

AUS DER ABTEILUNG NEURODEGENERATION UND
NEURORESTAURATIONSFORSCHUNG
(EHM. LEITER: PROF. DR. MED. J. B. SCHULZ)
IM ZENTRUM NEUROLOGISCHE MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT GÖTTINGEN

Experimentelle Untersuchungen zum
neuroprotektiven Einfluss von endogenem Faim2 im
murinen Fadenokklusionsmodell der zerebralen
Ischämie

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT ZU GÖTTINGEN

vorgelegt von

Christopher Spering

aus

Celle

Göttingen 2013

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

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. B. Schulz
II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Trendelenburg

Tag der
mündlichen Prüfung: 07. Januar 2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Verzögerter neuronaler Zelltod durch Apoptose	1
1.1.1	Die Bedeutung von Apoptose für den lebenden Organismus . .	2
1.1.2	Morphologische Veränderungen apoptotischer Zellen	3
1.1.3	Molekularer Mechanismus des FasL/CD95L-Fas/CD95-Systems	5
1.1.4	Die Bivalenz des FasL/CD95L-Fas/CD95-Systems	7
1.1.5	Apoptose im Zusammenhang mit ausgewählten neurologischen Krankheitsentitäten	9
1.2	Modulation der FasL/CD95L-Fas/CD95-Transduktion durch Faim2 .	11
1.3	Der Schlaganfall	13
1.3.1	Zerebrale Ischämie	13
1.3.2	Neuronaler Zelltod in der zerebralen Ischämie	16
1.3.3	Experimentelle Tiermodelle der zerebralen Ischämie	17
1.4	Herleitung der Fragestellung und experimentelle Strategie	18
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Apparatur	21
2.1.2	Chemikalien und Bioreagenzien	21
2.1.3	Lösungen und Puffer	21
2.1.4	Enzyme	23
2.1.5	Antikörper	24
2.1.6	Computersoftware	24
2.2	Versuchstiere	25
2.2.1	Herkunft und Haltung	25
2.2.2	Das Faim2- <i>null-mutant</i> -Konstrukt	26
2.3	Molekularbiologie	27
2.3.1	Isolation genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsie der Maus	27
2.3.2	DNA-Präzipitation	27
2.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA . . .	28

2.3.4	Agarosegelelektrophorese von PCR-Amplifikaten	29
2.3.5	RNA-Isolation und cDNA-Synthese	30
2.3.6	Quantitative <i>real time PCR</i>	31
2.3.7	Das Faim2-Lentivirus-Konstrukt	33
2.4	<i>In-vitro</i> -Methoden	34
2.4.1	<i>Oxygen-glucose Deprivation (OGD)</i>	35
2.4.2	Caspase-3- und -8- <i>Activity-Assay</i>	35
2.5	<i>In-vivo</i> -Methoden	36
2.5.1	<i>Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAo)</i>	36
2.5.2	Stereotaktische Injektionen	38
2.5.3	Zeitverlauf der Faim2- und Fas-Regulation	40
2.5.4	Caspase-3- und -8- <i>Activity-Assay</i>	41
2.5.5	BrdU-Applikation	42
2.6	Gewebeaufarbeitung der Maushirne	42
2.6.1	Einfrieren unfixierter Maushirne	42
2.6.2	Transkardiale Fixation des Gewebes	42
2.6.3	Schneiden der Maushirne	42
2.6.4	Hämatoxylin-Färbung	43
2.6.5	Messung des Infarktolumens	44
2.6.6	<i>Terminal-Desoxynucleotidyl-Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL)</i>	45
2.7	Immunhistochemie	48
2.7.1	Immunhistochemie gegen BrdU	48
2.7.2	Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen	49
2.8	Verhalten	51
2.8.1	<i>SNAP-Score</i> -Erhebung	51
2.9	Statistische Methodik	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Charakterisierung des Proteins <i>Faim2</i>	53
3.1.1	Expression von Faim2 im Organismus	53
3.1.2	Zeitliche Regulation von Faim2 und Fas/CD95 nach zerebraler Ischämie	54
3.2	Einfluss von Faim2 während milder fokaler zerebraler Ischämie	55
3.2.1	Vergrößertes Infarktolumen bei Faim2-Defizienz	57
3.2.2	Histologische Veränderungen im Infarktareal	60
3.3	Regulation der Apoptose durch Faim2	66

3.4	Einfluss der Faim2-Überexpression durch viralen Gentransfer auf neuronale Zellen	67
3.4.1	Charakterisierung des viralen Vektors zur stereotaktischen Injektion vor MCA-Okklusion	67
3.4.2	Schutz vor Apoptose durch Überexpression von Faim2	71
3.5	Klinische Bewertung der Versuchstiere nach zerebraler Ischämie	75
4	Diskussion	77
4.1	Faim2 im Überblick	77
4.2	Die Rolle von Faim2 während der zerebralen Ischämie und Regulation der Fas/CD95-induzierten Apoptose	80
4.2.1	Vergrößertes Ischämievolumen unter Faim2-Defizienz	83
4.2.2	Expression von Faim2 und Fas/CD95 im Organismus	84
4.2.3	Zeitliche Regulation von Faim2 und Fas/CD95 nach zerebraler Ischämie	85
4.2.4	Signaltransduktion und Caspase-Aktivität	86
4.2.5	Klinische Symptomatik der Versuchstiere	89
4.3	Viraler Gentransfer von Faim2 in neuronalen Zellen als Schutz vor Apoptose - ein potentiell therapeutischer Ansatz	90
5	Zusammenfassung	93
6	Abkürzungsverzeichnis	94
7	Literaturverzeichnis	101
8	Anhang	115
8.1	Publikationsverzeichnis	115
8.2	Alternative Tiermodelle der zerebralen Ischämie	115
8.3	Apparatur	116
8.3.1	Geräte	116
8.3.2	Verbrauchsmaterial	120
8.4	Chemikalien und Bioreagenzien	122
8.5	PCR-Amplifikate zur Genotypisierung von LFGElIaCre-Versuchstieren	126
8.6	Stereotaktische Injektion	127
8.7	Position und Anatomie der Hirnsektionen	128
8.8	<i>SNAP-Score</i>	129

Tabellenverzeichnis

1.1	Apoptose in ausgewählten Krankheitsentitäten	10
2.1	Auflistung der verwendeten Enzyme	23
2.2	Auflistung der verwendeten Antikörper	24
2.3	Auflistung der verwendeten Computersoftware	24
2.4	PCR-Reaktionszusammensetzung	28
2.5	PCR-Programmablauf	28
2.6	PCR-Reaktionszusammensetzung semi-nested PCR	29
2.7	<i>Quantitative real time PCR</i> : Reaktionszusammensetzung	32
2.8	<i>Quantitative real time PCR</i> : Programmablauf	32
2.9	Koordinaten für die stereotaktische Injektion	39
2.10	Koordinaten für den Vorversuch der stereotaktischen Injektion	39
3.1	Physiologische Parameter während MCAo	56
4.1	Zentrale Aussagen ausgewählter Veröffentlichungen zu Faim2 und zerebraler Ischämie	79
4.2	Überblick über die proximal inhibierend wirkenden Proteine der Apoptosetransduktion nach Einleitung durch FasL-Aktivierung	86
8.1	Tiermodelle der zerebralen Ischämie	115
8.2	Auflistung der verwendeten Geräte	116
8.3	Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials	120
8.4	Auflistung der verwendeten Chemikalien und Bioreagenzien	122
8.5	Richtlinien zur Durchführung des <i>SNAP-Scores</i>	130

Abbildungsverzeichnis

1.1	Morphologische Veränderungen einer apoptotischen Zelle	4
1.2	Die extrinsische und intrinsische Apoptose-Signaltransduktion	6
1.3	Funktion von FasL/CD95L-Fas/CD95 in multiplen Signaltransduktionswegen	8
1.4	FasL/CD95L-Fas/CD95-Signaltransduktion zur Einleitung der Apoptose und dessen inhibierende Proteine.	12
2.1	Anatomische Verhältnisse und Positionierung von Ligaturen, Inzision, Gefäßklipp und Filament an der Karotisgabel während MCAo	37
2.2	Versuchsordnung zum Zeitverlauf der Faim2- und Fas-Regulation	40
3.1	Expression von Faim2 in verschiedenen Organen und Geweben der Maus	53
3.2	Expression von Faim2-mRNA und Fas/CD95-mRNA im zeitlichen Verlauf nach MCAo	54
3.3	Makroskopische Darstellung des Infarktareals mittels HE-Färbung nach MCAo	57
3.4	Infarktverhalten von Faim2 ^{-/-} - und Faim2 ^{+/+} -Tieren nach milder fokaler zerebraler Ischämie	58
3.5	Vergleich der Infarktflächen der jeweiligen koronaren Sektionen	59
3.6	Grafik des Infarktverhaltens von Faim2 ^{-/-} - und Faim2 ^{+/+} -Tieren nach milder fokaler zerebraler Ischämie	60
3.7	Darstellung des Infarktareals anhand TUNEL-positiver Zellen eines Faim2-defizienten Tieres und eines Wildtyps im Vergleich.	61
3.8	Vergleich zwischen Faim2-defizienten Tieren und Wildtypen bzgl. der Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der infarzierten Hemisphäre und Dichte der TUNEL-positiven Zellen in der infarzierten Hemisphäre	62
3.9	Vergleich zwischen Faim2-defizienten Tieren und Wildtypen bzgl. der Dichte TUNEL-positiver Zellen im Infarktareal	62
3.10	Doppelfärbung gegen TUNEL/NeuN	63
3.11	Caspase-8 und Caspase-3 in einer Doppelfärbung gegen NeuN	64
3.12	BrdU-positive Zellen im Striatum	65
3.13	Caspase-8- und -3-Aktivität im Vergleich Faim2-Defizienz und -Wildtyp	67

3.14	Darstellung des infizierten Gewebes im Striatum am Faim2/LFG-Adenovirus-Konstrukt	68
3.15	Darstellung der mit dem Faim2-Lentiviruskonstrukt infizierten Zellen im Striatum	69
3.16	Versuchsaufbau des lentiviralen Gentransfers	71
3.17	Grafische Darstellung des Infarkt Volumens von Faim2 ^{-/-} und Faim2 ^{+/+} im Vergleich nach Gentransfer von Faim2 mittels eines Lentiviruskonstrukts	72
3.18	Grafische Darstellung des prozentualen Anteils überlebender Neurone nach OGD und der LDH-Freisetzung nach OGD im Vergleich Faim2 ^{-/-} und Faim2 ^{+/+}	73
3.19	Grafische Darstellung der LDH-Freisetzung nach OGD im Vergleich Faim2 ^{-/-} und Faim2 ^{+/+} in Abhängigkeit vom Virustiter	74
3.20	Grafische Darstellung des <i>SNAP-Scores</i> vor und nach MCAo	76
8.1	Agarosegelelektrophorese von PCR-Amplifikaten zur Genotypisierung von LFGElIaCre-Versuchstieren	126
8.2	Versuchsaufbau der stereotaktischen Injektion	127
8.3	Anatomische Verhältnisse bei stereotaktischer Injektion mittels Bohrlochtrepanation	127
8.4	Position der koronaren Hirnschnitte in einer Kontrolle (<i>sham</i>) ohne Ischämie	128

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Regulation des endogenen Zelltodmechanismus (Apoptose) nach experimenteller fokaler transients zerebraler Ischämie in der Maus. Bei den durchgeführten Untersuchungen steht das Membranprotein *Fas apoptotic inhibitory molecule 2 (Faim2)*¹ im Fokus. Faim2 nimmt eine modulierende Funktion innerhalb der endogenen Fas/CD95-Signaltransduktion ein. Die durchgeführten Experimente liefern Erkenntnisse zu folgenden Mechanismen: (1) Modulation und Inhibition der Fas/CD95-induzierten Signaltransduktion zur Einleitung der Apoptose durch Faim2, (2) quantitative und zeitliche Regulation von Faim2 und Fas/CD95 während der zerebralen Ischämie und (3) Einfluss der Abwesenheit bzw. Überexpression von Faim2 auf die Zelltodprozesse nach fokaler reversibler zerebraler Ischämie. Die Beantwortung der Frage nach dem Effekt der Hochregulation von Faim2 und dessen mögliche protektive Wirkung im Rahmen der Apoptose könnte langfristig in der präklinischen und klinischen Akutbehandlung von Patienten nach einer zerebralen Ischämie durch beispielsweise medikamentöse Hochregulation von Faim2 Anwendung finden.

1.1 Verzögerter neuronaler Zelltod durch Apoptose

Für die Entwicklung und für die Aufrechterhaltung eines Organismus ist die Balance zwischen Leben und Tod auf zellulärer Ebene entscheidend. Programmierter neuronaler Zelltod bildet zusammen mit Zellproliferation und -regeneration die Grundlage für neuroale Plastizität. Die Apoptose spielt nicht nur bei physiologischen Prozessen wie Embryonalentwicklung und Differenzierung von Zellen und Geweben eine wichtige Rolle, sondern auch in pathophysiologischen Zusammenhängen. Neben neurodegenerativen ZNS-Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer und Parkinson, reguliert sie auch bei akuten Erkrankungen wie zerebraler Ischämie, traumatischem Gewe-

¹In früheren Studien wurde Faim2 auch *Lifeguard (LFG)* (Somia et al. 1999) oder *neuronal membrane protein 35* (Beier et al. 2005) genannt. In der vorliegenden Arbeit wird primär die Bezeichnung *Faim2* verwendet, wobei die Faim2-defizienten Versuchstiere auch mit $Faim2^{-/-}$ und die Wildtypen mit $Faim2^{+/+}$ abgekürzt werden.

beuntergang, entzündlichen Prozessen und Neoplasien den Zelluntergang und die Regeneration/Zellproliferation (Martin-Villalba et al. 1999, Reich et al. 2008, Ribe et al. 2008, Beier und Schulz 2009). Eine der zur Apoptose führenden Signaltransduktionen wird durch das Fas/CD95-FasL/CD95L-System initiiert und stellte die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Apoptosemodulation durch Faim2 dar.

Der komplexe Ablauf der Apoptose verläuft in drei aufeinanderfolgende Phasen, die wiederum in mehrere Schritte untergliedert sind (Ellis und Horvitz 1986, Wyllie et al. 1992, Endres et al. 1998a):

Die Initiationsphase (*commitment phase*) ist geprägt durch Mechanismen, in denen sich die Zelle „festlegt“, das eigene Absterben zu initiieren. Auslösefaktoren sind beispielsweise Mitosezahl, Zellalter, Hormonkonzentrationen, interzelluläre Kommunikation, Fas/CD95-FasL/CD95L-vermittelter Abwehrkontakt und Noxen (Wyllie 1993, Riede et al. 2004, Reich et al. 2008).

In der Ausführungsphase (*execution phase*) läuft das eigentliche Zelltod-Programm ab. Dazu werden Zelltod-Proteasen (sog. *Caspasen*) kaskadenartig aktiviert, was wiederum zur Einleitung irreversibler Schäden und damit zur Exekution der Zelle führt.

In der Abräumphase werden nach dem Auslösen aus ihrem Zellverbund und der folgenden Kondensation die apoptotischen Zellen fragmentiert und entweder *recycled* oder als sog. *Apoptosekörperchen* phagozytiert und ohne Ausbildung einer Entzündungsreaktion beseitigt.

1.1.1 Die Bedeutung von Apoptose für den lebenden Organismus

Der von den Pathologen John F. R. Kerr, Andrew H. Wyllie und Alastair Robert Currie mit *Apoptosis* (griechisch: *ἀπόπτωση* = das Abfallen, Wegfall; aus *ἀπό* = ab, weg und *πτῶσις* = das Fallen (Duden 2006)) beschriebene Prozess des programmierten Zelluntergangs (Kerr et al. 1972) beschreibt einen Vorgang, bei dem die Zellbestandteile durch spezifische Kaskaden und Umbaumechanismen unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Umgebungszuständen in Kompartimente verpackt und nach Absterben der Zelle vom Körper wieder verwertet werden können (Wyllie et al. 1992, Wyllie 1993) (vgl. Abbildung 1.1 auf Seite 4).

Bei ihrer Entdeckung im Jahr 1972 konnte nur erahnt werden, welche Bedeutung die Apoptose für den lebenden Organismus darstellen würde. Heutzutage ist bekannt,

dass Apoptose sowohl in traumatisch geschädigtem Gewebe, in der Tumorgenese und -behandlung als auch in gesundem Gewebe zur Aufrechterhaltung der Funktion und ständigen Revitalisierung eine zentrale Rolle spielt (Wyllie 2010). Im Jahr 2002 haben Sydney Brenner, Robert Horvitz und John Sulston für eben diese Aufklärung der Zusammenhänge von zelleigenem programmiertem Zelltod den Nobelpreis für Medizin und Physiologie erhalten. Der Fokus ihrer Untersuchungen lag auf der Erforschung der Signaltransduktionswege am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, die zur Einleitung der Apoptose notwendig sind (Ellis und Horvitz 1986). Die Preisträger stellten u.a. die Apoptose in Zusammenhang mit dem Zellumsatz gesunder und erkrankter Gewebe. Apoptose ist Voraussetzung für den Zellumsatz, der gewebeabhängig unterschiedlich hoch ist. Darmepithelzellen beispielsweise haben einen Lebenszyklus von ca. 36-200 Stunden, Granulozyten von vier Tagen. Ein bekanntes Beispiel ist die Lebensdauer von ca. zehn Tagen der Thrombozyten im Rahmen der Antikoagulation, Erythrozyten hingegen überleben 120 Tage. Zu den Dauergeweben gehören Nervenzellen und Zellen des Skelettsystems. Letztere überleben ca. 15-35 Jahre und traumatische Veränderungen (z.B. Fraktur, Wunde etc.) werden mit dem Ersatz durch morphologisch und funktionell minderwertiges Gewebe beantwortet (Groth 2004).

Mehr als 500 Milliarden Zellen werden im menschlichen Körper jeden Tag neu gebildet. Würde nicht auch eine entsprechend hohe Anzahl durch die Apoptose zugrunde gehen, wäre das menschliche Knochenmark innerhalb weniger Jahre Tonnen schwer und der Darm mehrere Kilometer lang (Groth 2004). Das Leben an sich und die Entwicklung des Organismus benötigt Zellteilung, Zellproliferation und Zelltod.

Während dieses Mechanismus werden durch eine spezifische Genregulation von u.a. *c-myc*, *bcl-2*, *ras*, *p53* oder *PI3-Kinase/Akt*, die wiederum Proteine wie *Fas/CD95* und Proteine der *Fas apoptotic inhibitory molecules (Faim1-4)*-Familie etc. steuern, ein reproduzierbarer Umsatz und die Regeneration kontrolliert (Ellis und Horvitz 1986, Wyllie et al. 1992, Lesne et al. 2005, Reich et al. 2008).

1.1.2 Morphologische Veränderungen apoptotischer Zellen

Die Apoptose wird durch ein genvermitteltes Zelltodprogramm ausgelöst und sorgt dafür, dass meist nur einzelne Zellen absterben. Hierbei kommt es zum Schrumpfen der Zelle durch die sog. *Kondensation* (siehe Abbildung 1.1 auf der nächsten Seite) mit anschließender Fragmentation *ohne* inflammatorische Begleitreaktionen. Auf Grund dieser morphologisch charakteristischen Veränderungen wird die Apoptose auch als *Schrumpftod* bezeichnet (Riede et al. 2004).

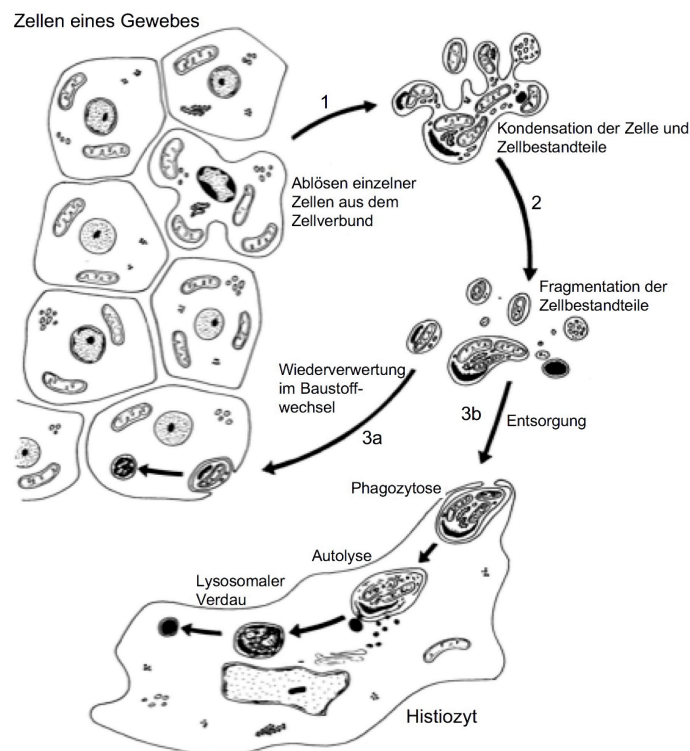


Abbildung 1.1: Flussdiagramm der morphologischen Veränderungen während der Apoptose. (1) Zunächst löst sich die apoptotische Zelle aus dem Zellverbund des Gewebes und schrumpft bis zur Kondensation. (2) Anschließend werden die Zelle selbst und die Zellbestandteile in Kompartimente verpackt, die jeweils mit Zellmembran umschlossen sind. Diese sog. Vesikel werden nun entweder zum Baustoffwechsel des menschlichen Organismus wieder verwertet (3a) oder über die Phagozytose und den lysosomalen Abbau in einem Histiocyten entsorgt (3b).

(modifiziert nach Kerr et al. 1972, Seite 242)

Demgegenüber steht der sog. *Schwelltode*, der akzidentelle Zelltod (Nekrose), bei dem es meist aufgrund einer irreversiblen Stoffwechselstörung zu einem erzwungenen Absterben von ganzen Zellgruppen bis hin zum *Massensterben* von Zellen mit konsekutiver Zellschwellung und inflammatorischer Begleitreaktion, ohne ein kontrolliertes Zelltodprogramm, kommt (Riede et al. 2004). Apoptotische Zellen befinden sich meist bereits isoliert innerhalb eines Zellverbundes und weisen histologisch kleine, ungleichmäßig sphärische bis ovale Zytoplasmafragmente auf, die zum Teil pyknotische Bestandteile der Nuclei beinhalten (Kerr et al. 1972). Nach der Kondensation und Fragmentation werden ungleich große Zellkörper gebildet, die als Vesikel mit Zellmembran umkleidet sind und je nach Differenzierung der ursprünglichen Zelle unterschiedliche Inhalte aufweisen. Diese Vesikel werden *Apoptosekörperchen* genannt. Sie beinhalten kondensierte Bestandteile des Nucleus und dessen kondensiertes, in dichte Granula verpacktes Chromatin, osmophile Kleinbestandteile des Nucleolus, Fragmente des

Zytoplasmas, Zellorganellen wie Mitochondrien etc. und diverse Bindungsproteine an der Oberfläche der sie umgebenden Zellmembran (Kerr et al. 1972).

Neuronale Zellen, die sich in Apoptose befinden, können durch Markierung von internukleosomalen Spaltprodukten der DNA-Fragmente in einer apoptotischen Zelle bei Doppelfärbungen gegen TUNEL und NeuN (siehe Abschnitt 2.7.2 auf Seite 49) oder reinen TUNEL-Färbungen mittels DAB (siehe Abschnitt 2.6.6 auf Seite 45) lichtmikroskopisch visualisiert werden.

1.1.3 Molekularer Mechanismus des FasL/CD95L-Fas/CD95-Systems

Apoptose kann als programmierter zellulärer *Selbstmord* oder als programmierter zellulärer *Brudermord* in Erscheinung treten. Bei dem erstgenannten Prozess werden zelleigene Kaskaden durch äußere (*extrinsische Apoptose-Signaltransduktion*) oder innere (*intrinsische Apoptose-Signaltransduktion*) Einflüsse aktiviert, die schließlich das Absterben der Zelle einleiten. Dies geschieht z.B. im physiologischen Alterungsprozess, nach Entzug stimulierender Hormone, der zyklischen Abstoßung des Endometriums und toxischen Schädigungen, die dem Genom zugefügt werden, wie beispielsweise UV-Exposition der Haut (Thompson 1995, Ribe et al. 2008). Der *programmierte zelluläre Brudermord* hingegen wird von anderen Zellen (z.B. Abwehrzellen) desselben Organismus oder Gewebes ausgelöst. Dies geschieht beispielsweise während der Embryogenese, zytotoxischen Abwehr von Fremdzellen oder fremdgewordenen Zellen (Tumorzellen) und der Lymphopoese sowie der Ausreifung von T-Zellen (Riede et al. 2004).

Einer der zur Apoptose führenden molekularen Signaltransduktionswege stellt das FasL/CD95L-Fas/CD95-System dar. Im Rahmen dieser Apoptoseeinleitung kommen sog. *Caspasen* (*cysteine-dependent aspartate-specific protease*) zum Tragen, die kaskadenartig aktiviert werden. Dabei unterscheidet man sog. *Initiationscaspasen* (z.B. Caspase-8, -9, -10) von *Effektorcaspasen* (z.B. Caspase-3) (Tang et al. 2000).

Wie in Abbildung 1.2 auf der nächsten Seite dargestellt, kann einerseits eine intrinsische (mitochondriale) und andererseits eine extrinsische (Todesrezeptor-vermittelte) Kaskade initiiert werden. Beide beginnen mittels proteolytischer Spaltung mit der Aktivierung inaktiver Procaspasen zu Initiationscaspasen und vereinen sich schließlich in der Aktivierung von Effektorcaspasen zur Einleitung der Apoptose (Schulz et al. 1999, Tang et al. 2000, Ribe et al. 2008).

Kroemer et al. (2007) zeigen auf, dass die mitochondriale Membranpermeabilität im

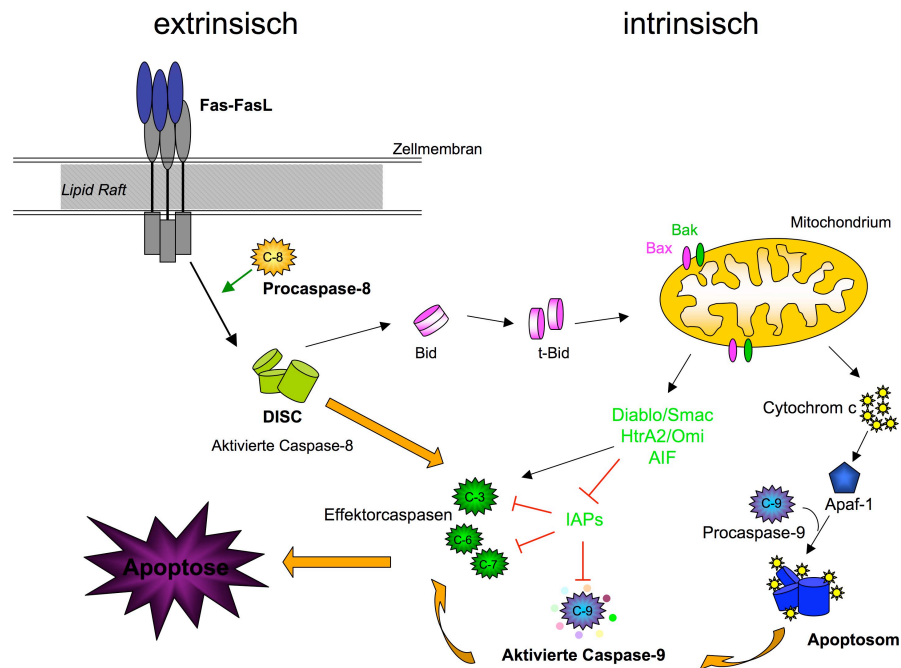


Abbildung 1.2: Die extrinsische und intrinsische Apoptose-Signaltransduktion. DISC: *death-inducing signaling complex*, Bid: *BH3 interacting domain death agonist*, t-Bid: trunkierte Form von Bid, Bak: *BCL2-antagonist/killer 1*, Bax: *BCL2-associated X protein*, Diablo: *direct IAP-binding protein with low pI* (Synonym *Smac*), Smac: *second mitochondria-derived activator of caspase*, AIF: *apoptosis-inducing factor*, HtrA2: *HtrA serine peptidase 2* (Synonym *Omi*), Apaf-1: *apoptotic protease activating factor-1*, IAPs: *inhibitor of apoptosis proteins*
(modifiziert nach Ribe et al. 2008, Seite 167)

Rahmen der intrinsischen Signaltransduktion, welche durch zytotoxische Bedingungen wie oxidativer Stress und ionisierende Strahlung ausgelöst wird, mit folgender Translokation mitochondrialer Moleküle, einen *point of no return* darstellt. Dabei rekrutieren Cytochrom c, Smac/ Diablo, HtrA2/Omi und AIF Initiations- und Effektorcaspasen (Tang et al. 2000, Galluzzi et al. 2009). Insbesondere das ins Zytosol abgegebene Cytochrom c kann über die Komplexbildung mit Apaf-1 und Procaspase-9 (Apoptosom) die Caspase-9 und damit die Effektorcaspasen aktivieren (Ribe et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit steht jedoch die extrinsische, FasL/CD95L-Fas/CD95-induzierte Signaltransduktion im Vordergrund. Diese zur Apoptose führende Kaskade wird durch die sog. *Todesrezeptoren* eingeleitet, unter denen der zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor(TNFR)-Superfamilie zählende Fas/CD95-Rezeptor ein wichtiger Vertreter ist. Nach Bindung mit dem Liganden FasL/CD95L bildet Fas/CD95 wiederum mit zwei weiteren FasL/CD95L-Fas/CD95-Verbindungen einen Komplex. Die Mobilität der nativen Rezeptoren und die Komplexbildung wird durch lipidhaltige Mikrodomänen, sog. *lipid rafts*, die sich frei in der Zellmembran bewegen können, ermöglicht

(Fernandez et al. 2007). Durch diese Komplexbildung erfolgt die Assoziation mit dem Adaptorprotein FADD (*Fas-associated death domain*), welches durch eine ins Zytoplasma ragende Todesdomäne und über an dieser befindlichen Todeffektordomänen an homologe Stellen auf der Initiationscaspase (pro-Caspase-8) bindet. Unter Aktivierung regulatorischer Proteine (FLIP, Faim1 und 3, PEA-15, Btk und FAP-1 (siehe Abbildung 1.4 auf Seite 12)) wird der Todesignalkomplex *DISC* (*death-inducing signaling complex*) mit aktiver Caspase-8 geformt, um wiederum die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) zu aktivieren (Krammer 1998, Peter und Krammer 2003, Ribe et al. 2008, Reich et al. 2011).

Wie in den Abbildungen 1.2 auf der vorherigen Seite und 1.4 auf Seite 12 dargestellt, kann durch aktivierte Caspase-8 über die Aktivierung von Bid und die trunkierte Form (t-Bid) die Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol veranlasst und damit der intrinsischen Weg im Sinne einer Verstärkung (*amplification loop*) rekrutiert werden (Tang et al. 2000, Stegh et al. 2002, Galluzzi et al. 2009). Des Weiteren wird hierdurch über die Mobilisation von Smac/Diablo die IAPs gehemmt, welche wiederum hemmend auf die Effektorcaspasen wirken (Ribe et al. 2008).

1.1.4 Die Bivalenz des FasL/CD95L-Fas/CD95-Systems

Apoptose ist in der Gewebekomöostase und -differenzierung sowie einer Vielzahl an immunsystemprägenden Prozessen und pathologischen Veränderungen beteiligt (Reich et al. 2008, Sancho-Martinez und Martin-Villalba 2009) und wird u.a. durch den *Todesrezeptor* Fas/CD95 induziert. Fas/CD95 ist das am besten charakterisierte Protein der TNFR-Superfamilie, dessen Funktion im Rahmen der Apoptose gründlich aufgearbeitet wurde (Beier und Schulz 2009). Die Apoptoseinduktion durch das FasL/CD95L-Fas/CD95-System ist lange Zeit als einzige Funktion desselbigen angenommen worden. Die ubiquitäre Expression von Fas/CD95 im Gehirn hat Anlass dazu gegeben zu hinterfragen, ob Fas/CD95 in derart hoher Dichte in gesunden neuronalen Zellen ausschließlich für die Einleitung durch beispielsweise einen Schlaganfall induzierte Apoptose vorgehalten werden muss. Die Abbildung 1.3 auf der nächsten Seite zeigt alternative Signaltransduktionen des FasL/CD95L-Fas/CD95-Systems auf, von denen nur eine zur Apoptose führt. Corsini et al. (2009) und Sancho-Martinez und Martin-Villalba (2009) zeigten auf, dass Fas/CD95 nicht nur den Zelltod einleiten kann, sondern im Gegenteil Neurogenese im gesunden und erkrankten Gehirngewebe induziert. Des Weiteren wurde für Fas/CD95 eine Aktivierung zahlreicher alternativer Signalwege, wie *mitogen-activated-protein-kinases* (MAPK)-, *Phosphatidylinositol-3-*

Kinase (PI3K/AKT)- und *extracellular-signal-regulated-kinase* (ERK)-Signalweg, beschrieben. Die Prozesse, die zur Aktivierung dieser Signalwege führen, sind noch nicht vollständig bekannt (Schulz et al. 1999, Sancho-Martinez und Martin-Villalba 2009, Corsini et al. 2009). Peter et al. (2005) beschrieben eine Tumorzellinvasion über den Fas/CD95-induzierten NF κ B- und MAP-Kinase-Signalweg, Sancho-Martinez und Martin-Villalba (2009) eine Fas/CD95-induzierte Gliomzellproliferation über PI3K/AKT. Die Fas/CD95-induzierte neuronale Ausdifferenzierung und Neuritenverzweigung (*neuronal branching*) über ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) wurden von Desbarats et al. (2003) und Zuliani et al. (2006) sowie die Zellproliferation (Peter et al. 2007) und Neurogenese in adulten Neuronen von Zhao C et al. (2008) beschrieben.

Neuronale Zellen liegen im zentralen Nervensystem (ZNS) im ausdifferenzierten Sta-

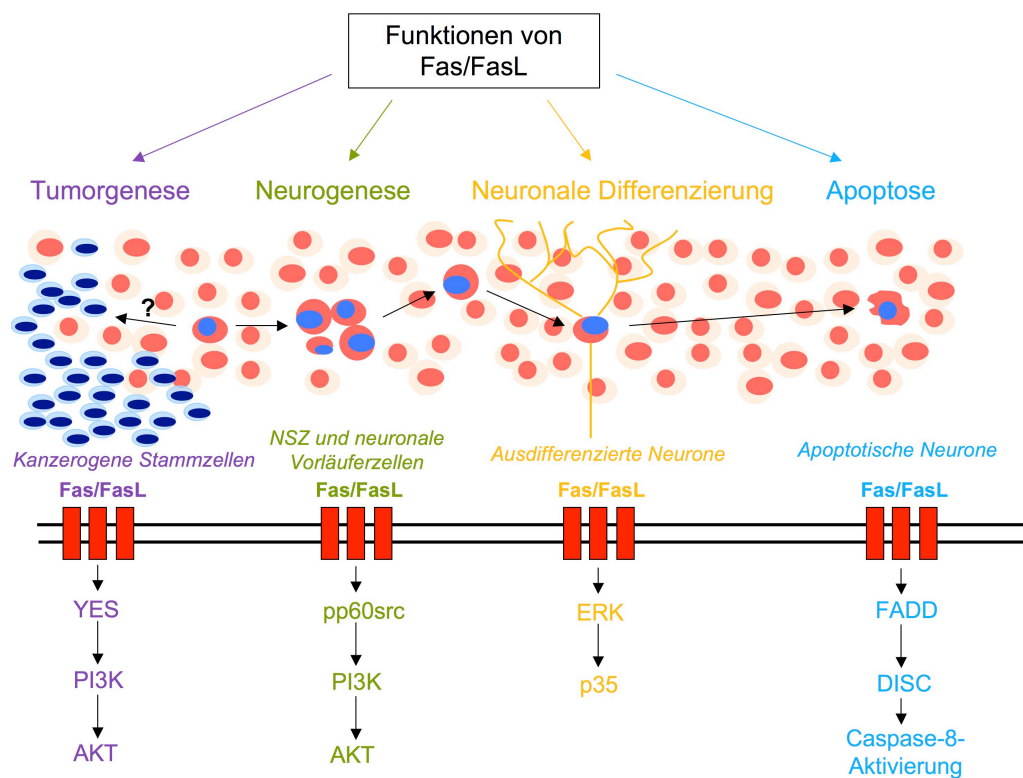


Abbildung 1.3: Funktion von FasL/CD95-Fas/CD95 in multiplen Signaltransduktionswegen. YES: *v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1*; PI3K: *Phosphatidylinositol-3-Kinase*; AKT: *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*; NSZ: *neuronale Stammzellen*; pp60src: *v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian) / phosphoryliertes 60-kDa-Phosphoprotein*; ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; p35: *cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit 1 (p35)*; FADD: *Fas-associated death domain*; DISC: *death-inducing signaling complex*

(modifiziert nach Beier und Schulz 2009, Seite 129)

dium vor. Lediglich in zwei Regionen, der subventrikulären Zone (SVZ) der Seiten-

ventrikel und der subgranulären Zone (SGZ) der Hippokampusformation des Gyrus dentatus, findet auch im adulten ZNS Neurogenese statt - sog. Stamm-Zell-Nische (Lois und Alvarez-Buylla 1994, Zhao C et al. 2008, Beier und Schulz 2009). In diesen Regionen entwickelt sich eine große Anzahl an adulten Neuronen mittels Proliferation und Differenzierung aus adulten neuronalen Stammzellen (NSZ) und migriert über den rostralen migratorischen Strom in weit entfernte Areale, wovon nur ein kleiner Teil überlebt (Zhao C et al. 2008). Einer der Auslöser für diese Proliferation und Ausdifferenzierung von NSZ mit anschließender Migration in die pathologisch veränderte Region ist die zerebrale Ischämie (Lindvall et al. 2004).

Vor dem Hintergrund, dass Fas/CD95 eine Vielzahl an biologischen Effekten beeinflusst, existieren mindestens drei Todesdomänen, die in der Lage sind Fas/CD95 mit nicht-Caspase-abhängigen Signaltransduktionen (MAPK / ERK und *nuclear factor κ B* (*NF κ B*)-Kinase) zu verbinden: (1) das *Fas-associated death domain-containing protein*, *FADD*, (2) das *death-associated protein 6*, *DAXX* und (3) das *receptor-interacting protein*, *RIP* (Lambert et al. 2003, Wajant et al. 2003). Reich et al. (2008) stellten heraus, dass nach Analyse von *knockout*-Mäusen alle drei genannten Fas-assoziierten Proteine für das Überleben von Zellen essentiell, aber entbehrlich für Apoptose seien. Tran et al. (2001) wiesen sogar nach, dass die Aktivierung von ERK das proapoptotische Signal von Fas/CD95 in ein anti-apoptotisches umlenken kann, indem die Caspase-Aktivierung gehemmt wird. Derzeit ist jedoch über die Kontrollmechanismen und die molekulare Kommunikation zwischen unterschiedlichen Fas/CD95-Signalkaskaden wenig bekannt.

1.1.5 Apoptose im Zusammenhang mit ausgewählten neurologischen Krankheitsentitäten

Neben der Beteiligung an physiologischen Prozessen im Organismus spielt die Apoptose insbesondere bei pathologischen Veränderungen eine wichtige Rolle. Neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Landau et al. 2005), Amyotrophe Lateralsklerose (Petri et al. 2006) oder Morbus Alzheimer (Su et al. 2003), Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose (Sabelko et al. 1997, Dittel et al. 1999), akute zerebrale Schädigungen wie die zerebrale Ischämie (Rosenbaum et al. 2000, Martin-Villalba et al. 2001, Reich et al. 2011) oder das Schädel-Hirn-Trauma (Beier et al. 2007) werden von durch Fas/CD95 und dessen Liganden FasL/CD95L induzierter Apoptose beeinflusst.

Grundsätzlich gelten die folgenden zwei pathophysiologischen Regulationsstörungen

der Apoptose im Zusammenhang einer Krankheitsentität:

Steigerung der zellulären Überlebensrate durch Hemmung der Apoptose

Meist geschieht dies in Tumorzellen. Die Gewebeintegrität und -funktion wird durch ein enges interzelluläres Netzwerk aufrecht erhalten, welches der Kommunikation, Stabilität und Regulation der einzelnen Zellen dient. Maligne Zellen eines Tumors zeigen neben einer beschleunigten Stammzellerneuerung und Zellteilung eine oft verminderte Apoptoserate (Mertens et al. 1997, Bucan et al. 2010). Unter physiologischen Bedingungen würden diese Zellen durch die Induktion von Apoptose beseitigt werden (Brudermord, siehe Abschnitt 1.1.3 auf Seite 5) oder die Zelle würde durch den Verlust der interzellulären Kontrolle die Apoptose selbstständig einleiten (mitochondrialer Apoptoseweg, siehe Abschnitt 1.1.3 auf Seite 5). Im Gegensatz zu gesunden Zellen, die sich nicht unbegrenzt häufig teilen können, ist die Teilungsfähigkeit von Zellen maligner Tumore somit unkontrolliert.

Steigerung der zellulären Sterberate durch Apoptosesteigerung Durch äußere Einflüsse, wie Sauerstoffmangel, mangelhafte Nährstoffzufuhr, chemische/toxische Reize oder Verlust von rezeptorvermittelten Reizen, kann in Geweben die Apoptoserate von Zellen gesteigert werden. Die Apoptose wird dabei, wie in Abschnitt 1.1.1 auf Seite 2 dargestellt, exogen oder endogen induziert und über die Caspase-Kaskade bis zum Exitus der Zelle vermittelt.

In der Tabelle 1.1 sind einige Beispiele knapp aufgeführt.

Tabelle: 1.1: Apoptose in ausgewählten Krankheitsentitäten

Krankheit	Pathophysiologie	FasL/CD95L-Fas/CD95-Hemmung	Referenzen
Morbus Parkinson	gesteigerte Apoptoserate neuromelaninhaltiger dopaminerger Nervenzellen in der Zona compacta der Substantia nigra	verminderter dopaminerger Zelluntergang in der Substantia nigra	Hayley et al. 2004, Landau et al. 2005
Morbus Alzheimer	gesteigerte Apoptoserate neuronaler Zellen im Rahmen allg. Hirnatrophie bei Beta-Amyloid-Peptid-Ablagerungen	verminderte neuronale Toxizität	Morishima et al. 2001, Su et al. 2003
Amyotrophe Lateralsklerose	gesteigerte Apoptose von Motorneuronen und Axonen	verlängertes Überleben v. Motorneuronen	Raoul et al. 2006, Petri et al. 2006
Multiple Sklerose	gesteigerte Apoptose im Rahmen entzündlich-demyelinisierender Läsionen im ZNS mit Verlust an Axonen und reaktiver Gliose	verminderter Zelluntergang und reduzierte klinische Symptomatik	Sabelko et al. 1997, Dittel et al. 1999
Zerebrale Ischämie	gesteigerte Apoptose durch Ischämie und oxidativen Stress	vermindertes Infarktverhalten	Rosenbaum et al. 2000, Martin-Villalba et al. 2001, Reich et al. 2011
Schädel-Hirn-Trauma	gesteigerte Apoptose und Nekrose durch traumatischen Zelluntergang und oxidativen Stress	vermindertes Läsionsvolumen und erhöhte Regeneration von Hirnfunktionen	Beer et al. 2000, Beier et al. 2007

1.2 Modulation der FasL/CD95L-Fas/CD95-Transduktion durch Faim2

Obwohl 1993 erste Funktionen des Fas/CD95-Signalwegs untersucht wurden, dauerte es nochmals 10 Jahre, bis ein Zusammenhang zwischen der Proliferation von T-Zellen im murinen lymphopenischen Syndrom und der Fas/CD95 Expression erkannt wurde (Hao et al. 2004). Desbarats und Newell (2000) beschrieben einen fulminanten Effekt in Hepatozyten nach der Injektion von Fas/CD95-spezifischen agonistischen Antikörpern. Es kam zu einem akuten Leberversagen bei Mäusen. Gleichzeitig beschleunigte allerdings diese Behandlung die Regeneration der Leber nach einer Leberteilresektion. Aber auch andere Gewebe, wie Herz, Pankreas und Kolon, weisen Aktivitäten von Fas/CD95 auf (Peter et al. 2007). Somia et al. (1999) wiesen für Faim2 eine Fas/CD95-inhibierende Funktion und damit einen Schutz vor Apoptose nach. Gleichzeitig gelang es ihnen, Faim2 in neuronalen Zellen, aber auch anderen Organen mittels mRNA-Expressionsanalyse nachzuweisen. Bucan et al. (2010) beschrieben den antiapoptotischen Effekt von Faim2 im Rahmen der Hemmung der Fas/CD95-Transduktion als Bestandteil der Entstehung von Mammakarzinomen. Choi et al. (2007) wiesen die zytoprotektive Wirkung von Faim2 durch den Schutz vor Apoptose an humanen Keratinozyten nach.

Zur Regulation von Ligand-Rezeptor-Systemen, wie das FasL/CD95L-Fas/CD95-System, bestehen folgende Möglichkeiten: (1) direkte Modulation der Signaltransduktion durch regulatorisch bindende Proteine, (2) Modifizierung spezifischer intrazellulärer Rezeptorsysteme, die unterschiedliche Signalwege einleiten können und (3) Regulation des allgemeinen Aktivierungsgrades der Zelle. Alle drei Wege finden sich in der Regulation des FasL/CD95L-Fas/CD95-Systems wieder (Reich et al. 2008). Die durch Fas/CD95 induzierte Apoptose und der komplexe Regulationsmechanismus modulierend einwirkender Proteine sind bereits detailliert erforscht (Peter und Krammer 2003) und in Abbildung 1.4 auf der nächsten Seite dargestellt. Die Modulation des FasL/CD95L-Fas/CD95-Systems ist ein Beispiel des negativen Feedbacks, bei dem nicht Transduktion-aktivierende Moleküle herunter, sondern hemmende hoch reguliert werden. Neben zahlreichen gut erforschten Proteinen, die in Tabelle 4.2.4 auf Seite 86 aufgelistet sind, sind die antiapoptotischen, inhibierenden Moleküle der Faim-Familie (Faim1, 2 und 3) zu einem frühen Zeitpunkt in der Fas/CD95-Signaltransduktion hemmend wirksam. Faim2 ist dabei ein vornehmlich in Neuronen exprimiertes, 35,1 kDa schweres Membranprotein, das exklusiv vor FasL/CD95L-induziertem Zelluntergang schützend wirksam ist (Somia et al. 1999, Beier et al. 2005,

Fernandez et al. 2007). Die Expression von Faim2 ist durch den Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT/Protein-Kinase B-Signalweg reguliert (Beier et al. 2005).

Die Abbildung 1.4 zeigt die Einleitung der Apoptose über die Bindung von FasL/CD95L an den Todesrezeptor Fas/CD95 auf der Zellmembran und die komplexen regulatorischen Mechanismen der weiteren Signaltransduktion. Faim2 nimmt dabei eine besondere Rolle ein, da die hemmende Wirkung bereits früh in der Initiationsphase erfolgt. Die apoptosehemmende Wirkung entfaltet Faim2 durch eine direkte Protein-Protein-Bindung an Fas/CD95 (Reich et al. 2008). Während die genaue Interaktion noch nicht bekannt ist, geben Fernandez et al. (2007) Evidenz dafür, dass die Bindung von Faim2 an Fas/CD95 innerhalb der *lipid rafts* stattfindet und somit noch vor der Interaktion von Fas/CD95 mit FADD.

Die an den *lipid rafts* mobilen Fas/CD95-Rezeptoren bilden nach Bindung des Li-

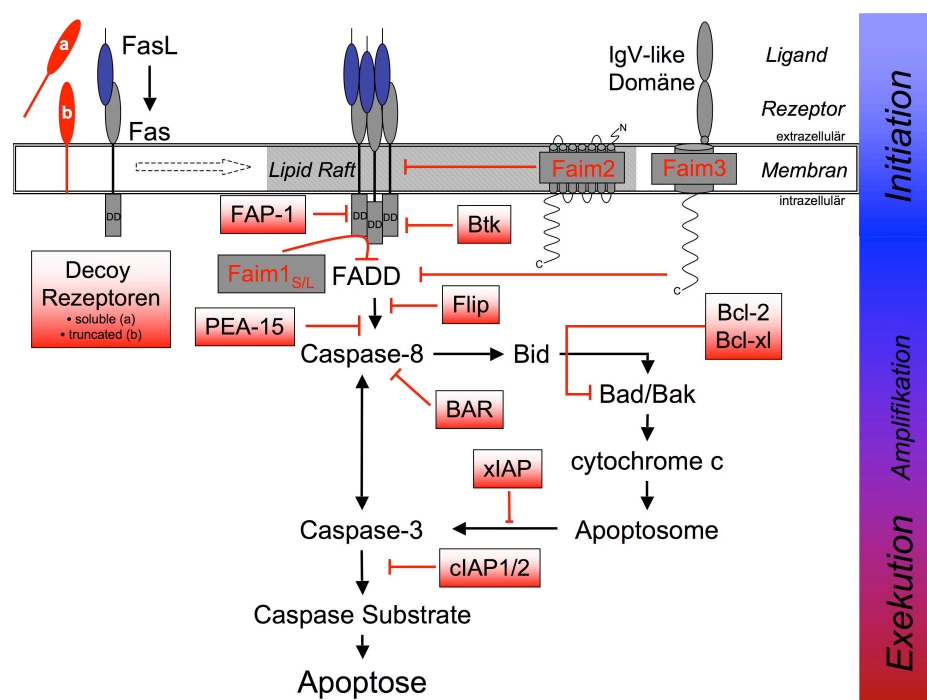


Abbildung 1.4: FasL/CD95L-Fas/CD95-Signaltransduktion zur Einleitung der Apoptose und dessen inhibierende Proteine: Bcl-2 (Bcl-XL, Bfl-1): Familie der B-Zell-Lymphom-2-Proteine; Btk: Bruton's Tyrosinkinase; c-FLIP: *cellular Fas-associated death domain-like IL-1b-converting enzyme-inhibitory protein* (Caspase-8 und FADD-like Apoptoseregulator); Faim: *Fas apoptotic inhibitory molecule* (*Faim1/2/3*); FAP-1: Fas assoziierte Phosphatase 1; IAP: (X-linked IAP; xIAP), *cellular IAP 1 und 2* (*cIAP1/2*): *Inhibitor of apoptosis protein family*; PEA-15: *Phosphoprotein enriched in Astrocytes 15 kDa*.

(modifiziert nach Reich et al. 2008, Seite 481)

ganden FasL/CD95L-Trimärkomplexe. Durch diese Komplexbildung erfolgt die Assoziation mit dem Adaptorprotein FADD, welches durch eine ins Zytoplasma ragende

Todesdomäne und über an dieser befindlichen Todeffektordomänen an homologe Stellen auf der Initiator-Caspase (Procaspase-8) bindet, diese aktiviert und damit die bis zur Exekution der Zelle führende Caspase-Kaskade startet.

Ein alternativer Weg zur Apoptose verläuft direkt intrazellulär über eine Schädigung der Mitochondrien. In diesem Fall wird aus dem mitochondrialen Intermembranraum Cytochrom c oder ein spezieller Apoptosefaktor, z.B. *Apoptosis-Inducing-Factor (AIF)*, freigesetzt. Das freigesetzte Cytochrom c bindet gemeinsam mit *Deoxyadenosin triphosphat (dATP)* an den sog. *apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1)*. Dies ruft eine Konformationsänderung von *Apaf-1* hervor, wodurch die sog. *Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD)* zugänglich wird und an die CARD-Domäne der Caspase-9 binden kann. Diese Bindung ist eine Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspase-9. Der gebildete Komplex aus Caspase-9, Apaf-1 und Cytochrom c wird als Apoptosom bezeichnet und kann wiederum die Caspase-Kaskade starten. Durch diese Amplifikationsschleife werden Apoptosezeiten signifikant verkürzt und schwache Signale verstärkt (Ashkenazi und Dixit 1999, Tang et al. 2000, Gerhardt et al. 2001, Reich et al. 2008). Beide Transduktionswege münden in der Aktivierung der Caspase-3, die letztlich irreversibel die Exekution der Zelle einleitet.

Die Aktivierung der Caspasen verläuft kaskadenartig, wobei bereits im Übergang von Initiationsphase zur Ausführungsphase eine Reihe an Proteinen hemmend auf die Aktivierung der Caspase-Kaskade wirken. Die Tabelle 4.2.4 auf Seite 86 zeigt eine Übersicht über diese hemmenden Proteine und deren Eigenschaften.

1.3 Der Schlaganfall

Als Schlaganfall wird die Minderperfusion im Versorgungsgebiet einer Gehirnarterie nach (1) zerebraler Ischämie (80% der Fälle) oder (2) hämorrhagischem Insult (20%) bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde die zerebrale Ischämie durch Okklusion der *Arteria cerebri media* als Krankheitsmodell verwendet.

1.3.1 Zerebrale Ischämie

Die zerebrale Ischämie beschreibt einen Zustand eines akuten fokalen neurologischen Defizits, bei dem es aufgrund einer umschriebenen Durchblutungsstörung des Gehirns, neben der verminderten Zufuhr von Glucose und Nährstoffen, zu einem pathologischen Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffzufuhr des Gehirnge-

webes kommt (DGN 2012). Je nach Dauer dieser Imbalance entsteht eine kurzfristige, ggf. reversible neuronale Funktionsstörung oder ein irreversibler Gewebeuntergang mit permanenter Einschränkung. Die häufigste Ursache der zerebralen Ischämie ist die Minderperfusion oder Okklusion im Versorgungsgebiet der *Arteria cerebri media* (Poeck und Hacke 2010). Das aus dem proximalen Verschluss der *A. cerebri media* resultierende, charakteristische klinische Syndrom einer akuten, hochgradigen arbeitsintensen sensomotorischen Hemisymptomatik mit Aphasie oder Neglect wird als Media-syndrom bezeichnet und ermöglicht es, in der Notfallsituation eine bereits präklinisch rasche Verdachts- und Differentialdiagnostik mit schnellstmöglicher Zuführung optimaler Therapieoptionen einzuleiten. In der weiterführenden klinischen Untersuchung demarkieren sich meist weitere Symptome wie sensible, motorische oder sensomotorische, kontralaterale Halbseitensymptome, Störungen der Blickmotorik, Störungen der Sprechmotorik, neurophysiologische Syndrome wie Aphasien oder Apraxien und Lese- oder Rechenstörungen. Die Ausprägung und Lokalisation der zerebralen Ischämie variieren stark. Häufig kann es nach einem Schlaganfall zu unspezifischen psychologischen Auffälligkeiten und ausgeprägten depressiven Verstimmungen kommen, die vermutlich durch eine postischämische Verschiebung des Neurotransmittergleichgewichts hervorgerufen werden (El Husseini et al. 2012).

Laut den aktuellen Leitlinien zur Akutbehandlung eines Schlaganfalls aus dem Jahr 2012 der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) zählt der Schlaganfall zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland und ist eine der führenden Ursachen von Morbidität und Mortalität weltweit. Das Statistische Bundesamt weist dem Schlaganfall im Bericht der deutschen Todesursachenstatistik aus dem Jahr 2006 mit 65.133 Todesfällen (7,9%) den 3. Platz und die führende Ursache dauernder Invalidität zu, im Jahr 2010 mit 23.675 Todesfällen Platz 6 (Statistisches Bundesamt 2011). Medizinökonomisch ist die Patientengruppe mit zerebraler Ischämie in den westlichen Industrieländern die teuerste Krankheitsgruppe überhaupt und erreicht bzw. übertrifft laut Rothwell et al. (2006) sogar die Häufigkeit kardiovaskulärer Erkrankungen, wie die prospektive, populationsbezogene *Oxford Vascular Study* (2002-2007) zeigte. Die Inzidenz ischämischer Schlaganfälle beträgt in Deutschland 160-240/100.000 Einwohner pro Jahr (DGN 2009). Neben der Alters- und Geschlechtsabhängigkeit nimmt die Inzidenz mit steigendem Lebensalter zu, ca. 50% aller Schlaganfallpatienten sind älter als 70 Jahre. Dabei sind Männer fast allen Alters circa doppelt so häufig betroffen wie Frauen, während in der Altersgruppe der über 85-jährigen mehr Frauen erkranken und sterben (Statistisches Bundesamt 2011). Die allgemeine Mortalität innerhalb des ersten Jahres wird auf durchschnittlich 25% berechnet, wobei die je-

weiligen Schlaganfallarten und -subtypen ausgeprägte Unterschiede in der Mortalität aufweisen.

Von den o.g. Neuerkrankungen pro Jahr versterben ca. 20% innerhalb der ersten vier Wochen. Die überlebenden 80% stellen derzeit eine Population von ca. 700.000 Menschen in Deutschland dar, von denen nur ein Drittel eine vollständige Genesung mit einem Leben ohne nennenswerte Einschränkungen führen kann. Von den verbleibenden zwei Dritteln werden nur 50% wieder in der Lage sein, ein selbstständiges Leben zu führen, dies allerdings mit stark einschränkenden Lähmungen oder Symptomen, die zu einer Arbeitslosigkeit oder Frühberentung führen. Die anderen 50% werden ab dem Zeitpunkt des Schlaganfalls dauerhaft pflegebedürftig bleiben (Poeck und Hacke 2010).

Nachdem bereits die Anerkennung als Notfall die Therapie in den vergangenen 20 Jahren signifikant verbessert hat, bildete die Einrichtung von über 200 Schlaganfallstationen, sog. *Stroke Units*, die stationäre Anbindung an die präklinischen Behandlungsstrategien. Da insbesondere in der präklinischen Notfalldiagnostik eine Differenzierung zwischen zerebraler Ischämie auf Grund eines möglicherweise thrombembolischen Geschehens und einer intrakraniellen Blutungssituation nicht möglich ist, gilt für die initiale Versorgung am Einsatzort nach wie vor der Grundsatz „*time is brain!*“ (Harraf et al. 2002).

Die Leitlinien der DGN zur Akuttherapie eines ischämischen Schlaganfalls (Rekanalisation, Lyse mittels rtPA, Prävention etc.) werden in regelmäßigen Abständen aktualisiert und orientieren sich an den Daten des SITS-MOST-Registers.

In der vorliegenden Arbeit wird eine transiente fokale zerebrale Ischämie induziert, so dass der Großteil des betroffenen Hirngewebes dem pathophysiologischen Konzept der *Penumbra* unterworfen ist. Unter *Penumbra* versteht man minderperfundiertes, aber strukturell erhaltenes Gewebe im Gegensatz zur manifesten ischämischen Nekrose mit irreversibler funktioneller und struktureller Schädigung. Die Größe der *Penumbra* - das durch eine zeitnahe rekanalisierende Therapie potentiell rettbar Gewebe - kann mittels bildgebender CT- oder MRT-Verfahren dargestellt werden. Die zentrale Kenngröße bildet bei der *Penumbra* der zerebrale Blutfluss (*cerebral blood flow, CBF*). Die Ausdehnung ist abhängig von dem Ausmaß der regionalen CBF-Minderung, dem Ort des Gefäßverschlusses und dem Status der vaskulären Kollateralen sowie der Dauer des Perfusionsdefizits. Die Perfusion des Gehirns eines erwachsenen, gesunden Menschen liegt bei ca. 50 – 80 ml/100 g/min. Erst ab einer Perfusion von 33% bis 25% des Ausgangswertes (ca. 20 ml/100 g/min) kommt es zu neurologischen Defiziten, isoelektrischen EEG-Veränderungen und zu einem anaeroben Stoffwechsel der

Neurone, welcher bei fehlendem Perfusionsanstieg oder weiterem Absinken des CBF auf 10 – 12 ml/100 g/min zur irreversiblen Schädigung und zum Verlust der Neurotransmission führen kann (Bor-Seng-Shu et al. 2012). Hierbei ist allerdings die Zeit der Perfusionsminderung entscheidend und bestimmt somit das dynamische Konzept der Penumbra. Bereits eine grenzwertig verminderte Perfusion kann die Penumbra verkleinern, wenn eine notwendige Reperfusion nicht rechtzeitig erfolgt. Dahingegen kann für kurze Zeit auch eine stärkere Perfusionsminderung toleriert werden, sofern die Reperfusion zeitnah eingeleitet wird (Gandini et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Arteria cerebri media* im Mausmodell für 30 Minuten okkludiert, woraufhin der CBF auf 20% des Ausgangswertes sank. Anschließend erfolgte die Reperfusion für 72 Stunden. Mit diesem Modell wird die maximale Ausdehnung der Penumbra erreicht und somit die höchstmögliche Anzahl potentiell apoptotischer Zellen (Endres et al. 1998a).

1.3.2 Neuronaler Zelltod in der zerebralen Ischämie

In zahlreichen experimentellen Fragestellungen ist die zerebrale Ischämie untersucht und in Zusammenhang mit neuronalem Zelltod gestellt worden. Dirnagl et al. (1999) arbeitete die Pathophysiologie des Schlaganfalls auf und stellte vier prinzipielle Schadensmechanismen der fokalen zerebralen Ischämie heraus:

1. Exzitotoxizität
2. Periinfarkt-Depolarisationen
3. Entzündung
4. Programmierter Zelltod (*Apoptose*)

Während die unter 1.-3. genannten Schadensmechanismen unmittelbar nach bzw. während der Ischämie beginnen, tritt der neuronale Zelltod als Apoptose erst verzögert ein (Du et al. 1996, Endres et al. 1998a). Wie bereits in Abschnitt 1.3.1 auf Seite 13 aufgezeigt, kommt dem verzögerten neuronalen Zelltod in dem Konzept der sog. Penumbra eine wesentliche Bedeutung zu. Die neuronalen Zellen in dieser Grenzzone gehören somit zum wiederbelebenden Gehirngewebe (Ginsberg und Pulsinelli 1994, Fisher und Garcia 1996, Reich et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit steht gerade diese Zone im Fokus, da hier noch eine Restperfusion und damit ein Restmetabolismus vorhanden ist. Daher könnte als therapeutischer Ansatz eine gezielte Hemmung der Apoptosesignaltransduktion die Einleitung der Apoptose hinauszögern, bis eine suffiziente Perfusion wieder erreicht wird.

1.3.3 Experimentelle Tiermodelle der zerebralen Ischämie

Die Pathophysiologie und Ausprägung einer zerebralen Ischämie sind dynamische, in hohem Maße zeitabhängige Prozesse mit deutlicher Variabilität zwischen einzelnen Patienten. Dennoch setzt eine wissenschaftliche Auswertung normierte Schlaganfallvolumina voraus, um reproduzierbare, vergleichbare und valide Daten erheben zu können. Die Entwicklung von Tiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie und deren Anwendung wurde u.a. in Primaten (Hudgins und Garcia 1970, Garcia und Kamijyo 1974), Hunden (Molinari 1970), Ratten (Brint et al. 1988) und Mäusen (Huang et al. 1994, Endres et al. 1998a) etabliert. Um den Einfluss von Faim2 auf das Fas/CD95-Signaltransduktionssystem während und nach einer fokalen zerebralen Ischämie untersuchen zu können und um therapeutische Optionen zu testen, wurden für die vorliegende Arbeit Vorversuche zu Zeitpunkt, Länge und Intensität der arteriellen Okklusion im Fadenokklusionsmodell getestet. Die *in-vivo*-Modelle der zerebralen Ischämie basieren auf dem operativen Verschluss von extra- und intrakraniellen Arterien, die *in-vitro*-Versuche auf kontrolliertem Sauerstoff- und Glukose-Entzug primärer, neuronaler Zellkulturen.

Da die *Arteria cerebri media* (ACM) eine große Bedeutung bei der zerebralen Ischämie von Säugetieren hat, steht die Okklusion dieses Gefäßes im Vordergrund vieler Untersuchungen (Garcia 1984). Das am häufigsten eingesetzte und gut reproduzierbare Modell der fokalen transienten zerebralen Ischämie ist das Filamentmodell in der Maus oder Ratte. Hierbei wird durch ein silikonbeschichtetes Filament, das in die *Arteria carotis interna* eingeführt und bis zur Bifurkation der *A. cerebri media* vorgeschoben wird, eine Okklusion derselben verursacht. Die Methode der sog. *Middle Cerebral Artery occlusion*, *MCAo*, wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt und ist in Abschnitt 2.5.1 auf Seite 36 und Abbildung 2.1 auf Seite 37 dargestellt.

Die Okklusion der ACM kann auf verschiedene Arten erfolgen. In der Tabelle 8.2 im Abschnitt 8.2 auf Seite 115 sind alternative Verfahren aufgezeigt, die jedoch bzgl. Spezifität und Reproduzierbarkeit dem Filamentmodell der transienten *MCAo* unterlegen sind.

Neben den zahlreichen *in-vivo*-Modellen wurde Ende der 80er Jahre von Choi ein *in-vitro*-Modell des Schlaganfalls entwickelt; das Verfahren des kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Entzuges, der sog. *oxygen glucose deprivation (OGD)* in der kortikalen neuronalen Zellkultur (Goldberg und Choi 1990, Choi et al. 2007). Dabei werden neuronale Zellen in Zellkultur transient in desoxygeniertem, glukosefreiem Medium inkubiert.

1.4 Herleitung der Fragestellung und experimentelle Strategie

Apoptose stellt neben Exitotoxizität, Periinfarkt-Depolarisation und Inflammation (Dirnagl et al. 1999) einen wesentlichen Schadensmechanismus beim durch Ischämie induzierten neuronalen Zelluntergang dar. Sie kann durch zwei Signalwege induziert werden (Schulz et al. 1999): (1) den externen, durch Aktivierung von Todesrezeptoren induzierten direkten Weg, oder (2) den mitochondrialen, indirekten Weg. Im ersten Fall führt die Induktion der Todesrezeptoren zur direkten Aktivierung der Initiator-Caspase, die im Weiteren die Aktivierung von Exekutiv-Caspasen einleitet. Bei der Aktivierung des indirekten, mitochondrialen Signalweges kommt es über zelluläre Signalwege zur Freisetzung proapoptotischer Substanzen aus den Mitochondrien, die dann über das Apoptosom weitere Initiator-Caspasen aktivieren oder antiapoptotische Moleküle inhibieren (siehe Abschnitt 1.1.3 auf Seite 5 und Abbildung 1.4 auf Seite 12). Während in Tumorzellen und Lymphozyten insbesondere der exogene, todesrezeptorinitiierte Weg von Bedeutung ist, sprechen die meisten Hinweise für eine Dominanz des endogenen, mitochondrialen Apoptoseweges bei der Apoptose in postmitotischen Zellen (z.B. Neurone). Da jedoch auch Neurone Todesrezeptoren, insbesondere Fas/CD95, auf ihrer Oberfläche exprimieren (Gerhardt et al. 2001, Beier et al. 2005) und Mäuse mit defizientem Fas/CD95-Rezeptor (lpr Mäuse) oder Fas/CD95-Ligand (gld Mäuse) in verschiedenen Tiermodellen des akuten neuronalen Untergangs geschützt sind, z.B. nach Ischämie oder spinalem Trauma (Martin-Villalba et al. 1999, Martin-Villalba et al. 2001, Demjen et al. 2004), stellt sich die Frage, ob unter besonderen pathologischen Bedingungen nicht doch der exogene Fas/CD95-Signalweg aktiviert wird und zum neuronalen Zelluntergang beiträgt. In einer humanen Lungenfibroblasten-Zelllinie (MRC5) wurde *Fas apoptotic inhibitory molecule 2 (FAIM2)/lifeguard (LFG)* als differentiell reguliertes Molekül identifiziert, das für die Fas/CD95-Resistenz einer Subpopulation von Zellen verantwortlich ist (Somia et al. 1999). Die Autoren zeigten ferner, dass Faim2 direkt mit dem Fas/CD95-Rezeptor interagiert und nicht an Fas-Adaptor Proteine bindet. Faim2 wird besonders im ZNS (Somia et al. 1999) und dort nur in Neuronen (Beier et al. 2005) exprimiert und die Expression wird während der Entwicklung hochreguliert. Da Faim2 bereits in der Zellmembran hemmend auf den Fas/CD95-Rezeptor wirkt, spielt es innerhalb der durch Fas/CD95-Liganden zur Apoptose führenden Signaltransduktion zu einem frühen Zeitpunkt eine wichtige Rolle.

Entwicklungsbiologisch wird die Expression von Faim2 mit der Alterung der Zellen

zunehmend hochreguliert (Reich et al. 2008). Neurone sind auf diese Weise geschützt vor einer durch exogene Liganden, die z.B. von Entzündungszellen freigesetzt werden, induzierten Apoptose. Beier et al. (2005) stellten ferner heraus, dass die Expression von Faim2 durch den Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase/AKT-Signalweg reguliert ist. Unter pathologischen Bedingungen, z.B. nach dem ischämischen Schlaganfall, wird dieser Signalweg herunterreguliert, so dass dann möglicherweise eine Fas/CD95-induzierte Apoptose der Neurone eingeleitet wird. Beier et al. (2005) konnten zeigen, dass die Expression von Faim2 der wesentliche Faktor für die Resistenz von Neuronen gegenüber Fas/CD95-Ligand war. Die Verminderung der Expression mit Hilfe von *antisense*- oder *RNAi*-Techniken führte zur Sensibilisierung postmitotischer Neurone gegenüber einem Fas/CD95-Ligand-Stimulus in Zellkultur.

Um die Rolle von Faim2 in krankheitsrelevanten Tiermodellen untersuchen zu können, wurde eine Faim2-defiziente Maus generiert (siehe Abschnitt 2.2.2 auf Seite 26). Diese Tiere sind lebensfähig und unterscheiden sich weder in ihrer Entwicklung noch in ihrem Verhalten oder neurologischen Status von den Wildtypkontrollen. In Kooperation mit der Experimentellen Neurologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, wurden an diesen Mäusen durch Verschluss der mittleren Zerebralarterie ischämische Schlaganfälle induziert und die Gehirne biochemisch, morphologisch und immunhistochemisch analysiert.

Während Exzitotoxizität nach einem ischämischen Schlaganfall dem akuten, nekrotisierenden Zelltod unterliegt, sind Apoptose und Inflammation Mechanismen, die sekundär insbesondere in der Penumbra einer ischämischen Läsion auftreten, auch nach Reoxygenierung (Endres et al. 1998a). In Tierexperimenten lässt sich durch die Wahl des ischämischen Paradigmas der Zelltodmechanismus beeinflussen. Während eine permanente Okklusion der mittleren Zerebralarterie mehrheitlich zu einem exzitotoxischen Zelltod führt, induziert eine 30-minütige Okklusion mit anschließender Reperfusion überwiegend einen apoptotischen Zelltod, sowohl in den Basalganglien als auch in kortikalen Arealen (Endres et al. 1998a). Dieses Modell schien besonders geeignet für die Untersuchung der hier aufgeworfenen Fragestellung und Hypothese. Die Induktion der Ischämie wird dabei mit dem Laser-Doppler kontrolliert. Vor und einen Tag nach Ischämie wurden Verhaltensexperimente durchgeführt. Nach Tötung der Tiere, wurden die Gehirne entnommen und anschließend histologisch und biochemisch untersucht. Es wurden Wildtypkontrolltiere mit der gleichen Anzahl von Rückkreuzungen auf den C57BL/6-Hintergrund mit den Faim2-defizienten Mäusen verglichen. Um einen möglichen Schutz vor Apoptose zu erreichen, wurde zur Hochregulation von Faim2 sowohl in den defizienten Tieren als auch in den Wildtypen, vor

MCAo ein rekombinantes Faim2-lentivirales Konstrukt als viraler Vektor stereotaktisch in das Striatum und den Kortex injiziert. Es folgte die vergleichende Auswertung zwischen Faim2-defizienten Mäusen und Wildtypen. Die Versuche wurden primär *in vivo* durchgeführt. Zur Bestätigung der Ergebnisse auf zellulärer Ebene wurden in Zusammenarbeit mit der Experimentellen Neurologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Faim2-defiziente neuronale Zellen mit Wildtyp Zellen *in vitro* unter sog. *Oxygen Glucose Deprivation (OGD)* in Apoptoserate, Caspaseaktivität und Überleben verglichen.

Mit dieser experimentellen Strategie sollte beantwortet werden, (1) ob Faim2-Defizienz zu einer Zunahme des Schlaganfallvolumens führt, (2) welcher Zelltodmechanismus hinter einer Zunahme des Ischämievolumens steht, (3) welche Zellen primär von der zerebralen Ischämie und der folgenden Apoptose betroffen sind, (4) welche Rolle die Caspasen in der Transduktion und Aktivierung bzw. Hemmung der Apoptose spielen, (5) ob durch Hochregulation von Faim2 ein Schutz vor Apoptose erreicht werden kann und (6) inwiefern zelluläre Beobachtungen im Vergleich von Faim2-defizienten Tieren und Wildtypen vor, während und nach der Ischämie mit neurologischen Symptomen, Verhalten und Überleben übereinstimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die im Folgenden gelisteten Unternehmen und Lieferanten befinden sich in Deutschland, soweit das Herkunftsland nicht anders angegeben ist.

2.1.1 Apparatur

Geräte

Die Auflistung der verwendeten Geräte ist im Anhang in Abschnitt 8.3.1 auf Seite 116 zu finden.

Verbrauchsmaterial

Die Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien ist im Anhang in Abschnitt 8.3.2 auf Seite 120 zu finden.

2.1.2 Chemikalien und Bioreagenzien

Die Auflistung der verwendeten Chemikalien und Bioreagenzien ist im Anhang in Abschnitt 8.4 auf Seite 122 zu finden.

2.1.3 Lösungen und Puffer

Citratpuffer (0,01 M, *pH* 6,0)

Stammlösung A (0,1 M): 21,01 g Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) in 1000 ml Aqua dest. lösen. Lagerung bei 4°C.

Stammlösung B (0,1 M): 29,41 g Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$) in 1000 ml Aqua dest. lösen. Lagerung bei 4°C.

Gebrauchsverdünnung: 18 ml Stammlösung A und 82 ml Stammlösung B zu 900 ml Aqua dest. hinzugeben; *pH* 6,0 einstellen.

Lysispuffer (für DNA-Isolation; 500 ml)

Tris (2 M, pH 8,5)	25 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	5 ml
NaCl (5 M-Lösung)	20 ml
Natriumdodecylsulfat (10%)	10 ml
Aqua dest.	440 ml

NBT/BCIP Substratpuffer

Tris	12,11 g
NaCl	5,84 g
MgCl ₂	10,17 g

Auf 900 ml mit Aqua dest. auffüllen; pH 9,5 mit 6 N HCl einstellen; auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Paraformaldehyd (PFA, 4%)

80 g Paraformaldehyd zu 1800 ml PBS (1x) geben; 4 ml 4 N NaOH hinzugeben und auf 40°C erwärmen, bis die Lösung klar wird; Lösung abkühlen lassen und pH 7,4 mit 6 N HCl einstellen; Filtrierung und Lagerung bei -20°C.

PBS (10x Stammlösung, 2000 ml)

NaCl	160 g
KCl	4 g
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	54 g
KH ₂ PO ₄	4,8 g

Auf 1900 ml mit Aqua dest. auffüllen; pH 7,4 einstellen; auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen; zur Herstellung der Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und pH neu einstellen (PBS 1x).

RNA-Puffer (Angabe pro Gewebeprobe)**TAE-Puffer (50x, 1000 ml)**

Auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen; zur Herstellung der Gebrauchslösung 1:50 mit Aqua dest. verdünnen.

RLT-Puffer	600 μ l
β -Mercaptoethanol	6 μ l
Tris	242 g
Essigsäure (100%)	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml

TBS (10x Stammlösung, 2000 ml)

NaCl	170 g
Tris	121 g

Auf 1900 ml mit Aqua dest. auffüllen; pH 7,5 mit 6 N HCl einstellen; auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen; zur Herstellung der Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und ggf. pH neu einstellen (TBS 1x).

2.1.4 Enzyme

Tabelle 2.1: Enzyme

ABsolute TM	QPCR-SYBR [®] -Green-	Abgene, Epsom, UK
Rox-Mix		
Complete TM	Proteaseinhibitoren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PfuTurbo TM	DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Proteinase K		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Taq-Polymerase		Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.2: Antikörper

Anti-Bromdesoxyuridin (BrdU; BU1/75[ICR1]), monoklonaler Antikörper (Ratte)	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-Caspase-3 (aktiv/gespalten), polyklonaler Antikörper (Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Caspase-8 (aktiv/gespalten), polyklonaler Antikörper (Kaninchen)	Imgenex, San Diego, Kalifornien, USA
Anti-Faim2/LFG, polyklonaler Antikörper (Ratte)	LifeSpan BioScience Inc., Seattle, Washington, USA
Anti-Kaninchen IgG (H+L), Alexa Fluor® 488, Sekundärantikörper (Ziege)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-Maus IgG (H+L), Alexa Fluor® 555, Sekundärantikörper (Ziege)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-Neuronal-Nuclei (NeuN), monoklonaler Antikörper (Maus)	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Anti-Ratte IgG (H+L), biotinyliert, Sekundärantikörper (Kaninchen)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

2.1.6 Computersoftware

Tabelle 2.3: Computersoftware

Bio-Capt (Version 12.5)	Vilber Lourmat, Tory, Frankreich
BibDesk (Version 1.5.9)	LaTeX Cambridge, Massachusetts, USA
GraphPad Prism (Version 5.00)	Thomson Reuters, New York City, New York, USA
LaTeX (TeXShop, Version 2.26)	LaTeX Eugene, Oregon, USA
Leica Application Suite (Version 2.8.1)	Leica Microsystems, Wetzlar
Microsoft Office 2004 for MacWord (Version 11.6.3), Excel (Version 11.6.5), PowerPoint (Version 11.6.4)	Microsoft, Redmond, Washington, USA

MxPro - Mx3000P (Version 3.00)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
NanoDrop ND-1000 (Version 3.5.2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Photoshop CS (Version 8.0.1)	Adobe Systems, San Jose, Kalifornien, USA
Sigma Scan Pro (Version 5.0.0)	Jandel Scientific, San Rafael, Kalifornien, USA
Stereo Investigator (Version 7.00)	MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Herkunft und Haltung

Es wurden homozygote Faim2-Wildtyp- und Nullmutanten-Mäuse (Wurfgeschwister) für die Versuche verwendet, die mithilfe eines Cre/LoxP-vermittelten Rekombinationssystems in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen generiert worden waren (vgl. Reich et al. 2011). Vor der Verwendung in Versuchsanordnungen waren die Tiere über mehrere Generationen auf die Linie C57Bl/6 zurückgekreuzt. In den Versuchsanordnungen der MCAo und der stereotaktischen Injektion wurden ausschließlich männliche Tiere möglichst ähnlichen Alters eingesetzt. Unmittelbar vor der Verwendung in den Versuchen erfolgte die Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) aus Schwanzspitzenbiopsaten gewonnener genomischer DNA.

Die Tiere wurden unter artgerechten, standardisierten Bedingungen mit kontrollierter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit in den Tierställen der Abteilung für Neurodegeneration und Neurorestaurationsforschung (Waldweg 33, 37073 Göttingen) sowie der Klinik für Neurologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin (Campus Mitte, Charitéplatz 1, 10117 Berlin) gehalten.

Die Haltung in den Tierställen erfolgte unter Bereitstellung von Futter (pelletierte Standarddiät) mit Leitungswasser *ad libitum* in einem inversen Tag-Nacht-Rhythmus mit Raumbeleuchtung von 21:30 Uhr bis 9:30 Uhr. Die Identifikation im Tierstall in Göttingen erfolgte über Ohrlochmarkierungen, in Berlin über Schwanzmarkierungen. An der Stirnseite des Tierkäfigs (365x207x140 mm [LxBxH]) waren die Identifikationskarten mit Zuchtlinie, Genotyp, Tiernummern, Geschlecht, Geburtsdatum, Tiernum-

mern der Elterntiere und Angaben über Nutzer und das genehmigte Tierversuchsvorhaben angebracht.

2.2.2 Das Faim2-*null-mutant*-Konstrukt

Die Generierung des Faim2-*null-mutant*-Konstrukts erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut in Göttingen und war nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Von dem Gesamtgenom, das für das Protein Faim2 kodiert, wurden *drei* Exons als Mutationsziele identifiziert. Die Exons 3-5 (72 aa – 146 aa) bilden nicht nur ein sog. *Cluster*, sondern kodieren die ersten eineinhalb von insgesamt sieben Transmembrandomänen des Faim2 (Reimers et al. 2006). Um die o.g. Region auf dem Genom für die sog. *Cre-Rekombinase* weiterhin zu sensibilisieren, die eine Deletion der gewünschten Allele verursacht, wurde mithilfe des Vektors *pConKO-True* ein Zielallel produziert und die *Standard-Blastozysten-Injektions-Methode* für das Einbringen in das Genom verwendet (Reich et al. 2011). Die über *semi-nested PCR*, *PCR* und *Southern Blotting* identifizierten Genotypen wurden im Falle einer erfolgreichen Deletion der Zielallele als *EIIa cre mouse* bezeichnet und mit heterozygoten Nachkommen gekreuzt. Durch dieses Vorgehen konnte eine vollständige Deletion der *loxP*-flankierten Gensequenz und eine stabile Mutation der Folgegeneration erreicht werden (Lakso et al. 1996). Anschließend wurde auf RNA-, cDNA-, DNA- und Protein-Ebene die erfolgreiche Deletion des Faim2 nachgewiesen und in Reich et al. (2011) in *Figure 1C-F* publiziert. Die phänotypische Entwicklung der Faim2-*null*-Mutanten zeigte im Vergleich zu den Wildtypen und Heterozygoten keine Auffälligkeiten. Sowohl die neurologische Entwicklung als auch Gewichtsverlauf und Lebenserwartung zeigten keine signifikanten Unterschiede. Sowohl in umfangreichen Verhaltenstests (*open field*, *accelerod*, *tight rope test* und *SNAP-Score* (siehe Abschnitt 3.5 auf Seite 75)) als auch makroskopisch und histologisch (NeuN und GFAP (siehe Abschnitte 3.2.2 auf Seite 60 und 3.4.1 auf Seite 67), Gallyas, Mac-3, APP) haben entsprechende Analysen keine signifikante Unterschiede ergeben, wie in Reich et al. (2011) in *FigureS1* aufgezeigt wurde. Die Genotypen der Mäuse wurden vor den Versuchen jeweils mittels PCR und *semi-nested PCR* getestet und bestätigt. Während der Versuche wurden nicht nur die physiologischen Parameter überwacht (siehe Abschnitt 3.2 auf Seite 55 und Tabelle 3.1 auf Seite 56), sondern es wurde auch das Verhalten vor und nach der zerebralen Ischämie getestet.

2.3 Molekularbiologie

2.3.1 Isolation genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsie der Maus

TENS Puffer für die Isolation von genomischer DNA: 100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2% SDS, pH 8,5

Die 0,2 – 0,5 cm langen Schwanzspitzenbiopsien wurden in 1,5 ml Reaktionsröhrchen gegeben und in 0,75 ml TENS Puffer, der 0,5 mg/ml Proteinase K enthielt, im Thermomixer bei 650 rpm, bei 56°C, inkubiert. 250 µl von 4 M NaCl wurde hinzugefügt und die Proben nach dem gründlichen Mischen bei 13.000 rpm für 10 min unter RT zentrifugiert. 0,75 ml des Überstandes wurde vorsichtig in ein Reaktionsröhrchen übertragen, das 0,5 ml Isopropanol enthielt. Anschließend wurden die Proben nach gründlichem Mischen (4-6 Mal umwenden) erneut 10 min bei 13.000 rpm unter RT zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgegossen und verworfen. Im Folgenden wurden nun die *DNA pellets* mit 800 µl 70% EtOH gewaschen und bei 13.000 rpm für 10 min unter RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die *pellets* für 15 – 20 min bei 42°C getrocknet. Anschließend wurden sie in 50 µl TE Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,8) resuspendiert.

2.3.2 DNA-Präzipitation

Sofern eine erhöhte Reinheit und/oder eine erhöhte DNA-Konzentration in der Lösung gefordert war, wurde ein Präzipitationsschritt im Anschluss an die DNA-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein gleiches Volumen PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1) zur DNA-Lösung hinzugefügt. Die Proben wurden kräftig für 10 s gemischt und bei 13.000 rpm für 10 min unter RT zentrifugiert. Die obere Wasserphase wurde behutsam in ein neues Reaktionsröhrchen überführt, ohne dabei die Interphase zu berühren, und mit 100% Isopropanol oder EtOH (70% oder 200% jeweils des Originalvolumens) und 3 M Na-Azetat (10% des Originalvolumens) vermischt. Hieran schloss sich eine 20-minütige Zentrifugation unter 4°C an, nach welcher der entstandene Überstand verworfen wurde. Die *DNA-pellets* wurden nun mit 70% EtOH gespült und erneut zentrifugiert. Das EtOH wurde vorsichtig entfernt die Präzipitate an Raumluft unter RT für 5 – 10 min getrocknet. Abschließend wurden die DNA-Pellets in dem geforderten Volumen entweder in ddH₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA

Das Verfahren der PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ermöglicht es, kleinste Mengen an DNA *in vitro* zu amplifizieren (Saiki et al. 1985), und wurde in der vorliegenden Arbeit primär zur Genotypisierung der Versuchstiere der Zuchtreihe *LFGEIIaCre* und Amplifikation von komplementärer DNA (cDNA) verwendet. Vor Beginn der Amplifikation von gezielten DNA-Abschnitten wurden optimale PCR-Bedingungen durch das Einstellen der MgCl₂-Konzentration, die Menge an DNA-Vorlage, die *Annealing*-Temperatur (50-60°C) und der Einsatz von Zusätzen wie Glycerol geschaffen. Beispielfhaft ist ein eingesetzter Standard-PCR Master Mix in der folgenden Tabelle 2.4 aufgezeigt.

Tabelle 2.4: Standard PCR-Reaktionszusammensetzung

Reagenz	Finale Kon- zentration	Totales Volumen (μ l)
DNA-Templat (cDNA oder genomische DNA)		variabel (100 – 200 ng)
10x PCR Puffer	1x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	1,5
dNTP mix, 10 mM jeweils	0,4 mM	1,0
<i>forward</i> Primer (100 μ M)	0,2 mM	1,0
<i>reverse</i> Primer (100 μ M)	0,2 mM	1,0
BioTherme Polymerase (5 U/ μ l)		0,25 - 0,5
ddH ₂ O		auf 25,0 auffüllen

Die Amplifikation wurde im Mastercycler Gradient oder im DNA engine PTC-200 Thermocycler durchgeführt. Die folgende Tabelle 2.5 zeigt die Programmabläufe im Thermocycler.

Tabelle 2.5: PCR-Programmablauf im Thermocycler

Stufe	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Bemerkung
1	95	120	
2	95	30	
3	52	30	
4	72	30	zurück zu Stufe 2; 35x wiederholen
5	72	300	
6	20	<i>hold</i>	

Wurde diese Amplifikation für die Genotypisierung mit den Primern Fw: 5'-TGAAA ACCACACTGCTCGAA-3'; Rv: 5'-GGGGTCAAGGTACCAGCTCT-3' eingesetzt,

konnte damit nur die PCR-gesteuerte Identifikation von Faim2-Defizienz erreicht werden. Im Falle der Identifikation von Faim2-Wildtypen wurde die PCR als semi-nested PCR durchgeführt. Hierbei wurden folgende Primer benutzt: Fw 5'-GAGCCTCTACCCACCTACC-C-3'; Rw1 5'-CTCCCAGGGACTCATTTGAA-3'; Rw2 5'-CTGGGTGAGACCTCAGAAGC-3'. Das Programm des Thermocyclers unterschied sich in diesem Fall lediglich in Stufe 4 (siehe Tabelle 2.5 auf der vorherigen Seite), die, anstatt für 30 Sekunden, 60 Sekunden lang dauerte. Eine Darstellung der Reaktionskomponenten befindet sich in der unten stehenden Tabelle 2.6.

Tabelle 2.6: PCR-Reaktionszusammensetzung für semi-nested PCR

Reagenz	Finale Konzentration	Totales Volumen (μl)	
		1. Durchlauf	2. Durchlauf
DNA-Templat (cDNA o. genom. DNA)		variabel (100 – 200 ng)	1,0 (von 1. Durchlauf)
10x PCR Puffer	1x	2,5	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	1,5	1,5
dNTP mix, 10 mM jeweils	0,4 mM	1,0	1,0
Primer 1 (100 μM)	5 μM	1,0	1,0
Primer 2 (100 μM)	5 μM	1,0	-
Primer 3 (100 μM)	5 μM	-	1,0
BioTherme Polymerase (5U/ μl)		0,25 - 0,5	0,25 - 0,5
ddH ₂ O		auf 25,0 auffüllen	auf 25,0 auffüllen

2.3.4 Agarosegelelektrophorese von PCR-Amplifikaten

Die jeweiligen Amplifikationsprodukte wurden in 1%igem Agarose Gel mittels DNA-Elektrophorese analysiert. Hierbei können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Um diese Fragmente später im UV-Licht sichtbar machen zu können, wurde der rote Phenanthridin-Farbstoff, das Ethidiumbromid, verwendet, welches in die Nukleinsäuren der DNA interkaliert und das Absorptionsspektrum verändert. Es wurden für die Darstellung der *LFGEIIaCre-Amplifikate* 1,5- bis 2-prozentige Agarosegele (in 1xTAE-Puffer) verwendet. Nach Aufkochen der Gele in einer Mikrowelle wurden 12 μl Ethidiumbromid zu 50 ml Agarose hinzugegeben und diese anschließend auf Gelträgern in Gießschienen mit Gelkämme zur Formung von Taschen gegossen. Die einzelnen DNA-Proben wurden

mit 6x Loading Dye (Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada) gemischt (5 μ l Loading Dye zu 25 μ l DNA-Amplifikat). Nach Erstarren des Gels und Übertragung in das Elektrophoresesystem wurde dieses mit 1xTAE-Puffer bedeckt und die einzelnen Geltaschen wurden mit jeweils 10 μ l der DNA/*Loading-Dye*-Mischung und zusätzlich eine Geltasche mit 5 μ l eines 50- bis 200-bp-Markers gefüllt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch Anlegen einer Spannung von 110 V für 20 min aufgetrennt, mit einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und fotografiert. Die Abbildung 8.1 auf Seite 126 in Abschnitt 8.5 auf Seite 126 zeigt eine derartige Darstellung zur Identifizierung von Faim2-null-Mutanten (KO-Allel) bzw. Faim2-Wildtypen (WT-Allel). Das ca. 200bp große DNA-Fragment wird als breite schwarze Bande dargestellt. Dabei weist eine einzelne Bande jeweils entweder auf einen homozygoten Wildtypen (+/+) oder einen Faim2-null-Mutanten (-/-) hin. Erscheint eine Bande sowohl im WT-Allel als auch im KO-Allel, so weist dies auf ein heterozygotes Versuchstier (+/-) hin. In Abbildung 8.1 auf Seite 126 ist somit der Nachweis von 3 homozygoten Faim2-null-Mutanten, 4 homozygoten Wildtypen und 3 heterozygoten Versuchstieren dargestellt. Die jeweils erste Tasche der beiden dargestellten Agarosegelelektrophoresen stellt eine Wasserprobe ohne DNA-Fragmente dar und fungierte als Kontrolle.

2.3.5 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Zum Nachweis von Faim2 in verschiedenen Organen der Maus im Allgemeinen, aber insbesondere zum quantitativen Nachweis im Hirngewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem Ischämieereignis, wurde zunächst mit Hilfe des Quiagen-RNeasy-Mini-Kits (Quiagen Cat. No. 74104), dem QIAshredder (Quiagen Cat. No. 79654) und dem RNase-Free-DNase-Set (Quiagen Cat. No. 79254) mRNA isoliert und später mittels *M-MLV reverse Transkriptase* (Promega), Oligo (dt) 15 Primer (Promega) und dNTPs (Fermentas) die Synthese von *complementary DNA* (cDNA) durchgeführt. Die Arbeitsschritte wurden dabei möglichst rasch und unter 15°C durchgeführt. Die Zentrifugentemperatur lag bei 20°C.

Nach der Präparation von Gewebe (30 mg) wurde dieses in mit 600 μ l RNA-Puffer gefüllte Homogenisatorröhrchen gegeben. Hierbei wurde in dem gekühlten Homogenisator 3x für 30 Sekunden das Gewebe mechanisch homogenisiert, unterstützt durch den RNA-Puffer. Anschließend wurde 1 Volumen 70%-Ethanol hinzugefügt. Das daraus entstandene Gemisch wurde nun auf *RNeasy columns* in 2 ml Röhrchen übertragen und für 15 s bei ca. 8000 x g zentrifugiert. Es folgten nun 3 Waschschrte mit den im Kit enthaltenen RW1- und RPE-Puffer und jeweils anschließender Zentrifugation für

15 s bei 8000 x g, wobei beim letzten Waschschrift für 2 min zentrifugiert wurde. Die *RNeasy column* wurde in ein neues 2 ml Röhrchen transferiert und nochmals für 1 min bei voller Leistungsfähigkeit der Zentrifuge für 1 Minute zentrifugiert. Daraufhin erfolgte der Elutionsschritt, zu dem die *RNeasy column* in ein neues 1,5 ml-Röhrchen überführt und 30 μ l *RNase-free* Wasser hinzugefügt wurde. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 1 min bei 8000 x g. Die gewonnene RNA befand sich nun am Boden des 1,5 ml-Röhrchens.

Im Anschluss an die RNA-Isolation folgte der DNase-Verdau und die cDNA-Synthese, sofern eine quantitative Bestimmung mittels *real time PCR* folgen sollte. Hierzu wurde zunächst 2,5 μ l DNase I (1 μ l DNase I pro 1 μ g RNA) (RQ1 *RNase-Free*-DNase I, Promega) mit 2 μ l Puffer, 0,5 μ l RNase-Inhibitor (RNasin, Promega), 15 μ l der zuvor gewonnenen RNA (max. 2,5 μ g) gemischt. Dieses Gemisch wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 μ l *Stop Solution* (Promega) hinzugefügt und nochmals für 10 min bei 65°C inkubiert. Im Folgenden wurden 2/3 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen Ammoniumacetat hinzugefügt und bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. 80 μ l Ethanol (70%ig) wurden hinzugegeben und nochmals für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig abgenommen, verworfen und das Pellet am Boden des Röhrchens kurz getrocknet. Danach wurde es in 15 μ l Wasser aufgenommen. Mit der gewonnenen RNA in Lösung wurde nun die cDNA-Synthese durchgeführt. Zunächst wurde die RNA-Konzentration mittels Photometer (PeqLab, NanoDrop) bestimmt. In 0,5 ml-Reaktionsröhrchen wurde daraufhin 2,5 μ g RNA (max. 14,7 μ l) in 4 μ l Puffer (5x), 0,5 μ l dNTP (10mM) und 0,4 μ l Oligo dt Primer (100 μ M) gegeben und bei 70°C für 2 Minuten mit 70°C Deckelheizung im Thermocycler reagiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 0,4 μ l reverse Transkriptase auf Eis. Dieses Gemisch wurde zur Reaktion für 60 Minuten bei 42°C in den Thermocycler gegeben. Das gewonnene Produkt wurde entweder unmittelbar für die *real time PCR* eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.3.6 Quantitative *real time PCR*

Quantitative *real time PCR* (qPCR) wurde mittels der interkalierenden, fluoreszierenden SYBR[®]-*Green*-Farbe durchgeführt. Zunächst wurde hierfür in einem ersten Schritt unter Benutzung des *RNeasy-Mini-Kits* (Qiagen) laut Herstelleranleitung RNA isoliert (vgl. Abschnitt 2.3.5 auf der vorherigen Seite). Die dabei gewonnene RNA-Konzentration wurde mithilfe des Nanodrop-Spektrometers (Nano-

tech) bestimmt. Im Folgenden wurde die RNA von RQ1-RNase-Free-DNase (Promega) verdaut und gegen RNasen geschützt, indem 20 U des RNase-Inhibitors RNasin (Promega) hinzugefügt wurden. Insgesamt wurden 2,5 μg der RNA für die reverse-Transkriptase-PCR (M-MLV; Promega) benutzt. Anschließend wurde die cDNA im Verhältnis 1:5 gelöst. Für alle Reaktionsschritte wurde stets HPLC Wasser eingesetzt, ebenso auch für die Lösung der cDNA. Die qPCR selbst wurde mittels *ABsoluteTM-QPCR-SYBR[®]-Green-ROX-Mix* (ABgene) vorbereitet. Die hierzu eingesetzten Primer sind unten aufgeführt.

Die qPCR wurde im Stratagene-Mx3000P-*Realtime*-Gerät (Stratagene) durchgeführt

Tabelle 2.7: *Quantitative real time PCR*: Reaktionszusammensetzung

Reagenz	Finale Kon- zentration	Totales Volumen (μl)
DNA Vorlage (cDNA abgeleitet aus RNA)		2,0
SYBR [®] - <i>Green-ROX-Mix</i>		12,5
<i>forward</i> Primer (5 μM)	70 nM	0,35
<i>reverse</i> Primer (5 μM)	70 nM	0,35
HPLC-grade H ₂ O		9,8

und, wie in der unten stehenden Tabelle 2.8 gezeigt ist, programmiert:

Die Fluoreszenz wurde detektiert und in *real time* gemessen. Dessen geometrische

Tabelle 2.8: Programmablauf der *real time PCR* im Stratagene-Mx3000P-*Realtime*-Gerät

Stufe	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (s)	Anzahl der <i>Cycles</i>
1 - Enzymaktivierung	95	900	1
2 - Denaturierung	95	15	
3 - Primer <i>Annealing</i>	primer T_m	30	40
4 - Extension	72	30	
5 - Schmelzkurve	95	30	
	60	30	1
	60-95	in 0,5 $^{\circ}\text{C}$ Stufen	

Zunahme in Verbindung mit der exponentiellen Zunahme des Produkts wurde zum Ermitteln des *threshold cycle* (CT) einer jeden Reaktion benutzt. Der Wert der CT zeigt denjenigen *Cycle* an, in dessen Zunahme die Fluoreszenzzunahme zum ersten

Mal signifikant höher ist als die Hintergrundfluoreszenz. Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der Maus wurde als Kontrollgen eingesetzt.

Die Auswertung der qPCR erfolgte mithilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Hierfür wurde neben dem Zielgen ein sogenanntes *Housekeeping*-Gen mit vorausgesetzter konstanter Expression (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GAPDH) mitamplifiziert und die Expression des Zielgens auf das *Housekeeping*-Gen mit der Berechnung des sogenannten ΔCt -Wertes normalisiert:

$$\Delta Ct_{Zielgen/Kalibrator} = Ct_{Zielsequenz} - Ct_{Housekeeping-Gen} \quad (2.1)$$

Kontrollgruppen der jeweiligen Experimente (cDNA NaCl-injizierter-Versuchstiere) dienten als relative Referenz (Kalibrator), deren Expression als 1 definiert wurde. Die ΔCt -Werte der Kontrollgruppe wurden gemittelt und anschließend der $\Delta\Delta Ct$ -Wert für jede einzelne Probe des Zielgens berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Zielgen} - \Delta Ct_{Kalibrator} \quad (2.2)$$

Anschließend konnte die relative Expression des Zielgens als ein Vielfaches der Expression des Kalibrators berechnet werden: Relative mRNA-Expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Es wurden folgende Primer verwendet:

Fas-Expression :

Fw: 5'-CTGCGATGAAGAGCATGGTTT-3'

Rv: 5'-CCATAGGCGATTTCTGGGAC-3'

Faim2-Expression :

Fw: 5'-AGAAGACATCATGACCCAGGG-3'

Rv: 5'-CTTTCTGGTCATCCCAGCTG-3'

GAPDH-Expression :

Fw: 5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3'

Rv: 5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'

2.3.7 Das Faim2-Lentivirus-Konstrukt

Sowohl das Faim2-Lentivirus als auch das Faim2-Adenovirus wurden in Kooperation mit Frau Dr. Ellen Gerhard im Labor Prof. J. B. Schulz konstruiert und generiert.

Mäusliche *Full-length-Faim2*-cDNA (*Faim2full length*) (Klon: MGC:40667 (IMAGE:5400222), Klon Sequenz: BC032278.1, Vektor: pCMV-SPORT6, RZPD *German Resource Center for Genome Research*, Berlin) und eine trunkierte Version, die lediglich die ersten 104 aa kodiert (*Faim2truncated*), wurden in lentivirale Drittgenerationsvektoren (pRRLSIN.cPPT.PGK/GFP.WPRE, Tronolab, Lausanne, Schweiz) subkloniert, wobei die *green-fluorescence-protein (GFP)*-Genkassette belassen und ein N-terminales *FLAG tag* (*common forward*: 5'-GCGGATCCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGACCCAGGGAAAGCTCTCTGTGG-3', *reverse (Faim2full length)*: 5'-CCGCTCGAGTCATTCCCGGTTGGTGCCAA-3', *reverse (Faim2 truncated)*: 5'-CCGCTCGAGTCACTTTCTGATGAAGAGCC-3') hinzugefügt wurde. Das GFP-exprimierende Virus diente als Kontrolle. Die korrekte Zusammensetzung, Überlebensfähigkeit und Funktionsweise aller Klonsequenzen wurde mittels *automated sequencing* (Metabion, Martinsried) bestätigt. Die Generierung und transgene Expression der Drittgenerationslentiviruspartikel wurde wie in Dull et al. (1998) beschrieben durchgeführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Reich et al. (2011) dargestellt.

Die dabei entstandene relative Kopienanzahl der lentiviralen Konstrukte wurde mittels mRNA durch *real time PCR* ermittelt und als Quotient von WPRE (*Woodchuck hepatitis virus post-transcription regulatory element*)-Molekülen pro 10.000 Aktin-Molekülen/ μ l ausgedrückt. Der Quotient betrug 697 für das *full-length-Faim2*-Protein-exprimierende lentivirale Konstrukt (*LV-Faim2full length*), 1208 für das an aa 1-105 trunkierte *Faim2*-Protein-exprimierende lentivirale Konstrukt (*LV-Faim2truncated*) und 1973 für das *green-fluorescence-Protein*-exprimierende lentivirale Konstrukt (*LV-GFP*). Das Virus wurde in allen Versuchen äquimolar verwendet und während der stereotaktischen Injektionen auf Eis gekühlt. Zu Lagerungszwecken wurde das Lentiviruskonstrukt bei -80°C tiefgefroren.

Im Rahmen der *in-vitro*-Versuchsreihen mittels OGD wurden zwei unterschiedliche Titer verwendet: hohe (*high*) (2100 WPRE/10000 Aktin-Molekülen/ μ l) und niedrige (*low*) (697 WPRE/10000 Aktin-Molekülen/ μ l) Lentivirus-Titer.

2.4 *In-vitro*-Methoden

Die *in-vitro*-Versuche wurden im Labor der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin in Zusammenarbeit mit Christoph Harms durchgeführt. Die primären murinen kortikalen Neurone wurden von Mausembryonen (embryonaler Tag 16, E16) der Linie C57Bl/6 sowohl von *Faim2*-defizienten Versuchstieren als auch von

Wildtypen entnommen. Die Zellen wurden bei 36,5°C, 95% Luft, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Züchtungsmedium, das aus dem neurobasalen Medium mit B27-Zusatz (Life Technologies/BRL, Eggenstein), 100 U/ml Penizillin-Streptomycin und 0,5 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin) bestand, gehalten. Ab dem 4. Tag *in vitro* wurde zwei Mal pro Woche ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei die Hälfte verworfen und der Rest wieder aufgefüllt wurde.

Bevor die kortikalen Neurone für Experimente verwendet werden konnten, mussten sie 10 Tage in o.g. Medium *in vitro* gereift sein. Anschließend wurde der virale Gentransfer durch das *Faim2-full-length*- sowie das *Faim2-truncated*-Lentiviruskonstrukt durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen entweder vor oder nach Gentransfer einem Sauerstoff-Glukose-Entzug mittels *oxygen-glucose deprivation (OGD)*, analog zu einer zerebralen Ischämie, unterzogen.

2.4.1 *Oxygen-glucose Deprivation (OGD)*

Bei der *oxygen-glucose deprivation* werden den Zellen *in vitro* gleichzeitig Sauerstoff und Glukose entzogen. Dies hat zur Folge, dass sie zur Apoptose angeregt werden.

Um den Zellen zunächst die Glukose zu entziehen, wurde unmittelbar vor dem Experiment das Züchtungsmedium entfernt. Anschließend wurden sie in PBS gewaschen und die Kulturen zum Sauerstoffentzug für 90 Minuten in der glukosefreien Salzlösung in die Hypoxiekammer (Anaerobierkammer Concept 400, Ruskinn Ltd, GB) mit einem Sauerstoffpartialdruck von $pO_2 < 2$ mmHg plaziert. Nach 90 Minuten wurde die glukosefreie Elektrolytlösung wieder gegen das Züchtungsmedium ausgetauscht und die normoxischen Bedingungen wiederhergestellt.

Bei den Kontrollkulturen wurde zur 90-minütigen Inkubation unter normoxischen Bedingungen eine Salzlösung mit 20 mM D-Glukose verwendet. Das Ausmaß der Apoptose wurde über die Messung der ins Medium freigesetzten Laktat-Dehydrogenase (LDH) ermittelt (Harms et al. 2007). Die LDH-Konzentration wurde über den kinetischen LDH-Test bestimmt. Um zusätzlich eine Aussage über den zellulären Schaden machen zu können, wurden die Zellen parallel über das Phasenkontrastmikroskop (Leitz, Wetzlar) evaluiert und repräsentative Mikrophotographien angefertigt.

2.4.2 *Caspase-3- und -8-Activity-Assay*

Die Aktivitätsmessung von *cleaved* Caspase-3 und -8 in der Zellkultur von primären murinen kortikalen Neuronen wurde analog zu dem *Activity-Assay* aus *in-vivo*-gewonnenem Hirngewebe durchgeführt (siehe 2.5.4 auf Seite 41).

2.5 *In-vivo*-Methoden

2.5.1 *Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAo)*

Die Tierexperimente wurden in strenger Einhaltung der Richtlinien zu den gültigen Tierschutzbestimmungen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Endres (Charité, Universitätsmedizin Berlin) und Prof. Dr. J. B. Schulz (Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt (Tierversuchsantrag Nr. G 0240/07 (LAGeSo (Landesamt für Gesundheit und Soziales) Berlin) und Nr. 33.11.42502-04.030/09 (Göttingen)). Alle operativen Eingriffe wurden an tief anästhesierten Tieren vorgenommen. Männliche Faim2-defiziente Mäuse und *littermate* Faim2-Wildtypen der *Black-Six*-Linie wurden mit Isofluran im N₂O-O₂-Gasgemisch (70% N₂O und 30% O₂) anästhesiert. Die Narkose wurde mit 2,0% Isofluran eingeleitet und mit 1,0% aufrecht erhalten. Hierzu wurden die Tiere auf dem OP-Tisch in Rückenlage gelagert und über eine Gesichtsmaske ventiliert. Während der Narkose wurde ein EKG zum Kreislaufmonitoring abgeleitet und über den beheizbaren OP-Tisch und eine rektal eingeführte Temperatursonde mittels Feedback-Temperatur-Regler die Körperkerntemperatur bei 36,5 ± 0,5 °C konstant gehalten. Die Narkosedauer betrug ca. 8-10 Minuten.

Nach dem Prüfen der Narkosetiefe und dem Erlöschen von Reaktionen auf Schmerzreize erfolgte zunächst eine ca. 1 cm lange Inzision links paramedian auf Höhe der Karotisgabel. Im Folgenden wurde das subkutane Fett- und Bindegewebe sowie ggf. Schilddrüsengewebe stumpf nach medial und lateral präpariert, sodass das *Trigonum caroticum* mit der *A. carotis communis*, der Karotisgabel mit *A. carotis interna* und *externa* sowie der *N. vagus* sauber dargestellt werden konnten. Zunächst wurden nun die *A. carotis communis* und *externa* jeweils mit einer Ligatur versehen. Hierzu wurde ein 5-0 Polyviolene-Faden der Firma *Harvard Apparatus* verwendet. Zur Vorbereitung der folgenden Einbringung des Monofilaments zur Okklusion der *A. cerebri media* wurde eine Ligatur um die *A. carotis interna* gelegt, allerdings nicht zugezogen. Während nun mit Hilfe einer Präzisionsschere die *A. carotis interna* eröffnet wurde, erfolgte zeitgleich die Insertion des mit Silikon beschichteten Monofilaments. Unter Darstellung des Verlaufs der *A. carotis interna* bis zum Abgang der *A. occipitalis*, an dessen Abgang das Filament vorbeigesteuert werden musste, wurde nun das Filament bis in die *A. cerebri media* vorgeschoben, um die fokale zerebrale Ischämie zu induzieren. Das verwendete Monofilament bestand aus einem monofilen 8-0 Nylonfaden, der mit einem Silikon-Resin-Gemisch (Xantopren M Mucosa and Activator NF Optosil Xantopren, Heraeus Kulzer, Wehrheim) beschichtet wurde. Der Faden wurde bis zum Abgang der *A. cerebri anterior* am *Circulus Willisii* eingeführt. Auf diese

Weise konnten die *A. cerebri media* und *A. choroidea anterior* okkludiert werden. Sobald die korrekte Platzierung mittels Flussmessung bestätigt werden konnte, wur-

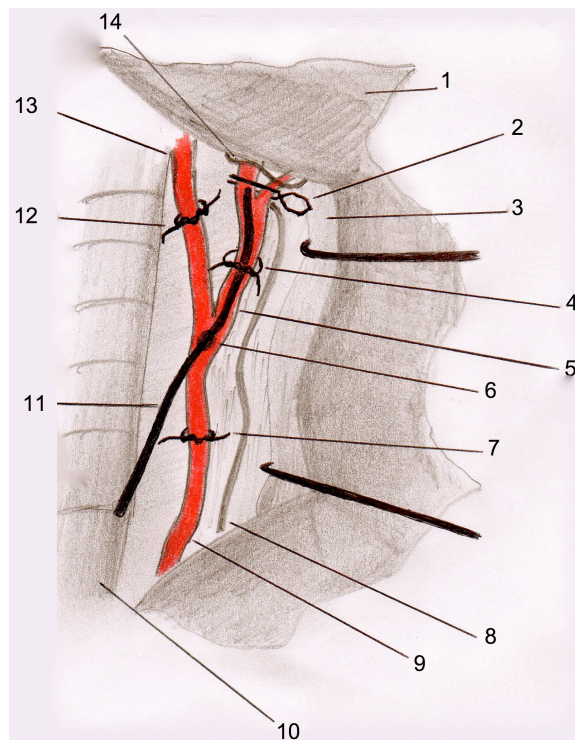


Abbildung 2.1: Anatomische Verhältnisse und Positionierung von Ligaturen, Inzision, Gefäßklipp und Filament an der Karotisgabel während MCAo. (1) Fell, Kutis und Subkutis; (2) Gefäßklipp; (3) Drüsengewebe; (4) 3. Ligatur (offen); (5) *A. carotis interna*; (6) Inzision in *A. carotis communis*; (7) 1. Ligatur (geschlossen); (8) *Nervus vagus*; (9) *A. carotis communis*; (10) Trachea; (11) In die *A. carotis interna* eingeführtes Filament bis zum geschlossenen Gefäßklipp, nach Öffnen des Gefäßklipps, Vorschieben bis *A. cerebri media*; (12) 2. Ligatur (geschlossen); (13) *A. carotis externa*; (14) Nervenast

de das Filament mit der zuvor gelegten Ligatur fixiert, die Narkose langsam beendet und die Wunde verschlossen. Die Mäuse wurden während der Okklusionszeit von insgesamt 30 Minuten auf einer Wärmeplatte gelagert und anschließend zum Entfernen des Filaments erneut kurz narkotisiert. Während das Filament aus der *A. carotis interna* zurückgezogen wurde, erfolgte gleichzeitig das Zuziehen der um die *A. carotis interna* zuvor locker gelegten Ligatur. Zum Beweis der erfolgreichen Reperfusion wurde ein Reflux aus der *A. carotis interna* zunächst abgewartet. So war nach 30-minütiger Okklusion die Reperfusion des Versorgungsgebiets der *A. cerebri media* und der *A. choroidea anterior* gewährleistet. Um den regionalen zerebralen Blutfluss ermitteln zu können und sowohl die Minderperfusion als auch die Reperfusion zu dokumentieren, wurde erneut die Laser-Doppler-Flussmetrie (Peri Flux 4001 Master, Perimed, Stockholm, Schweden) angewendet. Dabei fiel der regionale zerebrale Blut-

fluss im Versorgungsgebiet der *A. cerebri media* auf ca. 20% des Ausgangswertes ab und erreichte den Ausgangspunkt vor Okklusion innerhalb von 5 Minuten nach dem Wiederöffnen des Gefäßes. Es erfolgte nun der endgültige Wundverschluss mittels Einzelknopfnähte.

Vorbeiströmendes Narkosegas und ausgeatmete Gasvolumina wurden über eine Absaugvorrichtung entfernt. Im Anschluss an den operativen Eingriff wurden die Tiere mit einer Wärmeplatte auf Körpertemperatur gehalten und mit einer subkutanen Injektion von 1 ml 5% Glukose (Braun) und 0,9% NaCl (Diac) im Verhältnis 1:1 versorgt. Des Weiteren wurde das Futter mit Wasser getränkt und in den Käfig platziert. Zur fortgesetzten Analgesie erhielten die Tiere 3,2 mg/ml Nocaminsulfon (Ratiopharm) in das Trinkwasser gemischt.

Stichprobenartig wurde in einigen Tieren die linke *A. femoralis* punktiert und der mittlere arterielle Blutdruck und eine Blutgasanalyse durchgeführt. Als Kontrolle wurden sog. *Sham Mäuse* auf dem OP Tisch gelagert, anästhesiert und die Karotisgabel frei präpariert. Bevor das Filament eingeführt werden sollte, wurde die Narkose jedoch beendet und die Tiere wurden somit nicht einer unilateralen, zerebralen Ischämie unterzogen. Nach 30 Minuten erfolgte nochmals eine kurze Narkose und der definitive Wundverschluss.

Nach einer 72-stündigen Reperfusionzeit wurden die Versuchstiere, wie in Abschnitt 2.6 auf Seite 42 dargestellt, tief narkotisiert und dekapitiert, um anschließend das Gehirn zu präparieren und entsprechend aufzuarbeiten.

2.5.2 Stereotaktische Injektionen

In Vorbereitung auf die stereotaktischen Injektionen wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von 150 mg/kg KG Ketamin (Ketanest S, Pfizer) und 15 mg/kg KG Xylazin (Xylazin 2%, Riems) analgosediert. Nach dem Testen von Reflexen (Lidschlussreflex, Schmerzreflex an den Extremitäten) wurden die Mäuse flach, auf dem Bauch liegend, in den stereotaktischen Rahmen (World Precision Instruments, Berlin, Germany) eingespannt. Die offenstehenden Augen wurden mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Dexpanthenol, Bayer) bedeckt.

Eine mit Mineralöl gefüllte Glaskapillare wurde in den *Nanoliter2000 Microinjector* (World Precision Instruments) gespannt und anschließend mit der benötigten Menge an Virus befüllt. Es erfolgte dann der ca. 0,5 cm lange, sagittal geführte, paramediane Hautschnitt über der Schädelkalotte. Nach der Präparation der Schädelkalotte wurde die Injektionsposition mittels standardisierter Koordinaten relativ zum Bregma

ermittelt. Die verwendeten Koordinaten befinden sich in der untenstehenden Tabelle 2.9. An dieser Position wurde ein Bohrloch mit 1 mm Durchmesser gesetzt. Die Abbildung 8.2 in Abschnitt 8.6 auf Seite 127 zeigt den Versuchsaufbau und die Positionierung der Maus während der stereotaktischen Injektion. Die Injektion des Virus (Lentivirus, 697 Moleküle pro 10000 Aktin-Molekülen/ μl) erfolgte in zwei Höhen entlang des durch die Injektionsnadel geschaffenen Kanals mit je 1 μl und einer Rate von 250 nl/min. Die Abbildung 8.3 in Abschnitt 8.6 auf Seite 127 stellt die anatomischen Lagebeziehungen dar.

Tabelle 2.9: Koordinaten für die stereotaktische Injektion

Anatomische Struktur	anterior (<i>mm</i>)	lateral (links) (<i>mm</i>)	ventral (ab Kalotte) (<i>mm</i>)
Striatum	+ 0,20 + 0,20	+ 2,0 + 2,0	+ 3,75 + 2,75

Für die Injektion selbst wurde zunächst eine Zeit von 2 min nach dem Einführen der Kanüle in das Hirnparenchym abgewartet. Anschließend wurde die Injektion mit 250 nl/min gestartet. Nach der Injektion wurde die Kanüle zunächst in dieser Position für 2 min belassen, bevor die tiefere Koordinate eingestellt wurde. Nach erfolgter Virusinjektion von 2 μl Gesamtvolumen in das Striatum links wurde die Kanüle nach 5-minütiger Pause aus dem Hirnparenchym wieder entfernt.

Die postoperative Versorgung wurde analog zur Versorgung nach MCAo durchgeführt. Hierzu wurde die Wunde mit Histoacryl (Braun) verschlossen, die Körpertemperatur der Tiere mithilfe einer Wärmeplatte gewährleistet und Glukose (5%, Braun) / NaCl (0,9%, Diaco) Mix (1:1) subkutan verabreicht. Zur Analgesie erhielten die Mäuse 3,2 mg/ml Novaminsulfon (Ratiopharm) in das Trinkwasser gemischt.

Tabelle 2.10: Koordinaten für den Vorversuch der stereotaktischen Injektion

	Anatomische Struktur (je 1 μl)	anterior (<i>mm</i>)	lateral (links) (<i>mm</i>)	ventral (ab Kalotte) (<i>mm</i>)
1. Bohrloch	Kortex	+ 0,05	+ 0,20	+ 0,15
	Striatum	+ 0,05	+ 0,20	+ 0,33
2. Bohrloch	Kortex	- 0,94	+ 0,25	+ 0,15
	Striatum	- 0,94	+ 0,25	+ 0,30

Die stereotaktischen Injektionen wurden zunächst zum Vergleich des Infektionsradius mit Adeno- und Lentiviren durchgeführt und immunhistologisch mittels anti-GFP-

und anti-Faim2-Färbungen aufgearbeitet. Nach Identifikation des Lentivirus als das geeignetere von beiden, wurde ein Vorversuch zur Menge und zur Lokalisation der Injektion aufgenommen. Die hierbei verwendeten Koordinaten sind in der Tabelle 2.10 auf der vorherigen Seite aufgezeigt. Hierbei wurden zwei Bohrlöcher gesetzt und durch die jeweils zweimalige Injektion von $1 \mu\text{l}$ ein Gesamtvolumen von $4 \mu\text{l}$ injiziert. Im Folgenden wurden dann jedoch die weniger traumatischen lentiviralen Injektionen wie in Tabelle 2.9 auf der vorherigen Seite aufgeführt drei Wochen vor der MCAo appliziert.

2.5.3 Zeitverlauf der Faim2- und Fas-Regulation

Zur Darstellung der nach Ischämie zeitabhängigen Regulation von Faim2 und Fas wurde, wie in Abbildung 3.2 auf Seite 54 aufgezeigt, zu den Zeitpunkten 0, 3, 18 und 48 Stunden nach MCAo Hirngewebe aufgearbeitet und mittels RNA-Isolation und *real time PCR* die relative Menge an Faim2 und Fas im ischämischen Hirngewebe ermittelt.

Hierzu wurde zunächst, wie in Abschnitt 2.5.1 auf Seite 36 beschrieben, die MCAo

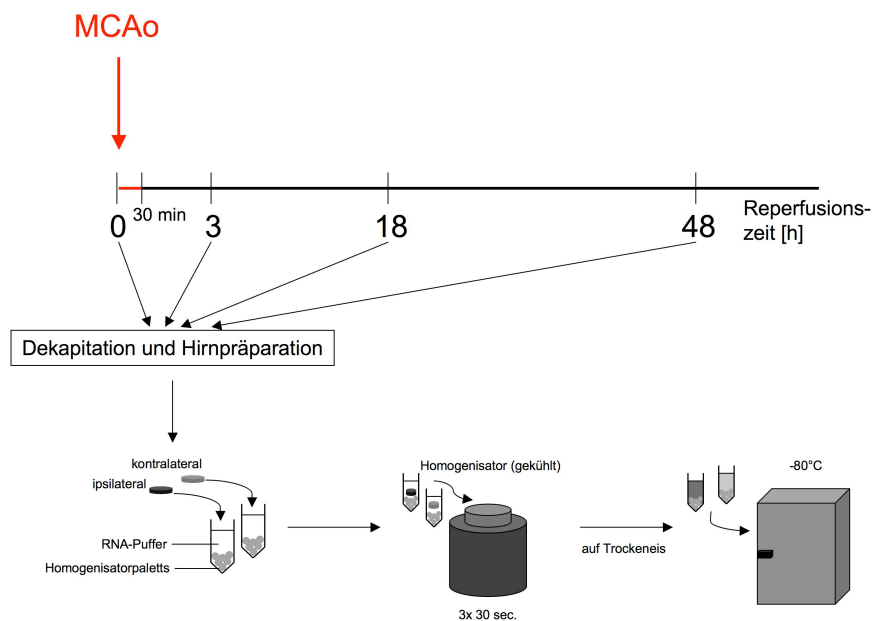


Abbildung 2.2: Versuchsanordnung zum Zeitverlauf der Faim2- und Fas-Regulation

durchgeführt. Anstelle der 72-stündigen Reperfusionzeit wurde nun jedoch nur 0, 3, 18 oder 48 Stunden Reperfusionzeit eingehalten und die Mäuse wurden zu diesen Zeitpunkten jeweils nach tiefer Narkose dekapitiert und die Gehirne entsprechend

präpariert. Direkt nach der Präparation aus dem Schädel, wurden die Gehirne entlang der *Falx cerebri* in *ipsilateral* (ischämisches Hirnareal im Mediastromgebiet) und *kontralateral* (Kontrolle) geteilt. Anschließend wurden die jeweiligen Striata in 30 mg Blöcke geteilt und in 2 ml Homogenisatorröhrchen mit 600 μ l RNA-Puffer gegeben. Im gekühlten Homogenisator wurden die Proben anschließend für 3x 30 s homogenisiert, um dann unmittelbar auf Trockeneis gefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren zu werden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte schließlich mittels RNA-Isolation, cDNA-Synthese und *real time PCR* wie in Abschnitten 2.3.5 auf Seite 30 und 2.3.6 auf Seite 31 beschrieben.

2.5.4 Caspase-3- und -8-*Activity-Assay*

Zur sicheren Detektion apoptotischer Vorgänge in einer Zelle ist die Messung der Aktivität der in Abschnitt 1.1.3 auf Seite 5 bereits dargestellten Initiatorcaspase (*Caspase-8*) als Startpunkt der Caspasenkaskade und der Effektorcaspase (*Caspase-3*) als Endpunkt der Caspasenkaskade und Bestandteil des Apoptosoms, mittels eines *Activity-Assays* möglich. Dabei werden jeweils die aktivierten Formen der Caspasen (*cleaved*) gemessen. Die flourometrisch ermittelte Konzentration von *cleaved Caspase-3* und -8 ist dabei proportional zur Aktivität von Caspase-3 und -8. Diese Aktivität wurde sowohl in ischämischen Hirnarealen der Faim2-defizienten Mäuse und deren Kontrollen als auch in neuronalen Zellkulturansätzen gemessen. Die neuronalen Zellen waren zuvor durch Sauerstoffentzug ebenfalls zur Apoptoseinduktion angeregt worden. Zur Messung der Caspase-3- und -8-Aktivität wurde ein Kit der Firma Roche Diagnostics, Mannheim verwendet, das auf der Basis des *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* beruht.

Das Gehirngewebe wurde zunächst in Lysispuffer homogenisiert und anschließend bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Reaktionspuffer und 0,5 μ l DTT gemischt. Entsprechende Kontrollen ohne AFC bzw. mit 1 μ l Fas-Inhibitor wurden angesetzt und die Proben für 30 min auf Eis inkubiert. Das Caspase-Substrat wurde hinzugefügt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung mittels flourometrischer Bestimmung des proteolytisch freigesetzten AFC.

Die neuronalen Zellen aus der Zellkultur wurden nach Sauerstoffentzug analog aufbereitet und die Caspase-Aktivität wurde flourometrisch ermittelt.

2.5.5 BrdU-Applikation

5-Bromo-2'-Deoxy-Uridin (BrdU, Sigma) wurde in 1% 1M NaOH in PBS (Konzentration 20 mg/ml) aufgelöst. Es wurde die pulsatile Verabreichungsmethode eingesetzt, wobei täglich ab 72 h vor MCAo intraperitoneale Injektionen (50 mg *BrdU/kg* Körpergewicht) verabreicht wurden. Alle Experimente, die eine *in-vivo*-Applikation von BrdU beinhalteten, wurden im Laboratorium der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

2.6 Gewebeaufarbeitung der Maushirne

2.6.1 Einfrieren unfixierter Maushirne

Die Tiere wurden mit Isofluran tief narkotisiert und mit einer Schere dekapitiert. Die Hirne wurden rasch entnommen und es wurden, vor dem Einfrieren in Methylbutan bei -40°C auf Trockeneis, sichtbare Gefäße und Hirnhautreste entfernt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gehirne bei -80°C aufbewahrt.

2.6.2 Transkardiale Fixation des Gewebes

Die Tiere wurden mit 10% Chloralhydrat in PBS (6,25 ml/kg KG intraperitoneal) nach 72-stündiger Reperfusionzeit nach MCAo tief analgosediert. Das vordere und mittlere Mediastinum wurde von ventral her eröffnet. Der rechte Vorhof wurde eröffnet und anschließend der linke Ventrikel kanüliert. Die transkardiale Perfusion erfolgte mit Hilfe einer Pumpe (Flussrate 5 ml/min). Zuerst wurde mit ca. 5 ml kaltem PBS perfundiert, bis die aus dem Herzvorhof herausströmende Flüssigkeit weitestgehend frei von Blut war. Anschließend wurden mit ca. 50 ml 4% PFA in PBS (pH-Wert 7,2 - 7,4) transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden dann nach Aufschneiden der Kapsel und Abziehen der Meningen vorsichtig entnommen und noch weitere 8 Stunden in 4% PFA bei $+4^{\circ}\text{C}$ postfixiert.

2.6.3 Schneiden der Maushirne

Abhängig von der späteren Aufarbeitungs- und Färbemethode, wurden die Gehirne unterschiedlich sektioniert, wobei die Position der koronaren Schnitte im Gehirn immer gleich blieb. Diese Sektionen sind in der Abbildung 8.4 in Abschnitt 8.7 auf Seite 128 dargestellt und die anatomischen Positionen relativ zum Bregma angegeben.

Der Fokus lag beim Aufarbeiten der Gehirne auf dem Versorgungsgebiet der *Arteria cerebri media*, im Speziellen dem Striatum und dem das Striatum umgebenden Kortex.

Free-Floating-Schnitte

Die mit 4% PFA transkardial fixierten Gehirne wurden am Vibratom (Technical Products, St. Louis, USA) geschnitten, wobei 40 μm starke koronare Schnitte angefertigt wurden. Die Schnitte wurden dann ca. 24 h in 30%iger Glukoselösung (in PBS) kryoprotectiert und anschließend entweder bei -20°C gelagert oder bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Kryoschnitte

Die unfixiert eingefrorenen Gehirne (*fresh frozen*) wurden am Kryostat (Microm, Heidelberg) geschnitten. 10-20 μm starke koronare Sektionen wurden auf kurz vorgewärmte Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgenommen. Anschließend wurden diese bei -80°C gelagert.

Paraffin-Schnitte

Zunächst wurden die Gehirne für 24 Stunden in vierprozentiger Paraformaldehydlösung fixiert, mit Hilfe eines Gewebeinfiltrationsautomaten paraffiniert und anschließend an einer Paraffinausgießstation in Paraffinblöcke eingegossen. Von den Paraffinblöcken wurden 4 μm starke Schnitte angefertigt, in einem Wasserbad bei 50°C geglättet, auf Objektträgern aufgezogen und anschließend in einem Ofen bei 37°C getrocknet.

2.6.4 Hämatoxylin-Färbung

Die Hämatoxylin-Färbung färbt Chromatin in den Zellkernen blau (Hämatoxylin). Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung und Reinigung der Schnitte, indem Letztere sequentiell dreimal in Xylol für 10 min und anschließend für 3 min zweimal in 100%- und jeweils einmal in 96%-, 70%- sowie 50%-Ethanol und zweimal für 5 min in Aqua dest. rehydriert wurden. Nach jeweils siebenminütiger Färbung in Hämalaunlösung und anschließender fließender Wässerung (*Bläuung*) wurden sie kurz in Aqua dest. gespült und nachfolgend in einer aufsteigenden Reihe (jeweils 4 mal Eintauchen in 50%-, 70%-, 96%-Ethanol; 5 min in 100%-Ethanol; 2 mal 10 min Xylol) dehydriert und mit Entellan eingedeckelt.

2.6.5 Messung des Infarkt volumens

Nach einer Reperfusionzeit von 72 h wurden die Mäuse tief narkotisiert und mit einer Schere dekapitiert. Die Gehirne wurden im Ganzen mit Kleinhirn und *Bulbi olfactories* nach Entfernung der sichtbaren Gefäß- und Hirnhautrückstände zügig entnommen und in Methylbutan bei -40°C auf Trockeneis schockgefroren. Im Verlauf wurden daraufhin die Gehirne am Kryostaten (Microm, Heidelberg) koronar alle $200\ \mu\text{m}$ in $10\text{-}20\ \mu\text{m}$ starke Scheiben geschnitten und auf Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgenommen. Die fünf verschiedenen Koronarschnitte sind in Abbildung 8.4 auf Seite 128 dargestellt und stellen bei der Messung jeweils repräsentativ das o.g. $200\ \mu\text{m}$ Intervall dar. Nachdem die auf die Objektträger aufgenommenen Schnitte über Nacht getrocknet waren, wurde eine Hämatoxylin-Färbung (Merck, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Nach erneuter Trocknung wurden die Schnitte am Computer eingescannt und die Infarktareale mittels *Sigma Scan Pro* quantifiziert und das Volumen berechnet. Grundsätzlich wurde vorausgesetzt, dass beide Hemisphären gleich groß waren. Wegen des Ödemeffekts wurde die volumetrische Messung ein Schnitt anterior und ein Schnitt posterior des Ischämieareals begonnen bzw. beendet. Um die ödematöse Hirnschwellung von der Berechnung weiterhin auszuschließen, wurde die gesamte kontralaterale (nicht-infarzierte Hemisphäre) von der gesamten ipsilateralen (infarzierte) Hemisphäre subtrahiert. Folgende Parameter wurden jeweils an den Hirnschnitten *a1* bis *a5* (siehe Abb. 8.4 auf Seite 128) gemessen:

1. Fläche der gesamten ipsilateralen (ischämischen) Hemisphäre in mm^2 : i_{gesamt}
2. Fläche des nicht ischämischen Areals der ipsilateralen (ischämischen) Hemisphäre in mm^2 : i_{gesund}
3. Fläche der kontralateralen (nicht-ischämischen) Hemisphäre in mm^2 : cl

Zur Ermittlung des direkten Infarkt volumens (Z_{dir}) ergibt sich folgende Formel:

$$Z_{\text{dir}} \text{mm}^3 = ((i_{\text{gesamt}} \text{mm}^2 - i_{\text{gesund}} \text{mm}^2) \cdot 0,2 \text{mm})_{a1} + (\dots)_{a2} + \dots + (\dots)_{a5} \quad (2.3)$$

Zur Ermittlung des indirekten Infarkt volumens (V_{ind}) ergibt sich folgende Formel:

$$V_{\text{ind}}\% = \frac{((i_{\text{gesund}} \text{mm}^2 \cdot 0,2 \text{mm})_{a1} + (\dots)_{a2} + \dots + (\dots)_{a5})}{((cl \text{mm}^2 \cdot 0,2 \text{mm})_{a1} + (\dots)_{a2} + \dots + (\dots)_{a5})} \cdot 100 \quad (2.4)$$

V_{ind} stellt dabei den prozentualen Anteil des Gehirns dar, der vom Infarkt verschont blieb. Der Vorteil der indirekten Volumetrie besteht insbesondere darin, dass der Störfaktor durch die ödematöse Schwellung nahezu auf 0 reduziert werden kann.

Das Ödem selbst kann durch die Berechnung des Ödemindex E_{Index} wie folgt berechnet werden:

$$E_{Index} \% = \frac{\left(\frac{(\text{il gesamt } mm^2 \cdot 0,2 \text{ mm})_{a1}}{(\text{cl } mm^2 \cdot 0,2 \text{ mm})_{a1}} \cdot 100 \right)_{a1} + \left(\frac{(\dots)_{a2}}{(\dots)_{a2}} \cdot 100 \right)_{a2} + \dots + \left(\frac{(\dots)_{a5}}{(\dots)_{a5}} \cdot 100 \right)_{a5}}{5} \quad (2.5)$$

E_{Index} stellt den Mittelwert aus den prozentualen Ödemanteilen der jeweiligen Hirnabschnitte dar. Damit weist $E_{Index} > 0$ auf ein Ödem hin, $E_{Index} < 0$ gibt Anhalt auf eine Hirnatrophie durch z.B. ein chronisches Stadium einer Ischämie (Lin et al. 1993). Die Berechnungen und die Interpretation der errechneten Volumina erfolgten analog zu den von Lin et al. (1993) veröffentlichten Auswertungen zum Effekt des Hirnödems auf das Infarktvolume im Rattenmodel der fokalen zerebralen Ischämie.

Präparate von Tieren ohne Infarkt oder einem nur sehr kleinen Infarktareal in der Hippokampusregion wurden von den Messungen ausgeschlossen, da hier von einer insuffizienten zerebralen Ischämie ausgegangen werden musste. Im Folgenden wurden die Infarktgrößen der jeweiligen Gruppen (Faim2-Defizienz, Faim2-Wildtyp) jeweils mit passenden Geschlechts- und Alterstrukturen verglichen. Zur statistischen Auswertung wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet.

2.6.6 *Terminal-Desoxynucleotidyl-Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL)*

Wie erstmalig durch (Gavrieli et al. 1992) beschrieben, können die beim Vorgang der Apoptose durch internukleosomale Spaltung entstehenden DNA-Fragmente in einer Zelle durch die TUNEL-Färbung (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) markiert und dargestellt werden. Die Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) katalysiert als Enzym bei der Färbung die Verknüpfung von mit Digoxigenin markierten Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTP: DIG-DNA) mit den 3'-Hydroxyl-Enden der fragmentierten Einzel- und Doppelstrang-DNA-Moleküle. Die Farbreaktion wird nun über das Hinzugeben von gegen Digoxigenin gerichteten Primärantikörpern erzeugt. Dabei werden diese entweder an alkalische Phosphatase (Lichtmikroskopie; NBT/BCIP-Entwicklung) oder an Rhodamin (Fluoreszenzmikroskopie) gekoppelt. Die Bearbeitung und Vorbereitung der Schnitte war abhängig von der vorangegangenen Fixierungs- und Schneidemethode. Wurden die Gehirne mittels Kryoschnitte (siehe Abschnitt 2.6.3 auf Seite 43) aufgearbeitet, tauten und trockneten die Objektgläser zunächst bei Raumtemperatur auf. Anschließend wurden der erste und fünfte von den 5 auf den Objektträger aufgezogenen Schnitten entfernt und die ver-

bliebenen drei mit einem Fettstift umkreist. Alle weiteren Schritte erfolgten in dem dadurch gebildeten Reservoir. Zunächst wurden die Schnitte in 4%-igem PFA bei einem pH von 7,5 für 15 min vorbehandelt. Anschließend wurde dreimalig mit TBS gewaschen. Die Objektträger wurden daraufhin auf Eis gelegt und die Schnitte für 2 min mit Citratpuffer bedeckt. Es folgte erneut dreimaliges Waschen. Im Folgenden wurde auf jeden Objektträger mit den drei umkreisten Schnitten 100 μ l *Tailingmix* gegeben, der aus 90 μ l *Label Solution* (69 μ l Reaktionspuffer, 14 μ l CoCl_2 , 7 μ l DIG-DNA) und 10 μ l TdT bestand und für 2 h bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen und 30-minütigem Blocken mit 10% FCS in TBS bei Raumtemperatur folgte eine 90-minütige Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase [1:250 verdünnt in 10% FCS in TBS] oder Anti-Digoxigenin-Rhodamin [1:20 verdünnt in 10% FCS in TBS]). Anschließend wurde fünfmalig mit TBS gewaschen. Das daraufhin verwendete Chromagen wurde abhängig von der gewünschten Auswertungsmethode gewählt (siehe unten). Wurden die Gehirne mittels Paraffin-Schnitttechnik (siehe Abschnitt 2.6.3 auf Seite 43) aufgearbeitet, wurde zunächst eine enzymatische Vorbehandlung mit 20 μ g/ml (gelöst in TBS/2 mM CaCl_2) rekombinanter Proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim) für 15 Minuten bei 37°C durchgeführt. Die für Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen vorgesehenen Schnitte wurden hitzeinduziert demaskiert. Die Schnitte wurden daraufhin dreimalig mit TBS gewaschen und für 5 Minuten in TBS auf Eis zur Inaktivierung der Proteinkinase K abgekühlt. Das weitere Prozedere erfolgte wie oben beschrieben. Waren die Schnitte noch nicht auf Objektträger aufgezogen (siehe Abschnitt 2.6.3 auf Seite 43), erfolgte zuvor das Auftragen und Trocknen der Schnitte auf Objektträger. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben. Die Objektträger wurden 10 Minuten in 0,1 M PO_4 inkubiert und anschließend mit Immu-Mount eingedeckelt. Waren die Schnitte als Doppelfärbung mit NeuN, aktiver Caspase-3 oder aktiver Caspase-8 Hoechst 33258 (Invitrogen GmbH; Karlsruhe, Germany) immunfluoreszenzgefärbt, wurden sie mit Aqua dest. gespült und abschließend mit Immu-Mount eingedeckelt. Das Enzym TdT wurde für die Negativkontrolle bei ansonsten identischem Färbeprotokoll weggelassen. Die Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen und damit derjenigen Zellen, die Apoptose eingeleitet hatten, erfolgte mittels des Stereo-Investigators 7 der Firma Leica (MicroBrightField Bioscience, Williston, USA) oder dem Stereomikroskop SMZ645 (Nikon Corporation, Tokio, Japan).

TUNEL mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromagen

Gefrierschnitte wurden aus dem Gefrierfach entnommen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Die folgenden Schritte erfolgten analog zu dem oben beschriebenen Protokoll:

1. Fixation in 4% PFA für 10 min bei Raumtemperatur
2. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im TBS
3. Umranden der Schnitte mit PAP-Pen (*hydrophobic slide marker*)
4. Citratpuffer auf Schnitte für 2 min auf Eis
5. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im TBS
6. Inkubation im *Equilibration buffer* für 1 min bei Raumtemperatur (ca. 20 μ l pro Schnitt)
7. Inkubation mit 450 μ l *Label Solution* und 50 μ l *Enzyme Solution* in einer Feuchtkammer bei 37°C für 120 min
8. Waschen in der *Stop solution* für 10 min
9. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im TBS
10. Inkubation mit HRP-konjugiertem Antikörper (12 μ l pro Schnitt) in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 60 min
11. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 Minuten im TBS
12. Inkubation mit 0,05% DAB/ 0,01% H₂O₂ in 40 ml TBS mit 200 μ l NiCl für 8 min
13. Waschen in destilliertem H₂O für 5 min
14. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im TBS
15. Vor Eindeckeln mit Immu Mount 10 min in 0,1 M PO₄.

TUNEL mit Fluorescein als Chromagen

1. Fixation in 4% PFA für 10 min bei Raumtemperatur
2. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im TBS
3. Umranden der Schnitte mit PAP-Pen (*hydrophobic slide marker*)
4. Citratpuffer auf Schnitte für 2 min auf Eis
5. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im TBS
6. Inkubation im *Equilibration buffer* für 1 min bei Raumtemperatur (ca. 20 μ l pro Schnitt)
7. Inkubation mit 450 μ l *Label Solution* und 50 μ l *Enzyme Solution* in einer Feuchtkammer bei 37°C für 120 min
8. Waschen in der *Stop solution* für 10 min

9. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im TBS
10. Inkubation mit HRP-konjugiertem Antikörper (12 μ l pro Schnitt) in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 60 min
11. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im TBS
12. Inkubation mit FITC-konjugiertem Antikörper (12 μ l pro Schnitt, Intergen) in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 30 min
13. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im TBS
14. Eindeckeln in *Immu-Mount*.

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Immunhistochemie gegen BrdU

Das Protokoll der Färbung:

1. Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation der Schnitte in 3% H_2O_2 in dd H_2O für 15 min bei Raumtemperatur
2. zweimaliges Waschen in PBS für 5 min bei Raumtemperatur
3. Denaturieren der DNA durch Inkubation in 2 M HCl für 60 min bei + 37°C
4. zweimaliges Waschen im PBS für 5 min bei Raumtemperatur
5. Inkubation mit 5%-igem Kaninchenserum/ 0,3% Triton X-100 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur
6. Inkubation der Schnitte mit anti-BrdU (monoklonal, hergestellt in Ratte; Titer 1:200 in 5% Kaninchenserum in PBS) für 18 h bei + 4°C
7. dreimaliges Waschen in PBS
8. Inkubation mit biotinyliertem anti-Ratte-IgG (1:250) für 60 h bei Raumtemperatur
9. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
10. Inkubation im Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Peroxidase-EliteKit) für 1 h bei Raumtemperatur
11. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
12. Reaktion mit 0,05% DAB-Lösung in 0,003% H_2O_2 (in PBS)
13. Stoppen der DAB-Reaktion mit dd H_2O
14. dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
15. Eindeckeln in *Immu-Mount*.

2.7.2 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

Um die in den Einfachfärbungen ermittelten quantitativen Ergebnisse qualitativ zu belegen, wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt. Hierbei wurde einerseits die Fragestellung der neuronenspezifischen Reaktionen durch Doppelfärbungen gegen NeuN (*Neuronal nuclear protein*) bearbeitet, andererseits wurden durch Doppelfärbungen mit TUNEL (*Terminale Desoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling*) die apoptotischen Abläufe spezifiziert. Da die Doppelfärbungen für die qualitative Aufarbeitung der zuvor quantitativ dargestellten Unterschiede zwischen Faim2-defizienten Versuchstieren und Wildtypen genutzt wurde, erfolgte hier keine stereologische Erhebung der Absolutzellzahlen.

Aktive Caspase-3/TUNEL und Aktive Caspase-8/TUNEL

Zur qualitativen Darstellung der durch Caspase-Aktivierung gesteuerten apoptotischen Vorgänge im endogenen Caspase-Signalweg wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit gegen aktive Caspase-3 und aktive Caspase-8 gerichteten Primärantikörpern in Kombination mit TUNEL-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die im Abschnitt 2.5.1 auf Seite 36 beschriebene zerebrale Ischämie bei Faim2-null-Mutanten und Wildtypen induziert und anschließend wurden die Hirne sowohl für das Färbeverfahren mittels *Free-Floating* (siehe Abschnitt 2.6.3 auf Seite 43) als auch als Paraffinschnitte aufgearbeitet. Es erfolgte zunächst die Vorbereitung der Schnitte in den Waschkammern und das Aufziehen auf Objektträger bzw. eine Entparaffinierung der Schnitte mit anschließendem zweimaligen Waschen in Aqua dest. für 5 min. Die Paraffinschnitte wurden dann einer hitzeinduzierten Antigendemaskierung in der Mikrowelle unterzogen, indem die Schnitte in mit Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0) gefüllten Plastikkuvetten gestellt und anschließend einmal für 5 min und vier Mal für 10 min bei voller Geräteleistung in der Mikrowelle gekocht wurden. In den Pausen wurde die Plastikkuvette mit Aqua dest. nachgefüllt. Nach einstündigem Abkühlen der Schnitte in einem Eisbad erfolgte ein dreimaliger Waschschrift für 5 min in Aqua dest. Das anschließende einmalige Waschen in TBST für 5 min und die einstündige Inkubation mit Blockierungslösung (10% FCS in TBST) wurde an beiden Schnittarten durchgeführt. Im Folgenden wurde der jeweilige Primärantikörper aufgetragen (Anti-Caspase-3, aktiv/gespalten [1:200 verdünnt in 10% FCS in TBST] und Anti-Caspase-8, aktiv/gespalten [1:1000 verdünnt in 10% FCS in TBST]) und jeweils über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBST wurde der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG [H+L], Alexa Fluor[®] 488; 1:200 verdünnt

in 10% FCS in TBST) aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST erfolgten nun die Gegenfärbung nach der TUNEL-Methode (vgl. Abschnitt 2.6.6 auf Seite 47), eine Kernfärbung mit Hoechst 33258 für 10 min, Spülen in Aqua dest. und anschließend die Eindeckelung mit *Immu-Mount*. Für Negativkontrollen wurde der Primärantikörper bei ansonsten identischem Protokoll weggelassen.

TUNEL/NeuN

Die Doppelfärbung von TUNEL und NeuN erfolgte analog zum vorgenannten Prozedere. Ziel war es zu identifizieren, ob es sich bei den apoptotischen Zellen auch tatsächlich um neuronale Zellen handelte. Hierzu wurde gegen ein neuronales Kernprotein gefärbt. Die verwendeten Gehirnschnitte waren zuvor mittels Paraffinschnittechnik aufgearbeitet worden (vgl. Abschnitt 2.6.3 auf Seite 43). Die Entparaffinierung, hitzeinduzierte Antigendemaskierung, Inkubation in Blockierungslösung, Kernfärbung mit Hoechst 33258, Eindeckelung und die jeweiligen Waschschritte entsprachen der bereits zuvor geschilderten Vorgehensweise. Es erfolgte zuerst die TUNEL-Färbung wie in Abschnitt 2.6.6 auf Seite 47 mit Fluorescein als Chromagen beschrieben. Nach Lagerung bei 4°C über Nacht, wurde mit dem Primärantikörper gegen NeuN (1:100 verdünnt in 10% FCS in TBST) 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und für die Farbentwicklung ein Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG [H+L], Alexa Fluor® 555, 1:200 verdünnt in 10% FCS in TBST; 120min Inkubation bei Raumtemperatur) eingesetzt. Für Negativkontrollen wurde der Primärantikörper bei ansonsten identischem Protokoll weggelassen.

Aktive Caspase 3/NeuN und Aktive Caspase 8/NeuN

Sowohl die Färbeprotokolle als auch die verwendeten Antikörper sind analog zu den beiden vorgenannten Doppelfärbungen verwendet worden. Es wurde zunächst die Caspase-Färbung durchgeführt und als Gegenfärbung die NeuN-Färbung.

GFP/NeuN-, GFP/GFAP- und GFP/Iba-1-Doppelfärbungen an Adeno- und Lentiviruskonstrukten im Vergleich

Zur Identifizierung sowohl des geeigneten Viruskonstrukts als auch der notwendigen Viruskonzentration im Injektionsvolumen der stereotaktischen Injektion wurden neuronale Zellen im Striatum durch das Faim2-Adenovirus-Konstrukt und Faim2-Lentivirus-Konstrukt (vgl. Reich et al. 2011) mittels stereotaktischer Injektion (siehe

Abschnitt 2.5.2 auf Seite 38) mit dem Faim2-Virus-Konstrukt infiziert und die Schnitte mit drei Doppelfärbungen aufgearbeitet. Dabei wurde zunächst mittels einer NeuN Doppelfärbung mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP-pAd bzw. GFP-pLenti) das Virus in den neuronalen Zellen nachgewiesen. Anschließend wurde zur Kontrolle GFP-pAd bzw. GFP-pLenti mit dem gliazellenspezifischen Protein GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) gegengefärbt. Ebenfalls zur Kontrolle wurde mit dem mikroglia- und makrophagenspezifischen Iba-1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) gegengefärbt, um die spezifische Infektion der Neuronen zu bestätigen. Abschließend erfolgte eine Färbung mit dem Faim2-Antikörper der Firma *LifeSpan BioScience Inc.*, Seattle, USA.

Die Abbildungen 3.14 auf Seite 68 und 3.15 auf Seite 69 zeigen die jeweiligen Ergebnisse der zuvor genannten Färbungen. Dabei zeigt sich im Vergleich zwischen Lenti- und Adenovirus eine signifikant stärkere Destruktion des Hirngewebes allein durch die Aggressivität des Adenovirus. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Färbungen nur noch mit dem Faim2-Lentivirus-Konstrukt durchgeführt.

2.8 Verhalten

Die Induktion eines einseitigen Ischämieareals sollte nicht nur histologisch nachgewiesen, sondern auch klinisch erfasst werden. Dazu wurde der von Herrn Shirley B. Shelton im Jahr 2008 veröffentlichte sog. *SNAP-Score* verwendet. *SNAP* steht für *Simple Neuroassessment of Asymmetric Impairment*. Hierdurch konnten die klinischen Auffälligkeiten vor und nach der Ischämie erhoben werden. Zeigte ein Tier keine oder nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten, war die zerebrale Ischämie in der Regel nicht erfolgreich eingetreten.

2.8.1 *SNAP-Score*-Erhebung

Wie von Shelton et al. (2008) beschrieben, eignet sich der *SNAP-Score*, um effizient und sensitiv ein einseitiges neurologisches Defizit klinisch zu dokumentieren. Hierzu wurden die Tiere unmittelbar vor und 2 Stunden nach Ende der Isofluran-Narkose wie in Tabelle 8.5 auf Seite 131 im Anhang in Abschnitt 8.8 detailliert aufgezeigt, klinisch beurteilt. Ein Tier ohne neurologisches Defizit sollte einen *SNAP Score* von 0 erreichen, ab einem *Score* von 2-5 war ein neurologisches Defizit zu erwarten (Shelton et al. 2008).

2.9 Statistische Methodik

Die erhobenen Daten wurden zunächst in *Excel 2004* zusammengefasst und aufgearbeitet. Die statistische Aufarbeitung erfolgte mittels *GraphPad Prism* (Version 5.00) und graphisch als Säulendiagramme mit errechnetem Mittelwert sowie Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean, SEM*) angegeben.

In den meisten Fällen wurden zwei Gruppen analysiert. Hierbei wurde der *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben verwendet. In Einzelfällen wurden durch Varianzanalysen mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen. Im Falle eines zu untersuchenden Faktors wurde der *One-way ANOVA*, bei zwei zu untersuchenden Faktoren der *Two-way ANOVA*, mit anschließendem *post-hoc-Test* für multiple Vergleiche zum Nachweis von Gruppenunterschiedlichkeiten verwendet. Um die Kontrollgruppen mit den Interventionsgruppen zu vergleichen, wurde bei einfaktorieller Varianzanalyse der *Dunnnett's post-hoc-Test* und nach zweifaktorieller Varianzanalyse bei verbundenen Stichproben der *Bonferroni* bzw. beim Vergleich von überspannten Mittelwerten der *Tukey post-hoc-Test* angewendet. Im Falle der Signifikanzanalyse des ordinalskalierten *SNAP-Scores* wurde zunächst die *Kruskal-Wallis-one-way-Analyse* angewendet, gefolgt vom *Dunn's-Multiple-Comparison-Test*.

Als signifikant wurden $p - \text{Werte} < 0,05$ angenommen ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$), soweit nicht anders angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Proteins *Faim2*

3.1.1 Expression von *Faim2* im Organismus

Im Rahmen seiner antiapoptotischen Funktion greift *Faim2* in hemmender Wirkung des Fas/CD95-Signalwegs in die endogenen Regulationsmechanismen neuronaler Zellen ein. Wie in Abschnitt 1.2 auf Seite 11 aufgezeigt, wurde von mehreren Autoren jedoch *Faim2* auch in anderen Organen und Zellen nachgewiesen und ihm dort die hemmende Wirkung des Fas/CD95-Transduktionssystems zugeschrieben. Während Somia et al. (1999) mittels *Northern-Blotting* *Faim2*-mRNA in multiplen humanen Organen nachweisen konnten, zeigten Fernandez et al. (2007) mittels quantitativer RT-PCR die Expression von *Faim2* primär nur in neuronalen Zellen auf.

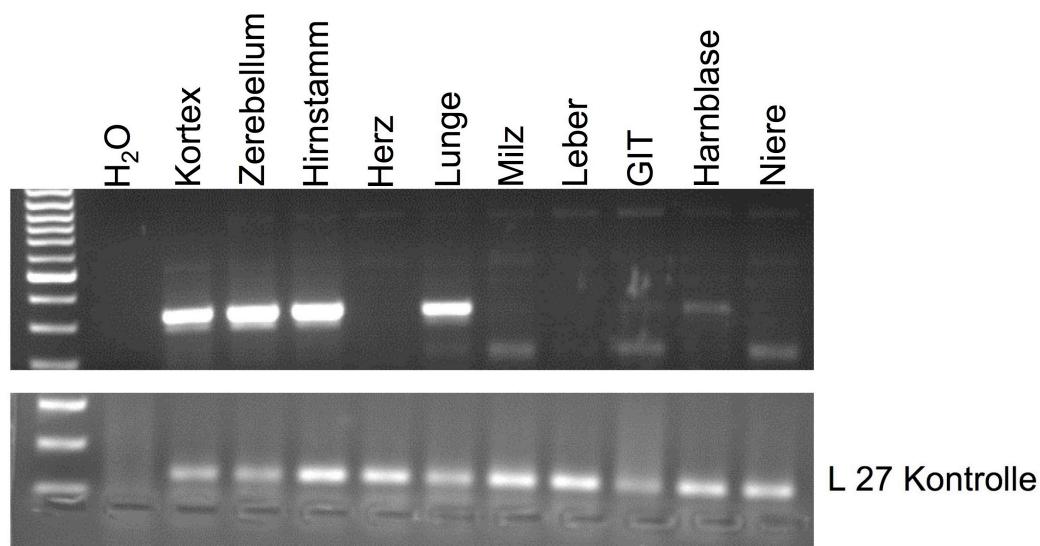


Abbildung 3.1: Expression von *Faim2* in verschiedenen Organen und Geweben der Maus. Mittels RT-PCR wurde die RNA amplifiziert. Als Kontrolle diente das in den Mitochondrien lokalisierte ribosomale Protein L 27. Eindeutig gelang der Nachweis von *Faim2* im zerebralen Kortex, Zerebellum, Hirnstamm und der Lunge. Ein sehr schwaches Signal konnte in der Harnblase erfasst werden, das fraglich schwache Signal im GIT konnte in repetitiven Versuchen ausgeschlossen werden. In Herz, Milz, Leber und Niere war *Faim2* nicht nachweisbar.

Auf Grund dieser Zusammenhänge haben wir neben neuronalem Gewebe multiple Gewebeproben in der Maus auf *Faim2*-Expression untersucht. Die Abbildung 3.1 zeigt die basale Expression von *Faim2* in verschiedenen Geweben und Organen ohne Einfluss durch eine Ischämie. Dabei gelang mittels quantitativer RT-PCR ein sicherer Nachweis von *Faim2* im zerebralen Kortex, Zerebellum, Hirnstamm und der Lunge. Schwächere Signale konnten ebenfalls in der Harnblase und im Gastro-Intestinal-Trakt (GIT) erfasst werden, welche jedoch in repetitiven Versuchen nicht mehr nachweisbar waren. In Herz, Milz, Leber und Niere war *Faim2* nicht nachweisbar.

3.1.2 Zeitliche Regulation von *Faim2* und Fas/CD95 nach zerebraler Ischämie

Die Regulation des Fas/CD95-Rezeptors und die Regulation von *Faim2* wurde mittels Expressionsanalyse durch quantitative *real time PCR* nach zerebraler fokaler Ischämie untersucht. Dazu wurde zunächst eine MCAo durchgeführt und das ischämische Hirngewebe an den Zeitpunkten 0, 3, 18 und 48 Stunden nach 30-minütiger Ischämie entsprechend aufbereitet und anschließend mittels *real time PCR* analysiert.

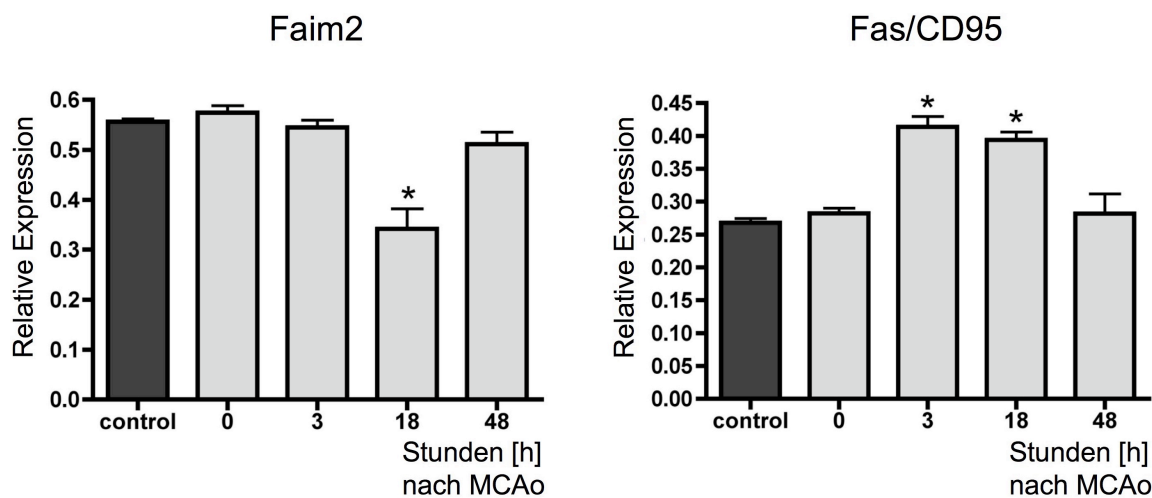


Abbildung 3.2: Expression von *Faim2*- und Fas/CD95-mRNA im zeitlichen Verlauf nach 30-minütiger MCAo. Das Hirngewebe wurde nach 3-, 18-, und 48-stündiger Reperfusion entnommen und mittels *real time PCR* analysiert. Dabei diente die kontralaterale (nicht-infarzierte Hirnhemisphäre) als Kontrolle. Die Grafiken zeigen eine signifikante Hochregulation von Fas/CD95 während 3 bis 18 Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie. Gleichzeitig wird *Faim2* in der Zwischenzeit signifikant herunter reguliert und erreicht ein Minimum bei 18 Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie. Nach 48 Stunden erreichen beide Moleküle wieder den Ausgangswert. 5 Versuchstiere wurden pro Zeitpunkt untersucht und jeweils drei wiederholende Messungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm SEM) dargestellt. Signifikanzanalyse: $*p < 0,001$ ipsilaterale Hemisphäre vs. Kontrolle (Zeitpunkte 18 h bzw. 3 h und 18 h).

(modifiziert publiziert in Reich et al. 2011, S. 229)

Die Abbildung 3.2 auf der vorherigen Seite gibt die aus dieser Untersuchung erhobene inverse Regulation von Faim2 und Fas/CD95 wieder. Dabei ist zu erkennen, dass der Fas/CD95-Rezeptor zwischen 3 und 18 Stunden nach 30-minütiger zerebraler Ischämie um ca. 50% hochreguliert ist, während Faim2 zum Zeitpunkt von 18 Stunden nach Ischämie signifikant herunter reguliert ist. Faim2 verbleibt bis einschließlich drei Stunden nach dem Ischämieereignis auf dem Ausgangsniveau und lässt erst zwischen 3 und 18 Stunden nach MCAo eine Änderung der Expression erkennen. Zum Zeitpunkt von 48 Stunden Reperfusionzeit nach Ischämie erreichen beide Proteine erneut nahezu den Ausgangswert. Als Kontrolle diente in diesem Versuch die kontralaterale, von der Ischämie nicht beeinflusste Gehirnhemisphäre.

3.2 Einfluss von Faim2 während milder fokaler zerebraler Ischämie

Zunächst wurden Faim2-defiziente Versuchstiere und Wildtypen der 30-minütigen Okklusion der *A. cerebri media* (sog. *milde Ischämie*) unterzogen, um folgend das topisch-anatomische, das zeitliche und das histologische Profil des Infarktareals zu untersuchen. Durch Vorarbeiten von Endres et al. (1998a) war bekannt, dass in der milden Ischämie nach 30-minütiger Okklusionszeit der maximale Zelluntergang nach einer Reperfusionzeit von 72 Stunden zu beobachten ist. Hinsichtlich der Quantität apoptotischer Zellen spielt insbesondere das direkt um die Infarktzone liegende Areal, die sog. Penumbra, eine wichtige Rolle, während zu späteren Zeitpunkten auch in diesem Areal die Anzahl apoptotischer Zellen wieder abnimmt (Endres et al. 1998a). Aufgrund dieser Vorüberlegungen wurde das Reperfusionzeitintervall nach MCA-Okklusion auf 72 Stunden festgelegt.

Stichprobenartig wurden jeweils 2 von 8 Versuchstieren während der Versuchsreihen auf physiologische Parameter untersucht, sodass ein Unterschied in arteriellem Blutdruck, Herzfrequenz, Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO_2) zwischen Faim2^{-/-} und Faim2^{+/+} ausgeschlossen werden konnte (siehe Tabelle 3.1 auf der nächsten Seite). Es ist zu erkennen, dass zwischen den Versuchsgruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede bzgl. der Hämodynamik, respiratorischen Funktion und des pH-Wertes bestanden.

Das zeitliche Profil des Einflusses von Faim2 während der fokalen zerebralen Ischämie wurde in Abschnitt 3.1.2 und Abbildung 3.2 auf der vorherigen Seite beschrieben.

Zur topisch-anatomischen Untersuchung wurden die Gehirne zunächst nach Ablauf

Tabelle 3.1: Physiologische Parameter der Faim2^{-/-}- und Faim2^{+/+}-Versuchstiere im Vergleich

	Faim2 ^{+/+}	Faim2 ^{-/-}
art. Blutdruck (<i>basal</i>)	90,8 ±1,9	93,4 ±4,0
art. Blutdruck (<i>MCAo</i>)	95,3 ±3,7	92,1 ±4,3
pH (<i>MCAo</i>)	7,3 ±0,01	7,31 ±0,02
pCO ₂ (<i>MCAo</i>)	41,4 ±2,9	41,7 ±2,2
pO ₂ (<i>MCAo</i>)	97,9 ±7,4	94,4 ±5,0

der 72-stündigen Reperfusion in 20 μm starke koronare Sektionen mit dem Kryostat geschnitten und anschließend mittels HE-Färbung (vgl. Abschnitt 2.6.4 auf Seite 43) aufgearbeitet. Bereits makroskopisch ist mit dieser Methode das Ischämieareal zu erkennen (Abbildung 3.3 auf der nächsten Seite). Um das Infarktareal weiter zu charakterisieren und die Größe zu quantifizieren, wurde eine computergestützte Volumetrie durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.6.5 auf Seite 44).

Ein wichtiger Faktor bei der Auswertung der Infarktgröße war der Ödemindex, da die ischämische (ipsilaterale) Hirnhemisphäre proportional zur Infarktgröße ödematös aufgetrieben ist. Um die ödematöse Schwellung des Hirngewebes jedoch nicht in die Volumetrie des Infarkts einzubeziehen, fungierte die kontralaterale Hirnhemisphäre als Referenz. Der daraus errechnete Ödemindex E_{Index} ermöglichte die Darstellung des tatsächlichen Infarktolumens ohne Ödemanteil. Die Berechnung ist in Formel 2.5 in Abschnitt 2.6.5 auf Seite 44 dargestellt.

Die weitere histologische Aufarbeitung erfolgte zum einen über bekannte zelluläre Marker wie TUNEL-Färbung, 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (*BrdU*) und Caspase-8 und -3, die jeweils spezifisch unterschiedliche Stadien der zellulären Aktivität bzw. Abschnitte in der Apoptose-Transduktion anzeigen und zum anderen über neuronenspezifische Marker wie das *Neuron-specific nuclear protein* (*NeuN*). Während des stereotaktischen lentiviralen Gentransfers mit einem rekombinanten Lentivirus wurden zur Bestätigung der selektiven neuronalen Infektion zusätzlich zytologische Marker, wie das mikrogli- und makrophagenspezifische Iba-1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) oder das gliazellenspezifische Protein GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), verwendet.

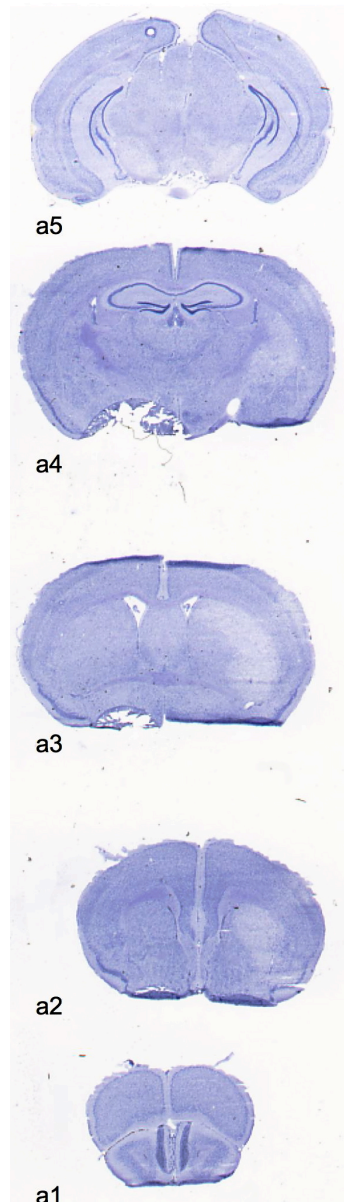


Abbildung 3.3: Makroskopische Darstellung des Infarktareals mittels HE-Färbung nach MCAo. In der linken Hemisphäre ist ab a2 bis a4 das Ischämieareal (aufgehellter Bereich) im Striatum bis in den Kortex (a3 und a4) reichend zu erkennen.

3.2.1 Vergrößertes Infarkt volumen bei Faim2-Defizienz

Nach milder zerebraler fokaler Ischämie zeigte sich, nach dem Schneiden der Gehirne im Kryostaten und anschließender Aufarbeitung der Hirnschnitte mittels HE-Färbung, in der computergesteuerten Volumetrie bei den Faim2-defizienten Tieren (n=11) im Vergleich zu den Wildtypen (n=8) ein signifikant größeres Infarktareal. In wiederholten Versuchsreihen (jeweils n=9) bestätigte sich das signifikant größere

Infarktverhalten bei Faim2-Defizienz. Die Abbildung 3.4 zeigt den bereits makroskopisch erkennbaren Unterschied zwischen Faim2^{-/-} und Faim2^{+/+}. Mit der Größe des

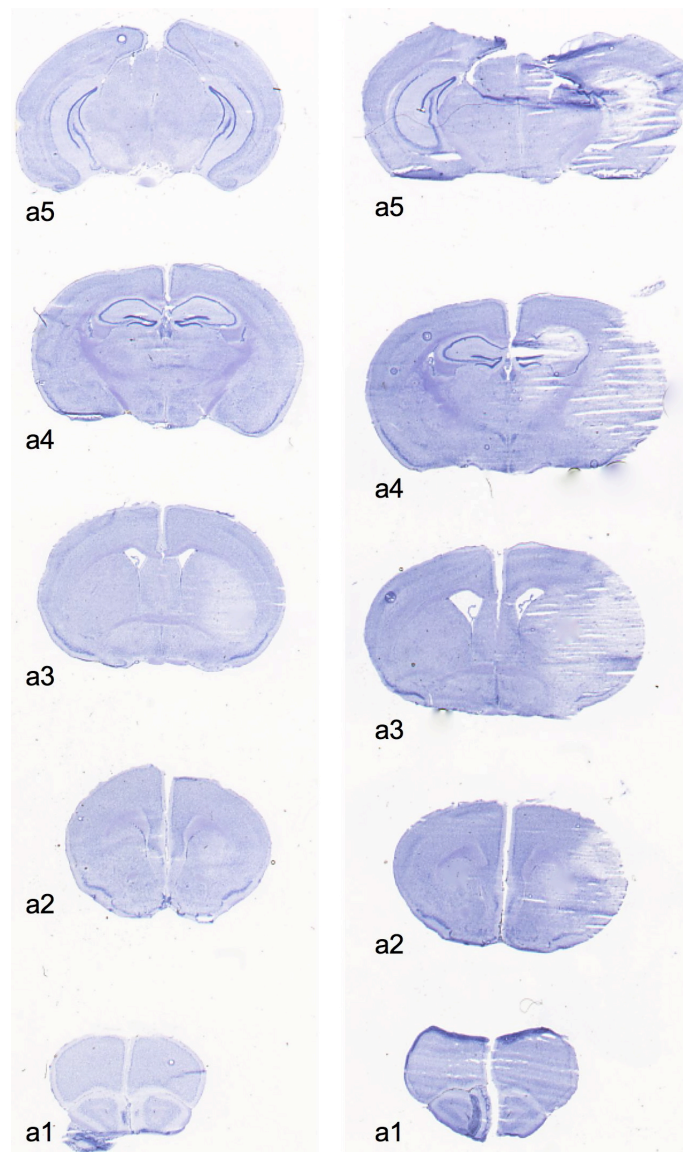


Abbildung 3.4: Infarktverhalten von Faim2^{+/+}- (links) und Faim2^{-/-}-Versuchstieren (rechts) nach milder fokaler zerebraler Ischämie. Das Ausmaß des Infarktareals ist bei Faim2^{-/-} stärker ausgeprägt. Die Gewebetextur wird aufgrund des ebenfalls ausgeprägteren Ödems weicher und lockerer, daher erscheinen insbesondere die Sektionen a4 und a5 zum Teil zerrissen. Die Ausbreitung des Infarkts in den umliegenden Kortex ist zu erkennen. Weiterhin zeigt sich eine Ausbreitung in die Hippokampusregion.

(modifiziert publiziert in Reich et al. 2011, S. 230)

Infarktverhaltens stieg auch der Umfang des Ödems und die damit verbundene Schwellung der infarzierten Gehirnhemisphäre. Dies ist an der Gewebetextur in den gezeigten Schnitten, insbesondere Sektionen a4 und a5, zu erkennen. Die ödembedingte

Vulnerabilität des Gewebes erschwerte die histologische Aufarbeitung, sodass teilweise Geweberisse beim Schneiden mit dem Kryostaten auftraten. Die makroskopische Ausbreitung des Infarkts in den umliegenden Kortex war bei den Faim2-defizienten Versuchstieren zu erkennen, während eine derartige Infarktausdehnung bei den Wildtypen nicht beobachtet werden konnte. Weiterhin zeigte sich eine Ausbreitung in die Hippokampusregion, die normalerweise zumindest zusätzlich von der *A. cerebri posterior* versorgt wird. Die Ausbreitung des Schlaganfalls bis in die Hippokampusregion konnte bei ca. der Hälfte der Faim2^{-/-}-Mäuse beobachtet werden.

Die Infarktflächen auf den jeweiligen koronaren Sektionen a1-a5 (vgl. Abbildung 8.4 in Abschnitt 8.7 auf Seite 128) weisen deutliche Unterschiede bzgl. der Ausdehnung und Größe auf. Signifikant größer ist die Infarktfläche bei Faim2^{-/-}-Versuchstieren ($p = 0,001$) auf Sektionsebene in Sektion a2 (Abbildung 3.5). Vergleicht man die

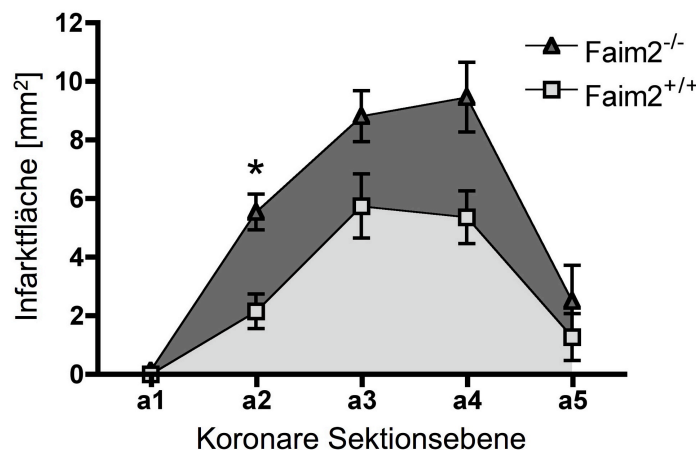


Abbildung 3.5: Vergleich der Infarktflächen der jeweiligen koronaren Sektionen bei Faim2^{+/+}- ($n = 11$) und Faim2^{-/-}-Versuchstieren ($n = 9$) nach milder fokaler zerebraler Ischämie. Bei der Signifikanzanalyse mittels *One-way ANOVA* wird in Sektion a2 eine Signifikanz ($*p = 0,01$) errechnet. Für die restlichen Sektionen wird eine deutliche Tendenz, aber keine Signifikanz erreicht.

se Beobachtungen mit den Beobachtung des Infarktareals bei ansonsten vollständig gesunden Tieren aus Versuchsreihen zu unterschiedlichen Okklusionszeiten von der Arbeitsgruppe von Prof. M. Endres der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, ist das Ausmaß der Infarktgröße bei Tieren, die einer 30-minütige Okklusionszeit der *A. cerebri media* und anschließend 72 Stunden Reperfusion unterzogen worden sind, äquivalent mit denen des Faim2-Wildtypen. Eine Ausbreitung in die Hippokampusregion und in den Kortex wurde bei 30-minütiger Okklusionszeit in großen Wildtypkontrollkollektiven nicht beobachtet. Bei längeren Okklusionszeiten der *A. cerebri media*, die im Rahmen von Vorversuchen der vorliegenden Arbeit

durchgeführt worden sind, zeigte sich nur bei 1 von 5 Versuchstieren ein derartig ausgeprägtes Infarktareal, nachdem das Filament für 72 Stunden (bis zur Dekapitation) in der Position an der *A. cerebri media* belassen und somit die Ischämiezeit von 30 Minuten auf 72 Stunden erhöht worden war (Modell der permanenten Okklusion). Die restlichen 4 Tiere wiesen zwar vergrößerte Infarktareale auf, diese waren jedoch nahezu vollständig auf das Striatum und nur teilweise den umgebenden Kortex in Sektion a3 beschränkt. Die ödematöse Hirnschwellung der infarzierten Hemisphäre war ebenfalls vergrößert.

Die Grafik 3.6 zeigt den signifikanten Unterschied ($p = 0,0009$) der Infarktvolu-
mina mit einem Mittelwert von $20,81 \text{ mm}^3 \pm 2,97$ bei $\text{Faim2}^{+/+}$ -Versuchstieren und $42,21 \text{ mm}^3 \pm 3,99$ bei $\text{Faim2}^{-/-}$ -Tieren.

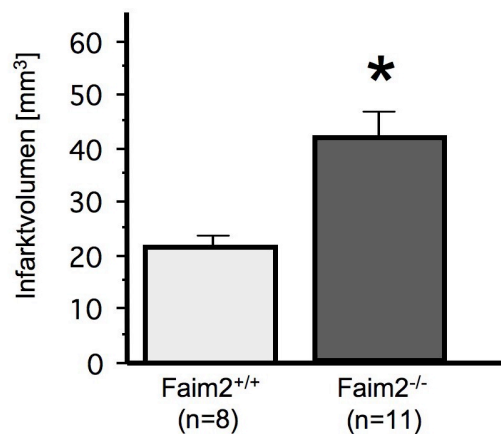


Abbildung 3.6: Grafik des Infarkt volumens von $\text{Faim2}^{-/-}$ ($n = 11$) und $\text{Faim2}^{+/+}$ -Tieren ($n = 8$) nach milder fokaler zerebraler Ischämie; Signifikanzanalyse: $*p = 0,0009$

3.2.2 Histologische Veränderungen im Infarktareal

Als Marker für die Ausarbeitung des histologischen Profils im ischämisch-geschädigten Infarktareal, wurde die *in-situ*-Markierung der nukleären DNA-Fragmentation mit TUNEL-Färbung (siehe Abschnitt 2.6.6 auf Seite 47) gewählt. Hierdurch können Doppelstrangbrüche in der DNA detektiert werden (Gavrieli et al. 1992) und insbesondere bei der Detektion des verzögerten Zellschadens valide Daten zur Darstellung von in Apoptose befindlichen Zellen erhoben werden (Du et al. 1996, Endres et al. 1998a). Da diese Methode eine breite Anwendung zur Detektion von ischämisch-bedingtem Zellschaden findet, wurde sie in einer Reihe von Studien kritisch evaluiert (Charriaut-Marlangue und Ben-Ari 1995, Labat-Moleur et al. 1998). In den vorliegenden Aus-

wertungen wurden lediglich Zellen mit einem starken nukleären TUNEL-Signal sowie kondensiertem Chromatin als positiv gewertet. Zellen mit fehlendem oder einem schwachen zytoplasmatischen bzw. schwachen nukleären Signal wurden als TUNEL-negativ gewertet.

Die Abbildung 3.7 zeigt den Vergleich der Infarktausdehnung zwischen Faim2-defizienten Versuchstieren und Wildtypen hinsichtlich TUNEL-positiver Zellen. Bei Faim2-Defizienz ist eine deutlich größere Ausdehnung des Apoptoseareals zu erkennen, welches sich über das Striatum hinausreichend bis in den umliegenden Kortex erstreckt.

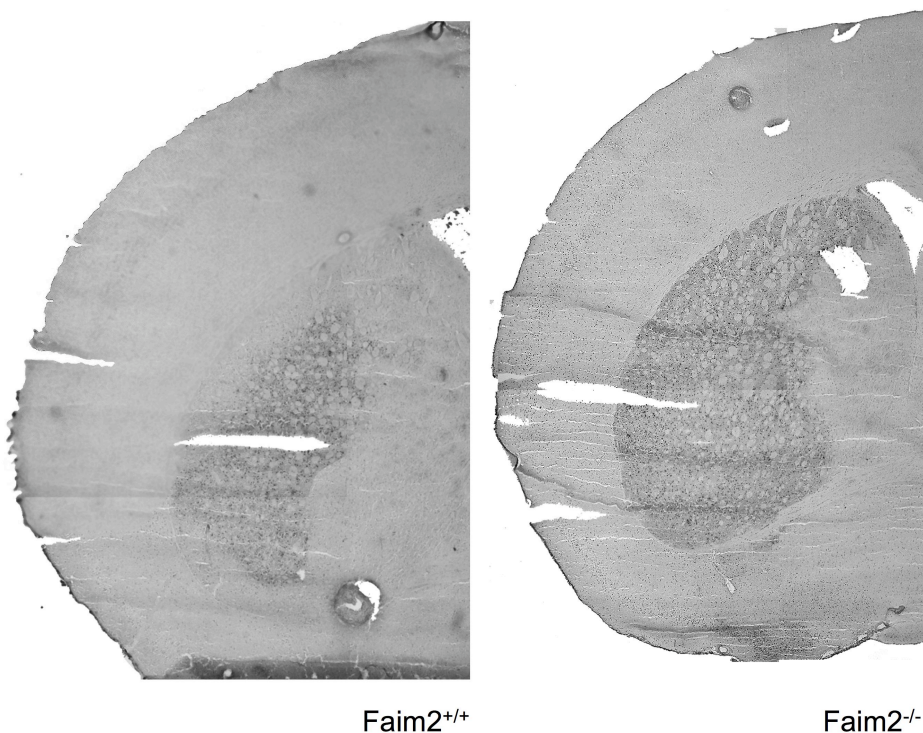


Abbildung 3.7: Darstellung des Infarktareals anhand TUNEL-positiver Zellen eines Faim2-defizienten Tieres und eines Wildtyps im Vergleich. Mittels DAB sind die TUNEL-positiven Zellen sichtbar gemacht worden. Die schwarzen punktförmigen Strukturen weisen auf eine TUNEL-positive Zelle hin. Bei Faim2-Defizienz ist eine deutlich größere Anzahl und vergrößerte Ausdehnung (bis in den umliegenden Kortex reichend) des apoptotischen Areals zu erkennen.

Die absolute Anzahl und die Dichte der apoptotischen Zellen in der infarzierten Hemisphäre (inkl. Kortex) wurde stereologisch bestimmt und ist in Abbildung 3.8 auf der nächsten Seite dargestellt. Diese beschreibt den signifikanten Unterschied im Vergleich zwischen Faim2-defizienten Tieren und Wildtypen. Danach leiten signifikant mehr Zellen die Apoptose ein, wenn Faim2 als Inhibitor der Apoptose-Signaltransduktion fehlt.

In den Abbildungen 3.8 und 3.9 ist die Dichte der TUNEL-positiven Zellen im In-

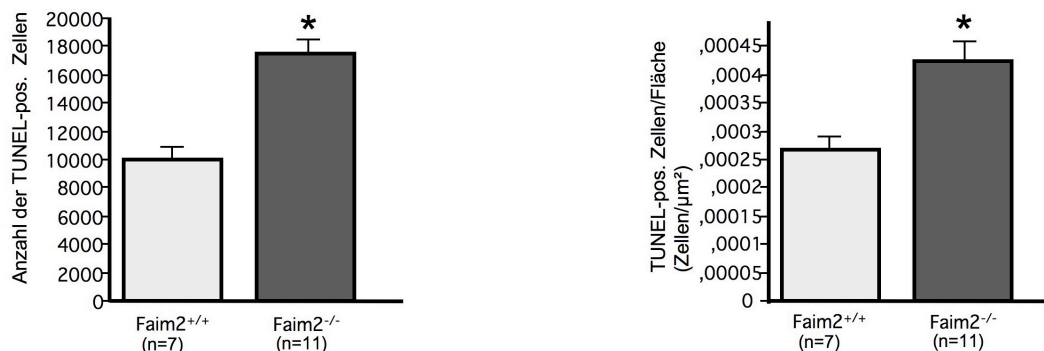


Abbildung 3.8: Vergleich zwischen Faim2-defizienten Tieren und Wildtypen bzgl. der absoluten Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der infarzierten Hemisphäre (Grafik links) und Dichte der TUNEL-positiven Zellen in der infarzierten Hemisphäre (Grafik rechts). TUNEL-positive Zellen/Hemisphäre: Faim2^{+/+}: 10030 ± 815,1 (n=7), Faim2^{-/-}: 17550 ± 890,3 (n=11); Signifikanzanalyse: * $p < 0,0001$ (Grafik links); * $p = 0,003$ (Grafik rechts)

farktareal dargestellt. Die bereits oben angesprochene signifikant erhöhte Dichte apoptotischer Zellen im Infarktareal der Faim2-defizienten Versuchstiere im Vergleich zu den Wildtypen, ist hier deutlich zu erkennen. Somit ist die stereologisch gemessene

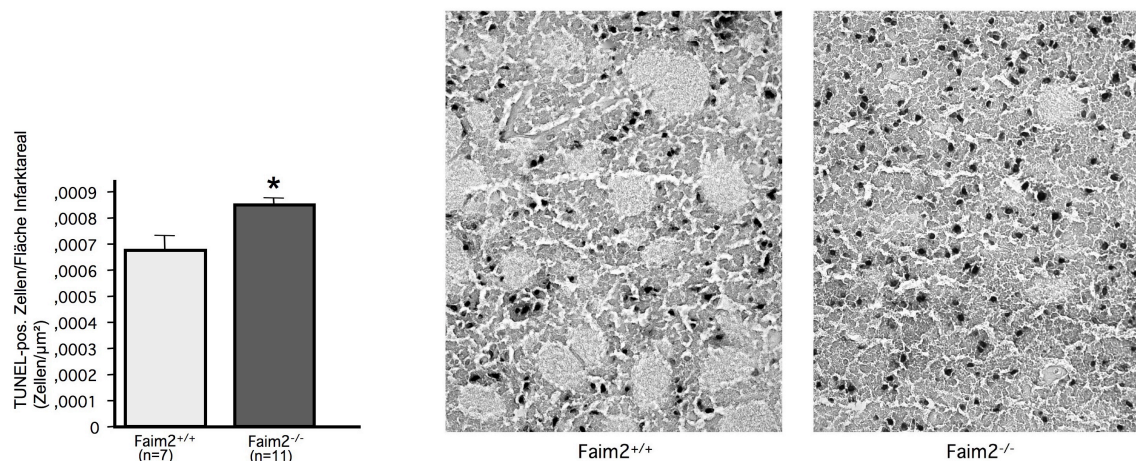


Abbildung 3.9: Vergleich zwischen Faim2-defizienten Tieren und Wildtypen bzgl. der Dichte TUNEL-positiver Zellen im Infarktareal. Die Grafik links zeigt den signifikanten Dichteunterschied apoptotischer Zellen im Infarktareal. Die beiden Bildausschnitte rechts geben die Dichte im Striatum des Infarktareals wieder. Mittels DAB wurden hier die TUNEL-positiven Zellen schwarz eingefärbt. TUNEL-positive Zellen/mm³ Infarkt x 104: Faim2^{+/+}: 0,3364 ± 0,0287 (n=7), Faim2^{-/-}: 0,4252 ± 0,0129 (n=11), Signifikanzanalyse: * $p = 0,0057$

absolute Anzahl apoptotischer Zellen nicht nur aufgrund der Ausbreitung der Fläche

in der infarzierten Hemisphäre bei Faim2-Defizienz erhöht, sondern auch aufgrund ihrer Dichte innerhalb des Infarktareals.

Zur genaueren Untersuchung des Ausmaßes der Schädigung und zur Charakterisierung des Zellprofils wurden die Schnitte weiter histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet. Um den Zelltyp der apoptotischen Zellen zu identifizieren, wurden Doppelfärbungen gegen TUNEL und einen zellspezifischen Marker verwendet. Für den Nachweis von Neuronen kam dabei das in adulten Neuronen exprimierte *Neuron-specific nuclear protein (NeuN)* zum Einsatz. Die Abbildung 3.10 zeigt die Doppelfärbung gegen TUNEL/NeuN im Vergleich Faim2-defizienter Tiere und Wildtypen. In den beiden unteren Bildabschnitten sind Neurone mittels NeuN grün angefärbt.

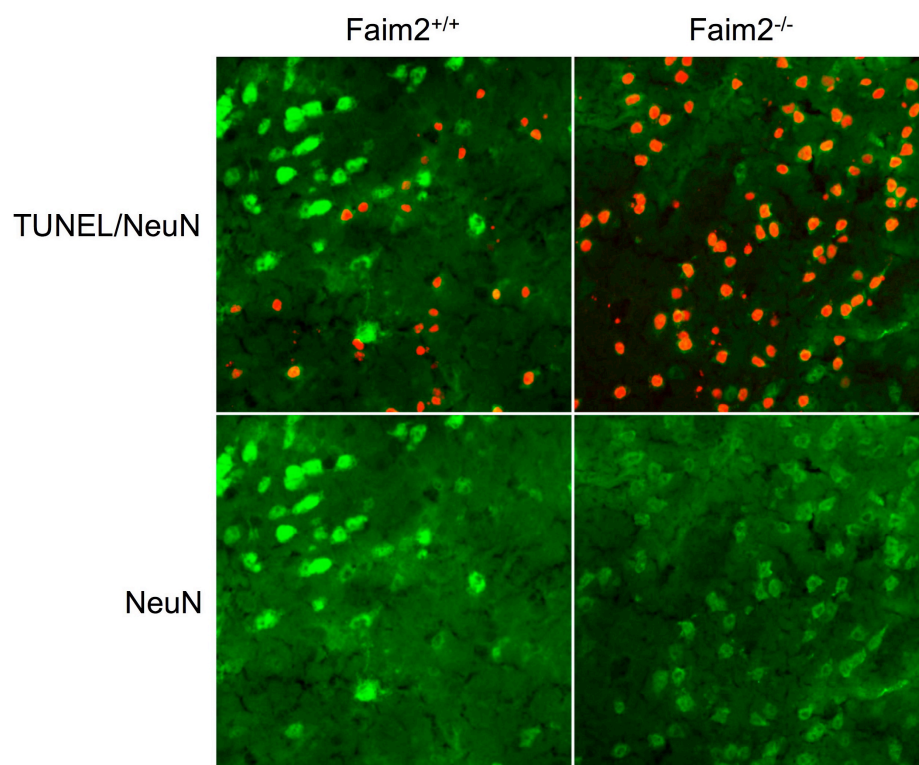


Abbildung 3.10: Doppelfärbung gegen TUNEL/NeuN im Vergleich Faim2^{-/-}- und Faim2^{+/+}-Versuchstiere. In den beiden unteren Bildabschnitten ist NeuN grün angefärbt, die Neurone sind deutlich zu erkennen. In den beiden oberen Bildabschnitten sind TUNEL-positive Zellen rot markiert. Eine Überlagerung von rotem und grünem Farbstoff markiert ein TUNEL-positives Neuron und weist damit auf einen neuronenspezifischen Zellschaden hin.

(modifiziert publiziert in Reich et al. 2011, S. 230)

In den beiden oberen Bildabschnitten sind TUNEL-positive Zellen rot markiert. Eine Überlagerung von rotem und grünem Farbstoff markiert ein TUNEL-positives Neuron und weist damit auf einen neuronenspezifischen Zellschaden hin. Im Vergleich zwischen Faim2^{-/-}- und Faim2^{+/+}-Versuchstieren ist der quantitative Unterschied und

die höhere Dichte an TUNEL-positiven Zellen bei Faim2-Defizienz zu erkennen.

Es wurden des Weiteren Doppelfärbungen gegen NeuN und aktivierte Caspase-8 und

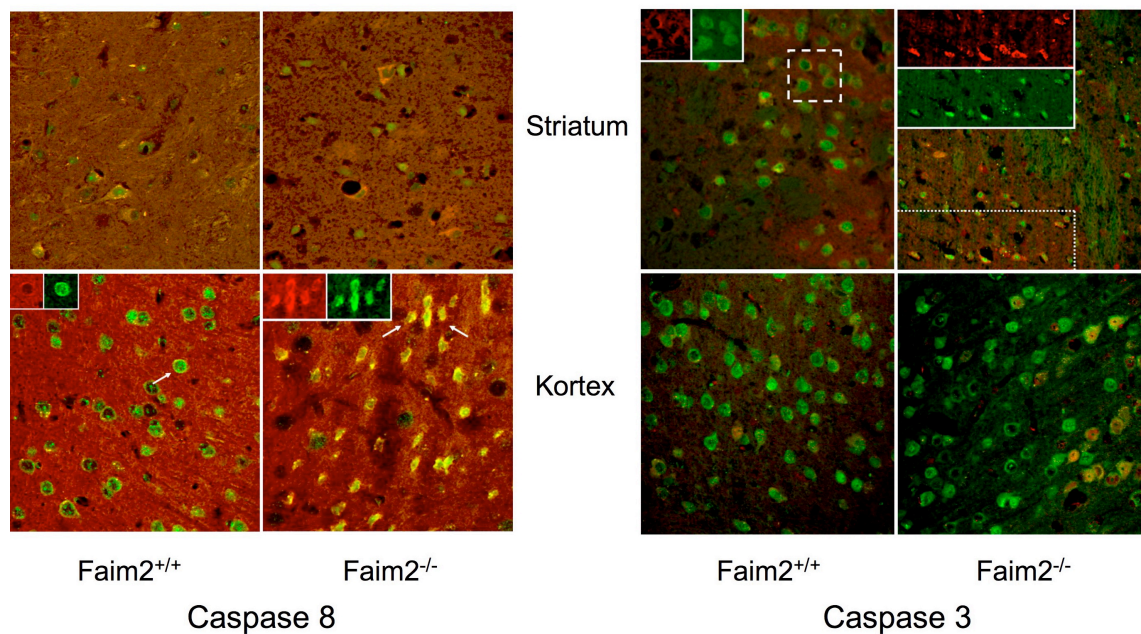


Abbildung 3.11: Konfokale Immunofluoreszenz 16 Stunden nach 30-minütiger MCAo. Caspase-8 (links) (Doppelfärbung von NeuN (grün) und aktivierter Caspase-8 (rot); Bildgröße: $200 \times 200 \mu\text{m}$) und Caspase-3 (rechts) (Doppelfärbung von NeuN (grün) und aktivierte Caspase-3 (rot); Bildgröße: $275 \times 275 \mu\text{m}$). Vergleichend Faim2-defiziente Versuchstiere und Faim2-Wildtypen, ist jeweils ein Bildausschnitt aus dem Striatum als Infarktzentrum bei der MCAo und ein Bildausschnitt aus dem umgebenden Kortex als Penumbra dargestellt. Es zeigen sich deutlich die Formunregelmäßigkeiten, pyknotischen Zellen und das Zelldebridement der neuronalen Zellen bei Faim2-Defizienz als Hinweis auf einen erhöhten Zelluntergang.

(modifiziert publiziert in Reich et al. 2011, S. 231)

-3 durchgeführt, um sowohl die Zellspezifität als auch den Status der Zelle innerhalb der Caspase-Kaskade in Richtung Apoptose zu identifizieren. Aktivierte Caspasen sind durch proteolytische Spaltung und Dimerisierung einer Procaspase in einen aktivierten Zustand versetzte Proteasen (Tang et al. 2000). In der Abbildung 3.11 sind diese Doppelfärbungen nach einer Reperfusionzeit von 16 Stunden, nach vorangegangener 30-minütiger Ischämie, mit deutlichen Signalunterschieden zwischen Faim2-defizienten Versuchstieren und Wildtypen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich bereits zu diesem Zeitpunkt im Zentrum des Ischämieareals (Striatum) die Signalstärke allgemein verschlechterte, während sie in der Penumbra (umgebender Kortex) noch ausgeprägt war. Da eine Quantifizierung der Caspase-8- und -3-positiven Zellen nicht möglich war, standen hier die morphologischen Veränderungen im Vordergrund. Hierbei zeigte sich in einer qualitativen Untersuchung eine deutliche Mehrzahl an Zel-

len mit Formunregelmäßigkeiten und pyknotischem Erscheinungsbild der NeuN- und Caspase-positiven Zellen bei Faim2-Defizienz.

Die vor der MCA-Okklusion verabreichte i.p. Injektion von 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU) (Injektionsprotokoll siehe Abschnitt 2.5.5 auf Seite 42) bereitete die im Anschluss an die Reperfusionphase durchgeführte Färbung gegen BrdU vor. Durch die BrdU-Markierung werden teilungsaktive Zellen im reaktiven Zeitfenster des ischämischen Schadens markiert. 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin dient als ein Thymidinanalogon und wird in die replizierende DNA eingebaut. Während der physiologischen Funktionen einer Zelle geht man davon aus, dass diese den Zellzyklus beendet hat und insbesondere Neurone nicht in der Lage sind den Zellzyklus wieder aufzunehmen - sog. G0-Phase/Ruhephase (Tixier-Vidal 1994). Allerdings zeigten vermehrt Untersuchungen, dass insbesondere in der Penumbra Neurone auch nach Abschluss der Embryonalentwicklung eine Aktivierung und Wiederexpression von zellzyklusrelevanten Genen aufweisen (Cramer und Chopp 2000). Innerhalb der 4 Zyklen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) wird DNA nur während der S-Phase repliziert. Somit gilt BrdU als ein Marker der S-Phase des Zellzyklus und der immunhistochemische Nachweis von BrdU gilt als Marker für DNA-Replikation sowohl im embryonalen als auch adulten Nervensystem (Thomaidou et al. 1997, Kornack und Rakic 1999). Der Proliferationsmarker BrdU wird daher auch als Marker für Neurogenese verwendet (Kempermann et al. 1998). Die Abbildung 3.12 zeigt quantitativ die Unterschiede BrdU-positiver

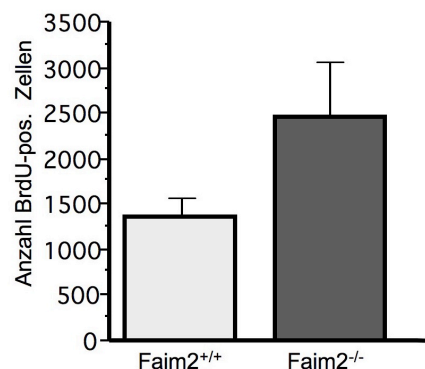


Abbildung 3.12: BrdU-positive Zellen im Infarktareal und Penumbra (Striatum). Es zeigt sich ein nicht-signifikanter ($p = 0,0974$) Unterschied mit jedoch deutlichem Trend an BrdU-positiven Zellen im Infarktareal und der umgebenden Penumbra im Vergleich zwischen Faim2^{-/-} und Faim2^{+/+} (jeweils $n=9$).

Zellen im Infarktareal und der Penumbra zwischen Faim2-defizienten Tieren und Wildtypen auf. Zwar konnte eine Signifikanz nicht erhoben werden ($p = 0,0974$),

es zeigte sich jedoch bei kleiner Fallzahl (jeweils $n=9$) ein deutlicher Trend.

3.3 Regulation der Apoptose durch Faim2

Wie bereits dargestellt unterliegt die Apoptose komplexen Regulationsmechanismen. Über den Fas/CD95-Rezeptor und seinen Liganden wird nach der Komplexbildung die Aktivierung der Caspase-Kaskade eingeleitet, sofern diese Aktivierung nicht verhindert wird. Während die Familie der *Fas apoptotic inhibitory molecules 1, 2* und *3* ihre hemmende Wirkung direkt am Fas/CD95-Rezeptor entfalten, wirken weitere Proteine regulatorisch in der Initiations- bzw. Amplifikationsphase. Damit greift das in der vorliegenden Arbeit im Fokus stehende Protein *Faim2* noch vor der Aktivierung des *Fas-associated death-domain-containing protein (FADD)* ein (Fernandez et al. 2007, Somia et al. 1999), sodass die Aktivierung der Caspase-8 als wichtiger Einleitungsschritt der weiteren Apoptose-Kaskade nicht erreicht wird. Während die Caspase-8-Aktivierung innerhalb der Initiationsphase eine frühe und wegweisende Rolle spielt, markiert die Aktivierung der Caspase-3 das Ende der Amplifikationsphase und damit die Einleitung der irreversiblen Exekutionsphase.

Zur Evaluation des proximal-inhibitorischen Effekts von *Faim2* auf die apoptotische Fas/CD95-Signalkaskade wurden neben der TUNEL-Reaktivität (vgl. Abschnitt 3.2.2 auf Seite 60) auch postischämische Caspase-8- und -3-Aktivität (*in vitro*) bzw. Spaltprodukte als Aktivierungsmarker genotypabhängig untersucht.

Die Aktivierung der Caspase-Kaskade gilt als wichtiger Nachweis Fas/CD95-induzierter Apoptose. Die Darstellung von aktivierter Caspase-8 und -3 gibt Hinweis darauf, ob die Apoptose-Signaltransduktion erfolgreich eingeleitet worden ist. Dabei wurde aufgrund der bereits beschriebenen örtlichen bzw. zeitlichen Unterschiede von Caspase-8 und -3 innerhalb der Caspase-Kaskade zunächst jeweils ein sog. *activity assay ex vivo* durchgeführt (vgl. Reich et al. 2011). Hierbei wurden *Faim2*^{-/-}- und *Faim2*^{+/+}-Mäuse (jeweils $n=3$) nach 30-minütiger MCAo und unterschiedlichen Reperfusionzeitpunkten (3 h, 8 h, 10 h, 20 h und 40 h) unter Analgosedierung perfundiert und anschließend aus Schnitten der ipsilateralen (ischämischen) Hirnhemisphäre die jeweilige Caspase-Aktivität bestimmt. Nach 20 Stunden Reperfusion konnte eine signifikant erhöhte Aktivität von Caspase-8 und -3 in den *Faim2*-defizienten Versuchstieren nachgewiesen werden (Abbildung 3.13 auf der nächsten Seite). Die kontralateralen Hirnhemisphären fungierten als Kontrolle.

Auch in der Doppelfärbung gegen NeuN/aktivierte Caspas-8 bzw. NeuN/aktivierte

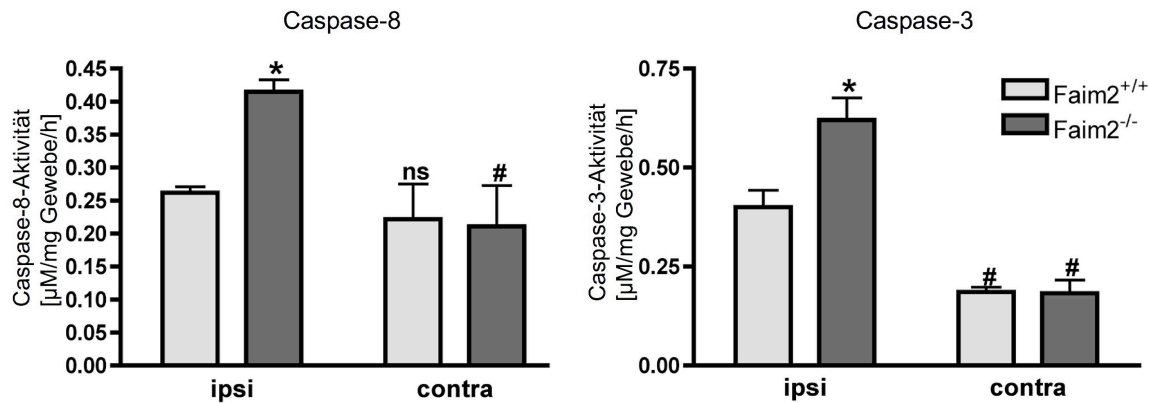


Abbildung 3.13: Caspase-8- und -3-Aktivität im Vergleich von Faim2-Defizienz und -Wildtyp 20 h nach 30-minütiger MCAo. Als Kontrolle diente jeweils die kontralaterale (contra) Hirnhemisphäre, während die ipsilaterale (ipsi) diejenige mit einem Infarktareal darstellt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus jeweils $n=3$ dargestellt. Signifikanzanalyse mittels *Two-way ANOVA*, gefolgt von *Tukey posthoc Analyse* ergibt für *Caspase-8*: $*p = 0,004$ bei ipsilateral Faim2^{+/+} vs. Faim2^{-/-} und $\#p = 0,01$ bei entsprechendem Vergleich ipsilateral vs. contralateral bei Faim2^{-/-}. n.s. = *not significant* bei ipsilateral vs. contralateral Faim2^{+/+}. Für *Caspase-3*: $*p = 0,033$ bei ipsilateral Faim2^{+/+} vs. Faim2^{-/-} und $\#p = 0,009$ bei entsprechendem Vergleich ipsilateral vs. contralateral bei Faim2^{-/-} und Faim2^{+/+}.

(modifiziert publiziert in Reich et al. 2011, S. 231)

Caspase-3 waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Die qualitativen Signalunterschiede mit ungleicher Ausbreitung vom Striatum ausgehend bis in den umgebenden Kortex reichend sind in Abbildung 3.11 auf Seite 64 aufgezeigt. Insbesondere die Mehrzahl an Zellen mit Formunregelmäßigkeiten und pyknotischem Erscheinungsbild stellt die höhere Apoptoserate bei Faim2-Defizienz heraus.

3.4 Einfluss der Faim2-Überexpression durch viralen Gentransfer auf neuronale Zellen

3.4.1 Charakterisierung des viralen Vektors zur stereotaktischen Injektion vor MCA-Okklusion

Durch die stereotaktische Injektion eines geeigneten Virus als Vektor für Faim2 in das Striatum und den Kortex konnte bei Nullmutanten Faim2 wieder lokal exprimiert bzw. überexprimiert und bei Wildtypen überexprimiert werden. Dies bedingte eine Reihe an Vorversuchen, um (1) ein geeignetes Virus (Adenovirus oder Lentivirus) zu wählen, (2) das optimale Zeitintervall zwischen Injektion und MCA-Okklusion zu

finden, (3) die Menge und Dosierung des zu injizierenden Virus zu bestimmen und (4) die genaue Lokalisation der Injektionsstelle zu identifizieren. Hinzu kommt, dass die stereotaktische Injektion bereits mit einem lokalen zerebralen Trauma einhergeht und die sich anschließende MCAo nochmals traumatisch auf das Hirngewebe wirkt. Zur Testung eines geeigneten Virus wurde sowohl ein Adenovirus- als auch ein Lentiviruskonstrukt für Faim2 entwickelt. Die ersten Versuche wurden mit einem Adenovirus durchgeführt. Die Versuchstiere wiesen, wie in Abbildung 3.14 dargestellt,

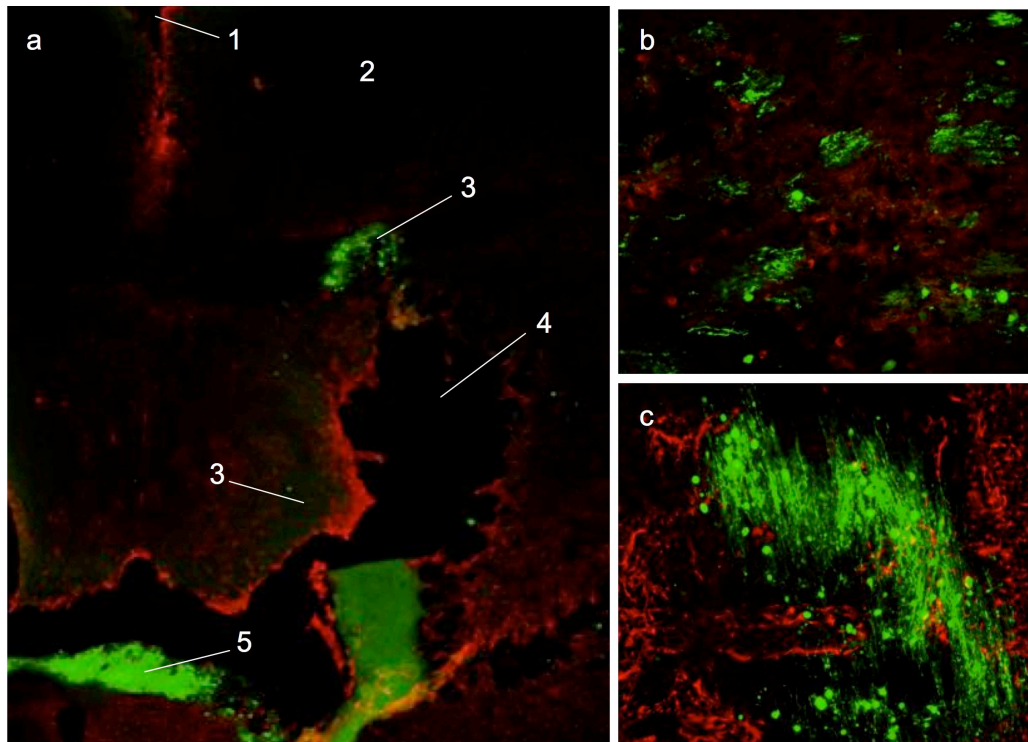


Abbildung 3.14: Darstellung des infizierten Gewebes im Striatum am Faim2/LFG-Adenovirus-Konstrukt - a GFP-pAdeno/GFAP-Doppelfärbung: 1 Linker Ventrikel; 2 gesundes Striatum; 3 im Striatum infizierte Zellen; 4 Destruktion durch Adenovirus; 5 freie Virusreste; b GFP-pAdeno/NeuN-Doppelfärbung; c GFP-pAdeno/Iba-1-Doppelfärbung

einen erheblichen Gewebeschaden auf. Dargestellt sind in **a** Doppelfärbung GFP-pAdeno/GFAP, in **b** GFP-pAdeno/NeuN Doppelfärbung und in **c** GFP-pAdeno/Iba-1 Doppelfärbung. Neben dem Ergebnis der erheblichen Destruktion durch das Adenovirus wurde durch die vorliegenden Färbungen auch nachgewiesen, dass eine neurospezifische Infektion nicht ausreichend erzielt werden konnte.

Aufgrund dieser destruktiven Eigenschaften des Adenovirus war ein zweites operatives Trauma durch die MCA-Okklusion nicht denkbar, da ansonsten die Auswertungen der Versuche allein durch das Ausmaß des Traumas verfälscht worden wären. Das Lentiviruskonstrukt erwies sich als weitaus weniger aggressiv gegenüber den infizierten Zellen. Die Abbildung 3.15 zeigt die Infektion durch das gewebeschonendere Lentivirus. In diesem Versuch wurde mittels Einfach- und Doppelfärbungen gegen **a** GFP,

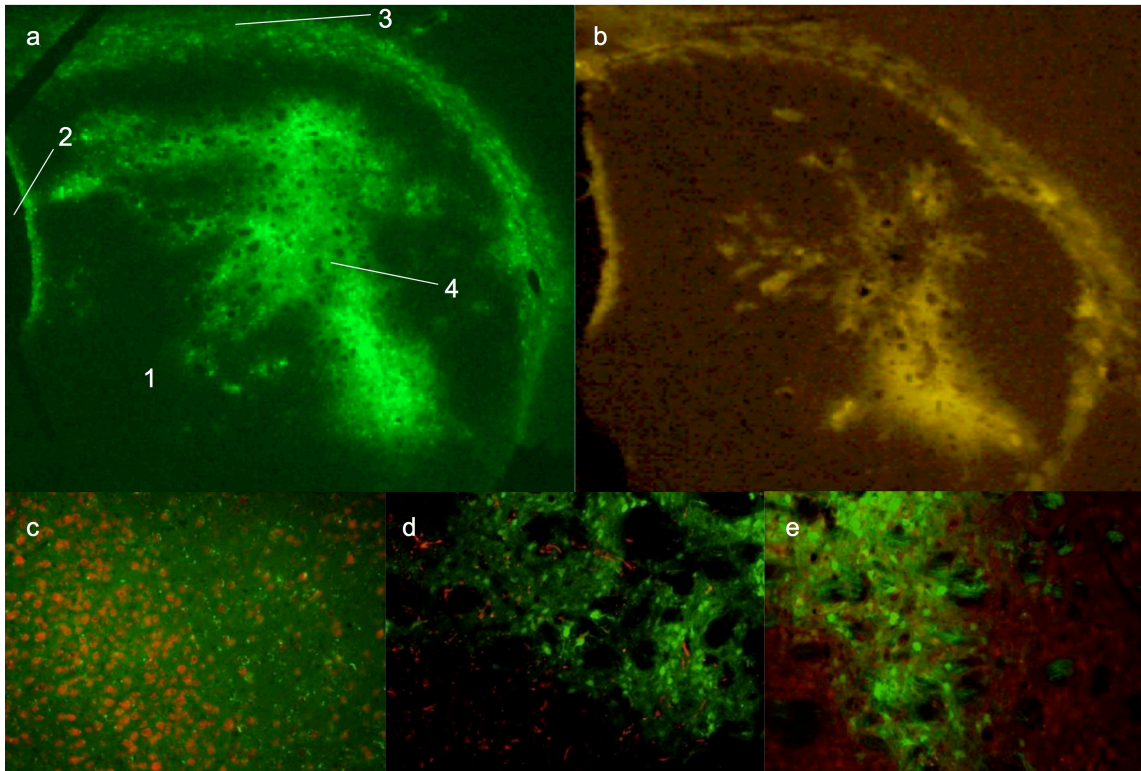


Abbildung 3.15: Darstellung der mit dem Faim2-Lentiviruskonstrukt infizierten Zellen im Striatum. **a** GFP-Färbung: 1 gesundes Striatum; 2 Linker Ventrikel; 3 *Corpus Callosum*; 4 mit Faim2-Lentivirus infiziertes Areal im Striatum; **b** Faim2-Färbung; **c** NeuN/GFP-pLenti-Doppelfärbung; **d** GFP/Iba-1-Doppelfärbung; **e** GFP/GFAP-Doppelfärbung.

(modifiziert publiziert in Reich et al. 2011, Supplemental Material)

b Faim2-Antikörper, **c** NeuN/GFP-pLenti, **d** GFP/Iba-1 und **e** GFP/GFAP eine neuronenspezifische Infektion durch das Lentivirus nachgewiesen. Weder in der Doppelfärbung mit dem gliazellenspezifischen Protein GFAP noch in der Doppelfärbung mit dem mikroglia- und makrophagenspezifischen Iba-1 konnte ein Überlagern des grünen Signals (GFP-pLenti) mit dem jeweils roten Signal beobachtet werden. Nur in der Doppelfärbung mit dem neuronenspezifischen NeuN mit GFP-pLenti wurde

eine Überlagerung der beiden farblich markierten Marker beobachtet und somit auf eine neuronenspezifische Infektion durch das Lentiviruskonstrukt geschlossen werden. In den Vorversuchen wurde das Lentivirus demnach als geeigneter für die Doppelbelastung einer stereotaktischen Injektion und folgender MCA-Okklusion identifiziert. Mithilfe des viralen Vektors sollte die Implementierung der genomischen Information zur Synthese von Faim2 in den neuronalen Zellen erreicht werden. Hierzu wird die Zelle auf herkömmlicher Art und Weise vom Virus infiziert und das Virusplasmid in die Zell-DNA integriert. Insbesondere Lentiviren haben sich als effizient im *in-vivo*-Gentransfer erwiesen und weisen eine hohe Spezifität für die Donorzelle auf (Dull et al. 1998). Die Abbildung 3.15 auf der vorherigen Seite belegt nicht nur die neuronenspezifische und gewebeschonende Infektion durch das Lentiviruskonstrukt, sondern auch eine im Verhältnis zur injizierten Virusmenge effiziente Infektionsrate und Ausbreitung im striatalen Infarktareal. Die beiden Bildabschnitte **a** und **b** der Abbildung 3.15 zeigen die flächige Ausbreitung des Viruskonstrukts innerhalb des Striatums. Der Gentransfer durch das Lentiviruskonstrukt erwies sich allerdings nicht nur im *in-vivo*- sondern auch im *in-vitro*-Versuch als erfolgreich (siehe Abschnitt 3.4.2 auf der nächsten Seite).

Nachdem das geeignete Virus identifiziert worden war, musste im 2. Schritt das geeignete Zeitintervall zwischen Injektion des Virus und Ischämie mittels MCA-Okklusion erarbeitet werden. Gleichzeitig wurden unterschiedliche Injektionsmengen und anatomische Injektionslokalisationen des Virus ermittelt. Dazu wurden 10, 15 und 20 Tage nach stereotaktischer Injektion des Virus die MCA-Okklusionen durchgeführt. Parallel dazu wurde eine Versuchsgruppe mit $1\ \mu\text{l}$ pro Injektionslokalisation und eine mit $2\ \mu\text{l}$ pro Injektionslokalisation des Virus (jeweils 697 WPRE-Moleküle/10.000 Aktin-Moleküle/ μl) bei gleicher Injektionsgeschwindigkeit an zwei Lokalisationen innerhalb des Striatums infiziert. Zur Auswertung der korrekten anatomischen Lokalisation der Injektionshöhe wurden diese beiden Versuchsgruppen wiederum in eine Gruppe an Tieren, die eine oberflächlichere Injektion in den Kortex und eine zweite tiefere Injektion in das Striatum erhielten, und eine zweite Gruppe, die jeweils nur eine tiefere Injektion in das Striatum erhielten, aufgeteilt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten die geringste Anzahl an während und nach der MCA-Okklusion verstorbenen Tiere bei einer Erholungsphase von 20 Tagen nach stereotaktischer Injektion. Die Injektion von Virus in den Kortex *und* in das Striatum rief eine wiederum zu große gewebliche Destruktion hervor. Bezüglich der zu injizierenden Menge wiesen $2\ \mu\text{l}$ keinen Vorteil und kein vergrößertes Infektionsareal gegenüber einer Injektion von nur $1\ \mu\text{l}$ auf. Daher wurde das möglichst schonende Verfahren gewählt. Hierbei

wurde jeweils 1 μl des Lentivirus an zwei Lokalisationen stereotaktisch direkt in das Striatum injiziert (siehe Tabelle 2.9 auf Seite 39). Im Anschluss wurde nach 20 Tagen die MCA-Okklusion durchgeführt und nach 72-stündiger Reperfusionzeit das Hirngewebe entsprechend aufgearbeitet und ausgewertet (siehe Abbildung 3.16 für den Versuchsablauf).

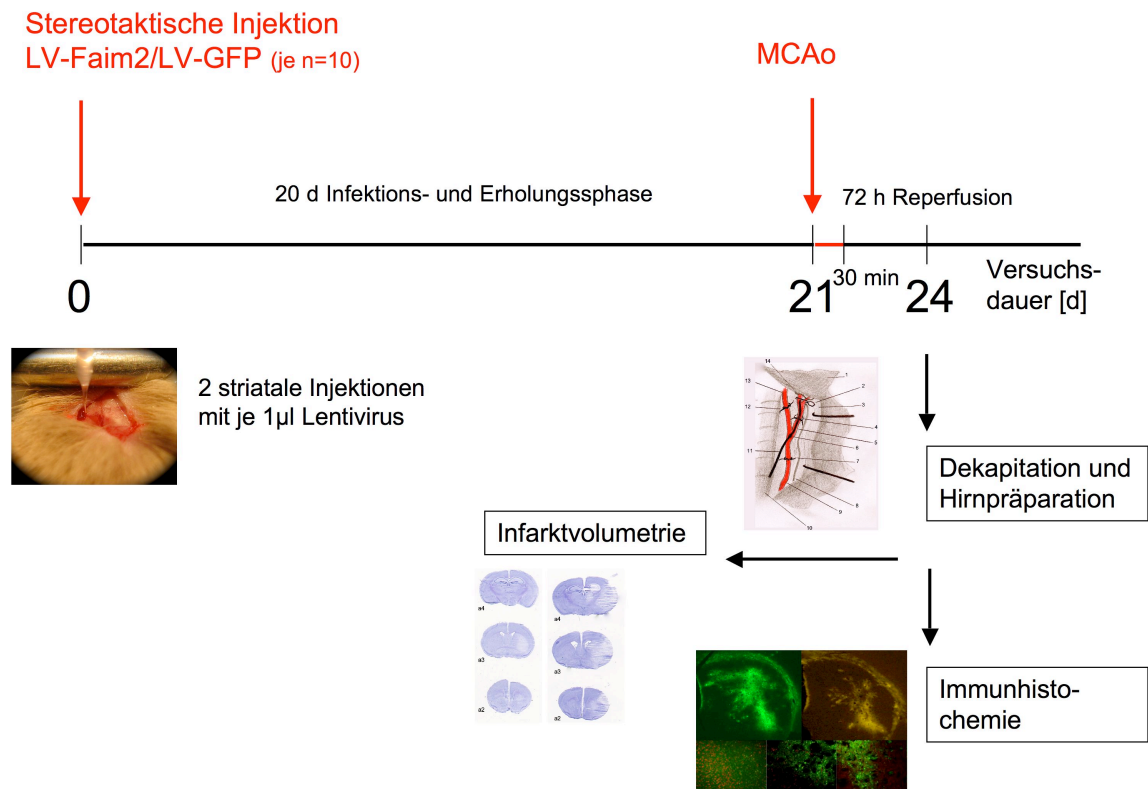


Abbildung 3.16: Versuchsaufbau des lentiviralen Gentransfers

3.4.2 Schutz vor Apoptose durch Überexpression von Faim2

Nach der stereotaktischen Injektion von lentiviralem Faim2 (LV-Faim2) wurde anschließend nach 20 Tagen die zerebrale fokale Ischämie mittels MCA-Okklusion induziert. Während in der volumetrischen Auswertung nach MCAo bei Versuchstieren ohne lentivirale Injektion ein signifikant größeres Infarktvolumen bei den Faim2-defizienten Versuchstieren als bei den Wildtypen zu beobachten war, konnte nach der vorherigen Injektion von LV-Faim2 ein im Vergleich zur Injektion lentiviraler Kontrollvektoren signifikant verkleinertes Infarktvolumen beobachtet werden. Die Abbil-

Abbildung 3.17 zeigt die Ergebnisse von Faim2-defizienten Versuchstieren und Wildtypen im Vergleich bei lentiviralem Gentransfer von Faim2. Als Kontrolle diente Lentivirus-GFP (LV-GFP). Dabei war zu erkennen, dass im Vergleich zur Kontrolle das Infarktvolume nach lentiviralem Gentransfer von Faim2 bei beiden Genotypen *in vivo* verringert ist. Sowohl die Wildtypen als auch die Faim2-defizienten Versuchstiere wiesen durch die lentivirusinduzierte Faim2-Überexpression ein signifikant verringertes Infarktvolume in Ausdehnung und Zellzahl apoptotischer Zellen auf. Die absolute Anzahl der apoptotischen Zellen wurde *in vivo* nicht quantifiziert, da jeweils nur eine lokale Expression von Faim2 durch den lentiviralen Gentransfer erreicht werden konnte.

Während in der Volumetrie ein geringeres Ausmaß des Schlaganfalls zu beobachten

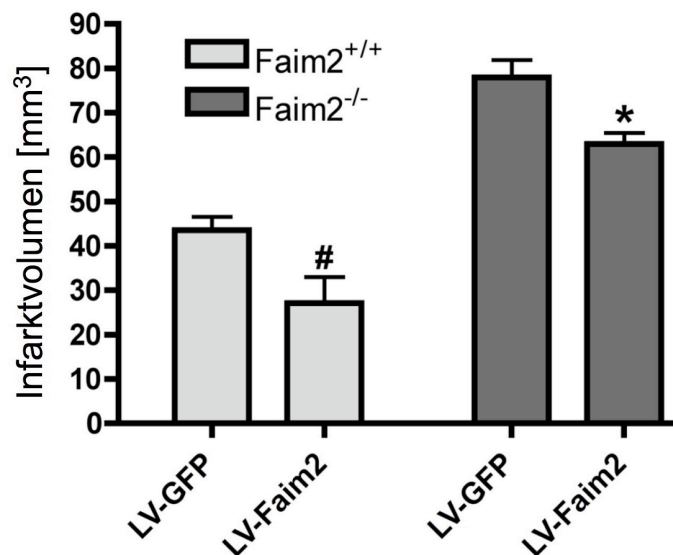


Abbildung 3.17: Grafische Darstellung des Infarktvolume von Faim2^{-/-} und Faim2^{+/+} im Vergleich nach Gentransfer von Faim2 mittels eines Lentiviruskonstrukts und MCAo 20 Tage nach stereotaktischer Injektion. Die Signifikanzanalyse mittels *Two way ANOVA* gefolgt von einem ungepaarten t-Test, zeigt ein signifikant kleineres Infarktvolume nach Gentransfer von Faim2 sowohl bei Faim2^{-/-} als auch bei Faim2^(+/+). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus jeweils n=5-8 pro Gruppe dargestellt. Infarktvolume: Faim2^{-/-} vs. Faim2^{+/+} $p < 0,0001$; LV-GFP vs. LV-Faim2 $*p = 0,0013$; Faim2^{+/+} vs. LV-GFP $\#p = 0,0218$; Faim2^{-/-} vs. LV-GFP $*p = 0,0126$.

(modifiziert publiziert in Reich et al. 2011, S. 230)

war, konnte in der *in-vitro*-Versuchsreihe auch ein erhöhtes Überleben der neuronalen Zellen beobachtet werden. Die *in-vitro*-Versuche wurden im Labor der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin in Zusammenarbeit mit Christoph Harms durchgeführt. Dabei wurden primäre kortikale Neurone in Zellkulturansätzen durch sog. *oxygen-glucose deprivation (OGD)* unter oxidativen Stress versetzt. In der

Abbildung 3.18 ist zu erkennen, dass signifikant mehr Wildtyp-Zellen ($Faim2^{+/+}$) überlebt haben als Zellen von Faim2-defizienten Versuchstieren ($Faim2^{-/-}$) (linke Grafik). Die rechte Grafik zeigt die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) während des Zelluntergangs im Rahmen des oxidativen Stress. LDH ist ein Marker für den Zelluntergang, da es als essentielles Enzym im Rahmen des Energiestoffwechsels einer jeden Zelle bei deren Untergang freigesetzt wird (Katchanov et al. 2001). Im Medium der neuronalen Zellen aus der $Faim2^{-/-}$ -Zelllinie war ein signifikant erhöhter LDH-Spiegel zu erheben. Daraus ist zu schlussfolgern, dass signifikant mehr Zellen der Faim2-defizienten Versuchstiere die Apoptose einleiteten.

Nach der Transduktion der neuronalen Zellen *in vitro* mit Faim2-Lentivirus und dem

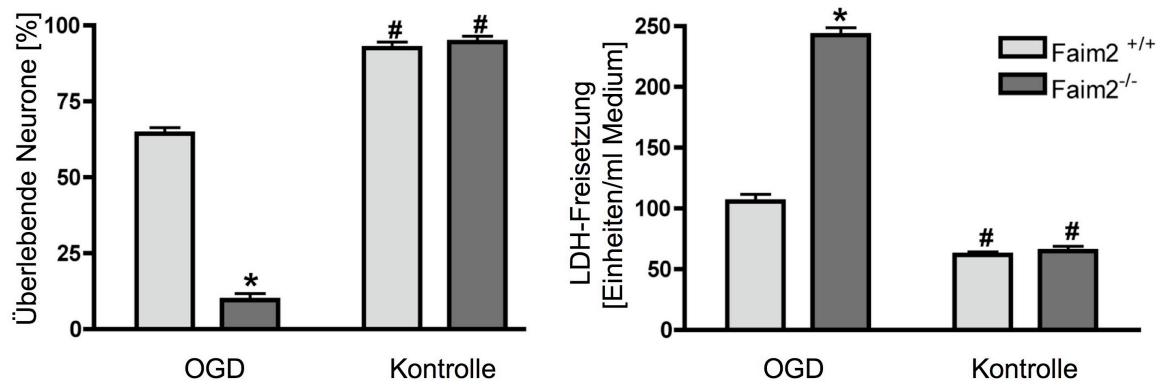


Abbildung 3.18: Grafische Darstellung des prozentualen Anteils überlebender primärer kortikaler Neurone nach OGD (linke Grafik) und der LDH-Freisetzung nach OGD (rechte Grafik) im Vergleich von $Faim2^{-/-}$ - und $Faim2^{+/+}$ -Versuchstieren. Es wurden ca. 500 Neurone pro Versuchsbedingung bzgl. der Viabilität in mindestens 8 mikroskopischen Gesichtsfeldern analysiert und in unabhängigen Versuchsansätzen wiederholt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mittels *Two-way ANOVA* gefolgt von einer *Tukey post-hoc-Analyse*: $Faim2^{-/-}$ vs. $Faim2^{+/+}$ $*p < 0,001$; jeweils Kontrolle vs. $Faim2^{-/-}$ bzw. $Faim2^{+/+}$ $\#p < 0,001$; Der LDH-Spiegel wurde 24 h nach OGD bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchsansätzen. Die Signifikanzanalyse erfolgte mittels *Two-way ANOVA* gefolgt von einer *Tukey post-hoc-Analyse*: LDH-Konzentration nach OGD $Faim2^{-/-}$ vs. $Faim2^{+/+}$ $*p < 0,001$; jeweils Kontrolle (LDH in neuronaler Zellkultur von $Faim2^{-/-}$ - bzw. $Faim2^{+/+}$ -Versuchstieren) vs. $Faim2^{-/-}$ bzw. $Faim2^{+/+}$ $\#p < 0,001$;

(modifiziert publiziert in Reich et al. 2011, S. 228)

damit verbundenen Gentransfer, zeigte sich auch auf zellulärer Ebene ein signifikant verringerter Zelluntergang nach OGD. Hierbei wies die $Faim2^{-/-}$ -Zelllinie primärer kortikaler Neurone, die von E16 Embryos der Faim2-defizienten Versuchstiere und Wildtypen stammend für 10 Tage *in vitro* kultiviert worden waren, nach Gentransfer sowohl durch das *Faim2-full length*- als auch das *Faim2-truncated*-Lentiviruskonstrukt, wenn auch nicht so effektiv, einen signifikanten Rückgang des Zelluntergangs im Vergleich zur Kontrollzelllinie ohne viralen Gentransfer auf. Die Abbildung 3.19 zeigt

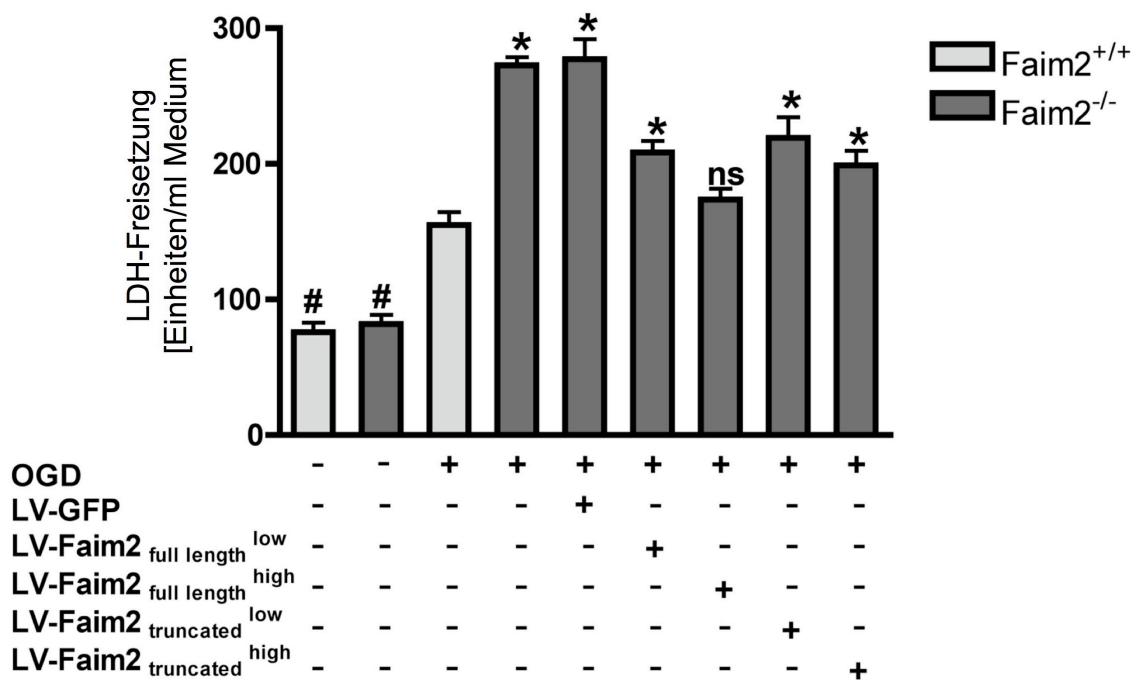


Abbildung 3.19: Grafische Darstellung der LDH-Freisetzung aus primären murinen kortikalen neuronalen Zellen in Zellkultur nach OGD im Vergleich von Faim2^{-/-}- und Faim2^{+/+}-Versuchstieren und Abhängigkeit vom Titer des zugeführten Lentiviruskonstrukts. Die Neurone wurden 3 Tage nach Beginn des *in-vitro*-Ansatzes mit Viruspartikeln transduziert. Dabei wurde entweder ein hoher oder ein niedriger Virustiter (bzgl. des mRNA-Niveaus) verwendet. Die LDH-Konzentration wurde 24 h nach 2,5-stündiger OGD ermittelt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus $n=6-8$ in dreifach unabhängigen Versuchsansätzen. Die Signifikanzanalyse erfolgte mittels *One-way ANOVA* gefolgt von einer *Tukey posthoc Analyse*: OGD-Faim2^{-/-} mit unterschiedlichem Virustiter vs. OGD-Faim2^{+/+} * $p < 0,05$; nicht signifikant (n.s.) Faim2^{-/-}-full length^{high} vs. OGD-Faim2^{+/+}; jeweils Kontrolle (LDH in neuronaler Zellkultur von Faim2^{-/-}- bzw. Faim2^{+/+}-Versuchstieren) vs. Faim2^{-/-} bzw. Faim2^{+/+} # $p < 0,01$.

(modifiziert publiziert in Reich et al. 2011, S. 228)

diese Versuchsreihen für neuronale Zelllinien unter OGD mit Gentransfer unterschiedlicher Virusunterformen mit hohen (*high*) (2100 WPRE/10000 Aktin-Molekülen/ μ l) und niedrigen (*low*) (697 WPRE/10000 Aktin-Molekülen/ μ l) Titern des Lentiviruskonstrukts. Hierbei wurde nach 2,5-stündiger OGD mit 24-stündiger Reoxygenierung (Harms et al. 2007) der LDH-Spiegel gemessen und das neuronale Überleben mittels *Propidiumiodid (PI)*-Gegenfärbung quantifiziert (Reich et al. 2011). Dabei wurden jeweils mindestens 2000 Neurone pro Versuchsanordnung ausgezählt und dieses jeweils 3-fach wiederholt. Die ischämische Toleranz von Faim2^{-/-} kortikalen Neuronen war signifikant niedriger als bei den Wildtypen. Um einen Dosisseffekt zu untersuchen, wurden die Zellen mit unterschiedlich hohen Virus-Titern (siehe oben) transduziert. Hieraus resultierte eine dosisabhängige LDH-Freisetzung, die bei dem Einsatz von Faim2^{-/-}-full length^{high} und Faim2^{-/-}-full length^{low} besonders deutlich wird. Wäh-

rend sich die LDH-Freisetzung bei der Verwendung von Faim2^{-/-}-*full length*^{high} den Wildtypenbedingungen anglich und keinen signifikanten Unterschied mehr aufwies, reduzierte sich zwar die LDH-Freisetzung unter Verwendung des Faim2^{-/-}-*full length*^{low} als Vektor, der Unterschied zu den Wildtypkontrollen war jedoch weiterhin noch signifikant.

Bei den primären kortikalen neuronalen Zellen aus Wildtypen resultierte die Infektion mit hohen und niedrigen Faim2-Lentivirus-Titern ebenfalls dosisabhängig in einer signifikanten Reduktion des Zelluntergangs, gemessen in der Auszählung von mindestens 2000 mit Propidiumiodid gefärbten Neuronen pro Versuchsansatz, wie von Harms et al. (2007) und Reich et al. (2011) beschrieben.

Insgesamt lässt sich beobachten, dass der Gentransfer mittels Faim2-Lentivirus sowohl makroskopisch *in vivo* als auch auf zellulärer Ebene *in vitro* das Schlaganfallvolumen und den zellulären Untergang bei Faim2^{-/-}-Versuchstieren signifikant verringert sowie bei den Faim2^{+/+}-Versuchstieren reduziert.

3.5 Klinische Bewertung der Versuchstiere nach zerebraler Ischämie

Zur klinischen Evaluation eines einseitigen neurologischen Defizits eignet sich der sog. *SNAP-Score* (*Simple Neuroassessment of Asymmetric Impairment*) (Shelton et al. 2008). Die Versuchstiere wurden jeweils 10 Minuten vor der MCAo und 2 Stunden nach Beginn der Reperfusionzeit klinisch untersucht. Die Abbildung 3.20 auf der nächsten Seite zeigt die Untersuchung der Versuchstiere im Rahmen der Versuchsreihe nach stereotaktischer Injektion des Faim2-Lentivirus und anschließender MCA-Okklusion 20 Tage später. Vor der MCA-Okklusion erreichten die Tiere maximal einen *Score* von 1, was die Abwesenheit eines neurologischen Defizits anzeigt. Diese Eingangsvoraussetzungen in die operative MCA-Okklusion war besonders wichtig, da die Tiere 20 Tage zuvor durch die stereotaktische, striatale Virusinjektion bereits ein potentiell zerebrales Trauma erlitten hatten. Tiere, die in der Voruntersuchung vor der MCA-Okklusion einen *SNAP-Score* > 2 erreicht hätten, wären spätestens an dieser Stelle aus dem Versuch ausgeschlossen worden.

Die Abbildung 3.20 auf der nächsten Seite zeigt auf, dass nach MCAo ein signifikant größeres neurologisches Defizit bzgl. einer neuropathologischen Asymmetrie besteht. In den Untersuchungen wiesen die Faim2^{-/-}-Versuchstiere signifikant höhere Testergebnisse als die Wildtypen auf. Außerdem zeigte sich beim Vergleich von Faim2^{-/-}-

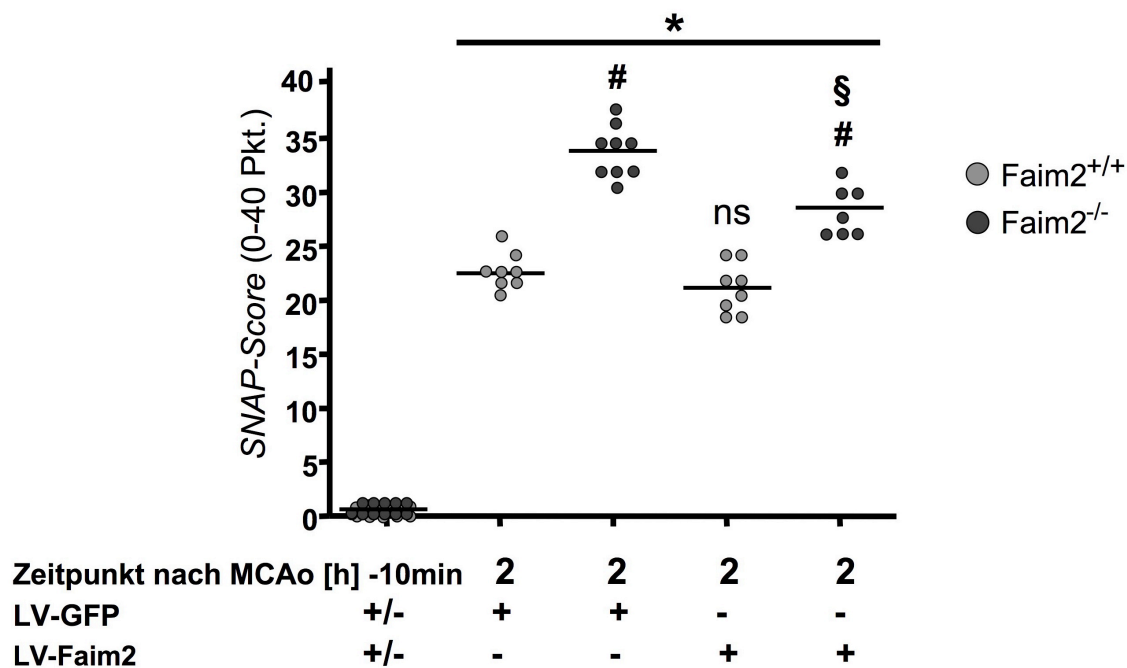


Abbildung 3.20: Grafische Darstellung des *SNAP-Scores* 10 Minuten vor MCAo und 2 Stunden nach Beginn der Reperfusionzeit an Versuchstieren, die 20 Tage vor der Ischämie eine stereotaktische Injektion von Faim2-Lentivirus bzw. Lentivirus-GFP als Kontrolle (*sham*-Tiere) erhalten hatten (jeweils $n = 7 - 9$). Dabei erreichen die *sham*-Tiere (LV-GFP) nach MCAo im Median 22 Pkt. (Faim2^{+/+}) und 34 Pkt. (Faim2^{-/-}), die Versuchstiere (LV-Faim2) nach MCAo im Mittel 21 Pkt. (Faim2^{+/+}) und 27 Pkt. (Faim2^{-/-}). Die Signifikanzanalyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis-one-way-Analyse* gefolgt von einem *Dunn's-Multiple-Comparison-Test*: 2h nach Beginn der Reperfusion vs. 10min vor MCAo * $p < 0,001$; Faim2^{-/-} LV-GFP bzw. LV-Faim2 vs. Faim2^{+/+} LV-GFP bzw. LV-Faim2 [#] $p < 0,001$; Faim2^{-/-} LV-GFP vs. Faim2^{-/-} LV-Faim2 [§] $p < 0,01$; nicht signifikant (ns) Faim2^{+/+} LV-GFP vs. Faim2^{+/+} LV-Faim2

Tieren mit LV-Faim2, dass ein signifikant geringeres neurologisches Defizit nach der MCA-Okklusion als bei den *sham*-Tieren (Faim2^{-/-}-LV-GFP) besteht. Somit korrelieren die Ergebnisse der vorgenannten Effekte von Faim2-Defizienz auf die zerebrale Ischämie bzw. die lentivirale Überexpression von Faim2 mit den Ergebnissen der klinischen Bewertung des neurologischen Defizits nach MCAo unter Faim2-Defizienz und Faim2-Überexpression. Bei den Faim2^{+/+}-Tieren konnte in der klinischen Untersuchung des neurologischen Defizits in der vergleichenden Analyse kein Unterschied durch die Überexpression von Faim2 beobachtet werden.

4 Diskussion

4.1 Faim2 im Überblick

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten und in Reich et al. (2011) veröffentlichten Daten und Ergebnisse zu dem neuroprotektiven Membranprotein Faim2 belegen erstmalig *in vivo* seinen signifikanten Einfluss während und nach der akuten Phase der transienten fokalen zerebralen Ischämie und die Bedeutung seiner Expression und Regulation. Betrachtet man die Häufigkeit und die gesundheitlichen, ökonomischen und psychischen Folgen einer zerebralen Ischämie beim Menschen (vgl. Abschnitt 1.3.1 auf Seite 13) in Verbindung mit der evolutionären Stärke von *Faim2*, wird die Bedeutung des therapeutischen Potentials dieses endogenen neuroprotektiven Proteins deutlich. Obgleich nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Organismus mit all seinen komplexen Regelkreisläufen und Kontrollinstanzen andere Mechanismen kompensatorisch hoch- oder herunterreguliert, um den Verlust von Faim2 in den Faim2-defizienten Tieren auszugleichen, belegen die dargestellten Ergebnisse, dass Faim2 protektiv auf das Überleben einer neuronalen Zelle wirkt und den programmierten Zelltod verhindern kann. Gleichzeitig geben sie Anhalt darauf, dass nicht nur eine hohe neuronale Spezifität für Faim2 besteht sondern auch, dass im Rahmen der zeitlichen Regulation von Faim2 und Fas/CD95 nach zerebraler Ischämie potentiell neuronale Regeneration über das FasL/CD95L-Fas/CD95-System gefördert und damit auch von Proteinen wie Faim2 kontrolliert werden kann. Zuliani et al. (2006) schrieben erstmalig Fas/CD95 gegensätzliche Fähigkeit zur Apoptoseinduktion - *reverse signaling* - zu. Mit dieser Eigenschaft des FasL/CD95L-Fas/CD95-Systems belegten sie, dass Fas/CD95 nicht nur Apoptose in kortikalen und hippokampalen Neuronen, sondern auch regenerative und differenzierende Prozesse wie *neuronal branching* induzierte und kontrollierte. Ein möglicher therapeutischer Ansatz bestünde analog zur viralen Hochregulation in der medikamentös induzierten Hochregulation über den PI3-Kinase-Akt/Protein-Kinase-B-abhängigen Signalweg, über den Faim2 reguliert wird (Beier et al. 2005). Siren et al. (2001) beispielsweise beschrieben die antiapoptotischen Eigenschaften von Erythropoietin in zerebralem Gewebe, wobei gleichzeitig von Zhao W et al. (2006)

aufgezeigt wurde, dass Erythropoietin über PI3-Kinase-Akt phosphorylierend wirkte und dessen Konzentration erhöhte. Damit wäre eine potentielle Hochregulation von Faim2 nach zerebraler Ischämie mittels Erythropoietin innerhalb der Akutbehandlung denkbar.

Katchanov et al. (2001) haben gezeigt, dass im Mausmodell der transienten zerebralen Ischämie mittels MCAo reliable und signifikante Daten bzgl. der Untersuchung von verspätetem neuronalem Zelltod im Striatum erzeugt werden können und dieses Modell zuverlässig die fokale zerebrale Ischämie beim Menschen repräsentiert. Die Ausprägung der Nekrose mit direktem Zelluntergang neuronaler Zellen durch den Verlust an Energiezufuhr ist abhängig von der Länge der Ischämiezeit und der Zeit bis zur Reperfusion sowie dessen Ausprägung. Gleichzeitig sind jedoch die Zellen der Region um die zentrale Nekrose herum, die Penumbra, einer Vielzahl an Noxen und Signalen, wie beispielsweise Nachbarzellen (Brudermord), Glutamat-Exitotoxizität, reaktive Sauerstoffradikale, Entzündungsreaktion, Kommunikationsverlust durch die Anker-moleküle, Metalloproteinasen und Endotheline, ausgesetzt (Ferrer und Planas 2003). Weiterhin stellten Ferrer und Planas (2003) die Apoptose als ursächlich für die komplexen Abläufe des ischämischen neuronalen Zelltods innerhalb der Penumbra dar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Ischämiezeit von 30 Minuten eine milde Ischämieform ohne Nekrose gewählt und beides untersucht, die frühe Phase der apoptotischen Ischämiefolgen im Zentrum des Schlaganfalls und die verspätete Pathophysiologie der Penumbra. Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied bei Faim2-defizienten Versuchstieren in der Dichte und Anzahl der die Apoptose einleitenden Zellen, im Schlaganfallvolumen und in der Caspase-Aktivität gezeigt werden. Dass Fas/CD95 von großer Bedeutung für die apoptoseeinleitende Signaltransduktion nach zerebraler Ischämie ist, wurde bereits in unterschiedlichen Mausmodellen der zerebralen Ischämie gezeigt. Eine signifikante Reduktion des Ischämieareals konnte z.B. bei direkter Signalunterbrechung durch genetische Veränderungen von Fas/CD95 (Graham et al. 2004, Martin-Villalba et al. 2001, Rosenbaum et al. 2000) oder antikörpervermittelte Neutralisation von FasL (Martin-Villalba et al. 2001) erreicht werden. Die genetische Faim2-Defizienz der in dieser Arbeit untersuchten Tiere führte nun zu dem gegenteiligen Effekt, nämlich zur signifikanten Erhöhung des Infarkt-volumens und Zelluntergangs nach transienter fokaler zerebraler Ischämie, da nun die physiologische, intrinsische *Hemmung* der Apoptose während der Signaltransduktion ausgeschaltet war. Dass dieser Effekt durch die Hochregulation von Faim2 mittels viralem Lentivirusvektor im Striatum rückläufig war und bei Überexpression sogar zu einer signifikanten Reduktion führte, belegt die hohe Spezifität dieser Signalüber-

tragung über Faim2 und Fas/CD95.

Die hier vorliegend erarbeiteten Ergebnisse weisen dem Membranprotein Faim2 eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose innerhalb einer Zelle zu. Neben der reinen Regulation der zur Apoptose führenden Signaltransduktion, um beispielsweise ein unkontrolliertes Absterben von Zellen zu verhindern, ist Faim2 damit an der Entscheidung zwischen Absterben und Regeneration einer Zelle beteiligt. Ob im Umkehrschluss demnach die Regeneration von Zellen durch Überexpression von Faim2 beschleunigt oder induziert und ob geschädigtes Gewebe durch Faim2 zur Gesundheit, Proliferation und Regeneration angestoßen werden kann, ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit jedoch ebenso noch nicht sicher zu beantworten, wie mögliche Zusammenhänge der apoptosehemmenden Wirkung von Faim2 mit weiteren Krankheitsentitäten neben der zerebralen Ischämie.

In der Tabelle 4.1 ist eine Auswahl an aktuellen Arbeiten zu Faim2 im Zusammenhang mit Apoptoseregulation aufgezeigt. Es wird dabei deutlich, dass die Charakterisierung von Faim2 nicht nur eine relativ junge Geschichte hat, sondern auch, dass dieses neuroprotektive Membranprotein bereits in verschiedenen Zusammenhängen und Fragestellungen untersucht worden ist. Auffallend ist, dass es durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstmalig gelang, Faim2 an defizienten Mäusen *in vivo* zu untersuchen. Die im Mausmodell der zerebralen Ischämie erhobenen, signifikanten Ergebnisse im Vergleich zwischen Faim2-defizienten Mäusen und Wildtypen, unterstreichen die zuvor *in vitro* entwickelten Funktionsweisen dieses antiapoptotischen Proteins.

Tabelle: 4.1: Zentrale Aussagen ausgewählter Veröffentlichungen zu Faim2 und zerebraler Ischämie

Titel	Autor	Inhalt	Art der Studie
<i>LFG: an anti-apoptotic gene that provides protection from Fas-mediated cell death.</i>	Somia et al. 1999	Erstmalige Darstellung der antiapoptotischen Wirkung von Lifeguard (LFG)/Faim2 im Rahmen eines genetischen Screenings zur Inhibition von Apoptose. Eine besonders hohe Expression des Proteins konnte in der Hippokampusregion nachgewiesen werden.	<i>in vitro</i>
<i>FasL (CD95L/APO-1L) resistance of neurons mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B-dependent expression of lifeguard/neuronal membrane protein 35.</i>	Beier et al. 2005	Die Expression des antiapoptotischen Proteins <i>membrane protein 35</i> /LFG/Faim2 wird durch Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-kinase)-Akt/Protein-Kinase-B reguliert und kann durch in-vitro -Überexpression in Gliomazellen diese vor Apoptose schützen.	<i>in vitro</i>

Zentrale Aussagen ausgewählter Veröffentlichungen zu Faim2 und zerebraler Ischämie Fortsetzung

Titel	Autor	Inhalt	Art der Studie
<i>Inhibition of apoptosis by expression of antiapoptotic proteins in recombinant human keratinocytes.</i>	Choi et al. 2007	Die immunologischen Untersuchungen an humanen Keratinozyten zeigen, dass eine Abstoßungsreaktion durch Hochexpression von antiapoptotischen Proteinen wie LFG/Faim2 verringert werden kann und die Zellen seltener in Apoptose gehen.	<i>in vitro</i>
<i>Lifeguard/neuronal membrane protein 35 regulates Fas ligand-mediated apoptosis in neurons via microdomain recruitment.</i>	Fernandez et al. 2007	FasL/Fas und damit auch LFG/Faim2 spielen eine zentrale Rolle in der Apoptoseregulation und in neurodegenerativen Erkrankungen. Das antiapoptotische Protein kann kortikale Zellen vor Apoptose schützen und reguliert die Caspaseaktivität herab. Es ist in den sog. <i>lipid rafts</i> lokalisiert, besitzt sieben Membrandomänen und ist an einer sehr frühen und wichtigen Position im Signaltransduktionsweg der Apoptoseaktivierung hemmend wirksam.	<i>in vitro</i>
<i>The anti-apoptotic protein lifeguard is expressed in breast cancer cells and tissues.</i>	Bucan et al. 2010	Das apoptosehemmende Protein LFG/Faim2 ist insbesondere in hoher Konzentration in epithelialen Brustkrebszellen exprimiert. Die hohe Expression korreliert mit der sinkenden Sensitivität der malignen Zellen gegenüber Fas und damit der Malignität des Tumors.	<i>in vitro</i>
<i>Fas/CD95 regulatory protein Faim2 is neuroprotective after transient brain ischemia.</i>	Reich et al. 2011	Erstmals Nachweis von Schutz vor Apoptose in einer Faim2-defizienten Mauslinie <i>in vivo</i> . Auch die <i>in-vitro</i> -Daten bestätigen die signifikant höhere Apoptoserate nach zerebraler Ischämie bzw. <i>oxygen-glucose deprivation (OGD)</i> . Ein Schutz vor Apoptose wird durch Hochexpression mittels viralem Gentransfer erreicht.	<i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>

4.2 Die Rolle von Faim2 während der zerebralen Ischämie und Regulation der Fas/CD95-induzierten Apoptose

Dem Membranprotein Faim2 können durch die vorliegenden Ergebnisse eine Reihe an wichtigen Eigenschaften zugeordnet werden: (1) hohe zelluläre Spezifität (siehe Abbildungen 3.1 auf Seite 53 und 3.10 auf Seite 63), (2) zentrale Positionierung innerhalb der Signaltransduktionskaskade an den sog. *lipid rafts* in der Zellmembran (Fernandez et al. 2007) in unmittelbarer Nähe zu den Todesrezeptoren/Todesdomäne (FADD) (siehe Abbildung 1.4 auf Seite 12) und der Caspase-8 mit frühem regulatorischen Einfluss auf die Caspasen-Aktivierung (vgl. Abbildung 3.11 auf Seite 64 und Abschnitt 3.3 auf Seite 66), (3) stabile und signifikante antiapoptotische Eigenschaften über Inhibition von Fas/CD95 direkt, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*,

(4) regulatives Expressionslevel während der zerebralen Ischämie (siehe Abbildung 3.2 auf Seite 54) mit Herabregulation in der postakuten Ischämiephase zur möglicherweise Fas-induzierten Regeneration (siehe alternative Funktionen von Fas/CD95, Abschnitt 1.1.4 auf Seite 7) sowie (5) Regulierbarkeit über viralen Gentransfer und damit potentiell auch medikamentös über Erythropoietin (Siren et al. 2001, Beier et al. 2005, Zhao W et al. 2006) zur signifikanten Reduktion des Zelluntergangs und des Infarktolumens.

Frühere Studien zu Faim2 beschreiben bereits einen Teil dieser Eigenschaften *in vitro* (siehe Tabelle 4.1 auf Seite 79). Dass Faim2 apoptosehemmende Eigenschaften hat, stellten bereits Somia et al. (1999) heraus. Beier et al. (2005) brachten jedoch Faim2 erstmals direkt in einen Zusammenhang mit Apoptose und Caspase-Aktivierung. Sie konnten in mehreren Zellreihen, u.a. Glioma-Zellreihen, die nicht Faim2 exprimierten, nachweisen, dass diese eine erhöhte Apoptoserate aufwiesen. Analog zu dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten viralen Gentransfer gelang es ihnen schließlich Faim2 auch in diesen Zellen zu exprimieren und damit die Apoptoserate zu senken. Fernandez et al. (2007) gelang es neben dem erneuten Nachweis der antiapoptotischen Eigenschaften von Faim2, eine nähere mikroskopische Charakterisierung durchzuführen. So stellten sie fest, dass Faim2 in den sog. *lipid rafts* und damit in unmittelbarer Nähe zu den FasL/CD95L-Fas/CD95-Komplexen und den Todesdomänen (FADD) lokalisiert ist. Diese Positionierung stellte eine zentrale Eigenschaft für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit der Caspase-Aktivität *in vivo* dar. Wobei Somia et al. 1999 bereits zuvor herausgefunden hatten, dass Faim2 weder direkt die Bindungsfähigkeit von Fas/CD95 mit FADD noch die Verbindung von FasL/CD95L zu Fas/CD95 beeinflusst. Bucan et al. (2010) stellten die Zellproliferation von Zellen in einem Mammakarzinom in Zusammenhang mit Faim2. Sie konnten nachweisen, dass Faim2 in Zelllinien eines Mammakarzinoms signifikant höher exprimiert ist als in gesunden Zellen und damit die Karzinomzellen weniger sensitiv auf Fas-induzierte Apoptosesignale reagierten.

Durch die vorliegende Arbeit ist es erstmals gelungen an zuvor generierten Faim2-defizienten Mäusen zunächst das Resultat aus dem Verlust sowie die Relevanz des Vorhandenseins von Faim2 *in vivo* zu untersuchen. In einem zweiten Schritt wurde Faim2 durch einen lentiviralen Vektor direkt stereotaktisch striatal wieder zugeführt bzw. überexprimiert und anhand dessen die Funktionsweise des Proteins im zerebralen Gewebe untersucht und konnte anhand von *in-vitro*-Versuchen bestätigt werden. Dabei konnten in einem experimentellen Modell der zerebralen Ischämie antiapoptotische Eigenschaften von Faim2 nachgewiesen werden. Ferner ist die Expression von

Faim2 nach einer zerebralen Ischämie reguliert. Durch eine verminderte Expression von Faim2 nach zerebraler Ischämie scheint die apoptotische Vulnerabilität von Neuronen erhöht. Die signifikanten Ergebnisse belegen die hohe Spezifität, mit der Faim2 antiapoptotisch wirksam ist. Nicht auszuschließen bleiben dabei regulatorische Kompensationsmechanismen, die bei Faim2-Defizienz in einem Organismus wirksam werden. Jedoch konnte sowohl durch die deutliche Signifikanz der erhobenen Daten bzgl. Infarktvolumen, Apoptoserate und -dichte und Caspase-Aktivität als auch durch den erfolgreichen Schutz vor Apoptose durch die Überexpression von Faim2 in neuronalen Zellen des Striatums und *Caudoputamens*, die wichtige Rolle von Faim2 für die Apoptoseregulation belegt werden.

Neben dem Aspekt der kontrollierten Apoptoseinduktion durch Fas/CD95 und den hemmenden Eigenschaften von Faim2 lassen sowohl die zeitliche Regulation (vgl. Abschnitte 3.1.2 auf Seite 54 und 4.2.3 auf Seite 85) dieser beiden Proteine als auch die hohe Expression von Faim2 im ZNS (vgl. Abschnitt 3.1.1 auf Seite 53) weitere Funktionen vermuten. Vor dem Hintergrund der erstmaligen Darstellung durch Zuliani et al. (2006), dass Fas/CD95 Neuroregeneration in Form von *neuronal branching* induzierte, nahmen Beier et al. (2007) dies als Grundlage zur Annahme, dass durch Fas/CD95 Neuroplastizität, dessen Voraussetzung Dendritenwachstum (*neuronal branching*) ist, nach Schädel-Hirn-Trauma induziert werden kann. Durch *in-vivo*-Versuche im Mausmodell des akuten Schädel-Hirn-Traumas konnten sie die *in-vitro*-Ergebnisse von Zuliani et al. (2006) insofern bestätigen, als dass durch Fas/CD95 sowohl das Läsionsvolumen verringert als auch die kognitiven Hirnleistungen sowie die Gedächtnisleistungen erhöht werden. Durch die verstärkte Expression von Fas/CD95 und verminderte Expression von Faim2 nur wenige Stunden nach der zerebralen Ischämie erhöht sich die zerebrale apoptotische Vulnerabilität. Die in dieser Arbeit *in vivo* dargestellte antiapoptotische Wirkung von Faim2 schützt vor dem neuronalen Zelluntergang. Nach einer ersten Phase mit gesteigertem Zelluntergang schließt sich eine Phase der Regeneration und Plastizität an. Experimentelle Studien, die diesen Zeitraum untersuchen, legen nahe, dass zur Verbesserung der Plastizität vermutlich eine verstärkte Aktivität des Fas/CD95-Signalwegs vorteilhaft ist. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt dies die Vermutung zu, dass Faim2 und andere Fas/CD95-regulierende Proteine die Fähigkeit besitzen, nicht nur hemmend auf die Apoptoseinduktion, sondern auch indirekt oder gar direkt aktivierend auf Neuroregeneration und Neuroplastizität im weiteren Verlauf einer akuten Erkrankung wie dem Schädel-Hirn-Trauma und dem Schlaganfall zu wirken. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in einer geänderten *downstream*-Signalpräferenz

von Fas/CD95. Damit wird Faim2 zu einem wertvollen Ziel für therapeutische Ansätze. Gleichzeitig geben allerdings Beier und Schulz (2009) zu bedenken, dass der therapeutische Ansatz am FasL/CD95L-Fas/CD95-System und damit auch Faim2, nicht ungefährlich ist. Die Bivalenz von Fas/CD95 und Faim2 mit den bisher noch wenig bekannten, komplexen Regulationsmechanismen innerhalb der Zellen, ermöglicht einerseits einen therapeutischen Ansatz bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen (vgl. Abschnitt 1.1.5 auf Seite 9), birgt andererseits aber die Gefahr der Stimulation von Apoptoseinduktion, neurogenem Wachstum oder gar Tumorinduktion. Daher muss dieser hochpotente und zugleich gefährliche therapeutische Ansatz des regulatorischen Netzwerks von Fas/CD95 und dessen modulierende Proteine, wie Faim2, spezifischer untersucht, die Transduktionskaskade genauer indentifiziert und Möglichkeiten erarbeitet werden, Signale entlang der neuroregenerativen Eigenschaften zu induzieren, während die proapoptotischen Eigenschaften umgangen werden können (Beier und Schulz 2009). Dieser noch unbekannt *switch* (Umschaltpunkt) von Faim2, der über Apoptoseinduktion oder Überleben und ggf. Regeneration der Zelle entscheidet, bleibt auch durch die Daten der vorliegenden Arbeit weiterhin unbekannt.

4.2.1 Vergrößertes Ischämievolumen unter Faim2-Defizienz

Sowohl die Beobachtung des vergrößerten Infarktareals und Hirnödems als auch die Ausbreitung des Ischämieareals bis hin in den umgebenden Kortex (siehe Abbildungen 3.4 auf Seite 58 und 3.7 auf Seite 61), ist bei den Tieren in der klinischen Untersuchung durch den *SNAP*-Test bestätigt worden. Wie durch die Anzahl TUNEL-positiver neuronaler Nuklei und der neuronalen Caspase-3-Aktivität gezeigt wurde, weist nicht nur die volumetrische Ausdehnung des Infarktareals einen signifikanten Unterschied, sondern auch die Dichte apoptotischer neuronaler Zellen bei den Faim2-defizienten Versuchstieren eine signifikante Zunahme auf. Diese Beobachtung belegt die qualitative und quantitative Verschiebung sterbender, gefährdeter oder überlebender neuronaler Zellen weg von potentiell rettbarer neuronalen Zellen in der Penumbra in Richtung ischämischen Zelltod bei Faim2-Defizienz.

Aufgrund dieser signifikanten Unterschiede im Infarktareal Faim2-defizienter Tiere muss jedoch kritisch eine Gefäßanomalität diskutiert werden. Der *Circulus arteriosus (cerebri) Willisii* ist bei Säugetieren als extrazerebrale Anastomosen des Gehirns ähnlich aufgebaut, weist jedoch starke interindividuelle Variationen bzgl. des Gefäßverlaufs, der Gefäßdurchmesser und der Versorgungsgebiete auf (Hillen et al. 1991).

Das im Filamentmodell der MCAo verwendete Silikonfilament wird durch die *A. carotis interna* an der *A. ophthalmica* vorbei bis distal der Bifurkation von *A. cerebri media* und *anterior* vorgeschoben. Somit kann durch die Anastomosen das restliche Gewebe weiter versorgt werden, nur die *A. cerebri media* ist vollständig vom Blutfluss getrennt. Mit dieser Positionierung verschließt das Filament ebenfalls den Zufluss der *A. communicans posterior*, welcher wiederum in die *A. cerebri posterior* mündet. Letztere Arterie versorgt dorsale Gehirnanteile wie die Hippokampusregion und anteilig den Kortex. Um das vergrößerte Infarktareal durch eine Gefäßmalformation erklären zu können, müsste bei den Faim2-defizienten Tieren eine Fehlfunktion der Anastomosen im *Circulus arteriosus (cerebri) Willisii* bestehen. Der Blutfluss von der kontralateralen *Arteria cerebri posterior* und der *Arteria basilaris* müsste unterbrochen oder unzureichend sein oder die *Arteria communicans posterior* insuffizient mit gleichzeitiger Vergrößerung des Versorgungsgebietes der *Arteria cerebri media*. Eine Malformation der *A. communicans posterior* bestehen bei ca. 6-21% der Bevölkerung und induziert insbesondere unter ipsilateral bestehender Okklusion der *A. cerebri media* eine fokale zerebrale Ischämie im Hypothalamus (Chuang et al. 2008). Bei 1-2 Versuchstieren mit einem derart stark ausgedehnten Infarktareal pro Versuchsansatz werden die vorgenannten 6-21% nicht erreicht, weshalb nicht von einem erhöhten Malformationsrisiko auszugehen ist. Auch die in den Faim2-defizienten Tieren beobachtete Ausdehnung des Ischämieareals in den Kortex erschien nicht durch eine Gefäßmalformation erklärbar zu sein, da die Flussmessung während der MCAo und die chirurgische Präparation während der Ischämieinduktion keine Auffälligkeiten ergaben. Es wurde daher auf eine gesonderte Gefäßdarstellung der zerebralen Blutversorgung verzichtet.

4.2.2 Expression von Faim2 und Fas/CD95 im Organismus

Während die Apoptose an sich als Regulator für Zellwachstum und Kontrollinstanz für die physiologische Funktionsweise der Zellen gilt, muss zwingender Weise auch die Apoptose selbst reguliert werden. Da dieses Phänomen nicht nur in vereinzelten Geweben im Organismus stattfindet, sondern ubiquitär in jeder Zelle potentiell ablaufen kann, wäre Faim2 in jeder Zelle zu erwarten. Die Abbildung 3.1 auf Seite 53 zeigt die Expression von Faim2 im Organismus. Hierbei fällt auf, dass Faim2 auf mRNA-Ebene lediglich in neuronalem Gewebe (Kortex, Zerebellum, Hirnstamm) und in der Lunge sicher nachzuweisen war. Der Nachweis im Gastrointestinaltrakt und Harnblase gelang in repetitiven Versuchsanordnungen nur schwach bis gar nicht.

Somia et al. (1999) hingegen konnten in einer mRNA-Expressionsanalyse multipler humaner Organe mittels *Northern-Blot* Faim2 auch in nicht-neuronalem Gewebe nachweisen (z.B. Harnblase, Uterus, Niere, Zervix, Ovarien etc.). Die höchste Expression wiesen sie jedoch ebenfalls im neuronalen Gewebe, insbesondere in den Körnerzellschichten des Hippokampus und Zerebellums nach. Auch Fernandez et al. (2007) kamen im Rahmen einer Expressionsstudie zu diesem Ergebnis und wiesen eine hohe Expression von Faim2 mittels quantitativer RT-PCR in hippokampalen Zellen und Neuronen des Kleinhirns nach. Fas/CD95 dahingegen war von mehreren Autoren zuvor in nahezu allen Organen nachgewiesen worden: Desbarats und Newell (2000) (Hepatozyten), Peter et al. (2007) (Herz, Pankreas und Kolon), Bucan et al. (2010) (Mammakarzinomzellen), Choi et al. (2007) (Keratinocyten). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Faim2 hingegen nahezu ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert ist.

Neben dem Nachweis von Faim2 auf RNA-Ebene gelang nur zweimalig der Nachweis auf Proteinebene. Hierzu wurden verschiedene Antikörper herangezogen, von denen letztlich nur der Antikörper der Firma Lifespan einen erfolgreichen Nachweis von Faim2 im Viruskonstrukt aufwies. Eine regelrechte Expressionsstudie war somit auf Proteinebene nicht erfolgreich. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der Aufarbeitung der Proteinproben liegen, im Rahmen derer die Proteine durch die mechanische und chemische Auflösung des Gewebes zum Teil denaturieren.

4.2.3 Zeitliche Regulation von Faim2 und Fas/CD95 nach zerebraler Ischämie

Neben der longitudinalen Expression von Faim2 in unterschiedlichen Geweben ist insbesondere auch die zeitliche Expression von Faim2 im Vergleich zu Fas von großem Interesse. Fernandez et al. (2007) wiesen nach, dass Faim2 in der postnatalen Entwicklungsphase und im Erwachsenenalter hochreguliert wird. Für die Expressionsstudie der vorliegenden Arbeit wurde eine leicht modifizierte Fragestellung gewählt. Der Fokus lag dabei mehr auf dem zeitlichen Expressionsverlauf von Faim2 und Fas/CD95 während und nach der zerebralen Ischämie. Da Faim2 in unmittelbarem Zusammenhang mit Fas/CD95 steht, wurde dieser vergleichend ebenfalls in die Expressionsstudie eingeschlossen. Die Abbildung 3.2 auf Seite 54 zeigt die Herabregulation von Faim2 ab ca. 3-18 Stunden nach MCAo, während Fas/CD95 bereits ab 3 Stunden signifikant hochreguliert war und zwischen der 18. und 48. Stunde wieder fast bis auf das Grundniveau abfiel. Faim2 ist 48 Stunden nach MCAo wieder nahezu beim Ausgangswert

angekommen.

Die unverändert hohen Konzentrationen an Faim2 innerhalb der Akutphase (3 Stunden nach MCAo) der zerebralen Ischämie in Verbindung mit der zuvor nachgewiesenen hohen Spezifität für neuronale Zellen, lassen auf ein hohes neuroprotektives Potential des Membranproteins Faim2 schließen. Während Faim2 in der Akutphase auf einem hohen Level exprimiert bleibt, wird es in der postakuten Phase (18 Stunden nach MCAo) signifikant herunterreguliert und könnte damit alternative Fas/CD95-Signaltransduktionen (vgl. Abschnitt 1.1.4 auf Seite 7) zulassen. Dieses würde beispielsweise Neuroregeneration ermöglichen. Initial den Zelltod fördernd, gleichzeitig aber die vorgenannte Vermutung unterstützend verhält sich Fas/CD95 in der postischämischen Phase. In der akuten Phase nach Ischämie, in der Zelltod initiiert wird, wird Fas/CD95 signifikant hochreguliert, während Faim2 im Verlauf abfällt. Anschließend verbleibt es in der postakuten Phase (18 Stunden nach MCAo), in der regenerative Prozesse eingeleitet werden, auf einem hohen Expressionsniveau. Ob diese Zusammenhänge und damit Faim2 tatsächlich die entscheidende Rolle in der Umschaltung von Apoptose zu neuroregenerativen Prozessen durch alternative Fas/CD95-Transduktionen spielen, bleibt spekulativ und ist in der vorliegenden Arbeit nicht weiter bearbeitet worden, sollte aber in Folgestudien berücksichtigt werden.

Ein Schwachpunkt dieser Expressionsstudie sind die relativ weit gewählten Zeitabstände. Dadurch ist nicht genau zu beurteilen, in welchem Zeitraum ein Minimum bzw. Maximum der Regulation erreicht ist.

4.2.4 Signaltransduktion und Caspase-Aktivität

Um die Aktivität von Faim2 während der Apoptoseeinleitung einordnen und detailliert untersuchen zu können, sind sowohl die Kenntnis über die genaue Lokalisation des Proteins selbst als auch die Kenntnis über andere an dem Vorgang beteiligte Proteine notwendig. In der Tabelle 4.2 sind die in der Signaltransduktion beteiligten, inhibierenden Proteine dargestellt und deren Funktion sowie Literaturreferenzen aufgelistet. Die Abbildung 1.4 auf Seite 12 zeigt die aufgelisteten Moleküle im Zusammenhang der Apoptosetransduktion graphisch.

Tabelle: 4.2: Überblick über die proximal inhibierend wirkenden Proteine der Apoptosetransduktion nach Einleitung durch FasL-Aktivierung

Bezeichnung	Gewebeexpression	Lokalisation	Funktion	Referenz
Faim1 (<i>Fas apoptotic inhibitory molecule 1</i>)	vorrangig neuronal	Zytoplasma	Hemmung des FADD direkt	(Sole et al. 2004, Segura et al. 2007)

Überblick über die proximal inhibierend wirkenden Proteine der Apoptosetransduktion nach Einleitung durch FasL-Aktivierung Fortsetzung

Bezeichnung	Gewebeexpression	Lokalisation	Funktion	Referenz
Faim2/LFG (<i>Fas apoptotic inhibitory molecule 2</i>)	neuronal	Membran	Hemmung der Komplexbildung von Fas-Ligand/Fas-Rezeptor-Komplex an den sog. <i>lipid rafts</i> innerhalb der Zellmembran direkt	(Schweitzer et al. 1998, Somia et al. 1999, Schweitzer et al. 2002, Beier et al. 2005, Fernandez et al. 2007, Davis et al. 2007)
Faim3 (<i>Fas apoptotic inhibitory molecule 3</i>)	lymphoidal	Membran	Hemmung des FADD direkt	(Song und Jacob 2005)
Btk (<i>Bruton's Tyrosinkinase</i>)	hämatopoietisch	Zytoplasma	Hemmung des FADD direkt	(Vassilev et al. 1999, Vassilev und Uckun 2004)
FAP-1 (<i>Fas assoziierte Phosphatase 1</i>)	ubiquitär	Zytoplasma	Hemmung des FADD direkt	(Foehr et al. 2005)
PEA-15 (<i>Phosphoprotein enriched in Astrocytes 15 kDa</i>)	ubiquitär	Zytoplasma	Hemmung der Aktivierung von Caspase-8	(Ricci-Vitiani et al. 2004, Renganathan et al. 2005, Eckert et al. 2008)
c-FLIP (<i>cellular Fas-associated death-domain-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein</i>)	ubiquitär	Zytoplasma	Hemmung der Aktivierung von Caspase-8	(Raoul et al. 1999, Graham et al. 2004, Taoufik et al. 2007, Safa et al. 2008)
Bcl-2 (<i>Familie der B-Zell-Lymphom-2-Proteine</i>)	ubiquitär	Zytoplasma	Hemmung der Aktivierungs- und Freilassungsproteine von Cytochrom c	(White et al. 1998, Deveraux et al. 2001, Henshall et al. 2002)
IAP (<i>Inhibitor of apoptosis protein family</i>)	neuronal	Zytoplasma	direkte Hemmung der Aktivierung von Caspase-3 durch das <i>Caspase-9/Apaf-1/Cytochrome c - Apoptosom</i>	(Gerhardt et al. 2001, Ferrer und Planas 2003)

Der entscheidende Punkt bei der Signaltransduktion ist, wie in Abschnitt 1.1.3 auf Seite 5 ausführlich dargestellt, die Aktivierung der Caspase-8 (*Initiatorcaspase*) als Beginn der Caspasenkaskade und schließlich die Aktivierung der Caspase-3 (*Effektorcaspase*) als Einleitung der Exekution. Deshalb stand bei der vorliegenden Arbeit die Messung von aktivierter Caspase-8 und -3 neben Faim2 im Vordergrund. In der Abbildung 3.13 auf Seite 67 ist der signifikante Unterschied der Faim2-defizienten Tiere gegenüber den Wildtypen bzgl. der Aktivierung von Caspase-8 und -3 dargestellt. Dieses Ergebnis des sog. *Caspase activity assay* belegt *ex vivo* die bereits aufgestellte Vermutung, dass die Faim2-Defizienz zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate der Zellen führt. Das *Assay* wurde 20 Minuten nach MCAo durchgeführt und liefert wichtige Aussagen über die Apoptoseaktivität der Zelle im zeitlichen Verlauf. Nach 20-minütiger Reperfusion nach zerebraler Ischämie wird der bekannte Höhepunkt der Initiatorcaspase, Caspase-8, erreicht, während die Aktivität der in der

Kaskade später angesiedelte Effektorcaspase, Caspase-3, erst später beginnt (Velier et al. 1999). Entsprechend ebbt die gemessene Caspase-8-Aktivität bereits ab und erreicht schließlich den Ausgangspunkt, während die Caspase-3-Aktivität erst noch steigt. Im Vergleich von Faim2-defizienten Tieren mit Wildtypen konnte im zeitlichen Verlauf weiterhin gezeigt werden, dass Tiere mit Faim2-Defizienz nicht nur eine höhere Caspase-Aktivität sowohl von Caspase-8 als auch -3 aufweisen sondern auch eine verlängerte Aktivität der Initiator-Caspase-8 (vgl. Abbildung 3.11 auf Seite 64). Die verlängerte Aktivität wurde aufgrund der morphologischen Veränderungen der neuronalen Zellen im Kortex 16 Stunden nach MCAo beobachtet. Hierbei ist kritisch anzumerken, dass nicht auszuschließen ist, dass allein durch diese verlängerte Aktivität vermehrt Zellen aus der Penumbra den Zelltod einleiten und sich die Penumbra im Zentrum verkleinert, das Gesamtvolumen jedoch in die Peripherie ausbreitet. In der Abbildung 3.11 auf Seite 64 ist eine quantitative Darstellung von Caspase-8- und -3-NeuN-Doppelfärbungen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nicht nur signifikant mehr Neurone eine Caspaseaktivität in den Faim2-defizienten Tieren aufweisen als die Wildtypen, sondern auch das Zelldebridement und die Ausbreitung der Penumbra in den Kortex stark zugenommen hat. Diese Beobachtung steht in Analogie zu den TUNEL-Färbungen der apoptotischen Zellen im Vergleich Faim2-defizienter Versuchstiere und Wildtypen im infarzierten Hirnareal, siehe Abbildung: 3.7 auf Seite 61. Um das Ausmaß der Penumbra und der dortigen Zellaktivitäten im unmittelbaren zeitlichen Verlauf nach zerebraler Ischämie verfolgen zu können, wäre eine MRT-Diagnostik notwendig. Um dabei die zelluläre Ebene beurteilen zu können, müsste eine zeitlich-qualitative Aufarbeitung der Caspase-Aktivität erfolgen, welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich war.

Die hier dargestellte Betrachtung der Caspasenaktivität und -regulation durch Faim2 ist ein wichtiger Bestandteil im Verständnis über die Funktionsweisen der apoptosemodulierenden Proteine, wie Faim2 eines ist. Dennoch konnte nach wie vor genaue Interaktion von Faim2 mit dem Rezeptor Fas/CD95 nicht geklärt werden. Somia et al. (1999) stellten für Faim2 bereits eine apoptoseinhibierende Funktion fest, belegten aber gleichzeitig, dass Faim2 weder die direkte Aktivierung von FADD durch Fas/CD95 noch die Bindung des Liganden FasL/CD95L an Fas/CD95 beeinflussen konnte. Es bleibt zu vermuten, dass Faim2 beispielsweise die Trimärbildung von FasL/CD95L-Fas/CD95 an den *lipid rafts* (vgl. Abschnitt 1.2 auf Seite 11) verhindert, da Faim2 auch hier lokalisiert ist (Fernandez et al. 2007). Somit bleiben der genaue molekulare Mechanismus, über den Faim2 durch Hemmung von Fas/CD95 modulierend auf die Caspasenaktivität wirkt, und der genaue Angriffspunkt innerhalb der

lipid rafts am Fas/CD95 Rezeptor unbekannt.

4.2.5 Klinische Symptomatik der Versuchstiere

Die erhobenen Ergebnisse zu den zellulären Veränderungen nach einer zerebralen Ischämie spiegeln sich in den klinischen Untersuchungen der Versuchstiere wider. Alle in den Schlaganfallversuchen eingesetzten Versuchstiere wurden 10 Minuten vor der MCAo und 2 Stunden nach Beginn der Reperfusion mittels *SNAP Score* auf neurologische Defizite untersucht. Die Versuchstiere mit viralem Gentransfer wurden 20 Tage zuvor stereotaktisch operiert.

Nach erfolgtem Gentransfer von Faim2 war eine signifikante Verbesserung der erreichten Punktzahl (postoperativ) für die Faim2-defizienten Versuchstiere im Vergleich Lentivirus zu Plazebo zu beobachten. Vergleicht man die Wildtypen postoperativ zwischen verabreichtem Lentivirus und Plazebo, ergibt sich zwar eine Tendenz in Richtung Milderung der klinischen Symptomatik nach Virusinfektion, allerdings keine statistische Signifikanz. Es ist daher kritisch zu hinterfragen, ob eine Hochregulation oder gar Überexpression von Faim2 tatsächlich auch in den Wildtypen einen klinischen Effekt bei zerebraler Ischämie erreichen kann. Der Vergleich zwischen *in-vitro*-Versuchsansatz und klinischer Symptomatik kann jedoch nur bedingt herangezogen werden, da *in vitro* mit ca. 90% Infektionseffektivität durch den Faim2-Gentransfer nahezu physiologische Zelltod-Level in den Faim2-defizienten neuronalen Zellen erreicht werden konnte. Bei den Faim2-kompetenten Zellen wurde ein zusätzlicher neuroprotektiver Effekt gemessen. *In vivo* hingegen wird das ischämische Areal nur anteilig infiziert. Durch die stereotaktische Injektion in das *Caudoputamen*/Striatum und nicht in den Kortex wird lediglich das Zentrum der zerebralen Ischämie erreicht, die kortikalen, peripheren Anteile des Ischämieareals werden dabei nicht infiziert. Somit ist eine fehlende Signifikanz bezüglich der klinischen Symptomatik in den Wildtypen, bei denen ein zusätzlicher neuroprotektiver Effekt, anders als auf *in-vitro*-Ebene, nicht eintritt, nicht überraschend. Um einen möglichen therapeutischen Ansatz in den medizinischen Alltag zu übertragen, müsste gesichert sein, dass sowohl die Expression von Faim2 ubiquitär und nicht nur punktuell im ZNS erhöht wird als auch Wildtypen von der Aktivierung/Hochexpression von Faim2 profitieren, da Faim2-Defizienz in der Bevölkerung nicht zu erwarten ist.

Insgesamt können die erhobenen Daten der klinischen Beurteilung mittels *SNAP-Score* lediglich einen weiteren Anhaltspunkt und eine Bestätigung der Versuchsreihen zur zellulären Erhebung darstellen. Ferner ist kritisch zu hinterfragen, ob der gewähl-

te Zeitpunkt mit 10 Minuten vor MCAo und 2 Stunden nach Beginn der Reperfusion den Höhepunkt des postischämischen Apoptoseschadens überhaupt erreicht. Die erhobenen Daten aus der zeitlichen Regulation von Fas/CD95 und Faim2 nach MCAo (vgl. Abschnitte 3.1.2 auf Seite 54 und 4.2.3 auf Seite 85) weisen deutliche Expressionsänderungen von Faim2 und Fas/CD95 innerhalb der ersten 48 Stunden nach Reperfusionbeginn nach. Insbesondere Fas/CD95 zeigt zum Zeitpunkt 3 Stunden und 18 Stunden nach MCAo eine signifikante Hochregulation, während Faim2 zunächst auf hohem Niveau exprimiert bleibt und erst bei dem Zeitpunkt 18 Stunden nach MCAo signifikant herabreguliert ist. Damit ist zwar eine klinische Hemisymptomatik 2 Stunden nach MCAo zu erwarten, gerade aber die zu diesem Zeitpunkt weiter ansteigende Fas/CD95-Konzentration lässt eine weitere Zunahme der apoptotischen Zellen vermuten. Endres et al. (1998b) konnten 24 Stunden nach 30-minütiger MCAo keine ischämischen Veränderungen in mit *Triphenyltetrazoliumchlorid* (TTC) und HE-Färbungen aufgearbeiteten Kryoschnitten nachweisen. Erst zu dem Zeitpunkt 72 Stunden nach MCAo waren ischämische Veränderungen auf diese Weise detektierbar. Die klinischen, neurologischen Tests wurden hier 24, 30 und 72 Stunden nach MCAo durchgeführt. Der Höhepunkt der ischämischen Veränderungen war bis zur 72. Stunde nach Schlaganfall zu erheben (Endres et al. 1998b).

Somit ist die o.g. fehlende Signifikanz bei den Faim2-Wildtypen sicherlich auch mit dem Zeitpunkt von nur 2 Stunden nach MCAo zu erklären, andererseits zeigt sich aber bereits zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Verbesserung der klinischen Symptomatik nach MCAo und lentiviralem Faim2-Gentransfer bei den Faim2-defizienten Versuchstieren. Weitere klinische Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten nach Beginn der Reperfusion nach 30-minütiger MCAo wären notwendig, um diese Beobachtung zu klären.

4.3 Viraler Gentransfer von Faim2 in neuronalen Zellen als Schutz vor Apoptose - ein potentiell therapeutischer Ansatz

Durch die Defizienz an Faim2, einem frühen Regulator der Fas-induzierten Apoptoseinduktion und Hemmer der FasL/CD95-Fas/CD95-Komplexbildung, erlitten die Versuchstiere eine signifikant größere zerebrale Ischämie und in der Zellkultur gingen signifikant mehr Neurone in die Apoptose. Durch die Infektion *in vitro*, mit ca. 90% Infektionsrate der Neurone, konnte durch Faim2-Gentransfer das physiologische Level

an unter OGD absterbenden Zellen in mutierten Neuronen wieder erreicht werden. Des Weiteren konnten Fernandez et al. (2007) nachweisen, dass bei Überexpression von Faim2 in Zellkultur primärer kortikaler Neurone die Caspasenaktivierung sank, was sie durch die Reduktion der FasL-induzierten Apoptose erklärten.

in vivo wurden nur die Areale um die stereotaktische Infektionsstelle um den *Nucleus caudatus* vom Lentivirus infiziert. Daraus resultierte eine partielle Reduktion des Infarkt volumens sowohl in Faim2-defizienten Versuchstieren als auch in den Wildtypen innerhalb der zentralen Ischämiezone, dem *Caudatoputamen*. Sowohl die Dosierung (Virustiter) als auch die Anzahl der Injektionsstellen und die Injektion selbst stellen bereits ein relevantes zerebrales Trauma dar. Durch eine Verdopplung der Dosis oder der Injektionsstellen innerhalb des Striatums und ggf. auch Kortex, könnte eine höhere Infektionsrate *in vivo* erreicht werden. Es wäre jedoch zu hinterfragen, welche Neurone aufgrund der Ischämie und welche durch das Injektionstrauma die Apoptose eingeleitet haben. Insofern kann das hohe therapeutische Potential der vorliegenden Ergebnisse nur dann genutzt werden, wenn durch eine medikamentöse Manipulation und Hochregulation von Faim2 in den betroffenen Neuronen kein sekundärer Schaden entsteht und eine ausreichend hohe Faim2-Expression erzielt werden kann.

Bei der *Göttinger Epo Stroke Study* aus den Jahren 1997 - 2001 konnte Frau Prof. Dr. Dr. H. Ehrenreich vom Max-Planck-Institut Göttingen bereits eine signifikant höhere neurologische Leistungsfähigkeit unter Erythropoietinsubstitution bei Radiochemotherapie von Glioblastompatienten, gemessen an der *NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale)* nachweisen. Daraus ergab sich eine deutschlandweite Multicenter-Studie in den Jahren 2003-2008 in Krankenhäusern und Kliniken in Aachen, Berlin, Braunschweig, Bremen, Celle, Dresden, Erlangen, Essen, Göttingen, Hannover und Leipzig. Hierbei wurde Patienten mit einem Schlaganfall in der Notaufnahme Erythropoietin (Epoetin-alpha, Eprex[®]; 40000 Internationale Einheiten als Kurzinfusion) verabreicht und am Tag 2, 3 und 90 wiederholt. Die Ergebnisse waren ernüchternd. Der Vergleich zu Patienten mit Plazebo oder rtPA ergab für Erythropoietin insgesamt ein tendenziell schlechteres Ergebnis. Bei Patienten, die mit rtPA therapiert worden waren, erhöhte sich das Komplikationsrisiko für Versterben, Blutung, Ödemen und thrombembolischen Geschehen (Ehrenreich et al. 2009, Sirén et al. 2009).

Dass Erythropoietin weiterhin jedoch ein hohes neuroprotektives Potential hat, stellten Garcia-Rodriguez und Sosa-Teste (2009) sowie Subirós et al. (2012) heraus. Von einer sicheren Anwendung bei Menschen zur Hochregulation von Faim2 und Ersatz der im Mausmodell der stereotaktischen Injektion angewandten Infektion der Neu-

rone mit einem Faim2-Lentivirus, scheinen wir derzeit jedoch noch weit entfernt zu sein. Dass Faim2 über PI3-kinase/AKT aktiviert und hochreguliert werden kann, haben bereits Beier et al. (2005) gezeigt. Dieses wiederum wird durch Erythropoietin aktiviert (Zhao W et al. 2006) und könnte somit theoretisch den neuroprotektiven Effekt, der Erythropoietin zugeschrieben wird, erklären.

5 Zusammenfassung

Apoptose und dessen Signaltransduktion spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung und Pathophysiologie von diversen neurologischen Erkrankungen. Um neuartige therapeutische Möglichkeiten auszuschöpfen oder zu erforschen, ist das Verständnis über die Regulationsprozesse im Rahmen der zur Apoptose führenden Signaltransduktion essentiell. In der vorliegenden Arbeit wurde das antiapoptotische Membranprotein *Fas apoptotic inhibitory molecule 2 (Faim2)* im Rahmen der Fas/CD95 induzierten Apoptose im Mausmodell der zerebralen Ischämie untersucht. Faim2 ist ein in der Evolution stabiler und zugleich neuronenspezifischer Inhibitor der über Fas/CD95-induzierten Apoptose. Um Faim2 näher untersuchen zu können, wurden Faim2-defiziente Versuchstiere generiert. Diese wiesen phänotypisch keinerlei Auffälligkeiten auf und zeigten ein regelrechtes Fortpflanzungsmuster. Im Rahmen der durchgeführten MCAo zur Induktion der zerebralen Ischämie im Versorgungsgebiet der *Arteria cerebri media* rief die Faim2-Defizienz ein signifikant größeres Schlaganfallvolumen hervor. In der neuronalen Zellkultur gingen signifikant mehr Faim2-defiziente Zellen nach kombinierter *oxygen glucose deprivation* in Apoptose als Wildtypzellen. Durch die stereotaktische Injektion eines rekombinanten Faim2-Lentivirus-Konstrukts und den damit verbundenen Gentransfer von Faim2 konnte das Schlaganfallvolumen *in vivo* bzw. die Apoptoserate *in vitro* signifikant gesenkt werden. Die zeitlich abhängige Regulation von Caspasenaktivierung und Fas/CD95 sowie Herabregulation von Faim2 nach einer zerebralen Ischämie geben neben den vorgenannten Schlaganfallvolumina Evidenz dafür, dass Faim2 als neuroprotektives Protein im Kontext der zerebralen Ischämie eine wichtige Rolle übernimmt und einen potentiellen therapeutischen Ansatz darstellt. Gleichzeitig deuten die zeitliche Herabregulation von Faim2 und erhöhte Expression von Fas/CD95 auch auf alternative Signaltransduktionswege, wie beispielsweise Fas-induzierte Neuroregeneration und -plastizität, hin und räumen damit möglicherweise Faim2 eine komplexe intrazellulär modulierende Stellung ein.

6 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ACM	Arteria cerebri media
AFC	7-amino-4-trifluoromethyl coumarin
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	Aluminiumsulfat
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Bak	<i>Bcl-2-antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat, 4-Toluidin-Salz (BCIP)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH	<i>Bcl-2 homology</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin
Btk	Bruton's Tyrosinkinase
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CBF	<i>cerebral blood flow</i>
cDNA	komplementäre DNA
CoCl_2	Cobalt(II)-chlorid
com.	communis

Ct	Threshold-Cycle
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAXX	<i>death-associated protein 6</i>
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
Diablo	<i>direct IAP-binding protein with low pI</i>
DIG	Digoxigenin
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
Faim1/2/3	Fas apoptotic inhibitory molecule 1, 2 oder 3
Faim2 ^{-/-}	Faim2-Defizienz
Faim2 ^{+/+}	Faim2-Wildtypen
FAP-1	Fas assoziierte Phosphatase 1
f.c.	final concentration; Endkonzentration
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLIP/cFLIP	<i>(cellular) Fas-associated death domain-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein (Caspase-8 und FADD-like Apoptoseregulator)</i>
<i>g</i>	Gramm
G	Gauge; Maß des Kanülenaußendurchmessers

GIT	Gastro-Intestinal-Trakt
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HtrA2	<i>HtrA serine peptidase 2</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
Iba-1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
Inc.	Incorporated
i.p.	intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
<i>kg</i>	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	<i>knockout</i> / Faim2-null-Mutant
KU	Kunitz Units; Kunitz-Einheiten
<i>l</i>	Liter
L x B x H	Länge mal Breite mal Höhe
LDH	Lactatdehydrogenase
LFG	Lifeguard (Synonym: Faim2)
LV	Lentivirus
<i>M</i>	mol
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MCA	Middle cerebral artery, Arteria cerebri media
MCAo	Middle cerebral artery occlusion
<i>mg</i>	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
<i>ml</i>	Milliliter
<i>mm</i>	Millimeter

mRNA	messenger RNA; Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
n	Anzahl
<i>N</i>	Äquivalentkonzentration
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NeuN	Neuron-specific nuclear protein
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NIHSS	<i>National Institute of Health Stroke Scale</i>
NMP35	Neuronal membrane protein 35 (Synonym: Faim2)
n.s.	nicht signifikant
NSZ	Neuronale Stammzellen
OGD	<i>oxygen-glucose deprivation (OGD)</i>
p	Wahrscheinlichkeit
p35	<i>cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit 1 (p35)</i>
pAdeno	Faim2-Adenoviruskonstrukt
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEA-15	<i>Phosphoprotein enriched in Astrocytes 15 kDa</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus/potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PI3-Kinase-Akt	Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt
pLenti	Faim2-Lentiviruskonstrukt
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck

pp60src	<i>v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)</i> / phosphoryliertes 60-kDa-Phosphoprotein
qPCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RLT-Puffer	Guanidin-Thiocyanat enthaltender Lysispuffer
RNA	Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
<i>rpm</i>	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
<i>s</i>	Sekunde
s.c.	subkutan
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SNAP	<i>Simple Neuroassessment of Asymmetric Impairment</i>
sog.	sogenannt
SVZ	Subventrikuläre Zone
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
TdT	Terminale desoxynucleotidyl Transferase
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TENS-Puffer	Tris-EDTA-NaCl-SDS-Puffer
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid

TUNEL	<i>Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling</i>
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
WPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus post-transcription regulatory element</i>
WT	Wildtyp
YES	<i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Verwendete SI-Einheiten und -Präfixe:

Symbol	SI-Einheit	Präfix	Faktor
<i>c</i>		centi	10^{-2}
<i>g</i>	Gramm		-
<i>h</i>	Stunde		-
<i>k</i>		kilo	10^3
μ		mikro	10^{-6}
<i>m</i>		milli	10^{-3}
<i>min</i>	Minute		-
<i>mol</i>	Mol		-
<i>n</i>		nano	10^{-9}
<i>s</i>	Sekunde		-

7 Literaturverzeichnis

- ASHKENAZI, A UND DIXIT, VM (1999): Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11 [Nr. 2] 255–60.
- BEER, R, FRANZ, G, SCHÖPF, M, REINDL, M, ZELGER, B, SCHMUTZHARD, E, POEWE, W UND KAMPFL, A (2000): Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 [Nr. 4] 669–77.
- BEIER, CP UND SCHULZ, JB (2009): CD95/Fas in the brain—not just a killer. *Cell Stem Cell* 5 [Nr. 2] 128–130.
- BEIER, CP, WISCHHUSEN, J, GLEICHMANN, M, GERHARDT, E, PEKANOVIC, A, KRUEGER, A, TAYLOR, V, SUTER, U, KRAMMER, PH, ENDRES, M, WELLER, M UND SCHULZ, JB (2005): FasL (CD95L/APO-1L) resistance of neurons mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B-dependent expression of lifeguard/neuronal membrane protein 35. *J Neurosci* 25 [Nr. 29] 6765–74.
- BEIER, CP, KOLBL, M, BEIER, D, WOERTGEN, C, BOGDAHN, U UND BRAWANSKI, A (2007): CD95/Fas mediates cognitive improvement after traumatic brain injury. *Cell Res* 17 [Nr. 8] 732–4.
- BOR-SENG-SHU, E, KITA, WS, FIGUEIREDO, EG, PAIVA, WS, FONOFF, ET, TEIXEIRA, MJ UND PANERAI, RB (2012): Cerebral hemodynamics: concepts of clinical importance. *Arq Neuropsiquiatr* 70 [Nr. 5] 352–6.
- BRINT, S, JACEWICZ, M, KIESSLING, M, TANABE, J UND PULSINELLI, W (1988): Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 8 [Nr. 4] 474–85.
- BUCAN, V, REIMERS, K, CHOI, CY, EDDY, MT UND VOGT, PM (2010): The

- anti-apoptotic protein lifeguard is expressed in breast cancer cells and tissues. *Cell Mol Biol Lett* 15 [Nr. 2] 296–310.
- CHARRIAUT-MARLANGUE, C UND BEN-ARI, Y (1995): A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7 [Nr. 1] 61–4.
- CHEN, ST, HSU, CY, HOGAN, EL, MARICQ, H UND BALENTINE, JD (1986): A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17 [Nr. 4] 738–43.
- CHOI, CYU, REIMERS, K, ALLMELING, C, KALL, S, CHOI, YH UND VOGT, PM (2007): Inhibition of apoptosis by expression of antiapoptotic proteins in recombinant human keratinocytes. *Cell Transplant* 16 [Nr. 6] 663–674.
- CHUANG, YM, LIU, CY, PAN, PJ UND LIN, CP (2008): Posterior communicating artery hypoplasia as a risk factor for acute ischemic stroke in the absence of carotid artery occlusion. *J Clin Neurosci* 15 [Nr. 12] 1376–81.
- CORSINI, NS, SANCHO-MARTINEZ, I, LAUDENKLOS, S, GLAGOW, D, KUMAR, S, LETELLIER, E, KOCH, P, TEODORCZYK, M, KLEBER, S, KLUSSMANN, S, WIESTLER, B, BRÜSTLE, O, MUELLER, W, GIEFFERS, C, HILL, O, THIE-MANN, M, SEEDORF, M, GRETZ, N, SPRENGEL, R, CELIKEL, T UND MARTIN-VILLALBA, A (2009): The death receptor CD95 activates adult neural stem cells for working memory formation and brain repair. *Cell Stem Cell* 5 [Nr. 2] 178–90.
- CRAMER, SC UND CHOPP, M (2000): Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci* 23 [Nr. 6] 265–71.
- DAVIS, AR, LOTOCKI, G, MARCILLO, AE, DIETRICH, WD UND KEANE, RW (2007): FasL, Fas, and death-inducing signaling complex (DISC) proteins are recruited to membrane rafts after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 24 [Nr. 5] 823–34.
- DEMJEN, D, KLUSSMANN, S, KLEBER, S, ZULIANI, C, STIELTJES, B, METZGER, C, HIRT, UA, WALCZAK, H, FALK, W, ESSIG, M, EDLER, L, KRAMMER, PH UND MARTIN-VILLALBA, A (2004): Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10 [Nr. 4] 389–95.
- DESBARATS, J UND NEWELL, MK (2000): Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med* 6 [Nr. 8] 920–3.

- DESBARATS, J, BIRGE, RB, MIMOUNI-RONGY, M, WEINSTEIN, DE, PALERME, JS UND NEWELL, MK (2003): Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5 [Nr. 2] 118–25.
- DEVERAUX, QL, SCHENDEL, SL UND REED, JC (2001): Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin* 19 [Nr. 1] 57–74.
- DGN: *Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) und der Deutschen Schlaganfallgesellschaft (DSG) in der Deutschen Gesellschaft für Neurologie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie e.V., Berlin 2009.
- DGN: *Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) und der Deutschen Schlaganfallgesellschaft (DSG) in der Deutschen Gesellschaft für Neurologie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie e.V., Berlin 2012.
- DIRNAGL, U, IADECOLA, C UND MOSKOWITZ, MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22 [Nr. 9] 391–7.
- DITTEL, BN, MERCHANT, RM UND JANEWAY, CA (1999): Evidence for Fas-dependent and Fas-independent mechanisms in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 162 [Nr. 11] 6392–400.
- DU, C, HU, R, CSERNANSKY, CA, HSU, CY UND CHOI, DW (1996): Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 16 [Nr. 2] 195–201.
- DUDEN: *Das Herkunftswörterbuch: Etymologie der deutschen Sprache*. (Duden 07) Bibliographisches Institut, Mannheim 2006.
- DULL, T, ZUFFEREY, R, KELLY, M, MANDEL, RJ, NGUYEN, M, TRONO, D UND NALDINI, L (1998): A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72 [Nr. 11] 8463–8471.
- ECKERT, A, BOCK, BC, TAGSCHERER, KE, HAAS, TL, GRUND, K, SYKORA, J, HEROLD-MENDE, C, EHEMANN, V, HOLLSTEIN, M, CHNEIWEISS, H, WIESTLER, OD, WALCZAK, H UND ROTH, W (2008): The PEA-15/PED protein protects glioblastoma cells from glucose deprivation-induced apoptosis via the ERK/MAP kinase pathway. *Oncogene* 27 [Nr. 8] 1155–66.

- EHRENREICH, H, WEISSENBORN, K, PRANGE, H, SCHNEIDER, D, WEIMAR, C, WARTENBERG, K, SCHELLINGER, PD, BOHN, M, BECKER, H, WEGRZYN, M, JÄHNIG, P, HERRMANN, M, KNAUTH, M, BÄHR, M, HEIDE, W, WAGNER, A, SCHWAB, S, REICHMANN, H, SCHWENDEMANN, G, DENGLER, R, KASTRUP, A, BARTELS, C UND EPO STROKE TRIAL GROUP (2009): Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 40 [Nr. 12] e647–56.
- EL HUSSEINI, N, GOLDSTEIN, LB, PETERSON, ED, ZHAO, X, PAN, W, OLSON, DM, ZIMMER, LO, WILLIAMS, JR, JW, BUSHNELL, C UND LASKOWITZ, DT (2012): Depression and antidepressant use after stroke and transient ischemic attack. *Stroke* 43 [Nr. 6] 1609–16.
- ELLIS, HM UND HORVITZ, HR (1986): Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44 [Nr. 6] 817–29.
- ENDRES, M, KAPS, M UND MOSKOWITZ, MA (1998a): [Apoptosis and ischemic infarct]. *Nervenarzt* 69 [Nr. 6] 459–64.
- ENDRES, M, NAMURA, S, SHIMIZU-SASAMATA, M, WAEBER, C, ZHANG, L, GÓMEZ-ISLA, T, HYMAN, BT UND MOSKOWITZ, MA (1998b): Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 [Nr. 3] 238–47.
- FERNANDEZ, M, SEGURA, MF, SOLE, C, COLINO, A, COMELLA, JX UND CENA, V (2007): Lifeguard/neuronal membrane protein 35 regulates Fas ligand-mediated apoptosis in neurons via microdomain recruitment. *J Neurochem* 103 [Nr. 1] 190–203.
- FERRER, I UND PLANAS, AM (2003): Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 62 [Nr. 4] 329–39.
- FISHER, M UND GARCIA, JH (1996): Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology* 47 [Nr. 4] 884–8.
- FOEHR, ED, LORENTE, G, VINCENT, V, NIKOLICH, K UND URFER, R (2005): FAS associated phosphatase (FAP-1) blocks apoptosis of astrocytomas through dephosphorylation of FAS. *J Neurooncol* 74 [Nr. 3] 241–8.

- GALLUZZI, L, BLOMGREN, K UND KROEMER, G (2009): Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 10 [Nr. 7] 481–94.
- GANDINI, R, PAMPANA, E, DEL GIUDICE, C, MASSARI, F, SPANO, S, ASSAKO ONDO, EP, SALVATORI, E, SALLUSTIO, F, KOCH, G, STANZIONE, P UND SIMONETTI, G (2012): Acute stroke treatment using the Penumbra endovascular mechanical thrombolysis device: a single-centre experience. *Radiol Med* 117 [Nr. 7] 1199–214.
- GARCIA, JH (1984): Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 15 [Nr. 1] 5–14.
- GARCIA, JH UND KAMIJYO, Y (1974): Cerebral infarction. Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 33 [Nr. 3] 408–21.
- GARCIA-RODRIGUEZ, JC UND SOSA-TESTE, I (2009): The nasal route as a potential pathway for delivery of erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke in humans. *SciWorldJ* 9 970–81.
- GAVRIELI, Y, SHERMAN, Y UND BEN-SASSON, SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 [Nr. 3] 493–501.
- GERHARDT, E, KUGLER, S, LEIST, M, BEIER, C, BERLIOCCHI, L, VOLBRACHT, C, WELLER, M, BAHR, M, NICOTERA, P UND SCHULZ, JB (2001): Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 17 [Nr. 4] 717–31.
- GINSBERG, MD UND PULSINELLI, WA (1994): The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol* 36 [Nr. 4] 553–4.
- GOLDBERG, MP UND CHOI, DW (1990): Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose. *Stroke* 21 [Nr. 11 Suppl] III75–7.
- GRAHAM, EM, SHELDON, RA, FLOCK, DL, FERRIERO, DM, MARTIN, LJ, O’RIORDAN, DP UND NORTHINGTON, FJ (2004): Neonatal mice lacking functional Fas death receptors are resistant to hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiol Dis* 17 [Nr. 1] 89–98.

- GROTH, J: *Meine Moleküle. Deine Moleküle*. Rhombos-Verlag, Berlin 2004 (Kapitel Der programmierte Zelltod (Apoptose), Seiten 69–72).
- HAO, Z, HAMPEL, B, YAGITA, H UND RAJEWSKY, K (2004): T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 199 [Nr. 10] 1355–65.
- HARMS, C, ALBRECHT, K, HARMS, U, SEIDEL, K, HAUCK, L, BALDINGER, T, HÜBNER, D, KRONENBERG, G, AN, J, RUSCHER, K, MEISEL, A, DIRNAGL, U, VON HARSDFORF, R, ENDRES, M UND HÖRTNAGL, H (2007): Phosphatidylinositol 3-Akt-kinase-dependent phosphorylation of p21(Waf1/Cip1) as a novel mechanism of neuroprotection by glucocorticoids. *J Neurosci* 27 [Nr. 17] 4562–71.
- HARRAF, F, SHARMA, AK, BROWN, MM, LEES, KR, VASS, RI UND KALRA, L (2002): A multicentre observational study of presentation and early assessment of acute stroke. *BMJ* 325 [Nr. 7354] 17.
- HAYLEY, S, CROCKER, SJ, SMITH, PD, SHREE, T, JACKSON-LEWIS, V, PRZEDBORSKI, S, MOUNT, M, SLACK, R, ANISMAN, H UND PARK, DS (2004): Regulation of dopaminergic loss by Fas in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 24 [Nr. 8] 2045–53.
- HENSALL, DC, ARAKI, T, SCHINDLER, CK, LAN, JQ, TIEKOTER, KL, TAKI, W UND SIMON, RP (2002): Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. *J Neurosci* 22 [Nr. 19] 8458–65.
- HILLEN, B, HOOGSTRATEN, HW, VAN OVERBEEKE, JJ UND VAN DER ZWAN, A (1991): Functional anatomy of the circulus arteriosus cerebri (WillisII). *Bull Assoc Anat (Nancy)* 75 [Nr. 229] 123–6.
- HUANG, Z, HUANG, PL, PANAHIAN, N, DALKARA, T, FISHMAN, MC UND MOSKOWITZ, MA (1994): Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265 [Nr. 5180] 1883–5.
- HUDGINS, WR UND GARCIA, JH (1970): Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke* 1 [Nr. 2] 107–11.

- KATCHANOV, J, HARMS, C, GERTZ, K, HAUCK, L, WAEBER, C, HIRT, L, PRILLER, J, VON HARSDFORF, R, BRUCK, W, HORTNAGL, H, DIRNAGL, U, BHI-DE, PG UND ENDRES, M (2001): Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* 21 [Nr. 14] 5045–53.
- KEMPERMANN, G, KUHN, HG UND GAGE, FH (1998): Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18 [Nr. 9] 3206–12.
- KERR, JF, WYLLIE, AH UND CURRIE, AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 [Nr. 4] 239–57.
- KOFLER, B, BULLEYMENT, A, HUMPHRIES, A UND CARTER, DA (2002): Id-1 expression defines a subset of vimentin/S-100beta-positive, GFAP-negative astrocytes in the adult rat pineal gland. *Histochem J* 34 [Nr. 3-4] 167–71.
- KORNACK, DR UND RAKIC, P (1999): Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [Nr. 10] 5768–73.
- KRAMMER, PH (1998): The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system. *Toxicol Lett* 102-103 131–7.
- KROEMER, G, GALLUZZI, L UND BRENNER, C (2007): Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87 [Nr. 1] 99–163.
- LABAT-MOLEUR, F, GUILLERMET, C, LORIMIER, P, ROBERT, C, LANTUEJOUL, S, BRAMBILLA, E UND NEGOESCU, A (1998): TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 46 [Nr. 3] 327–34.
- LAKSO, M, PICHEL, JG, GORMAN, JR, SAUER, B, OKAMOTO, Y, LEE, E, ALT, FW UND WESTPHAL, H (1996): Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [Nr. 12] 5860–5.
- LAMBERT, C, LANDAU, AM UND DESBARATS, J (2003): Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* 8 [Nr. 6] 551–62.
- LANDAU, AM, LUK, KC, JONES, ML, SIEGRIST-JOHNSTONE, R, YOUNG, YK, KOUASSI, E, RYMAR, VV, DAGHER, A, SADIKOT, AF UND DESBARATS, J

- (2005): Defective Fas expression exacerbates neurotoxicity in a model of Parkinson's disease. *J Exp Med* 202 [Nr. 5] 575–81.
- LESNE, S, GABRIEL, C, NELSON, DA, WHITE, E, MACKENZIE, ET, VIVIEN, D UND BUISSON, A (2005): Akt-dependent expression of NAIP-1 protects neurons against amyloid-beta toxicity. *J Biol Chem* 280 [Nr. 26] 24941–7.
- LIN, TN, HE, YY, WU, G, KHAN, M UND HSU, CY (1993): Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke* 24 117–121.
- LINDVALL, O, KOKAIA, Z UND MARTINEZ-SERRANO, A (2004): Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10 Suppl S42–50.
- LOIS, C UND ALVAREZ-BUYLLA, A (1994): Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264 [Nr. 5162] 1145–8.
- MARTIN-VILLALBA, A, HERR, I, JEREMIAS, I, HAHNE, M, BRANDT, R, VOGEL, J, SCHENKEL, J, HERDEGEN, T UND DEBATIN, KM (1999): CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19 [Nr. 10] 3809–17.
- MARTIN-VILLALBA, A, HAHNE, M, KLEBER, S, VOGEL, J, FALK, W, SCHENKEL, J UND KRAMMER, PH (2001): Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 8 [Nr. 7] 679–86.
- MERTENS, F, JOHANSSON, B, HOGLUND, M UND MITELMAN, F (1997): Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 57 [Nr. 13] 2765–80.
- MOLINARI, GF (1970): Experimental cerebral infarction. I. Selective segmental occlusion of intracranial arteries in the dog. *Stroke* 1 [Nr. 4] 224–31.
- MORISHIMA, Y, GOTOH, Y, ZIEG, J, BARRETT, T, TAKANO, H, FLAVELL, R, DAVIS, RJ, SHIRASAKI, Y UND GREENBERG, ME (2001): Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21 [Nr. 19] 7551–60.
- PETER, ME UND KRAMMER, PH (2003): The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10 [Nr. 1] 26–35.

- PETER, ME, LEGEMBRE, P UND BARNHART, BC (2005): Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochim Biophys Acta* 1755 [Nr. 1] 25–36.
- PETER, ME, BUDD, RC, DESBARATS, J, HEDRICK, SM, HUEBER, AO, NEWELL, MK, OWEN, LB, POPE, RM, TSCHOPP, J, WAJANT, H, WALLACH, D, WILTROUT, RH, ZÖRNIG, M UND LYNCH, DH (2007): The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 129 [Nr. 3] 447–50.
- PETRI, S, KIAEI, M, WILLE, E, CALINGASAN, NY UND BEAL, MF (2006): Loss of Fas ligand-function improves survival in G93A-transgenic ALS mice. *J Neurol Sci* 251 [Nr. 1-2] 44–9.
- POECK, K UND HACKE, W: *Neurologie*. Springer, Berlin 2010 (Kapitel Zerebrale Durchblutungsstörungen: Ischämische Infarkte, Seiten 164–222).
- PULSINELLI, WA UND BRIERLEY, JB (1979): A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10 [Nr. 3] 267–72.
- RAOUL, C, HENDERSON, CE UND PETTMANN, B (1999): Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J Cell Biol* 147 [Nr. 5] 1049–62.
- RAOUL, C, BUHLER, E, SADEGHI, C, JACQUIER, A, AEBISCHER, P, PETTMANN, B, HENDERSON, CE UND HAASE, G (2006): Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [Nr. 15] 6007–12.
- REICH, A, SPERING, C UND SCHULZ, JB (2008): Death receptor Fas (CD95) signaling in the central nervous system: tuning neuroplasticity? *Trends Neurosci* 31 [Nr. 9] 478–486.
- REICH, A*, SPERING, C*, GERTZ, K, HARMS, C, GERHARDT, E, KRONENBERG, G, NAVE, KA, SCHWAB, M, TAUBER, SC, DRINKUT, A, HARMS, K, BEIER, CP, VOIGT, A, GÖBBELS, S, ENDRES, M UND SCHULZ, JB (2011): Fas/CD95 regulatory protein Faim2 is neuroprotective after transient brain ischemia. *J Neurosci* 31 [Nr. 1] 225–33 (* Reich, A und Sperring, C equally contributed, shared first authorship).
- REIMERS, K, CHOI, CYU, MAU-THEK, E UND VOGT, PM (2006): Sequence analysis shows that Lifeguard belongs to a new evolutionarily conserved cytoprotective family. *Int J Mol Med* 18 [Nr. 4] 729–734.

- RENGANATHAN, H, VAIDYANATHAN, H, KNAPINSKA, A UND RAMOS, JW (2005): Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochem J* 390 [Nr. Pt 3] 729–35.
- RIBE, EM, SERRANO-SAIZ, E, AKPAN, N UND TROY, CM (2008): Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *Biochem J* 415 [Nr. 2] 165–82.
- RICCI-VITIANI, L, PEDINI, F, MOLLINARI, C, CONDORELLI, G, BONCI, D, BEZ, A, COLOMBO, A, PARATI, E, PESCHLE, C UND MARIA, RD (2004): Absence of caspase 8 and high expression of PED protect primitive neural cells from cell death. *J Exp Med* 200 [Nr. 10] 1257–66.
- RIEDE, UN, WERNER, M UND SCHAEFER, HE: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme, Stuttgart 2004.
- ROSENBAUM, DM, GUPTA, G, D'AMORE, J, SINGH, M, WEIDENHEIM, K, ZHANG, H UND KESSLER, JA (2000): Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 61 [Nr. 6] 686–92.
- ROTHWELL, PM, BUCHAN, A UND JOHNSTON, SC (2006): Recent advances in management of transient ischaemic attacks and minor ischaemic strokes. *Lancet Neurol* 5 [Nr. 4] 323–31.
- SABELKO, KA, KELLY, KA, NAHM, MH, CROSS, AH UND RUSSELL, JH (1997): Fas and Fas ligand enhance the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis, but are not essential for immune privilege in the central nervous system. *J Immunol* 159 [Nr. 7] 3096–9.
- SAFA, AR, DAY, TW UND WU, CH (2008): Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 8 [Nr. 1] 37–46.
- SAIKI, RK, SCHARF, S, FALOONA, F, MULLIS, KB, HORN, GT, ERLICH, HA UND ARNHEIM, N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 [Nr. 4732] 1350–4.
- SANCHO-MARTINEZ, I UND MARTIN-VILLALBA, A (2009): Tyrosine phosphorylation and CD95: a FAScinating switch. *Cell Cycle* 8 [Nr. 6] 838–42.

- SCHULZ, JB, WELLER, M UND MOSKOWITZ, MA (1999): Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 45 [Nr. 4] 421–9.
- SCHWEITZER, B, TAYLOR, V, WELCHER, AA, MCCLELLAND, M UND SUTER, U (1998): Neural membrane protein 35 (NMP35): a novel member of a gene family which is highly expressed in the adult nervous system. *Mol Cell Neurosci* 11 [Nr. 5-6] 260–73.
- SCHWEITZER, B, SUTER, U UND TAYLOR, V (2002): Neural membrane protein 35/Lifeguard is localized at postsynaptic sites and in dendrites. *Brain Res Mol Brain Res* 107 [Nr. 1] 47–56.
- SEGURA, MF, SOLE, C, PASCUAL, M, MOUBARAK, RS, PEREZ-GARCIA, MJ, GOZZELINO, R, IGLESIAS, V, BADIOLA, N, BAYASCAS, JR, LLECHA, N, RODRIGUEZ-ALVAREZ, J, SORIANO, E, YUSTE, VJ UND COMELLA, JX (2007): The long form of Fas apoptotic inhibitory molecule is expressed specifically in neurons and protects them against death receptor-triggered apoptosis. *J Neurosci* 27 [Nr. 42] 11228–41.
- SHELTON, SB, PETTIGREW, DB, HERMANN, AD, ZHOU, W, SULLIVAN, PM, CRUTCHER, KA UND STRAUSS, KI (2008): A simple, efficient tool for assessment of mice after unilateral cortex injury. *J Neurosci Methods* 168 [Nr. 2] 431–42.
- SIEMKOWICZ, E UND HANSEN, AJ (1978): Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats. *Acta Neurol Scand* 58 [Nr. 1] 1–8.
- SIRÉN, AL, FRATELLI, M, BRINES, M, GOEMANS, C, CASAGRANDE, S, LEWCZUK, P, KEENAN, S, GLEITER, C, PASQUALI, C, CAPOBIANCO, A, MENNINI, T, HEUMANN, R, CERAMI, A, EHRENREICH, H UND GHEZZI, P (2001): Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [Nr. 7] 4044–9.
- SIRÉN, AL, FASSHAUER, T, BARTELS, C UND EHRENREICH, H (2009): Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics* 6 [Nr. 1] 108–27.
- SMITH, ML, BENDEK, G, DAHLGREN, N, ROSÉN, I, WIELOCH, T UND SIESJÖ,

- BK (1984): Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69 [Nr. 6] 385–401.
- SOLE, C, DOLCET, X, SEGURA, MF, GUTIERREZ, H, DIAZ-MECO, MT, GOZZELINO, R, SANCHIS, D, BAYASCAS, JR, GALLEGO, C, MOSCAT, J, DAVIES, AM UND COMELLA, JX (2004): The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kapp B signaling. *J Cell Biol* 167 [Nr. 3] 479–92.
- SOMIA, NV, SCHMITT, MJ, VETTER, DE, VAN ANTWERP, D, HEINEMANN, SF UND VERMA, IM (1999): LFG: an anti-apoptotic gene that provides protection from Fas-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [Nr. 22] 12667–12672.
- SONG, Y UND JACOB, CO (2005): The mouse cell surface protein TOSO regulates Fas/Fas ligand-induced apoptosis through its binding to Fas-associated death domain. *J Biol Chem* 280 [Nr. 10] 9618–26.
- STATISTISCHES-BUNDESAMT: *Todesursachen in Deutschland*. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2011 (Fachserie 12, Reihe 4).
- STEGH, AH, BARNHART, BC, VOLKLAND, J, ALGECIRAS-SCHIMNICH, A, KE, N, REED, JC UND PETER, ME (2002): Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein. *J Biol Chem* 277 [Nr. 6] 4351–60.
- SUBIRÓS, N, DEL BARCO, DG UND CORO-ANTICH, RM (2012): Erythropoietin: still on the neuroprotection road. *Ther Adv Neurol Disord* 5 [Nr. 3] 161–73.
- SU, JH, ANDERSON, AJ, CRIBBS, DH, TU, C, TONG, L, KESSLACK, P UND COTMAN, CW (2003): Fas and Fas ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in beta-amyloid-induced neuronal death. *Neurobiol Dis* 12 [Nr. 3] 182–93.
- TAMURA, A, GRAHAM, DI, MCCULLOCH, J UND TEASDALE, GM (1981): Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1 [Nr. 1] 53–60.
- TANG, D, LAHTI, JM UND KIDD, VJ (2000): Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 275 [Nr. 13] 9303–7.

- TAOUFIK, E, VALABLE, S, MÜLLER, GJ, ROBERTS, ML, DIVOUX, D, TINEL, A, VOULGARI-KOKOTA, A, TSEVELEKI, V, ALTRUDA, F, LASSMANN, H, PETIT, E UND PROBERT, L (2007): FLIP(L) protects neurons against in vivo ischemia and in vitro glucose deprivation-induced cell death. *J Neurosci* 27 [Nr. 25] 6633–46.
- THOMAIDOU, D, MIONE, MC, CAVANAGH, JF UND PARNAVELAS, JG (1997): Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17 [Nr. 3] 1075–85.
- THOMPSON, CB (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 [Nr. 5203] 1456–62.
- TIXIER-VIDAL, A (1994): Cell division and differentiation of central nervous system neurons. *Ann N Y Acad Sci* 733 56–67.
- TRAN, SE, HOLMSTROM, TH, AHONEN, M, KAHARI, VM UND ERIKSSON, JE (2001): MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* 276 [Nr. 19] 16484–90.
- VASSILEV, AO UND UCKUN, FM (2004): Therapeutic potential of inhibiting Bruton's tyrosine kinase, (BTK). *Curr Pharm Des* 10 [Nr. 15] 1757–66.
- VASSILEV, A, OZER, Z, NAVARA, C, MAHAJAN, S UND UCKUN, FM (1999): Bruton's tyrosine kinase as an inhibitor of the Fas/CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 274 [Nr. 3] 1646–56.
- VELIER, JJ, ELLISON, JA, KIKLY, KK, SPERA, PA, BARONE, FC UND FEUERSTEIN, GZ (1999): Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 19 [Nr. 14] 5932–41.
- WAJANT, H, PFIZENMAIER, K UND SCHEURICH, P (2003): Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 14 [Nr. 1] 53–66.
- WATSON, BD, DIETRICH, WD, BUSTO, R, WACHTEL, MS UND GINSBERG, MD (1985): Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17 [Nr. 5] 497–504.
- WHITE, CA, MCCOMBE, PA UND PENDER, MP (1998): The roles of Fas, Fas ligand and Bcl-2 in T cell apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 82 [Nr. 1] 47–55.

- WYLLIE, AH (1993): Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer* 67 [Nr. 2] 205–8.
- WYLLIE, AH (2010): Where, O death, is thy sting? A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol* 42 [Nr. 1] 4–9.
- WYLLIE, AH, ARENDS, MJ, MORRIS, RG, WALKER, SW UND EVAN, G (1992): The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol* 4 [Nr. 6] 389–97.
- ZHAO, C, DENG, W UND GAGE, FH (2008): Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132 [Nr. 4] 645–60.
- ZHAO, W, KITIDIS, C, FLEMING, MD, LODISH, HF UND GHAFARI, S (2006): Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* 107 [Nr. 3] 907–15.
- ZULIANI, C, KLEBER, S, KLUSSMANN, S, WENGER, T, KENZELMANN, M, SCHREGLMANN, N, MARTINEZ, A, DEL RIO, JA, SORIANO, E, VODRAZKA, P, KUNER, R, GROENE, HJ, HERR, I, KRAMMER, PH UND MARTIN-VILLALBA, A (2006): Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ* 13 [Nr. 1] 31–40.

8 Anhang

8.1 Publikationsverzeichnis

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden an folgenden Stellen veröffentlicht:

Originalarbeit

Reich, A.*, **Spering, C.***, Gertz, K., Harms, C., Gerhardt, E., Kronenberg, G., Nave, K. A., Schwab, M., Tauber, S. C., Drinkut, A., Harms, K., Beier, C. P., Voigt, A., Göbbels, S., Endres, M. und Schulz, J. B. (2011): Fas/CD95 regulatory protein Faim2 is neuroprotective after transient brain ischemia. *J Neurosci* 31 [Nr. 1] 225–33.

*Die Erstautorenschaft wird von Reich, A. und Spering, C. als *equally contributed* geteilt.

Übersichtsarbeit

Reich, A., **Spering, C.** und Schulz, J. B. (2008): Death receptor Fas (CD95) signaling in the central nervous system: tuning neuroplasticity? *Trends Neurosci* 31 [Nr. 9] 478–486.

Posterbeitrag

Reich A, **Spering C**, Gertz K, Harms C, Gerhardt E, Kronenberg G, Nave KA, Schwab M, Tauber SC, Drinkut A, Harms K, Voigt A, Göbbels S, Endres M und Schulz JB (2010): Fas/CD95 Regulatory Protein Faim2 Is Neuroprotective after Transient Brain Ischemia. *Neurowoche*, P 713, Mannheim, Deutschland, 21. - 25.09.2010.

8.2 Alternative Tiermodelle der zerebralen Ischämie

Tabelle: 8.1: Tiermodelle der zerebralen Ischämie

Tiermodell	Verfahren	Vorteile	Nachteile	Referenzen
Permanente proximale MCAo	permanente Ischämieinduktion durch proximalen Verschluss <i>Aa. cerebri mediae</i> beidseits	einmaliger, einfacher operativer Eingriff	Ischämie im Kortex und <i>Caudoputamen</i>	Garcia et al. 1984

Tiermodelle der zerebralen Ischämie Fortsetzung

Tiermodell	Verfahren	Vorteile	Nachteile	Referenzen
Temporäre distale MCAo	distale Okklusionsvariante, mit Verschluss ACM über der <i>Fissura rhinalis</i> durch Ligatur + Verschluss <i>A. carotis com.</i> beidseits temporär	signifikante Reduktion des Blutflusses über dem Versorgungsgebiet der ACM rechts mit moderatem Infarkt im frontoparietalen Kortex	kein Infarkt im <i>Caudoputamen</i>	Chen et al. 1986
Permanenter Gefäßverschluss durch Elektrokauterisation	Gezielte Elektrokauterisation von gehirnvorsorgenden Gefäßen	einfache Durchführbarkeit	Mangelhafte Präzision und Kontrollierbarkeit	Tamura et al. 1981
Globalischämie durch <i>Neck tournique</i>	mit aufpumpbarem <i>Neck Tournique</i> Dekapitation simuliert, anschließend Reperfusion nach Entfernen der Druckmanschette	Dekapitation + Reperfusion; einfache Methode	Kompression wichtiger Strukturen im Halsbereich (<i>Nervus vagus, Glandula thyroidea, Vv. jugulares</i> etc.) + inkomplette Globalischämie da <i>Aa. vertebrales</i> im Schutz der Halswirbelsäule	Siemkowitz und Hansen 1978
Globalischämie durch Kardioplegie	kardioplege Lösung mit folgendem kardialen Arrest und zerebraler Globalischämie	einfache Methode	Ischämie auch für den restlichen Organsimus	Koffer et al. 2002
Globalischämie durch das 4-Gefäßverschluss-Modell	Tag 1: atraumatische Gefäßklammern locker um die <i>Aa. carotides communes</i> angebracht und die <i>Aa. vertebrales</i> durch die <i>Foramina alares</i> des Atlas verödet; Tag 2: Ischämieinduktion durch temporären Verschluss der beiden zuvor gesetzten Arterienklammern	auch an wachen, nicht narkotisierten, sich frei bewegenden Tieren durchführbar	komplexe und aufwendige OP, schwer reproduzierbar	Pulsinelli und Brierley 1979
2-Gefäßverschluss-Modell	<i>Aa. carotides communes</i> okkludiert + medikamentöse systemische Hypotension; zerebraler Blutfluss (CFU) im Kortex sinkt auf 5%, im Thalamus und Mittelhirn noch mehr	komplexe OP und Management	nur Ischämie-induktion des Vorderhirns	Smith et al. 1984
Photochemische Induktion von Thromben	Vorbereitung: photosensitive Substanz Bengalrosa i.v. injiziert. Anschließend durch gezielte Bestrahlung mit Licht von 560 nm Wellenlänge Bildung von Sauerstoffradikalen angeregt, dies ruft mikrovaskuläre Thrombozytenaggregation hervor	präzise Positionierung der Infarktareale im Kortex	Schädigung der mikrovaskulären Strombahn durch die photochemische Reaktion, Beeinträchtigung der Bluthirn-Schranke und Entstehung von vasogenen Ödemen	Watson et al. 1985
Embolische Modelle	intraarterielle Blutklümpchen durch Katheter in <i>A. carotis communis</i> eingebracht oder direkt visköses Silikon positioniert	einfache Durchführbarkeit	mangelhafte Kontrollierbarkeit und potentielle Streuung von Mikropartikeln	Multiple Modelle beschrieben

8.3 Apparatur

8.3.1 Geräte

Tabelle 8.2: Auflistung der verwendeten Geräte

Anästhesie Work Station (table top / two gases)	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Adapter für <i>key-fill Vaporizer - Isofluran</i>	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Aufbewahrungsboxen für Reaktionsgefäße	GLW® Storing Systems, Würzburg
Elektrophoresekammer für Agarose Gels Mini Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresesystem (Gelgrößen: 7 x 8 cm, 9 x 11 cm)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Färbegaskästen	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Färbegestell	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Färbetrog (Kunststoff)	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Feuchte Kammer	Kartell spa, Noviglio, Italien
Flockeneisbereiter (Modell: AF-20)	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Illinois, USA
Gefrierschrank (Modell: MDF-U537)	Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Osaka, Japan
Gefrierschrank (Modell: HFU 586 Top)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gel-Gießschienen	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelkämme (1,0 und 1,5 mm; 8, 10, 12, 14 Zähne)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelträger	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gel-Videodokumentationssystem (Bio-Vision)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gewebehomogenisator <i>Precellys 24</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Glaswaren (Gefäße und Flaschen; 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml)	Schott AG, Mainz
Homogenisator <i>Precellys 24-Dual</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Hämodynamische Messeinheit, incl. Blutdruck, EKG, HF, Blutfluss, pH und pO ₂	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Heizplatte <i>HI 1220</i>	Leica Microsystems, Wetzlar
Kaltlichtquelle <i>KL 1500 LCD</i>	Schott AG, Mainz
Kammerasystem für OP Mikroskop Leica M651 (Modell: Leica 2D)	Leica, Microsystems, Wetzlar

Kompaktwaage <i>CS200</i>	Ohaus Corp., Pine Brook, New Jersey, USA
Kühlschränke <i>Premium No Frost</i>	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer MR 3000	Heidolph Instruments, Schwabach
Messpipetten (25 ml)	Brand, Wertheim
Messpipetten (5 ml; 10 ml)	HBG Henneberg-Sander GmbH, Gießen
Mess-/Mischzylinder, Größen: 2000 ml, 1000 ml, 500 ml	Brand (Plastibrand [®]), Wertheim und Kartell spa, Noviglio, Italien
Mikroinjektor Nanoliter2000 microinjector Micro4 smart controller unit	WPI (World Precision Instruments), Berlin
Mikrokühlzentrifuge <i>Sigma 1-15 K</i>	Sartorius, Göttingen
Mikrooperationsbesteck	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Mikrowelle (Micromaxx [®] MM 41580)	Medion AG, Essen
Mikroskop (Modell: Axioskop 2 mot plus)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop (Modell: DMI6000 B)	Leica Microsystems, Wetzlar
Nahtmaterial Monofilament Nylon (Größen: 4-0, 5-0, 8-0, 9-0)	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Nahtmaterial Polyviolene <i>LOOK[®]</i> (Größen: 4-0, 5-0)	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Narkosegasabsaugung Flouvac System, VAC 240	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Operationsmikroskop (Modell: M651 MSD)	Leica Microsystems, Wetzlar
Operationstisch (Modell: size 1H Type 872/3H)	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Paraffinausgießstation (<i>Shandon Histocentre 2</i>)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR-Thermostyzykler <i>Mastercycler[®] gradient</i>	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter (Typ: CG 842)	Schott AG / SI Analytics GmbH, Mainz
Pipetten <i>mLINE[®]</i> , Größen: 10 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Biohit Oyj, Helsinki, Finnland
Pipetten <i>Pipetman[®]</i> , Größen: 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA

Pipettierhelfer (<i>accu-jet</i> [®])	Brand, Wertheim
Präparatekästen	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Präparationsbesteck	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Präzisionswaage (Modell: Kern EW 4200-2NM)	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Real-Time PCR System (Stratagene Mx3000P TM)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Reinstwassersystem <i>arium</i> [®] 611	Sartorius, Göttingen
Rotationsmikrotom (Leica RM2245)	Leica Microsystems, Wetzlar
SDS-PAGE- und Blotting-Apparatus Mini-PROTEAN [®] II-Elektrophorese-System PROTEAN [®] II xi-Elektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sigma 1-15 Mikrozentrifuge	Vitaris AG, Baar, Schweiz
Spannungsgeräte(Elektrophorese): PowerPac Basic TM	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Spektrophotometer <i>NanoDrop</i> [®] ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Standautoklav (vertikal) 5075 ELV	Systec GmbH, Wetztenberg
Stereo Investigator 7	MicroBrightField Bioscience, Williston, USA
Stereotaktischer Rahmen	WPI (World Precision Instruments), Berlin
Stereomikroskop SMZ645	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Stoppuhren SKT338N	Oregon Scientific, Tualatin, Oregon, USA
Thermomixer <i>Comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Tierkäfige Mäuse	Tecniplast, Buguggiate, Italien
Tischkühlzentrifuge <i>Sigma 6K15</i>	Sartorius, Göttingen
Vaporizer - Isofluran	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
VideoMot2 - Video Tracking System	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Vortex Genie 2	neoLab Migge Laborbedarf GmbH, Heidelberg

Wärme- und Trockenschrank <i>Heraeus Function Line T 20</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Western Blot Imaging <i>Fluor Chem Q</i>	proteinsimple, Santa Clara, California, USA
Zentrifuge <i>5415D</i>	Eppendorf, Hamburg

8.3.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 8.3: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials

Deckgläser für die Mikroskopie Größen: 18x18 mm, 24x40 mm, 24x60 mm	Menzel, Braunschweig / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Eindeckmittel <i>Entellan</i>	Merck, Darmstadt
Eindeckmittel <i>Shandon Immu-MountTM</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Einbettkassetten (Rotilabo [®])	Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen (<i>Omnifix[®]</i> ; 5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritze (<i>BD PlastipakTM</i> ; 1 ml)	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Filtrierpapiere	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Gel blotting paper Type GB3000	Whatman GmbH, Dassel
Injektionskanülen (<i>100 Sterican[®]</i> ; Größen: 18 G, 26 G, 27 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Keramik-Kügelchen (<i>Precellys</i> ; 1, 4 mm)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Labortücher (<i>KIMTECH Science</i>)	Kimberly Clark, Dallas, Texas, USA
Latex-Untersuchungshandschuhe (puderfrei), Peha-soft [®]	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Nitril-Untersuchungshandschuhe (puderfrei), Nitra-Tex [®] EP	Ansell Limited, Richmond, Australia
Nitrocellulosemembran 0,45 μm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nitrocellulose Transfermembran PROTRAN [®]	Whatman GmbH, Dassel

Objektträger <i>Superfrost</i> [®] <i>Plus</i>	<i>Menzel-Gläser</i>	Menzel, Braunschweig / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PAP pen (ab2601)		Abcam plc, Cambridge, UK
PCR-Gefäße (0,2 ml; 8er-Streifen)		Starlab GmbH; Ahrensburg
Pipettenspitzen, Größen: 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l		Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (steril; RNase-, DNase-, Pyrogen-, DNA-frei), Größen: 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l		nerbe plus, Winsen/Luhe
Precellys Keramik-Kit 1,4 mm mit 2 ml Homogenisatorröhrchen		PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Reagiergefäße (1,5 ml; 2 ml) mit Deckelverschluß		Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße (2 ml) mit Schraubverschluß		Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Röhren, Größen: 50 ml, 15 ml		Sarstedt, Nümbrecht
Skalpellsklingen		Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg
Sterile Skalpellsklingen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Spritzen und Kanülen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Unterlagen <i>MoliNea</i> [®] <i>plus L</i> (40 x 60 cm)		Paul Hartmann AG, Heidenheim
Vernichtungsbeutel		Sarstedt, Nümbrecht
Weichholzgranulateinstreu		

8.4 Chemikalien und Bioreagenzien

Tabelle 8.4: Auflistung der verwendeter Chemikalien und Bioreagenzien

2-Methyl-butan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2-Propanol (Isopropanol, ROTISOLV [®] UV/IR-Grade)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
4-Toluidin-Salz (BCIP)	Roche Diagnostics, Mannheim
5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ABsolute TM QPCR Seal	Abgene, Epsom, UK
ABsolute TM QPCR-SYBR [®] -Green- ROX-Mix	Abgene, Epsom, UK
Acrylamid 2K-Solution (30%, Mix Acrylamid: Bisacrylamid; 37,5:1)	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat (Al ₂ O ₁₂ S ₃ x 16H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumacetat (CH ₃ COONH ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Azeton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bepanthen (Augen- und Nasensalbe)	Bayer Vital, Leverkusen
-Mercaptoethanol	Fluka (Sigma-Aldrich)
Biotherm TM 10x Buffer	GeneCraft / Ares Bioscience GmbH, Köln
Biotherm TM DNA-Polymerase	GeneCraft / Ares Bioscience GmbH, Köln
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2H ₂ O; 99%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Citronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O; ≥99,5%)	Roth, Karlsruhe
Chemilumineszenzsubstrat <i>Chemiglow</i>	Alpha Innotec, San Leandro, USA
Cobaltchlorid (CoCl ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete [®] Proteases-Inhibitor- Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DAB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkir- chen

DABCO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Desoxynucleosid-5'-triphosphate dNTP Mix 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Desoxyribonuklease I (DNase I; 3550 KU/mg Protein)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DIG DNA Labeling Mix, 10 x conc.	Roche Diagnostics, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
DPX <i>mounting medium</i>	Fluka, Neu-Ulm
Eosin G (gelblich)	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig, 100%)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (Rotipuran [®] $\geq 99,8\%$, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fetales Kälberserum (Gibco [®] , hitzeinaktiviert)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Flüssigstickstoff	Linde AG, Pullach
Gene Ruler TM (100 bp DNA Ladder)	Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada
GeneRuler [®] (1 kb-DNA-Ladder)	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glucoseoxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Guanidinisothiocyanat	Mobitec Molecular Biotechnology, Göttingen
Histoacryl	B. Braun, Melsungen

Hämalaunlösung (sauer nach Mayer)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Immersionsöl (für die Mikroskopie)	Merck KGaA, Darmstadt
Isofluran <i>Forene</i> ®	Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Kernechtrot (für die Mikroskopie)	Merck KGaA, Darmstadt
Ketamin (10%; 100 mg/ml)	Pharmanovo GmbH, Hannover
Loading Dye (6 x Solution)	Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada
Magnesiumchlorid (MgCl ₂), 25 mM	Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Metafectene transfection reagent	Biontex Laboratories, Martinsried
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega, Madison, Wisconsin, USA
NaCl-Lösung (0,9%)	Diaco, Triest, Italien
NaCl solution (0,9%, steril, für Injektion)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcitrat-Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Naturaflor® Milchpulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligo(dT)15 Primer	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Paraformaldehyd PFA (reinst)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Prestained SDS-PAGE Standard (Broad Range)	Bio-Rad, München
Proteinase K, rekombinant	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K, aus <i>Tritirachium album</i> (≥30 U/mg)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

RNase Inhibitor (<i>RNasin</i>)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RQ1 DNase Buffer (10x)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
RQ1 RNase Free DNaseI	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Salzsäure (HCl; 6 mol/l; 6 N Lösung)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sauerstoff	Linde AG, Pullach
Stop Solution	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Wasser, Rotisol [®] HPLC Gradient Grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Terminale Transferase (rekombinant)	Roche Diagnostics, Mannheim
Thermo-Fast [®] Platte, 96-Well	Abgene, Epsom, UK
Tris (PUFFERAN [®] $\geq 99,3\%$, Buffer Grade)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TWEEN [®] 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Wasser für Injektionszwecke (<i>Ampuwa</i>)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Xylazin (2%; 20 mg/ml)	Riemser Arzneimittel AG, Greifswald – Insel Riems
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ziegenserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

8.5 PCR-Amplifikate zur Genotypisierung von LFGEIIaCre-Versuchstieren

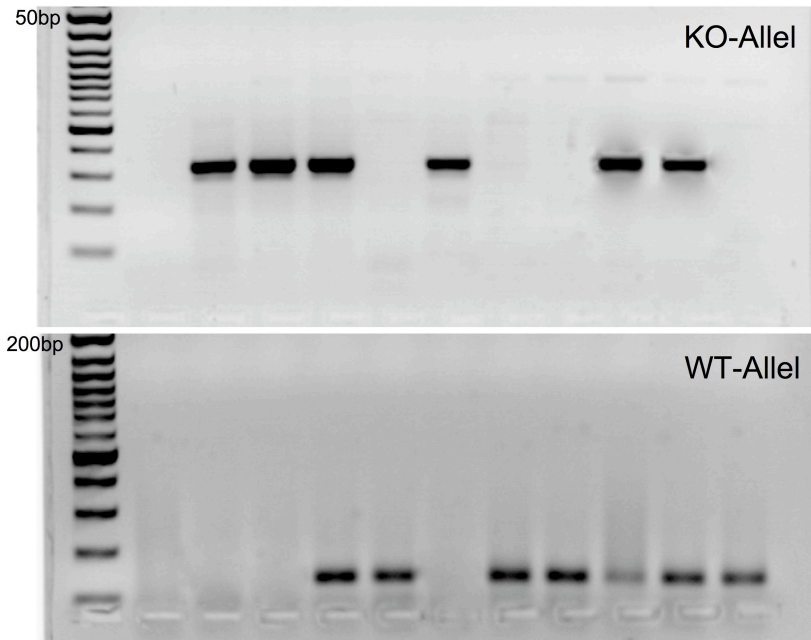


Abbildung 8.1: Agarosegelelektrophorese von PCR-Amplifikaten zur Genotypisierung von LFGEIIaCre-Versuchstieren

8.6 Stereotaktische Injektion

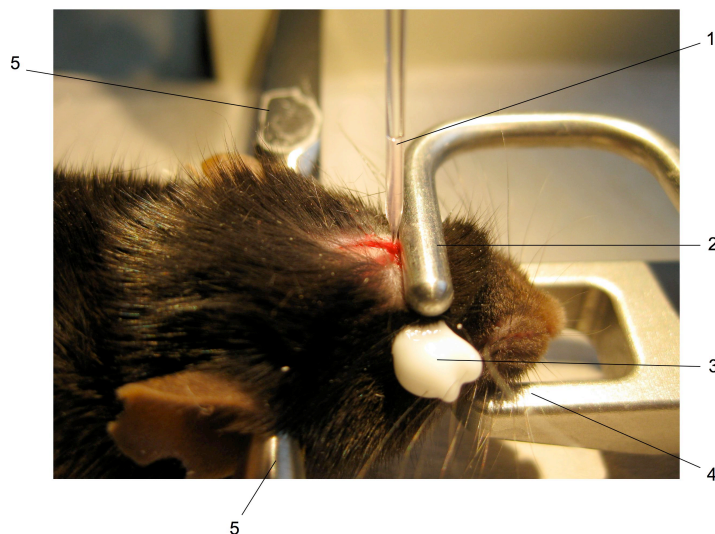


Abbildung 8.2: Versuchsaufbau der stereotaktischen Injektion. (1) Mit Mineralöl und Virus befüllte Glaskapillare; (2) Fixierungsbügel; (3) Auge mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe bedeckt; (4) Bügel für Oberkieferauflage; (5) Fixierungsbolzen an den Os mastoidii bds.

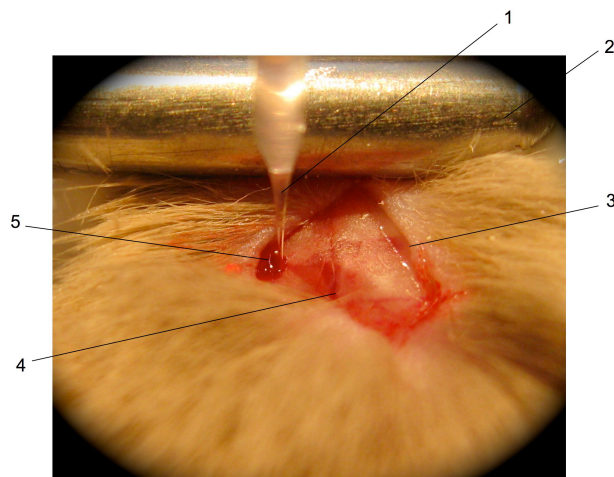


Abbildung 8.3: Anatomische Verhältnisse bei stereotaktischer Injektion mittels Bohrlochtrepantion. (5-fache Vergrößerung) (1) Mit Mineralöl und Virus befüllte Glaskapillare; (2) Fixierungsbügel; (3) Circa 0,5 cm langer Hautschnitt, median; (4) Bregma; (5) Bohrloch.

8.7 Position und Anatomie der Hirnsektionen

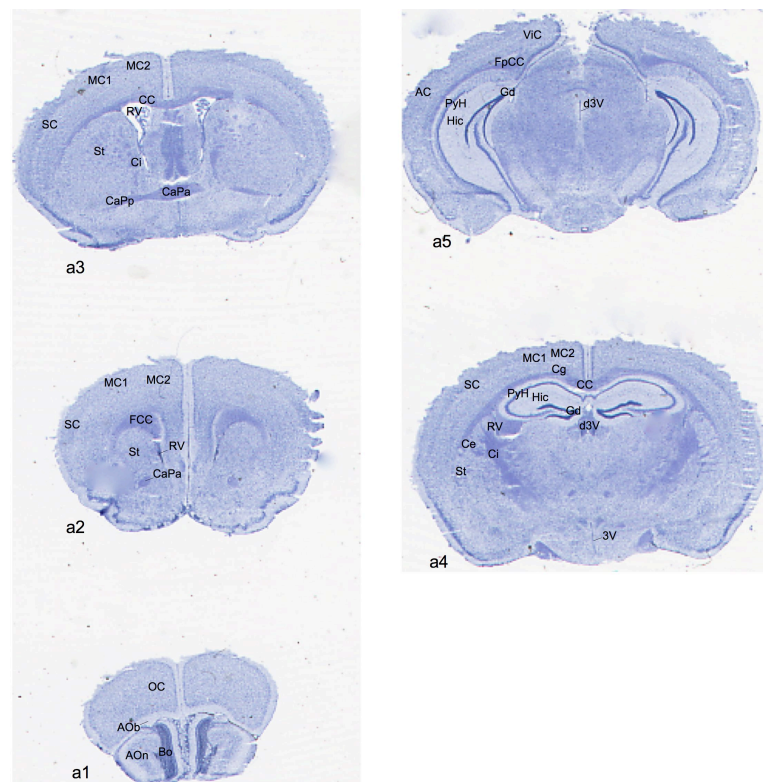


Abbildung 8.4: Position der koronaren Hirnschnitte in einer Kontrolle (*sham*) ohne Ischämie a1: +3, 14 mm (Bregma) *AOb* Accessorischer olfaktorischer Bulbus; *AOn* Anteriorer olfaktorischer Nukleus; *Bo* Bulbus olfactorius; *OC* Orbitaler Cortex; a2: +1, 70 mm (Bregma) *CaPa* Commissura anterior Pars anterior; *FCC* Forceps anterior des Corpus Callosum; *MC1* Primärer motorischer Kortex; *MC2* Sekundärer motorischer Kortex; *RV* Rechter Ventrikel; *SC* Somatosensorischer Kortex; *St* Striatum; a3: 0 mm (Bregma) *CaPa* Commissura anterior Pars posterior; *CaPp* Commissura anterior Pars posterior; *CC* Corpus callosum; *Ci* Capsula interna; *MC1* Primärer motorischer Kortex; *MC2* Sekundärer motorischer Kortex; *RV* Rechter Ventrikel; *SC* Somatosensorischer Kortex; *St* Striatum; a4: -1, 28 mm (Bregma) *3V* Dritter Ventrikel; *CC* Corpus callosum; *Ce* Capsula externa; *Cg* Cingulum; *Ci* Capsula interna; *d3V* dorsaler Anteil des dritten Ventrikels; *Gd* Gyrus dentatus; *Hic* Hippocampus; *MC1* Primärer motorischer Kortex; *MC2* Sekundärer motorischer Kortex; *PyH* Pyramidenzellschicht des Hippokampus; *RV* Rechter Ventrikel; *SC* Somatosensorischer Kortex; *St* Striatum; a5: -2, 75 mm (Bregma) *AC* Auditorischer Kortex; *d3V* dorsaler Anteil des dritten Ventrikels; *FpCC* Forceps posterior des Corpus Callosum; *Gd* Gyrus dentatus; *Hic* Hippocampus; *PyH* Pyramidenzellschicht des Hippokampus; *ViC* Visueller Kortex

8.8 *SNAP-Score*

Tabelle: 8.5: Richtlinien zur Durchführung des SNAP-Scores

A. Interaktion	Score					
	0	1	2	3	4	5
	Vermeidet berührt zu werden	Reagiert schnell nach kurzem Berühren	Erstarrt vor der Flucht	Reagiert erst nach mehrfachen Anstupsen	Bewegt nur den Kopf	Komatös
B. Käfig-Griff	Beide Pfoten lassen gleichzeitig los	CL Pfote lässt in <50% der Griffe als erstes los / Schwierigkeiten oder fehlender Griff bei einer anderen Pfote	CL Pfote lässt in >50% aber <100% der Griffe als erste los	CL Pfote lässt immer als erste los	CL Pfote greift nicht zu	gar kein Zugreifen
C. Visualisieren einer Fläche	Sobald Fläche identifiziert streckt sie den Rücken und streckt beide Vorderpfoten aus	Streckt zwar beide Vorderpfoten aus, die IL führt, verdreht den Körper, klopft mit der CL Pfote	Streckt hin und wieder die CL Pfote nicht aus	Streckt die CL Pfote nicht aus	Kopf nicht erhoben und streckt keine Pfoten aus	Komatös
D. Rennen und Kreiseln	Ungerichtet, verschiedene Richtungen	Erstarrt, kann aber in beide Richtungen laufen	Dreht sich meistens nur in eine Richtung	Rennt hartnäckig nur in eine Richtung	Enges Kreiseln	Rollt seitlich
E. Gang und Körperhaltung	Normaler Gang und Körperhaltung	Gelegentliche CL Abduktion einer Extremität, allerdings inkonstant oder auch IL sichtbar	CL Extremität beim Gang abduziert oder bleibt abduziert während Stand	CL Extremität gibt nach oder zu schwach, um das Gewicht zu halten	Hinterherziehen der Extremität	Liegend
F. Kopfschiefelage	keine Schiefelage	Fragliche Kopfschiefelage	Gelegentliche Kopfschiefelage auffällig	Offensichtliche Kopfschiefelage	Torticollis	Liegend

Richtlinien zur Durchführung des SNAP-Scores Fortsetzung

		Score					
		0	1	2	3	4	5
G. Gesichtsfeld	Reagiert auf visuellen Stimulus beidseits		Kein Reaktion einer ar-sonsten wachen und auf-merksamen Maus / andere Indikationen für normales Gesichtsfeld	<50% CL Reaktion und >50% IL Reaktion	Permanente positive IL Reaktion und permanente negative Reaktion CL	Keine Reaktion auf beiden Seiten und andere Anzeichen eines verminderten Gesichtsfelds	Komatös
H. Stabtest	Normal		Eine ansonsten wache und aufmerksame Maus hat Schwierigkeiten zu greifen oder unterlässt es / wirft den Stab / verliert den Griff CL	Greift gelegentlich nicht nach dem Stab mit CL Pfote	Greift regelmäßig nicht nach dem Stab mit CL Pfote	Benutzt die CL Pfoten nicht	Kann den Stab nicht greifen

Bei jedem der o.g. Tests A.-H. kann zwischen 0 und 5 Punkten vergeben werden. Der SNAP-Score ergibt sich aus der Summe der jeweiligen Testergebnisse. CL: kontralateral; IL: ipsilateral. (Modifiziert nach Shelton et al. (2008))

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jörg B. Schulz für die Bereitstellung der Ressourcen zur Durchführung der vorliegenden Arbeit sowie für die intensive Betreuung und Unterstützung in der Erstellungs- und Versuchsphase. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Matthias Endres der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin für die freundliche und hochkompetente Zusammenarbeit in den Räumen seines Labors am Campus Mitte und Charlottenburg.

Dr. med. Arno Reich, möchte ich für seine engagierte Betreuung während der Anlernphase von wissenschaftlichen Grundlagen und den Vorversuchen ebenso danken, wie für die Begleitung während der Versuchsdurchführung und Auswertung sowie der Strategieplanung und Erarbeitung der aus der vorliegenden Arbeit entstandenen Publikationen, welche diese Promotion sehr bereichert haben.

Ebenfalls gilt mein besonderer Dank Frau Dr. med. Karen Gertz und Herrn Prof. Dr. med. Golo Kronenberg der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin für ihr überaus großes Engagement in der Einarbeitung in die Versuchsmethodik der *Middle Cerebral Artery Occlusion* und die darauf folgende Aufarbeitung und molekularbiologische Auswertung der Ischämieversuche.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. Christoph Harms (*in-vitro*-Versuche), Dr. rer. nat. Anja Drinkut (stereotaktische Injektionen) und Dr. rer. nat. Ellen Gerhard (lentiviraler Vektor) für die intensive Einarbeitung und Unterstützung bzw. enge Kooperation.

Ohne die große Unterstützung durch die Medizinisch Technischen Assistenten wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Dafür einen herzlichen Dank an die beteiligten MTAs der ehemaligen Abteilung für Neurodegenerations- und Neurorestaurationsforschung der Georg-August-Universität Göttingen, der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Aachen und der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin.

Nicht zuletzt möchte ich dem ehemaligen Studiendekan der medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen, Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Hellige, und dem amtierenden Studiendekan der medizinischen Fakultät, Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Burckhardt, für die Bereitstellung der finanziellen Unterstützung im Rahmen des aus Studienbeiträgen finanzierten Exzellenzförderungsstipendiums *Gö4med* danken. Ebenso gilt mein Dank der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die jahrelange finanzielle und inhaltliche Unterstützung meiner Studien- und Forschungstätigkeiten.