

**Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

Untersuchungen zur endogenen Neurogenese an
Ephrin-B3-defizienten Mäusen nach zerebraler Ischämie

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Eva Bretschneider
aus
Lippstadt

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Bähr

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. B. Reuss

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2012

Ergebnisse und Methoden dieser Dissertation wurden in folgenden internationalen wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht:

Thorsten R. Doeppner, Eva Bretschneider, Maria Doehring, Inmaculada Segura, Aycan Sentürk, Amparo Acker-Palmer, Mohammad R. Hasan, Ayman ElAli, Dirk M. Hermann, and Mathias Bähr (2011). **Enhancement of endogenous neurogenesis in ephrin-B3 deficient mice after transient focal cerebral ischemia.** *Acta Neuropathologica*, *accepted*.

Thorsten R. Doeppner, Maria Doehring, Eva Bretschneider, Anil Zechariah, Britta Kaltwasser, Jan Koch, Dirk M. Hermann, Mathias Bähr, Uwe Michel (2011). **MiR-124 mediates neuroprotection against ischemic stroke via inhibition of deubiquitinating enzymes and subsequent degradation of REST.** *Journal of Neuroscience*, *submitted*.

1	Einleitung	1
1.1	Der Ischämische Schlaganfall.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Therapeutische Strategien	3
1.1.3	Mechanismen der zerebralen Ischämie	5
1.1.3.1	Exzitotoxizität	5
1.1.3.2	Peri-Infarkt-Depolarisationen	6
1.1.3.3	Entzündungsreaktion	6
1.1.3.	Apoptose	7
1.1.3.	Reperfusionsschaden.....	8
1.2	Endogene Neurogenese	8
1.3	Ephrin-Liganden und ihre Rezeptoren	11
1.3.1	Aufbau.....	11
1.3.2	Allgemeine Funktionen.....	12
1.3.3	Funktionen einzelner Subtypen.....	12
1.4	Ephrin-B3.....	13
2	Zielsetzung	15
3	Materialien und Methoden	16
3.1	Chemikalien	16
3.2	Verbrauchsmaterialien	18
3.2.1	Zellkulturbedarf	18
3.2.2	Primärantikörper.....	19
3.2.3	Sekundärantikörper.....	19
3.3	Lösungen für Immunhistochemie	20
3.3.1	NPC-Präparation	20
3.3.2	Medien für Zellkultur.....	21
3.4	Methoden.....	21
3.4.1	Versuchstiere und Haltung	21
3.4.2	Das Mausmodell der zerebralen Ischämie	22
3.4.3	Generierung von Ephrin-B3-Knockout-Mäusen.....	22
3.4.4	Fadenokklusionsmodell der Maus.....	23
3.4.5	Experimentelle Gruppen	25
3.4.6	Analyse der Zellproliferation mittels BrdU	25
3.4.7	Herstellung der Paraffinschnitte	26
3.4.8	Definierung von Regions of Interest	27
3.4.9	Immunhistochemische Analysen.....	27
3.4.9.1	Quantitative Analyse des Infarktvolumens....	29
3.4.9.2	Analyse der post-ischämischen Zellschädigung und der neuronalen Dichte..	29

3.4.9.3	Analyse des postischämischen funktionellen Defizits	30
3.4.10	Verhaltenstests	30
3.4.10.1	Rota-Rod-Test	30
3.4.10.2	Tight-Rope-Test.....	31
3.4.11	Präparation und Kultivierung von SVZ-abgeleiteten NPC	33
3.4.12	Proliferationsassay.....	34
3.4.13	Hypoxie-Hypoglykämie-Test	35
3.4.14	Caspase-3-Assay.....	35
3.5	Statistik	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Die post-ischämische Zell-Proliferation ist in Ephrin-B3 ^{-/-} -Mäusen gesteigert.....	37
4.2	Analyse der Differenzierung der proliferierenden Zellen	39
4.3	Gesteigerte Stimulation der post-ischämischen Neurogenese in Ephrin-B3 ^{-/-} -Mäusen	44
4.4	Quantitative Analyse der post-ischämischen Schädigung	47
4.5	Analyse des post-ischämischen funktionellen Defizits	49
4.6	Analyse der Resistenz von NPC nach <i>in-vitro</i> -Hypoxie-Hypoglykämie.	53
4.7	Subakute Infarkt-Schädigungen in Ephrin-B3 ^{-/-} -Mäusen sind mit der Aktivierung von Caspase-3 assoziiert	56
5	Diskussion	59
6	Zusammenfassung.....	67
7	Abkürzungsverzeichnis	69
8	Literaturverzeichnis	72

1 Einleitung

1.1 Der Ischämische Schlaganfall

1.1.1 Epidemiologie

Der Schlaganfall ist nach wie vor eine der häufigsten Ursachen für Langzeitbehinderung und Tod in den westlichen Industrieländern. Tatsächlich besitzt er nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen und tumorösen Entitäten die drittgrößte Mortalitätsrate (s. Tabelle 1). Im Detail sterben in Deutschland 22,3% der Menschen an einer kardialen Ursache, 5% an einem tumorösen pulmonalen Geschehen und 3,3% an einem Schlaganfall (Statistisches Bundesamt, 2008).

Derzeit kommen 51% aller Schlaganfälle in der Altersgruppe über 75 Jahre vor (Statistisches Bundesamt, 2008). Dieser Anteil wird aufgrund der zuvor beschriebenen Veränderungen in der Bevölkerungsstruktur in den kommenden Jahrzehnten zunehmen (<http://www.bpb.de/files/H8YZFH.pdf>).

Das funktionelle Ergebnis nach einem Schlaganfall ist nach wie vor unbefriedigend. So sterben bereits innerhalb der ersten 28 Tage 19,4% der Betroffenen, 28,5% sterben innerhalb der ersten 3 Monate und 37,3% der Patienten überleben das erste Jahr nach einem Schlaganfall nicht (Kolominsky-Rabas and Heuschmann 2002).

Tabelle 1. Mortalität der 10 häufigsten Todesursachen in Deutschland Stand 2007 nach dem Statistischen Bundesamt (2008)

Erkrankung	Anzahl Gestorbene	Anteil in Prozent
Chronisch ischämische Herzkrankheiten	76.915	9,3%
Akuter Myokardinfarkt	57.788	7,0%
Herzinsuffizienz	49.970	6,0%
Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	41.495	5,0%
Schlaganfall	26.911	3,3%
Sonstige chronisch obstruktive Lungenerkrankungen	21.716	2,6%
Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet	21.079	2,5%
Hypertensive Herzkrankheit	18.553	2,2%
Bösartige Neubildung des Dickdarmes	18.072	2,2%
Bösartige Neubildung der Brustdrüse (Mamma)	17.029	2,1%

Der Schlaganfall ist ein multifaktorielles Geschehen, welches ursächlich ischämischer bzw. hämorrhagischer Genese im weitesten Sinne ist. Der ischämische Schlaganfall stellt in diesem Zusammenhang ca. 80% aller Schlaganfallentitäten, während auf hämorrhagische und andere Formen nur 20% aller Schlaganfälle fallen. (Kolominsky-Rabas and Heuschmann 2002). Der ischämische Schlaganfall ist Folge einer Reduktion des zerebralen Blutflusses im umschriebenen Gewebe, welche typischerweise aufgrund eines lokalen Thrombus bzw. einer Embolie oder in selteneren Fällen aufgrund einer systemischen Minderperfusion auftritt (Cowan and Martin 1992). In Folge dessen kommt es zu einer Minderversorgung des Gehirns mit Sauerstoff, Glukose und anderen Substraten sowie einem konsekutiven Zusammenbruch des zellulären Ionengradienten.

Der ischämische Zelltod vollzieht sich nach klassischer Lehrmeinung (s. Kapitel 1.1.3) in diesem Fall in verschiedenen Zeitstufen. Typischerweise wird in diesem Zusammenhang zwischen einem Infarktkern und der so genannten Penumbra unterschieden. In ersterem kommt es bereits wenige Minuten nach Unterbrechung der Blutzufuhr zu einer irreversiblen Zellschädigung mit (überwiegend) nekrotischem Zelltod, während es im Penumbragebiet zu einer prinzipiell reversiblen Schädigung kommt, sofern eine adäquate Therapie in einem definierten Zeitintervall stattfindet (Gonzalez and Schaefer 2006).

1.1.2 Therapeutische Strategien

Gegenwärtig besteht die einzige kausale Therapie des ischämischen Schlaganfalls in der unverzüglichen Rekanalisation des okkludierten Gefäßes (Fisher et al. 2003) mit Hilfe von *rekombinantem tissue Plasminogen Activator* (rt-PA) (Morgenstern 1997; Hacke et al. 1999). Da diese Therapie jedoch sowohl mit einem engen Zeitfenster wie auch mit klaren Kontraindikationen (siehe auch Tabelle 2) behaftet ist (Hacke et al. 1995; Morgenstern 1997; Hacke et al. 1999; Broderick and Hacke 2002; Fisher 2003; Thomassen et al. 2003), erhalten nur ca. 2-4% des

Patientenkollektivs diese Therapieform (Rogalewski et al. 2006; Aleu et al. 2007).

Tabelle 2. Ein- und Ausschlusskriterien für eine Lysetherapie. Tabelle nach Nabavi and Ringelstein (2005), S. A3114 (Völkel 2009).

Einschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">- Charakteristische Schlaganfallsymptomatik- Relevantes neurologisches Defizit (NIH-SS >4)- Zeit seit Symptombeginn <4,5 h (lokale Lyse <6 h)- Möglichkeit zum kontinuierlichen apparativen Monitoring- Alter 18-80 Jahre

Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">- Status epilepticus nach Symptombeginn- Schwere konsumierende Grundkrankheit- IM-Injektion an nichtkomprimierbarer Stelle <7 Tage- Schweres Schädel-Hirn-Trauma <4 Wochen- Großer operativer Eingriff <4 Wochen- Schwere gastrointestinale Blutung <4 Wochen- Blutdruck trotz Therapie persistierend >185/110 mm Hg- PTT >45 s, INR größer als 1,7 oder Thrombozyten <100 000/μl- Hinweis auf intrazerebrale Blutung oder Subarachnoidalblutung- Ausgedehnte Infarktfrühzeichen(>30-50% ACM-Territorium)- Schwere zerebrale Mikroangiopathie

Neben dieser kausalen Therapie bestehen weitere supportive Maßnahmen in der Kontrolle und Behandlung von Blutdruck, Blutzucker, Elektrolythaushalt und anderen, wie sie am effizientesten auf einer Stroke Unit durchgeführt werden können. Dies führt neben einer Redu-

zierung der Aufenthaltsdauer und der Komplikationsrate vor allem auch zu einer besseren funktionellen Erholung des Patienten (Diez-Tejedor and Fuentes 2001).

1.1.3 Mechanismen der zerebralen Ischämie

1.1.3.1 Exzitotoxizität

Aufgrund des ständigen zellulären Bedarfs an energiereichen Phosphaten ist das Gehirn auf eine ausreichend hohe Blutzufuhr angewiesen. Das Sistieren des zerebralen Blutflusses im ischämischen Gewebe führt zu einem Funktionsverlust der ATP-abhängigen Na^+/K^+ -ATPase und in Folge dessen zu einer Imbalance des zellulären Ionengradienten (Edvinsson and Krause 2002). Ein vermehrter Natriumein- bzw. Kaliumauswärtsstrom geht mit einer Depolarisation der Zelle einher, welche schlussendlich zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Caplan 2000) mit konsekutivem Einstrom von Kalzium in die Zelle sowie der Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt führt (Prass and Dirnagl 1998). Der erhöhte extrazelluläre Glutamatgehalt führt seinerseits wiederum über eine Aktivierung von ligandengesteuerten kalziumpermeablen Kanälen zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und in Folge dessen zu einer Überladung der Zellen.

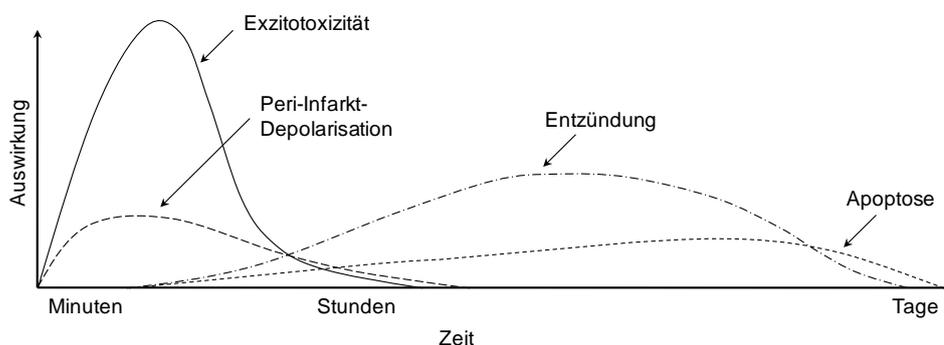


Abb. 1. Reaktionsabläufe nach einer zerebralen Ischämie: Schon nach wenigen Minuten einer zerebralen Ischämie kommt es zu Exzitotoxizität und Peri-Infarkt-Depolarisationen. Im Verlauf entwickelte sich eine Entzündung und die Induktion eines

apoptotischen Zelltodes. Abbildung nach Dirnagl et al.(1999), S. 393.

1.1.3.2 Peri-Infarkt-Depolarisationen

Im Zentrum des Infarktes kommt es zum Zelluntergang und der zuvor beschriebenen Freisetzung von Glutamat und Kalium. Die Folge hieraus ist eine anoxische Depolarisation der Zelle ohne sich anschließende Repolarisation aufgrund des gestörten Zellmetabolismus. Hingegen ist eine Repolarisation in der Penumbra nach wie vor möglich, benötigt dafür jedoch sehr viel Energie. Aufgrund der hohen extrazellulären Kalium- und Glutamatkonzentrationen sowie der persistierenden Energiedefizienz kommt es zu erneuten Depolarisationen, welche „Peri-Infarkt-Depolarisationen“ genannt werden und zu weiterer Schädigung des Gewebes führen (Hossmann 1996). Die Anzahl der Peri-Infarkt-Depolarisationen korreliert dabei mit der Größe des Infarktes (Mies et al. 1993). Allerdings konnte dieses Phänomen noch nicht am Menschen gezeigt werden, sondern wurde nur im Tierversuch beobachtet (Back et al. 2000).

1.1.3.3 Entzündungsreaktion

Neben der oben geschilderten Exzitotoxizität kommt es im weiteren subakuten Verlauf zu einer Triggerung intrazellulärer Reaktionswege, die zu einer post-ischämischen Entzündung führen (Dirnagl et al. 1999).

Auf der zellulären Ebene kommt es durch die Nekrose von Hirngewebe zu einer Aktivierung des Immunsystems, wodurch eine entzündliche Kaskade aktiviert wird. Charakteristisch für diese Reaktion sind eine Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia sowie die Infiltration von peripheren Immunzellen. Über Mikroglia und Immunzellen kommt es zu einer Freisetzung einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren, als da sind Zytokine (z. B. IL-1, IL-6, TNF-alpha) und Chemokine (z.B. CINC, MCP-1) (R. Jin et al. 2010). Im Detail fördert dabei IL-1 wiederum die mit NMDA assoziierte Exzitotoxizität und führt zu einer Stimulation der Nitritoxidase. IL-6 korreliert mit der Infarktgröße und einem schlechteren

klinischen Endergebnis, wo hingegen ein TNF-alpha-Anstieg mit dem Ausmaß der Ischämie korreliert (Huang et al. 2006).

Die Folge des Anstiegs von TNF-alpha und IL-1 ist eine Überexpression von Adhäsionsmolekülen (z. B: ICAM-1, Selektine auf Endothelzellen u. a.) und die Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, worüber es nun zu einer weiteren Infiltration mit Entzündungszellen kommen kann (Nawashiro et al. 1997).

1.1.3.4 Apoptose

Die Apoptose lässt sich in zwei unterschiedliche Wege einteilen, den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Beim intrinsischen Weg wird Cytochrom c von den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt, welches so zu einer Triggerung der Apoptose führt (Sugawara et al. 1999). Die Ischämie löst zudem eine Aktivierung von Nitritoxid-Synthasen (NOS) aus, wodurch es zu einer Steigerung an Nitritoxid (NO) kommt. In der Folge dessen wird die Atmungskette gestört, was zu einem ATP-Mangel führt, wieder gefolgt von einem apoptotischen Zelltod (González et al. 2006). Außerdem kommt es durch Cytochrom c zu einer limitierten Proteolyse von Pro-Caspase-9 und zu einer Aktivierung von Caspase-9 (Love 2003), welche Auslöser der Cytochrom-c-abhängigen Caspase-Kaskade ist und schlussendlich in der Aktivierung von Caspase-3 mündet (Sugawara et al. 2004). Caspase-3 wiederum, auch als Effektor-Caspase bezeichnet, führt über direkte und indirekte Mechanismen u. a. zu einer Degradation essentieller Proteine und zu einer DNA-Fragmentation (Broughton et al. 2009).

Beim extrinsischen Weg kommt es durch Ligandenbindung von TNF zu einer Auslösung der Caspase-Kaskade. Ihre Funktion liegt zum einen in der normalen Zellfunktion (Zytoskelett), zum anderen aktivieren sie jedoch sekundäre Enzyme (z.B. DNase), die mit einer Spaltung der DNA im Zellkern beginnen (<http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash>).

1.1.3.5 Reperfusionsschaden

Obwohl eine zügige Reperfusion des ischämischen Areals grundsätzlich wünschenswert ist, kommt es im Rahmen dieser Reperusionsphase zu einer Ansammlung von Superoxiden, Peroxynitrit und NO, welche u. a. Matrix-Metalloproteasen aktivieren. Das Gehirn wiederum reagiert vor dem Hintergrund des hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren sehr sensitiv, da zudem nur eine limitierte antioxidative Kapazität vorhanden ist (Chong et al. 2004).

1.2 Endogene Neurogenese

Endogene Neurogenese findet nicht nur während der Ontogenese, sondern auch in definierten Arealen des adulten Hirns statt. Diese sind die subventrikuläre Zone (SVZ) der Seitenventrikel (Altman and Bayer 1990) und die subgranuläre Zone des Gyrus Dentatus (Gross 2000; Taupin and Gage 2002; Taupin 2006). In der SVZ führen Astrozyten-ähnliche neurale Stamm- bzw. Vorläuferzellen über schnell proliferierende Zellen zu Neuroblasten, die über den rostralen migratorischen Strom (RMS) zum Bulbus olfactorius migrieren. Dort differenzieren diese immaturen neuronalen Zellen zu muren Neuronen (Doetsch et al. 1997; Doetsch et al. 1999; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002). In der SVZ konnten bis dato vier Zelllinien nachgewiesen werden: E-Zellen (ependymale, ziliotragende Zellen) bilden die laterale Wand der Seitenventrikel und stellen eine Grenzschicht zwischen Ventrikel und SVZ dar. B-Zellen sind Astrozyten-ähnliche Zellen und stellen sich als langsam proliferierende neurale Stammzellen (oder Vorläuferzellen) dar. Aus B-Zellen gehen stark proliferierende C-Zellen hervor, welche ihrerseits so genannte A-Zellen generieren. Diese entsprechen unreifen migrierenden Neuroblasten, welche in den RMS eintreten und dort ausdifferenzieren (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002).

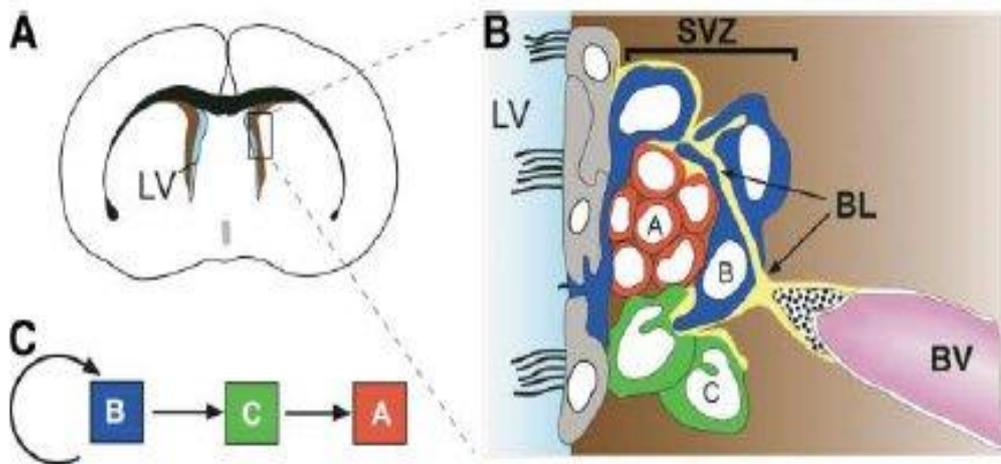


Abb. 2. Aufbau der subventrikulären Zone (SVZ): Die Astrozyten-ähnlichen B-Zellen (dunkelblau) sind die Stammzellen der SVZ. Einige der B-Zellen nehmen Kontakt mit dem Ventrikellumen auf. C-Zellen (grün) sind schnell proliferierende Zellen, die aus den B-Zellen hervorgegangen sind. C-Zellen sind die Vorläufer der A-Zellen (rot), die als Neuroblasten in den Bulbus olfactorius migrieren, wo sie zu Interneuronen differenzieren. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Autor und Verlag entnommen aus Alvarez-Buylla and Lim (2004), S.684.

Im Hippokampus hingegen entwickelt sich die subgranuläre Zone als sekundäre Keimzone zwischen dem Hilus und der granulären Zellschicht (Altman and Bayer 1990). Es folgt eine Migration von neuronalen Vorläuferzellen (NPC) in die Granulärzone, wo es zu deren Differenzierung kommt (Cameron et al. 1993).

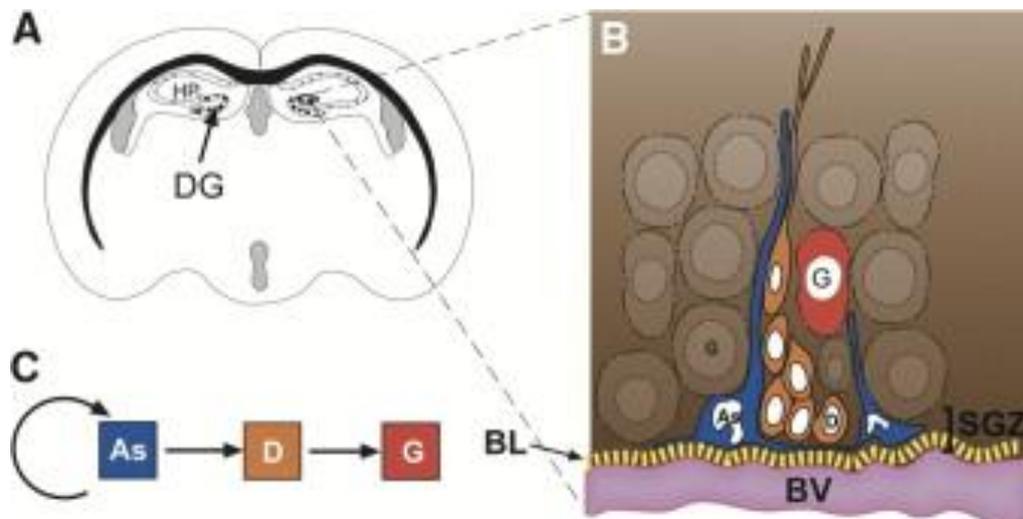


Abb. 3. Neurogenese in der subgranulären Zone: Astrozyten (As, dunkelblau) haben Einfluss auf die Vorläuferzellen (D-Zellen, orange), die zu neuen Körnerzellen (G-Zellen, rot) proliferieren. Diese neu geborenen Körnerzellen integrieren sich in die Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus (DG, braune G-Zellen). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Autor und Verlag entnommen aus Alvarez-Buylla and Lim (2004), S. 684.

Die endogene Neurogenese wird unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Umständen stimuliert. Physiologischerweise ist die Neurogenese unter anderem östrogen-, alters- und auch kortikoidabhängig (Tanapat et al. 1999; Cameron and Gould 1994; Kuhn et al. 1996). Erstmals wurde in den 1990er Jahren gezeigt, dass die Induktion einer zerebralen Ischämie mit einer Stimulation der endogenen Neurogenese einhergeht. Hierbei kommt es zu einer gesteigerten Proliferation, Migration und Differenzierung von NPC (Liu et al. 1998; Arvidsson et al. 2002; Yamashita et al. 2006). Allerdings ist die funktionelle Relevanz der endogenen Neurogenese aufgrund einer reduzierten Überlebensrate und einer geringen neuronalen Differenzierung der neu geborenen Zellen unklar (Dayer et al. 2003; Yoo et al. 2008). In diesem Zusammenhang soll es zu einer Zelltodrate von ca. 80% in Bezug auf post-ischämisch neugebildete Neurone innerhalb von zwei bis sechs Wochen kommen (Arvidsson et al. 2002). Weitere Ana-

lysen der Signalwege für die Zellproliferation und der Differenzierung von NPC sind daher für die Verbesserung der Neurogenese nach einem Schlaganfall essentiell.

1.3 Ephrin-Liganden und ihre Rezeptoren

1.3.1 Aufbau

Ephrin-Rezeptoren sind die größte Subfamilie der Rezeptortyrosinkinasen. In einem Erythropoetin produzierenden menschlichen hepato-zellulären Karzinom wurde erstmals eine Überexpression von Ephrin-Rezeptoren festgestellt und diese als Protoonkogene isoliert. Der „Eph“-Anteil ergibt sich hierbei aus dem englischen Terminus des *Erythropoietin-producing Hepatocellular Carcinoma* (Hirai et al. 1987). Grundsätzlich gilt es zu unterscheiden zwischen Rezeptor (abgekürzt als „Eph“) und dessen Liganden, welcher üblicherweise als „Ephrin“ bezeichnet werden.

Gegenwärtig sind im Säugetierorganismus wenigstens neun EphA (EphA1-8 und EphA10)- und fünf EphB (EphB1-4 und EphB6)-Rezeptoren bekannt. Typ-A-Rezeptoren binden in der Regel die Typ-A-Ephrine (Ephrin-A1-5), die mit der Zellmembran über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) verbunden sind, sind aber nicht gänzlich spezifisch für Ephrin-A-Liganden. Typ-B-Rezeptoren binden üblicherweise Typ-B-Ephrine (Ephrin-B1-3), die eine transmembrane Domäne haben (Martinez and Soriano 2005). Allen Eph-Rezeptoren gemein ist eine hoch konservierte N-terminale extrazelluläre Domäne, an die der jeweilige Ligand binden kann (Labrador et al. 1997). Es schließen sich eine Cystein-reiche Region und zwei Fibronektine des Typs III an, die zu einer Rezeptordimerisierung (Lackmann et al. 1998) und zu Wechselwirkungen von Eph-Rezeptoren mit anderen Proteinen führen (Dalva et al. 2000). Eine Ausnahme von diesen Regeln bildet z. B. EphA4, der sowohl Typ-A- und auch viele Typ-B-Liganden binden kann (Klein 2009).

Die Interaktion zwischen Eph und Ephrin beinhaltet eine wechselseitige Interaktion, so dass Eph sowohl als Rezeptoren im herkömmlichen Sinne wie auch als Liganden fungieren können. Bindet sich ein Ephrin-Ligand an einen Eph-Rezeptor, so wird ein anterogrades Signal nach intrazellulär übertragen. Der Eph-Rezeptor kann jedoch auch eine Induktion an den ursprünglichen Liganden auslösen und so ein reverses Signal induzieren. Membrangebundene Ephrine können demnach bidirektional über ihre Eph-Rezeptoren interagieren (Flanagan and Vanderhaeghen 1998).

1.3.2 Allgemeine Funktionen

Ephrine sind bereits in der pränatalen Entwicklung von entscheidender Bedeutung. Sie übernehmen intrauterin die axonale Führung, Zell-Zell-Adhäsion und sind für die synaptische Plastizität mitverantwortlich (Wilkinson 2001; Palmer and Klein 2003).

Postnatal modulieren sie die Affinität der Zellen zu ihren Nachbarzellen, sezernieren distinkte Substrate und induzieren die Migration von Zellen. Gleichzeitig sind sie an der Ausgestaltung des neuralen Netzwerkes durch Induktion, Differenzierung, Anordnung und Führung zellulärer Fortsätze von maturen neuralen Zellen beteiligt (Palmer and Klein 2003; Altman and Bayer 1990).

1.3.3 Funktionen einzelner Subtypen

Es gibt Hinweise, dass Ephrine an einer post-natalen endogenen Neurogenese mit verschiedenen Rollen, die von ihrem Subtyp abhängen, beteiligt sind. So führt zum Beispiel ein komplettes Fehlen von Ephrin-B1 zur perinatalen Letalität und einer Reihe von phänotypischen Veränderungen wie Mangel an neuralleistenzellenabhängigem Gewebe, unvollständiger Körperwand und abnormer Skelettmusterung (Davy et al. 2004). Heterozygot (X- Chromosomal) führt die Mutation im Ephrin-B1-Gen (EFNB1) zum kranio-fronto-nasalen Syndrom (Wieland et al. 2004).

Betrachtet man die Gemeinsamkeiten der Ephrine, so werden Ephrin-B2, EphB1, EphB2, EphB3 und EphA4 in der SVZ exprimiert (Conover et al. 2000). Ephrin-B2 und EphA2 werden außerdem mit einer Neovaskularisation und Angiogenese von Tumoren in Verbindung gebracht (Gale et al. 2001). Zudem werden viele Ephrin/Eph-Spezies in distinkten Tumorentitäten wie Mamma-, Bronchial-, Kolon- und Prostatakarzinom sowie in Melanomen und Glioblastomen gefunden (Surawska et al. 2004).

Ephrin-B2 ist beispielsweise ein Marker für Arterien auch außerhalb des ZNS und kann als Ligand an mindestens 6 Rezeptoren binden, wohingegen EphB4 im Endothel von Venen gefunden wird (Adams and Alitalo 2007). Darüber hinaus aktiviert EphB2 direkt die Proliferation in der SVZ *in vitro* (Katakowski et al. 2005), während Ephrin-A2 und EphA7 negative Regulatoren der Proliferation von NPC sind (Holmberg et al. 2005).

Außerdem können EphB-Rezeptorsignale den NMDA-Rezeptor abhängigen Ca^{2+} -Einstrom erhöhen und führen zu einer erhöhten CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*)-abhängigen Transkription, ein Prozess, der wichtig für das Lernen, das Gedächtnis sowie für die Plastizität der Synapse ist (Takasu et al. 2002).

1.4 Ephrin-B3

Seit längerem ist bekannt, dass Ephrin-B3 ein negativer Regulator des Zellzyklus und der Apoptose in der SVZ ist. Dabei kontrolliert Ephrin-B3 die Zellproliferation und das Überleben der Zellen in der SVZ. Es konnte gezeigt werden, dass regenerierende Axone Ephrin-B3 exprimieren (Goldshmit et al. 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass Ephrin-B3 von postnatal myelinisierenden Oligodendrozyten exprimiert wird und eine entsprechende inhibitorische Wirkung besitzt (Benson et al. 2005). So zeigen Ephrin-B3-Knockout-Mäuse unter physiologischen Bedingungen eine signifikant erhöhte Zellproliferation entlang der Seitenventrikel so-

wie eine veränderte Expression von Proteinen, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Ricard et al. 2006).

Ephrin-B3 spielt eine Schlüsselrolle bei der axonalen Regulation und Differenzierung und fungiert in diesem Zusammenhang als zerebrale Mittellinienbarriere. In Folge dessen verhindert Ephrin-B3 eine Rückkreuzung kontralateraler kortikospinaler Bahnen beim Eintritt in die Graue Substanz (Kullander et al. 2001, Yokohama et al. 2001). In Abwesenheit von Ephrin-B3 kommt es hingegen zu einer Rückkreuzung in die Graue Substanz. In der Folge führt dies zu einer bilateralen Innervation von alpha-Motoneuronen des Rückenmarks, so dass Ephrin-B3^{-/-} Mäuse in ihrem Phänotyp typischerweise eine simultane Innervation der Hinterläufe aufweisen. Trotz dieser augenscheinlichen Veränderung im Phänotyp dieser Tiere sind Ephrin-B3-Knockout-Tiere in ihrer Lokomotorik im Wesentlichen nicht beeinträchtigt (Kullander et al. 2001).

Unter physiologischen Bedingungen steigert die Blockade von Ephrin-B2 oder Ephrin-B3 die Proliferation und Migration von SVZ-abgeleiteten NPC (Conover et al. 2000; Ricard et al. 2006). Obwohl bereits Untersuchungen existieren, in denen Eph-/Ephrin-vermittelte Effekte auf neurale Proliferation und Differenzierung unter *physiologischen* Bedingungen analysiert wurden, so ist deren Bedeutung für die *post-ischämische* Neurogenese immer noch nicht fassbar.

Bisher hat nur eine Studie einen post-ischämischen Anstieg der Proliferation und neuronalen Differenzierung von SVZ-abgeleiteten NPC nach einer Hemmung von eph-B2 gezeigt (Xing et al. 2008), so dass in der vorliegenden Arbeit erstmals die endogene Neurogenese und die funktionale Wiederherstellung nach zerebraler Ischämie in Ephrin-B3-Knockout-Mäusen (Ephrin-B3^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (Ephrin-B3^{+/+}) untersucht wird.

2 Zielsetzung

Ephrin-/Eph-Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der prä- und postnatalen neuronalen Proliferation und Differenzierung des Gehirns. Vor dem Hintergrund einer kürzlich gezeigten gesteigerten zerebralen Zellproliferation und neuronalen Differenzierung in adulten Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen unter physiologischen Bedingungen werden in der hier vorliegenden Arbeit Untersuchungen nach Induktion einer transienten zerebralen Ischämie an Ephrin-B3^{+/+}- und Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Zunächst werden sowohl die post-ischämische Zellproliferation als auch die neurale Differenzierung im Perinfarktareal in einem Zeitraum von bis zu vier Wochen nach Beginn des Schlaganfalls untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit geht es um die Frage, inwiefern sich die Deletion von Ephrin-B3 auf die post-ischämische Schädigung auswirkt. Anders ausgedrückt wird der Frage nachgegangen, ob potentielle Änderungen in der post-ischämischen Neurogenese von Ephrin-B3^{-/-}-Tieren sich auf das Ausmaß der post-ischämischen Zellschädigung und der funktionellen Erholung auswirken.

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien

Accutase	PAA, Österreich
Basic Fibroblast Growth Factor bFGF	Invitrogen, Karlsruhe
5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, Steinheim
B27 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cacodylsäure-Natriumsalz-Monohydrat	Merck, Hohenbrunn
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
CoCl ₂	Merck, Hohenbrunn
DAPI	AppliChem, Darmstadt
DNase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eselserum (Dks)	Chemicon, Kanada
DMEM/Ham's F12	PAA, Österreich
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epidermal Growth Factor (EGF)	Invitrogen, Karlsruhe
Et-OH-Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol (reinst)	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt)	Chemie-Vertrieb Hannover
Glucose 5%	B Braun, Melsungen
HBSS (Hanks balanced salt solution)	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES 1M	Invitrogen, Karlsruhe
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Steinheim

Immersionsöl Immersol TM 518F	Carl Zeiss, Oberkochen
Isofluran: Forene	Abbott, Ludwigshafen
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kynurensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mannitol	B. Braun, Melsungen
MgCl ₂	Riedel de Häen, Seelze
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NGS	PAA, Kanada
Penicillin/Streptomycin 100x (Pen/ Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Sterofundin	B. Braun, Melsungen
Glucose	B. Braun, Melsungen
Natriumchlorid 0,9 % (flüssig)	B Braun, Melsungen
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sterofundin	B Braun, Melsungen
Teleostean-Gelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ziegenserum (NGS)	PAA, Kanada
Zweikomponentenkleber Cyanolit	Panacol-Elosol GmbH, Oberursel
Xylol, 98% vergällt	Roth, Karlsruhe

3.2 Verbrauchsmaterialien

Falcon-Reaktionsgefäße (15 ml / 50 ml)	Becton Dickinson, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipette	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Glaspasteurpipetten (150 mm)	WU, Mainz
Objektträger	Menzel-Glas, Braunschweig
Deckgläser	Menzel-Glas, Braunschweig
Reaktionsgefäße (0,5/ 1,5 / 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
silikonbeschichtete Nylonfäden	Docol, USA
Fäden Ethilon 60	Johnson, Belgien
Fäden Polypropylen 4.0	Johnson, Belgien
Spritzen 1ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen: Sterican	B. Braun, Melsungen
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Antifadingmedium: Immu-Mount	Thermo. Electron Corporation, USA

3.2.1 Zellkulturbedarf

12- und 24-Well Platten	NUNC, Wiesbaden
Filter, 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen, 35 x 10 mm	BD Falcon, Heidelberg
Pipetten 1, 5, 10, 25 ml	NUNC, Wiesbaden
Sterilfilter Filtropur S, 0,20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen, 35 x 10 mm	BD Falcon, Heidelberg
Zellsieb, 70µm Nylon	BD Falcon, Heidelberg

3.2.2 Primärantikörper

Monoklonaler Antikörper Maus anti- NeuN	Millipore, USA
Monoklonaler Antikörper Kaninchen anti- GFAP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Monoklonaler Antikörper Ziege anti- Dcx	Santa Cruz Bio- technology, USA
Monoklonaler Antikörper Maus anti- CNPase	Millipore, USA
Monoklonaler Antikörper Maus anti- Nestin	Millipore, USA
Monoklonaler Antikörper Ratte anti- BrdU	Abcam, UK
Monoklonaler Antikörper Maus-anti- BrdU	Roche Diagnostics, Mannheim
Monoklonaler Antikörper Kaninchen-anti- Ki67	Abcam, UK

Lectine

Biotinylated Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia Lectin I, IsolectinB ₄ (IB₄)	Vector Laborato- ries USA
--	------------------------------

3.2.3 Sekundärantikörper

Alexa 488-konjugiertes anti-Ziege IgG Esel	Invitrogen, Karlsruhe
Cy3-konjugiertes anti-Maus IgG Esel	Dianova, Ham- burg
Alexa 488-konjugiertes anti-Kaninchen IgG Ziege	Invitrogen Karlsruhe
Alexa 594.konjugiertes anti-Ratte IgG Ziege	Invitrogen Karlsruhe
Alexa 594-konjugiertes Streptavidin Ziege	Invitrogen Karlsruhe
Alexa 488-konjugiertes anti Ratte IgG Ziege	Invitrogen Karlsruhe

Alexa 488-konjugiertes anti Maus IgG Ziege	Invitrogen Karlsruhe
Alexa 568-konjugiertes anti-Kaninchen IgG Esel	Invitrogen Karlsruhe

3.3 Lösungen für Immunhistochemie

Citratpuffer (pH 6,0):	0,2% Citronensäure-Monohydrat in Aqua bidest.
Donkey Serum (Dks)-Blockpuffer	10% Dks in 0,3% TBS-T
Normal Goat Serum (NGS)-Blockpuffer	10% NGS in 0,3% TBS-T
PBS (pH 7,4)	40g NaCl + 1g KCl + 1g KH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄ auf 5l Aqua bidest.
PFA (4%, pH 7,4)	40g Paraformaldehyd mit 1l PBS und Schluck 5M NaOH, mit HCl pH-Wert einstellen
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim

3.3.1 NPC-Präparation

Dissoziationsmedium	13,3 mg Trypsin 7 mg Hyaluronidase 2 mg Kynurensäure 200 ml DNase (10.000 U/ml) in 10 ml Lösung „A“
Lösung „A“ (pH 7,5)	10 % (v/v) HBSS (10x) 0,9 % (v/v) D-Glucose (Stocklsg. 300 mg/ml) 0,75 % 1M HEPES
Lösung „B“ (pH 7,5)	5 % (v/v) HBSS (10x)

	1 M Saccharose
Lösung „C“ (pH 7,5)	4 % (w/v) BSA
	50 mM HEPES

3.3.2 Medien für Zellkultur

Neurosphärenmedium	47 ml DMEM/F12
	1 ml B27
	0,5 ml Pen/Strep (100x)
	0,4 ml HEPES 1M
	0,5 ml EGF (2 mg/ml)
	0,5 ml bFGF (2mg/ml)
OGD-Medium	Sterofundin® mit 1 mM Mannitol

3.4 Methoden

Die Arbeit wurde von 2008 bis 2010 in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Schlaganfallforschung“ der Neurologischen Universitätsklinik Göttingen unter der Anleitung von Herrn Professor Bähr und Doktor Döppner durchgeführt.

3.4.1 Versuchstiere und Haltung

Sämtliche Tierexperimente hielten sich an die Vorschriften des Rates der Europäischen Gemeinschaften (86/609/EEC) und an die Richtlinien der tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen. An Ephrin-B3^{-/-}- sowie Ephrin-B3^{+/+}-Mäusen wurde eine transiente fokale zerebrale Ischämie induziert. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse mit einem Gewicht von 25-28 g verwendet. Den Mäusen wurde

nach Umsiedlung in den Tierstall eine Eingewöhnungszeit von über einer Woche zugestanden. Eine fest installierte Wasserversorgung war gegeben, so dass sich die Tiere mit Wasser und Nahrung selbstständig versorgen konnten. Das Tierlabor unterlag einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h mit einer definierten Raumtemperatur zwischen 17 und 21°C. Die artgerechte Haltung der Mäuse und der Umgang mit ihnen wurden tierärztlich kontrolliert.

3.4.2 Das Mausmodell der zerebralen Ischämie

Die Maus ist ein etablierter wichtiger Modellorganismus für die Schlaganfallforschung (Mergenthaler et al. 2004), da sie ihrerseits viele Vorteile für die Forschung verkörpert. Die Säuger sind klein, pflanzen sich schnell fort, haben direkt mehrere Nachkommen, und es bestehen bereits lange Erfahrungen mit ihnen in der Forschung.

In der Ischämieforschung setzte sich als Standard das Fadenokklusionsmodell durch (Hara et al. 1996), welches auch in dieser Arbeit verwendet worden ist (s. 3.3.4). Für dieses Modell sprechen eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, eine geringe Präparationszeit und eine gezielt wählbare Ischämiezeit. Dem entgegen stehen Störfaktoren wie die Anästhesie, die relativ große Halspräparation und das Einbringen eines Fremdkörpers in das Gefäßsystem.

3.4.3 Generierung von Ephrin-B3-Knockout-Mäusen

Die Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse, die in den Versuchen genutzt wurden, wurden durch Nicolas W. Gale (Regeneron Pharmaceuticals Inc., New York, USA) bzw. durch Frau Dr. Aycan Sentürk (Institut für Molekulare Lebenswissenschaften und Institut für Zellbiologie, Johann Wolfgang von Goethe Universität, Frankfurt a. M.) bereitgestellt und deren Generierung an anderer Stelle bereits beschrieben (Kullander et al. 2001). Zusammengefasst wurde eine homologe Rekombination von embryonalen Stammzellen genutzt, um ein Nullallel für das endogene Ephrin-B3-Gen

der Maus hervorzubringen und die codierende Region des ersten Exons des Genes durch LacZ- und Neomycin-Gene zu ersetzen. Das korrekte „Targeting“ in den embryonalen Stammzellen wurde durch Southern Blots kontrolliert und anschließend die Stammzellen zur Generierung von homozygoten Nullallel-Mäusen (Ephrin-B3^{-/-}) genutzt. Northern Blots des Hirngewebes dieser Mäuse zeigten, dass Ephrin-B3 bei diesen Knockout-Mäusen nicht nachweisbar war.

3.4.4 Fadenokklusionsmodell der Maus

Zur Induktion einer transienten fokalen zerebralen Ischämie wurde eine Fadenokklusion der Arteria cerebri media (MCA) durchgeführt, welches ein etabliertes und gut kontrollierbares Modell des ischämischen Schlaganfalls darstellt. Initial wurde die Maus mit Isofluran (Baxter, Deutschland) in einem geschlossenen Gefäß betäubt, um eine Fixation in Rückenlage auf einer Heizplatte (Harvard Apparates Homeothermic Blanket Control, USA) für die Inhalationsnarkose vorzunehmen. Bei guter Spontanatmung konnte die weitere Inhalationsnarkose mit Isofluran (1-1,5%), Distickstoffmonoxid (68,5-69%) und Sauerstoff (30%) aus einem Verdampfer (Drägerwerke, Deutschland) unter oxymetrischer Kontrolle (Drägerwerke, Deutschland) durchgeführt werden. Der Blutfluss wurde mittels einer Laser-Doppler-Sonde (Perimed Periflux System 5000, Schweden) kontrolliert. Hierzu wurde ein Schnitt an der Kopfhaut links paramedian ausgeübt und eine Inzision in den linken M. temporalis gesetzt. Hiernach wurde die Laser-Sonde mittels eines Zweikomponentenklebers (Cyanolit, Panacol-Elosol GmbH, Deutschland) über dem linken MCA-Territorium fixiert.

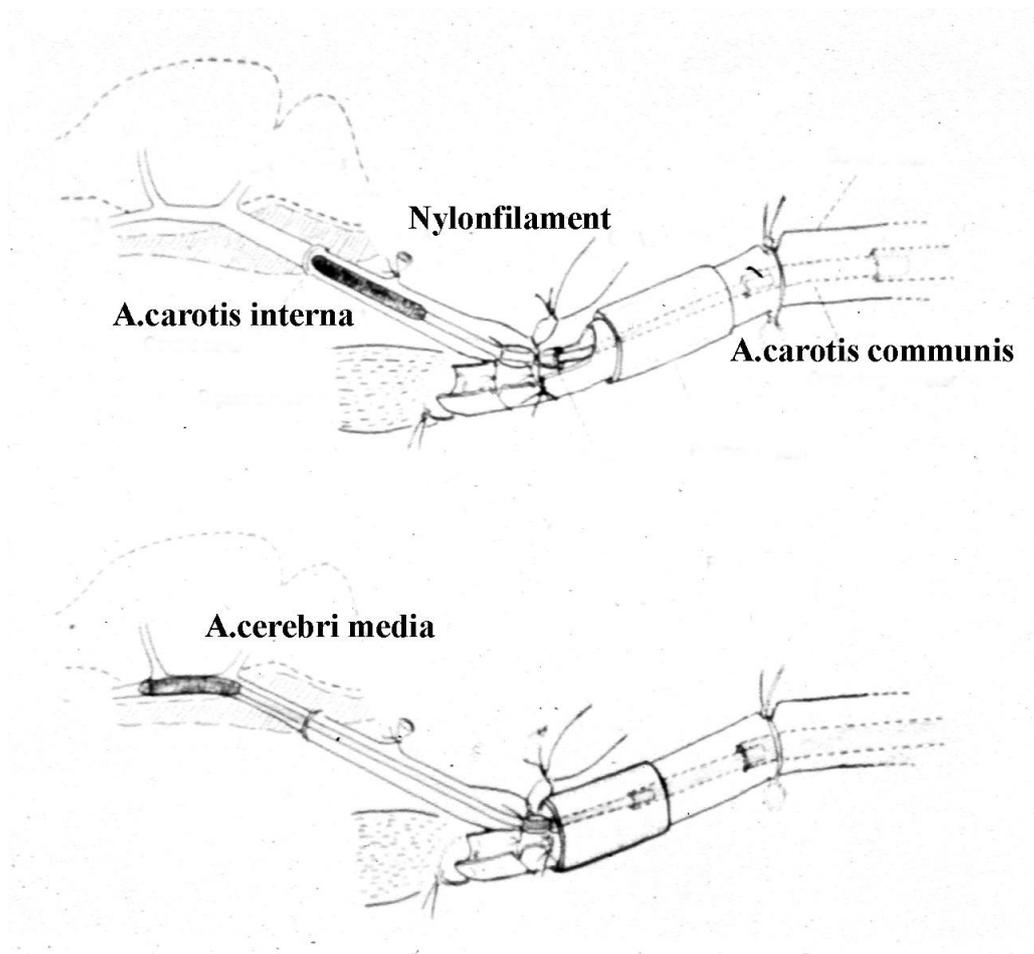


Abb. 4. Fadenokklusionsmodell der transienten zerebralen Ischämie der Maus: Dargestellt ist die A. carotis communis, welche proximal ligiert wird. Nach Ligatur der gleichseitigen A. carotis externa und Platzierung eines mikrochirurgischen Clips auf die A. carotis interna erfolgt die Insertion des Fadens. Einzelheiten siehe Text. Die Abbildung wurde von Herrn Dr. Döppner freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Sodann wurde die Maus auf dem Rücken platziert und eine mediane Halsinzision durchgeführt. Es wurde eine Präparation der linken A. carotis communis (CCA) durchgeführt. Nach proximaler Ligatur der CCA erfolgte die anschließende Präparierung und Ligatur der A. carotis interna (ACI) und A. carotis externa (ACE). Die ACE wurde wiederum ligiert. Anschließend wurde die A. pterygopalatina in der Tiefe aufgesucht und ebenfalls ligiert. Auf die ACI an ihrem proximalen Abgang wurde nun ein neurochirurgischer Clip (Aesculap, Deutschland) gesetzt,

um das Gefäß temporär zu verschließen. Die CCA wurde nun über einen kleinen Schnitt eröffnet und ein silikonbeschichteter Nylonfaden (Doccol, USA; Diameter 180 μm an der Fadenspitze) eingeführt. Anschließend konnte der neurochirurgische Clip entfernt werden und somit der Faden über die ACI, in die MCA vorgeschoben werden (Abb. 4). Ein Abfall des Dopplerflusses auf ein Drittel des Initialflusses zeigte eine Ischämie an, welche über 30 bzw. bei einigen Ephrin-B3^{-/-}-Tieren über 20 min aufrecht gehalten wurde. Nach Retraktion des Fadens wurde über mindestens 15 min der Doppler-Fluss zur Kontrolle einer suffizienten Reperfusion beobachtet.

3.4.5 Experimentelle Gruppen

Die Experimente fanden an zwei unterschiedlichen Mauslinien (EphrinB3^{-/-}, EphrinB3^{+/+}) mit jeweils drei Überlebenszeitpunkten statt. Diese sind wie folgt:

EphrinB3^{-/-}: 4d, 14d und 28d

EphrinB3^{+/+}: 4d, 14d und 28d

Jede experimentelle Gruppe bestand aus 7-8 Tieren.

3.4.6 Analyse der Zellproliferation mittels BrdU

Zur Analyse der Proliferation in den Wildtyp-Mäusen und den Knockout-Mäusen wurde Bromdesoxyuridin (BrdU) (Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet. BrdU ist ein Thymidin-Analogon und wird bei der Zellreplikation während der S-Phase eingebaut. (Taupin 2007). Den Tieren wurde dazu in definierten Intervallen jeweils eine Tagesdosis von 50 mg BrdU pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert (Abb. 5).

4-Tage-Gruppe:BrdU-Injektion: 

Tage: | 1 | 2 | 3 | 4 |

14-Tage-Gruppe:BrdU-Injektion: 

Tage: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |

28-Tage-Gruppe:BrdU-Injektion: 

Tage: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |

BrdU-Injektion: 

Tage: | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 |

Abb. 5. BrdU-Gabe in den einzelnen Versuchsgruppen: Den Versuchstieren wurde eine tägliche Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht.

3.4.7 Herstellung der Paraffinschnitte

Die immunhistochemischen Analysen wurden allesamt an Paraffinschnitten durchgeführt. Am Versuchsende wurde den Mäusen intraperitoneal 30%iges Chloralhydrat (420 mg/kg Körpergewicht; Sigma-Aldrich, Deutschland) gegeben, wodurch eine tiefe Anästhesie ausgelöst wurde. Nach Freipräparation des Herzens erfolgte die Perfusion transkardial mit 50 ml PBS, sowie 50 ml 4%-igem Paraformaldehyd (PFA). Die Tiere wurden hiernach dekapitiert und das Gehirn präpariert und entnommen. Über Nacht erfolgte die Fixation der Gehirne in 4%-igem PFA bei 4°C und die anschließende Paraffineinbettung. Mittels eines Mikrotoms (Leica, Deutschland) wurden die Gehirne auf jeweils 2 µm Dicke geschnitten und auf Adhäsionsobjektträger (Menzel-Glas, Deutschland) über die Methode der zwei Wasserbecken (Zimmertem-

peratur und 50°C) aufgetragen. Nach Aufbringen der Schnitte auf den Objektträger wurden die Schnitte bei 60°C zwei Stunden im Inkubator (Kendro Laboratory Products, Deutschland) getrocknet.

3.4.8 Definierung von Regions of Interest

Die quantitativen Analysen wurden an fest definierten Regionen, engl. Regions of Interest (ROI) innerhalb der SVZ und den Basalganglien (BG) durchgeführt. Die stereotaktischen Koordinaten für die quantitativen Analysen in der SVZ waren 0,14 mm anterior, 2-3 mm ventral und 1-1,25 mm lateral von Bregma. Die quantitative Analyse innerhalb der BG wurde 0,14 mm anterior, 2,5-3,25 mm ventral und 1,5-2,25 mm lateral von Bregma durchgeführt. Pro Tier wurden jeweils drei ROIs analysiert. Bei der TUNEL-Färbung wurden die ischämischen BG ausgewertet. Die Anzahl proliferierender Zellen (BrdU- und Ki-67-Färbung) wurde in den BG und der SVZ untersucht. Die Analyse von Zelldifferenzierungen wurde anhand verschiedener Marker durchgeführt und wird als relativer Anteil an der Gesamtpopulation BrdU⁺ proliferierender Zellen angegeben. Zur Beurteilung der post-ischämischen Differenzierung von neu entstandenen endogenen Vorläuferzellen wurden verschiedene Differenzierungsmarker eingesetzt, wie sie im nächsten Abschnitt beschrieben sind.

3.4.9 Immunhistochemische Analysen

Für die Differenzierungsanalyse der proliferierenden Zellen wurden Färbungen gegen GFAP für Astrozyten, CNPase für Oligodendrozyten, Doublecortin (Dcx) für immature neuronale Zellen, NeuN für differenzierte neuronale Zellen, Isolectin B₄ (IB₄) für mikrogliale Zellen und Nestin für neurale Vorläuferzellen durchgeführt. Außerdem wurden BrdU und Ki-67 als Proliferationsmarker verwendet. Die Proliferationsmarker unterscheiden sich in dem Punkt, dass Ki-67 lediglich aktuell proliferierende Zellen nachweist (Kee et al. 2002), während BrdU eine

Proliferation zu einem beliebigen Zeitpunkt anzeigt (Scholzen and Gerdes 2000). Des Weiteren wurde bei jeder Untersuchung eine DAPI-Färbung durchgeführt (AppliChem, Deutschland). Nach vorausgegangenem Serumblock wurden die oben beschriebenen Primärantikörper (GFAP, CNPase, Dcx, NeuN, IB₄, Nestin, Ki-67, BrdU) aufgetragen und über 24 h in einer 4°C messenden Feuchtkammer inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Die manuelle Auswertung der BrdU⁺-Zellen, sowie der Differenzierungsstufen, erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Deutschland).

3.4.9.1 Quantitative Analyse des Infarktolumens

Das Infarktolumen wurde an Tag 4, 14 und 28 nach der Induktion des Schlaganfalls mittels einer TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid)-Färbung analysiert. TTC (Sigma Aldrich, Deutschland) wirkt als Protonenakzeptor für mitochondriale Enzymsysteme. Durch eine enzymatische Reduktion erfolgt die Umwandlung von hydrophilem TTC zu rotem, lipophilem Formazan. Durch eine Störung des mitochondrialen Stoffwechsels (z. B. nach einer Ischämie) unterbleibt die Rotfärbung im Gewebe. Gesundes Gewebe stellt sich deshalb in der TTC-Färbung rot dar, was für eine Enzymaktivität im vitalen Gewebe spricht. Stoffwechsellinaktives Gewebe, d. h. in den vorliegenden Untersuchungen ischämisches Gewebe, stellt sich dagegen weiß dar (Bederson et al. 1986; Baskaya et al. 2000).

Zur Durchführung dieser Färbung wurden die Hirne entnommen und in vier Schnitte von jeweils zwei Millimeter geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte mit 2,3,5-TTC (2%), gefärbt, eingescannt und anhand der Software Image J (über das Internet frei erhältlich) am Computer analysiert. Das Infarktolumen wurde hierbei mittels Subtraktion und Integration des nicht-ischämischen Areals der ipsilateralen Hemisphäre vom Gesamtvolumen der kontralateralen Seite bestimmt.

3.4.9.2 Analyse der post-ischämischen Zellschädigung und der neuronalen Dichte

DNA-Strangbrüche als indirekter Marker für einen stattgefundenen apoptotischen Prozess wurden anhand der *terminal deoxynucleotidyl transferase*-mediated *dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL)-Methode determiniert (Gavrieli et al. 1992).

Nach vorausgegangenem Serumblock wurden sowohl Negativkontrollen wie auch Probenmaterial für 30 min in TdT-Puffer inkubiert. Die Positivkontrolle wurde mit DNase für 10 min inkubiert, anschließend mit destilliertem H₂O und PBS gewaschen sowie dann inklusive der anderen Materialien für 90 min bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde anhand einer 30-minütigen Inkubation mit einem SSC-Puffer

bei 37°C inhibiert. Nach Waschen mit PBS wurde für 30 min ein Serumblock auf die Objektträger gegeben. Anschließend erfolgte eine 2-stündige Inkubation mittels des Antikörpers Streptavidin Alexa Fluor 594.

3.4.9.3 Analyse des postischämischen funktionellen Defizits

Um das Ausmaß des post-ischämischen Lokomotordefizits beurteilen zu können, wurden die Versuchstiere an definierten Tagen unterschiedlichen Verhaltenstests unterzogen. So wurden sämtliche Tiere an den Tagen 7, 14, 21 und 28 nach Induktion der Ischämie im so genannten Rota-Rod-Test und Tight-Rope-Test untersucht. Um sicher zu stellen, dass alle Tiere in der Lage waren, die Tests erfolgreich zu absolvieren, wurden sie bereits einen Tag vor der Ischämie mit den Experimenten vertraut gemacht und entsprechend trainiert. Jeder Test erfolgte in Doppelbestimmung und es wurde jeweils der Mittelwert aus dieser berechnet.

3.4.10 Verhaltenstests

3.4.10.1 Rota-Rod-Test

Der Rota-Rod-Test erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Gerlai (Gerlai et al. 2000), wobei die Tiere an bestimmten Tagen nach einem festen Schema getestet wurden (Abb. 6).

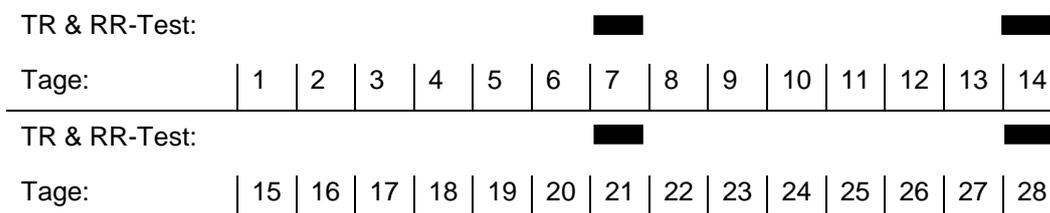


Abb. 6. Durchführung der Verhaltenstests: *Tight-Rope- (TR) und Rota-Rod-Test (RR) wurden jeweils an Tag 7, 14, 21 und 28 nach zerebraler Ischämie durchgeführt.*

Hierzu wurden die Mäuse auf eine 3 cm breite, rotierende Rolle (TSE Systems, Deutschland) platziert. Die Geschwindigkeit dieser wurde sukzessive von initial 4 Drehungen pro Minute (rpm) auf maximal 40

rpm gesteigert. Das Maximaltempo wurde nach 260 Sekunden erreicht, der Test endete entweder nach 300 s oder mit dem Herunterfallen der Maus.



Abb. 7. Rota-Rod-Test: Die Tiere begannen mit einer Geschwindigkeit von 4 rpm, wobei diese auf bis zu 40 rpm akzeleriert wurde und die Zeit bis zum Herunterfallen der Maus gemessen wurde. Die maximale Testzeit betrug 300 s.

3.4.10.2 Tight-Rope-Test

Die weitere Analyse des post-ischämischen Motorkoordinationsdefizits erfolgte anhand eines modifizierten Tight-Rope-Tests nach Gerlai (Gerlai et al. 2000). Hierzu wurden die Tiere mit den Vorderpfoten auf die Mitte eines 60 cm langen Seiles platziert. Ein gesundes Tier ergriff das Seil mit allen vier Pfoten und dem Schwanz und hangelte sich am Seil entlang, bis eine der beiden Plattformen erreicht wurde.

Die Tiere wurden zu den oben beschriebenen Zeitpunkten auf das Seil platziert und die Testleistung anhand zweier Parameter, d.h. „Zeit bis zum Erreichen der Plattform“ bzw. „Plattform erreicht“ beurteilt. Die maximale Testzeit betrug 60 s. Die Analyse der Testergebnisse erfolgte anhand eines verifizierten Scores (Tabelle 2) (Gerber et al, 2001).



Abb. 6. Tight-Rope Test nach Gerlai: die Maus wurde in die Mitte des Seiles platziert und musste innerhalb von 60 Sekunden eine der beiden Plattformen erreichen.

Tabelle 2: Tight-Rope Auswertung: Die Ergebnisse des Tight-Rope-Testes spiegeln zum einen die Zeit auf dem Seil (in Sekunden), sowie das mögliche Erreichen der Plattform (“+” für Ziel erreicht und “-“ für nicht erreicht), wider. Die maximale Punktzahl liegt dabei bei 20.

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

3.4.11 Präparation und Kultivierung von SVZ-abgeleiteten NPC

Die Präparation und anschließende Kultivierung der NPC wurde nach einem modifizierten Protokoll von Rietze und Reynolds (Rietze and Reynolds 2006) von Herrn Dr. Döppner bzw. von der Arbeitsgruppe

Amparo Acker-Palmer (Universität Frankfurt) durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zusammenfassend wurden NPC aus der SVZ von 6-8 Wochen alten Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen und Ephrin-B3^{+/-}-Mäusen isoliert. Die SVZ wurde unter stereomikroskopischer Kontrolle (Zeiss, Deutschland) mikroseziiert, in kleine Stücke zerlegt und verrieben. Es erfolgte die Dissoziation in einzelne Zellsuspensionen. Sodann wurden die Zellen in serumfreiem Basismedium DMEM-F12 (PAA, Österreich) kultiviert, welches mit epidermal growth factor (EGF, 2 pg/ml), basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, 2 µg/ml) und Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, Deutschland) ergänzt wurde. Die Zellen wurden mit 5% CO₂ bei 37°C inkubiert und die Wachstumsfaktoren alle 2-3 Tage hinzugefügt. Die Zellen wurden durch Accutase passagiert, anschließend erfolgte wieder die Suspension in vorgewärmten konditionierten Medien. Es kam zur Proliferation und Aggregation der aus der SVZ isolierten NPC, und es entstanden rundliche dreidimensionale Zellaggregate, so genannte Neurosphären (Bez et al. 2003). Nach 7-10 Tagen konnten die Neurosphären passagiert werden. Die NPC wurden nach 2-3 Passagen für die angegebenen Experimente verwendet.

3.4.12 Proliferationsassay

Die Versuche für den Proliferationsassay wurden von der Arbeitsgruppe Amparo Acker-Palmer (Universität Frankfurt; Mitarbeiterin Frau Dr. Inmaculada Segura) durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Hierzu wurden 10.000 NPC in 6-Well-Platten ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Die Neurosphären wurden auf 24-Well-Platten mit Deckgläschen pipettiert und mit 1 mg/ml Poly-D-Lysin (Sigma, Deutschland) und 5 µg/ml Laminin (Invitrogen, Deutschland) für die Immunfärbung bedeckt. Die Neurosphären wurden in 4% PFA für 1 h bei 4°C gelagert. Anschließend erfolgte eine Waschung mit PBS, eine Blockung über eine Stunde und die Inkubation über Nacht mit Kaninchen-Anti-Phospho-Histon-H3-Antikörper (1:50, Cell Signaling, USA). Die Neuro-

sphären wurden gewaschen und mit dem Anti-Kaninchen-Cy3-konjugierten sekundären Antikörper (1:200, Jackson ImmunoResearch, USA) gefärbt. Zum Nachweis der Zellkerne wurden die Schnitte mit DAPI angefärbt (1:20.000; Roth, Deutschland). Die Bilder wurden mit Hilfe des konfokalen Mikroskops (Leica TCS SP2) mit einem 20fach-Objektiv dargestellt und quantitative Messungen mittels MetaMorph Software (Molecular Devices, USA) durchgeführt.

3.4.13 Hypoxie-Hypoglykämie-Test

Der folgende Hypoxie-Hypoglykämie-Test wurde von Herrn Dr. Döppner durchgeführt. NPC (100.000 Zellen) aus Ephrin-B3^{+/+}- und Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen wurden jeweils in jeder Bedingung verwendet. Vor Induktion der Hypoxie wurde das Zellkulturmedium durch eine kristalloide Lösung ersetzt ("Thomajodin" plus 1 mM Mannitol; DeltaPharm, Deutschland). Dann wurden die Zellen in einer Hypoxiekammer (1% O₂, 5% CO₂ und 94% N₂) für 45 min inkubiert und wieder in Standardzellkulturmedium für 24 h unter normalen Zellkulturbedingungen, d. h. bei 37°C mit CO₂ von 5% in wasserdampfgesättigter Luft, reinkubiert

Die Anzahl der nicht vitalen Zellen wurde mit Hilfe eines so genannten Live/Dead-Zytotoxizitäts-Assays (Lonza, Schweiz) analysiert. SVZ-abgeleitete NPC aus beiden Tiergruppen, die für 24 h unter Standardbedingungen der Zellkultur inkubiert wurden, dienten als Negativkontrollen.

3.4.14 Caspase-3-Assay

Zur Bestimmung der Caspase-3 Aktivität, wurde die Enzymaktivität anhand des Fluorophor-Substrates Ac-DEVD-AMC (Biomol, Deutschland) in Hirnlysaten der ischämischen Hemisphäre (n=4 pro Bedingung) bei 1, 2, 3 und 4 h nach zerebraler Ischämie von Herrn Dr. Döppner durchgeführt, und die Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Während Kontrolltiere eine intravenöse Injektionen von 100 µl 0,2% DMSO

erhielten, wurde den Testtieren 100 µl des Caspase-3 Inhibitors z-DEVD.fmk (Biomol, Deutschland; 500 ng, in 0,2% DMSO gelöst) zu Beginn der Reperfusion injiziert. Die Aufarbeitung der linken ischämischen Hemisphäre wurde mit einem Lysepuffer aus 25 mmol/l HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM 1,4-Dithiothreitol (Roche, Deutschland), 0,1% 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS, Sigma-Aldrich, Deutschland), 10% Saccharose, 0,1% Triton X-100 mit 10 µg/ml Pepstatin A, Aprotinin und Leupeptin plus 1 mM PMSF (alle Sigma-Aldrich, Deutschland) zur Protease-Inhibition, homogenisiert. Sodann erfolgte eine Zentrifugation und die Entnahme des Überstandes für die Caspase-3-Aktivitäts-Messung. Für jede Messung wurden 90 µl der Proben mit 10 µl Substrat (50 µM Endkonzentration) inkubiert und die Fluoreszenz (355-460 nm) in 2 Minuten-Intervallen innerhalb von 20 Minuten detektiert. Der Anstieg der Fluoreszenz verlief zwischen 4-16 Minuten linear. Die Caspase-3-Aktivität wurde von der Steigung (Fluoreszenz-Einheiten pro Zeit) aus berechnet und ist als Picomol des Substrats pro Milligramm Protein pro Minute basierend auf einer Standard-Kurve für 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC; Biomol, Deutschland) angegeben. Protein-Konzentrationen im Überstand wurden mit Hilfe des Bradford-Assays untersucht. Außerdem erhielten die Tiere zusätzlich eine z-DEVD.fmk- oder DMSO-Applikation über die Schwanzvene am Tag 1-3 nach dem Schlaganfall. Danach wurden die Tiere am Tag 4 getötet und die Infarkt volumina wie oben beschrieben analysiert.

3.5 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zum Vergleich zwischen den beiden Gruppen wurde der 2-seitige Student-t-Test verwendet. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Die post-ischämische Zell-Proliferation ist in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen gesteigert

EphrinB3^{-/-}-Mäuse zeigen unter physiologischen Bedingungen eine erhöhte Proliferation von NPC aus der SVZ der Seitenventrikel (Ricard et al. 2006). Inwiefern diese Beobachtung unter pathologischen Gesichtspunkten nach zerebraler Ischämie eine Rolle spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit an Ephrin-B3^{+/+}- und Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen mittels BrdU- bzw. Ki-67-Färbungen an den Tagen 4, 14 und 28 nach dem Infarkt analysiert. Vier Tage nach dem Schlaganfall waren in beiden Tiergruppen BrdU⁺- und Ki⁺-67-Zellen sowohl in der SVZ wie auch im ischämischen Striatum zu beobachten, wobei jedoch die überwiegende Anzahl dieser Zellen sich im ischämischen Striatum befand (Abb. 7). Wenn gleich auch die Induktion einer zerebralen Ischämie zu einer hohen Anzahl an BrdU⁺- wie auch Ki-67⁺-Zellen führte, so fanden sich im ischämischen Striatum von Ephrin-B3^{-/-} Tieren stets einer signifikant erhöhte Anzahl an proliferierenden Zellen. (Abb. 7). Hingegen ließen sich keine proliferierenden Zellen im nicht-ischämischen kontralateralen Striatum beobachten (nicht dargestelltes Ergebnis).

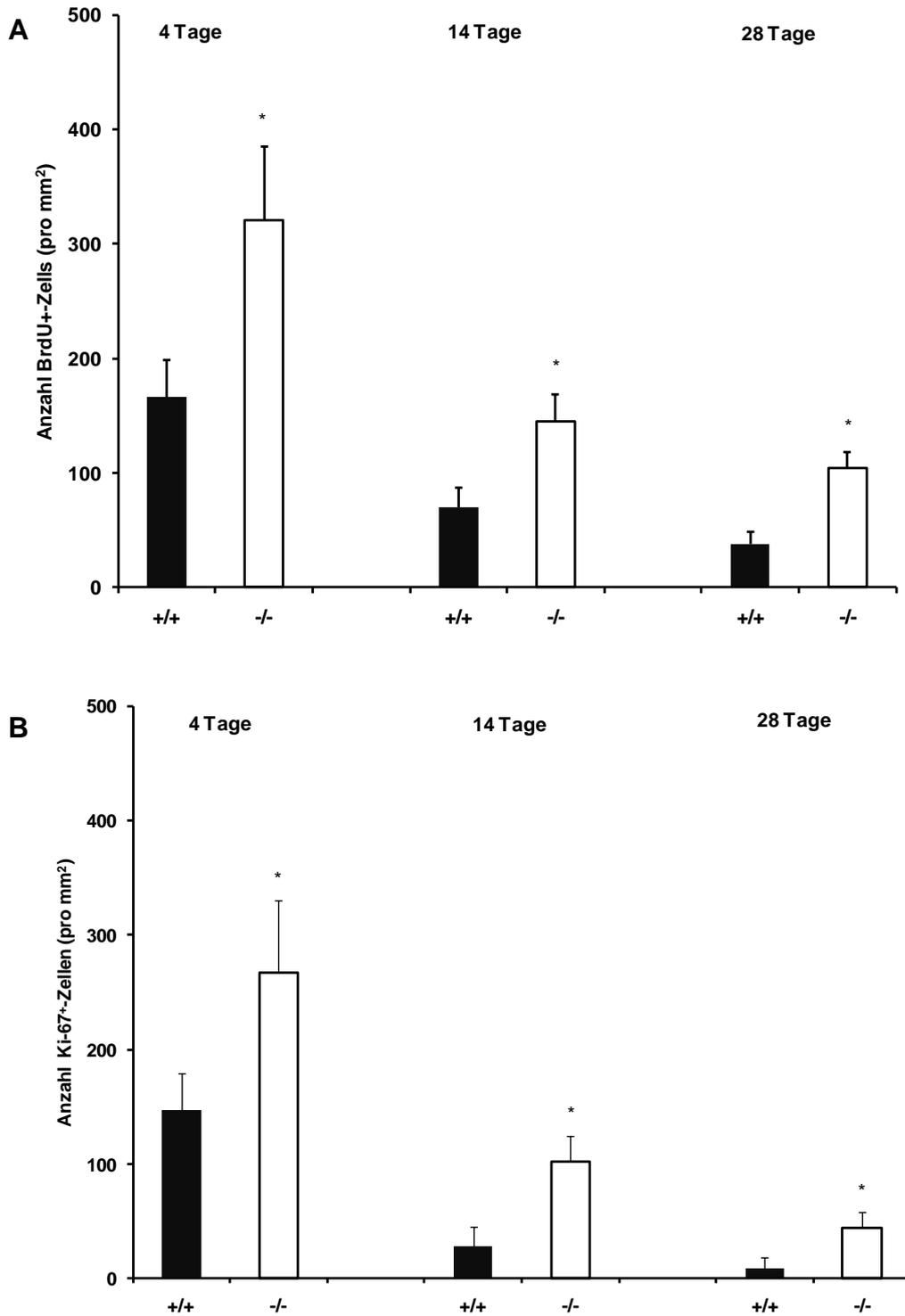


Abb. 7. Gesteigerte Zellproliferation in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen nach zerebraler Ischämie. Die Zellproliferation in Wildtyp- (+/+) und Knockout-Mäusen (-/-) wurde in einem Zeitverlauf von bis zu 4 Wochen nach Induktion des Schlaganfalls anhand von BrdU- (A) und Ki-67-Färbeprotokollen analysiert. Dargestellt

sind Mittelwerte \pm SD aus SVZ und ischämischem Striatum. Ein p -Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. *signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Ephrin-B3^{+/+} Tieren.

Obwohl die Anzahl an BrdU⁺- und Ki-67⁺-Zellen in den definierten Beobachtungsarealen (SVZ und ischämischem Striatum) in beiden Gruppen sukzessive sank, war in Ephrin-B3^{-/-} Tieren stets eine erhöhte Anzahl dieser Zellen zu beobachten (Abb. 8).

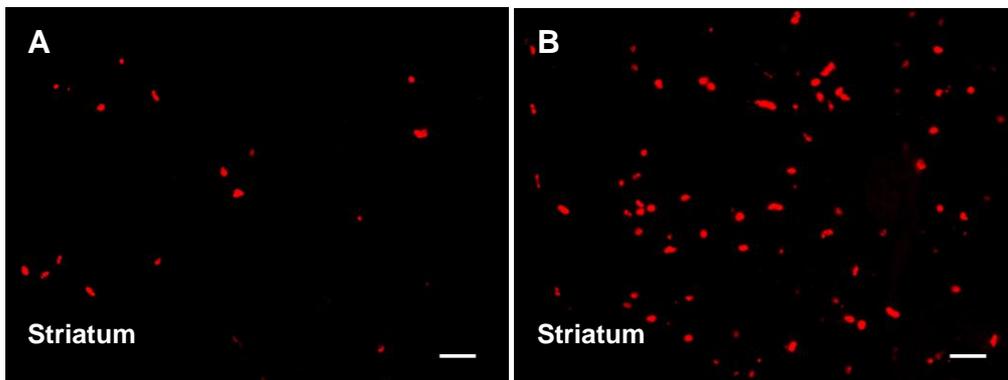


Abb. 8: Distribution BrdU⁺-Zellen in der ischämischen Hemisphäre: BrdU⁺-Zellen fanden sich typischerweise im ischämischen Striatum verteilt sowohl von Ephrin-B3^{+/+}- (A) wie auch von Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen (B). Hingegen ließ sich nur eine Minorität an proliferierenden Zellen in der SVZ dieser Tiere beobachten. Maßstab: 50 μ m.

Darüber hinaus ließ sich zu allen gegebenen Untersuchungszeitpunkten eine signifikant höhere Anzahl an BrdU⁺- und Ki-67⁺-Zellen in der kontralateralen SVZ bei Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Ephrin-B3^{+/+} Tieren nachweisen (Daten nicht dargestellt).

4.2 Analyse der Differenzierung der proliferierenden Zellen

Nachdem eine erhöhte Proliferation beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, welche Zellen dort proliferieren. Die Differenzierung von proliferierenden Zellen erfolgte mittels speziellen Markern für Neurone, Astroglia, Mikroglia und Oligodendroglia. Um zu analysieren, wie viele

der proliferierenden Zellen (BrdU⁺-Zellen, Ki-67⁺-Zellen) einen mikroglialen Phänotyp aufweisen, wurde eine IB₄-Färbung vier Tage nach Induktion des Schlaganfalls durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass über 90% der BrdU⁺-Zellen eine Kolo-kalisation mit IB₄ auswiesen, wobei diese Zellen ausschließlich im ischämischen Striatum beobachtet werden konnten. Hier fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Knockout-Maus und Wildtyp-Maus (Abb. 9).

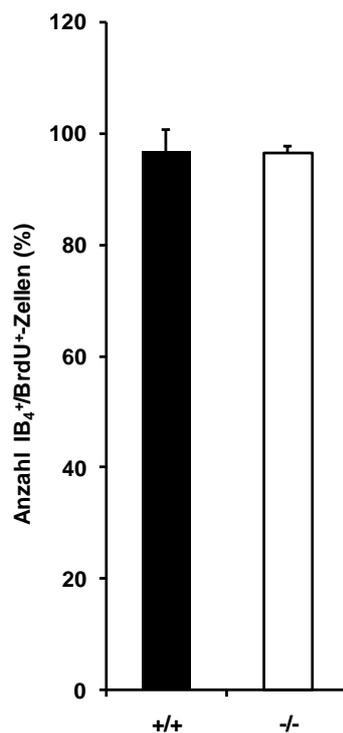


Abb. 9. Mikrogliale Differenzierung proliferierender Zellen. Dargestellt ist der relative Anteil an BrdU⁺ und IB₄⁺ Zellen in Ephrin-B3^{+/-} (+/+) und Ephrin B3^{-/-} (-/-)Tieren. Die Daten repräsentieren MW ± SD und stellen den mikroglialen Anteil an den Proliferierenden Zellen dar. *statistisch signifikant p < 0,05.

Im Gegensatz dazu war die relative Zahl an Astroglia (GFAP) zu Beginn der Analyse am vierten post-ischämischen Tag sehr niedrig. Diese Zahl stieg jedoch in beiden Gruppen mit der Zeit an. Der Astroglia-Anteil unter den proliferierenden Zellen war in den Knockout-Tieren jedoch signifikant höher als in den Wildtyp-Tieren (Abb. 10.).

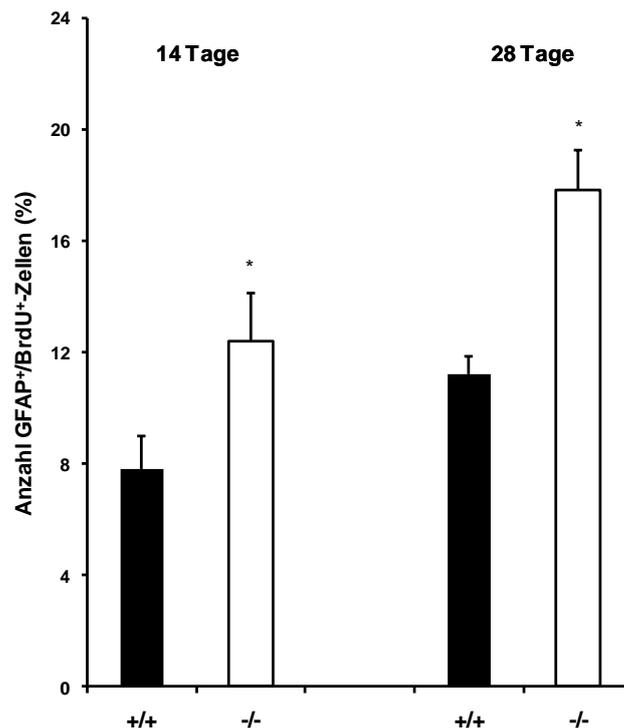


Abb. 10. Astrogliale Zelldifferenzierung. Die Abbildung stellt den relativen Anteil einer astroglialen Kolokalisation mit BrdU⁺ Zellen dar, wobei hier der astrogliale Anteil in den Knockout-Tieren (-/-) signifikant höher ist als in den Wildtyp-Tieren (+/+). *statistisch signifikant $p < 0,05$.

Für die Differenzierungsanalyse unreifer neuronaler Zellen wurde der Marker Dcx, wie im Kapitel „Material und Methoden“ (s.S. 27f.) beschrieben, eingesetzt. In der subakuten Phase der zerebralen Ischämie, d. h. am Tag 4, ließen sich keine Dcx exprimierenden proliferierenden Zellen darstellen (nicht gezeigtes Ergebnis). Hingegen ließ sich in der ipsilateralen SVZ eine signifikant höhere Anzahl als in den Ephrin-B3^{+/+}-Mäusen beobachten. In Wildtyp-Mäusen blieb die relative Anzahl der proliferierenden Zellen, die vom 14. post-ischämischen Tag an Dcx im Striatum exprimierten, auch nach vier Wochen nur gering (Abb. 11). Hingegen kam es im Verlauf von vier Wochen in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen zu einem sukzessiven Anstieg von BrdU⁺-Zellen, welche einen immaturren neuronalen Phänotyp einnahmen. Dieser Unterschied ist 14 Tage nach Ischämie im Vergleich zu den Wildtypen signifikant höher. Am Tag 28 ist dieser Unterschied noch weiter gestiegen.

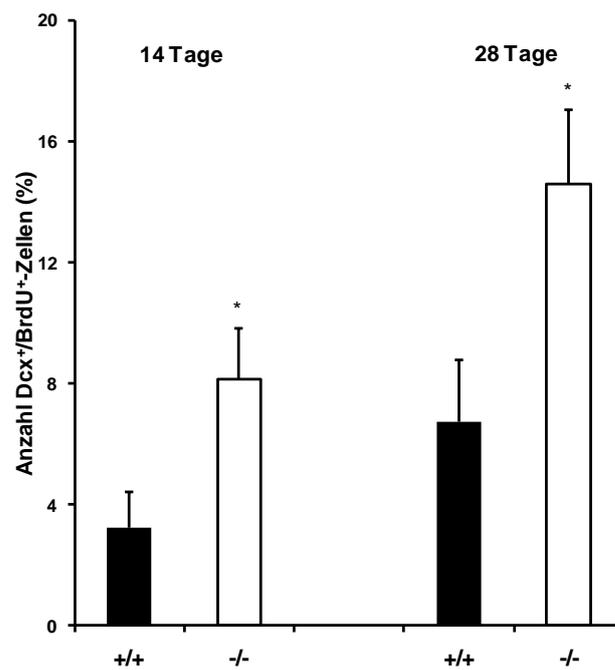


Abb. 11. Immature neuronale Differenzierung: Zu den gegebenen Zeitpunkten (14 und 28 Tage) zeigen die Knockout-Tiere (-/-) eine signifikant gesteigerte Proliferation an neuronaler Differenzierung gegenüber den Wildtyp-Tieren (+/+). *statistisch signifikant $p < 0,05$.

Obwohl es in beiden experimentellen Gruppen zu einem graduellen Anstieg von Dcx⁺/BrdU⁺ Zellen im Beobachtungszeitraum kam, so ließ sich eine mature neuronale Differenzierung von BrdU⁺ Zellen nur in Ephrin-B3^{-/-} Tieren am Tag 28 nach Schlaganfall beobachten. Gleichwohl zeigte sich diese neuronale Differenzierungsrate mit einem relativen Anteil von ca. 2% als verhältnismäßig gering.

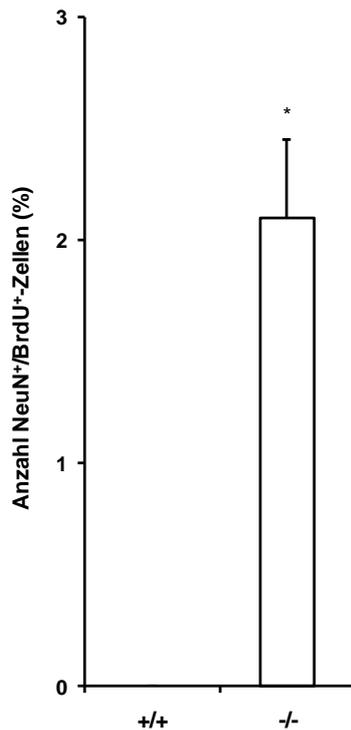


Abb. 12. Immature Zelldifferenzierung: am Tag 28 konnten NeuN⁺-Zellen in Kolokalisation mit BrdU festgestellt werden, womit eine Neurogenese in Knockout-Tieren (-/-) gegenüber Wildtyp-Tieren (+/+) nachgewiesen werden konnte. *statistisch signifikant $p < 0,05$.

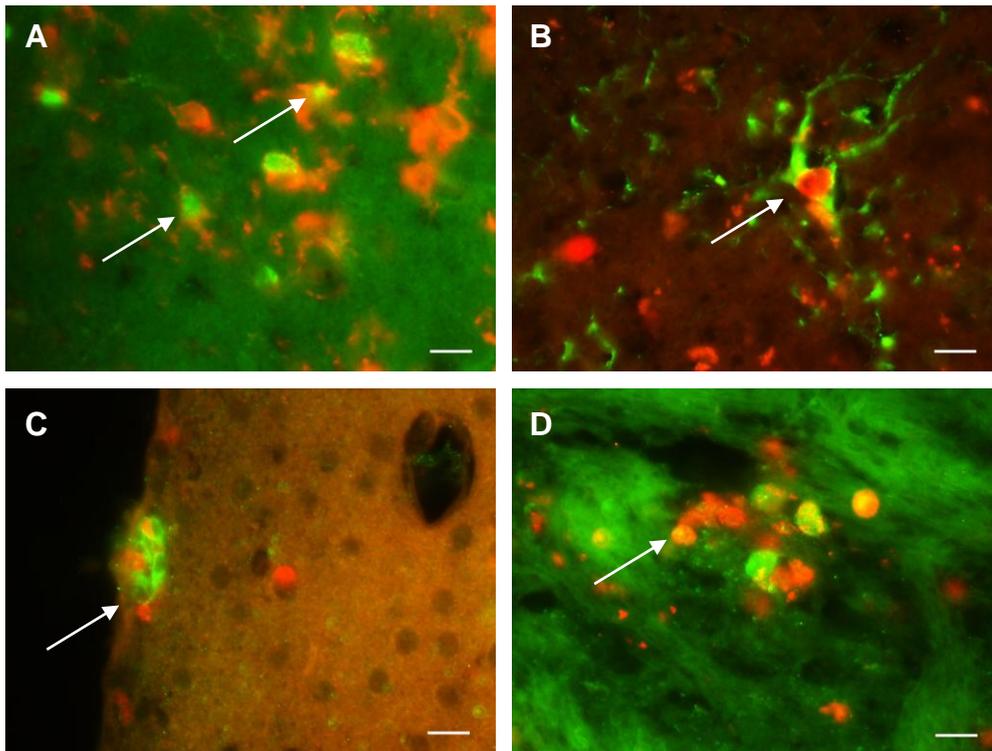


Abb. 13. Kolokalisationen von $BrdU^+$ Zellen. Die Abbildung zeigt die beschriebenen Kolokalisationen von $BrdU^+$ -Zellen mit den Markern IB_4 (grün; A), $GFAP$ (grün; B), Dcx (grün; C) und $NeuN$ (grün; D), Maßstab: 20 μm

4.3 Gesteigerte Stimulation der post-ischämischen Neurogenese in $Ephrin-B3^{-/-}$ -Mäusen

Da sich die post-ischämischen endogenen Zellproliferation zwischen $Ephrin-B3^{+/+}$ - und $Ephrin-B3^{-/-}$ -Mäusen unterscheidet (Abb. 7), wurde eine anschließende Analyse der absoluten Zahlen von $Dcx^+/BrdU^+$ und $NeuN^+/BrdU^+$ Zellen für einen Zeitraum von bis zu vier Wochen nach dem Infarkt durchgeführt.

Im Einklang mit erhöhten relativen Kolokalisationen von $BrdU^+/Dcx^+$ -Zellen in den Knockout-Mäusen war die absolute Anzahl der Dcx^+ -Zellen in diesen Tieren am Tag 14 und vielmehr noch am Tag 28 höher als in den Wildtyp-Tieren (Abb. 15). Diese Zellen waren nun nicht mehr, wie am Tag 4 beschrieben, auf die SVZ beschränkt, sondern formten

cluster-ähnliche Zellaggregate innerhalb des ischämischen Striatums. (Abb. 14).

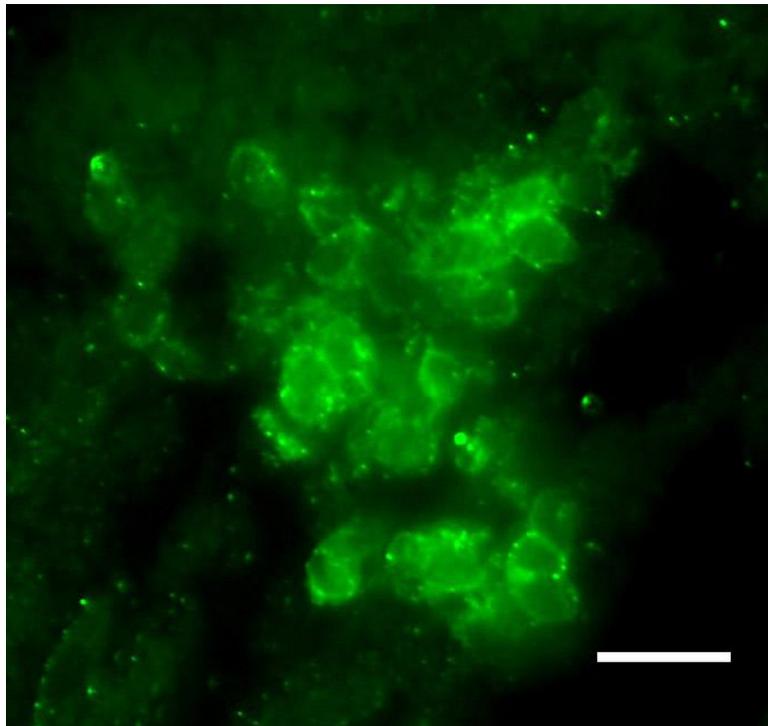


Abb. 14. Anordnung Dcx^+ -Zellen im ischämischen Gewebe.: Dcx^+ -Zellen neigen typischerweise zu einer cluster-artigen Agglomeration im ischämischen Striatum, hier zu beobachten am Tag 28 in $Ephrin-B3^{-/-}$ -Tieren. Maßstab: 20 μm .

Dcx^+ Zellen ließen sich – wie oben bereits ausgeführt – auch im kontralateralen nicht-ischämischen SVZ nachweisen. Interessanterweise zeigte sich auch hier eine erhöhte Zahl Dcx^+ Zellen in $Ephrin-B3^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu $Ephrin-B3^{+/+}$ -Mäusen (nicht gezeigtes Ergebnis). Ähnlich erbrachte die Analyse der absoluten Zahlen von $NeuN^+/BrdU^+$ -Zellen vier Wochen nach dem Schlaganfall eine signifikant erhöhte Anzahl von neu generierten neuronalen Zellen im ischämischen Striatum von $Ephrin-B3^{-/-}$ -Mäusen. Während sich in $Ephrin-B3^{+/+}$ -Mäusen innerhalb des Beobachtungszeitraums keine neu entstandenen Neurone nachweisen ließen, so blieb jedoch die Anzahl dieser Zellen auch in $Ephrin-B3^{-/-}$ -Mäusen verhältnismäßig niedrig (Abb. 15). Hingegen ließen sich keine $NeuN$ exprimierenden $BrdU^+$ -Zellen im kontralateralen Striatum bzw. der SVZ darstellen, weder bei Wildtyp- noch bei Knockout-

Mäusen. Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass die endogene Neurogenese in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen nach der Induktion einer transienten fokalen zerebralen Ischämie im Vergleich zu Ephrin-B3^{+/+} signifikant gesteigert ist.

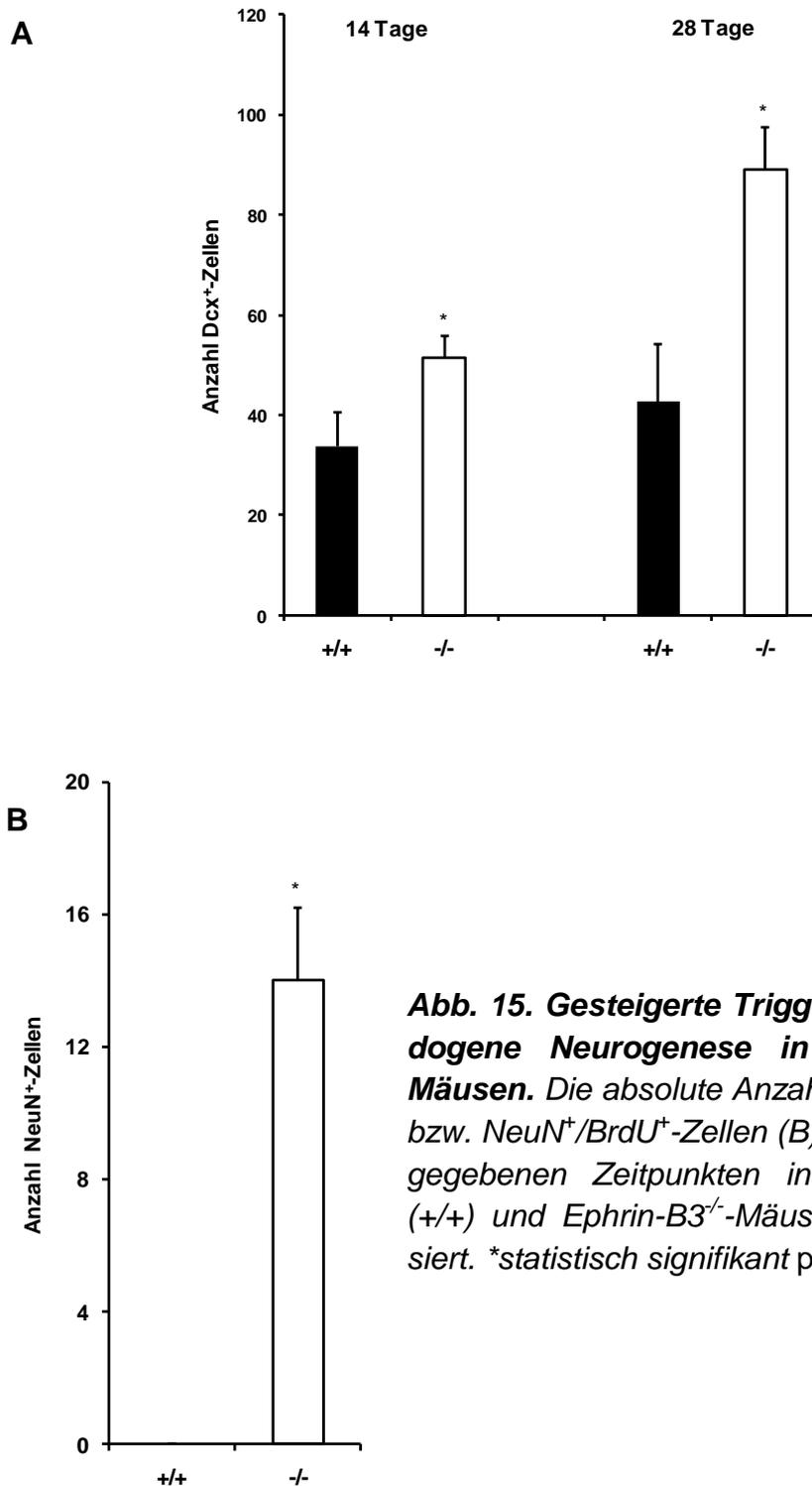
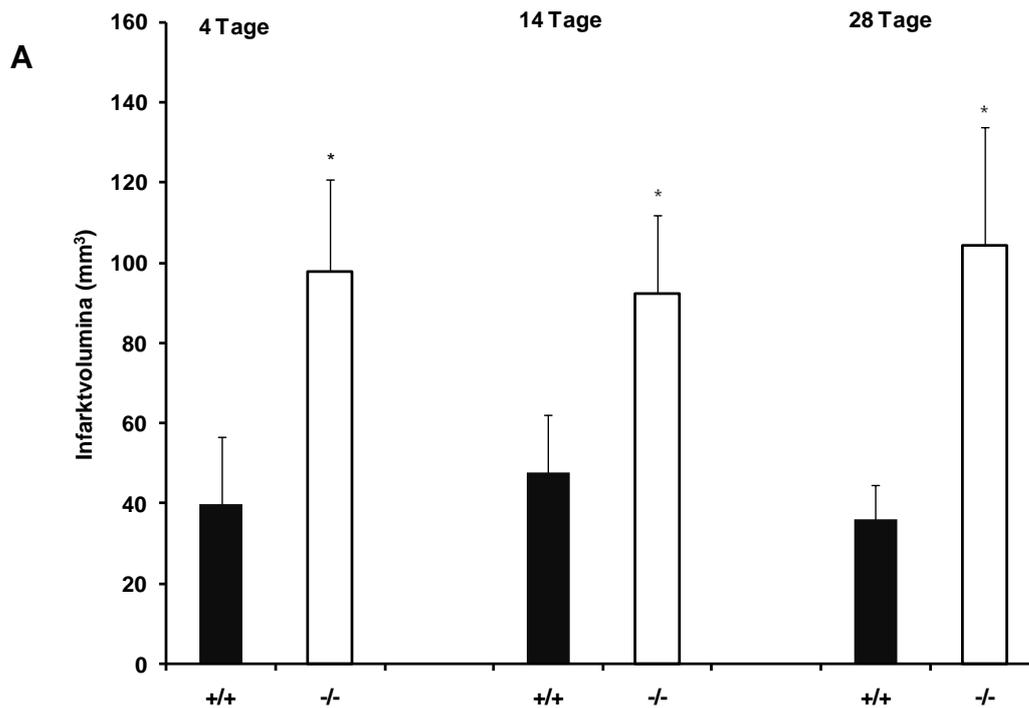


Abb. 15. Gesteigerte Triggerung der endogenen Neurogenese in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen. Die absolute Anzahl von Dcx⁺ (A) bzw. NeuN⁺/BrdU⁺-Zellen (B) wurde zu den gegebenen Zeitpunkten in Ephrin-B3^{+/+} (+/+) und Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen (-/-) analysiert. *statistisch signifikant p < 0,05.

4.4 Quantitative Analyse der post-ischämischen Schädigung

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern eine quantitativ erhöhte neuronale Regeneration von Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen mit einer höheren Resistenz gegen zerebrale Ischämie vergesellschaftet ist. Zu diesem Zweck wurden sowohl das Ausmaß der Infarktschädigung wie auch die funktionelle Erholung in einem Verlauf von bis zu vier Wochen untersucht. Überraschenderweise zeigte sich jedoch in der Analyse der Infarktvolumina keine erhöhte Resistenz in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen gegenüber Kontrolltieren. Im Gegenteil zeigte sich, dass Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse signifikant erhöhte Infarktvolumina an untersuchten Zeitpunkten aufwiesen. (Abb. 16 A-C).



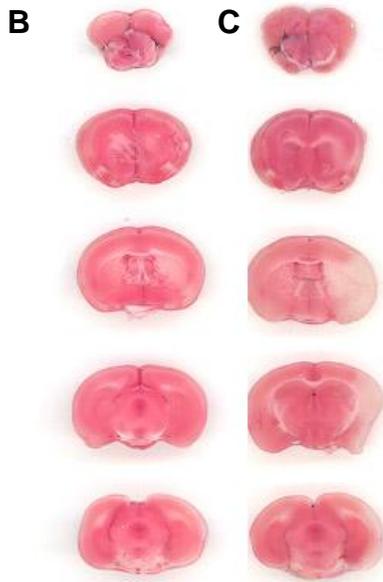


Abb. 16. Analyse von Infarkt volumina: Die Abbildung zeigt die Analyse von Infarkt volumina an den Tagen 4, 14 und 28 in Ephrin $B3^{-/-}$ ($-/-$) und Ephrin $B3^{+/+}$ -Mäusen ($+/+$). Während eine 30-minütige Ischämie in Wildtyp-Tieren überwiegend eine striatale Läsion induziert (B), so zeigen sich in den korrespondierenden Knockout-Tieren anhand der TTC-Färbung ausgedehnte Infarzierungen mit kortikaler Beteiligung (C). *statistisch signifikant $p < 0,05$.

Im Einklang mit diesen erhöhten Infarkt volumina in Ephrin- $B3^{-/-}$ -Mäusen wurde mittels einer TUNEL-Färbung zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen der Zelluntergang und über eine so genannte IB₄-Färbung das Ausmaß der mikroglialen Antwort untersucht (Abb. 16 B+C). Sowohl die Anzahl an TUNEL⁺-Zellen wie auch die die Zahl an IB₄⁺ Zellen zeigten sich signifikant erhöht (Abb. 17). Die beobachtete Aggravation des zellulären Schadens nach Induktion der zerebralen Ischämie war jedoch nicht mit einer Veränderung der zerebralen Perfusion einer verminderten Reperfusion vereinbar. Dies wurde durch den Laser-Doppler-Fluss in beiden Tiergruppen verglichen und objektiviert (Daten nicht dargestellt).

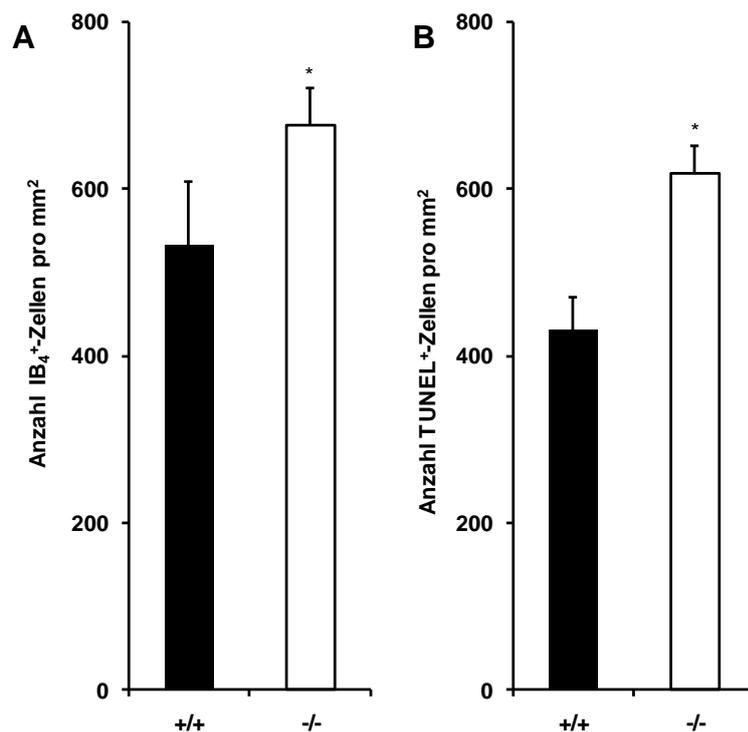


Abb. 17. Post-ischämische Zellschädigung und mikrogliale Reaktion: Quantitative Analyse der Anzahl IB4⁺-Mikroglia (A) sowie der Anzahl TUNEL⁺-Zellen (B) in Ephrin-B3^{-/-} (-/-) und Ephrin-B3^{+/+}-Mäuse (+/+) am Tag 4. *statistisch signifikant $p < 0,05$.

4.5 Analyse des post-ischämischen funktionellen Defizits

In Einklang mit dem oben skizzierten erhöhten ischämischen Gewebeschäden in Ephrin-B3^{-/-} lässt sich ein persistierendes, signifikantes motorisches Koordinationsdefizit mit einer verminderten funktionellen Erholung nach dem Infarkt beobachten (Abb. 18).

Obwohl Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse aufgrund einer bilateralen kortikospinalen Innervation einen differenten Phänotyp dahingehend aufweisen, dass eine unimodale Bewegung beider Hinterläufe gleichzeitig auftritt (Kullander et al. 2001), führt dies nicht zu einer Einschränkung der Tiere im normalen Verhalten. Mehr noch zeigte sich, dass Ephrin-B3^{-/-} und

EphrinB3^{+/+}-Tiere vergleichbare prä-ischämische Resultate in den Verhaltenstest erzielten.(Abb. 18).

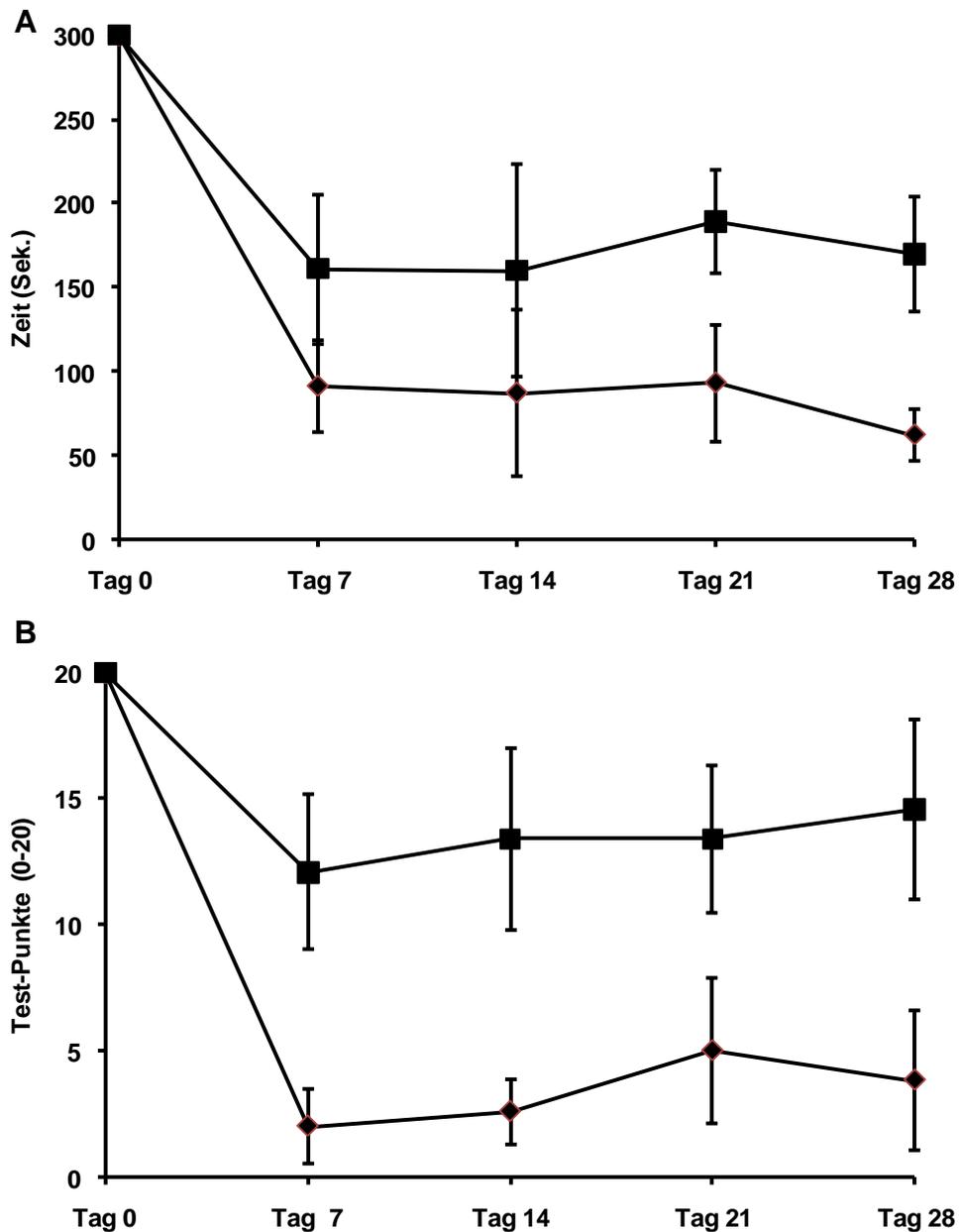


Abb. 18. Analyse des post-ischämischen Motorkoordinationsdefizits. Die funktionelle Erholung von Ephrin-B3^{+/+}- (Quadrate) und Ephrin B3^{-/-}-Mäusen (Rauten) nach zerebraler Ischämie wurde sowohl anhand des Rota-Rod (A) wie auch des Tight-Rope (B) Tests analysiert. Dargestellt sind jeweils die Mittel-

werte \pm SD in einem Verlauf von bis zu 4 Wochen nach Schlaganfallinduktion. *statistisch signifikant $p < 0,05$.

4.5.1 Die erhöhte Neurogenese in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen ist mit einer erhöhten ischämischen Schädigung verbunden

Ausgehend von der oben beschriebenen erhöhten post-ischämischen endogenen Neurogenese in Ephrin-B3^{-/-} Mäusen wurde vor dem Hintergrund der bestehenden Abhängigkeit zwischen Ausmaß der Ischämieschädigung einerseits und Induktion von endogener Neurogenese andererseits (siehe oben) untersucht, inwiefern eine erhöhte Neurogenese Folge der erhöhten Infarktschädigung in diesen Tieren ist. Anders ausgedrückt geht es um die Frage, ob eine erhöhte endogene Neurogenese in Ephrin-B3 Tieren Ausdruck einer genuinen erhöhten basalen Neurogenese oder aber lediglich Folge des erhöhten Infarktschadens ist. Um zu gewährleisten, dass vergleichbare Infarktvolumina zwischen Ephrin-B3^{-/-}- und Ephrin-B3^{+/+}-Mäusen induziert werden, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit zusätzliche Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse einer 20-minütigen zerebralen Ischämie ausgesetzt, während Ephrin-B3^{+/+} nach wie vor einer 30-min Ischämie unterzogen wurden. Die so dann durchgeführte Analyse der Infarktvolumina am Tag 28 zeigte ein Volumen von $\sim 50 \text{ mm}^3$ in Ephrin-B3^{-/-} respektive von $\sim 40 \text{ mm}^3$ in Ephrin-B3^{+/+}-Mäusen, so dass sich kein statistisch signifikanter Unterschied herausarbeiten ließ (Abb. 19).

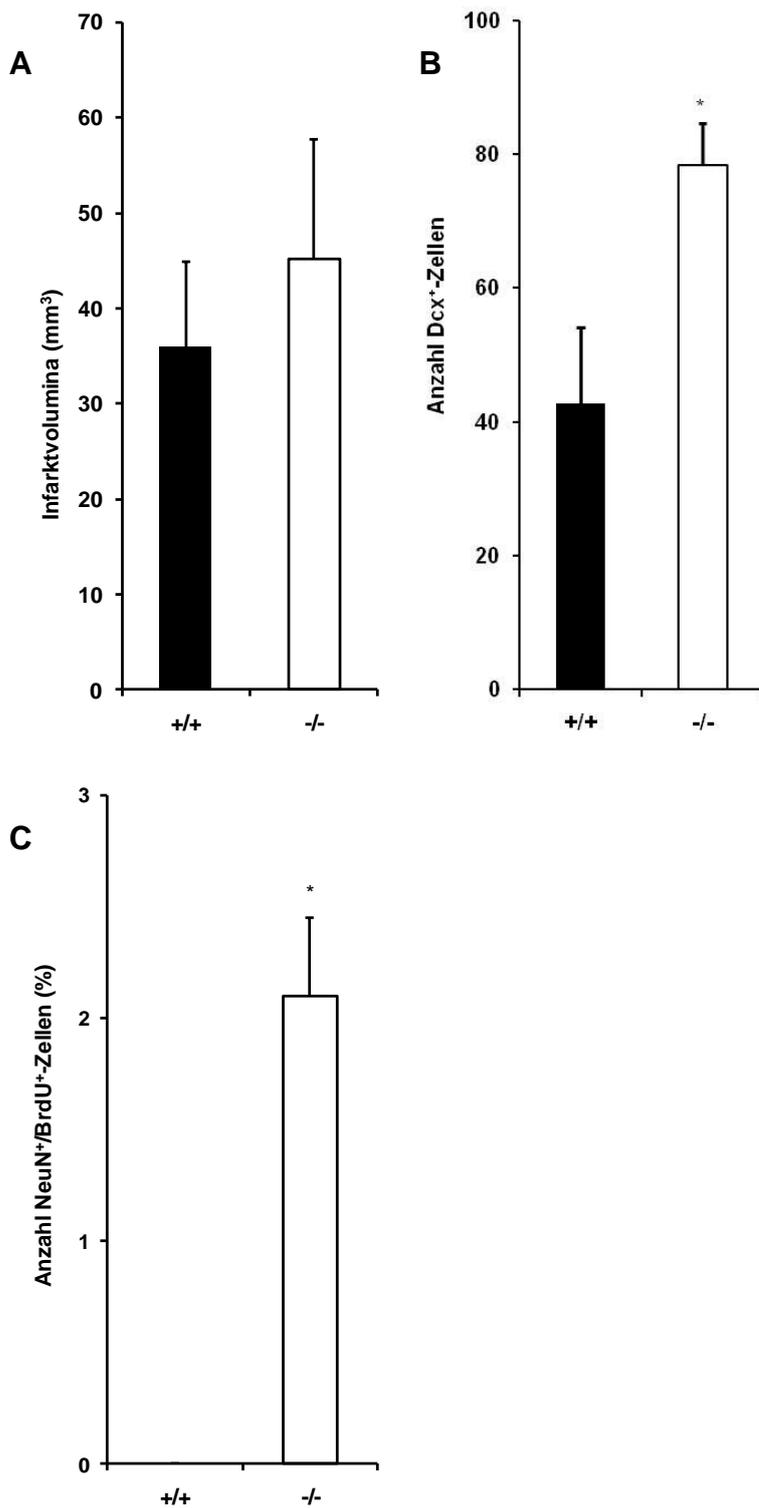


Abb. 19. Die Neurogenese in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen korreliert nicht mit dem Ausmaß der ischämischen Schädigung: Die Tiere wurden 20 min (Ephrin-B3^{-/-}; -/-) oder 30 min (Ephrin-B3^{+/+}; +/+) einer zerebralen Ischämie ausgesetzt. Es folgte die Analyse der Infarktvolumenta anhand einer TTC-Färbung am Tag 28 nach Schlaganfall (A). Die Analyse der post-ischämischen

*Neurogenese wurden mittels quantitativer Untersuchung der Dcx⁺- (B) bzw. NeuN⁺/BrdU⁺-Zellen (C) im ischämischen Striatum und in der ipsilateralen SVZ ebenfalls am 28. Tag durchgeführt. *statistisch signifikant $p < 0,05$.*

Die Untersuchung der endogenen Neurogenese im Hinblick auf die absolute Anzahl an Dcx⁺ und NeuN⁺/BrdU⁺-Zellen ergab eine signifikant erhöhte Zahl dieser Zellen im Peri-infarkt-Gebiet von Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. Interessanterweise zeigten sich diese Werte in der gleichen Größenordnung wie nach Induktion einer zerebralen Ischämie von 30 min Dauer (Abb. 19).

Diese Daten legen nahe, dass die endogene Neurogenese nach zerebraler Ischämie in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen genuin erhöht im Vergleich zu Ephrin-B3^{+/+} Tieren ist. Anders ausgedrückt scheint kein linearer Zusammenhang zwischen Infarktgrößen und endogener Neurogenese zu bestehen.

4.6 Analyse der Resistenz von NPC nach *in-vitro*-Hypoxie-Hypoglykämie.

Da Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse gegenüber Wildtyp-Mäusen eine signifikant erhöhte Sensitivität gegenüber einer ischämischen Noxe aufzeigen (Abb. 19), stellte sich die Frage, inwiefern dies auf NPC aus der SVZ von Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen nach *in-vitro*-Hypoxie/Hypoglykämie der Fall ist. Wie bereits von Ricard et al. zuvor beschrieben (Ricard et al. 2006) zeigten NPC aus Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Neurosphärenbildung und damit einhergehend eine erhöhte Zellproliferationsrate unter physiologischen, d. h. nicht-ischämischen, Bedingungen.

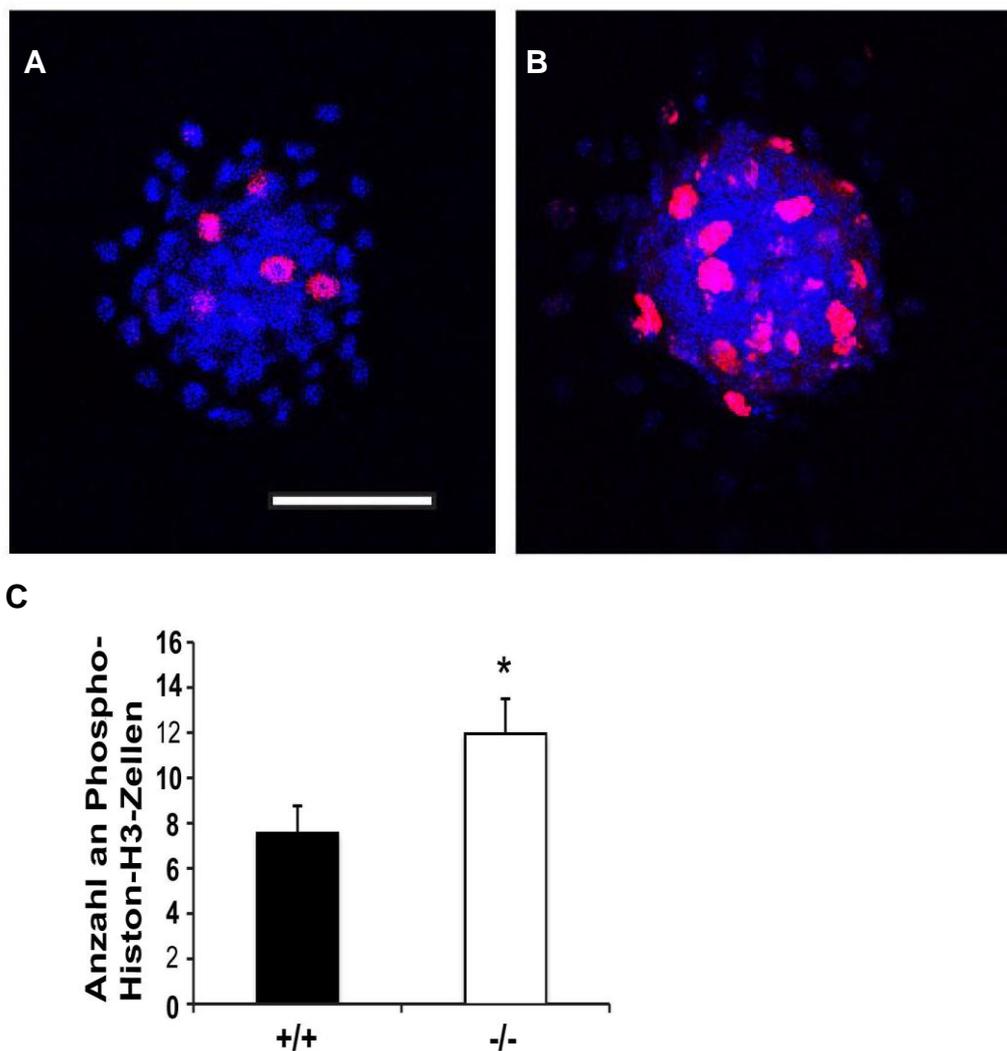


Abb. 20. Neurosphären aus neuronalen Vorläuferzellen (neural precursor cells, NPCs). Neurosphären können aus den SVZ von Ephrin-B3^{+/+}- (A) und Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen (B) gewonnen werden. Hierbei beobachtet man eine erhöhte Neurosphärenbildung in Knockout-Mäusen. Die Abbildung wurde von Herrn Dr. Döppner freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Maßstab 100 μ m.

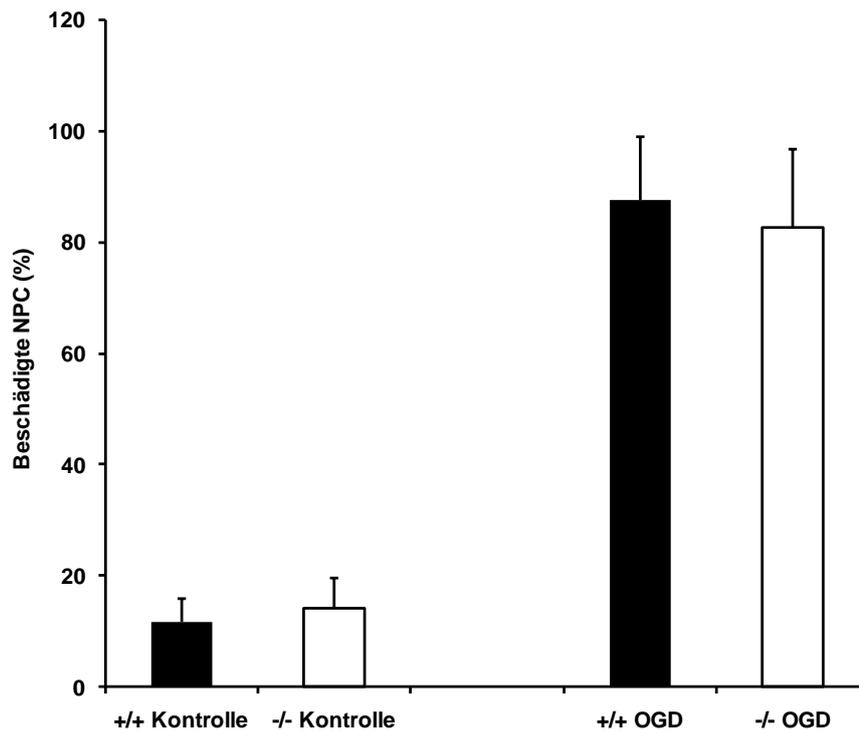


Abb. 21. Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse besitzen keine höhere Empfindlichkeit gegenüber hypoxischen Schädigungen als Ephrin-B3^{+/+}-Tiere: NPC aus Ephrin-Knockoutmäusen (-/-) und EphrinWildtypmäusen (+/+) wurden 45 min einem Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) unterzogen und für 24 h einer Standard-Zellkultur-Bedingung ausgesetzt. Die Kontrollen wurden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen, jedoch ohne OGD inkubiert. Experimente von Herrn Dr. Döppner durchgeführt. *statistisch signifikant $p < 0,05$.

Wurden NPC einer *in-vitro*-Hypoxie-Hypoglykämie (OGD) für 45 min mit konsekutiver Re-Kultivierung unter Standardzellkulturbedingungen für 24 h ausgesetzt, so zeigten sowohl NPC von Ephrin-B3^{-/-} und Ephrin-B3^{+/+} Tieren eine distinkte Zellschädigung (Abb. 21). Gleichwohl konnte kein Unterschied hinsichtlich der Zelltodrate in diesen beiden Gruppen beobachtet werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass NPC aus der SVZ von Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen eine erhöhte proliferative Aktivität im Vergleich zu Ephrin-B3^{+/+}-Tieren aufweisen, sich jedoch nicht in Bezug auf die Sensitivität gegenüber hypoxisch-hypoglykämischen Noxen unterscheiden.

4.7 Subakute Infarkt-Schädigungen in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen sind mit der Aktivierung von Caspase-3 assoziiert

Wie zuvor beschrieben, führt die Abwesenheit von Ephrin-B3 unter physiologischen Bedingungen zu einem Caspase-3-induziertem Gewebeschaden, der über Eph-A4 Rezeptoren vermittelt wird. Es stellte sich die Frage, ob Caspase-3 eine dominante Rolle bei der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Aggravation des post-ischämischen Schadens in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen aufweist. Caspase-3-Aktivitätsmessungen in Hirnlysaten während der akuten Phase des ischämischen Schlaganfalls zeigten eine sukzessive zunehmende Enzymaktivität sowohl in Ephrin-B3^{-/-}- wie auch in Ephrin-B3^{+/+}-Mäusen. Das Maximum der Aktivität wurde in beiden Gruppen 2 h nach dem Schlaganfall beobachtet (Abb. 22). Jedoch zeigte sich in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen ein deutlich steilerer Anstieg der Caspase-3 Aktivität und zudem auch eine signifikant erhöhte absolute Aktivität des Enzyms im Vergleich zu Kontrolltieren. Wenngleich auch diese Beobachtung 2 h nach Ischämie am ausgeprägtesten war, so zeigte sich auch in den darauf folgenden Messungen eine persistierende, erhöhte Caspase-3 Aktivität in Ephrin-B3^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Ephrin-B3^{+/+}-Mäusen.

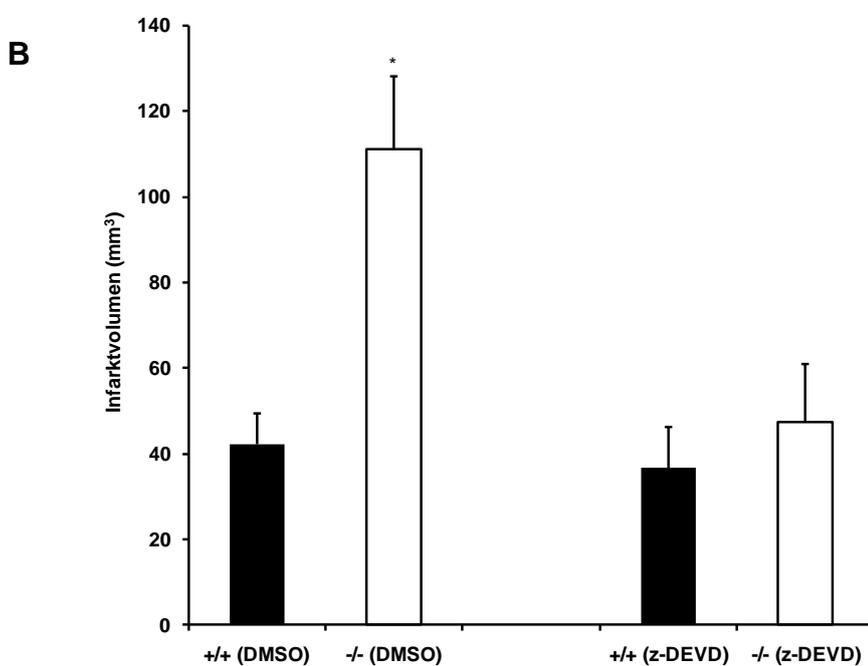
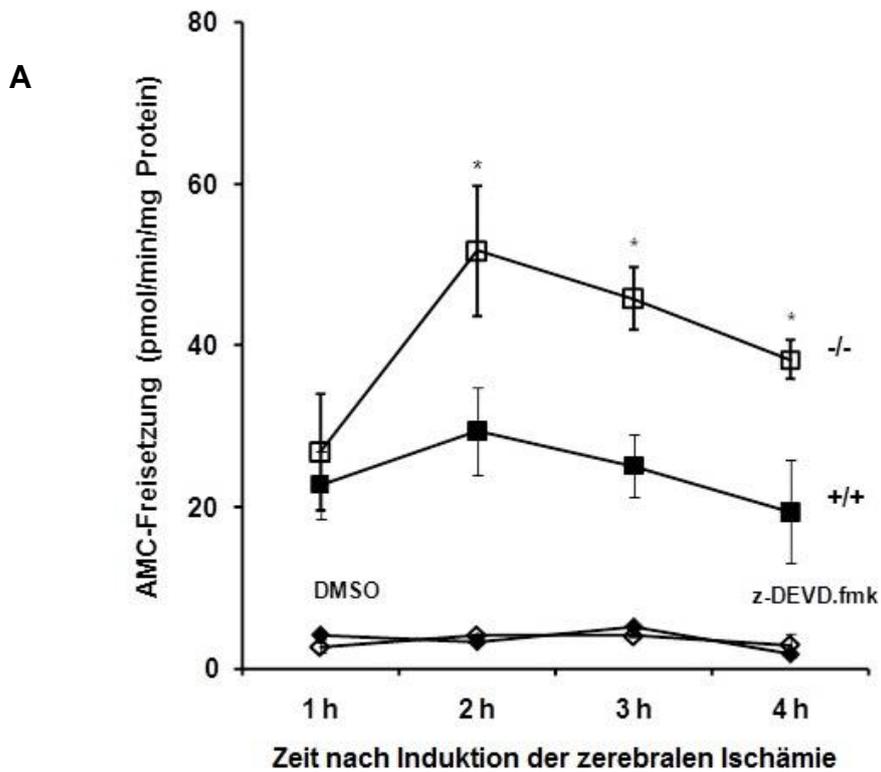


Abb. 22. Aggravation der ischämischen Gewebeschädigung in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen mit Caspase-3: (A) Die Caspase-3 Aktivität wurde 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion des Schlaganfalls bestimmt. Als Kontrolltiere fungierten hierbei Ephrin-B3^{+/+}-

*(schwarze Symbole) und Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse (offene Symbole). Ein Teil der Tiere erhielt 0,2% DMSO (Quadrat) intravenös und ein anderer Teil erhielt den Caspase-3-Inhibitor z-DEVD.fmk (Raute) am Anfang der Reperfusion. (B) Die systemische Anwendung von z-DEVD.fmk an den Tagen 0-3 führte zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße am 4. Tag in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen (-/-) im Vergleich zu den Kontrolltieren (+/+), die DMSO erhielten. Die Experimente wurden von Herrn Dr. Döppner durchgeführt. *statistisch signifikant p < 0,05.*

Die systemische Gabe des Caspase-3-Inhibitors z-DEVD.fmk zu Beginn der Reperfusion führte hingegen in beiden experimentellen Gruppen zu einer signifikanten Reduktion von Caspase-3-Aktivität zu allen Messzeitpunkten. Interessanterweise führte die Gabe des Caspase-3 Inhibitors z-DEVD.fmk zu einer signifikanten Reduktion des Infarktolumens am Tag 4 nach Schlaganfall nur in den Ephrin-B3^{-/-}-Tieren. Hingegen ließ sich in den Ephrin-B3^{+/+} Mäusen kein signifikanter Rückgang des Infarktschadens beobachten. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass möglicherweise die Beteiligung von Caspase-3 mit einer Aggravation von Infarktschäden in Ephrin-B3^{-/-}-Tieren vergesellschaftet ist.

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden Auswirkungen einer Deletion von Ephrin-B3 auf die Zellproliferation und die endogene Neurogenese nach Induktion einer zerebralen Ischämie an Ephrin-B3^{-/-}- und Ephrin-B3^{+/+}-Mäusen untersucht. In einem zweiten Schritt wurde der Frage nachgegangen, inwiefern sich eine Modulation von post-ischämischer Zellproliferation und Neurogenese in Ephrin-B3-defizienten Tieren auf die Gewebeschädigung und die funktionelle Erholung auswirken.

In der hier vorliegenden Arbeit ließ sich eine Stimulation der endogenen Zellproliferation nach Induktion einer zerebralen Ischämie sowohl in Wildtyp- wie auch Knockout-Tieren beobachten. Eine Stimulierung der post-ischämischen endogenen Zellproliferation in der SVZ bzw. der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus ist wiederholt gezeigt worden (s. o.). Ihre funktionelle Relevanz jedoch war nach wie vor unklar. (Jin, et al. 2001; Arvidsson et al. 2002). In der hier vorliegenden Arbeit ließ sich zwar ebenfalls eine ischämieinduzierte Stimulation dieser endogenen Zellproliferation von Vorläuferzellen aus der SVZ der Seitenventrikel beobachten, jedoch weisen Ephrin-B3^{+/+}- und Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse distinkte Unterschiede auf, welches im Folgendem weiter erläutert wird.

Wenngleich es im Verlauf des Beobachtungszeitraums zu einer progredienten Abnahme sowohl von BrdU⁺- wie auch Ki-67⁺-Zellen in beiden tierexperimentellen Gruppen kam, war die Zahl der nachgewiesenen Zellen zu jedem untersuchten Zeitpunkt in den Knockout-Mäusen durchweg höher als in den Wildtyp-Mäusen. Zwar wurden BrdU⁺- und Ki-67⁺-Zellen in beiden Tiergruppen im ipsilateralen ischämischen Striatum und der SVZ beobachtet, die Zahl war jedoch in der SVZ konstant niedriger als im ischämischen Striatum. Die Anzahl an BrdU⁺- und Ki-67⁺-Zellen in der kontralateralen, nicht-ischämischen SVZ war dabei auch in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen erhöht, welches für eine erhöhte basale Zellproliferation innerhalb der neurogenen Nische spricht. Diese Ergebnisse stehen mit der Literatur in Einklang, in der eine erhöhte basale

Zellproliferation in der Keimnische von Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen unter physiologischen Bedingungen beschrieben wird (Ricard et al. 2006).

In dieser Arbeit wurde eine differenzierte Analyse von endogenen proliferierenden BrdU⁺-Zellen in einem Zeitraum von bis zu 4 Wochen nach Induktion der zerebralen Ischämie durchgeführt. Hierbei erfolgte der Einsatz unterschiedlicher Marker zur Detektion von verschiedenen „Differenzierungsmolekülen“ der verschiedenen Zelllinienrichtungen. In diesem Zusammenhang wichtig ist die Tatsache, dass das Thymidinanalogon BrdU nicht nur während der S-Phase des Zellzyklus, sondern auch in Phasen der Zellreparatur in die Zelle eingebaut wird (Taupin 2007). Aus diesem Grunde wurden zusätzliche Proliferationsanalysen anhand des nukleären Antigens Ki-67 durchgeführt, welches in allen Phasen der Mitose (S-, G1-, G2- und M-Phase) von physiologischen (und auch neoplastischen) Zellen exprimiert wird, wobei in ruhenden Zellen (=G0-Phase) Ki-67 negativ nicht nachgewiesen wird (Rock et al. 1993). Die Analyse dieser Ki-67⁺ Zellen bestätigte jedoch eine konstant erhöhte Anzahl an proliferierenden Zellen in Ephrin-B3^{-/-}-Tieren zu den gegebenen Untersuchungszeitpunkten.

Da eine erhöhte endogene Zellproliferation für sich genommen zu keiner notwendigen funktionellen Relevanz nach zerebraler Ischämie führt, erfolgte eine differenzierte Differenzierungsanalyse von BrdU⁺ Zellen. Es zeigte sich am vierten Tag, dass über 90% der BrdU⁺-Zellen einen mikroglialen Phänotyp aufwiesen, wie anhand der IB₄-Färbung zu detektieren war. Jedoch hatte die Deletion von Ephrin-B3 keinen spezifischen Einfluss auf die mikrogliale Reaktion bzw. Differenzierung, da kein signifikanter Unterschied zwischen Ephrin-B3^{+/+}- und Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen vorhanden war. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Beobachtungen, bei denen subakut nach einem Schlaganfall Zellproliferation mit einer Mikroglia-Aktivierung und nicht durch verstärkte endogene Neurogenese verbunden war (Doepfner et al. 2010), wobei das Ausmaß der BrdU⁺-Zellen in der subakuten Phase des Schlaganfalls mit dem Ausmaß des Gewebeschadens korreliert.

Im Verlauf kam es in beiden Tiergruppen zu einem Anstieg von proliferierenden BrdU⁺-Zellen, welche den Astroglia-Marker GFAP exprimierten. Ab Tag 14 waren jedoch diese Kollokationen in den Knockout-Mäusen deutlich größer als in den Wildtyp-Mäusen. Inwiefern es sich hierbei um eine genuin erhöhte Differenzierungsrate von proliferierenden Zellen handelt oder lediglich um eine reaktive Astrogliaaktivierung nach zerebraler Ischämie, bleibt offen und wird weiter unten im Text nochmals aufgegriffen. Weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine oligodendrogliale Differenzierung (Marker CNPase) von BrdU⁺-Zellen zeigten hingegen keine Kollokation mit diesem Marker (unveröffentlichtes Ergebnis).

Der weitere Schwerpunkt der Analysen zielte auf eine Beurteilung der Differenzierung hinsichtlich eines neuronalen Phänotyps von proliferierenden BrdU⁺ Zellen ab. Es zeigte sich, dass proliferierende Zellen den unreifen neuronalen Marker Dcx exprimieren. Am vierten Tag nach dem Schlaganfall konnten diese Zellen in beiden experimentellen Gruppen nur in der SVZ nachgewiesen werden, wohingegen zu diesem Zeitpunkt keine Dcx⁺/BrdU⁺-Zellen im ischämischen Striatum gefunden wurden. Dieser Befund entspricht den bereits bekannten Daten in der Literatur, da in der SVZ Astrozyten-ähnliche neurale Stamm- bzw. Vorläuferzellen sich durch schnell teilende Zellen zu den Neuroblasten, die über den rostralen migratorischen Strom (RMS) zum olfaktorischen Bulbus auswandern, differenzieren. Dcx findet sich somit in der Regel nur in der SVZ (Doetsch et al. 1997; Doetsch et al. 1999; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002). Vom 14. post-ischämischen Tag an wird in den Tieren auch im ischämischen Striatum Dcx exprimiert, wobei bei den Wildtyp-Mäusen die relative Anzahl der proliferierenden Zellen (BrdU⁺/Dcx⁺), auch nach vier Wochen nur gering (Abb. 7) bleibt. Diese Daten stimmen mit früheren Berichten überein, in denen wiederholt gezeigt wurde, dass eine zerebrale Ischämie zu einem Anstieg in der neuronalen Differenzierung von BrdU⁺-proliferierenden Zellen in Nagetieren führt (Arvidsson et al. 2001; Zhang et al. 2001; Arvidsson et al. 2002; Doepfner et al. 2009). Interessanterweise zeigte sich jedoch bei

den Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen eine durchgehend höhere immature neuronale Differenzierung als in den Wildtyp-Mäusen. Jedoch war in den Knock-out-Tieren die Anzahl der BrdU⁺/Dcx⁺-Zellen in der kontralateralen SVZ ebenfalls im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen erhöht. Die ischämieinduzierte erhöhte Koexpression von BrdU und Dcx im ischämischen Striatum und der SVZ von Ephrin-B3^{+/+}-Tiere führte schlussendlich jedoch nicht zu einer genuinen maturen neuronalen Differenzierung in Wildtyp-Tieren. Anders ausgedrückt ließen sich im Beobachtungszeitraum von bis zu 4 Wochen bei diesen Tieren keine Expression des maturen neuronalen Markers NeuN in den BrdU⁺ Zellen beobachten. Hingegen konnte in den Knockout-Mäusen vier Wochen nach der Ischämie vereinzelt NeuN⁺/BrdU⁺-Zellen gefunden werden, welche jedoch typischerweise einen distinkten Aufbau von Zellprotrusionen vermissen ließen.

Vor dem Hintergrund differenter Anzahlen an BrdU⁺ Zellen zwischen Ephrin-B3^{-/-}- und Ephrin-B3^{+/+}-Tieren (s.o.) erfolgte eine Post-Analyse von absoluten Zahlen hinsichtlich der Genese und Proliferation von immaturren und maturen Neuronen. Im Einklang mit einer hohen relativen Zahl von neugeborenen Nervenzellen waren die absoluten Anzahlen der Dcx⁺ und NeuN⁺/BrdU⁺ Zellen signifikant in Ephrin-B3 Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen erhöht, wodurch hiermit eine gesteigerte Proliferation in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen gezeigt wird. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die endogene Neurogenese in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen erhöht ist.

In der Literatur wurde eine erhöhte neuronale Differenzierung von Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen bisher nur unter *physiologischen* Bedingungen beschrieben. Ephrin-B3 gilt in diesem Zusammenhang als negativer Regulator der Neurogenese in der SVZ. Außerdem ist zu bemerken, dass mit der erhöhte Zellproliferation auch ein erhöhter Zelluntergang einhergeht (Ricard et al. 2006). Insofern stellte sich die Frage, inwiefern eine erhöhte endogene Neurogenese von Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber einer zerebralen Ischämie einhergeht.

Die Induktion einer transienten fokalen zerebralen Ischämie ging bei Knockout-Tieren sowohl mit einem erhöhten Infarktvolumen, einer ausgeprägten Zellschädigung (TUNEL-Färbung) sowie mit einer hohen Zahl von aktivierten Mikrogliazellen einher. Einhergehend mit diesem erhöhten ischämie-induzierten Gewebeschaden in Ephrin-B3^{-/-}-Tieren, welcher nicht einer Änderung der zerebralen Perfusion bzw. Reperfusion anzuschulden war, zeigten diese Tiere eine signifikant reduzierte post-ischämische funktionelle Erholung. Ein Grund hierfür liegt sicherlich in der größeren Läsion nach einem Schlaganfall. Andererseits kann auch ein reduziertes Überleben von neugeborenen Zellen (mit-)verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang ist die oben skizzierte erhöhte Anzahl von GFAP⁺/BrdU⁺-Zellen in Ephrin-B3^{-/-}-Tieren vielmehr Ausdruck einer astroglialen Narbenbildung als einer echten astroglialen Differenzierung von SVZ-abgeleiteten BrdU⁺ Zellen.

Da zerebrale Ischämie als solches eine Stimulation der endogenen Neurogenese induziert (s.o.), wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die beobachtete erhöhte endogene Neurogenese lediglich Folge einer erhöhten Gewebeschädigung in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen ist. Anders ausgedrückt geht es um die Frage, ob endogene Neurogenese in Ephrin-B3^{-/-}-Tieren aufgrund einer erhöhten Stimulation durch größeren Gewebeschaden oder aber bereits durch basale Mechanismen gesteigert ist. Vor diesem Hintergrund wurde die endogene Neurogenese unter vergleichbaren Infarktvolumina analysiert. Eine Reduktion der Faden-Okklusions-Zeit in den Knockout-Tieren, die zu ähnlichen Infarktgrößen wie bei den Wildtyp-Tieren führte, beeinträchtigte jedoch nicht die endogene Neurogenese in den Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen. Im Gegenteil, die post-ischämische Neurogenese war nicht nur im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erhöht, sondern war auch auf dem gleichen Niveau wie in den Knockout-Tieren, die jeweils einer längeren Ischämiezeit ausgesetzt waren. Diese Beobachtungen deuten auf eine verstärkte endogene Neurogenese in Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse hin, welche durch zerebrale Ischämie zwar getriggert wird, jedoch – zumindest teilweise – unabhängig vom Ausmaß der ischämischen Schädigung ist. Anders ausgedrückt

bedeutet dies, dass zerebrale Ischämie lediglich als Trigger für eine gesteigerte Neurogenese in Knockout-Tieren fungiert.

Eph/Ephrin-Moleküle werden in der SVZ und dem umgebendem Gewebe exprimiert, und es wurde gezeigt, dass Eph/Ephrin-Interaktion in diesen Arealen Einfluss nehmen auf Proliferation und Apoptose, die sowohl antero- wie auch retrograde Signalkaskaden beeinflussen (Conover et al. 2000; Holmberg et al. 2005; Katakowski et al. 2005; Ricard et al. 2006). Obwohl die SVZ selbst nicht durch die transiente fokale zerebrale Ischämie betroffen ist, wurde untersucht, ob eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ischämie in den Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen auch für SVZ-abgeleiteten NPC *in vitro* gilt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass NPC aus Ephrin-B3-Mäusen eine erhöhte Proliferationsrate unter normoxischen Bedingungen *in vitro* aufweisen.

Wenngleich auch eine erhöhte Proliferationsrate dieser Zellen durch Ricard et al. (Ricard et al. 2006) unter physiologischen Bedingungen zuvor gezeigt wurde, so konnten diese Befunde nicht ohne weiteres auf unser experimentelles Paradigma übertragen werden. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache begründet, dass sowohl endogene Zellproliferation wie auch Neurogenese u. a. abhängig von der Tierspezies und deren Alter sind (Bouab et al. 2011; Van Kampen et al. 2004; Baker et al. 2005), wobei letzteres sich in der vorliegenden Arbeit von der Studie von Ricard et al. unterscheidet. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass SVZ-abgeleitete NPC aus Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen eine verstärkte Proliferation unter nicht-ischämischen Bedingungen zeigten. Dabei führte die Exposition von NPC gegenüber Hypoxie in beiden Tiergruppen zu einer deutlichen Zellschädigung, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen bestand. Diese Beobachtung fußt wahrscheinlich auf der Tatsache, dass Ephrin-B3 selbst nicht in der SVZ exprimiert wird, sondern nur im umliegenden Gewebe, welches nur indirekt die Proliferation von NPC beeinflusst (Ricard et al. 2006). Interessant ist somit die in dieser Arbeit gezeigte Unabhängigkeit der Zellen von Noxen wie Ischämie als Triggerfaktoren einer gesteigerten Proliferation. Vielmehr ist eine erhöhte basale Zellproliferation ursächlich für die ge-

machten Beobachtungen und macht somit den Einsatz dieser Zellen im Rahmen einer potentiellen tierexperimentellen Stammzelltherapie interessant.

Obwohl die Rolle der Apoptose und die Aktivierung von Caspase-3 in der zerebralen Ischämie wiederholt untersucht worden ist, sind die genauen Analysen der apoptotischen Signalkaskaden sowie ein klinischer Benefit durch Hemmung von pro-apoptotischen Kaskaden nach wie vor nicht überzeugend demonstriert worden (Namura et al. 1998; Dirnagl et al. 1999). EphA4 selbst wird durch eine Caspase-3-ähnliche Caspase an der intrazellulären Domäne an Position D773/774 gespalten, die zur Initiierung des Zelltods führt. Unter nicht-ischämischen Bedingungen führt ein Fehlen von Ephrin-B3 zu einem erhöhten Zelltod in der adulten SVZ, während das Fehlen von EphA4 zu einer Zunahme von Neuroblasten führt (Furne et al. 2009). Die aktuelle Studie bestimmte die post-ischämischen Caspase-3 Aktivität mit einem signifikanten Anstieg der Enzymaktivität in den Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen. Nach zwei Stunden kam es hierbei zu einem Maximum der Caspase-3-Aktivität. Die systemische Applikation des Caspase-3-Inhibitors z-DEVD.fmk reduzierte nicht nur signifikant die Caspase-3 Aktivität in beiden Tiergruppen, sondern führte auch zu einem signifikanten Rückgang des Infarktvolumens in den Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen. Auffällig dabei war, dass die Infarktvolumina von Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen nach z-DEVD.fmk Behandlung nicht nur deutlich reduziert waren, sondern sich diese auch den Infarktvolumina von Ephrin-B3^{+/+}-Mäusen annäherten, welche ebenfalls mit dem Caspase-3-Inhibitor behandelt wurden. Im Gegenteil dazu zeigten Ephrin-B3^{+/+}-Mäuse, die z-DEVD.fmk erhalten hatten, keine signifikante Reduktion der Infarktvolumina. Dieses deutet darauf hin, dass die Caspase-3-Aktivierung eher an einer Aggravation der ischämieinduzierten Gewebeschädigung in Ephrin-B3-Knockout-Tieren beteiligt ist. Sie scheint hingegen von untergeordneter Bedeutung hinsichtlich der initialen Generierung des Infarktschadens von Ephrin-B3^{+/+}-Mäusen zu sein.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass die post-ischämische endogene Neurogenese in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen gesteigert ist, welches sich in einer gesteigerten Anzahl an SVZ-abgeleiteten NPC an der Stelle der Läsion äußert. Die Abwesenheit von Ephrin-B3 führt jedoch zu erhöhten Infarktschädigungen und anschließender reduzierter funktioneller Erholung, was mit einer erhöhten post-ischämischen Caspase-3 Aktivierung assoziiert ist. In zukünftigen Studien könnte die erhöhte Proliferation und neuronale Differenzierung von kultivierten NPC aus Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen für die zellbasierte Schlaganfall-Therapie interessant sein.

6 Zusammenfassung

Die Induktion einer zerebralen Ischämie führt zu einer Stimulation der endogenen Neurogenese im adulten Gehirn. Die funktionelle Relevanz dieses Phänomens ist jedoch aufgrund einer hohen Zelltod- und geringen neuronalen Differenzierungsrate von neuronalen Vorläuferzellen (NPC) aus der Subventrikulärzone (SVZ) von untergeordneter Bedeutung.

In diesem Zusammenhang spielen Ephrin-Rezeptoren und ihre korrespondierenden Liganden wie beispielsweise Ephrin-B3 eine entscheidende Rolle, insofern als dass sie an der (negativen) Regulation der Neurogenese unter *physiologischen* Bedingungen beteiligt sind. Erstmals wurden in der hier vorliegenden Studie Mechanismen der post-ischämischen Neurogenese an Ephrin-B3-defizienten Mäusen (Ephrin-B3^{-/-}) über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 4 Wochen untersucht.

In den Analysen konnte gezeigt werden, dass die zerebrale Ischämie in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen zu einer signifikant gesteigerten Proliferation und neuronalen Differenzierung von endogenen NPC aus der SVZ führt. Dennoch zeigte sich in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen eine signifikant erhöhte Zell- und Gewebeschädigung, welche auch mit einer verminderten post-ischämischen funktionellen Erholung dieser Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen einherging. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die post-ischämische Schädigung in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen mit einer erhöhten Caspase-3-Aktivierung assoziiert war. Während die Hemmung der Caspase-3 keinen Einfluss auf die Größe des Schlaganfalls bei den Kontrolltieren hatte, waren die Infarktgrößen in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert und befanden sich auf dem Niveau von Wildtyp-Kontrollen. Dies deutet darauf hin, dass Caspase-3 eine entscheidende Rolle bei der Aggravation der post-ischämischen Gewebeschädigung in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen spielt.

Zusammenfassend führt die Deletion des Ephrin-B3-Liganden zu einer signifikant erhöhten post-ischämischen Neurogenese im Periinfarktareal, ohne jedoch zu einer funktionellen Erholung beizutragen. Im Gegenteil, die post-ischämische Gewebeschädigung ist durch eine assoziierte erhöhte Aktivität von Caspase-3 in Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen signifikant gesteigert.

Zukünftige Studien werden zeigen müssen, ob die erhöhte Proliferations- und Differenzierungsrate von NPC aus Ephrin-B3^{-/-}-Mäusen für eine zellbasierte Schlaganfall-Behandlung von therapeutischem Interesse ist.

7 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACID	Acid sensing ion channel
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BG	Basalganglien
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CCA	Arteria carotis communis
CNPase	2'-3'-zyklische Nukleotid Phosphodiesterase (2'-3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase)
CoCl ₂	Cobalt(II)-chlorid
CT	Computertomographie
DAPI	4'6-Diamidino -2-Phenylindol
Dcx	Doublecortin
DKS	Eselserum (donkey serum)
DTT	Dithiothreitol
evtl.	eventuell
GFAP	saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
G0-Phase	Ruhephase
G1-Phase	Gap-Phase, Präsynthesephase
G2-Phase	Postsynthesephase
HCl	Salzsäure (37%ige Lösung von Chlorwasserstoff in Wasser)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Et-OH	Ethanol
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IB ₄	Isolectin B ₄
IgG	Immunglobulin G
IM	intramuskulär
INR	international normalized ratio
KCl	Kaliumchlorid

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ki-67	Kiel (Ort der Entdeckung) und Nummer des Zellklons
MAG	myelin-associated glycoprotein
MCA	A. cerebri media
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
M-Phase	Mitose-Phase
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaOH	Natronlauge
NeuN	neuronal nuclei
NGS	Ziegenserum (normal goat serum)
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Nitritoxid
NOS	Nitritoxid-Synthase
NPC	neurale Vorläuferzellen, neural precursor cells
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RMS	Rostraler migratorischer Strom (rostral migratory stream)
ROI	region of interest
rpm	Drehungen pro Minute
s.S.	siehe Seite
S-Phase	Synthesephase
SVZ	Subventrikuläre Zone
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween20 (tris-buffered saline tween20)
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TIA	Transischämische Attacke
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling

z.B. zum Beispiel

z-DEVD.fmk bestimmte Aminosäuresequenz, die Caspase-3 hemmt

8 Literaturverzeichnis

- Adams, R. H. and K. Alitalo (2007): "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6): 464-78.
- Aleu A, Mellado P, Lichy C, Köhrmann M, Schellinger PD (2007): "Hemorrhagic complications after off-label thrombolysis for ischemic stroke." *Stroke* 38(2): 417-22.
- Altman, J. and S. A. Bayer (1990): "Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells." *J Comp Neurol* 301(3): 325-42.
- Alvarez-Buylla, A. and J. M. Garcia-Verdugo (2002): "Neurogenesis in adult subventricular zone." *J Neurosci* 22(3): 629-34.
- Alvarez-Buylla, A. and D. A. Lim (2004): "For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain." *Neuron* 41(5): 683-6.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. (2002): "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke." *Nat Med* 8(9): 963-70.
- Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. (2001): "N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke." *Eur J Neurosci* 14(1): 10-8.
- Back T, Hirsch JG, Szabo K, Gass A. (2000): "Failure to demonstrate peri-infarct depolarizations by repetitive MR diffusion imaging in acute human stroke." *Stroke* 31(12): 2901-6.
- Baker SA, Baker KA, Hagg T. (2005): "D3 dopamine receptors do not regulate neurogenesis in the subventricular zone of adult mice." *Neurobiol Dis* 18(3): 523-7.
- Başkaya MK, Doğan A, Temiz C, Dempsey RJ. (2000): "Application of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to evaluate injury volume after controlled cortical impact brain injury: role of brain edema in evolution of injury volume." *J Neurotrauma* 17(1): 93-9.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. (1986): "Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats." *Stroke* 17(6): 1304-8.
- Benson MD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M, Parada LF. (2005): "Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(30): 10694-9.

- Bez A, Corsini E, Curti D, Biggiogera M, Colombo A, Nicosia RF, Paganò SF, Parati EA. (2003): "Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization." *Brain Res* 993(1-2): 18-29.
- Bouab M, Paliouras GN, Aumont A, Forest-Bérard K, Fernandes KJ. (2011): "Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood." *Neuroscience* 173: 135-49.
- Broderick, J. P. and W. Hacke (2002): "Treatment of acute ischemic stroke: Part I: recanalization strategies." *Circulation* 106(12): 1563-9.
- Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. (2009): "Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia." *Stroke* 40(5): e331-9.
- Cameron, H. A. and E. Gould (1994): "Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus." *Neuroscience* 61(2): 203-9.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. (1993): "Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat." *Neuroscience* 56(2): 337-44.
- Caplan, L.: *Caplan's Stroke: A Clinical Approach*, Butterworth Heine-
mann, Oxford 2000
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. (2004): "Essential cellular regulatory elements of oxidative stress in early and late phases of apoptosis in the central nervous system." *Antioxid Redox Signal* 6(2): 277-87.
- Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A. (2000): "Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone." *Nat Neurosci* 3(11): 1091-7.
- Cowan, A. I. and R. L. Martin (1992): "Ionic basis of membrane potential changes induced by anoxia in rat dorsal vagal motoneurons." *J Physiol* 455: 89-109.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME. (2000): "EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation." *Cell* 103(6): 945-56.

- Davy A, Aubin J, Soriano P. (2004): "Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development." *Genes Dev* 18(5): 572-83.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. (2003): "Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus." *J Comp Neurol* 460(4): 563-72.
- Diez-Tejedor, E. and B. Fuentes (2001): "Acute care in stroke: do stroke units make the difference?" *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1: 31-9.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. (1999): "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." *Trends Neurosci* 22(9): 391-7.
- Doepfner TR, Dietz GP, El Aanbouri M, Gerber J, Witte OW, Bähr M, Weise J. (2009): "TAT-Bcl-x(L) improves survival of neuronal precursor cells in the lesioned striatum after focal cerebral ischemia." *Neurobiol Dis* 34(1): 87-94.
- Doepfner TR, Dietz GP, Weise J, Bähr M. (2010): "Protection of hippocampal neurogenesis by TAT-Bcl-x(L) after cerebral ischemia in mice." *Exp Neurol* 223(2): 548-56.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1997): "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." *J Neurosci* 17(13): 5046-61.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.. (1999): "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." *Cell* 97(6): 703-16.
- Edvinsson, L., Krause, D.N.: *Cerebral blood flow and metabolism*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2002
- Fisher, M. (2003): "Recommendations for advancing development of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 3." *Stroke* 34(6): 1539-46.
- Flanagan, J. G. and P. Vanderhaeghen (1998): "The ephrins and Eph receptors in neural development." *Annu Rev Neurosci* 21: 309-45.
- Furne C, Ricard J, Cabrera JR, Pays L, Bethea JR, Mehlen P, Liebl DJ. (2009): "EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1793(2): 231-8.

- Gale NW, Baluk P, Pan L, Kwan M, Holash J, DeChiara TM, McDonald DM, Yancopoulos GD. (2001): "Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells." *Dev Biol* 230(2): 151-60.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. (1992): "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." *J Cell Biol* 119(3): 493-501.
- Gerber J, Raivich G, Wellmer A, Noeske C, Kunst T, Werner A, Bruck W, Nau R (2001): "A mouse model of Streptococcus pneumonia meningitis mimicking several features of human disease." *Acta Neuropathol* 101:499-508.
- Gerlai R, Thibodeaux H, Palmer JT, van Lookeren Campagne M, Van Bruggen N. (2000): "Transient focal cerebral ischemia induces sensorimotor deficits in mice." *Behav Brain Res* 108(1): 63-71.
- Goldshmit Y, Galea MP, Wise G, Bartlett PF, Turnley AM. (2004): "Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice." *J Neurosci* 24(45): 10064-73.
- González, R., Hirsch, J., Lev, M., Schaefer, P.: Acute Ischemic Stroke - Imaging and Intervention Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2006
- Gross, C. G. (2000): "Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma." *Nat Rev Neurosci* 1(1): 67-73.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Höxter G, Mahagne MH, et al. (1995): "Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS)." *JAMA* 274(13): 1017-25.
- Hacke W, Brott T, Caplan L, Meier D, Fieschi C, von Kummer R, Donnan G, Heiss WD, Wahlgren NG, Spranger M et al. (1999): "Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience." *Neurology* 53(7 Suppl 4): S3-14.
- 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* 16(4): 605-11.
- Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F. (1987): "A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene." *Science* 238(4834): 1717-20.

- Holmberg J, Armulik A, Senti KA, Edoff K, Spalding K, Momma S, Cassidy R, Flanagan JG, Frisén J. (2005): "Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis." *Genes Dev* 19(4): 462-71.
- Hossmann, K. A. (1996): "Periinfarct depolarizations." *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8(3): 195-208.
- <http://www.bpb.de/files/H8YZFH.pdf> am 03.03.2010.
- <http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash> am 05.03.2010
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. (2006): "Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia." *Surg Neurol* 66(3): 232-45.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. (2001): "Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4710-5.
- Jin R, Yang G, Li G. (2010): "Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells." *J Leukoc Biol* 87(5): 779-89.
- Katakowski M, Zhang Z, deCarvalho AC, Chopp M. (2005): "EphB2 induces proliferation and promotes a neuronal fate in adult subventricular neural precursor cells." *Neurosci Lett* 385(3): 204-9.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. (2002): "The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis." *J Neurosci Methods* 115(1): 97-105.
- Klein, R. (2009): "Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling." *Nat Neurosci* 12(1): 15-20.
- Kolominsky-Rabas, P. L. and P. U. Heuschmann (2002): "[Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke]." *Fortschr Neurol Psychiatr* 70(12): 657-62.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. (1996): "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation." *J Neurosci* 16(6): 2027-33.
- Kullander K, Croll SD, Zimmer M, Pan L, McClain J, Hughes V, Zabski S, DeChiara TM, Klein R, Yancopoulos GD, Gale NW. (2001): "Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control." *Genes Dev* 15(7): 877-88.

- Labrador JP, Brambilla R, Klein R. (1997): "The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling." *EMBO J* 16(13): 3889-97.
- Lackmann M, Oates AC, Dottori M, Smith FM, Do C, Power M, Kravets L, Boyd AW. (1998): "Distinct subdomains of the EphA3 receptor mediate ligand binding and receptor dimerization." *J Biol Chem* 273(32): 20228-37.
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. (1998): "Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils." *J Neurosci* 18(19): 7768-78.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA.. (2003): "Mechanisms, challenges and opportunities in stroke." *Nat Rev Neurosci* 4(5): 399-415.
- Love, S. (2003): "Apoptosis and brain ischaemia." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(2): 267-82.
- Martinez, A. and E. Soriano (2005): "Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system." *Brain Res Brain Res Rev* 49(2): 211-26.
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. (2004): "Pathophysiology of stroke: lessons from animal models." *Metab Brain Dis* 19(3-4): 151-67.
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA. (1993): "Correlation between perinfarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat." *Neuroreport* 4(6): 709-11.
- Morgenstern, L. B. (1997): "rtPA in acute ischemic stroke: the North American perspective." *Neurology* 49(5 Suppl 4): S63-5.
- Nabavi, D. G. and Ringelstein B. (2005): "Initialdiagnostik beim akuten ischämischen Hirninsult." *Dtsch Arztebl* 45: A3111 - A3120.
- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA. (1998): "Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia." *J Neurosci* 18(10): 3659-68.
- Nawashiro H, Martin D, Hallenbeck JM. (1997): "Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice." *J Cereb Blood Flow Metab* 17(2): 229-32.
- Palmer, A. and R. Klein (2003): "Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function." *Genes Dev* 17(12): 1429-50.

- Prass, K. and U. Dirnagl (1998): "Glutamate antagonists in therapy of stroke." *Restor Neurol Neurosci* 13(1-2): 3-10.
- Ricard J, Salinas J, Garcia L, Liebl DJ. (2006): "EphrinB3 regulates cell proliferation and survival in adult neurogenesis." *Mol Cell Neurosci* 31(4): 713-22.
- Rietze, R. L. and B. A. Reynolds (2006): "Neural stem cell isolation and characterization." *Methods Enzymol* 419: 3-23.
- Rock JP, Babu VR, Drumheller T, Chason J. (1993): "Cytogenetic findings in pituitary adenoma: results of a pilot study." *Surg Neurol* 40(3): 224-9.
- Rogalewski A, Schneider A, Ringelstein EB, Schäbitz WR. (2006): "Toward a multimodal neuroprotective treatment of stroke." *Stroke* 37(4): 1129-36.
- Scholzen, T. and J. Gerdes (2000): "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* 182(3): 311-22.
- Statistisches Bundesamt 2008:
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt,templateId=renderPrint.psml> am 04.02.2010
- Sugawara T, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. (1999): "Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia." *J Neurosci* 19(22): RC39.
- Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH. (2004): "Neuron death/survival signaling pathways in cerebral ischemia." *NeuroRx* 1(1): 17-25.
- Surawska H, Ma PC, Salgia R. (2004): "The role of ephrins and Eph receptors in cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* 15(6): 419-33.
- Takasu MA, Dalva MB, Zigmond RE, Greenberg ME. (2002): "Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors." *Science* 295(5554): 491-5.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. (1999): "Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat." *J Neurosci* 19(14): 5792-801.

- Taupin, P. (2006): "Neurogenesis in the adult central nervous system." *C R Biol* 329(7): 465-75.
- Taupin, P. (2007): "BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation." *Brain Res Rev* 53(1): 198-214.
- Taupin, P. and F. H. Gage (2002): "Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals." *J Neurosci Res* 69(6): 745-9.
- Thomassen L, Brainin M, Demarin V, Grond M, Toni D, Venables GS. (2003): "Acute stroke treatment in Europe: a questionnaire-based survey on behalf of the EFNS Task Force on acute neurological stroke care." *Eur J Neurol* 10(3): 199-204.
- Van Kampen JM, Hagg T, Robertson HA. (2004): "Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation." *Eur J Neurosci* 19(9): 2377-87.
- Völkel A., H. R. (2009): "Thrombolyse mit Alteplase 3 bis 4.5 Stunden nach akutem ischämischen Schlaganfall. Ergebnisse der European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS III)." *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 46, Number 1: 1-6.
- Wieland I, Jakubiczka S, Muschke P, Cohen M, Thiele H, Gerlach KL, Adams RH, Wieacker P. (2004): "Mutations of the ephrin-B1 gene cause craniofrontonasal syndrome." *Am J Hum Genet* 74(6): 1209-15.
- Wilkinson, D. G. (2001): "Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development." *Nat Rev Neurosci* 2(3): 155-64.
- Xing S, He Y, Ling L, Hou Q, Yu J, Zeng J, Pei Z. (2008): "Blockade of EphB2 enhances neurogenesis in the subventricular zone and improves neurological function after cerebral cortical infarction in hypertensive rats." *Brain Res* 1230: 237-46.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T. et al (2006): "Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum." *J Neurosci* 26(24): 6627-36.
- Yokoyama N, Romero MI, Cowan CA, Galvan P, Helmbacher F, Charney P, Parada LF, Henkemeyer M. (2001): "Forward signaling

mediated by ephrin-B3 prevents contralateral corticospinal axons from recrossing the spinal cord midline." *Neuron* 29(1): 85-97.

Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, Suh-Kim H. (2008): "Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model." *Exp Mol Med* 40(4): 387-97.

Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M. (2001): "Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia." *Neuroscience* 105(1): 33-41.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen 2008 und 2010 im Zentrum für neurologische Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die eine Unterstützung für mich in dieser Zeit waren.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Thorsten R. Döppner für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die Einarbeitung in die Methodik sowie die hervorragende Betreuung bei der Durchführung dieser Dissertation.

Herrn Professor M. Bähr danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung die hier vorgelegte Arbeit durchführen zu können.

Darüber hinaus gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Aycan Sentürk (Institut für Molekulare Lebenswissenschaften und Institut für Zellbiologie, Johann Wolfgang von Goethe Universität, Frankfurt a. M.) für die Bereitstellung der Ephrin-B3^{-/-}-Mäuse.

Britta Kaltwasser danke ich für ihre stetige organisatorische Hilfe, für viele konstruktive Ideen und ihre immer offene Tür in allen Belangen.

Mimount El Aanbouri danke ich für die geduldige Einarbeitung im Labor.

Ein weiteres Dankeschön geht an meine Kolleginnen Maria Doehring und Birte Könnecke für das tolle Arbeitsklima und stets konstruktive Unterstützung