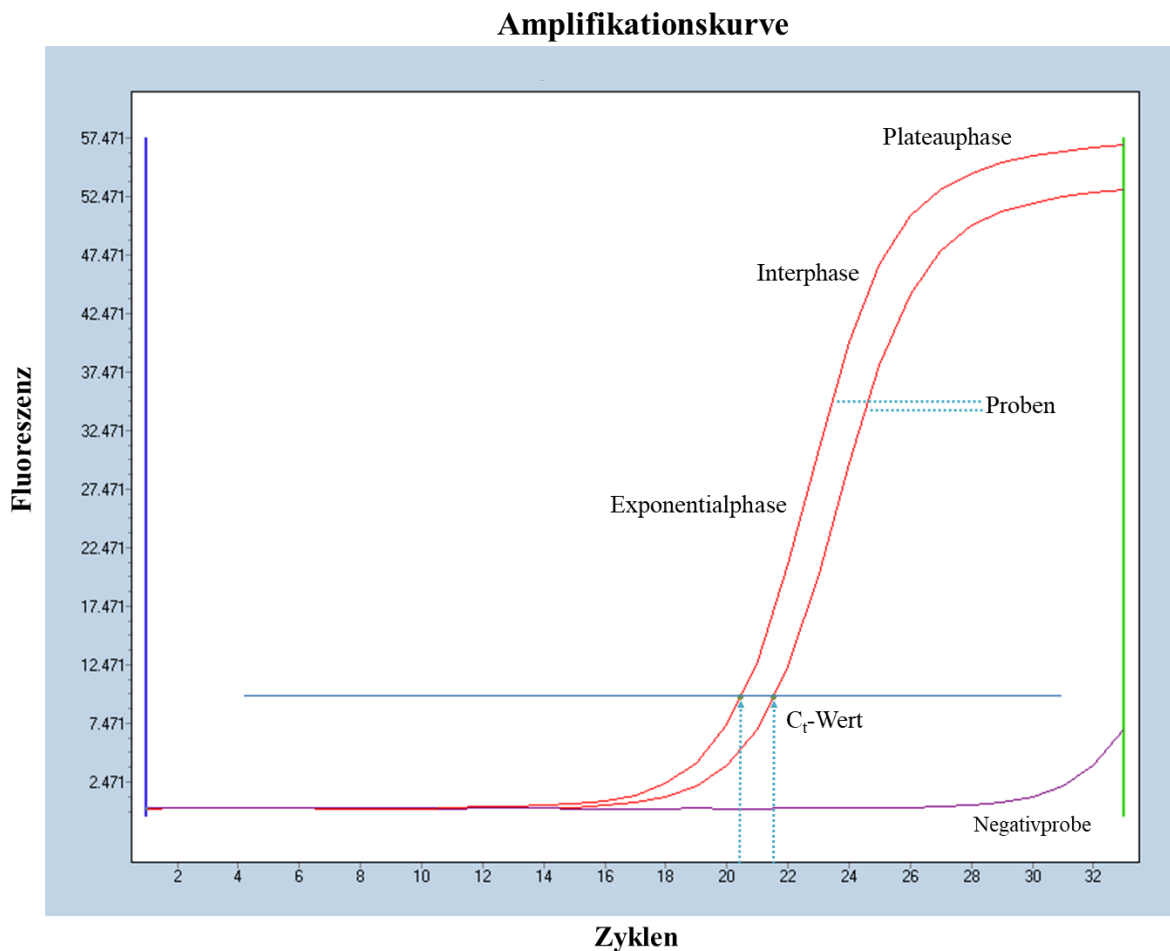


Abbildung 6: Amplifikationskurve einer SYBR-Green-qRT-PCR.

Aufgetragen ist die Fluoreszenz in der Ordinate und die Zyklusanzahl in der Abszisse. Die Fluoreszenzzunahme der Amplifikate der Proben zeigt einen sigmoiden Verlauf mit drei Phasen: der exponentiellen Phase, der Interphase, und letztendlich einer Plateauphase, bei der die PCR sich selbst durch entstandene Nebenprodukte, wie *Primer*-Dimere, limitiert. Zur Beurteilung der Probenkonzentrationen wird der C_t -Wert als die Zyklusanzahl, an der die Fluoreszenz einen signifikanten Anstieg erreicht hat, durch die Analysesoftware ermittelt. Es erfolgte immer gleichzeitig eine Negativkontrolle.

der C_t -Wert gemessen. Dieser entspricht dem Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal signifikant über einen Schwellenwert zunimmt und in allen Proben die gleiche DNA Menge vorliegt.

Die gemessenen C_t -Werte können zur relativen Quantifizierung von Genexpressionen herangezogen werden. Zur Berechnung der relativen Genexpressionen wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet (Holzapfel und Wickert 2007). Die spezifischen Genexpressionen wurden auf ein *Housekeeping*-Gen als Referenz bezogen, in dem Falle auf die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT).

Herkömmlich wird bei der $\Delta\Delta C_t$ -Methode eine doppelte Differenz gebildet: Es wird die Differenz zwischen dem C_t -Wert der jeweiligen Probe des bestimmten Zielgenes zum C_t -Wert des Referenzgenes gebildet:

$$\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Referenzgen})$$

Des Weiteren werden die gebildeten Differenzen für die zu untersuchende Gruppe von einer Kontrollgruppe abgezogen und so das $\Delta\Delta C_t$ gebildet:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Therapeutische Gruppe}) - \Delta C_t(\text{Kontrollgruppe})$$

Die RNA der Gehirne wurde getrennt für die ischämische (ipsilaterale) und nicht-ischämische (kontralaterale) Hemisphäre isoliert. Die $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde daher angepasst und die kontralaterale Hemisphäre als Referenz bezogen:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Ipsilaterale Hemisphäre}) - \Delta C_t(\text{Kontralaterale Hemisphäre})$$

Zum Vergleich der verschiedenen Expressionsraten, wurde der *Fold Change* aus dem $\Delta\Delta C_t$ gebildet. Ein Wert > 1 spricht für eine relative Expressionszunahme, ein Wert < 1 für eine relative Expressionsabnahme:

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte

Nachfolgend auf die qRT-PCR erfolgte die Schmelzkurvenanalyse. Hierzu wurden die Proben von 60 °C auf 95 °C sukzessive (2.2 °C/s) erhitzt und dabei kontinuierlich, in 5 °C Schritten, das Fluoreszenzsignal detektiert. Nach einer Schluss-Elongationsphase wurden

Schmelzkurve

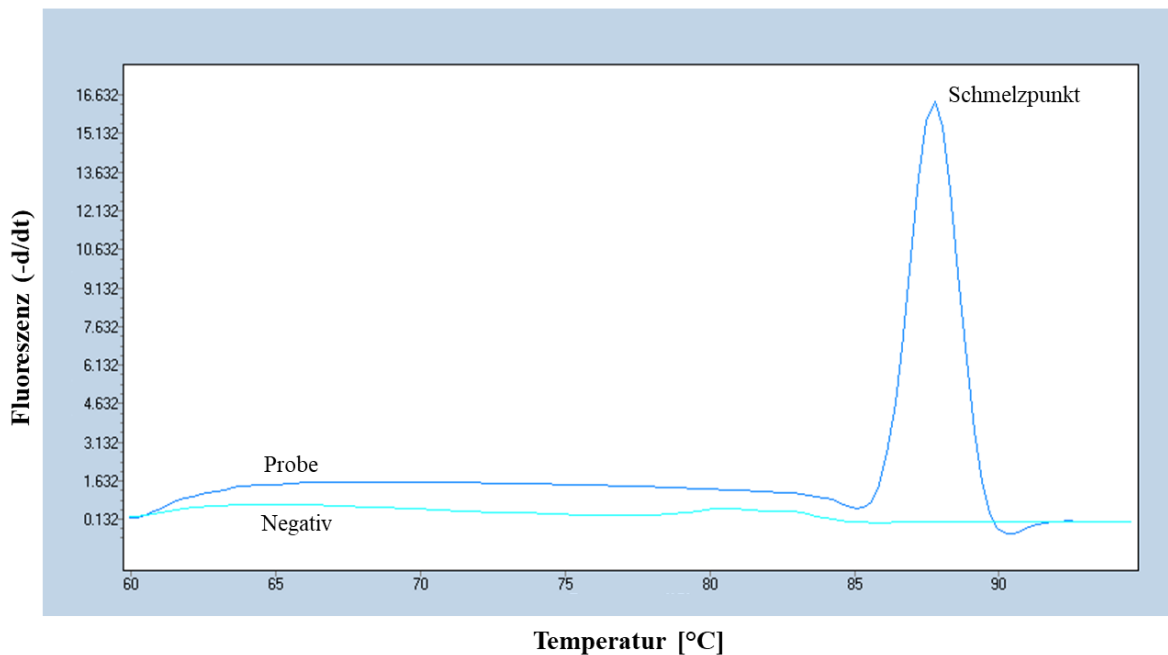


Abbildung 7: Schmelzkurvenanalyse einer SYBR-Green-qRT-PCR.

Aufgetragen ist die Ableitung der Kurve der Fluoreszenzabnahme in der Ordinate und die Temperatur in °C in der Abszisse. Die Proben wurden kontinuierlich von 60 °C auf 95 °C erhitzt. Die DNA-Proben denaturieren bei einer spezifischen Schmelztemperatur. Durch die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes kommt es zu einer Abnahme des Signals, welches hier als Ableitung der Fluoreszenzkurve dargestellt als Signalspitze zu erkennen ist. In der dargestellten Probe ist nur ein Signalgipfel erkennbar, sodass hier von einem spezifischen DNA-Produkt ausgegangen werden kann. Primer-Dimere würden eine zusätzliche Spitze erzeugen. Als Kontrolle diente eine Negativprobe.

während der sukzessiven Erhitzung die entstandenen DNA-Produkte denaturiert und dadurch der interkalierte SYPR-Green Farbstoff freigesetzt. Dies führte zu einem Signalabfall. Durch Ableitung der Fluoreszenzkurve ergaben sich so spezifische Spitzen für verschiedene PCR-Produkte, deren Schmelzverhalten wesentlich von ihren Längen und ihrem GC-Gehalt abhängig sind (Abbildung 7). Demgemäß konnte auf die Reinheit der Produkte geschlossen werden. Gelegentlich war auch eine Spitze für entstandene *Primer*-Dimere und Nebenprodukte sichtbar. Es wurden PCR-Ansätze von möglichst hoher Reinheit angestrebt und bei unklaren Schmelzkurven die Reaktionen verworfen.

2.2.4 Statistische Auswertungen

Als statistischer Test wurde durchgängig der einseitige *Mann-Whitney-U*-Test für nicht normalverteilte Werte verwendet sowie der einseitige *t*-Test für normalverteilte Proben. *p*-Werte von ≤ 0.05 wurden als signifikant (*) anerkannt.

Die Angaben von deskriptiven Werten erfolgten als Mittelwert \pm Standardfehler. Bei Werten aus einer Ordinalskala (*Neuroscore*) wurde der Median \pm Interquartilabstand angegeben.

Die statistischen Auswertungen und die grafischen Darstellungen erfolgten mit der proprietären *Software GraphPadPrism*; Tabellenkalkulation, Text- und Bildverarbeitung mittels *MS Office-Software-Paket*.

3 Ergebnisse

3.1 Versuchsaufbau zum therapeutischen Potenzial von Metallothionein-II im MCAO-Schlaganfallmodell

Um mögliche therapeutische Effekte von Metallothionein beim ischämischen Schlaganfall zu testen, wurde Metallothionein-II (MT-II) im tierexperimentellen Schlaganfallmodell Mäusen injiziert und dessen Effekt im direkten Vergleich zu einer Kontrollgruppe evaluiert. Es erfolgte eine makroskopische Gegenüberstellung des neurologischen Defizits, der Infarktvolumina und der Hirnödeme. Mikroskopisch wurden Unterschiede im Überleben der Neurone und der Immigration und Aktivierung von inflammatorischen Zellen im ischämischen Areal untersucht. Schließlich wurden molekularbiologisch die Expressionsmuster von ausgewählten Kandidatengenen und proinflammatorischen Zytokinen gemessen, um mögliche Wirkmechanismen von Metallothionein zu beurteilen.

Die therapeutische Wirkung von Metallothionein-II wurde im tierexperimentellen Standardmodell der Schlaganfallforschung, dem *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)-Modell geprüft. Dabei erfolgte in Narkose an der Maus eine transiente Okklusion der *A. cerebri media* mittels eines Silikon-überzogenen Fadens und einer anschließenden Reperfusion des ischämischen Gewebes. Es kamen dabei zwei Variationen des Modells zum Einsatz: Ein strengeres MCAO-Modell, bei dem die Okklusionszeit 60 min und die Reperusionszeit 48 h betrug, und ein milderes Schlaganfallmodell, bei der die Okklusionszeit bei 30 min und die Reperusionszeit bei 72 h lag. Zum Vergleich wurden die Infarktvolumina histologisch in HE-Färbung mittels Gefrierschnittpräparate des Gehirns ausgemessen wie auch ein Vergleich des neurologischen Defizits (*Neuroscore*) durchgeführt.

In beiden Modellen wurden männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57Bl6/N im Alter von 8-10 Wochen eingesetzt. Die Applikation des MT-II erfolgte intraperitoneal (i.p.), direkt vor Operationsbeginn in Narkose. Es wurden 5 µg/10 g Körpergewicht appliziert und die Injektion alle 12 h nach Reperfusion bis zum Ende der Reperusionszeit wiederholt (MT-II Gruppe). Als Kontrollgruppe diente die Injektion von 0.9% sterilem NaCl (NaCl-Gruppe). Es erfolgten tägliche Temperatur- und Körpergewichtskontrollen (Abbildung 8). Mäuse, die die Abbruchkriterien erfüllten, wurden schmerzlos getötet. Diese Tiere sowie jene, die spontan vor Ende der Reperusionszeit starben, wurden nicht in die histologischen Auswertungen, jedoch aber in den *Neuroscore* mit dem Wert 4 aufgenommen.

Wenn nicht anders verzeichnet, wurden die deskriptiven Werte als Mittelwert \pm Standardfehler angeben und der einseitige *Mann-Whitney-U-Test* als statistischer Test für nicht normalverteilte Proben verwendet. *p*-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant (*) gewertet.

3.2 Metallothioneinbehandlung reduziert das Infarktvolumen im milden Schlaganfallmodell

Unmittelbar vor MCAO-Induktion und alle 24 h postoperativ erfolgten bei allen Tieren Messungen des Körpergewichts und der Körpertemperatur. Neben dem erwarteten postoperativen Gewichtsverlust und einer moderaten Hypothermie konnten zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusen in beiden verwendeten Modellen keine Unterschiede im Verlauf festgestellt werden (Abbildung 8).

Ergebnisse des strengeren 60-min-MCAO-Modells

Bei 60 min Okklusions- und 48 h Reperfusionzeit zeigte sich zwischen der MT-II behandelten und der unbehandelten Gruppe kein signifikanter Unterschied der Infarktvolumina (Abbildung 9). Es wurden das direkte Infarktvolumen, das indirekte Infarktvolumen und das Hirnödem als Differenz zwischen direktem und indirektem Infarktvolumen berechnet.

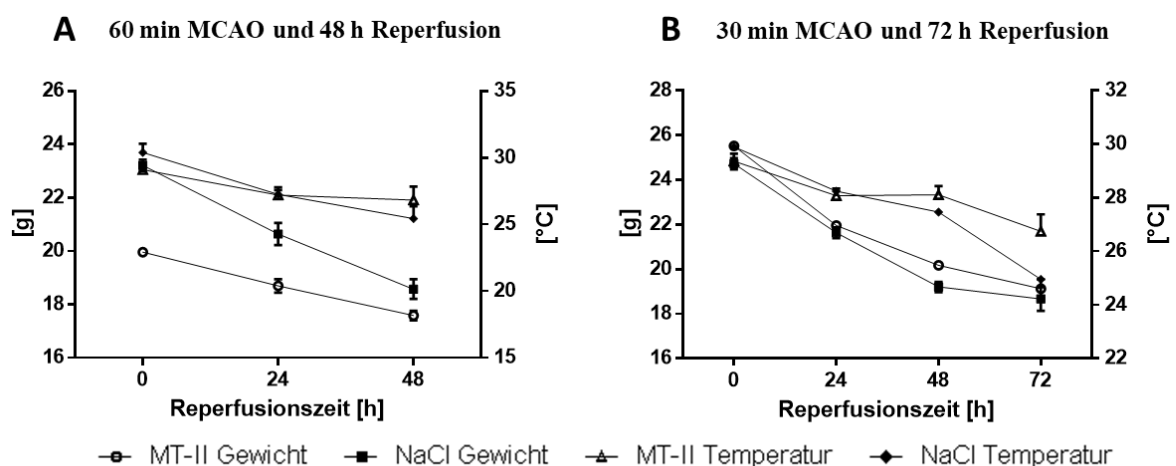


Abbildung 8: Gewichts- und Temperaturkontrollen der behandelten Mäuse.

(A) Entwicklung des mittleren Gewichts und der mittleren Temperatur der Mäuse im 60-min-Okklusions- und 48-h-Reperfusion-MCAO-Modell über die Zeit ($n_{\text{MT-II}} = 8$; $n_{\text{NaCl}} = 7$). (B) Entwicklung des mittleren Gewichts und der mittleren Temperatur der Mäuse im 30-min-Okklusions- und 72-h-Reperfusion-MCAO-Modell über die Zeit ($n_{\text{MT-II}} = 9$; $n_{\text{NaCl}} = 8$). Dargestellt sind die Datenpunkte als Mittelwert \pm Standardfehler.

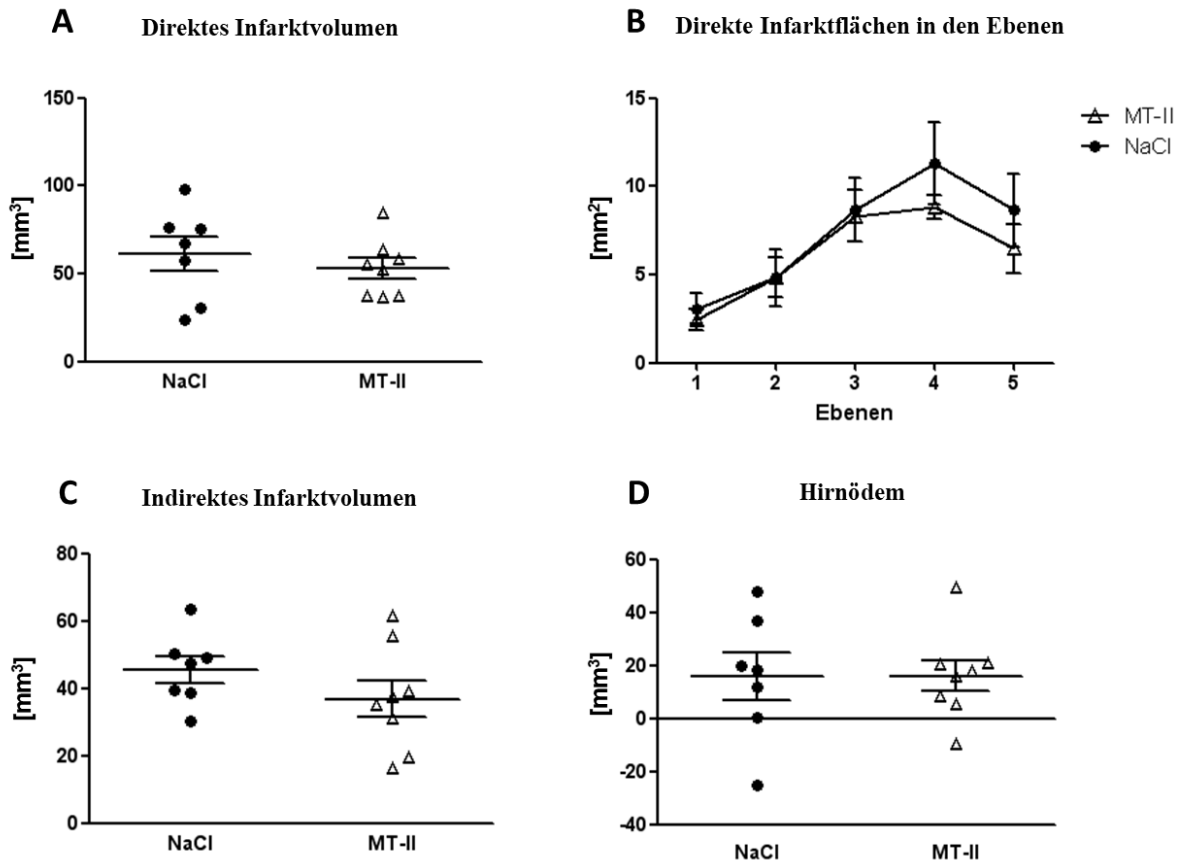


Abbildung 9: Infarkt volumina nach 48 h Reperfusion mit 60 min MCAO im Vergleich.

Mäuse wurden entweder mit MT-II ($n = 8$) oder NaCl ($n = 7$) i.p. behandelt. **(A)** Das direkte Infarktvolumen (in mm^3), ermittelt aus den infarzierten Flächen der Gehirnhemisphären. **(B)** Die direkten Infarktflächen (mm^2) in den einzelnen definierten histologischen Gehirnebenen im Vergleich. **(C)** Das indirekte Infarktvolumen (in mm^3) ermittelt aus der Differenz zwischen den Volumina der kontralateralen Flächen und der nicht-infarzierten ipsilateralen Flächen. **(D)** Die errechneten Hirnödeme als Differenz zwischen direkten zu indirekten Infarktvolumen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelter und un behandelter Gruppe festgestellt werden ($p > 0.05$, mittels einseitigem *Mann-Whitney-U-Test*). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. * $p \leq 0.05$.

Die MT-II behandelte Gruppe ($n = 8$; Gewicht: 22.9 ± 0.3 g) zeigte im direkten Infarktvolumen (53 ± 5.8 mm^3) eine leichte Tendenz zu niedrigeren Werten als zur NaCl behandelten Kontrollgruppe ($n = 7$; Gewicht: 23.3 ± 0.2 g; Abbildung 9a), aber keinen signifikanten Unterschied (61.3 ± 10.0 mm^3 , $p = 0.27$). Gleiches gilt für die indirekten Infarktvolumina (Abbildung 9c) zwischen behandelter (36.8 ± 5.6 mm^3) und un behandelter Gruppe (45.5 ± 4.0 mm^3 , $p = 0.12$). Beim Hirnödeme (Abbildung 9d) können sogar leichte Werterhöhungen bei der MT-II Gruppe (16.1 ± 6.0 mm^3) gesehen werden, allerdings ebenfalls ohne Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe (15.8 ± 9.0 mm^3 , $p = 0.5$).

Dementsprechend sind auch in der Betrachtung der einzelnen histologischen Ebenen (definiert nach interauraler Position) keine Unterschiede in den direkten Infarktflächen zu erkennen (Abbildung 9b).

Ergebnisse des milden 30-min-MCAO-Modells

Im Gegensatz dazu zeigte das mildere MCAO-Modell in den Infarktvolumina (Abbildung 10) signifikant kleinere Werte in der MT-II Gruppe ($n = 9$, Gewicht: 25.7 ± 0.2 g) zur NaCl Gruppe ($n = 8$, Gewicht: 24.7 ± 0.2 g). Das direkte Volumen (Abbildung 10a) der behandelten Gruppe (33.3 ± 3.6 mm³) war deutlich reduziert zur unbehandelten (51.3 ± 5.7 mm³, $p = 0.02$). Ebenso das indirekte Infarktvolumen (Abbildung 10c) in der behandelten Gruppe mit 25.6 ± 3.5 mm³, zur Kontrollgruppe mit 34.1 ± 3.1 mm³ ($p = 0.046$). Das entstandene Hirnödeme (Abbildung 10d) war in der MT-II Gruppe zwar reduziert (7.6 ± 4.5 mm³) zur NaCl Gruppe (17.1 ± 7.7 mm³), aber ohne Signifikanz ($p = 0.2$). Die direkten Infarktflächen waren insbesondere in der 3. (3.9 mm interaurale Position, $p = 0.005$) und 4. (1.9 mm interaurale Position, $p = 0.01$) histologischen Ebene signifikant reduziert (Abbildung 10b).

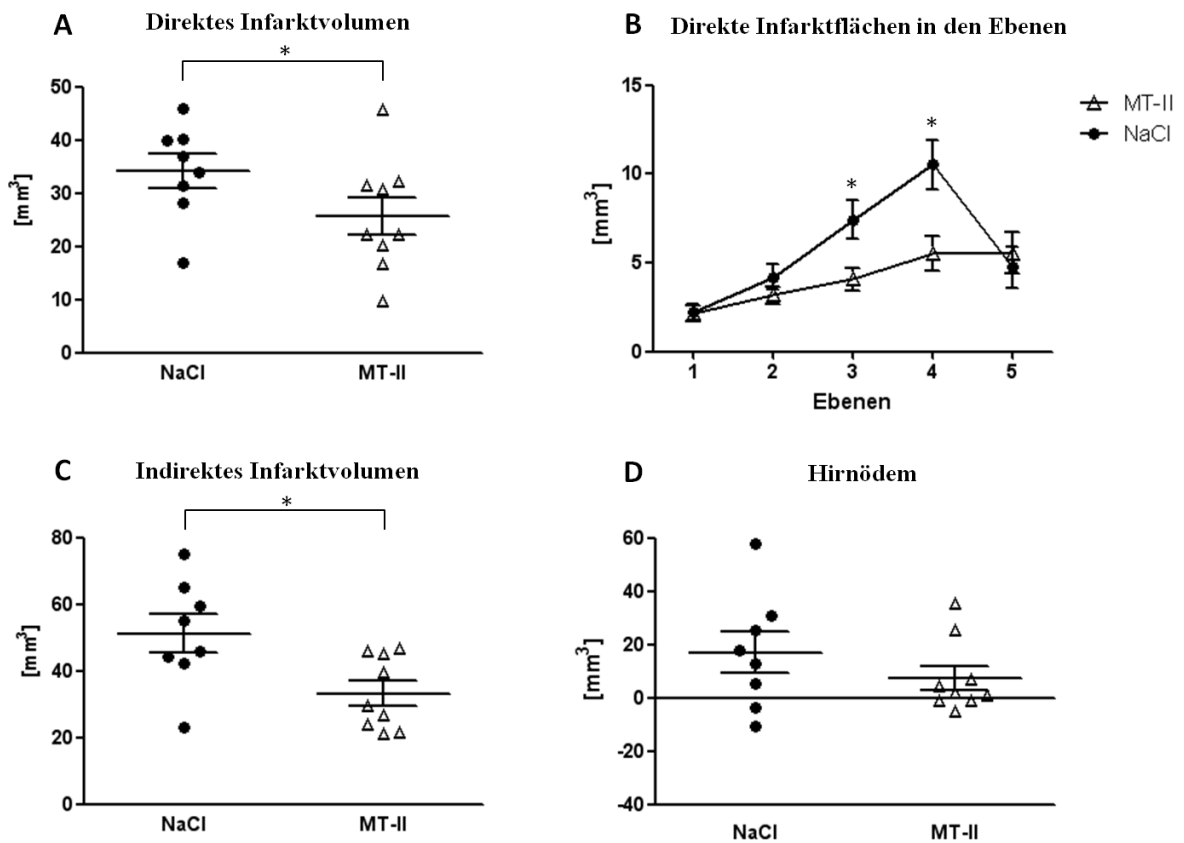


Abbildung 10: Infarktvolumina nach 72 h Reperfusion mit 30 min MCAO im Vergleich.

Mäuse wurden entweder mit MT-II ($n = 9$) oder NaCl ($n = 8$) i.p. behandelt. **(A)** Das direkte Infarktvolumen (in mm³), ermittelt aus den infarzierten Flächen der Gehirnhemisphären. **(B)** Die direkten Infarktflächen (mm²) in den einzelnen definierten histologischen Gehirnebenen im Vergleich. **(C)** Das indirekte Infarktvolumen (in mm³) ermittelt aus der Differenz zwischen den Volumina der kontralateralen Flächen und der nicht-infarzierten ipsilateralen Flächen. **(D)** Die errechneten Hirnödeme als Differenz zwischen direkten zu indirekten Infarktvolumen. In den direkten ($p = 0.02$) und indirekten ($p = 0.046$) Infarktvolumen zeigten sich signifikante Reduzierungen bei MT-II i.p. Behandlung (ermittelt durch den einseitigen *Mann-Whitney-U-Test*). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. $*p \leq 0.05$.

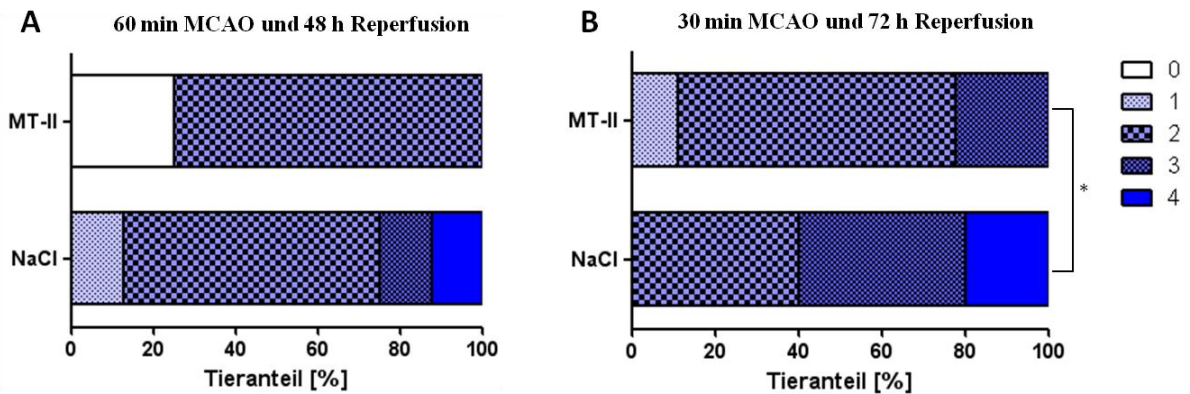


Abbildung 11: Vergleich des neurologischen Defizits (*Neuroscore*) der MCAO-behandelten Tiere am Ende der Reperfusionzeit.

Die Tiere wurden entweder mit MT-II oder als Kontrolle mit NaCl i.p. behandelt. 0 steht für kein Defizit, 1 für ein Streckdefizit der Vorderpfote, 2 für eine Zirkulationsbewegung zur kontralateralen Seite, 3 für eine Hemiplegie und 4 für den spontanen Tod der Maus. Der *Neuroscore* wurde alle 24 h, ab Beginn der MCAO-Induktion erhoben. (A) Das neurologische Defizit nach 48 h Reperfusion und 60 min Okklusion bei MT-II Behandlung ($n = 8$) zur Kontrollgruppe ($n = 8$). (B) Das neurologische Defizit nach 72 h Reperfusion und 30 min Okklusion bei MT-II Behandlung ($n = 9$) zur Kontrollgruppe ($n = 10$). Die MT-II behandelte Gruppe zeigte eine signifikante Besserung im neurologischen Defizit nach 72 h bei 30 min MCAO ($p = 0.03$, mit einseitigem *Mann-Whitney-U-Test*). * $p \leq 0.05$.

3.3 MT-II Behandlung verbessert neurologische Defizite im milden Schlaganfallmodell

Um die entstandenen neurologischen Defizite an den Mäusen nach MCAO Induktion beurteilen zu können, wurde eine grobe Skala zur Beurteilung als *Neuroscore* verwendet. Beim *Neuroscore* galt die 0 für kein Defizit, 1 für ein Streckdefizit der ipsilateralen Vorderpfote, 2 für eine Zirkulationsbewegung zur kontralateralen Seite, 3 für eine Hemiplegie und 4 für den spontanen Tod der Maus. Der *Neuroscore* wurde alle 24 h, beginnend vor MCAO Durchführung, bis zum Ende der definierten Reperfusionzeit, an den Mäusen erhoben. Im Vergleich zum strengeren MCAO-Modell, zeigten sich im milden Schlaganfallmodell deutlich reduziertere neurologische Defizite bei der Behandlung mit MT-II. Im strengen MCAO-Modell mit 60 min Okklusions- und 48 h Reperfusionzeit konnte kein signifikanter Unterschied (Abbildung 11a) nach 24 h ($p = 0.2$) und 48 h ($p = 0.09$) zwischen den Gruppen festgestellt werden ($n_{MT-II} = 8$; $n_{NaCl} = 8$; nach 24 h: 2 ± 2 vs. 2 ± 1.75 ; nach 48 h: 2 ± 1.5 vs. 2 ± 0.75 ; Angaben als Median \pm Interquartilabstand). Im MCAO-Modell mit 30 min Okklusions- und 72 h Reperfusionzeit konnte ein signifikanter Unterschied sowohl nach 48 h ($p = 0.03$) wie auch nach 72 h ($p = 0.03$) zwischen MT-II behandelte Gruppe ($n = 9$; nach 24 h: 2 ± 0 ; nach 48 h: 2 ± 0 ; nach 72 h: 2 ± 0.5) und Kontrollgruppe ($n = 10$; nach 24 h: 2 ± 0 ; nach 48 h: 2 ± 1 ; nach 72 h: 3 ± 1.25) festgestellt werden (Abbildung 11b).

3.4 Neuronenüberleben und die Aktivierung von inflammatorischen Zellen wurden von Metallothionein-II nicht beeinflusst

Die möglichen Effekte von Metallothionein wurden auch auf zellulärer Ebene gemessen. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen an den infarzierten Gehirngeweben durchgeführt und die Neurone und inflammatorischen Zellen gezählt (Abbildung 13). Als Marker für Neurone diente die Anfärbung vom Protein NeuN, inflammatorische Zellen wurden mit dem Protein Iba1 markiert. Dies wird speziell von monozytären Zellen, insbesondere aktivierten Mikroglia, exprimiert. Zur Auszählung wurde die Schnittebene 3 (3.9 mm interauraler Position) verwendet. Die NeuN-positiven Zellen wurden gezählt, indem eine horizontale Linie

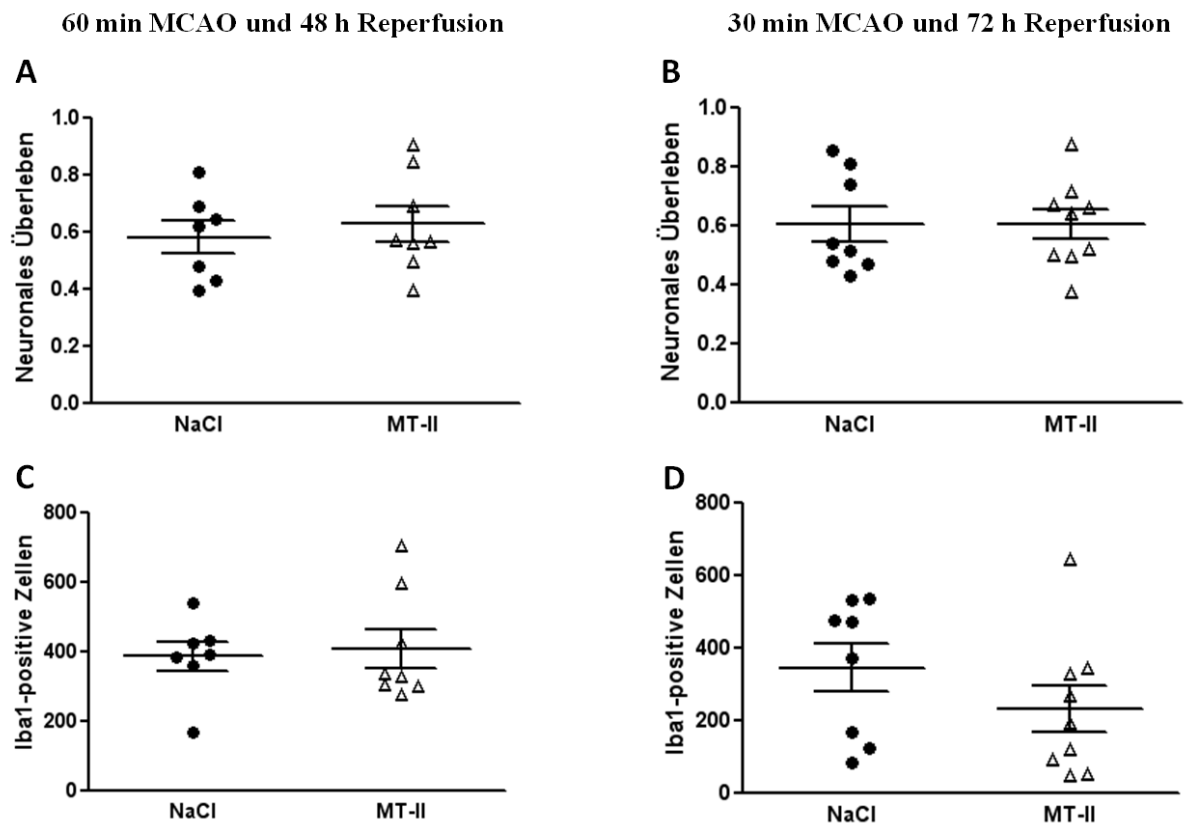


Abbildung 12: Vergleich des neuronalen Überlebens und Aktivierung monozytärer Zellen an Immunfluoreszenzfärbungen zwischen zwei MCAO-Modellen.

Das neuronale Überleben wurde gemessen, indem bei 3.9 mm interauraler Position in den Gehirnpräparaten der Neuronenmarker NeuN immunfluoreszierend gefärbt wurde. Anschließend wurde eine Linie 250 μm unter dem *Corpus Callosum* gezogen und alle NeuN-positiven Zellen die diese berührten gezählt. Das neuronale Überleben ist das Verhältnis von ipsilateralen zu kontralateralen Zellen. Inflammatorische Zellen, insbesondere Makrophagen und aktivierte Mikroglia, wurden mittels Iba1 markiert. Alle Iba1-positiven Zellen auf der infarzierten (ipsilateralen) Hemisphäre wurden gezählt und verglichen. (**A und C**) Neuronales Überleben und ipsilaterale Iba1-positive Zellen im 60-min-Okklusions- und 48-h-Reperfusions-MCAO-Modell zwischen MT-II i.p. behandelter und unbehandelter (NaCl) Gruppe. (**B und D**) Neuronales Überleben und ipsilaterale Iba1-positive Zellen im 30-min-Okklusions- und 72-h-Reperfusions-MCAO-Modell zwischen MT-II i.p. behandelter und unbehandelter (NaCl) Gruppe. Es konnten in allen Vergleichen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (mittels einseitigem *Mann-Whitney-U-Test*). * $p \leq 0.05$.

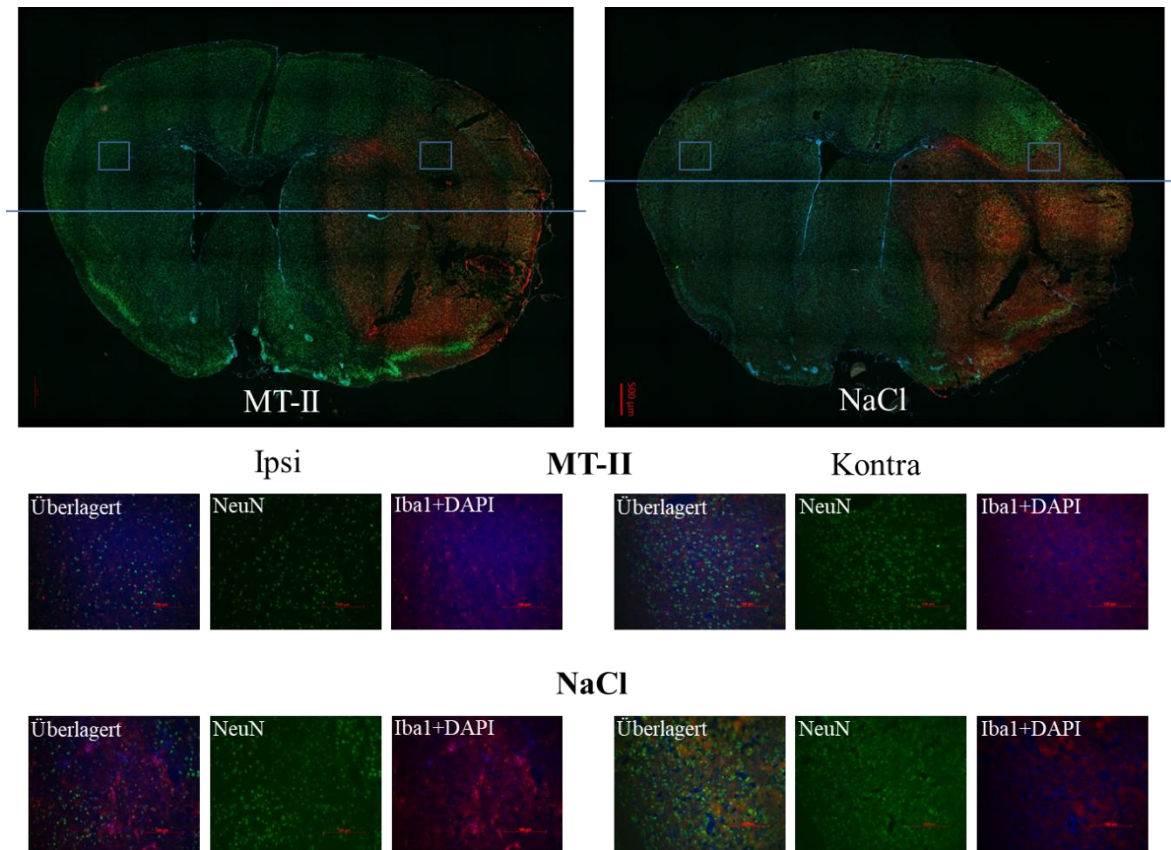


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbungen von Neuronen und monozytären Zellen im Vergleich zwischen MT-II-behandelten und unbehandelten Mäusen im MCAO-Modell.

Zur Messung des neuronalen Überlebens und des Ausmaßes der Aktivierung von monozytären Zellen wurden Gefrierschnittpräparate bei 3.9 mm interauraler Position immunfluoreszierend gefärbt und mikroskopiert. Dazu wurden Neurone mittels des Markerproteins NeuN und des Fluoreszenzfarbstoffes *AlexaFluor488* markiert (in der Abbildung in grün). Makrophagen und aktivierte Mikroglia wurden mit dem Markerprotein Iba1 und dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert (in der Abbildung rot). Die Zellkerne aller Zellen wurden mit DAPI gefärbt (in der Abbildung blau). Dargestellt sind beispielhaft Gehirnpräparate aus dem milden Schlaganfallmodell, mit 30 min Okklusions- und 72 h Reperusionszeit. Oben sind die durch Mehrfachaufnahmen zusammengefügte Gesamtdarstellungen der Gehirnpräparate von einer MT-II-i.p.-behandelten Maus im Vergleich zu einer Maus aus der Kontrollgruppe mit 0.9% NaCl-i.p.-Injektion zu sehen. Die Aufnahme erfolgte in 10x Vergrößerung, die Farbkanäle sind überlagert dargestellt. Darunter sind definierte Ausschnitte (markiert durch blaue Rechtecke in den oberen Bildern) zu erkennen, die in 20x Vergrößerung aufgenommen wurden, zum beispielhaften Vergleich der neuronalen und monozytären Zellen zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe wie auch zwischen ipsilateraler (infarzierter) und kontralateraler Hemisphäre. Die Farbkanäle wurden sowohl einzeln wie auch überlagert dargestellt. Das neuronale Überleben wurde gemessen, indem eine Linie 250 µm unter dem *Corpus Callosum* gezogen und alle NeuN-positiven Zellen, die diese berührten, gezählt wurden (blaue Linien in den oberen Abbildungen).

250 µm unter dem *Corpus Callosum* gezogen wurde und alle NeuN-positiven Zellen, die diese Linie berührten, erfasst wurden (Abbildung 13). Die ipsilaterale (infarzierte) Hemisphäre wurde getrennt von der kontralateralen Hirnhälfte gemessen. Das neuronale Überleben wurde als Quotient zwischen NeuN-positiven Zellen der ipsilateralen zur kontralateralen Hemisphäre berechnet. Die Iba1-positiven Zellen wurden in beiden Hemisphären gezählt und die Summe aus beider Hirnhälften dargestellt.

Im 60-min-MCAO- mit 48-h-Reperfusionzeit-Modell konnten weder Unterschiede zwischen der MT-II behandelten ($n = 8$) und der Kontrollgruppe ($n = 7$) im neuronalen Überleben (0.6 ± 0.1 vs. 0.6 ± 0.1 , $p = 0.35$), noch in der Anzahl aktivierter ipsilateraler inflammatorischer Zellen (407 ± 56 vs. 385 ± 43 , $p = 0.35$) dargestellt werden (Abbildung 12a und c). Das gleiche gilt für das mildere MCAO Modell, mit 30 min MCAO und 72 h Reperfusionzeit (Abbildung 12b und d). Auch hier zeigten sich in den immunfluoreszenzgefärbten Gehirnen der behandelten Mäuse ($n = 9$) keine Vorteile im neuronalen Überleben (0.6 ± 0.05 vs. 0.6 ± 0.06 , $p = 0.44$) und keine signifikante Reduzierung der Iba1-positiven Zellen (230 ± 64 vs. 344 ± 67 , $p = 0.1$) gegenüber der unbehandelten Gruppe ($n = 8$), auch wenn ein Trend zu reduzierteren Zellzahlen sich abzeichnete.

3.5 Behandlung mit Metallothionein führt zur einer Repression des TNF- α -Gens

Um mögliche Wege für die Effekte von Metallothionein zu finden, wurden molekularbiologische Genexpressionsanalysen mittels quantitativer *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Dazu wurden Mäuse mit dem milden Schlaganfallmodell, mit 30 min Okklusion- und 72 h Reperfusionzeit, behandelt. Es erfolgte ein Vergleich zwischen Metallothionein-II i.p. behandelten Mäusen ($n = 4$; Gewicht: 23.7 ± 0.9 g) zur NaCl i.p. behandelten Kontrollgruppe ($n = 6$; Gewicht: 24.7 ± 0.7 g). Außerdem wurden unbehandelte Mäuse nur mit MT-II i.p. nach dem gleichen Therapieschema über 72 h behandelt, um eventuelle direkte Effekte von MT-II im gesunden Gewebe zu analysieren ($n = 3$, Gewicht: 23.5 ± 0.6 g). Die mRNA wurde aus den Hirnhemisphären getrennt isoliert. Die Genexpression von definierten inflammatorischen Proteinen wurde mittels relativer Quantifizierung durch qRT-PCR gemessen. Die relative Quantifizierung wurde bezogen auf das konstitutiv expremierte *Housekeeping*-Gen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Die relative Genexpression wurde als *Fold Change* angegeben. Der Wert wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet, wobei als Referenz zur ipsilateralen (infarzierten) Hemisphäre die kontralaterale Hemisphäre verwendet wurde. Die C_t -Werte der nur MT-II behandelten Tiere wurden auf nicht behandelte Tiere ($n = 3$, Gewicht: 22.6 ± 0.6 g) bezogen. Die Genexpressionen von folgenden proinflammatorischen Proteinen wurde gemessen: Interleukin (IL)-1 β , *Cysteinyl-Aspartate Specific Protease* (Caspase)-1, *Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD* (ASC) und Tumornekrosefaktor (TNF)- α . Überdies wurde die endogene Metallothionein-II

Expression, wie auch die Expression des Metallothionein assoziierten Rezeptors Megalin gemessen.

Zur Analyse der Spezifität der verwendeten PCR-Ansätze erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Reaktionsprodukte (Abbildung 14b). Es konnten keine unspezifischen Banden festgestellt werden. Die PCR-Produkte zeigten die erwarteten Basenpaarlängen (MT-II: 299 bp, Megalin: 283 bp, IL-1 β : 295 bp, Caspase-1: 297 bp, TNF- α : 275 bp, ASC: 293 bp).

Weiterhin wies insbesondere die Expression von TNF- α eine deutliche Repression bei den MT-II behandelten Mäusen im Gegensatz zur Kontrollgruppe auf ($p = 0.04$, einseitiger t-Test). Auch für ASC sind Tendenzen für erniedrigte Expressionen bei exogener MT-II Behandlung zu sehen, die allerdings keine Signifikanz darstellten ($p = 0.22$). Die anderen Proteine waren unwesentlich beeinflusst durch die MT-II i.p. Injektion (Abbildung 14a).

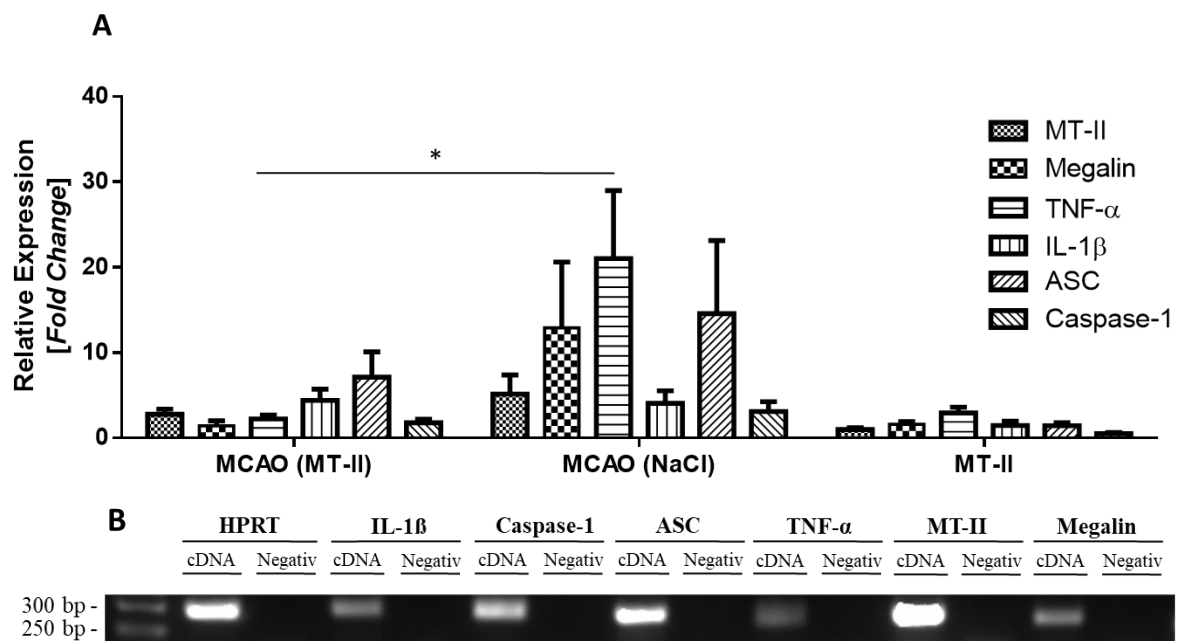


Abbildung 14: Relative Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR bei 30 min Okklusion und 72 h Reperfusions-MCAO-Modell und Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Reaktionsansätze.

(A) Relative Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR beim 30-min-MCAO-Modell mit 72 h Reperfusionszeit. Es wurden drei Gruppen behandelt: Zwei Gruppen erhielten eine MCAO Operation und entweder MT-II i.p. ($n = 4$) oder als Kontrollgruppe NaCl i.p. ($n = 6$). Eine Gruppe erhielt keine MCAO Operation, sondern eine Behandlung mit MT-II i.p. über 72 h nach gleichem Spritzschema ($n = 3$). Die relative Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf das Gen HPRT bezogen und die Normalisierung erfolgte in Bezug auf die Expression der kontralateralen Hirnhemisphäre. Die relativen Expressionen sind als *Fold Change* angegeben. Es wurden die Expressionen von Metallothionein-II (MT-II), Megalin und den inflammatorischen Proteinen: IL-1 β , TNF- α , ASC und Caspase-1 beachtet. Bei den MT-II behandelten Tieren konnte eine signifikante Reduzierung der TNF- α Expression festgestellt werden ($p = 0.03$, einseitiger t-Test). (B) Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte der gemessenen Gene zur Analyse der Spezifität der verwendeten PCR-Ansätze. Die PCR-Produkte lagen im erwarteten Bereich zwischen 250 bp und 300 bp (MT-II: 299 bp, Megalin: 283 bp, IL-1 β : 295 bp, Caspase-1: 297 bp, TNF- α : 275 bp, ASC: 293 bp). Zu jedem Ansatz wurde eine Negativeprobe ohne cDNA Zugabe erstellt. * $p \leq 0.05$.

4 Diskussion

4.1 Therapeutisches Potenzial von Metallothionein im ischämischen Schlaganfall

Der ischämische Schlaganfall ist eine häufige neurologische Erkrankung mit zum Teil erheblichen Belastungen für den Patienten. Er gilt als zweithäufigste Todesursache weltweit (Feigin et al. 2017). Trotz der enormen Relevanz für die Patienten und das weltweite Gesundheitssystem, sind die Behandlungsoptionen weiterhin eingeschränkt.

Als medizinischer Notfall bedarf der ischämische Schlaganfall bei Beginn von neurologischen Symptomen einer akuten Therapie. Hierfür stehen die systemische Lyse mit rekombinantem gewebespezifischem Plasminogenaktivator (rtPA) oder eine mechanische interventionelle Rekanalisationstherapie zur Verfügung. Trotz neuester Arbeiten, die eine Evidenz für einen möglichen Therapiezeitraum von bis zu 24 h nach Symptombeginn zeigen (Jovin et al. 2017), ist die Indikation zur Therapie nur für eine reduzierte Patientengruppe gegeben, diese limitiert sich durch die immer älter werdende Bevölkerung und hierdurch bestehende Komorbiditäten und Prämedikationen, wie beispielweise Antikoagulanzen. Daher ist die Anzahl an Patienten, die tatsächlich einer Akutbehandlung zugeführt werden können, verringert. Für die übrigen Erkrankten bleiben eine konsequente Sekundärprophylaxe und wichtige neurorehabilitierende Maßnahmen. Während die Akuttherapie auf eine rasche Reperfusion des ischämischen Areals und damit eine Eindämmung fortschreitender neurologischer Symptome zielt, soll die neuroprotektive Therapie die Resistenz des Gewebes gegenüber ischämischen Schäden erhöhen wie auch damit den Krankheitsverlauf verzögern und zu einer Verbesserung der entstanden neurologischen Defizite führen.

Neuroprotektive Therapieansätze werden für die Behandlung des ischämischen Insults seit Jahren in *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuchen experimentell getestet, um Patienten eine verbesserte Therapieoption beim Schlaganfall geben zu können. Allerdings bleibt die klinische Translation experimenteller neuroprotektiver Therapieansätze bisher weitgehend erfolglos (O'Collins et al. 2006). Mögliche Gründe könnten sein (Cheng et al. 2004): Die vermeintliche späte Einleitung der neuroprotektiven Therapie bei humanen Studien, die Auswahl des falschen Tiermodells, die falsche Auswahl des Therapieziels, ungenügende experimentelle Daten, zu kleine Versuchsgruppen, statistische Fehlanalysen, zu kurze experimentelle Zeit-

fenster, die biologischen Unterschiede zwischen Menschen und Modelltieren, klinische Heterogenität der Schlaganfalltypen und Vernachlässigung der Komorbiditäten, Prämedikationen und des Alters der betroffenen Menschen in präklinischen Studien.

Zur Entwicklung möglicher neuroprotektiver Behandlungsmaßnahmen ist das Verständnis der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls entscheidend:

Durch eine Unterbrechung der Perfusion kommt es zu einer Ischämie, welche im neuronalen Gewebe eine Nekrose verursacht. Dieser Infarktkern ist umgeben von einem hypoxischen Areal, welches sich in Gefahr befindet, der Penumbra (Dirnagl et al. 1999). In diesem Areal wird durch die Minderperfusion eine Kaskade an Reaktionen ausgelöst, welche für den Verlauf des Schlaganfalls und seine Folgen entscheidend ist (Moskowitz et al. 2010). Die Hauptkomponenten dabei sind die Exzitotoxizität, Peri-Infarkt-Depolarisation, Apoptose und Inflammationsreaktion. Diese Prozesse entstehen in den ersten Minuten bis Stunden des Insults (Dirnagl et al. 1999). In den kommenden Tagen entwickelt sich dann die Inflammationsreaktion im ZNS, was sowohl das angeborene Immunsystem, wie auch das adaptive Immunsystem aktiviert. Die anschließende Immunreaktion beeinflusst das neurologische Ergebnis des Patienten. Im weiteren Verlauf führt sie aber daneben zur Regeneration und Aktivierung von Reparaturmechanismen (Iadecola und Anrather 2011).

Eine neuroprotektive Therapie müsste in diese pathophysiologische Kaskade eingreifen können, um sie zu modifizieren und reduzieren. In diesem Rahmen könnte Metallothionein (MT) durch seine antiinflammatorischen und neuroregenerativen Eigenschaften einen möglichen Behandlungsansatz darstellen.

Metallothioneine sind ubiquitär exprimierte Proteine, die in fast allen Organismen konserviert vorkommen (Vallee 1995). Neben ihrer Aufgabe als Chelatoren zweiwertiger Metallionen wurden weitere mannigfaltige Funktionen von MT-I/II festgestellt (Santos et al. 2012). Sie zeigen antiapoptotische (Ostrakhovitch et al. 2006), antiinflammatorische (Manso et al. 2011), wachstumsfördernde (Fitzgerald et al. 2007), neuroregenerative und neuroprotektive Effekte (West et al. 2008). Außerdem sind sie in der Lage reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu reduzieren und wirken somit antioxidativ (Sato und Bremner 1993).

Es existieren mehrere Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung und eine besondere Rolle sowohl der intrazellulären als auch der extrazellulären MT-I/II beim ischämischen Schlaganfall (Santos et al. 2012).

So ist bei Genexpressionsanalysen beim MCAO-Modell, das Metallothionein-II-Gen das am meisten induzierte im ischämischen Insult (Trendelenburg et al. 2002). MT-I/II-*knockout*-Mäuse zeigten im MCAO-Modell deutlich vergrößerte Infarkte (Trendelenburg et al. 2002;

Wakida et al. 2007). Ein MT-I überexprimierendes Maus Modell zeigte sich gegen fokaler Hirnischämie geschützt (van Lookeren Campagne et al. 1999). Eine Injektion von MT-II reduzierte bei fokaler Kryoläsion von Maushirnen den neuronalen Schaden (Giralt et al. 2002) und förderte die neuronale Regeneration, das Wachstum von Neuronen und die Ausbildung von Axonen *in-vitro* (Leung et al. 2012) und *in-vivo* (Chung et al. 2003).

Trotz Belegen für einen positiv neuroprotektiven Effekt einer möglichen MT-I/II Behandlung (Santos et al. 2012) wurden bis zu Beginn dieser Arbeit noch keine Versuche unternommen, den therapeutischen Nutzen von MT-I/II im Standardmodell der experimentellen Schlaganfallforschung, dem MCAO-Modell, an Mäusen zu testen.

Ziel dieser Arbeit war es, das therapeutische Potenzial einer intraperitonealen (i.p.) MT-II Injektion im MCAO-Modell bei Mäusen zu evaluieren. Die Bewertung des Therapienutzens erfolgte durch Beobachtungen des neurologischen Defizits mittels der Erhebung eines *Neuroscore*s und durch den histologischen Vergleich der Infarkt volumina und des entstandenen Hirnödems. Weiterhin wurde histologisch mittels Immunfluoreszenzfärbung eine Gegenüberstellung des neuronalen Überlebens durch Auszählung von Neuronen gezogen und das Ausmaß des inflammatorischen Geschehens durch Zählung aktivierter und migrierter monozytärer Zellen erstellt. Zudem erfolgte eine Analyse von Genexpressionsmustern ausgewählter proinflammatorischer Zytokine und der Gene von MT-II und Megalin mittels quantitativer *Real-Time-PCR*, um mögliche Wirkmechanismen einer exogenen MT-II-Zufuhr zu eruieren.

4.2 Eine MT-II Applikation kann das Infarktvolumen und das neurologische Defizit im Schlaganfall verringern

Um den therapeutischen Nutzen einer MT-II i.p. Injektion im ischämischen Schlaganfall zu beurteilen, wurde an Mäusen das MCAO-Modell angewendet.

Das MCAO-Modell hat sich als das meistverwendete Tiermodell in der experimentellen Schlaganfallforschung etabliert (Fluri et al. 2015). Dabei erfolgt mittels eines minimalinvasiven Eingriffes eine transiente oder permanente Okklusion der *A. cerebri media* durch einen Silikon-überzogenen Faden, welcher über die *A. cerebri interna* eingeführt wird (Longa et al. 1989). Dieses Modell kommt am ehesten der Pathophysiologie des humanen ischämischen Schlaganfalls gleich (Fluri et al. 2015). Im Gegensatz zu anderen Modellen ist der Eingriff minimal, und es muss keine Kraniotomie erfolgen, außerdem sind die Infarkte gut

reproduzierbar und reliabel. Daher hat sich dieses Tiermodell in den meisten Schlaganfallstudien zur Pathobiochemie oder zur Validierung potenzieller neuroprotektiver Substanzen durchgesetzt. Einschränkungen ergeben sich durch den hohen methodischen Aufwand, die Abhängigkeit der Infarktgrößen vom jeweiligen Operateur und von der verwendeten Fadenbeschaffenheit, welche auch die Gefahr von hämorrhagischen Komplikationen erhöht. Außerdem zeigt sich eine schlechte Verwendbarkeit für Versuche zur Thrombolyse, wofür ein geeigneteres Modell zur Verfügung steht (Fluri et al. 2015).

Um die Gefahr von Variabilität in den induzierten Infarkten durch die Fadenstruktur zu minimieren, wurden für diese Arbeit nur kommerziell angeschaffte Silicon-überzogene Fäden verwendet. Weiterhin ist durch mehrere Studien belegt, dass die alleinige Verwendung von Inhalationsnarkotika, indem Falle Isofluran, schon für sich einen neuroprotektiven Effekt im MCAO-Modell aufweisen (Kapinya et al. 2002; Hoffmann et al. 2016b). Daher wurde die Operationszeit so kurz wie möglich, stets unter 15 min, gehalten, um zusätzliche Effekte des volatilen Anästhetikums zu minimieren.

In dieser Arbeit wurden zwei Varianten des MCAO-Modells angewandt, welche sich in der Okklusions- und Reperfusionzeit unterschieden. Ein milderes Schlaganfallmodell, mit 30 min Okklusion und 72 h Reperfusionzeit und ein strengeres Modell mit 60 min Okklusion und 48 h Reperfusion. Als Kontrollgruppe dienten 0.9% NaCl i.p. Injektionen. Die i.p. MT-Injektionen erfolgten unmittelbar nach MCAO Induktion und wurden alle 12 h wiederholt. Bei der vorliegenden Arbeit wurde das Therapiekonzept von Giralt et al. übernommen, welches bereits erfolgreich im fokalen Kryoläsionsmodell an Mäusen angewendet worden war (Giralt et al. 2002).

Postoperative Gewichts- und Temperaturkontrollen wurden alle 24 h durchgeführt. Ein möglicher therapeutischer Effekt über Veränderungen des postoperativen Gewichts und der Körpertemperatur an den Tieren erscheint angesichts ähnlicher Verlaufskurven zwischen den Interventionsgruppen unwahrscheinlich (Abbildung 8).

Es konnte festgestellt werden, dass im milderen Infarktmodell mit einer geringeren Ischämiezeit (30 min) und einer längeren Reperfusionzeit (72 h) eine signifikante Reduzierung der Infarktvolumina in der MT-II i.p. Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden konnte (Abbildung 10a-c). Weiterhin konnte ein signifikant geringeres neurologisches Defizit beim 30-min-Okklusionsmodell bei den MT-II behandelten Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe schon nach 48 h festgestellt werden. Dieser setzte sich ebenfalls nach 72 h Reperfusionzeit fort (Abbildung 11b).

Bei einer geringeren Ischämiezeit konnte im längeren Beobachtungszeitraum eine Reduzierung des Infarkt Volumens und ein geringeres neurologisches Defizit durch eine MT-II-Behandlung beobachtet werden. MT-II scheint allerdings vor allem bei milderen Schlaganfällen neuroprotektiv zu wirken und einen Zusatznutzen als Therapeutikum aufzuweisen. Der Effekt machte sich hier vor allem nach 72 h deutlich bemerkbar, was auf einen Zusatznutzen von MT-II weniger im akuten Therapiezeitraum, sondern eher in der Langzeittherapie hindeutet. Eventuell wären bei längeren Ischämiezeiten auch im späteren Verlauf neuroprotektive Wirkungen sichtbar gewesen, wenn ein späterer Analysezeitpunkt gewählt worden wäre. Daher wären Langzeitversuche, mit Reperfusionzeiten von zwei Wochen bis einem Monat nach MCAO-Induktion sinnvoll, um die positiven, aber auch möglichen negativen Therapieeffekte von MT-II besser beurteilen zu können.

Der neuroprotektive Effekt einer MT-II i.p. Behandlung im MCAO-Modell deckt sich mit einer während dieser Arbeit erschienen Veröffentlichung, die ein ähnliches Ergebnis bei Ratten zeigen konnte (Diaz-Ruiz et al. 2014). Dort wurde an der Ratte das transiente MCAO-Modell mit 2 h Okklusionszeit und einer anschließenden Reperfusionzeit von 72 h durchgeführt und die Tiere mit MT-II i.p. behandelt. Allerdings erfolgte im Gegensatz zu dieser Arbeit nur eine zweimalige MT-II Injektion in einer im Verhältnis zur Gewicht der Ratte geringeren Dosis. Es konnte ebenfalls ein vermindertes neurologisches Defizit, wie auch eine Reduktion der Infarktflächen durch MT-II i.p. erfasst werden. Hingegen wurden in jener Arbeit die Ergebnisse nicht weiter differenziert betrachtet und es erfolgten keine ausgedehnten Versuche zu dieser Aussage. Die Infarktfläche wurde nur in einer Ebene gemessen und daher keine Volumenberechnung durchgeführt. Hier wäre die Betrachtung weiterer Ebenen, der direkten und indirekten Infarktvolumina und des Hirnödems aufschlussreich gewesen. Auch statistische Mängel in der Auswertung mindern die Aussagekraft ab. Der verwendete *Neuroscore* stellte eine Ordinalskala dar, zur Beurteilung wurden aber statistische Tests auf Basis einer Intervallskala verwendet, sodass Angaben über Signifikanzen fragwürdig erscheinen.

In einer erst kürzlich erschienenen Studie wurde außerdem die i.p. Injektion von MT-I an Mäusen im MCAO-Modell getestet (Smith et al. 2018). Deckend mit dieser Arbeit, konnte eine signifikante Reduzierung des Infarkt Volumens und des neurologischen Defizits durch eine MT-I i.p. Injektion gezeigt werden. Als Modell wurde eine 30 min Okklusionszeit mit einer 48 h Reperfusionzeit verwendet. Da dieser Versuch nur ein Nebenergebnis zu dem Hauptziel der Arbeit - nämlich den therapeutischen Nutzen von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen bei zerebraler Ischämie an der Maus zu evaluieren - war, erfolgten

keine weiteren Experimente zu den Ergebnissen. Es wurden keine weiteren MCAO-Zeiten getestet und keine histologischen oder molekularbiologischen Effekte der MT-I-Behandlung betrachtet. Es wurden nur direkte Infarktflächen, im Gegensatz zu Volumina, betrachtet, allerdings wurde ein feingliedrigerer *Neuroscore* als bei der vorliegenden Arbeit verwendet. Interessanterweise wurden in der besagten Arbeit deutlich höhere MT-I-Konzentrationen injiziert als bisher in der Literatur bekannt, wobei hierzu eine Erklärung fehlte.

Sinnvoll wären weitere Versuche mit längerer Applikations- und Reperfusionsdauer, um Langzeiteffekte und Limitationen der MT-II Behandlung besser erfassen zu können.

Ebenso wurden bisher eher kleinere Tierzahlen in den vergleichenden Gruppen verwendet. Auf Grund der gezeigten positiven Therapieergebnisse von MT-II könnte in zukünftigen Experimenten mit größeren Tierzahlen in den Gruppen gearbeitet werden, um die statistische Teststärke zu erhöhen, bevor klinische Studien durchgeführt werden.

Ein weiterer Punkt ist die Injektionsmodalität des MT-II. In dieser Arbeit wurde nur eine der möglichen Injektionsformen verwendet. Dabei erfolgte die Injektion des MT-II vor MCAO-Induktion. In weiteren Versuchen könnte beispielweise eine Applikation erst 2 h nach MCAO-Induktion durchgeführt werden, um näher an die klinischen Verhältnisse bei der Patientenversorgung zu kommen. Weiterhin könnte eine Konzentrationsreihe erstellt werden mit eineinhalbfacher, zweifacher, zweieinhalbfacher Erhöhung der bisherigen Injektionskonzentration von MT-II, damit eine denkbare Steigerung der Wirkung oder ein mögliches Einsetzen von unerwünschten Arzneimittelwirkungen beobachtet werden könnte. Ebenfalls klinisch bedeutsam wäre die Frage, ob intravenöse oder orale Applikationen von MT-II durchführbar und neuroprotektiv wären.

4.3 Das neuronale Überleben und die Aktivierung von inflammatorischen Zellen wird von MT-II nicht beeinflusst

Die MT-II-Behandlung reduziert im milderen Schlaganfallmodell das Infarktvolumen und führt zur einem geringeren neurologischen Defizit. Um ein zelluläres Korrelat zu finden, erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen der Neurone und monozytären Zellen an den infarzierten Mäusehirnen und anschließend deren Auszählung. Damit konnte ein Maß für das neuronale Überleben wie auch des inflammatorischen Geschehens erhalten werden.

Das neuronale Überleben wurde als Quotient der Neuronenzahl von ipsilateraler (infarzierter) zur kontralateraler Hemisphäre berechnet. Beim neuronalen Überleben zeigten sich keine Unterschiede zwischen MT-II behandelter und der Kontrollgruppe, weder im 60-min-

Okklusions- und 48-h-Reperfuisionsmodell (Abbildung 12a), noch bei 30 min Okklusions- und 72 h Reperfuisionszeit (Abbildung 12b).

Die migrierten Makrophagen und aktivierten Mikroglia wurden jeweils in der ipsilateralen Hemisphäre als Ganzes ausgezählt. Auch hier zeigten sich zwischen der MT-II Gruppe und der unbehandelten Gruppe keine Unterschiede in beiden MCAO-Modellen. Zwar konnten im milderen Schlaganfallmodell bei den MT-II injizierten Mäusen eine reduzierte Anzahl an aktivierten Mikroglia ipsilateral festgestellt werden (Abbildung 12d), allerdings ist dieses Ergebnis ohne statistische Signifikanz.

Die zelluläre Auswertung der beiden MCAO-Modelle zur Bewertung einer MT-II Applikation zeigt eine Diskrepanz zu der Auswertung der Infarktvolumina und des neurologischen Defizits. Während eine MT-II Behandlung sowohl eine signifikante Reduzierung des Infarktvolumens im milden Schlaganfallmodell als auch ein geringeres neurologisches Defizit bewirkt, ist auf zellulärer Ebene kein signifikanter Unterschied im neuronalen Überleben feststellbar. Mögliche Ursachen dafür könnte an der verwendeten Methode liegen: Es wurde nur die Schnittebene 3 (3.9 mm interaurale Position) gemessen. Zwar zeigten die Ebenen 3 und 4 (1.9 mm interaurale Position) die höchste Infarktausprägung im verwendeten MCAO-Modell (Abbildung 10b), aber eventuell wäre eine Beachtung beider Ebenen in der Auszählung aussagekräftiger. Ein weiterer Aspekt könnte die Auszählung entlang einer einzigen Linie sein. Diese erfasst nur einen kleinen Bereich des Infarktareals, hier wäre es auch möglich ein größeres Areal zur Auszählung zu nehmen, um vielleicht kongruentere Daten zu den Ergebnissen der Infarktvolumina zu erhalten. Ein weiterer Störfaktor bei der Auswertung könnten Artefakte gewesen sein, entweder bedingt durch die Präparation oder durch das Hirnödem in den fluoreszenzmarkierten Arealen.

Ein nicht vorhandener Unterschied in der Aktivierung und Migration von monozytären Zellen ins ischämische Areal zwischen einer MT-II Behandlung zu einer Kontrollgruppe lässt nicht auf eine generelle Einflusslosigkeit von Metallothionein im inflammatorischen Geschehen schließen. Es konnte sowohl eine Expression von MT-I/II in monozytären Zellen (Kimura 1991) wie auch eine direkte Interaktion zwischen extrazellulärem MT-II und Makrophagen nachgewiesen werden (Youn et al. 1995). Zudem ist die Reduzierung der Mikrogliaaktivität durch MT-II Applikation bei fokaler kortikaler Läsion an Ratten schon bekannt (Chung et al. 2009). Allerdings konnten diese Versuche nun zeigen, dass wohl die antiinflammatorische Wirkung des Metallothioneins nicht vorwiegend mit einer Reduzierung oder Hemmung von monozytären Zellen zu erklären ist, sondern weitere andere Ursprünge haben

muss, wie eine Reduzierung von inflammatorischen Zytokinen oder einer Beeinflussung des adaptiven Immunsystems (Manso et al. 2011).

Weitere zukünftige *in-vivo*-Versuche könnten sich genauer mit dem neuronalen Überleben und dem Einfluss von Zellen des Immunsystems nach MT-II Injektion befassen. Beispielsweise könnten durchflusszytometrische Untersuchungen am Hirngewebe Aussagen über die Immigration und Aktivierung verschiedener inflammatorischer Zellen treffen und eine Option bieten neuronale Zellen zu quantifizieren.

4.4 Extrazelluläres MT-II führt zu einer Supprimierung von TNF- α

Um mögliche Mechanismen und Ursachen für die neuroprotektive Wirkung von MT-II im ischämischen Insult zu erforschen wurden die Genexpressionen von ausgewählten Kandidatengen im Gehirn mittels quantitativer *Real-Time-PCR* (qRT-PCR) im 30-min-MCAO-Modell analysiert und MT-II behandelte Gruppen gegen eine Kontrollgruppe verglichen.

Es wurden drei Gruppen beobachtet: Die eine Gruppe erhielt eine MT-II i.p. Injektion und eine weitere Gruppe diente als Kontrolle. Eine dritte Gruppe an Tieren erhielt keine MCAO-Operation, allerdings eine MT-II i.p. Injektion über 72 h, zeitgleich zu den operierten Mäusen. Die letztere Gruppe diente als Vergleich, um eine eventuelle Beeinflussung der Genexpression durch eine alleinige MT-II Applikation festzustellen.

Als proinflammatorische Kandidatengene wurden ausgewählt: Interleukin (IL)-1 β , Tumornekrosefaktor (TNF)- α , *Cysteiny-Aspartate Specific Protease* (Caspase)-1 und *Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD* (ASC). Die Auswahl dieser Proteine erfolgte, da sie zentrale inflammatorische Mechanismen beim ischämischen Schlaganfall betreffen (Iadecola und Anrather 2011).

Die Zytokine IL-1 β und TNF- α sind wichtige proinflammatorische Faktoren im ischämischen Schlaganfall und deren erhöhte Ausschüttung ist im ischämischen Areal bekannt (Iadecola und Anrather 2011). Ebenso ist die proinflammatorische Caspase-1 involviert, welches als Aktivator von Zytokinen, insbesondere IL-1 β , eine wichtige Rolle spielt und über das Inflammasom aktiviert wird (Fann et al. 2013).

ASC ist ein Hauptbestandteil von intrazellulären Immunkomplexen, den Inflammasomen, welche zum angeboren Immunsystem zählen (Strowig et al. 2012). Sie werden stark durch DAMPs aktiviert, bewirken eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und fördern so die Immunreaktion. Eine Hauptfunktion liegt in der Spaltung des Zymogens Pro-Caspase-1 zu Caspase-1, was dann IL-1 β aktiviert (Strowig et al. 2012). Ihre Bedeutung in

der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls ist noch weitestgehend unerforscht und offen, es bestehen aber durchaus Anhalte für eine wichtige Funktion im inflammatorischen Geschehen des ischämischen Insults (Trendelenburg 2014).

Die Proteine IL-1 β , TNF- α und Caspase-1 wurden ausgewählt, um die antiinflammatorische Wirkung von MT-II auf eine mögliche Repression dieser entzündungsfördernden Mediatoren zurückführen zu können. ASC wurde ausgewählt, um eine eventuelle bisher unbekannt Verbindung zwischen MT-II und den Inflammasomen feststellen zu können. Neben diesen Gentranskripten wurde die endogene MT-II Expression gemessen, um eine vermutete Repression oder Induktion dergleichen durch exogenes MT-II erkennen zu können. Außerdem wurde die Expression des Gens vom Rezeptor Megalin betrachtet.

Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP)-2 oder auch Megalin genannt, ist ein Multiliganden-Rezeptor aus der LDL-Familie (Herz 2009). Es konnte bisher kein rein spezifischer MT-II Rezeptor festgestellt werden, allerdings kann MT-II als Ligand für LRP-1 und Megalin dienen (Ambjørn et al. 2008). Aktuell wird davon ausgegangen, dass Astrozyten im ZNS MT-I/II sezernieren, während Neurone MT-I/II durch LRP1 und Megalin im Bereich ihres Somas detektieren (Leung et al. 2012) und die Rezeptoren internalisiert werden (Asmussen et al. 2009). Diese sollen dann verschiedene auch wachstumsfördernde Signalwege aktivieren können, welche die neuroprotektiven Eigenschaften von MT-I/II ausmachen (West et al. 2011). Daher sollte nun erfasst werden ob eine exogene MT-II Zufuhr einen Effekt auf die Expression des Rezeptors Megalin hat.

Die Genexpressionsmuster zeigten im Versuch nur für TNF- α eine signifikante Suppression unter einer MT-II i.p. Injektion im MCAO-Modell (Abbildung 14a). Die proinflammatorischen Proteine IL-1 β und Caspase-1, wie auch der Inflammasombestandteil ASC zeigten eine Expressionssteigerung durch die Ischämie, welche zu erwarten war (Lammerding et al. 2016), allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe festgestellt werden. Auch die MT-II Expression war induziert durch die MCAO, hingegen zeigte hier eine exogene MT-II Applikation keinen Unterschied auf die Genexpression. Ebenfalls konnte eine alleinige MT-II i.p. Injektion ohne MCAO-Operation keine Veränderungen in den Genexpressionen im Gegensatz zu unbehandelten Mäusen erbringen.

In den ausgewählten Kandidatengen zeigte eine MT-II i.p. Behandlung im MCAO-Modell an Mäusen eine Repression der TNF- α Expression. Die Unterdrückung der TNF- α Expres-

sion könnte eine mögliche Erklärung der antiinflammatorischen Eigenschaften von Metallothioneinen sein, welche einen neuroprotektiven Effekt nach ischämischem Schlaganfall bewirken.

Bisher sind die intrazellulären Signalkaskaden der Metallothionein vermittelten Wirkungen auf die Zelle noch nicht genau verstanden (West et al. 2011). Auch die Unterschiede in den Funktionen zwischen extrazellulärem zu intrazellulärem Metallothionein bedürfen weiterer Forschung zur Signaltransduktion, Genexpression und möglichen Rezeptoren. MT-I/II wird von Astrozyten im ZNS intrazellulär bei zerebralem Schaden exprimiert und vermittelt neuroprotektive und neuroregenerative Eigenschaften durch die Reduzierung von ROS und Bindung von Schwermetallionen (Chung et al. 2008). Weiterhin konnten MT-I/II Expressionen in Neuronen nachgewiesen werden (Hidalgo et al. 2006). Ihre Expression wird von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF- α und Glukokortikoiden induziert (Hidalgo und Carrasco 1998). Lange Zeit wurden MTs rein intrazelluläre Effekte zugesprochen da Daten für einen möglichen Rezeptor fehlten. Nun konnte für das von Astrozyten sezernierte MT-I/II nachgewiesen werden, dass es von Neuronen detektiert werden kann (Ambjørn et al. 2008).

Das extrazelluläre MT-II fördert die Zellregeneration und das Axonenwachstum nach physikalischer *in-vitro*-Axotomie an kultivierten Hinterwurzelganglien (Leung et al. 2012). Wie erwähnt, spielen hier wohl rezeptorvermittelte Wirkungen eine Rolle. Die intrazellulären Signalwege sind nicht genau bekannt (West et al. 2011). Es bestehen unter anderem Hinweis auf einen G-Protein gekoppelten *second-messenger*, der zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen und des PI3-Kinase Wegs zu wachstumsfördernden Effekten führt (Asmussen et al. 2009). Ebenfalls wird das neuronale Überleben durch Aktivierung der Expression von CREB-abhängigen Genen (Chung et al. 2008) und Signalkaskaden, welche über die Phospholipase C aktiviert werden gefördert (Asmussen et al. 2009). Dies sind alles bekannte wachstumsfördernde, anabole Signalwege. Antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkungen könnten andererseits durch eine Beeinflussung des STAT-Signalweges erfolgen, welches unter MT-Wirkung inhibiert wird (Leung et al. 2012). Eventuell besteht sogar eine direkte Suppression proapoptotischer Faktoren durch MT-II (Ma et al. 2015).

Um weitere mögliche Wirkmechanismen zu untersuchen, müssten Genexpressionen anderer pro- und antiinflammatorischer Komponenten getestet werden und der Einfluss von MT-I/II hierauf beurteilt werden. Neben immunologischen Faktoren wären auch wachstumsfördernde Proteine von Interesse, um die mannigfaltigen Wirkungen von Metallothionein weiter erforschen zu können.

Außerdem dürften die Ergebnisse nicht nur aus der Betrachtung des Transkriptoms geschlossen werden, da auch posttranskriptionale Regulationen eine Bedeutung für die letztendlich translationierten Proteine haben. So gibt es Hinweise auf eine posttranskriptionale Regulation der MT-I/II Expression und dadurch nicht korrelierender mRNA zu Proteinmenge (Vasconcelos et al. 2002). Mögliche beeinflussende Faktoren müssten daher auf Proteomebene betrachtet werden, um den Einfluss einer MT-II Injektion besser einschätzen zu können. Ebenfalls könnten Analysen des Phosphoproteoms oder die Verwendung von transgenen Tieren, wie Megalin-defiziente Mäuse, aufschlussreiche Ergebnisse zu Wegen der Signaltransduktion von MT liefern.

4.5 Eine klinische Anwendung von Metallothionein im ischämischen Schlaganfall? Ein Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals ein neuroprotektiver Effekt einer MT-II i.p. Injektion im MCAO-Modell an Mäusen gezeigt werden. In einem milden Schlaganfallmodell, mit einer kurzen Ischämiezeit (30 min) und einer längeren Beobachtungszeit von 72 h führten MT-II Applikationen zu einem reduzierten Infarktvolumen und einem geringeren neurologischen Defizit. Im Sinne einer antiinflammatorischen Wirkung konnte eine Repression der TNF- α -Expression durch MT-II Injektion festgestellt werden.

Diese Daten erweitern die Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung von MT-I/II im ischämischen Schlaganfall (Santos et al. 2012), insbesondere um die Punkte, dass hier erstmalig die Applikation von MT-II am MCAO-Modell an der Maus durchgeführt wurde und auch der Zusammenhang mit der TNF- α Expression nachgewiesen werden konnte.

Trotz alledem sind weitere Versuche nötig, bevor MT als mögliches Therapeutikum im ischämischen Schlaganfall zum Einsatz kommen kann.

Die meisten Studien, wie auch diese Arbeit, betrachten die MT Applikation nur über einen kurzen Zeitraum (Santos et al. 2012). Hier wären Langzeitversuche nötig, in denen die neuroprotektive Wirkung einer MT-Behandlung an Versuchstieren über Wochen beobachtet und bewertet wird. Dies ließe Rückschlüsse ziehen auf eine mögliche zu verwendende Therapiedauer und die Langzeiteffekte einer MT Behandlung sowie die unerwünschten Arzneimittelwirkungen oder toxischen Auswirkungen von MT.

Bisher ist wenig bekannt zu pharmakokinetischen und toxischen Eigenschaften einer MT-Applikation im Organismus:

Es konnte demonstriert werden, dass eine MT-II i.p. Injektion rasch von Mäusen absorbiert und im Organismus schnell distribuiert wird (Lewis et al. 2012). Innerhalb von 4 h erfolgt bereits die renale Elimination. Eine Akkumulation wiederholter MT-II i.p. Injektionen konnte in keinem Kompartiment festgestellt werden. Gleiches wurde auch bei einer intramuskulären Verabreichung beobachtet (Lewis et al. 2012). Wie in mehreren Versuchen nachgewiesen (Giralt et al. 2002; Lewis et al. 2012), ist injiziertes MT-II nicht in der Lage, die intakte Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Außerdem gibt es Hinweise auf unterschiedliche Plasma-Halbwertszeiten für die einzelnen MT-Isoformen (Kershaw und Klaassen 1992). Demnach verläuft die Elimination von MT-II in Ratten nach Injektion von Zn^{2+} über die Leber langsamer als die von MT-I, welches einen Vorteil für die therapeutische Verwendung von MT-II darstellt.

In diesem Zusammenhang wäre eine mögliche Alternative, MT nicht als gesamtes Protein, sondern nur ein funktionelles Teilpeptid zu injizieren, welches eventuell bessere pharmakokinetische Eigenschaften aufweist und weniger Raum für Interaktionen und Nebenwirkungen bietet. Ein in Anlehnung an MT synthetisiertes Peptid, das EmtinB, zeigte *in-vitro* stimulierende Eigenschaften auf das neuronale Wachstum und Überleben (Ambjørn et al. 2008) wie auch *in-vivo* die Fähigkeit, die intakte Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Sonn et al. 2010), und könnte eine mögliche therapeutische Alternative sein (Ambjørn et al. 2008). Zwar besteht im ischämischen Areal eine Blut-Hirn-Schrankenstörungen (Iadecola und Anrather 2011), allerdings könnte so auch intaktes Gewebe eine gewisse Konzentration des Pharmakons erhalten und dadurch eine Ausbreitung des Schadens minimiert werden.

Erstrebenswert wäre der Einsatz von MT als neuroprotektive Therapie additiv zur schon bestehenden Reperfusionstherapie.

Die Sicherheit einer additiven MT-II-Therapie konnte in unserer Arbeitsgruppe von einem anderen Doktoranten an Mäusen bestätigt werden (Eidizadeh et al. 2015).

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so besteht in den ubiquitär vorkommenden Metallothioneinen-I/II ein neuroprotektives Potenzial, welches als ein neuer Ansatz für die Therapie des ischämischen Schlaganfalls durchaus vielversprechend ist.

5 Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall ist die zweithäufigste Todesursache weltweit mit schweren Folgen für die betroffenen Personen, wie weitreichenden sozioökonomischen Konsequenzen. Neuroprotektive Substanzen werden seit Jahrzehnten erforscht, aber noch konnte kein Therapieansatz in den klinischen Alltag translatiert werden.

Eine mögliche Option könnten in diesem Zusammenhang Metallothioneine (MTs) sein. MTs sind ubiquitär exprimierte cysteinreiche Proteine, welche überwiegend als Chelatoren zweiwertiger Metallionen fungieren. Die Isoformen MT-I und MT-II haben starke Homologien zueinander und zeigten in einer Reihe von Studien antiinflammatorische, antiapoptotische, wachstumsfördernde, neuroregenerative und neuroprotektive Eigenschaften.

Um den neuroprotektiven Effekt von MT-II weiter zu beurteilen, wurde in dieser Arbeit erstmals MT-II intraperitoneal (i.p.) in einem Standardmodell der Schlaganfallforschung, dem *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)-Modell an Mäusen, appliziert und sein Effekt gegen eine Kontrollgruppe (NaCl i.p.) in Bezug auf das neurologische Defizit, Infarktvolume, neuronales Überleben sowie die Aktivierung monozytärer Zellen beurteilt. Beim MCAO-Modell erfolgte in einer minimalinvasiven Operation eine transiente Okklusion der *A. cerebri media*, welches eine fokale Hirnischämie verursachte. Es wurden zwei Modelle verwendet, ein strengeres Infarktmodell mit 60-min-Okklusions- und 48-h-Reperfusionzeit und ein mildes mit 30 min Okklusion und 72 h Reperfusion. Dabei konnte im milden MCAO-Infarktmodell durch eine MT-II i.p. Injektion eine deutliche Reduzierung des Infarktvolume und des neurologischen Defizits erreicht werden. Ein Einfluss auf das neuronale Überleben und die Aktivierung von monozytären Zellen konnte nicht gezeigt werden. Weiterhin erfolgten Genexpressionsanalysen der infarzierten Gehirne mittels quantitativer *Real-Time-PCR* von ausgewählten proinflammatorischen Kandidatengenen und des MT-II- und Megalin-Gens. Dabei stellte sich heraus, dass eine MT-II i.p. Injektion im MCAO-Modell zu einer deutlichen Repression der TNF- α -Expression im Gegensatz zur Kontrollgruppe führt.

Insgesamt besteht eine deutliche Evidenz für einen neuroprotektiven Effekt einer MT-II-Applikation im ischämischen Schlaganfall, und es sind weitere Untersuchungen sinnvoll, um die Möglichkeit einer klinischen Anwendung von MT zu beurteilen.

6 Literaturverzeichnis

Internetquellen

Clustal Omega:

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Zugriff: 11.05.2017

Ensembl Datenbank:

<https://www.ensembl.org/>; Zugriff: 15.04.2014

Primer-Blast:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; Zugriff: 15.04.2014

Protein Data Bank:

<http://www.rcsb.org/>; Zugriff: 11.05.2017

Literaturquellen

Alawieh A, Elvington A, Tomlinson S (2015): Complement in the Homeostatic and Ischemic Brain. *Front Immunol* 6, 417

Ambjørn M, Asmussen JW, Lindstam M, Gotfryd K, Jacobsen C, Kiselyov VV, Moestrup SK, Penkowa M, Bock E, Berezin V (2008): Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family. *J Neurochem* 104, 21–37

Andrews GK (2000): Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 59, 95–104

Anrather J, Iadecola C (2016): Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 13, 661–670

Asmussen JW, Von Sperling ML, Penkowa M (2009): Intraneuronal signaling pathways of metallothionein. *J Neurosci Res* 87, 2926–2936

Baba H, Tsuneyama K, Yazaki M, Nagata K, Minamisaka T, Tsuda T, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakajima T, et al. (2013): The liver in itai-itai disease (chronic cadmium

- poisoning): pathological features and metallothionein expression. *Mod Pathol* 26, 1228–1234
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986): Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke J Cereb Circ* 17, 472–476
- Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, et al. (2017): Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135, e146–e603
- Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, Nederkoorn PJ, Wermer MJH, et al. (2015): A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 372, 11–20
- Blaauwgeers HG, Anwar Chand M, van den Berg FM, Vianney de Jong JM, Troost D (1996): Expression of different metallothionein messenger ribonucleic acids in motor cortex, spinal cord and liver from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 142, 39–44
- Braun W, Vasák M, Robbins AH, Stout CD, Wagner G, Kägi JH, Wüthrich K (1992): Comparison of the NMR solution structure and the x-ray crystal structure of rat metallothionein-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10124–10128
- Busch MA, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Gößwald A (2013): Prävalenz des Schlaganfalls bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 56, 656–660
- Cai L, Koropatnick J, Cherian MG (1995): Metallothionein protects DNA from copper-induced but not iron-induced cleavage in vitro. *Chem Biol Interact* 96, 143–155
- Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, Yan B, Dowling RJ, Parsons MW, Oxley TJ, et al. (2015): Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection. *N Engl J Med* 372, 1009–1018
-

- Carrasco J, Adlard P, Cotman C, Quintana A, Penkowa M, Xu F, Van Nostrand WE, Hidalgo J (2006): Metallothionein-I and -III expression in animal models of Alzheimer disease. *Neuroscience* 143, 911–922
- Chen L, Jin T, Huang B, Nordberg G, Nordberg M (2006): Critical exposure level of cadmium for elevated urinary metallothionein--an occupational population study in China. *Toxicol Appl Pharmacol* 215, 93–99
- Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA (2004): Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother* 1, 36–45
- Cherian MG, Nordberg M (1983): Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* 28, 1–15
- Cherian MG, Howell SB, Imura N, Klaassen CD, Koropatnick J, Lazo JS, Waalkes MP (1994): Role of metallothionein in carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 126, 1–5
- Christensen EI, Birn H (2002): Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 256–266
- Chung RS, Vickers JC, Chuah MI, West AK (2003): Metallothionein-IIA promotes initial neurite elongation and postinjury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23, 3336–3342
- Chung RS, Hidalgo J, West AK (2008): New insight into the molecular pathways of metallothionein-mediated neuroprotection and regeneration. *J Neurochem* 104, 14–20
- Chung RS, Leung YK, Butler CW, Chen Y, Eaton ED, Pankhurst MW, West AK, Guillemin GJ (2009): Metallothionein treatment attenuates microglial activation and expression of neurotoxic quinolinic acid following traumatic brain injury. *Neurotox Res* 15, 381–389
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002): Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci CMLS* 59, 627–647
- DGN-Leitlinie 2012 zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. Thieme Verlag, September 2012
-

- DGN-Leitlinie 2015 zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Ergänzung 2015 zur Rekanalisierenden Therapie. Herausgegeben von der Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Oktober 2015
- DGN Leitlinie 2015 zur Sekundärprophylaxe ischämischer Schlaganfall und transitorische ischämische Attacke (Teil 1). Herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie und der Deutschen Schlaganfall-Gesellschaft, Januar 2015
- Diaz-Ruiz A, Vacio-Adame P, Monroy-Noyola A, Méndez-Armenta M, Ortiz-Plata A, Montes S, Rios C (2014): Metallothionein-II inhibits lipid peroxidation and improves functional recovery after transient brain ischemia and reperfusion in rats. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 436429
- Dirnagl U (2012): Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann N Y Acad Sci* 1268, 21–25
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397
- Dziegiel P, Pula B, Kobierzycki C, Stasiolek M, Podhorska-Okolow M (2016): Metallothioneins in Normal and Cancer Cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 218, 1–117
- Eidizadeh A, Trendelenburg G (2016): Focusing on the protective effects of metallothionein-I/II in cerebral ischemia. *Neural Regen Res* 11, 721–722
- Eidizadeh A, Khajehalichalehshtari M, Freyer D, Trendelenburg G (2015): Assessment of the Therapeutic Potential of Metallothionein-II Application in Focal Cerebral Ischemia In Vitro and In Vivo. *PloS One* 10, e0144035
- Etzel KR, Cousins RJ (1981): Hormonal regulation of liver metallothionein zinc: independent and synergistic action of glucagon and glucocorticoids. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* 167, 233–236
- Fann DY-W, Lee S-Y, Manzanero S, Chunduri P, Sobey CG, Arumugam TV (2013): Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes. *Ageing Res Rev* 12, 941–966
- Feigin VL, Norrving B, Mensah GA (2017): Global Burden of Stroke. *Circ Res* 120, 439–448
-

- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH, STAIR Group (2009): Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke J Cereb Circ* 40, 2244–2250
- Fitzgerald M, Nairn P, Bartlett CA, Chung RS, West AK, Beazley LD (2007): Metallothionein-IIA promotes neurite growth via the megalin receptor. *Exp Brain Res* 183, 171–180
- Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C (2015): Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther* 9, 3445–3454
- Giralt M, Penkowa M, Lago N, Molinero A, Hidalgo J (2002): Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp Neurol* 173, 114–128
- Gonçalves I, Quintela T, Baltazar G, Almeida MR, Saraiva MJM, Santos CR (2008): Transthyretin interacts with metallothionein 2. *Biochemistry (Mosc)* 47, 2244–2251
- Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, Roy D, Jovin TG, Willinsky RA, Sapkota BL, et al. (2015): Randomized Assessment of Rapid Endovascular Treatment of Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 372, 1019–1030
- Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener HC (2001): Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke* 32, 2559–2566
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, et al. (2008): Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359, 1317–1329
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J (2003): Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* 533, 211–226
- Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA (1996): Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 16, 605–611
- Heger Z, Rodrigo MAM, Krizkova S, Ruttkay-Nedecky B, Zalewska M, Del Pozo EMP, Pelfrene A, Pourrut B, Stiborova M, Eckschlager T, et al. (2016): Metallothionein as
-

- a Scavenger of Free Radicals - New Cardioprotective Therapeutic Agent or Initiator of Tumor Chemoresistance? *Curr Drug Targets* 17, 1438–1451
- Herz J (2009): Apolipoprotein E receptors in the nervous system: *Curr Opin Lipidol* 20, 190–196
- Heuschmann P, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas P, Berger K (2010): Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Aktuelle Neurol* 37, 333–340
- Hidalgo J, Carrasco J (1998): Regulation of the synthesis of brain metallothioneins. *Neurotoxicology* 19, 661–666
- Hidalgo J, Penkowa M, Espejo C, Martínez-Cáceres EM, Carrasco J, Quintana A, Molinero A, Florit S, Giralt M, Ortega-Aznar A (2006): Expression of metallothionein-I, -II, and -III in Alzheimer disease and animal models of neuroinflammation. *Exp Biol Med Maywood NJ* 231, 1450–1458
- Hoffmann S, Harms H, Ulm L, Nabavi DG, Mackert B-M, Schmehl I, Jungehulsing GJ, Montaner J, Bustamante A, Hermans M, et al. (2016a): Stroke-induced immunodepression and dysphagia independently predict stroke-associated pneumonia – The PREDICT study. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 3671-3682
- Hoffmann U, Sheng H, Ayata C, Warner DS (2016b): Anesthesia in Experimental Stroke Research. *Transl Stroke Res* 7, 358–367
- Hölttä M, Minthon L, Hansson O, Holmén-Larsson J, Pike I, Ward M, Kuhn K, Rüetschi U, Zetterberg H, Blennow K, Gobom J (2015): An integrated workflow for multiplex CSF proteomics and peptidomics-identification of candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer’s disease. *J Proteome Res* 14, 654–663
- Holzapfel B, Wickert L (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biol Unserer Zeit* 37, 120–126
- Howells C, West AK, Chung RS (2010): Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): evaluation of the biological function of growth-inhibitory factor in the injured and neurodegenerative brain. *FEBS J* 277, 2931–2939
-

- Iadecola C, Anrather J (2011): The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796–808
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998): Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 1–9
- Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A, San Román L, Serena J, Abilleira S, Ribó M, et al. (2015): Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med* 372, 2296–2306
- Jovin TG, Saver JL, Ribo M, Pereira V, Furlan A, Bonafe A, Baxter B, Gupta R, Lopes D, Jansen O, et al. (2017): Diffusion-weighted imaging or computerized tomography perfusion assessment with clinical mismatch in the triage of wake up and late presenting strokes undergoing neurointervention with Trevo (DAWN) trial methods. *Int J Stroke* 12, 641–652
- Kagi JH, Vallee BL (1961): Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physico-chemical properties. *J Biol Chem* 236, 2435–2442
- Kapinya KJ, Löwl D, Fütterer C, Maurer M, Waschke KF, Isaev NK, Dirnagl U (2002): Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 33, 1889–1898
- Kelly EJ, Palmiter RD (1996): A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat Genet* 13, 219–222
- Kershaw WC, Klaassen CD (1992): Degradation and metal composition of hepatic isometallothioneins in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 112, 24–31
- Kimura M (1991): Metallothioneins of monocytes and lymphocytes. *Methods Enzymol* 205, 291–302
- Klassen RB, Crenshaw K, Kozyraki R, Verroust PJ, Tio L, Atrian S, Allen PL, Hammond TG (2004): Megalin mediates renal uptake of heavy metal metallothionein complexes. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F393-403
-

- Kobayashi H, Uchida Y, Ihara Y, Nakajima K, Kohsaka S, Miyatake T, Tsuji S (1993): Molecular cloning of rat growth inhibitory factor cDNA and the expression in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 19, 188–194
- Køhler LB, Berezin V, Bock E, Penkowa M (2003): The role of metallothionein II in neuronal differentiation and survival. *Brain Res* 992, 128–136
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G (1986): Experimental studies of ischemic brain edema. *Nosotchu* 8, 1–8
- Koumura A, Hamanaka J, Shimazawa M, Honda A, Tsuruma K, Uchida Y, Hozumi I, Satoh M, Inuzuka T, Hara H (2009): Metallothionein-III knockout mice aggravates the neuronal damage after transient focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1292, 148–154
- Krizkova S, Ryvolova M, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Majzlik P, Hubalek J, Provaznik I, Kizek R (2011): Electrophoretic fingerprint metallothionein analysis as a potential prostate cancer biomarker. *Electrophoresis* 32, 1952–1961
- Lammerding L, Slowik A, Johann S, Beyer C, Zendedel A (2016): Poststroke Inflammasome Expression and Regulation in the Peri-Infarct Area by Gonadal Steroids after Transient Focal Ischemia in the Rat Brain. *Neuroendocrinology* 103, 460–475
- Langhorne P, Stott DJ, Robertson L, MacDonald J, Jones L, McAlpine C, Dick F, Taylor GS, Murray G (2000): Medical Complications After Stroke : A Multicenter Study. *Stroke* 31, 1223–1229
- Leitlinie Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls 2012 siehe DGN-Leitlinie 2012
- Leitlinie Ergänzung zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls 2015 siehe DGN-Leitlinie 2015
- Leitlinie Sekundärprophylaxe ischämischer Schlaganfall und TIA 2015 siehe DGN-Leitlinie 2015
- Leung JY, Bennett WR, Herbert RP, West AK, Lee PR, Wake H, Fields RD, Chuah MI, Chung RS (2012): Metallothionein promotes regenerative axonal sprouting of dorsal root ganglion neurons after physical axotomy. *Cell Mol Life Sci CMLS* 69, 809–817
-

- Leung YK, Pankhurst M, Dunlop SA, Ray S, Dittmann J, Eaton ED, Palumaa P, Sillard R, Chuah MI, West AK, Chung RS (2010): Metallothionein induces a regenerative reactive astrocyte phenotype via JAK/STAT and RhoA signalling pathways. *Exp Neurol* 221, 98–106
- Lewis KE, Chung RS, West AK, Chuah MI (2012): Distribution of exogenous metallothionein following intraperitoneal and intramuscular injection of metallothionein-deficient mice. *Histol Histopathol* 27, 1459–1470
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989): Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84–91
- van Lookeren Campagne M, Thibodeaux H, van Bruggen N, Cairns B, Gerlai R, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG (1999): Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12870–12875
- Ma H, Su L, Yue H, Yin X, Zhao J, Zhang S, Kung H, Xu Z, Miao J (2015): HMBOX1 interacts with MT2A to regulate autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells. *Sci Rep* 5, 15121
- Manso Y, Adlard PA, Carrasco J, Vašák M, Hidalgo J (2011): Metallothionein and brain inflammation. *J Biol Inorg Chem* 16, 1103–1113
- Maret W, Li Y (2009): Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* 109, 4682–4707
- Margoshes M, Vallee BL (1957): A CADMIUM PROTEIN FROM EQUINE KIDNEY CORTEX. *J Am Chem Soc* 79, 4813–4814
- Masters BA, Quaipe CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD (1994): Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* 14, 5844–5857
- Meloni G, Vašák M (2011): Redox activity of α -synuclein-Cu is silenced by Zn₇-metallothionein-3. *Free Radic Biol Med* 50, 1471–1479
- Meloni G, Faller P, Vašák M (2007): Redox silencing of copper in metal-linked neurodegenerative disorders: reaction of Zn₇metallothionein-3 with Cu²⁺ ions. *J Biol Chem* 282, 16068–16078
-

- Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V (2000): Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35, 35–70
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G (1992): Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res* 269, 375–382
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010): The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67, 181–198
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992): NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Dev Camb Engl* 116, 201–211
- Nakazato K, Tomioka S, Nakajima K, Saito H, Kato M, Kodaira T, Yatsuzuka S, Shimomura Y, Hiroki T, Motoyama K, et al. (2014): Determination of the serum metallothionein (MT)1/2 concentration in patients with Wilson's disease and Menkes disease. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS* 28, 441–447
- Nordberg GF, Piscator M, Nordberg M (1971): On the distribution of cadmium in blood. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 30, 289–295
- Nordberg GF, Garvey JS, Chang CC (1982): Metallothionein in plasma and urine of cadmium workers. *Environ Res* 28, 179–182
- Nordberg M, Nordberg GF (1975): Distribution of metallothionein-bound cadmium and cadmium chloride in mice: preliminary studies. *Environ Health Perspect* 12, 103–108
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW (2006): 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59, 467–477
- Ostrakhovitch EA, Olsson P-E, Jiang S, Cherian MG (2006): Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Lett* 580, 1235–1238
- Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM (1992): MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6333–6337
-

- Pankhurst MW, Gell DA, Butler CW, Kirkcaldie MTK, West AK, Chung RS (2012): Metallothionein (MT) -I and MT-II expression are induced and cause zinc sequestration in the liver after brain injury. *PloS One* 7, e31185
- Pedersen MØ, Jensen R, Pedersen DS, Skjolding AD, Hempel C, Maretty L, Penkowa M (2009): Metallothionein-I+II in neuroprotection. *BioFactors* 35, 315–325
- Penkowa M, Carrasco J, Giralt M, Moos T, Hidalgo J (1999): CNS wound healing is severely depressed in metallothionein I- and II-deficient mice. *J Neurosci* 19, 2535–2545
- Penkowa M, Tio L, Giralt M, Quintana A, Molinero A, Atrian S, Vasák M, Hidalgo J (2006): Specificity and divergence in the neurobiologic effects of different metallothioneins after brain injury. *J Neurosci Res* 83, 974–984
- Reinecke F, Levanets O, Olivier Y, Louw R, Semete B, Grobler A, Hidalgo J, Smeitink J, Olckers A, Van der Westhuizen FH (2006): Metallothionein isoform 2A expression is inducible and protects against ROS-mediated cell death in rotenone-treated HeLa cells. *Biochem J* 395, 405–415
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernandez-Guillamon M, Lo EH, Montaner J (2008): MMP-9-Positive Neutrophil Infiltration Is Associated to Blood-Brain Barrier Breakdown and Basal Lamina Type IV Collagen Degradation During Hemorrhagic Transformation After Human Ischemic Stroke. *Stroke* 39, 1121–1126
- Samson SL, Gedamu L (1998): Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59, 257–288
- Santos CR, Martinho A, Quintela T, Gonçalves I (2012): Neuroprotective and neuroregenerative properties of metallothioneins. *IUBMB Life* 64, 126–135
- Sato M, Bremner I (1993): Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 14, 325–337
- Sato M, Sasaki M, Hojo H (1994): Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in rat tissues. *Int J Immunopharmacol* 16, 187–195
-

- Saydam N, Georgiev O, Nakano MY, Greber UF, Schaffner W (2001): Nucleo-cytoplasmic trafficking of metal-regulatory transcription factor 1 is regulated by diverse stress signals. *J Biol Chem* 276, 25487–25495
- Schlake T, Boehm T (2001): Expression domains in the skin of genes affected by the nude mutation and identified by gene expression profiling. *Mech Dev* 109, 419–422
- Smith HK, Omura S, Vital SA, Becker F, Senchenkova EY, Kaur G, Tsunoda I, Peirce SM, Gavins FNE (2018): Metallothionein I as a direct link between therapeutic hematopoietic stem/progenitor cells and cerebral protection in stroke. *FASEB* 32, 2381–2394
- Sofroniew MV (2005): Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *The Neuroscientist* 11, 400–407
- Sonn K, Pankratova S, Korshunova I, Zharkovsky A, Bock E, Berezin V, Kiryushko D (2010): A metallothionein mimetic peptide protects neurons against kainic acid-induced excitotoxicity. *J Neurosci Res* 88, 1074–1082
- Stokes WS (2002): Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR J* 43 Suppl, S31–38
- Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R (2012): Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481, 278–286
- Tekur S, Ho S-M (2002): Ribozyme-mediated downregulation of human metallothionein II(a) induces apoptosis in human prostate and ovarian cancer cell lines. *Mol Carcinog* 33, 44–55
- Trendelenburg G (2014): Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of the inflammasome and connected pathways. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 34, 1857–1867
- Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, Kannbley U, Schmitt AO, Castell S, et al. (2002): Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 22, 5879–5888
-

- Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M (1991): The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7, 337–347
- Vallee BL (1995): The function of metallothionein. *Neurochem Int* 27, 23–33
- Vašák M, Meloni G (2011): Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* 16, 1067
- Vasconcelos MH, Tam S-C, Hesketh JE, Reid M, Beattie JH (2002): Metal- and tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and protein. *Toxicol Appl Pharmacol* 182, 91–97
- Wakida K, Shimazawa M, Hozumi I, Satoh M, Nagase H, Inuzuka T, Hara H (2007): Neuroprotective effect of erythropoietin, and role of metallothionein-1 and -2, in permanent focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 148, 105–114
- West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin ED, Aschner M (2008): Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology* 29, 489–503
- West AK, Leung JYK, Chung RS (2011): Neuroprotection and regeneration by extracellular metallothionein via lipoprotein-receptor-related proteins. *J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem* 16, 1115–1122
- Yin X, Knecht DA, Lynes MA (2005): Metallothionein mediates leukocyte chemotaxis. *BMC Immunol* 6, 21
- Yiu G, He Z (2006): Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 7, 617–627
- Youn J, Borghesi LA, Olson EA, Lynes MA (1995): Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. II. effects on macrophage functions. *J Toxicol Environ Health* 45, 397–413
- Zeng J, Heuchel R, Schaffner W, Kägi JH (1991): Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS Lett* 279, 310–312
-

Zhang B, Egli D, Georgiev O, Schaffner W (2001): The Drosophila homolog of mammalian zinc finger factor MTF-1 activates transcription in response to heavy metals. *Mol Cell Biol* 21, 4505–4514

Danksagung

Ich möchte meinen Dank an die Klinik für Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Direktion von Prof. Dr. med. M. Bähr richten, dafür dass ich die Möglichkeit erhielt, meine experimentelle Doktorarbeit dort durchführen zu können.

Weiterhin geht insbesondere mein Dank an meinen Betreuer, Doktorvater und Ideengeber dieses Projekts, George Trendelenburg, für die Geduld, Zeit, Mühe, Arbeit, stetige Zuversicht und kollegialen Rat, die er in meine Doktorarbeit und Forschung investierte. Ferner danke ich allen Mitarbeitern und Doktoranten des Labors für die unermüdliche Unterstützung, ausdrücklich: Sabine Herold, Irina Graf und Bozena Zechmeister. Einen ganz besonderen Dank richte ich an meine Kommilitonen und Mitdoktoranten Sarah Grünwald und Konstantina Theodorou.

Außerdem danke ich dem Doktoranten Manuel Khajehalichalehshtari für die gute Zusammenarbeit und der Bereitstellung der operierten Mäuse für die Genexpressionsanalysen mittels quantitativer *Real-Time-PCR*.

Lebenslauf

Ich, Abass Eidizadeh, bin geboren am 31.12.1988 in Göttingen und ebenfalls dort aufgewachsen.

Ich besuchte die Grundschule, die Orientierungsstufe und dann das Gymnasium in Göttingen und erhielt 2008 das Abitur. Während der Oberstufe des Gymnasiums absolvierte ich parallel zur Schule ein zweisemestriges Schülerstudium der Angewandten Informatik (B.Sc.) und ein zweisemestriges Schülerstudium der Biologie (B.Sc.) an der Universität Göttingen.

Vom August 2008 bis zum April 2009 war ich als Zivildienstleistender an der Niedersächsischen Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen tätig.

Im Sommersemester 2009 begann ich mein Humanmedizinstudium an der Universität Göttingen. Im Frühjahr 2011 schloss ich das Erste Staatsexamen erfolgreich ab. Im Herbst 2014 folgte der erfolgreiche Abschluss des Zweiten Staatsexamens. Vom Herbst 2014 bis zum Herbst 2015 absolvierte ich das Praktische Jahr. Das 1. Terial erfolgte in der Augenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen, das 2. Terial in der Abteilung für Innere Medizin am Stadt Krankenhaus Korbach und das 3. Terial in der Chirurgie am Kantonsspital Thurgau Münsterlingen (Schweiz). Im Dezember 2015 schloss ich mit dem Dritten Staatsexamen das Humanmedizinstudium ab und erhielt im Januar 2016 die Approbation als Arzt.

Vom Mai 2016 bis zum Mai 2017 war ich als Assistenzarzt für Innere Medizin im Herz- und Gefäßzentrum am Krankenhaus Neu-Bethlehem in Göttingen tätig.

Seit dem August 2017 bin ich als Assistenzarzt für Laboratoriumsmedizin am Institut für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen beschäftigt.

Parallel zum Studium begann ich meine Promotionsarbeit zum Thema „Beurteilung des therapeutischen Potenzials von intraperitoneal injiziertem Metallothionein-II im ischämischen Schlaganfallmodell an der Maus“ in der Klinik für Neurologie in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Schlaganfallforschung“ bei Prof. Dr. med. George Trendelenburg.

Bisher im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichte Publikationen:

Eidizadeh A, Khajehalichalehshtari M, Freyer D, Trendelenburg G (2015): Assessment of the Therapeutic Potential of Metallothionein-II Application in Focal Cerebral Ischemia In Vitro and In Vivo. PloS One 10, e0144035

Eidizadeh A, Trendelenburg G (2016): Focusing on the protective effects of metallothionein-I/II in cerebral ischemia. Neural Regen Res 11, 721–722